https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
14rd Year, Vol. 14, No. 53, 2025 pp. 71-84
Received: 03/09/2022 Accepted: 04/01/2023

(Research Paper)

Effects of Cell-free Supernatant from *Lactobacillus Acidophilus* on Biofilm of Carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumonia* Isolates from Raw Milk

Ayoub Salehivand
Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
salehivand1400@gmail.com

Moslem Neyriz Naghadehi [1]
Department of Food Hygiene, Veterinary Medicine Faculty, Urmia Branch, Islamic Azad University,Urmia, Iran
mo.neyriz@iau.ac.ir

Abstract

The emergence and spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) is a serious concern in public health and food safety. Lactic acid bacteria (LAB) and their metabolite have been proposed as potential biocontrol agents in the removal of biofilm. In this regard, the present study aimed to investigate the effects of *Lactobacillus acidophilus* cell-free supernatant (CFS) on the biofilm of CRKP isolates from raw milk of Piranshahr city (Iran). One-hundred samples of raw milk were randomly collected from different areas of Piranshahr city with sterile conditions. Enrichment in BPW broth, streak on McConkey agar, and related metabolic tests were the methods used to isolate and identify *Klebsiella pneumoniae*. Identification of CRKP isolates was done by the disk diffusion method and using carbapenem antibiotics. The biofilm production ability of CRKP isolates and the biofilm removal activity of *L. acidophilus* CFS were performed by the microplate assay method. Twelve milk samples (12%) were contaminated with *K. pneumoniae*. Among the isolates, 5 isolates were resistant to doripenem (41.7%), 4 isolates to ertapenem (33.3%), 2 isolates to imipenem (16.7%), and 2 isolates to meropenem (16/7%). Two isolates were identified as CRKP. CRKP isolates were also recognized as moderate biofilm producers. Different concentrations of CFS reduced the biofilm of CRKP isolates in a concentration-dependent manner ($p<0.01$). *L. acidophilus* CFS reduced the biofilm of CRKP isolates in laboratory conditions. Therefore, it is suggested to evaluate the antibiofilm effects of *L. acidophilus* CFS on other foodborne pathogens.

Keywords: Cell-free Supernatant, *Lactobacillus Acidophilus*, Biofilm, Carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumoniae*, Raw Milk, Piranshahr City (Iran).

Introduction

*Corresponding Author
3060-7647/ © 2025 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
Salehivand, A., Neyriz Naghadehi, M. Effects of Cell-free Supernatant from Lactobacillus Acidophilus on Biofilm of Carbapenem-resistant Klebsiella Pneumonia Isolates from Raw Milk. *Journal of Microbial Biology*. 2025; 14(53): 71-84. doi:10.22108/BJM.2023.134951.1491

When milk is secreted in the animal's udder, it is potentially sterile. But when leaving the udder, it will be infected by microorganisms that enter the udder duct from the outside environment. Cases of mastitis and infections can heavily contaminate milk with microorganisms and may even make it unsuitable for consumption. During the preparation and transportation of milk in animal husbandry, various microorganisms, most of which are bacteria, may contaminate the milk. The degree of contamination and the type of bacterial population depends on the cleanliness of the collection containers, milking machines, tanks, and agitators. Lactic acid bacteria (LAB) and their production compounds have been proposed as potential biocontrol agents in biofilm removal. LABs are a diverse group of bacteria with a long history of use in food and medicine. *Lactobacillus* is a diverse genus of LAB bacteria. *Lactobacilli*, especially *Acidophilus* species, are among the most common probiotics known as a safe biological therapeutic agent. To this end, this study investigates the effects of *Lactobacillus acidophilus* cell-free supernatant (CFS) on the biofilm of CRKP isolates from raw milk of Piranshahr city (Iran).

Materials and Methods

One-hundred samples of raw milk were randomly collected from different areas of Piranshahr city with sterile conditions. Enrichment in BPW broth, streak on McConkey agar, and related metabolic tests were the methods used to isolate and identify *Klebsiella pneumoniae*. In the next step, the identification of CRKP isolates was done by the disk diffusion method and using carbapenem antibiotics. In additions, the biofilm production ability of CRKP isolates and the biofilm removal activity of *L. acidophilus* CFS were performed by the microplate assay method.

Research Findings

The results show that out of a total of 100 raw milk samples tested, 12 samples (12%) are infected with *Klebsiella pneumoniae*. In the present study, out of 12 isolates of *Klebsiella pneumoniae*, 5 isolates compared to doripenem (41.7%), 4 isolates compared to ertapenem (33.3%), 2 isolates compared to imipenem (16.7%) and 2 isolates compared to meropenem. (16.7 percent) were resistant. In addition, 2 isolates were resistant to carbapenem antibiotics and were identified as CRKP isolates. Among the isolates, 11 isolates (91.67%) were resistant or semi-sensitive to at least one of the carbapenems; while only one isolate (8.33%) was sensitive to carbapenems. This finding shows that 91.67% of *Klebsiella pneumoniae* isolates have a carbapenemase phenotype. Also, the isolates showed the highest resistance to doripenem (41.7%) and ertapenem (33.3%) and the highest sensitivity to imipenem (33.3%) and meropenem (22.2%). The results indicate that the tested concentrations of *Lactobacillus acidophilus* CFS significantly and concentration-dependently reduce the biofilm of CRPK isolates ($p<0.01$). Also, pure CFS (100% concentration) showed the highest percentage of biofilm reduction.

Discussion of Results and Conclusions

Klebsiella pneumoniae is an important opportunistic pathogen that causes several infectious diseases in humans, including septicemia, liver abscesses, diarrhea and pneumonia. In addition, a hospital-acquired pathogen is known to be associated with increased patient mortality. In addition to clinical environments, *Klebsiella pneumoniae* is mostly found in foods such as raw vegetables, powdered baby food, meat, fish, and prepared foods and is considered a foodborne pathogen. In addition to being important in medicine, this bacterium is also important in veterinary medicine due to mastitis in cows and uterus infection in mares.

10.22108/BJM.2023.134951.1491

زیست‌شناسی میکروبی
سال چهاردهم، شماره ۵۳، ۱۴۰۴، صفحه ۷۱-۸۴
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴

مقاله پژوهشی

اثرات پالیده عاری از سلول *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر بیوفیلم جدایه‌های مقاوم به کاربانپم *کلبسیلا پنومونیه* از شیرهای خام

ایوب صالحی وند
دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
salehivand1400@gmail.com

مسلم نیریز نقدهی *
دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
mo.neyriz@iau.ac.ir

چکیده

ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به کاربانپم *کلبسیلا پنومونیه* (CRKP) از نگرانی‌های جدی در بهداشت عمومی است. باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) و ترکیبات تولیدی آنها به‌عنوان عوامل بیوکنترل بالقوه در حذف بیوفیلم مطرح شده‌اند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات پالیده عاری از سلول (CFS) *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر بیوفیلم جدایه‌های CRKP از شیرهای خام شهرستان پیرانشهر صورت گرفت. ۱۰۰ نمونه شیرخام به‌صورت تصادفی از مناطق مختلف شهرستان پیرانشهر با رعایت شرایط سترون جمع‌آوری شدند. غنی‌سازی در آبگوشت BPW، کشت در آگار مک‌کانکی و نیز انجام آزمایش‌های متابولیکی مرتبط، روش‌های استفاده‌شده در جداسازی و شناسایی *کلبسیلا پنومونیه* بودند. شناسایی جدایه‌های CRKP به روش انتشار دیسک و با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های کاربانپم انجام شد. توانایی تولید بیوفیلم جدایه‌های CRKP و نیز فعالیت حذف بیوفیلم CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به روش سنجش میکروپلیت انجام شدند. ۱۲ نمونه شیر (۱۲ درصد)، آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند. از میان جدایه‌ها، ۵ جدایه نسبت به دوری‌پنم (۴۱/۷ درصد)، ۴ جدایه نسبت به ارتاپنم (۳۳/۳ درصد)، ۲ جدایه نسبت به ایمی‌پنم (۱۶/۷درصد) و ۲ جدایه نسبت به مروپنم (۱۶/۷ درصد) مقاوم بودند. ۲ جدایه به‌عنوان CRKP شناسایی شدند. همچنین، جدایه‌های CRKP تولیدکنندهٔ متوسط بیوفیلم تشخیص داده شدند. غلظت‌های مختلف CFS، بیوفیلم جدایه‌های CRKP را به‌صورت وابسته به غلظت کاهش دادند ($p<0/01$). CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، بیوفیلم جدایه‌های CRKP را در شرایط آزمایشگاهی کاهش داد؛ بنابراین، ارزیابی اثرات ضدبیوفیلم CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر سایر عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا پیشنهاد می‌شود.

واژه های کلیدی: پالیده عاری از سلول، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، بیوفیلم، *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به کاربانپم، شیرخام، پیرانشهر (ایران)

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

صالحی وند, ایوب, نیریز نقدهی, مسلم. اثرات پالیده عاری از سلول لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر بیوفیلم جدایه‌های مقاوم به کاربانپم کلبسیلا پنومونیه از شیرهای خام. *زیست شناسی میکروبی*. ۱۴۰۴; ۱۴(۵۳): ۷۱-۸۴. doi: 10.22108/bjm.2023.134951.1491

3060-7647/ © 2025 The Authors
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

مقدمه

زمانی که شیر در پستان حیوان ترشح می‌شود، بالقوه سترون است؛ اما در هنگام خروج از پستان توسط میکروارگانیسم‌هایی که از محیط خارج وارد مجرای پستان می‌شوند، آلوده خواهد شد. موارد ورم پستانی و عفونت‌ها شیر را به‌شدت به میکروارگانیسم‌ها آلوده کرده و حتی ممکن است آن را برای مصرف نامناسب کند. در هنگام تهیه و حمل‌ونقل شیر در دامداری، ممکن است میکروارگانیسم‌های مختلف که بیشتر آنها را باکتری‌ها تشکیل می‌دهند، شیر را آلوده کنند. میزان آلودگی و نوع جمعیت باکتریایی به نظافت ظروف جمع‌آوری، ماشین‌های شیردوشی، تانک‌ها، همزن‌ها بستگی دارد؛ حتی گفتنی است این سطوح می‌توانند شیر را بیشتر آلوده کنند. در یک دامداری که اصول بهداشتی رعایت می‌شود ممکن است تعداد باکتری‌های شیر از چند هزار در هر میلی‌لیتر تجاوز نکند؛ اما در صورتی که به موازین بهداشتی و سردکردن کافی شیر توجه نشود، تعداد باکتری‌ها از چند میلیون در هر میلی‌لیتر تجاوز خواهد کرد؛ بنابراین، نظافت مرتب و روزانه، ضدعفونی وسایل شیردوشی و سردکردن سریع شیر خام از عوامل مهم و مؤثر در کیفیت میکروبی شیر است (۱).

کلی‌فرم‌ها، از ارگانیسم‌های شاخص[۱] در میکروب‌شناسی مواد غذایی هستند. باکتری‌هایی هستند که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارند و بیشتر آنها در روده حیوانات خونگرم یافت می‌شوند. همچنین، بسیاری از عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا[۲] از اعضای خانواده انتروباکتریاسه هستند و ازطریق دستگاه روده‌ای دفع می‌شوند؛ بنابراین، حضور تعداد بالای کلی‌فرم‌ها در مواد غذایی می‌تواند برای پیشگویی وجود عوامل بیماری‌زای روده‌ای استفاده شوند. همچنین میزان بالای کلی‌فرم‌ها در مواد غذایی، می‌تواند عدم رعایت موازین بهداشتی[۳] در مراحل تولید را نشان دهد. حداقل چهار جنس باکتریایی در گروه کلی‌فرم قرار می‌گیرند که عبارت‌اند از *اشریشیا*[۴]، *کلبسیلا*[۵]، *سیتروباکتر*[۶] و *انتروباکتر*[۷]. کلی‌فرم‌ها ازنظر تعریف عبارت‌اند از باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی، غیرهاگزا، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری که لاکتوز را در ۳۵ درجه سانتی‌گراد در ۴۸ ساعت تخمیر و اسید و گاز تولید می‌کنند. این گروه از باکتری‌ها در حرارت پاستوریزاسیون از بین می‌روند و در محصولات پاستوریزه به‌عنوان شاخص بهداشتی و وجود آلودگی ثانوی بررسی می‌شوند (۲).

گونه‌های *کلبسیلا* باکتری‌هایی میله‌ای شکل، گرم منفی، غیرمتحرک، بی‌هوازی اختیاری و محصور در کپسول‌اند که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارند. این باکتری‌ها در طبیعت فراگیرند و هم در محیط و هم در دستگاه گوارش حیوانات و انسان‌ها به‌صورت فلور طبیعی حضور دارند؛ با وجود این، عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب هستند و می‌توانند باعث عفونت‌های بیمارستانی جدی مانند پنومونی[۸]، سپتی‌سمی[۹]، منتژیت[۱۰]، عفونت‌های دستگاه ادراری[۱۱] و بافت نرم، در کنار ورم پستان گاوی و متریت مادیان، آبسه‌های کبدی چرک‌زا[۱۲] در پستانداران شوند. گونه‌های *کلبسیلا* فاکتورهای حدت زیادی هستند که در بیماری‌زایی و عفونت‌زایی آنها دخالت دارند و عبارت‌اند از کپسول، لیپوپلی‌ساکارید، چسبنده‌های فیمبریال[۱۳] و غیرفیمبریال، سیدروفورها[۱۴] و توانایی تولید بیوفیلم (۳).

همچنین *کلبسیلا پنومونیه*[۱۵] به توانایی در تشکیل بیوفیلم شناخته شده است. بیوفیلم اجتماعی از باکتری‌های سازمان‌دهی‌شده در یک ماتریکس خارج سلولی هستند. این ماتریکس از پروتئین‌ها، اگزوپلی‌ساکاریدها، DNA و لیپوپپتیدها تشکیل شده است. نخستین‌بار LeChevallier و همکاران در سال ۱۹۸۸ *کلبسیلا پنومونیه* و پدیده تشکیل بیوفیلم را توصیف کردند. این باکتری دارای برخی عوامل بیماری‌زا مانند پلی‌ساکارید کپسولی، لیپوپلی‌ساکارید، فیمبریای نوع ۱ و نوع ۳، پروتئین‌های غشای خارجی و عوامل تعیین‌کننده برای جذب آهن و استفاده از منبع نیتروژن است. *کلبسیلا پنومونیه* از این فاکتورهای حدت برای بقا و فرار از سیستم ایمنی در طول عفونت و همچنین تشکیل بیوفیلم استفاده می‌کند. *کلبسیلا پنومونیه* می‌تواند یک لایه ضخیم از بیوفیلم

10.22108/BJM.2023.134951.1491

خارج سلولی تولید کند که از اتصال باکتری به سطوح زنده یا غیرزنده، پشتیبانی و از نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کند و اثرات آنها را کاهش می‌دهد (۴).

تکامل، گسترش و ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریایی یکی از مهم‌ترین مشکلات مراقبت‌های بهداشتی در سراسر جهان است. از دهه ۱۹۵۰، عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام درمان می‌شوند. به دنبال معرفی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با طیف وسیع، بتالاکتامازهای با طیف گسترده[۱۶] جدید ظهور کردند. در سال ۱۹۹۶ اولین کاربانماز[۱۷]، کدگذاری‌شده توسط ژن bla_{KPC}، در *کلبسیلا پنومونیه* شناسایی شد. سپس سایر ژن‌های کاربانماز مانند bla_{NDM}، bla_{OXA-48}، bla_{VIM} و bla_{IMP-1} ظهور کردند. بیشتر گزارش‌ها نشان می‌دهند حیوانات، محصولات غذایی و محیط نیز ممکن است مخازنی برای باکتری‌های تولیدکنندهٔ کاربانماز باشند (۵).

کاربانم‌ها دسته‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با طیف وسیعی از فعالیت ضدباکتریایی هستند و عموماً در برابر اکثر آنزیم‌های بتالاکتاماز تولیدشده توسط باکتری‌ها پایدار هستند؛ بنابراین، کاربانم‌ها به‌عنوان آخرین خط درمانی در برابر عفونت‌های باکتریایی ناشی از ارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو در نظر گرفته می‌شوند (۶).

مطالعات مراقبت جهانی نشان می‌دهند کسر قابل توجهی از جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از عفونت‌های بیمارستانی[۱۸] فعالیت‌های بتالاکتامازی با طیف گسترده و کاربانمازی نشان می‌دهند. پراکندگی بومی *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به کاربانم (CRKP)[۱۹] در سرتاسر جهان گزارش شده است. یونان، ایتالیا و رومانی بالاترین میزان شیوع CRKP را در مقایسه با سایر کشورهای اروپایی دارند (۷).

باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)[۲۰] و ترکیبات تولیدی آنها به‌عنوان عوامل بیوکنترل بالقوه در حذف بیوفیلم مطرح شده‌اند. LAB، گروه متنوعی از باکتری‌ها هستند که تاریخچه طولانی استفاده در مواد غذایی و پزشکی دارند. *لاکتوباسیلوس‌ها* از جنس‌های متنوع باکتری‌های LAB هستند. *لاکتوباسیلوس‌ها* به‌خصوص گونه *اسیدوفیلوس* از رایج‌ترین پروبیوتیک‌ها هستند که به‌عنوان یک عامل درمانی بیولوژیکی ایمن (GRAS)[۲۱] شناخته می‌شود؛ همچنین برای تقویت پاسخ‌های ایمنی میزبان نیز استفاده می‌شود. مکانیسم‌های مختلفی وجود دارد که *لاکتوباسیلوس‌ها* می‌توانند فعالیت ضدمیکروبی خود را اعمال کنند؛ از جمله تولید ترکیبات بازدارنده، تحریک سیستم ایمنی، رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا برای اتصال به گیرنده و رقابت روی مواد مغذی. ترکیبات بازدارنده تولیدشده توسط *لاکتوباسیلوس‌ها* شامل اسیدهای آلی مانند اسیدلاکتیک[۲۲]، اسیداستیک[۲۳] و اسیدفرمیک[۲۴]، باکتریوسین‌ها و پراکسید هیدروژن می‌شود. به‌طور کلی، این ترکیبات ضدمیکروب در طول تکثیر باکتری در محیط کشت مایع ترشح می‌شوند و با عنوان سوپرناتانت یا پالیده[۲۵] شناخته می‌شوند. *لاکتوباسیلوس‌ها* ازطریق این مکانیسم‌های ضدمیکروبی، فعالیت‌های آنتاگونیستی خود را در برابر باکتری‌های بیماری‌زای مختلف از جمله انتروباکتریاسه‌های مقاوم به کاربانم[۲۶] (CRE)، *هلیکوباکتر پیلوری*[۲۷]، *سالمونلا*[۲۸]، *شیگلا*[۲۹]، *سودوموناس آیروجینوزا*[۳۰] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[۳۱] نشان داده‌اند (۸). همچنین، در مطالعاتی اثر حذف بیوفیلم پالیده باکتری‌های اسیدلاکتیک در برابر عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا گزارش شده است (۹-۱۲).

در این راستا، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی تأثیر پالیده عاری از سلول *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر بیوفیلم جدایه‌های مقاوم به کاربانم *کلبسیلا پنومونیه* از شیرهای خام شهرستان پیرانشهر انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی *کلبسیلا پنومونیه*: در این بررسی، تعداد ۱۰۰ نمونه شیرخام به‌صورت تصادفی از مناطق مختلف

10.22108/BJM.2023.134951.1491

شهرستان پیرانشهر در ظروف سترون، جمع‌آوری و با رعایت شرایط سرد به آزمایشگاه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی منتقل شدند. ابتدا نمونه‌ها در آبگوشت آب پپتونه بافری (BPW)[۳۲] (کیولب، کانادا) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت غنی‌سازی شدند. سپس در آگار مک‌کانکی[۳۳] (کیولب، کانادا) کشت خطی داده و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پرگنه‌های صورتی رنگ و موکوئیدی ظاهرشده، در آگار مغذی خالص‌سازی و آزمایش‌های متابولیکی تولید اندول (-)، متیل رد (-)، وژئز پروسکائر (+)، مصرف سیترات (+)، سولفید هیدروژن (-)، اوره‌آز (+)، لیزین دکربوکسیلاز (+)، اورنیتین دکربوکسیلاز (-)، فنیل آلانین دآمیناز (-)، رشد در آبگوشت KCN (+)، حرکت (-)، تولید اسید و گاز از قندهای گلوکز (+)، ساکارز (+)، لاکتوز (+) و دولسیتول (-) برای شناسایی *کلبسیلا پنومونیه* انجام شدند (۱۳-۱۵).

شناسایی جدایه‌های مقاوم به کاراباپنم *کلبسیلا پنومونیه*: برای شناسایی جدایه‌های مقاوم به کاربا‌پنم *کلبسیلا پنومونیه* از آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم[۳۴] (۱۰ میکروگرم)، مروپنم[۳۵] (۱۰ میکروگرم)، دوری‌پنم[۳۶] (۱۰ میکروگرم) و ارتاپنم[۳۷] (۱۰ میکروگرم) (شرکت پادتن طب، ایران) به روش انتشار دیسک[۳۸] استفاده شد. ابتدا جدایه‌ها در آگار مغذی (کیولب، کانادا) کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس پرگنه‌ها در سالین سترون پراکنده شدند و کدورت سوسپانسیون با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند به‌صورت چشمی تنظیم شد. در مرحله بعد، سوسپانسیون آماده‌شده روی آگار مولر هینتون[۳۹] (کیولب، کانادا) با استفاده از سوآب معمولی سترون به‌صورت سطحی کشت داده شد و در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی روی آن قرار داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و قطر منطقه مهاری[۴۰] با استفاده از کولیس (برحسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. سپس براساس دستورالعمل مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی[۴۱] (CLSI) نتایج به‌صورت حساس[۴۲] (S)، نیمه‌حساس[۴۳] (I) و مقاوم[۴۴] (R) برای هر آنتی‌بیوتیک ثبت شد (۱۶، ۱۷).

سنجش توانایی تولید بیوفیلم جدایه‌های CRPK: ارزیابی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های CRKP به روش سنجش میکروپلیت انجام شد (۱۸، ۱۹). برای این منظور، از میکروپلیت‌های سترون ۲۴ چاهکی کف صاف و درب‌دار از جنس پلی‌استیرن استفاده شد. برای تهیه تلقیح باکتریایی، ابتدا جدایه‌ها در آبگوشت مغذی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری سوسپانسیون باکتریایی روی جذب نوری[۴۵] (OD) ۰/۱ تنظیم و تعداد تقریبی 10^7 CFU/ml به دست آمد. در مرحله بعد، به هریک از چاهک‌ها ۱/۸ میلی‌لیتر آبگوشت TSB[۴۶] (کیولب، کانادا) و ۰/۲ میلی‌لیتر از تلقیح باکتریایی افزوده شد. همچنین، به‌عنوان شاهد منفی به چاهک‌ها آبگوشت سترون ریخته شد. میکروپلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد، سوسپانسیون درون چاهک‌ها تخلیه و جذب نوری فاز پلانکتونی[۴۷] در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس چاهک‌ها با محلول بافر فسفات سالین[۴۸] (PBS) سه بار شستشو و در دمای محیط خشک شدند. در مرحله بعد، به مقدار ۲ میلی‌لیتر کریستال ویوله[۴۹] یک درصد به چاهک‌ها ریخته شد و رنگ‌آمیزی به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت. سپس رنگ اضافی چاهک‌ها با آب مقطر شستشو داده شد و در دمای محیط خشک شدند. در ادامه، برای محلول‌کردن بیوفیلم رنگ‌آمیزی‌شده، ۲ میلی‌لیتر اتانول مطلق به چاهک‌ها افزوده شد. سپس جذب نوری بیوفیلم در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. شاخص تشکیل بیوفیلم[۵۰] (SBF) هر جدایه با فرمول زیر محاسبه شد و با استفاده از جدول ۱ تفسیر شدند (۱۹). آزمایش‌ها روی جدایه‌ها و نیز شاهد منفی در سه

تکرار انجام شدند.

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

AB: جذب نوری بیوفیلم رنگ‌آمیزی‌شده

CW: جذب نوری شاهد منفی

G: جذب نوری فاز پلانکتونی

جدول ۱- تفسیر شاخص تشکیل بیوفیلم

Table 1- Interpretation of the Biofilm Formation Index

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

تهیه پالیده عاری از سلول (CFS) *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

: ابتدا *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643 در آبگوشت MRS (مرک، آلمان) و در انکوباتور دی‌اکسیدکربن به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی، با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. با رعایت شرایط سترون، محلول رویی جداسازی و با فیلتر سرنگی با قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر صاف شد. سپس غلظت‌های ۱ درصد، ۱۰ درصد و ۱۰۰ درصد (خالص) در آبگوشت TSB سترون تهیه شدند (۱۸).

ارزیابی فعالیت حذف بیوفیلم CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر جدایه‌های CRPK:

این آزمایش به روش سنجش میکروپلیت انجام شد. ابتدا به مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر از آبگوشت TSB و سپس به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از تلقیح باکتریایی آماده‌شده به چاهک‌ها افزوده شدند. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سوسپانسیون باکتریایی چاهک‌ها با دقت تخلیه و با محلول PBS شستشو و در دمای محیط خشک شدند. سپس غلظت‌های ۱ درصد، ۱۰ درصد و ۱۰۰ درصد (خالص) از CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به مقدار ۲ میلی‌لیتر در چاهک‌ها افزوده و در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد، CFS از چاهک‌ها تخلیه و با محلول PBS شستشو و در دمای محیط خشک شد. سپس چاهک‌ها با ۲ میلی‌لیتر از محلول کریستال ویولت یک درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و رنگ اضافی چاهک‌ها با آب مقطر شستشو و خشک شد. در مرحله بعد، بیوفیلم رنگ‌آمیزی‌شده با ۲ میلی‌لیتر اتانول مطلق محلول شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در چاهک‌های شاهد منفی، فقط آبگوشت TSB و در چاهک‌های شاهد، آبگوشت TSB و تلقیح باکتریایی افزوده شدند (۱۸). آزمایش‌ها روی جدایه‌ها، شاهد منفی و نیز شاهد در سه تکرار انجام شدند.

$$\text{درصد کاهش بیوفیلم} = \frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)} \times ۱۰۰$$

C: جذب نوری چاهک‌های شاهد

B: جذب نوری چاهک‌های شاهد منفی

T: جذب نوری چاهک‌های تیمارشده

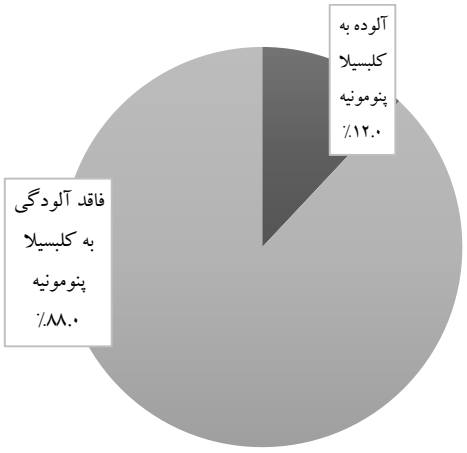
روش تجزیه آماری داده‌ها: تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS[51] نسخه ۲۵ انجام گرفت. یافته‌های توصیفی متغیرهای مطالعه‌شده شامل میانگین، انحراف معیار، فراوانی مطلق و نسبی محاسبه و گزارش شدند. همچنین با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی اختلاف میانگین درصد کاهش تولید بیوفیلم جدایه‌های CRKP متأثر از غلظت‌های مختلف CSF *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بررسی شد. گفتنی است در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، خطای مجاز برای رد فرض صفر (H_0)، ۵ درصد در نظر گرفته شد. همچنین رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۹ صورت گرفت.

نتایج

فراوانی مطلق و نسبی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه*

10.22108/BJM.2023.134951.1491

از نمونه‌های شیر: نتایج نشان می‌دهند از مجموع ۱۰۰ نمونه شیرخام آزمایش‌شده، ۱۲ نمونه (۱۲ درصد) آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* هستند (شکل ۱).



شکل ۱- فراوانی نسبی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های شیر

Figure 1- Relative frequency of *Klebsiella pneumoniae* isolates from milk samples

شناسایی جدایه‌های مقاوم به کاربانم *کلبسیلا پنومونیه*: در تحقیق حاضر از ۱۲ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*، ۵ جدایه نسبت به دوری‌پنم (۴۱/۷ درصد)، ۴ جدایه نسبت به ارتاپنم (۳۳/۳ درصد)، ۲ جدایه نسبت به ایمی‌پنم (۱۶/۷ درصد) و ۲ جدایه نسبت به مروپنم (۱۶/۷ درصد) مقاوم بودند. همچنین ۲ جدایه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربانم مقاوم بودند و به‌عنوان جدایه‌های CRKP شناسایی شدند. از میان جدایه‌ها، ۱۱ جدایه (۹۱/۶۷ درصد) حداقل نسبت به یکی از کاربانم‌ها، مقاوم یا نیمه‌حساس بودند؛ درحالی‌که فقط یک جدایه (۸/۳۳ درصد) نسبت به کاربانم‌ها حساس بود. این یافته نشان می‌دهد ۹۱/۶۷ درصد از جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* دارای فنوتیپ کاربانمازی هستند. همچنین جدایه‌ها بیشترین مقاومت را به دوری‌پنم (۴۱/۷ درصد) و ارتاپنم (۳۳/۳ درصد) و بیشترین حساسیت را به ایمی‌پنم (۳۳/۳ درصد) و مروپنم (۲۲/۲ درصد) نشان دادند (جدول ۲ و شکل ۲).

فراوانی مطلق و نسبی توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های CRPK: با توجه به بررسی نتایج شاخص تشکیل بیوفیلم، هر دو جدایه CRKP (۱۰۰ درصد)، تولیدکنندهٔ متوسط بیوفیلم تشخیص داده شدند.

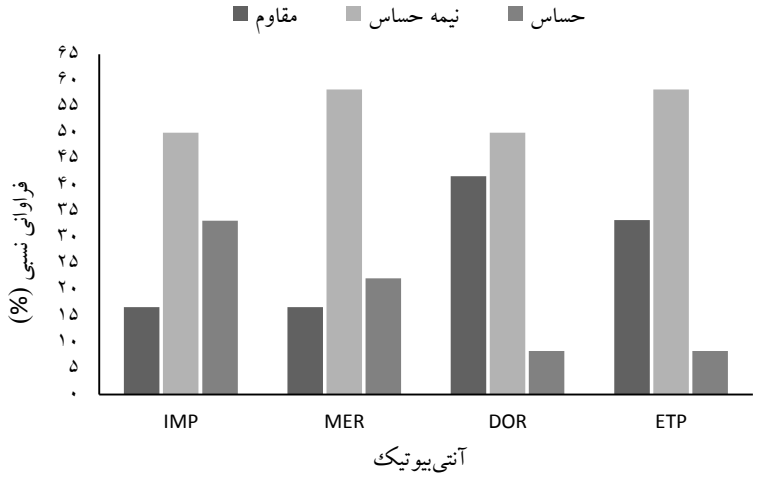
فعالیت حذف بیوفیلم CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر جدایه‌های CRPK: نتایج حاکی است غلظت‌های آزمایش‌شدهٔ CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیوفیلم جدایه‌های CRPK را به‌صورت معنی‌دار و وابسته به غلظت کاهش می‌دهند ($p<0/01$). همچنین CFS خالص (غلظت ۱۰۰ درصد)، بالاترین درصد کاهش بیوفیلم را نشان داد (شکل ۳).

جدول ۲- آنتی‌بیوگرام جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های شیر

Table 2- Antibiogram of *Klebsiella pneumoniae* isolates from milk samples

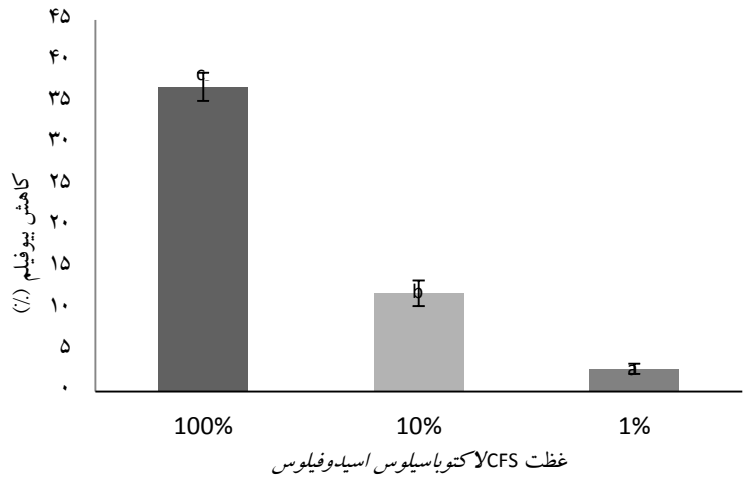
آنتی‌بیوتیک	علامت اختصاری	حساس		نیمه‌حساس		مقاوم	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
ایمی‌پنم	IPM	۴	۳۳/۳	۶	۵۰/۰	۲	۱۶/۷
مروپنم	MER	۳	۲۲/۲	۷	۵۸/۳	۲	۱۶/۷
دوری‌پنم	DOR	۱	۸/۳	۶	۵۰/۰	۵	۴۱/۷
ارتاپنم	ETP	۱	۸/۳	۷	۵۸/۳	۴	۳۳/۳

10.22108/BJM.2023.134951.1491



شکل ۲- آنتی‌بیوگرام جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از نمونه‌های شیر

Figure 2- Antibiogram of *Klebsiella pneumoniae* isolates from milk samples



شکل ۳- میانگین± انحراف معیار درصد کاهش بیوفیلم جدایه‌های CRPK متأثر از CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (حروف نامشابه در ستون‌ها نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ است)

Figure 3- Mean ± standard deviation of biofilm reduction percentage of CRPK isolates affected by CFS of *Lactobacillus acidophilus* (dissimilar letters in columns indicate significant differences at the $p<0.05$ level)

بحث و نتیجه‌گیری

کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرصت‌طلب مهم است که بیماری‌های عفونی متعددی در انسان‌ها از جمله سپتی‌سمی، آبسه‌های کبدی، اسهال و پنومونی را سبب می‌شود. همچنین یک عامل بیماری‌زای اکتسابی از بیمارستان شناخته می‌شود که با افزایش مرگ‌ومیر بیماران در ارتباط است. *کلبسیلا پنومونیه* علاوه بر محیط‌های بالینی، بیشتر در غذاها از جمله سبزی‌های خام، غذاهای پودری کودکان، گوشت، ماهی، غذاهای آماده یافت می‌شود و به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای منتقله از غذا در نظر گرفته می‌شود (۲۰). در کنار اهمیت در پزشکی، این باکتری به سبب ایجاد ورم پستان در گاو و عفونت رحم مادیان در دامپزشکی نیز اهمیت دارد (۳).

در زمینهٔ میزان شیوع *کلبسیلا پنومونیه* در شیر و فرآورده‌های شیر مطالعات متعددی انجام شده است. در یک مطالعه در استان‌های جیانگ‌سو و شان دونگ چین، از

مجموع ۸۵۷ نمونه شیر خام آزمایش‌شده (۸۰۰ نمونه شیر سالم و ۵۷ نمونه شیر ورم پستانی)، ۶۶ نمونه (۷/۷ درصد) آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر در شهر آنکارای ترکیه از مجموع ۸۰ نمونه شیر و محصولات شیر آزمایش‌شده، ۲۵ نمونه (۳۱/۲۵ درصد) آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند (۲۲). همچنین در بررسی دیگر در شهرکرد ایران، از ۱۳۰ نمونه شیر ورم پستانی آزمایش‌شده، ۲۰ نمونه (۱۵/۳۸درصد) آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند (۲۳). در تحقیق کنونی از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر خام شهرستان پیرانشهر، ۱۲ نمونه (۱۲درصد) آلوده به *کلبسیلا پنومونیه بودند*. یافته‌های مطالعه حاضر با یافته‌های یانگ و همکاران در سال ۲۰۲۱ (۲۱)، گون دوغان و یاکار در سال ۲۰۰۶ (۲۲) و نیز کریمی و ممتاز در سال ۲۰۱۹ (۲۳) در زمینهٔ آلودگی شیر خام به *کلبسیلا پنومونیه* در یک راستا است؛ اما میزان آلودگی متفاوت بوده است و به رعایت موازین بهداشتی در مراحل تولید شیر و نیز وقوع ورم پستان در گله بستگی دارد. به‌طورکلی، برای کاهش آلودگی‌های میکروبی شیر خام، اجرای برنامه‌های مبارزه با ورم پستان در گله، نظافت و ضدعفونی مرتب و روزانه تجهیزات و وسایل شیردوشی و مخازن نگهداری شیر خام و نیز خنک‌سازی سریع شیر خام در دامداری پیشنهاد می‌شود.

وقوع ورم پستان در گله‌های شیری و نیز استفاده از درمان‌های آنتی‌بیوتیکی بدون برنامه، خطر ظهور و گسترش باکتری‌های مقاوم به چند دارو[۵۲] (MDR) در شیر و فرآورده‌های آن را افزایش داده و به‌عنوان یک تهدید بالقوه برای امنیت غذایی و بهداشت عمومی مطرح است (۲۱). کاربابنم‌ها به‌دلیل طیف وسیع فعالیت و پایداری در مقابل آنزیم بتالاکتاماز، در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به پنی‌سیلین و سفالوسپورین استفاده می‌شوند (۲۴)؛ با وجود این، ظهور ژن‌های تولیدکنندهٔ بتالاکتاماز با توانایی هیدرولیز کاربابنم (کاربابنماز) به‌خصوص در میان باکتری‌های انتروباکتریاسه درحال گسترش است که می‌تواند مشکلات جدی در درمان عفونت‌ها را ایجاد کند (۲۵). آنزیم KPC (کاربابنماز *کلبسیلا پنومونیه*)، یکی از آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ کاربابنم است که توسط پلاسمیدها انتقال می‌یابد و می‌تواند به سرعت بین باکتری‌ها مبادله و باعث مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود (۲۴، ۲۵). مطالعات محدودی در زمینهٔ میزان شیوع *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به کاربابنم در شیر خام وجود دارد. در یک تحقیق، فعالیت کاربابنمازی ۴۷ جدایه تولیدکنندهٔ ESBL (۴۱ جدایه *اشریشیاکلی* و ۶ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*) از ۱۵۰ نمونه شیر خام منطقه دریای سیاه ترکیه مطالعه شد. بررسی فنوتیپی نشان داد از ۴۷ جدایه، ۷ جدایه نسبت به ایمی‌پنم یا مروپنم مقاوم‌اند. سنجش PCR نشان داد ۳۳ جدایه از ۴۷ جدایه، حامل حداقل یکی از ژن‌های اصلی کاربابنماز هستند (۲۶). در تحقیق حاضر، از ۱۲ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* از شیر خام، ۱۱ جدایه (۹۱/۶۷ درصد)، حداقل نسبت به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های کاربابنم، مقاوم یا نیمه‌حساس بودند؛ درحالی‌که فقط یک جدایه (۸/۳۳ درصد) نسبت به کاربابنم‌ها حساس بود. این نشان می‌دهد ۹۱/۶۷ درصد جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از شیرهای شهرستان پیرانشهر دارای فنوتیپ کاربابنمازی هستند. همچنین دو جدایه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربابنم مقاوم بودند و به‌عنوان جدایه‌های CRKP شناسایی شدند. نتایج مطالعه حاضر با نتایج اویانلیک و همکاران در سال ۲۰۲۲ در زمینهٔ شیوع جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با فعالیت کاربابنمازی در شیر خام مشابه است؛ اما میزان شیوع بستگی به نحوه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای مختلف دارد. اجرای برنامه‌های مبارزه با اورام‌پستان در گله‌های شیری زیرنظر دامپزشک و اجتناب از استفاده بی‌رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها پیشنهاد می‌شود.

تشکیل بیوفیلم یک فاکتور حدت در *کلبسیلا پنومونیه* است (۳). در یک مطالعه، مشاهده شد جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت دارویی چندگانه در میان تولیدکنندگان ضعیف بیوفیلم (۹۷/۹ درصد) بسیار متداول‌تر از

تولیدکنندگان قوی بیوفیلم (۷۶ درصد) هستند. همچنین نشان داده شد جدایه‌های مقاوم به کارباپنم *کلبسیلا پنومونیه*، ۹۱ درصد کمتر تمایل به تشکیل بیوفیلم قوی دارند. همچنین رابطه معکوس معنی‌داری بین تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش شد (۲۷). در تحقیق حاضر دو جدایه CRKP، تولیدکنندهٔ بیوفیلم متوسط تشخیص داده شدند؛ این یافته با یافته‌های کازومانو و همکاران در سال ۲۰۱۹ در یک راستا است. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد فاکتورهای حدت در میکروارگانیسم‌ها با توجه به شرایط زیست و برای حفظ بقا دست‌خوش تغییراتی می‌شوند.

با توجه به ماهیت پیچیده و مقاوم بیوفیلم‌ها، یافتن راه‌های جایگزین برای پاک‌سازی بیوفیلم‌ها مدنظر محققان قرار گرفته است که در این راستا، ترکیبات مشتق‌شده از گیاهان، پپتیدهای ضدمیکروبی از منابع مختلف و پروبیوتیک‌ها مطرح شده‌اند. در سال‌های گذشته، علاقه بیشتری به استفاده موضعی از پروبیوتیک‌ها برای غلبه بر مشکل مقاومت آنتی‌بیوتیکی مرتبط با بیوفیلم وجود داشته است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی مصرف شوند، اثرات سلامت‌زایی برای میزبان خواهند داشت. در میان باکتری‌های اسید لاکتیک، *لاکتوباسیلوس‌ها* بزرگ‌ترین جنس و پرمصرف‌ترین گونه‌های پروبیوتیکی را شامل می‌شوند و ازنظر مقررات غذایی ایمن (GRAS) شناخته می‌شوند (۲۸).

پست‌بیوتیک‌ها[۵۳] فرآورده‌های محلول یا متابولیت‌های ترشح‌شدهٔ پروبیوتیک‌ها هستند که قادر به ایجاد اثرات سودمند فیزیولوژیکی با مکانیسم‌های مستقیم یا غیرمستقیم هستند. پست‌بیوتیک‌ها فرآورده‌های متابولیکی جانبی سلول‌های پروبیوتیکی زنده از جمله سوپرناتانت بدون سلول (CFS)، پروتئین‌های ترشح‌شده، باکتریوسین‌ها، اسیدهای آلی و بیوسورفکتانت‌های ترشح‌شده[۵۴] (BS) را شامل می‌شوند (۲۹). سوپرناتانت بدون سلول *لاکتوباسیلوس‌ها* ترکیبی از متابولیت‌های با وزن مولکولی پایین (اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و روترین) و بالا (باکتریوسین‌ها و پلی‌پپتیدهای شبه باکتریوسین) است (۳۰).

چندین یافته نشان می‌دهند CFS مشتق‌شده از *لاکتوباسیلوس* به‌عنوان یک مایع پاک‌کنندهٔ زیستی عمل می‌کند که چسبندگی و تشکیل بیوفیلم پاتوژن‌ها روی سطوح زنده و غیرزنده را کاهش می‌دهد. در یک مطالعه، غلظت‌های مختلف مایع فیلترشده بدون سلول *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* اثرات ضدبیوفیلم و تعدیل‌کنندهٔ سیستم ایمنی را نشان دادند (۳۱). در مطالعه‌ای دیگر، تشکیل بیوفیلم جدایه‌های تولیدکنندهٔ ESBL *کلبسیلا پنومونیه* در حضور سوپرناتانت‌های *لاکتوباسیلوس* به‌طور چشمگیری کاهش یافت. همچنین پراکسید هیدروژن موجود در سوپرناتانت، یک محصول مؤثر در برابر رشد و تشکیل بیوفیلم *کلبسیلا پنومونیه* شناخته شد (۳۲). در یک بررسی، CFS *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* جداشده از کفیر اثرات ضدبیوفیلم در برابر جدایه‌های MDR *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد (۳۳). در بررسی دیگر، سوپرناتانت گونه‌های *لاکتوباسیلوس* در برابر انتروباکتریاسه‌های مقاوم به کارباپنم فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان داد (۳۴). نتایج مطالعه حاضر نشان دادند CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* اثر ضدبیوفیلم در برابر جدایه‌های CRKP دارد که نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات بالا، در زمینهٔ اثرات ضدبیوفیلم CFS *لاکتوباسیلوس‌ها* بر جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *کلبسیلا پنومونیه*، مشابه و در یک راستا هستند؛ بنابراین، از یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* دارای اثرات حذف بیوفیلم بر جدایه‌های مقاوم به کارباپنم *کلبسیلا پنومونیه* در شرایط آزمایشگاهی است. ارزیابی اثرات ضدبیوفیلم CFS *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر سایر عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

مقاله پژوهشی حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی است و نویسندگان مقاله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه و مسئول محترم آزمایشگاه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی جناب مهندس باقری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

(1) Guity K. Hygiene and Technology of Milk. 4th ed. Tehran: Tehran University Publications; 2020: 39-54.

(2) McLandsborough LA. Food Microbiology Laboratory. 1st ed. CRC Press LLC. 2005:33-40.

(3) Ammar AM, Abd El-Hamid MI, Gomaa NA. Prevalence, Antimicrobial resistance and biofilm formation of Klebsiella Pneumoniae isolated from human and cows. Zagazig Veterinary Journal. 2021;49(2):27-41. https://dx.doi.org/10.21608/zvjz.2021.51857.1126

(4) Nirwati H, Sinanjung K, Fahrunissa F, Wijaya F, Napitupulu S, Hati VP, Hakim MS, Meliala A, Aman AT, Nuryastuti T. Biofilm formation and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. BMC Proceedings. 2019;13(11):20. https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7

(5) Lepuschitz S, Schilla S, Stoeger A, Pekard-Amenitsch S, Huhulescu S, Inreiter N, Hartl R, Kerschner H, Sorschag S, Springer B, Brisse S. Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. Journal of Science of the Total Environment. 2019; 662: 227-235. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.179

(6) Laolerd W, Akeda Y, Preeyanon L, Ratthawongjirakul P, Santanirand P. Carbapenemase-producing carbapenem-resistant enterobacteriaceae from Bangkok, Thailand, and their detection by the carba NP and modified carbapenem inactivation method tests. Microbial Drug Resistance. 2018;24(7):1006-1011. https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0080

(7) Di Domenico EG, Cavallo I, Sivori F, Marchesi F, Prignano G, Pimpinelli F, Sperduti I, Pelagalli L, Di Salvo F, Celesti I, Paluzzi S. Biofilm production by carbapenem- resistant Klebsiella pneumonia significantly increases the risk of death in oncological patients. Journal of Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020;10:561741. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.561741

(8) El-Mokhtar MA, Hassanein M, Ahmed AS, Gad GFM, Amin MM, Hassanein OFE. Antagonistic activities of cell-free supernatants of Lactobacilli against extended-spectrum β-lactamase producing Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. Infect Drug Resist. 2020;13:543–552. https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2147/IDR.S235603

(9) Wang HH, Ye KP, Zhang QQ, Dong Y. Biofilm formation of meat-borne Salmonella enterica and inhibition by the cell-free supernatant from Pseudomonas aeruginosa. Journal of Food Control. 2013;32(2):650-658. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.047

(10) Ait Ouali F, Al Kassaa I, Cudennec B, Abdallah M, Bendali F, Sadoun D, Chihib NE, Drider D. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. International Journal of Food Microbiology. 2014;191:116-124. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011

(11) Aminnezhad S, Kasra-Kermanshahi R. Antibiofilm activity of cell-free supernatant from Lactobacillus casei in Pseudomonas aeruginosa. Feyz. 2014;18(1):30-37. https://feyz.kaums.ac.ir/article-1-2191-fa.html [In Persian].

(12) Khiralla GM, Mohamad EAH, Farag AG, Elhariry H. Antibiofilm effect of Lactobacillus pentosus and Lactobacillus plantarum cell-free supernatants against some bacterial pathogens. Journal of Biotech Resistance. 2015;6:86-95. https://B2n.ir/p97747

(13) Hitchins AD, Hartman PA, Todd ECD. In: Vanderzant C., and Splittstoesser DF, editors. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd ed. American Public Heaith Association. Academic press; 1992:325-367.

(14) Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G.

Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. 2015:420-454.

(15) Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Majuire. Clinical Veterinary Microbiology. 2nd ed. Elsevier Ltd. 2013:239-274.

(16) Ortez JH. In: Coyle MB, Editor. 1st ed. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology. 2005:39-52.

(17) CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018:30-37.

(18) Koohestani M, Moradi M, Tajik H, Badali A. Effects of cell-free supernatant of Lactobacillus acidophilus LA5 and Lactobacillus casei 431 against planktonic form and biofilm of Staphylococcus aureus. InVeterinary Research Forum. 2018;9(1):301-306. https://doi.org/10.30466/vrf.2018.33086

(19) Naves P, Del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, BlancoJ, Rodríguez-Cerrato V, Ponte MC, Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of Escherichia coli is method-dependent. Journal of Applied Microbiology. 2008; 105:585–590. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x

(20) Zhang S, Yang G, Ye Q, Wu Q, Zhang J, Huang Y. Phenotypic and genotypic characterization of Klebsiella pneumoniae isolated from retail foods in China. Journal of Frontiers in Microbiology. 2018;9:289. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00289

(21) Yang Y, Peng Y, Jiang J, Gong Z, Zhu H, Wang K, Zhou Q, Tian Y, Qin A, Yang Z. Isolation and characterization of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae from raw cow milk in Jiangsu and Shandong provinces, China. Transboundary and Emerging Diseases. 2021;68(3):1033-1039. https://doi.org/10.1111/tbed.13787

(22) Gungogan N, Yakar UA. Siderophore production, serum resistance, hemolytic activity and extended-spectrum b-lactamase- producing Klebsiella species isolated from milk and milk products. Journal of Food Safety. 2007;27:251–264.https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2007.00077.x

(23) Karimi S, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance pattern in Klebsiella pneumoniae strains isolated from bovine mastitis in Shahrekord, Iran. Navid No Journal of Medical Sciences. 2019;22(69):1-14. https://doi.org/10.22038/nnj.2019.38286.1145 [In Persian].

(24) Meletis G. Emergence of Klebsiella pneumoniae carrying bla_{VIM} and blaKPC genes. Hippokratia. 2010 Apr;14(2):139-140. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2895282/

(25) Queenan AM. Carbapenemases: the versatile β- lactamases. Clinical Microbiology Review. 2007 Jul;20:440-458. https://doi.org/10.1128/cmr.00001-07

(26) Uyanlik T, Cadirici O, Cucukoglu A, Can C. Investigation of major carbapenemase genes in ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae strains isolated from raw milk in Black Sea region of Turkey. International Dairy Journal. 2022 May 1;128:105315. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105315

(27) Cusumano JA, Caffrey AR, Daffinee KE, Luther MK, Lopes V. Weak biofilm formation among carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. Journal of Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2019 Dec 1;95(4):114877. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114877

(28) Giordani B, Parolin C, Vitali B. Lactobacilli as anti-biofilm strategy in oral Infectious Diseases: A Mini-Review. Frontiers in Medical Technology. 2021 Oct 20;3:769172. https://doi.org/10.3389/fmedt.2021.769172

(29) Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, GonzálezCórdova AF, Vallejo-Cordoba B, Hernández-Mendoza A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Journal of Trends in Food Science & Technology. 2018 May 1;75:105–14. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009

(30) Nataraj BH, Ali SA, Behare P V, Yadav H. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. Microbial Cell Factory. 2020 Dec;19:168. https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-020-01426-w

(31) Wilson AM, Walker JM, Yin K. Different Concentrations of Lactobacillus acidophilus cell free filtrate have differing anti-Biofilm and

immunomodulatory Effects. Journal of Front Cell Infect Microbiology. 2021 Sep 13;11: 737392. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.737392

(32) Kheiri F, Kermanshahi RK, Feizabadi MM. The inhibitory effects of Lactobacillus supernatants and their metabolites on the growth and biofilm formation of Klebsiella pneumonia. Infectious Disorders - Drug Targets. 2020 Dec 1;20(6):902-912. https://doi.org/10.2174/1871526520666200106122632

(33) Raras TYM, Firdausy AF, Kinanti IR, Noorhamdani N. Anti-Biofilm activity of lactic acid bacteria isolated from kefir against multidrug-resistant Klebsiella pneumonia. Journal of Pure and Applied Microbiology. 2019 Jun 1;13(2):983-992. https://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.2.35

(34) Chen CC, Lai CC, Huang L, Huang WY, Toh HS, Weng TC, Chuang YC, Lu YC, Tang HJ. Antimicrobial activity of Lactobacillus species against carbapenem-resistant enterobacteriaceae. Journal of Front Microbiology. 2019 Apr 18;10:789. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00789

[1]- Indicator organisms
[2]- Foodborne
[3]- Sanitation
[4]- *Escherichia*
[5]- *Klebsiella*
[6]- *Citrobacter*
[7]- *Enterobacter*
[8]- Pneumonia
[9]- Septicemia
[10]- Meningitis
[11]- Urinary Tract Infection (UTI)
[12]- Pyogenic liver abscess
[13]- Adhesive fimbrial
[14]- Siderophore
[15]- *Klebsiella pneumoniae*
[16]- Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)
[17]- Carbapenemases
[18]- Nosocomial
[19]- Carbapene-resiatant *Klebsiella pneumonia* (CRKP)
[20]- Lactic acid bacteria (LAB)
[21]- Generally Recognized as Safe
[22]- Lactic acid
[23]- Acetic acid
[24]- Formic acid
[25]- Supernatant
[26]- Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE)
[27]- *Helicobacter pylori*
[28]- *Salmonella*
[29]- *Shigella*
[30]- *Pseudomonas aeruginosa*
[31]- *Staphylococcus aureus*
[32]- Buffered pepton water (BPW)
[33]- McConkey agar
[34]- Imipenem
[35]- Meropenem
[36]- Doripenem
[37]- Ertapenem
[38]- Disk Diffusion
[39]- Mueller Hiton agar
[40]- Inhibition zone
[41]- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
[42]- Sensitive
[43]- Intermediate
[44]- Resistant
[45]- Optical density (OD)
[46]- Tryptic Soy Broth (TSB)
[47]- Planktonic phase
[48]- Phosphate buffered saline (PBS)
[49]- Crystal violet
[50]- Specific biofilm formation (SBF) index
[51]- Statistical package for social sciences (SPSS)
[52]- Multidrug-resistance (MDR)
[53]- Postbiotics
[54]- Biosurfactants (BS)