نویسنده محترم تاخیر در ارسال بیش از یک هفته ای فایل ها چاپ مقاله شما را دچار مشکل خواهد کرد و مسئولیت آن با خود نویسنده است

خواص ضد باکتریایی محیط کشت بدون سلول *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* علیه پاتوژن های مقاوم

خواص ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* علیه پاتوژن های مقاوم

علی کاظمی[۱]، نادر حبیبی[۲]*

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

۲- گروه صنایع غذایی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

* ایمیل نویسنده مسئول:naderhabibi45@yahoo.com

چکیده

اخیراًاستفاده از پروبیوتیک‌ها در مهار باکتری‌های بیماری‌زاااهمیت بسیار زیادی پیدا کرده است.علاوه بر آن دارای خواص مفیدی جهت حفظ سلامت بدن می‌باشند. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی خواص ضدباکتریایی محیط کشت فاقد سلول دو باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* علیه دو پاتوزن *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس*می‌باشد. باکتری‌های پاتوژن از نمونه‌های شیر خام گاو توزیع شده در شهر سنندج با استفاده از محیط‌های اختصاصی و افتراقی جداسازی، سپس با روش دیسک دیفیوژن حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها بررسی و جدایه‌های مقاوم به چند دارو جهت ادامه تست‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند. بعد از کشت باکتری‌های پروبیوتیک‌از مایع بدون سلول آن‌ها برای بررسی خواص ضدباکتریایی توسط روش‌های MIC و MBC استفاده شد. همچنین میان‌کنش دو پروبیوتیک با استفاده از روش چکربورد و تعین شاخص FICi بررسی شد.از ۱۸۰ نمونه گرفته‌شده، تعداد ۱۵ جدایه *اشریشیا کلی* (۸/۳۳٪) و ۱۹ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*(۱۰/۵۵٪)جداسازی شد. بر اساس نتیجه تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای هر کدام از باکتری‌های پاتوژن۱۰ جدایه انتخاب شد. نتایج نشان داد که محیط کشت رشد کرده هر دو باکتری پروبیوتیک دارای قدرت ضدباکتریایی علیه هر دو

باکتری*پاتوژن* می‌باشند، اما بررسی همزمان این دو پروبیوتیک اثر سینرژیستی را نشان دادند. باکتری*استافیلوکوکوس‌اورئوس* نسبت به *اشریشیاکلی* حساس‌تر بود. مقادیر MIC و MBC در رنج ۲/۵ تا ۱۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود.بنابراین می‌توان محیط کشت بدون سلول *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس*را به عنوان یک ترکیب بیولوژیکی جدید با خواص ضدباکتریایی معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی:*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، باسیلوس کواگولانس، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس‌اورئوس*

۱-مقدمه

امروزه به دلیل وجود عوامل مختلف ایجادکننده فساد موادغذایی یافتن ترکیبات نگه‌دارنده جدید به موضوع مورد بررسی بسیاری از پژوهشگران این زمینه تبدیل شده است. ترکیبات نگه‌دارنده موجود ممکن است دارای معایبی باشند که استفاده از آن‌ها محدودشده باشد. از طرف دیگر پاتوژن‌های غذازاد کم کم به آنتی‌بیوتیک‌ها و نگه‌دارنده‌های قدیمی مقاوم شده و باعث ایجاد فساد در موادغذایی می شوند. همچنین استفاده از نگه‌دارنده‌های شیمیایی روی میزان سلامت مصرف‌کننده اثرات منفی بر جای می‌گذارد. بر همین اساس تمایل به استفاده از ترکیبات افزودنی با منشاء طبیعی و یا زیستی روز به روز افزایش پیدا می‌کند(۲۲).

آلودگی سموم و پاتوژن‌های غذایی اثرات نامطلوبی بر سلامت انسان وارد می کند و خسارات اقتصادی هنگفتی را به همراه دارد(۲۶).آلودگی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس‌اورئوس* جدا شده از شیر خام به ثبات رسیده است(۲۳).

میزان بیان دو ژن TLR2 و TLR4در سلول‌های آلوده به *سالمونلا انتریتیدیس*، با هریک از باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* به صورت معناداری کاهش یافته است(۷).

امروزه پروبیوتیک‌ها و پره‌بیوتیک‌ها بسیار مورد مطالعه محققان می‌باشند. پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده و فعالی هستند که خوردن آنها، باعث تغییر میکروبیوم دستگاه گوارشی ما در جهت سلامتی بیشتر می‌شود. وجود این باکتری‌های خوب، از رشد و تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند و باعث گوارش بهتر غذا و کمک به کارکرد سیستم ایمنی بدن می‌شود.پروبیوتیک‌ها این مزایا را برای سلامتی ما به همراه دارند:پیشگیری و درمان اسهال ناشی از عفونت‌ها یا آنتی‌بیوتیک‌ها، بهبود و کاهش علائم سندروم روده تحریک‌پذیر (اسهال یایبوست در پی استرس زیاد)، تقویت سیستم ایمنی، کاهش التهاب و آلرژی‌ها، بهبودخلق و کاهش اضطراب(۱۵،۲۰). پروبیوتیک‌ها به عنوان افزودنی به موادغذایی مطرح می‌باشند. پروبیوتیک‌ها

معمولاًبه جنس‌های باکتریـایی‌لاکتوباسـیلوس[1]،باسـیلوس[2]،رومینوکوکـوس[3]،انتروکوکـوس[4]،کلسـتریدیوم[5]وبیفیـدوباکتریوم[6]تعلـق دارند.این باکتری‌های اسیدلاکتیکی به طورمشخص کموارگانوتروفیک[7] بوده و کربوهیدرات‌هاراتخمیرکرده و درنهایت محصـول اصلیآن‌هااسیدلاکتیک است که با افزایش میزان نفوذپذیری غشای‌بیرونی باکتری‌های گرم‌منفی، باعث ورود ترکیبات ضدمیکروبی به داخل باکتری‌های بیماری‌زا شده و باعث مرگ آن‌ها می‌شوند(۱۰،۲۰،۲۳).

لاکتو*باسیلوس‌اسیدوفیلوس*[8] یک باکتری گرم‌مثبت و متعلق به خانواده لاکتوباسیلاسه و جنس لاکتوباسیلوس می‌باشد.این باکتری به صورت هموفرمانتاتیو (تبدیل‌کننده قند به لاکتیک‌اسید) و میکروآئروفیلیک می باشد. در مجاری گوارشی و همچین دهان انسان و حیوانات یافت می‌شود. برخی از سویه‌های این باکتری به عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند. سویه‌هایی که به عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند در ترکیب با *استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس*[9] و لاکتو*باسیلوس‌بولگاریکوس*[10] در تولید فرآورده‌هایی مانند ماست و پنیر کاربرد دارد. مطالعات مختلف خواص پروبیوتیکی متفاوتی را از این باکتری نشان داده‌اند. با توجه به توانایی بالایی این باکتری در تولید فرآورده‌های ضد میکروبی مانند اسیدهای‌آلی، امروزه بسیار مورد مطالعه قرار می‌گیرد(۳).

سویه‌های باسیلوس در مقایسه با سایر سویه‌های پروبیوتیک دارای سلول‌های اسپوردار هستند که باعث افـزایش قابلیـت زنـده‌مـانی آن‌ها جهت تحمل حرارت در فرآیندهای زیستی و همچنین مقاومت در مقابل نمـک‌هـای صـفراوی در حـین عبـور از معـده مـی-شود(۱۰).

باسیلوس‌کواگولانس[11]نیز علاوه بر ویژگی‌های مذکور، باکتریوسینی تحت عنوان کواگولین[12]ترشح می‌کند که بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های مضر روده عمل می‌کند. نتایج مطالعات نشان داد که استفاده طولانی مدت از این سویه فاقد اثرات جهش‌زایی و ژنوتوکسیک در انسان است. همچنین در یک مطالعه‌ی آزمایشگاهی به منظور بررسی میزان ماندگاری و فعالیت این سویه در دستگاه‌گوارش، مشخص شد که بقاء باکتری حدود۷۰٪ و تبدیل اسپور به فرم رویشی در شرایط آزمایش شده حدود۱۰٪ است. علاوه بر این میزان ماندگاری با حضور لاکتوز و فروکتوز بررسی و در نهایت نشان داده شد که سویه مذکور به هضم

---

[1]-*Lactobacillus*
[2] - *Bacillus*
[3] - Ruminococcus
[4]- *Enterococcus*
[5]- *Clostridium*
[6] -*Bifidobacterium*
[7]- Chemoorganotrophic
[8] -*Lactobacillus acidophilus*
[9] - *Streptococcus thermophilus*
[10]-*Lactobacillus bulgaricus*
[11] -*Bacillus coagulans*
[12]- Coagulin

لاکتوز و فروکتوز کمک کرده و از بروزعلائم گوارشی در افراد حساس به کربوهیدرات‌ها پیشگیری می‌کند(۱۴). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند عامل ضدمیکروبی تولیدشده توسط برخی سویه‌های باسیلوس قادربه مهار گونه‌های کلستریدیوم،کمپیلوباکتر واسترپتوکوکوس می‌باشد(۱۸).

اشریشیاکلی[1] یک باکتری میله‌ای گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و جزو کلی‌فرم‌ها محسوب می‌شود.این باکتری به وفور در روده حیوانات خونگرم یافت می‌شود. بیشتر سویه‌های این باکتری بی‌خطر هستند و به عنوان فلور نرمال روده محسوب می‌شوند. اما برخی از سویه‌های *اشریشیاکلی* به واسطه داشتن فاکتورهای حدت یا پاتوژنسیته مختلف توانایی ایجاد بیماری‌های مختلفی مانند بیماری‌های گوارشی، عفونت کلیه مجاری ادراری بخصوص در خانم‌ها، عفونت خون، عفونت استخوان و مفاصل، مننژیت و ... را دارند. برخی از سویه‌های این باکتری با تولید توکسین در موادغذایی به عنوان غذازاد شناخته می‌شوند. توکسین‌های تولیدشده توسط این سویه ها عامل ایجاد مسمومیت‌غذایی می‌باشد؛ به همین دلیل مطالعات مختلفی برای مبارزه با این باکتری و بخصوص سویه‌های پاتوژن انجام می‌شود(۵).

باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس*[2] یک باکتری گرم‌مثبت، گرد، کاتالازمثبت و اکسیدازمنفی و بی‌هوازی‌اختیاری است. جنس استافیلوکوکوس‌ها، ۳۳ گونه مهم دارند. بیشتر آن‌ها بی‌خطرند و به صورت طبیعی روی پوست اکثر افراد وجود دارند و در خاک نیز زندگی می‌کنند اما گونه‌های بیماری‌زا نیز در بین استافیلوکوکوس‌ها وجود دارند که می‌توانند عامل ایجاد بیماری‌هایی مانند آبسه های پوستی، عفونت خون، عفونت زخم، باکتریمی، استئومیلیت و ... شوند. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* قادراست با تولید انتروتوکسین‌ها در موادغذایی ایجادکننده مسمومیت غذایی باشد که با اسهال و استفراغ همراه است. حضور این باکتری در موادغذایی و تولید توکسین یکی از مشکلات تولیدکنندگان مواد غذایی است (۵).

بر این اساس هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثر سینرژیسمی ناشی از ترکیبات ترشحی دو پروبیوتیک*لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* علیه دو باکتری*استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی*مقاوم به دارو جداشده از موادغذایی می‌باشد. لازم به ذکر است در صورت وجود نتایج قابل قبول برای این دو باکتری می‌توان نتایج را به سایر باکتری های غذازاد نسبت داد.

[1] *Escherichia coli*
[2] *Staphylococcus aureus*

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه گیریو جداسازی باکتری‌های غذازاد

در مجموع ۱۸۰ نمونه شیرخام گاومورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌گیری در شرایط استریل بااستفاده از ظروفو وسایلی که از قبل استریل شده بودنداز شیرهای خام مراکز لبنی سطح شهر سنندج صورت گرفت. مقدار نمونه ۱۰۰ میلی‌لیتر بود که در ظروف استریل از قبل تهیه شده اخذ گردید. نمونه‌ها سریعاً و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

نمونه‌های شیرروی محیط‌های مکانکی‌آگار[1](برای بررسی حضور*اشریشیاکلی*)و بردپارکرآگار[2](برای بررسی حضور *استافیلوکوکوس‌اورئوس*) منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با توجه به الگوی رشد باکتریایی و مشخصات کلنی، کلنی‌های مشکوک به محیط‌های دیگر جهت تایید منتقل شدند. کلنی‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* به محیط ائوزین‌متیلن‌بلوآگار[3]و کلنی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* به محیط مانیتول‌سالت‌آگار[4] منتقل شدند. سپس پلیت‌های کشت داده‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند(۶).در مطالعه حاضرازسویه استاندارد *استافیلوکوکوس‌اورئوس* ATCC 25923 و سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 25922 استفاده شد. سویه‌های مذکوراز مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی[5] تهیه شدند.

۲-۲- تعیین تست حساسیت میکروبی

ابتدا بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش آگاردیسک‌دیفیوژن(Kirby-Bauer)روی محیط مولرهینتون‌آگار(Merck, Germany)طبقدستورالعمل انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی[6] انجام شد(۲۵). از بین جدایه‌ها طبق CLSI تعداد ۱۰ جدایه*استافیلوکوکوس‌اورئوس* و ۱۰ جدایه*اشریشیاکلی* مقاوم به چند دارو انتخاب شدند.آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی شامل تتراسایکلین،پنی‌سیلین،آزیترومایسین، کلینداماسین،کلوگزاسیلین،انروفلوکساسین،سیپروفلوکساسین، ونکومایسین، جنتامایسین و کلرام فنیکل بودند (شرکت پادتن طب،ایران).

۲-۳-تعیین MIC و MBC حاصل از محیط کشت دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس وباسیلوس کواگولانس*

[1]- MacConkey agar
[2]-Baird-Parker agar
[3]- Eosin Methylene Blue (EMB) agar
[4] - Mannitol Salt Agar (MSA) agar
[5] - Persian Type Culture Collection (PTCC)
[6] - Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)

تعیین مقادیر کمترین غلظت مهارکنندگی رشد[1] و کمترین غلظت کشندگی[2]حاصل از محیط کشت رشد دو باکتری*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ATCC 4356 و *باسیلوس کواگولانس* ATCC 23498 انجام شد.این باکتری‌ها از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی خریداری شد.سپس ویال‌ها طبق دستورالعمل با حجم مناسب سرم فیزیولوژی استریل به مدت نیم ساعت در دمای اتاق احیا شد. پس از احیا شدن آن‌ها روی محیط کشت De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar کشت داده شدند تا کلنی خالص آن‌ها برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

تعیین مقادر MIC با استفاده از روش میکرودایلوشن‌براث[3] و در میکروپلیت های ۹۶ خانه‌ای ته صاف انجام شد. برای این منظور باکتری های پروبیوتیک در محیط کشت MRS Broth و در جار بی‌هوازی کشت داده شد. سپس با استفاده از فیلترهای باکتریولوژیک باکتری‌های محیط کشت حذف شده و محیط کشت حاصله به عنوان ماده مؤثر مورد بررسی قرار گرفت. انجام این تست برای دو باکتری به صورت جداگانه و همچنین به صورت ترکیب با هم مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام میکرودایلوشن براث ماده حاصله به صورت سریال دایلوشن رقت سازیشد. برای انجام تست میکرودایلوشن براث از غلظت ۰/۶۲۵ µl/ml تا ۳۲۰ µl/mlانجام شد. در نهایت میزان کمترین غلظت مهارکنندگی رشد با مشاهده عدم وجود کدورت تعیین شد (شکل ۱).از تمام گودههایی که فاقد رشد بوده‌اند مقدار ۱۰ میکرولیتر، روی محیط عصاره مغز و قلب[4]آگار کشت داده می‌شود و کاهش ۹۹/۹٪ تعداد باکتری اولیه به عنوان MBC در نظر گرفته شد(۵).

[1]- Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
[2]- Minimum Bactericidal Concentration (MBC)
[3]- Broth microdilution
[4]- Brain Heart Infusion (BHI)

شکل ۱. میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مربوط به تست میکرودایلوشن‌براث برای تعیین مقادیر MIC و MBC (مستطیل مشخص شده گودهای معادل MIC را نشان می‌دهد).

۲-٤- بررسی اثر سینرژیسمی دو باکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *باسیلوس‌کواگولانس* به روش تعیین FICi با استفاده از میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای

تست تعیین Fraction inhibitory concentration index (FICI) به روش چکربورد[1] انجام شد. در این تست خواص سینرژیستی دو ترکیب با هم سنجیده می‌شود. در یک میکروپلیت MIC حاصل از محیط کشت دو باکتری پروبیوتیک به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. سپس در یک میکروپلیت دیگر MICدو باکتری پروبیوتیک به صورت سینرژیسمی محاسبه شد و طبق رابطه۱اثر سینرژیمی یا هم‌افزایی بررسی شد(۲۳).

رابطه(۱)

$$\text{Sum FIC}_{BC} = \frac{\text{MIC}_B \text{ in combination}}{\text{MIC}_B \text{ alone}} + \frac{\text{MIC}_C \text{ in combination}}{\text{MIC}_C \text{ alone}}$$

[1]Checkerboard

در فرمول فوق اگر $FIC_I \leq$ ۰/۵ باشد به عنوان سینرژیسمی کامل، ۰/۵< $FIC_I \leq$۰/۷۵ نسبتاً سینرژیسم، ۰/۷۵< $FIC_I \leq$۲ بدون اثر و $FIC_I >$۲ به صورت آنتاگونیست در نظر گرفته شد (۱۶).

۲-۵-تجزیه و تحلیل داده‌ها

تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SSPSصورت گرفته و گروه‌های مورد مطالعه به کمک آزمون‌های Paired t-tests و آزمون chi-square ارزیابی شدند. سطح معنی داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- باکتری های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *اشریشیاکلی* جدا شده

در مطالعه حاضر ابتدا به بررسی آلودگی نمونه های شیر خام گاو عرضه شده در سطح شهر سنندج با دو باکتری *استافیلوکوکوس-اورئوس* و *اشریشیا کلی* پرداخته شد. بر اساس نتایج کشت و تست های بیوشیمیایی از ۱۸۰ نمونه گرفته شده، تعداد ۱۵ جدایه باکتری*اشریشیاکلی* (۸/۳۳٪) و ۱۹ جدایه (۱۰/۵۵٪) باکتری*استافیلوکوکوس‌اورئوس* از شیرخام توزیع‌شده در مراکز لبنی سطح شهر سنندج جدا شد(جدول ۱).

جدول ۱- توزیع فراوانی *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در شیرخام

نوع باکتری	موارد‌مثبت		موارد‌منفی		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
اشریشیاکلی	۱۵	۸/۳۳	۱۶۵	۹۱/۶۷	۱۸۰	۱۰۰
استافیلوکوکوس-اورئوس	۱۹	۱۰/۵۵	۱۶۱	۸۹/۴۵	۱۸۰	۱۰۰

بررسی مطالعات گذشته صورت گرفته در ایران نشان می‌دهد که شیرهای توزیع‌شده در کشور دارای آلودگی با *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند. این آلودگی می تواند منشا دامی و یا حتی انسانی داشته باشد. در مطالعه سلطان‌دلال و همکاران (۱۳۹۸)، از تعداد ۱۵۰ نمونه شیر جمع‌شده از شهرستان بروجرد (استان‌لرستان) ۳۱جدایه (آلودگی ۲۰/۶۶٪) باکتری *اشرشیاکلی* جدا شد. براساس فعالیت بتاگلیکوزیدازی منفی و واکنش با آنتی‌سرم اختصاصی ۵ جدایه به عنوان O157: H7 تشخیص داده شد(۲۴). بنیادیانو همکاران (۲۰۱۴)، در یک مطالعه بر روی ۲۰۰ نمونه شیر خام تولیدی در استان چهارمحال و بختیاری به منظور تعیین میزان آلودگی به باکتری *اشریشیاکلی*O157: H7 با استفاده از محیط غنی‌کننده و محیط کشت افتراقی و روش سرولوژی پرداختند. از ۲۰۰ نمونه شیر خام مورد آزمایش ۸۳ مورد(۴۱/۵٪) مشکوک به سروتیپ O157: H7 شناسایی شد(۵).

در مطالعه دیگری که در ایران انجام شد در زمان های مختلف نمونه‌گیری و به بررسی حضور دو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس*پرداخته شد. از ۳۲۰ نمونه شیردر زمان شیردوشی حدود۶۳ نمونه (۷/۱۹٪) آلوده به *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، در ۶۲ نمونه (۴/۱۹٪) فقط *اشریشیاکلی* و ۳۰ نمونه (۳/۹٪) فقط *استافیلوکوکوس‌اورئوس* بودند، در ۱۶۵ نمونه (٪۶/۵۱) آلودگی به هیچ کدام از این دو باکتری دیده نشد(۱). آلودگی به *اشیریشیاکلی* می‌تواند به علل مختلف در شیر اتفاق بیفتد از جمله عدم استفاده از ماشین یخچال‌دار در هنگام حمل شیرخام به مراکز فرآوری، عدم شستشو و ضدعفونی مناسب سطح پستان گاو(به علت آلوده بودن پستان گاو با مدفوع خود گاو در هنگام شیردوشی)، عدم رعایت بهداشت فردی کارگران و عدم استفاده از آب پاکیزه برای شستشوی ظروف نگهداری و حمل و نقل شیر. همچنین آلودگی شیرخام به *استافیلوکوکوس اورئوس* می تواند منجر به ترشح آنتروتوکسین توسط این باکتری گردیده که حتی بااعمال حرارت ازبین نمی‌رود و می‌تواند ایجاد مسمومیت کند.

۳-۲-مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدول۲آورده شده است. در مورد باکتری *اشرشیاکلی* بیشترین و کمترین مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین ۱۱(۷۳/۳۳٪) و جنتامایسن ۲(۱۳/۳۳٪) بود. همچنین در مورد باکتری *استافیلوکوکوس-اورئوس* بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۶(۸۴/۲۱٪) بود. لازم به ذکراست همه جدایه‌های *استافیلوکوکوس-اورئوس* نسبت به ونکومایسین حساس ۱۹(۱۰۰٪) بودند.

نکته مهم و قابل توجه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* جداشده از نمونه‌های لبنی می‌باشدکه می‌تواند یک زنگ خطر برای مصرف بی‌رویه تجویز آنتی‌بیوتیک باشد و انتشار و انتقال این باکتری، با توجه به اینکه درصد بالایی از افراد جامعه سالم ناقل آن هستند، در اثر انتقال بین افراد و انتقال ژن‌های مقاومتی، به ایزوله‌های دارای مقاومت چندگانه یاMullty Drug Resistant Isolatesتبدیل می‌شوند. شیرخام دام‌های شیری می‌تواند منبع باکتری‌های مقاوم به چند دارو باشد که تهدیدی بهداشتی برای مصرف شیرخام در ایراناست. با اینوجود، تحقیقات بیشتر برای درک ویژگی‌های اپیدمیولوژیک تکمیلی در شیرخام ضروری است(۸,۱۸). بنابراین اگر این باکتری‌هاازطریق غذا وارد بدن انسان شوند ممکن است باعث ایجاد عفونت‌های مقاوم به درمان گردند.

جدول ۲- نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس*

آنتی‌بیوتیک	باکتری	تعدادجدایه حساس (٪)	تعدادجدایه نیمه‌حساس (٪)	تعدادجدایه مقاوم (٪)
تتراسایکلین	*اشریشیاکلی*(۱۵ جدایه)	۵ (۳۳/۳۳)	۳ (۲۰)	۷ (۴۶/۶۶)
	استافیلوکوکوس اورئوس(۱۹جدایه)	۳ (۱۵/۸)	۲ (۱۰/۵)	۱۲ (۶۳/۱۵)

پنی‌سیلین	*اشریشیاکلی*	۲ (۱۳/۳۳)	۲ (۱۳/۳۳)	۱۱ (۷۳/۳۳)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۳ (۱۵/۸)	۰ (۰)	۱۶ (۸۴/۲۱)
آزیترومایسین	*اشریشیاکلی*	۶ (۴۰)	۱ (۶/۶۶)	۸ (۵۳/۳۳)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۹(۴۷/۳۶)	۲ (۱۰/۵)	۸ (۴۲/۱)
کلیندامایسین	*اشریشیاکلی*	۶ (۴۰)	۲ (۱۳/۳۳)	۷ (۴۶/۶۶)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲ (۶۳/۱۵)	۱ (۵/۲۶)	۶ (۳۱/۵۷)
کلوگزاسیلین	*اشریشیاکلی*	۴ (۲۶/۶۶)	۳ (۲۰)	۸ (۵۳/۳۳)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۶ (۳۱/۵۷)	۱ (۵/۲۶)	۱۲ (۶۳/۱۵)
انروفلوکساسین	*اشریشیاکلی*	۸ (۵۳/۳۳)	۲ (۱۳/۳۳)	۵ (۳۳/۳۳)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲ (۶۳/۱۵)	۱ (۵/۲۶)	۶ (۳۱/۵۷)
سیپرفلوکساسین	*اشریشیاکلی*	۸ (۵۳/۳۳)	۳ (۲۰)	۴ (۲۶/۶۶)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲ (۶۰)	۲ (۶/۶۶)	۵ (۲۶/۳۱)
وانکومایسین	*اشریشیاکلی*	۷ (۴۶/۶۶)	۴ (۲۶/۶۶)	۴ (۲۶/۶۶)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
جنتامایسین	*اشریشیاکلی*	۱۱ (۷۳/۳۳)	۲ (۱۳/۳۳)	۲ (۱۳/۳۳)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۵ (۲۶/۳۱)	۲ (۶/۶۶)	۱۲ (۶۰)
کلرام‌فنیکل	*اشریشیاکلی*	۹ (۶۰)	۲ (۱۳/۳۳)	۴ (۲۶/۶۶)
	استافیلوکوکوس اورئوس	۶ (۳۱/۵۷)	۴ (۲۱)	۹ (۴۷/۳۶)

۳-۳- مقادیر MIC و MBC دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

نتایج حاصل از تست میکرودایلوشن‌براث برای دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* در جدول۱ قابل مشاهده است. نتایج این تست نشان داد که محیط کشت رشدکرده هر دو باکتری دارای قدرت ضدمیکروبی علیه هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* میباشند. لازم به ذکر است که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشریشیاکلی* حساس‌تر می‌باشد. هم مقادیر MIC و هم MBC *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* علیه دو باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* معنی‌دار بود(جدول۲).

جدول۳- نتایج MIC و MBC حاصل از محیط کشت دو باکتری *لاکتوباسیلوساسیدوفیلوس* و *باسیلوس-کواگولانس* علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی*

	اشریشیاکلی				*استافیلوکوکوس اورئوس*			
	۱۰ جدایه مقاوم		سویه استاندارد		۱۰ جدایه مقاوم		سویه استاندارد	
باکتری پروبیوتیک	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC(µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	مقادیر	۴۰-۲۰	۱۰-۴	۲۰	۱۰	۲۰-۱۰	۲۰-۵	۵	۲/۵
	P value	۰/۰۳۲*	۰/۰۰۳۳*	غیرقابل آنالیز(یک سویه		۰./۰۳۲*	۰/۰۰۳۳*	غیرقابل آنالیز(یک سویه	
باسیلوس کواگولانس	مقادیر	۱۶۰-۴۰	۱۶۰-۴۰	۸۰	۸۰	۸۰-۴۰	۴۰-۲۰	۲۰	۱۰
	P value	۰/۰۵۹	۰/۰۲۴*	غیرقابل آنالیز(یک سویه		۰/۰۵۹	۰/۰۲۴*	غیرقابل آنالیز(یک سویه	

* : معنی دار در سطح ۰/۰۵

در دو دهه گذشته استفاده از پروبیوتیک‌ها در مهار باکتری‌های بیماری‌زا اهمیت بسیاری پیدا کرد. به عنوان مثال در مطالعه میرزایی‌وهمکاران(۱۳۸۸)، تأثیرپروبیوتیک‌های*بیفیدوباکتریومآنگولاتوم*،*بیفیدوباکتریوم‌بیفیدوم*،*لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس‌کازئی* بر سرعت رشد *اشریشیاکلی* O157: H7 در شرایط رشد همراه در شیر مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله رشد توامان هر کدام از پروبیوتیک‌ها در طول ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری به طور معنی‌دار رشد *اشریشیاکلی* :O157 H7مهار نمود. بر اساس نتایج این مطالعه pH نمونه شیر حاوی کشت *E.coli+L. casei* بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری از pH نمونه شیر حاوی *اشریشیاکلی* به طور معنی‌دار کمتر بود ($p<0.01$).در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف طولانی مدت محصولات لبنی حاوی پروبیوتیک‌های مذکور می‌تواند در جلوگیری از بروز عفونت با *اشریشیاکلی* O157: H7 و درمان آن مفید واقع شود(۲).

در یک مطالعه مشابه که توسط کومار و همکاران (۲۰۱۶)، انجام شد خواص ضدباکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* علیه سویه‌های انترواگرگیتیو*اشریشیاکلی*[1]بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در کشت همراه یا Co-cultured این دو پروبیوتیک در غلظت 10^{10} cfu باعث مهار رشد باکتری *اشریشیاکلی* در ۷۲ ساعت می شود. همچنین در غلظت‌های 10^{8} cfu و 10^{9} مدت زمان مهار رشد به ۹۶ ساعتمی‌رسد(۱۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محیط کشت رشدکرده هر دو باکتری دارای قدرت ضدمیکروبی علیه هر دو باکتری*استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *اشریشیاکلی* می‌باشند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری*استافیلوکوکوس‌اورئوس* نسبت به *اشریشیاکلی* حساس‌تر بود.مقادیر MIC برای *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* علیه *اشریشیاکلی* بین ۱۰ تا ۴۰ µl/ml و علیه *استافیلوکوکوس‌اورئوس* بین ۲/۵ تا ۲۰ µl/ml و همچنین برای *باسیلوس کواگولانس* این مقادیر به ترتیب بین ۴۰ تا ۱۶۰ µl/ml و ۱۰ تا ۴۰ µl/ml به دست آمد. نکته قابل توجه اینکه مقادیر MBC در مطالعه حاضر خیلی نزدیک به رنج های MIC می‌باشد که این نشان می دهد که دو پروبیوتیک مورد مطالعه غیر از خواص مهارکنندگی رشد دارای اثر کشندگی روی باکتری‌های پاتوژن نیز می باشند. پروبیوتیک ها به واسطه تولیدمواد

[1]- *EnteroaggregativeEscherichia coli*

پیشگیری‌کننده از جمله باکتریوسین اسید لاکتیک و ... همچنین با ممانعت از اتصال و رشد و کلونیزه‌شدن موضعی اجرام بیماری زا در مخاط روده و نیز با مجادله و غلبه بر تصاحب غذا از رخداد بسیاری از عفونت‌ها پیشگیریمی‌کنند.اثر ضدمیکروبی حاصل از فعالیت‌های متابولیکی باکتری‌های پروبیوتیک را می‌توان به تولید اسیدلاکتیک نسبت داد زیرا در طی رشد باکتری‌های پروبیوتیک، اسیدیته محیط به شدت اسیدی شده و باکتری‌های بیماری‌زا به‌طور طبیعی به شرایط اسیدی حساس بوده و در اسیدیته پایین از بین می‌روند(۹,۱۲).

۳-٤- اثر سینرژیسمی دو باکتری*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* علیه دو باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس*

با استفاده از تست چکربورد میان‌کنش بین دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس‌کواگولانس* علیه دو باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر دو باکتری *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *باسیلوس-کواگولانس* علیه *اشریشیاکلی* نسبتاً سینرژیسم و علیه *استافیلوکوکوس‌اورئوس* کاملاً سینرژیسم بود. اعداد مربوط به FIC_I در جدول۴آورده شده است.

جدول٤- نتایج برهم‌کنش *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *باسیلوس‌کواگولانس*علیه دو باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس*

	اشریشیاکلی		*استافیلوکوکوس اورئوس*	
تست‌چکربورد	۱۰ جدایه مقاوم	سویه استاندارد	۱۰ جدایه مقاوم	سویه استاندارد
FICI	۰/۷۲۵	۰/۷۲۵	۰/۳۸۸	۰/۳۸۸
نتیجه اینتراکشن	نسبتاًسینرژیسم	نسبتاًسینرژیسم	سینرژیسمیکامل	سینرژیسمیکامل

در همین راستا، بویریوانت و همکاران(۲۰۰۷)، با بررسی اثر مهاری مایع رویی چندین جدایه لاکتوباسیلوس بر برخی از سویه‌های بیماریزا مثل *لیستریامونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلاتیفی‌موریوم* نشان دادند که *لاکتوباسیلوس-روتری* دارای فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به بقیه لاکتوباسیلوس‌ها بود. در این بررسی توانایی رشد *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از مدفوع در شرایط مختلف مانند pH پایین، غلظت زیاد اکسیژن، بهتر از بقیه لاکتوباسیلوس‌ها بود. همچنین بیشتر سویه‌های جداشده از این دو نوع لاکتوباسیلوس بودند(۴).

با توجه به تفسیری که از شاخص FICi بیان می‌گردد،اگر۰/۵≥ FICI باشد به عنوان سینرژیسمی کامل، ۰/۷۵ < ۰/۵FICI ≤ نسبتاً سینرژیسم، ۲≤ FICI <۰/۷۵ بدون‌اثر و ۲< FICI به صورت آنتاگونیست در نظر گرفته می‌شود. بنابراین شاخص مذکور برای اشریشیاکلی(۰/۷۵≥FICI>۰/۵) نسبتاً سینرژیسم و برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* (۰/۵≥FICI) سینرژیسمی کامل می‌باشد(۴). بررسی اثرات سینرژیسمی ناشی از دو پروبیوتیک مورد مطالعه نشان

می‌دهد که این پروبیوتیک‌هااثر همدیگر را تقویت می نمایند(مشاهده مقادیر FICi). با توجه به نتایجمذکور، این پتانسیل وجود دارد که در آینده بتوان ترکیب این دو باکتری راعلیه سایر باکتری‌های مقاوم هم به کار برد.

٤- نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* دارای خواص ضدباکتریایی علیه دو باکتری پاتوژن غذازاد *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* هستند. همچنین در بررسی همزمان این دو پروبیوتیک اثر همدیگر را تقویت نموده و دارای اثر سینرژیستی بودند. بر اساس نتایج مطالعه حاضر می توان محیط کشت بدون سلول *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* به عنوان یک ترکیب بیولوژیکی با خواص ضد باکتریایی معرفی نمود.

منابع

۱. صادقی فرد، ن.، عزیزی جلیلیان، ف.، صیدخانی، ن.، رستم زاد، آ. ۱۳۸۵. بررسی آلودگی شیر خام از نظر *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایلام. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام*. دوره ۱۴، شماره ۱، ۴۹-۴۴.

۲. میرزایی، ح.، رضا نهایی، م.، جوادی، ا.، احمدی منش، مهدی. ۱۳۸۸.مطالعه تاثیر برخی پروبیوتیک‌ها برروی*اشریشیاکلی* O157: H7در شرایط رشد توأمان در شیر. *مجله تحقیقات دامپزشکی*، دوره ۶۴، شماره ۴، ۲۸۲-۲۷۹.

3. Bâati, L.l., Fabre-Gea, C.,Auriol, D., Blanc, P.J. 2000. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *International journal of food microbiology*, 59: 241-247.

4. Boirivant, M., and Strober, W. 2007. The mechanism of action of probiotics. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23: 679-692.

5. Bonyadian, M., Moshtaghi, H., and Taheri, M. A. 2014. Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and entero-aggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. *Veterinary Research Forum*, 5(1):29-34.

6. Carroll, K. C., Butel, J., and Morse, S.2015.*Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 27 E.* McGraw-Hill Education.

7. Dallal, M., Moshiri, M., Mirshafiey, A., Douraghi, M., Rezaie, F., Gholami, M. 2019. Evaluation of the effect of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 on the TLR2 and TLR4expression in HT29 cells infected with *Salmonella enteritidis*. *Tehran University Medical Journal*, 76: 724-730.

8. Dehghani, M., Akbarpour, B., Salari, M., Poursheykhani, A., and Rasoulzadeh, H. 2016. Assessment of Prevalence and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* in Raw and Pasteurized Milks of Sari City in the Summer of 2014. *Iranian Journal of Health and Environment*, 9: 147-154.

9. Ghahfarokhi,E.S., Dehkordi,M.M.,K.2012. Isolation and evaluation of lactic acid production content in native *Lactobacillus* of Chaharmahal va Bakhtiari province isolated from dairy products. *Biological Journal of Microorganism* , 1 (3): 41- 52.

10. Gilliland, S., Staley, T., and Bush, L.1984. Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct. *Journal of dairy science*, 67: 3045-3051.

11. Griggs, J., and Jacob, J. P. 1984. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *Journal of Applied Poultry Research*,14: 750-756.

12. Heller, KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American journal of Clinical Nutrition* 2001; 73 (2): 374- 379.

13. Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H., and Deschamps, A. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria.*International Journal of Food Microbiology*, 61: 193-197.

14. Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., and Mercenier, A. 2010. Application of probiotics in food products-challenges and new approaches.*Current Opinion in Biotechnology*, 21: 175-181.

15. Kuete, V., Alibert-Franco, S., Eyong, K., *et al*. 2011. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*,37: 156-161.

16. Kumar, M., Dhaka, P., Vijay, D., *et al*.2016. Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48: 265-270.

17. Lin, S., Hung, A., and Lu, J. 2011. Effects of supplement with different level of *Bacillus coagulans* as probiotics on growth performance and intestinal microflora populations of broiler chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10: 111-114.

18. Momtaz, H., Farzan, R., Rahimi, E., Safarpoor D. F., and Souod, N. 2012. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. *The Scientific World Journal*, 2012.Article 231342.

19. Pradhan, D., Mallappa, R. H., and Grover, S. 2020. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria.*Food Control*, 108: Article 106872.

20. Rahi, A., Kazemeini,H., Jafariaskari,S., Seif,A., Hosseini,S., and Safarpoor, D.F.2020. Genotypic and Phenotypic-Based Assessment of Antibiotic Resistance and Profile of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in the Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Recovered from Raw Milk. *National library of medicine*.13:273-283.

21. Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J. and Girbés, T. 2014. Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 5: 1765.

22. Salminen, S., Ouwehand, A. and Isolauri, E. 1998. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8: 563-572.

23. Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L. and Wilkens, M. 2017. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PloS one*, 12: e0172273.

24. Soltan Dallal, M. M., Zandieh Moradi, R., Mazaheri Nezhad Fard, R. and Rajabi, Z. 2020. Identification and Diagnosis of Enterohemorrhagic E. Coli by Molecular Method in Boroujerd City Cows' Milk. *Journal of Payavard Salamat* 13: 411-418.

25. Wayne, P. 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. *CLSI document M100-S20*.

26. Yang,Z.,Zhang,W.,Yin,Y.,Fang,W.,Xue,H.2022. Metal-organic framework-based sensors for the detection of toxins and foodborne pathogens. *Food Control.*133:part B. Article 10863.

Antibacterial properties of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus coagulans* cell-free culture medium against resistant pathogens.

Ali Kazemi[1], Nader Habibi[1]*

1. MSc of Food Science & Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
2. Department of Food Science & Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

* Corresponding Author's Email: Naderhabibi45@yahoo.com
Mibile:09188730399

Abstract

Recently, the use of probiotics in controlling pathogenic bacteria has become very important. Inaddition, they have useful properties to maintain the health of the body. The aim of this study was to investigate the antibacterial properties of cell-free culture medium of two probiotic bacteria Lactobacillus acidophilus and Bacillus coagulans against two foodborne pathogens Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Pathogenic bacteria from the samples of raw cow's milk distributed in Sanandaj city using special and differential isolation media, then their antibiotic sensitivity was checked by disk diffusion method and multi-drug resistant isolates were used to perform tests laboratory were selected. After culturing probiotic bacteria, their cell-free liquid was used to check antibacterial properties by MIC and MBC methods. Also, the interaction between two probiotics was investigated using the checkerboard method and determining the FICi index. From 180 samples taken, 15 isolates of Escherichia coli (8.33%) and 19 isolates of Staphylococcus aureus (10.55%) were isolated. Based on the result of the antibiotic sensitivity test, 10 isolates were selected for each of the pathogenic bacteria.he results showed that the culture medium grown by both probiotic bacteria has antibacterial power against both pathogenic bacteria, but the simultaneous examination of these two probiotics showed a synergistic effect. Staphylococcus aureus bacteria was more sensitive than Escherichia coli. MIC and MBC values ranged from 2.5 to 160 µl/ml. Therefore, the cell-free culture medium of Lactobacillus acidophilus and Bacillus coagulans can be introduced as a new biological compound with antibacterial properties.

Key words:*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*