Homepagr: https://sanad.iau.ir/journal/jfst **E-ISSN: 2676-7155**

(Original Research Paper)

Antibacterial Properties of *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus coagulans* cell-free Culture Medium Against Resistant Pathogens.

Ali Kazemi[1], Nader Habibi[2]*

1. MS.c Graduated of Food Science and Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Received:29/06/2022 Accepted:27/10/2022

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.

Keywords:*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

* Corresponding Author: naderhabibi45@yahoo.com

E-ISSN: 2676-7155 سایت مجله: https://sanad.iau.ir/journal/jfst

(مقاله پژوهشی)

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

علی کاظمی[۱]، نادر حبیبی[۲*]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.
۲- گروه علوم وصنایع غذایی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۴/۰۸ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۷/۲۵

چکیده

اخیراً استفاده از پروبیوتیک‌ها در مهار باکتری‌های بیماری‌زا اهمیت بسیار زیادی پیدا کرده است.علاوه بر آن دارای خواص مفیدی جهت حفظ سلامت بدن می‌باشند. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی خواص ضد باکتریایی 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 آن ها بررسی و جدایه‌های مقاوم به چند دارو جهت ادامه تست‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند. بعد از کشت باکتری‌های *پروبیوتیک* از 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 گرفته شده، 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 ضد باکتریایی علیه هر دو باکتری *پاتوژن* می‌باشند، اما بررسی هم زمان 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، استافیلوکوکوس اورئوس.*

*مسئول مکاتبات: naderhabibi45@yahoo.com

۱-مقدمه

امروزه به دلیل وجود عوامل مختلف ایجادکننده فساد مواد غذایی 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 محدود شده باشد. از طرف دیگر پاتوژن‌های غذا زاد کم کم به آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده مقاوم شده و باعث ایجاد فساد در مواد غذایی 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 *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام به ثبات رسیده است(۲۳). میزان بیان دو ژن TLR2 و TLR4 در سلول‌های آلوده به *سالمونلا انتریتیدیس*، با هر یک از باکتری های 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 یابیوست در پی استرس زیاد)، تقویت سیستم ایمنی، کاهش التهاب و آلرژی‌ها، بهبود خلق و کاهش اضطراب (۱۵، ۲۰). پروبیوتیک‌ها به عنوان افزودنی به مواد غذایی مطرح می‌باشند. پروبیوتیک‌ها معمولاًبه جنس‌های باکتریایی-لاکتوباسیلوس[1]،باسیلوس[2]،رومینوکوکوس[3]،انتروکوکوس[4]، کلستریدیوم[5]و بیفیدوباکتریوم[6]تعلق دارند.این باکتری‌های اسیدلاکتیکی به طورمشخص کموارگانوتروفیک[7] بوده و کربوهیدرات‌ها را تخمیرکرده و درنهایت محصول اصلی آن‌ها اسیدلاکتیک است که با افزایش میزان نفوذپذیری غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی، باعث ورود ترکیبات ضد میکروبی به داخل باکتری‌های بیماری زا شده و باعث مرگ آن‌ها می‌شوند (۲۳،۱۰،۲۰). *لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس*[8] یک باکتری گرم مثبت و متعلق به خانواده لاکتوباسیلاسه و جنس لاکتوباسیلوس می‌باشد.این باکتری به صورت هموفرمانتاتیو (تبدیل‌کننده قند به لاکتیک اسید) 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 *لاکتوباسیلوس-بولگاریکوس*[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 افزایش قابلیت

1-*Lactobacillus*
2 - *Bacillus*
3 - Ruminococcus
4- *Enterococcus*
5- *Clostridium*
6 -*Bifidobacterium*
7- Chemoorganotrophic
8 -*Lactobacillus acidophilus*
9 - *Streptococcus thermophilus*
10-*Lactobacillus bulgaricus*

زنده‌مانی آن‌ها جهت تحمل حرارت در فرآیندهای زیستی و همچنین مقاومت در مقابل نمک‌های صفراوی در حین عبور از معده می‌شود (۱۰). *باسیلوس کواگولانس*[1] نیز علاوه بر ویژگی‌های مذکور، باکتریوسینی تحت عنوان کواگولین[2] 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 لاکتوز و فروکتوز کمک کرده و از بروزعلائم گوارشی در افراد حساس به کربوهیدرات‌ها پیشگیری می‌کند(۱۴). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند عامل ضد میکروبی تولیدشده توسط برخی سویه‌های باسیلوس قادر به مهار گونه‌های کلستریدیوم، کمپیلوباکتر واسترپتوکوکوس می‌باشد (۱۸). اشریشیاکلی 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، منتژیت و ... را دارند. برخی از سویه‌های این باکتری با تولید توکسین در مواد غذایی به عنوان غذا زاد شناخته می‌شوند. توکسین‌های تولید شده توسط این سویه ها عامل ایجاد مسمومیت غذایی می‌باشد؛ به همین دلیل مطالعات مختلفی برای مبارزه با این باکتری و به خصوص سویه‌های پاتوژن انجام می‌شود(۵).

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*[3] یک باکتری گرم مثبت، گرد، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی و بی‌هوازی اختیاری 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 مواد غذایی ایجادکننده مسمومیت غذایی باشد که با اسهال و استفراغ همراه است. حضور این باکتری در مواد غذایی 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 جدا شده از مواد غذایی 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.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه گیری و جداسازی باکتری‌های غذازاد

در مجموع ۱۸۰ نمونه شیرخام گاو مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌گیری در شرایط استریل بااستفاده از ظروف و وسایلی که از قبل استریل شده بودند از شیرهای خام مراکز لبنی سطح شهر سنندج صورت گرفت. مقدار نمونه ۱۰۰ میلی لیتر بود که در ظروف استریل از قبل تهیه شده اخذ گردید. نمونه‌ها سریعاً و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های شیر روی محیط‌های مکانکی‌آگار[4](برای بررسی حضور *اشریشیاکلی*) و بردپارکرآگار[5] (برای بررسی

1 -*Bacillus coagulans*
2- Coagulin

3-*Staphylococcus aureus*
4- MacConkey agar
5-Baird-Parker agar

بررسی حضور *استافیلوکوکوس اورئوس*) 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 ائوزین متیلن-بلوآگار[1] و کلنی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* به محیط مانیتول سالت‌آگار[2] منتقل شدند. سپس پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۶). در مطالعه حاضر از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 و سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 25922 استفاده شد. سویه‌های مذکوراز مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی[3] تهیه شدند.

۲-۲- تعیین تست حساسیت میکروبی

ابتدا بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش آگار دیسک-دیفیوژن (Kirby-Bauer) روی محیط مولرهینتون-آگار(Merck, Germany) طبق دستورالعمل انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی[4] انجام شد (۲۵). از بین جدایه ها طبق CLSI تعداد ۱۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۱۰ جدایه *اشریشیاکلی* مقاوم به چند دارو انتخاب شدند.آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی شامل تتراسایکلین، پنی سیلین، آزیترومایسین، کلیندامایسین، 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* و *باسیلوس کواگولانس*

تعیین مقادیر کمترین غلظت مهارکنندگی رشد[5] و کمترین غلظت کشندگی[6]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 میکرو دایلوشن براث[7] و در میکروپلیت های ۹۶ خانه‌ای ته صاف انجام شد. 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 سازی شد. برای انجام تست میکرودایلوشن براث از غلظت ۶۲۵/ µl/ml۰ تا ۳۲۰ µl/ml انجام شد. در نهایت میزان کمترین غلظت مهارکنندگی رشد با مشاهده عدم وجود کدورت تعیین شد (شکل ۱).از تمام گودهایی که فاقد رشد بوده‌اند مقدار ۱۰ میکرولیتر، روی محیط عصاره مغز و قلب[8] آگار کشت داده می‌شود و کاهش ۹۹/۹٪ تعداد باکتری اولیه به عنوان MBC در نظر گرفته شد(۵).

شکل۱-میکروپلیت ۹۶ خانهای مربوط به تست میکرودایلوشن براث

برای تعیین مقادیر MIC و MBC (مستطیل مشخص شده گودهای معادل MIC را نشان می‌دهد).

1- Eosin Methylene Blue (EMB) Agar
2 - Mannitol Salt Agar (MSA) Agar
3 - Persian Type Culture Collection (PTCC)
4 - Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)
5- Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
6- Minimum Bactericidal Concentration (MBC)
7- Broth Microdilution
8- Brain Heart Infusion (BHI)

۲-۴- بررسی اثر سینرژیسمی دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* به روش تعیین FICi با استفاده از میکروپلیت ۹۶ 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 MIC دو باکتری پروبیوتیک به صورت سینرژیسمی محاسبه شد و طبق رابطه۱اثر سینرژیمی یا هم‌افزایی بررسی شد(۲۳).

رابطه(۱)

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

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 SSPS صورت 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 *استافیلوکوکوس اورئوس* 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 توزیع شده در مراکز لبنی سطح شهر سنندج جدا شد (جدول ۱).

جدول ۱- توزیع فراوانی *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیرخام

نوع باکتری	مواردمثبت		موارد منفی		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

1-Checkerboard

بررسی مطالعات گذشته صورت گرفته در ایران نشان می‌دهد که شیرهای توزیع شده در کشور دارای آلودگی با *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند. این آلودگی می تواند منشا دامی و یا حتی انسانی داشته باشد. در مطالعه سلطان دلال و همکاران (۱۳۹۸)، از تعداد ۱۵۰ نمونه شیر جمع‌شده از شهرستان بروجرد (استان‌لرستان) ۳۱ جدایه (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 *استافیلوکوکوس-اورئوس* پرداخته شد. از ۳۲۰ نمونه شیر در زمان شیردوشی حدود ۶۳ نمونه (۷/۱۹٪) آلوده به *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، در ۶۲ نمونه (۴/۱۹٪) فقط *اشریشیاکلی* و ۳۰ نمونه (۳/۹٪) فقط *استافیلوکوکوس-اورئوس* 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 یخچال دار 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 با اعمال حرارت ازبین نمی‌رود و می‌تواند ایجاد مسمومیت کند.

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

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی در جدول۲ آورده شده است. در مورد باکتری *اشرشیاکلی* بیشترین و کمترین مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین ۱۱(۷۳/۳۳٪) و جنتا مایسن 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 *استافیلوکوکوس‌اورئوس* نسبت به ونکومایسین حساس ۱۹(۱۰۰٪) بودند. نکته مهم و قابل توجه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* جدا شده از نمونه‌های لبنی می‌باشدکه می‌تواند یک زنگ خطر برای مصرف بی‌رویه تجویز آنتی‌بیوتیک باشد و انتشار و انتقال این باکتری، با توجه به این که درصد بالایی از افراد جامعه سالم ناقل آن هستند، در اثر انتقال بین افراد و انتقال ژن‌های مقاومتی، به ایزوله‌های دارای مقاومت چندگانه یا Mullty Drug Resistant Isolates تبدیل می‌شوند. شیرخام دام‌های شیری می‌تواند منبع باکتری‌های مقاوم به چند دارو باشد که تهدیدی بهداشتی برای مصرف شیرخام در ایراناست. با این وجود، تحقیقات بیشتر برای درک ویژگی‌های اپیدمیولوژیک تکمیلی در شیرخام ضروری است(۸,۱۸). بنابراین اگر این باکتری‌ها از طریق غذا وارد بدن انسان شوند ممکن است باعث ایجاد عفونت‌های مقاوم به درمان گردند.

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

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 باکتریلاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس و باسیلوس کواگولانس علیه باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس‌اورئوس

نتایج حاصل از تست میکرو دایلوشن براث برای دو باکتریلاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس‌کواگولانس در جدول۱ قابل مشاهده است. نتایج این تست نشان داد که محیط کشت رشد کرده هر دو باکتری دارای قدرت ضد میکروبی علیه هر دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی می باشند. لازم به ذکر است که باکتری استافیلوکوکوس‌اورئوس 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 *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* 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	۲۰–۴۰	۴–۱۰	۲۰	۱۰	۱۰–۲۰	۵ –۲۰	۵	۲/۵
	P value	۰/۰۳۲*	۰/۰۰۳۳*	غیرقابل آنالیز(یک سویه		۰./۰۳۲*	۰/۰۰۳۳*	غیرقابل آنالیز(یک سویه	
باسیلوس کواگولانس	مقادیر	۴۰–۱۶۰	۴۰–۱۶۰	۸۰	۸۰	۴۰–۸۰	۲۰–۴۰	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 میرزایی و همکاران (۱۳۸۸)، تأثیر پروبیوتیک‌های *بیفیدو باکتریوم آنگولاتوم*، *بیفیدوباکتریوم-بیفیدوم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس-کازئی* 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: H7 مهار نمود. بر اساس نتایج این مطالعه pH نمونه شیر حاوی کشت *E.coli+L. casei* بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری 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 پروبیوتیک های 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 ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس* 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 cfu 10^{8} 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 ضد میکروبی علیه هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* می‌باشند.نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشریشیاکلی* حساس‌تر بود. مقادیر MIC برای *لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس* علیه *اشریشیاکلی* بین ۱۰ تا ۴۰ µl/ml و علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* 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 این که 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

1- *Enteroaggregative Escherichia coli*

دارای اثر کشندگی روی باکتری‌های پاتوژن نیز می باشند. پروبیوتیک ها به واسطه تولید مواد پیشگیری‌کننده از جمله باکتریوسین اسید لاکتیک و ... همچنین با ممانعت از اتصال و رشد و کلونیزه شدن موضعی اجرام بیماری زا در مخاط روده و نیز با مجادله و غلبه بر تصاحب غذا از رخداد بسیاری از عفونت‌ها پیشگیری می‌کنند. 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 به طور طبیعی به شرایط اسیدی حساس بوده و در اسیدیته پایین از بین می‌روند(۹,۱۲).

۳-۴- اثر سینرژیسمی دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* علیه دو باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

با استفاده از تست چکربورد میان کنش بین دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* علیه دو باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر دو باکتری *لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس* و *باسیلوس‌کواگولانس* علیه *اشریشیاکلی* نسبتاً سینرژیسم و علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* کاملاً سینرژیسم بود. اعداد مربوط به FIC_I در جدول۴ آورده شده است.

جدول۴- نتایج برهم‌کنش لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس و باسیلوس‌کواگولانسعلیه 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	نسبتاً سینرژیسم	نسبتاً سینرژیسم	سینرژیسم کامل	سینرژیسم کامل

در همین راستا، بویریوانت و همکاران(۲۰۰۷)، با بررسی اثر مهاری مایع رویی چندین جدایه لاکتوباسیلوس بر برخی از سویه‌های بیماریزا مثل *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلاتیفی موریوم* 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≥ FICI >۰/۵ نسبتاً سینرژیسم، ۲≥ FICI >۰/۷۵ بدون اثر و ۲< FICI به صورت آنتاگونیست در نظر گرفته می‌شود. بنابراین شاخص مذکور برای اشریشیاکلی (۰/۷۵≥FICI>۰/۵) نسبتاً سینرژیسم و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* (۰/۵≥FICI) سینرژیسمی کامل می‌باشد (۴). بررسی اثرات سینرژیسمی ناشی از دو پروبیوتیک مورد مطالعه نشان می‌دهد که این پروبیوتیک‌ها اثر همدیگر را تقویت می نمایند (مشاهده مقادیر FICi). با توجه به نتایج مذکور، این پتانسیل وجود دارد که در آینده بتوان ترکیب این دو باکتری را علیه سایر باکتری‌های مقاوم هم به کار برد.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* دارای خواص ضد باکتریایی 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 *لاکتوباسیلوس-اسیدوفیلوس* و *باسیلوس کواگولانس* به عنوان یک ترکیب بیولوژیکی با خواص ضد باکتریایی معرفی نمود.

۵-منابع

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

۲. میرزایی ح، رضا نهایی م، جوادی ا، احمدی منش مهدی. مطالعه تاثیر برخی پروبیوتیک‌ها بر روی *اشریشیاکلی* O157: H7 در شرایط رشد توأمان در شیر. *مجله تحقیقات دامپزشکی*. ۱۳۸۸؛ ۶۴(۴): ۲۸۲-۲۷۹

3. Bâati L.l, Fabre-Gea C, .Auriol D, Blanc P. J. 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. 2000;* 59: 241-247.
4. Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2007; 23: 679-692.
5. Bonyadian M, Moshtaghi H, Taheri M. A. Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and entero-aggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. *Veterinary Research Forum*. 2014; 5(1):29-34.
6. Carroll, K. C., Butel, J., 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. 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.* 2019*;* 76: 724-730.
8. Dehghani M, Akbarpour B, Salari M, Poursheykhani A, 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. Isolation and evaluation of lactic acid production content in native *Lactobacillus* of Chaharmahal va Bakhtiari province isolated from dairy products. *Biological Journal of Microorganism*. 2012; 1 (3): 41- 52.
10. Gilliland S, Staley T, Bush L. Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct. *Journal of dairy science*. 1984*;* 67: 3045-3051.
11. Griggs J, Jacob J. P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *Journal of Applied Poultry Research*. 1984;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, Deschamps A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria.*International Journal of Food Microbiology*. 2000; 61: 193-197.
14. Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A. Application of probiotics in food products-challenges and new approaches.*Current Opinion in Biotechnology*. 2010; 21: 175-181.
15. Kuete V, Alibert-Franco S, Eyong K, *et al.* Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011; 37: 156-161.
16. Kumar M, Dhaka P, Vijay D, *et al.* Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus*

acidophilus against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016; 48: 265-270.

17. Lin S, Hung A, Lu J. 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*. 2011; 10: 111-114.
18. Momtaz H, Farzan R, Rahimi E, Safarpoor D. F, Souod N. 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, Grover S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria.*Food Control*. 2020; 108: Article 106872.
20. Rahi A, Kazemeini H, Jafariaskari S, Seif A, Hosseini S, Safarpoor D. F. 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*. 2020;13:273-283.
21. Quinto E. J, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T. Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*. 2014; 5: 1765.
22. Salminen S, Ouwehand A, Isolauri E. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 1998; 8: 563-572.
23. Sanhueza L, Melo R, Montero R, Maisey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PloS one.* 2017*;* 12: e0172273.
24. Soltan Dallal M. M, Zandieh Moradi R, Mazaheri Nezhad Fard R, Rajabi Z. Identification and Diagnosis of Enterohemorrhagic E. Coli by Molecular Method in Boroujerd City Cows' Milk. *Journal of Payavard Salamat*. 2020; 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. Metal-organic framework-based sensors for the detection of toxins and foodborne pathogens. *Food Control*. 2022;133:part B. Article 10863.