

Original Article

Evaluation of antibiotic sensitivity of *Bacillus licheniformis* and *Geobacillus stearothermophilus* as indicator microorganisms of microbial inhibition assays for antibiotic residues detection

Sara Mirzaie¹

1. Department of Animal, Poultry and Aquatics, Institute of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

Received: 2024.12.21

Accepted: 2025.03.22

Revised: 2025.03.12

Published: 2025.10.01

* E-mail: smirzaie@irost.ir

Abstract

Introduction: Screening of poultry products is crucial to prevent antibiotic residues from entering the human food chain and to maintain public health. Thermophilic bacteria from the genera *Geobacillus* and *Bacillus* are among the most well-known indicator microorganisms in test-tube-based microbial inhibition assays for screening animal products. **Objective:** The current study was carried out to assess the antibiotic susceptibility of *Bacillus licheniformis* (BL) PTCC 1721 and *Geobacillus stearothermophilus* (GS) IBRC-M 10771, obtained from local microbial collections, to various permitted or banned antibiotics used in food-producing poultry. **Methods:** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of enrofloxacin, sulfamethazine, and oxytetracycline, commonly used in poultry, were assessed using the broth microdilution method. Moreover, antibiotic susceptibility to 12 antibiotics was evaluated using the disk diffusion assay.

Results: The results showed that the MICs of enrofloxacin, sulfamethazine, and oxytetracycline for GS were 0.015, 0.003, and 0.062 mg/L, respectively, while the corresponding values for BL were 2, 1, and 0.125 mg/L. Compared to standard values, these findings indicated that both strains were fully susceptible to these antibiotics. Results from the disk diffusion assay additionally revealed that GS exhibited susceptibility to all evaluated antibiotics. Conversely, BL demonstrated resistance to two antibiotics, colistin and lincomycin, while remaining fully susceptible to the others.

Conclusions: Based on the findings, both evaluated strains exhibited a favorable antibiotic susceptibility profile for use as indicator microorganisms in microbial inhibition assays. However, the spectrum of sensitivity—and thus the potential for residue detection—was broader in GS compared to BL. Further studies are required to determine the detection limits of these strains in accordance with the maximum residue limits in various poultry tissues.

Keywords: Microbial inhibition assay, poultry products, residues, minimum inhibitory concentration



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by [Razi Vaccine & Serum Research Institute](#) This article is an open access article licensed under the [Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](#)

مقاله کامل

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس به عنوان میکروارگانیسم‌های شاخص آزمون‌های مهار میکروبی برای تعیین باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی

سارا میرزائی^۱

۱. گروه دام، طیور و آبزیان، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۲۲



* E-mail: smirzaie@irost.ir

چکیده

مقدمه: آنالیز محصولات طیور برای جلوگیری از ورود باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی به زنجیره غذایی انسان و حفظ سلامت مصرف‌کنندگان ضروری است. باکتری‌های گرم‌دوست متعلق به جنس‌های ژئوباسیلوس و باسیلوس از معروف‌ترین میکروارگانیسم‌های شاخص آزمون‌های مهار میکروبی بر پایه لوله آزمایش برای غربالگری نمونه‌های دامی به شمار می‌روند. **هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی دو سویه باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس تهیه‌شده از کلکسیون‌های میکروبی داخل کشور نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های مجاز برای استفاده در دامپزشکی و برخی داروهای با محدودیت مصرف در طیور مولد غذا انجام شد. **روش کار:** حداقل غلظت مهارکنندگی سه نوع آنتی‌بیوتیک از گروه داروهای پرمصرف طیور شامل انروفلوکساسین، سولفامتازین و اوکسی‌تتراسایکلین برای سویه‌های فوق به روش‌های میکرودايلوشن براث و حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک مجاز یا دارای محدودیت مصرف به روش انتشار دیسک تعیین شد. **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی انروفلوکساسین، سولفامتازین و اوکسی‌تتراسایکلین برای ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس به ترتیب ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۶۲ میلی‌گرم در لیتر و در مورد باسیلوس لیکنی فرمیس به ترتیب ۱، ۲ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر بود که در مقایسه با مقادیر استاندارد، هر دو سویه مورد مطالعه به داروهای فوق کاملاً حساس بودند. نتایج روش انتشار دیسک نیز نشان داد که ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های بررسی‌شده حساس بود. در مقابل، باسیلوس لیکنی فرمیس در برابر کلیستین و لینکومایسین مقاوم ولی به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها کاملاً حساس بود. **نتیجه‌گیری:** طبق این نتایج، هر دو سویه از حساسیت آنتی‌بیوتیکی مناسبی برای استفاده به عنوان میکروارگانیسم شاخص در آزمون مهار میکروبی برخوردار بودند، ولی طیف حساسیت و پتانسیل تعیین باقی‌مانده ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس گسترده‌تر از باسیلوس لیکنی فرمیس بود. در مطالعات آتی حد تشخیص این سویه‌ها با توجه به مقادیر حد مجاز باقی‌مانده‌ها در بافت‌های مختلف طیور باید بررسی شود.

کلمات کلیدی: آزمون مهار میکروبی، محصولات طیور، باقی‌مانده‌ها، حداقل غلظت مهارکنندگی

مقاله

امروزه پرورش طیور به صورت متراکم برای تأمین امنیت غذایی جوامع انسانی اجتناب ناپذیر است. در چنین شرایطی، خطر وقوع بیماری‌های عفونی همه گیر که با خسارت‌های اقتصادی بسیاری همراه است، افزایش می‌یابد. از این رو، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کنترل بیماری‌های عفونی طیور در شرایط معمول پرورش طیور به صورت متراکم ضرورت دارد (۱). آنتی بیوتیک‌های متنوعی مثل فلوروکینولون‌ها، ماکرولیدها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، لینکوزامیدها و سولفونامیدها برای استفاده در دام و طیور مولد غذا مجوز مصرف دارند که در میان آن‌ها سه خانواده مهم سولفونامیدها، تتراسایکلین‌ها و فلوروکینولون‌ها از جمله پر مصرف‌ترین آنتی بیوتیک‌ها برای طیور در کشور به شمار می‌روند (۲، ۳، ۴). کاربرد نادرست آنتی بیوتیک‌ها از نظر دوز دارو، مدت زمان مصرف و بی‌توجهی به دوره قطع مصرف دارو قبل از کشتار دام، ممکن است موجب حضور باقی مانده‌های دارویی و متابولیت‌های آن‌ها در گوشت و محصولات طیور شود (۲). تجمع باقی مانده‌های آنتی بیوتیکی در محصولات دامی ممکن است خطراتی را برای سلامت انسان، از جمله آپلازی مغز استخوان، واکنش ازدیاد حساسیت، تغییر در فلور باکتریایی طبیعی دستگاه گوارش و ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی داشته باشد (۵). با وجود اینکه بروز مقاومت آنتی بیوتیکی مهم‌ترین مسئله خطر ساز باقی مانده‌هاست (چون ممکن است موجب بی‌اثر شدن آنتی بیوتیک‌ها در برابر بیماری‌های عفونی معمول شود)، جنبه‌های کمتر مطالعه شده‌ای مانند سمیت مشتقات باقی مانده‌های آنتی بیوتیکی اکسیدکننده که سیستم آنتی اکسیدانی درونی بدن را مختل می‌کند، نیز باید مدنظر قرار گیرند (۶). گزارش شده است که باقی مانده‌های آنتی بیوتیک طی فرایند پخت و پز نیز به طور کامل از بین نمی‌روند؛ مثلاً نشان داده شده است که انروفلوکساسین در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت سه ساعت باقی می‌ماند و روش‌های معمول پخت روی باقی مانده آن تأثیری ندارند (۷). از این رو، غربالگری محصولات دامی از نظر باقی مانده‌ها در جلوگیری از ورود باقی مانده‌ها به چرخه غذایی و سلامت مصرف کنندگان اهمیت فراوانی دارد. برای کاهش خطر ورود مقادیر باقی مانده به زنجیره غذایی انسان، داروهای دام پزشکی تحت ارزیابی و نظارت دقیق قرار دارند و حداکثر مقدار مجاز باقی مانده (MRL) برای آن‌ها در برخی

کشورها و همچنین کمیسیون اروپا تعیین شده و همچنین ایجاد و توسعه برنامه‌های پایش و روش‌های آنالیز نمونه‌های دامی از نظر وجود باقی مانده‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۸).

وجود باقی مانده‌های آنتی بیوتیکی در گوشت طیور و تخم مرغ در مطالعات صورت گرفته در مناطق مختلف کشور نشان داده شده است (۲، ۹، ۱۰، ۱۱). آزمون‌های تعیین آنتی بیوتیک‌ها که برای آنالیز نمونه‌های دامی به کار می‌روند، به طور کلی روش‌های میکروب شناسی، ایمنی شناسی و شیمیایی مختلفی را شامل می‌شود (۶). روش‌های بر پایه میکروب شناسی مانند آزمون‌های مهار میکروبی برخلاف روش‌های ایمنی شناسی نظیر الایزا ارزان قیمت و با طیف تشخیص گسترده هستند و از این رو، برای غربالگری اولیه محصولات دامی مناسب به شمار می‌روند. این روش‌ها به دو دسته آزمون‌های بر پایه پتری دیش و لوله آزمایش تقسیم بندی می‌شوند. آزمون‌های بر پایه پتری دیش مانند آزمون چهار پلیتی به ۱۶ تا ۱۸ ساعت زمان گرم خانه گذاری تا مشخص شدن جواب نیاز دارند. در حالی که آزمون‌های بر پایه لوله آزمایش بر اساس تغییر رنگ محیط کشت عمل می‌کنند و نتیجه آن‌ها پس از گذشت سه تا چهار ساعت زمان گرم خانه گذاری مشخص می‌شود (۱). همچنین، آزمون‌های مهار میکروبی مبتنی بر لوله آزمایش در پلتهای میکروتیتر نیز قابل اجرا هستند و این مسئله امکان سنجش هم زمان تعداد بیشتر نمونه را فراهم می‌کند (۱۲). روش‌هایی همچون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) یا کروماتوگرافی مایع طیف سنجی جرمی (LC-MS) برای تعیین حضور آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌های حیوانی در واقع آزمون‌های گران قیمتی هستند که عمدتاً برای تأیید نمونه‌های مشکوک پس از غربالگری توصیه شده‌اند (۱).

آزمون‌های مبتنی بر لوله آزمایش شامل محیط کشت تلقیح شده با اسپور باکتری حساس به عنوان شاخص آزمون و معرف pH است. بخش مهم در این آزمون‌ها باکتری شاخص است که معمولاً گونه‌هایی از باسیلوس هاست. سویه‌های باکتریایی با حساسیت آنتی بیوتیکی مناسب از جنس باسیلوس در مقایسه با دیگر باکتری‌ها به دلیل اسپورزا بودن و شرایط رشد آسان (هوازی بودن) در آزمون‌های مهار میکروبی بر پایه لوله آزمایش مناسب‌اند. استفاده از اسپور باکتری در محیط کشت سبب افزایش پایداری و مدت نگهداری محیط کشت آزمون می‌شود (۱۲). باکتری شاخص در

از مراکز کلکسیون میکروبی داخل کشور تهیه شدند، یعنی باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استاروترموفیلوس نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های مجاز برای استفاده در طیور و برخی داروهای با محدودیت مصرف در طیور مولد غذا انجام شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، شرایط کشت و تهیه استوک آنتی‌بیوتیک‌ها در این مطالعه باسیلوس لیکنی فرمیس سویه DSM 13 (PTCC 1721) و ژئوباسیلوس استاروترموفیلوس سویه C953 (IBRC-M 10771) به ترتیب از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت کشت تازه تهیه شدند (جدول ۱). سویه‌ها در محیط کشت جامد نوترینت آگار (مرک، آلمان) کشت داده و در دمای بهینه رشد به ترتیب ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری و تجدید کشت شدند.

سه آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین (۱۷۸۴۹)، سولفامتازین (S6526) و اوکسی‌تتراسایکلین (O5785) به شکل دهیدراته (شرکت سیگما-آلد ریچ، ایالات متحده) تهیه و استفاده شدند. پیش از انجام آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی محلول استوک آنتی‌بیوتیک‌ها تهیه شد. به این ترتیب که از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مول بر لیتر برای انروفلوکساسین و سولفامتازین و آب مقطر برای اوکسی‌تتراسایکلین به عنوان حلال طبق مطالعه وو و همکاران (۲۰۱۹) استفاده شد و با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آماده و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- نگهداری شدند (۲۱).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) با استفاده از روش میکروداپلوشن براث (Microdilution Broth) با سه بار تکرار انجام شد. مقادیر نقاط انفصال (breakpoint) برای آنتی‌بیوتیک‌های انروفلوکساسین، سولفامتازین و اوکسی‌تتراسایکلین در جنس باسیلوس طبق دستورالعمل مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (۰۲) در نظر گرفته شد. غلظت سریالی دوبرابری در محیط کشت نوترینت براث (کیولب، کانادا) برای آنتی‌بیوتیک‌ها جداگانه در میکروپلیت ۶۹ خانه ته‌صاف دردار با جنس پلی‌استایرن و استریل (جت‌بایوفیل، چین) تهیه شد. غلظت‌های نهایی انروفلوکساسین، سولفامتازین

این آزمون‌ها در دمای مناسب خود رشد می‌کند و سبب تغییر رنگ محیط می‌شود. در صورت حضور باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در نمونه در حد شناسایی، از رشد باکتری جلوگیری می‌شود یا به تأخیر می‌افتد و در نتیجه تغییری در رنگ محیط کشت ایجاد نمی‌شود (۱۳). در آزمون‌های مهار میکروبی قدیمی از باسیلوس سوبتیلیس به عنوان میکروارگانیسم شاخص استفاده شده بود. این باکتری تا زمانی شاخص آزمون‌های مهار میکروبی محسوب می‌شد که مقادیر MRL برای آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین نشده بودند، زیرا بعد از آن مشخص شد که این سطوح باقی‌مانده فراتر از توانایی شناسایی شدن به وسیله این سویه هستند (۱۴). ژئوباسیلوس استاروترموفیلوس یکی از پرکاربردترین باکتری‌های شاخص استفاده‌شده در آزمون‌های مهار میکروبی در لوله آزمایش محسوب می‌شوند که تجاری‌سازی شده‌اند، زیرا به سادگی آلوده نمی‌شود، به دمای بالا برای رشد نیاز دارد (۵۵ درجه سانتی‌گراد) و در مدت کوتاه (کمتر از چهار ساعت) رشد سریعی دارد (۱۲). با این حال، گزارش شده که این باکتری ممکن است حساسیت کافی به برخی آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور معمول در پرورش دام و طیور استفاده می‌شوند، از جمله کینولون‌ها، نشان ندهد (۱۵). از سوی دیگر، در مطالعه تومینی و همکاران (۲۰۱۹)، با بررسی سه سویه مختلف جنس باسیلوس مشخص شد که باسیلوس لیکنی فرمیس حساسیت خوبی برای شناسایی کینولون‌ها و سولفونامیدها دارد (۱۳).

مطالعات چندانی در خصوص توسعه روش‌های غربالگری، به ویژه روش مهار میکروبی که آزمون‌های اولیه با هزینه کمتر از روش‌های تأییدی هستند، در کشور انجام و منتشر نشده است. از سوی دیگر، تاکنون بیشتر مطالعات حساسیت آنتی‌بیوتیکی باسیلوس‌ها عمدتاً روی جدایه‌های مرتبط با مشکلات بالینی (میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا) و گونه‌های اسید لاکتیکی متمرکز شده است و اطلاعات کمی در زمینه پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری‌ها به طور کلی وجود دارد (۱۶). با توجه به اهمیت بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری شاخص در آزمون‌های مهار میکروبی، ضرورت دارد که این مطالعات روی باکتری‌هایی صورت گیرد که پتانسیل شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در پرورش طیور را دارند. از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی دو سویه مهم باکتریایی که به عنوان شاخص آزمون‌های مهار میکروبی مبتنی بر لوله آزمایش برای تعیین باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی مطرح و

جدول ۱- مشخصات سویه‌های باکتریایی با قابلیت استفاده به عنوان میکروارگانیزم شاخص در آزمون مهار میکروبی در لوله آزمایش برای تعیین باقی مانده‌ها

نام سویه	منبع	منشاء	شماره کلکسیون‌های داخلی و خارجی	شماره دسترسی در بانک ژن
باسیلوس لیکنی فرمیس سویه 13 DSM	(۱۷، ۱۸)	محصولات لبنی	PTCC 1721 ATCC 14580	NC_006270
ژئوباسیلوس استاروترموفیلوس سویه C953	(۱۹)	نمونه‌های محیطی و خاک	IBRC-M 10771 JCM 12216	AY682097

سه بار تکرار انجام شد (۲۱). برای این کار از کلونی‌های رشد کرده در محیط جامد نوترینت سوسپانسیون در محیط براث ایجاد کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای توصیه شده برای هر سویه باکتریایی گرم‌خانه‌گذاری شدند. کدورت سوسپانسیون با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند به روش طیف‌سنجی طبق آنچه پیش‌تر شرح داده شد، تنظیم شد. سپس به وسیله سواب استریل باکتری در سطح محیط مولر-هیتون آگار (مرک، آلمان) به صورت یکنواخت کشت داده شد. پس از گذشت پنج تا ده دقیقه از کشت و جذب رطوبت سطحی، دیسک‌های آنتی بیوتیک به وسیله پنس استریل در سطح پلیت قرار داده شدند. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای سویه‌های باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استاروترموفیلوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. در نهایت، قطر هاله عدم رشد به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و نتیجه به صورت مقاوم (R)، حساسیت متوسط (I) و حساس (S) طبقه‌بندی شد. با توجه به نبود استاندارد برای آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه در کمیته اروپایی آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی و مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی برای جنس باسیلوس، از مقادیر نقاط انفصال ذکر شده برای لاکتوباسیلوس‌ها استفاده شد (۲۲).

نتایج و بحث

سویه‌های باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استاروترموفیلوس به عنوان باکتری‌های ساپروفیت به طور گسترده در زیست‌بوم پراکنده‌اند. به دلیل توانایی این باکتری‌ها در رشد در محیط‌های با دمای بالا مانند چشمه‌های آب گرم، این گونه‌ها به میکروارگانیزم‌های گرمادوست یا مقاوم به گرما شناخته شده‌اند (۲۳). باسیلوس لیکنی فرمیس همچون برخی دیگر از گونه‌های جنس باسیلوس از نظر تولید مکمل‌های غذایی پروبیوتیکی برای انسان و دام شناخته شده هستند. به طور کلی سویه‌های مختلف باسیلوس و ژئوباسیلوس جدا شده

و اوکسی‌تراسایکلین در هر گوده میکروپلیت ۹۶ خانه در جدول ۲ آورده شده است. سوسپانسیون باکتریایی سویه‌های باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استاروترموفیلوس در محیط کشت نوترینت براث ابتدا به وسیله خوانش در طول موج ۶۲۵ نانومتر (اسپکتروفتومتر سسیل، سی ای ۲۰۴۰، انگلستان) و تعیین چگالی نوری در محدوده ۰/۸ تا ۰/۱۳ با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تطبیق داده شدند. سپس غلظت به دست آمده با محیط کشت نوترینت براث رقیق شد (۱:۲۵) تا غلظت مورد نظر در هر گوده برابر با 3×10^6 واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر حاصل شود (۱۶). حجم نهایی در هر گوده ۱۵۰ میکرولیتر بود. گوده‌های حاوی باکتری به تنهایی شاهد مثبت و گوده‌های حاوی محیط کشت به تنهایی و بدون آنتی بیوتیک شاهد منفی در نظر گرفته شد. پلیت‌ها برای سویه‌های باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استاروترموفیلوس با توجه به گرمادوست بودن هر دو سویه به ترتیب در دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی هر آنتی بیوتیک به عنوان کمترین غلظتی در گوده‌ها در نظر گرفته شد که پس از اتمام زمان گرم‌خانه‌گذاری فاقد رشد قابل مشاهده باکتری بود. همچنین جذب نوری میکروپلیت توسط دستگاه الیزا ریدر (سایتیشن ۵، ایالات متحده) در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد.

آزمون انتشار دیسک

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های مدنظر به روش انتشار دیسک کربی-بائر (Kirby-Bauer) طبق دستورالعمل کمیته اروپایی این آزمون برای ۱۲ نوع آنتی بیوتیک مختلف شامل کلیستین، انروفلوکساسین، اریترومايسين، لینکومايسين، اوکسی‌تراسایکلین، سولفامتوکسازول-تری متوپریم، تایلوزین، کلرامفنیکل، فلورفنیکل، سیپروفلوکساسین، داکسی سایکلین و نئومايسين (پادتن طب، ایران) با

جدول ۲- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها برای سویه‌های باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس

مقادیر نقاط انفصال برای جنس باسیلوس (میلی گرم در لیتر) (CLSI ⁺⁺ , ۲۰۱۶)			دسته آنتی‌بیوتیک‌ها	طیف غلظت‌های آنتی‌بیوتیکی (میلی گرم در لیتر)	مقدار MIC ⁺ (میلی گرم در لیتر)	آنتی‌بیوتیک	نام سویه باکتری
مقاوم (R)	حساسیت متوسط (I)	حساس (S)					
≥ 8	4	≤ 2	فلوروکینولون‌ها	0/5 - 512	2	انروفلوکساسین	باسیلوس لیکنی فرمیس
				0/5 - 512	1	سولفامتازین	
$\geq 4/76$	-	$\leq 2/38$	سولفونامیدها	0/15 - 512	0/125	اوکسی‌تتراسایکلین	ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس
				0/07 - 512	0/15	انروفلوکساسین	
≥ 16	8	≤ 4	تتراسایکلین‌ها	0/002 - 512	0/03	سولفامتازین	
				0/07 - 512	0/62	اوکسی‌تتراسایکلین	

MIC⁺ حداقل غلظت مهارکنندگیCLSI⁺⁺ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی

(۱) از منابع مختلف به دلیل توانایی در تولید متابولیت‌هایی همچون

آنزیم‌ها، اسیدهای آمینه، باکتریوسین‌ها، سورفکتانت‌ها و امثال آن مورد توجه‌اند و کاربردهای زیست‌فناورانه‌ای دارند (۲۴).

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی سویه‌های باسیلوس لیکنی فرمیس و ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس همراه با طیف غلظت‌های مطالعه‌شده و مقادیر نقاط انفصال توصیه‌شده از سوی مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی در جدول ۲ ارائه شده است. همچنین، نتایج مربوط به حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک در جدول ۳ نشان داده شده است.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، حداقل غلظت مهارکنندگی انروفلوکساسین، سولفامتازین و اوکسی‌تتراسایکلین برای ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس به ترتیب ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۶۲ میلی‌گرم در لیتر و برای باسیلوس لیکنی فرمیس به ترتیب ۱، ۲ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر بود. بر این اساس، در مقایسه با مقادیر استاندارد، هر دو سویه مطالعه‌شده به آنتی‌بیوتیک‌های یادشده کاملاً حساس بودند. نتایج تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک نیز نشان داد که ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های بررسی‌شده حساس بود. در مقابل، باسیلوس لیکنی فرمیس در برابر کلیستین و لینکومایسین مقاومت نشان داد، ولی به دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه‌شده کاملاً حساس بود (شکل

۱). ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس، سویه استفاده‌شده در آزمون‌های مهار میکروبی مبتنی بر لوله آزمایش، به دلیل داشتن حساسیت بسیار نسبت به بتا-لاکتام‌ها که به‌ویژه در دام استفاده می‌شوند شناخته شده است و گزارش شده که حساسیت کافی به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام همچون کینولون‌ها، تتراسایکلین‌ها و سولفونامیدها ندارد (۱۲، ۲۵). باین حال، نتایج مطالعه حاضر بیانگر حساسیت این سویه به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه‌شده بود. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های مطالعه ناگل و همکاران (۲۰۲۴) مطابقت داشت که نشان داد ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس به تتراسایکلین‌ها حساسیت در سطح بالا (حداقل غلظت مهارکنندگی اوکسی‌تتراسایکلین برای این باکتری برابر با ۰/۰۱۹ میلی‌گرم در لیتر) و به تایلوزین، لینکومایسین، اریترومایسین و نئومایسین نیز حساسیت دارد (۲۶). در مطالعه دیگری نیز، نجار و همکاران (۲۰۲۲)، حساس بودن ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس و دیگر باکتری‌های گرمادوست متعلق به جنس ژئوباسیلوس را به اریترومایسین و کلرامفنیکل گزارش کردند (۲۳). در یک مطالعه، باسیلوس لیکنی فرمیس جداشده از دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی در برابر اریترومایسین و لینکومایسین مقاوم بود (۲۷). مشخص شده است که ژن speG که در باسیلوس لیکنی فرمیس یافت می‌شود، در مقاومت باکتری در

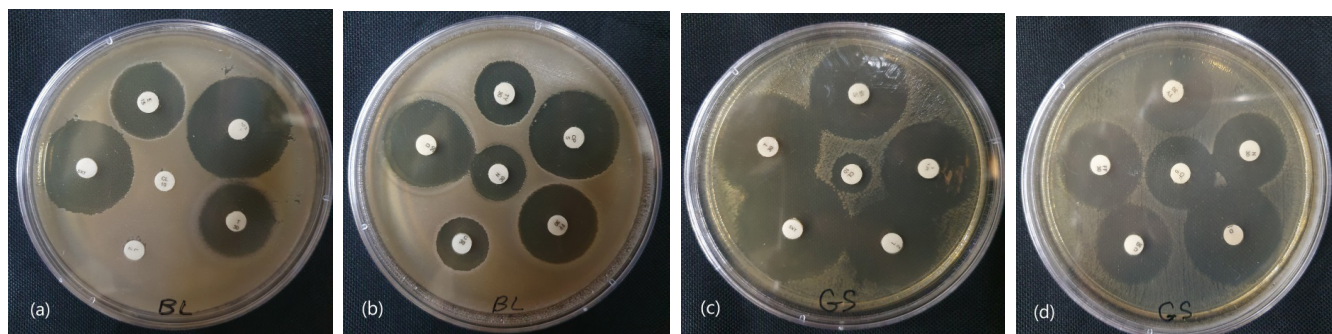
جدول ۳- مقادیر قطر هاله عدم رشد در آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار دیسک

مقادیر نقاط انفصال قطر هاله عدم رشد (میلی متر)	قطر هاله عدم رشد* (میلی متر)		باسیلوس لیکنی فرمیس / استناروترمو فیلوس	غلظت دیسک (میکرو گرم)	نام آنتی بیوتیک	
	حساس (S)	حساسیت متوسط (I)				مقاوم (R)
≤ ۸	۹- ۱۰	≥ ۱۱	۱۳	۷/۵	۱۰	کلیستین (CL)
≤ ۱۳	۱۴- ۱۸	≥ ۱۹	۳۳	۳۴	۵	انروفلوکساسین (NFX)
≤ ۱۳	۱۴- ۱۷	≥ ۱۸	۳۲/۵	۲۴/۵	۱۵	اریترومایسین (E)
≤ ۱۴	۱۵- ۱۸	≥ ۱۹	۳۴/۵	۲۵/۵	۳۰	اوکسی تتراسایکلین (T)
≤ ۸	۹- ۱۱	≥ ۱۲	۳۱	۷/۵	۲	لینکومایسین (L)
≤ ۱۰	۱۱- ۱۵	≥ ۱۶	۳۷/۵	۳۱/۵	۲۳/۷۵ - ۱/۲۵	سولفامتوکسازول- تری متوپریم (SXT)
≤ ۱۳	۱۴- ۱۷	≥ ۱۸	۲۸	۲۰/۷	۳۰	تایلوزین (TY)
≤ ۱۳	۱۴- ۱۷	≥ ۱۸	۲۷	۱۹/۲	۳۰	کلرامفنیکل (C)
≤ ۱۳	۱۴- ۱۷	≥ ۱۸	۳۱	۲۸/۷	۳۰	فلورفنیکل (FF)
≤ ۱۳	۱۴- ۱۸	≥ ۱۹	۲۵/۶	۳۰/۲	۵	سیپروفلوکساسین (CP)
≤ ۱۴	۱۵- ۱۸	≥ ۱۹	۳۵/۳	۲۹/۸	۳۰	داکسی سایکلین (D)
≤ ۱۵	۱۶- ۱۷	≥ ۱۸	۲۴/۶	۱۸/۶	۳۰	نئومایسین (N)

* داده‌ها میانگین سه بار تکرار آزمون است.

(۲۰۲۳) حساسیت باسیلوس لیکنی فرمیس را به اریترومایسین، انروفلوکساسین و تتراسایکلین گزارش کردند (۲۹). با این حال، برخلاف نتایج مطالعه حاضر و بسیاری از مطالعات پیشین، مواردی از مقاومت باسیلوس لیکنی فرمیس در برابر اریترومایسین نیز گزارش شده است (۳۰، ۳۱). در مطالعه دیگری، حساسیت سویه‌های باسیلوس لیکنی فرمیس به اوکسی تتراسایکلین و کلرامفنیکل گزارش شد (۳۲). آدامسکی و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی باسیلوس‌ها مشاهده کردند که پروفایل حساسیت

برابر کلیندامایسین مؤثر است (۲۸). با توجه به مقاومت مشاهده شده باسیلوس لیکنی فرمیس در مطالعه حاضر در برابر لینکومایسین که با کلیندامایسین در خانواده لینکوزامیدها قرار می‌گیرد و با گزارش‌های پیشین نیز همسو است، احتمال دارد که مقاومت مشاهده شده به لینکومایسین با واسطه ژن یادشده ایجاد شده باشد. حساسیت آنتی بیوتیکی باسیلوس لیکنی فرمیس گرمادوست جداشده از خاک، حساسیت این میکروارگانیسم به کلرامفنیکل، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین نشان داده شد. همچنین نیری و همکاران



شکل ۱- پلیت‌های محیط کشت آگار مولر-هیتون در روش انتشار دیسک برای سویه باسیلوس لیکنی فرمیس (a و b) و ژئوباسیلوس استئروترموفیلوس (c و d) پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری

برای بالا بردن حساسیت دارویی/اشریشیا به کار رفته‌اند، ولی به‌طور کلی استفاده از باکتری‌های گرم‌منفی برای روش‌های مهار میکروبی بسیار کم است (۳۵).

فنیکل‌ها از جمله کلرامفنیکل و فلورفنیکل از آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی با طیف اثر گسترده بر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی هستند که طبق اعلام مراجع بهداشتی، منع مصرف یا محدودیت‌هایی در استفاده از آن‌ها در طیور وجود دارد (۳۶). مثلاً کلرامفنیکل به‌دلیل احتمال ایجاد عوارض در مصرف کنندگان همچون سرکوب مغز استخوان و ایجاد آنمی آپلاستیک برای استفاده در دام و طیور مولد غذا غیرمجاز بوده و فلورفنیکل نیز با آنکه عوارض یادشده برای کلرامفنیکل را ایجاد نمی‌کند، ولی از آنجاکه به‌دلیل چربی‌دوست بودن و تجمع در بافت چربی می‌تواند پایدار بماند و در بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نقش داشته باشد، در دوره تولید طیور تخم‌گذار تجاری منع مصرف دارد (۳۴). در مطالعات مختلف داخل کشور وجود باقی‌مانده‌های فلورفنیکل (۲۰ درصد از نمونه‌های گوشت طیور) و کلرامفنیکل در ۱۷/۵ درصد و ۱۷/۹ درصد نمونه‌های گوشت و احشای طیور گزارش شده است (۳۴، ۳۶، ۳۷). توجه به اینکه هر دو سویه باسیلوس مطالعه‌شده حساسیت خوبی به فنیکل‌ها نشان دادند، استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در آزمون‌های مهار میکروبی می‌تواند امکان شناسایی موارد سوءمصرف و تخلفات استفاده از این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها را نیز فراهم کند.

نتیجه‌گیری

ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس و باسیلوس لیکنی‌فرمیس از جمله مهم‌ترین سویه‌های دارای پتانسیل استفاده به‌عنوان میکروارگانیسم شاخص در آزمون‌های مهار میکروبی برای غربالگری نمونه‌های دامی شناخته شده‌اند. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها از منبع کلکسیون‌های داخل کشور به‌منظور مشخص شدن طیف بالقوه آنتی‌بیوتیک‌های شناسایی شده به‌وسیله آن‌ها ضرورت داشت که در این مطالعه بررسی شد. طبق نتایج مطالعه حاضر، هر دو سویه از حساسیت آنتی‌بیوتیکی مناسبی برای استفاده به‌عنوان میکروارگانیسم شاخص در آزمون مهار میکروبی برخوردار بودند، ولی طیف حساسیت و پتانسیل تعیین باقی‌مانده ژئوباسیلوس/استئاروترموفیلوس گسترده‌تر از باسیلوس لیکنی‌فرمیس بود. در مطالعات آتی باید درباره

آنتی‌بیوتیکی بسته به گونه متفاوت است (۳۰). در مطالعه یادشده حساسیت باسیلوس لیکنی‌فرمیس از منشأ شیر خام به کلرامفنیکل و مروپنم گزارش شد. در مطالعه دیگری، غلظت مهارکنندگی تتراسایکلین برای باسیلوس لیکنی‌فرمیس برابر با ۰/۲۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد که به‌معنای حساس بودن این باکتری همانند نتایج مطالعه حاضر بود (۳۱). از آنجاکه گونه‌های جنس باسیلوس به‌عنوان افزودنی غذایی و پروبیوتیک‌ها کاربرد گسترده‌ای دارند، ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در مورد گونه‌هایی از این جنس که دارای قابلیت پروبیوتیکی هستند، بیشتر گزارش شده است. مثلاً، در مطالعه ادیمپونگ و همکاران (۲۰۱۲)، حداقل غلظت مهارکنندگی برای هشت آنتی‌بیوتیک روی باسیلوس لیکنی‌فرمیس دارای پتانسیل پروبیوتیکی نشان داد که این باکتری به تتراسایکلین، ونکومايسين و جنتامایسین حساس، ولی در برابر استرپتومایسین مقاوم است (۱۶). در مطالعه بنون و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی باسیلوس لیکنی‌فرمیس گرمادوست جداسده از خاک، حساسیت این میکروارگانیسم به کلرامفنیکل، اریترومايسين و سیپروفلوکساسین نشان داده شد (۳۳).

مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در طیور پرورشی گاه با عدم رعایت دوره قطع مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها تا کشتار همراه است که موجب ایجاد این نگرانی می‌شود که داروها به‌طور کامل از بدن طیور دفع نشده‌اند و در نتیجه باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی به غذای مصرف کنندگان راه پیدا می‌کند (۳۴). در مطالعات مختلف، از باکتری‌های مختلفی به‌تنهایی یا در مجموعه آزمایش‌ها به‌عنوان باکتری شاخص آزمون مهار میکروبی در غربالگری محصولات طیور استفاده شده است که معروف‌ترین آن‌ها ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس، اشریشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس لیکنی‌فرمیس است (۱۲، ۱۳). باکتری‌های شاخص برای آزمون‌های مهار میکروبی به‌طور غالب از میان باکتری‌های گرم‌مثبت انتخاب می‌شوند. تعیین طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از باکتری‌های گرم‌منفی به‌طور معمول چالش‌برانگیز است، زیرا این باکتری‌ها پوشش سلولی پیچیده‌ای متشکل از غشای داخلی و غشای خارجی دارند. غشای خارجی باکتری‌های گرم‌منفی سد اصلی نفوذ بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌هاست، درحالی‌که باکتری‌های گرم‌مثبت یک لایه دارند که به آنتی‌بیوتیک‌ها نفوذپذیرتر است. روش‌های مهندسی ژنتیک

- 8- Lateefat HM, Olaniyi OA, Misbahu G, Raimi OM. A wake-up call: determination of antibiotics residue level in raw meat in abattoir and selected slaughterhouses in five local government in Kano State, Nigeria. *BioRxiv*. 2022 Jan 5:2022-01. <https://doi.org/10.1101/2022.01.04.474991>.

org/10.1017/S0022029900003848.

19- Nazina TN, Sokolova DS, Grigoryan AA, Shestakova NM, Mikhailova EM, Poltarau AB, Tourova TP, Lysenko AM, Osipov GA, Belyaev SS. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. *Syst Appl Microbiol*. 2005 Jan 28;28(1):43-53. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.001>.

20- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, 3rd ed CLSI guideline M45 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016 Wayne, PA.

21- EUCAST: Breaking Point Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters v_12.0_Breakpoint Tables. 2022, 1–110. Available online: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 20 February 2023).

22- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot*. 1998 Dec 1;61(12):1636-43. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.12.1636>.

23- Najar IN, Das S, Kumar S, Sharma P, Mondal K, Sherpa MT, Thakur N. Coexistence of heavy metal tolerance and antibiotic resistance in thermophilic Bacteria belonging to Genus *Geobacillus*. *Front microbiol*. 2022 Aug 25;13:914037. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.914037>.

24- Toutiaee S, Mojgani N, Harzandi N, Moharrami M, Mokhberosafa L. In vitro probiotic and safety attributes of *Bacillus* spp. isolated from beebread, honey samples and digestive tract of honeybees *Apis mellifera*. *Lett Appl Microbiol*. 2022 May 1;74(5):656-65. <https://doi.org/10.1111/lam.13650>.

25- Beltrán MC, Berruga MI, Molina A, Althaus RL, Molina MP. Performance of current microbial tests for screening antibiotics in sheep and goat milk. *Int Dairy J*. 2015 Feb 1;41:13-5. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.007>.

26- Nagel OG, Gasparotti ML, Machado SI, Althaus RL. Similarities of *Geobacillus* bacteria based on their profiles of antimicrobial susceptibility in milk samples. *Rev Argent Microbiol*. 2024 Jan 1;56(1):102-11. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.07.003>.

27- Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Feb;71(2):968-78. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.968-978.2005>.

28- Heo G, Kong H, Kim N, Lee S, Sul S, Jeong DW, Lee JH. Antibiotic susceptibility of *Bacillus velezensis*.

FEMS Microbiol Lett. 2022;369(1):fnac017. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac017>.

29- Nayeri Fasaei B, Ashrafi Tamai I, Joghataei SM. First Isolation of *Bacillus licheniformis* from Bovine Mastitis in Iran. *Arch Razi Inst*. 2023 Dec;78(6): 1690. <https://doi.org/10.32592/ARI.2023.78.6.1690>.

30- Adamski P, Byczkowska-Rostkowska Z, Gajewska J, Zakrzewski AJ, Kłębukowska L. Prevalence and antibiotic resistance of *Bacillus* sp. isolated from raw milk. *Microorganisms*. 2023 Apr 19;11(4):1065. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041065>.

31- Agersø Y, Stuer-Lauridsen B, Bjerre K, Jensen MG, Johansen E, Bennedsen M, Brockmann E, Nielsen B. Antimicrobial susceptibility testing and tentative epidemiological cutoff values for five *Bacillus* species relevant for use as animal feed additives or for plant protection. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Oct 1;84(19):e01108-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01108-18>.

32- Banerjee S, Devaraja TN, Shariff M, Yusoff FM. Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and Artemia. *J Fish Dis*. 2007 Jul;30(7):383-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00819.x>.

33- Banoon S, Ali Z, Salih T. Antibiotic resistance profile of local thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated from Maysan province soil. *Comun Sci*. 2020 Jul 13;11:e3291. <https://doi.org/10.14295/cs.v11i0.3291>.

34- Mohammadi M, Fathi E, Gholami-Ahangaran M. The study of florfenicol residue in chicken meat in Charamahal-va-Bakhtiyari province by high purified liquid chromatography. *New Findings Vet Microbiol*. 2020 Feb 20;2(2):10-6. <https://doi.org/10.35066/J040.2019.913>.

35- Jonkers TJ, Steenhuis M, Schalkwijk L, Luirink J, Bald D, Houtman CJ, Kool J, Lamoree MH, Hamers T. Development of a high-throughput bioassay for screening of antibiotics in aquatic environmental samples. *Sci Total Environ*. 2020 Aug 10;729:139028. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139028>.

36- Tajik H, Malekinejad H, Razavi-Rouhani SM, Pajouhi MR, Mahmoudi R, Haghazari A. Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. *Food Chem Toxicol*. 2010 Aug 1;48(8-9):2464-8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.014>.

37- Rahimi E, Jafarian M. Evaluation of chloramphenicol residues in poultry meat using ELISA method in Isfahan. *Vet J Islam Azad Uni Tabriz Branch*. 2009; Mar 12;3:203-7.