

جداسازی و شناسایی باکتری های پروبیوتیکی تولید کننده اسید لاکتیک از شیر الاغ

محمد جواد اکرمی^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۲*}، احمد اسماعیلی^۳

۱- دانشجوی بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- دانشیار بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۳- دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره هفدهم / شماره ۴ / زمستان ۹۴ / مسلسل ۶۶

چکیده

دریافت مقاله: ۹۴/۸/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۱۳

*** مقدمه:** استفاده شیر الاغ به عنوان یک منبع تغذیه جدید، به دلیل خواص تغذیه‌ای و فقدان پروتئین‌های آلرژی‌زا در حال افزایش است. فلور میکروبی شیر الاغ، به خصوص باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) آن هنوز به طور کامل شناسایی نشده‌اند. این تحقیق برای اولین بار با هدف بررسی فلور میکروبی شیر الاغ به منظور شناسایی باکتری‌های بومی با خواص پروبیوتیکی انجام گرفت.

*** مواد و روش‌ها:** باکتری‌های اسید لاکتیک شیر الاغ با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی و به کمک روش‌های استاندارد میکروبیولوژی شناسایی گردیدند. تعداد ۲۵۰ کلونی مجزا و تصادفی از ۳ نمونه شیر الاغ مربوط به عشایر شهرستان سلسله جداسازی شدند. برای شناسایی گونه‌ها از آزمون‌های گرم، کاتالاز، حرکت در محیط جامد، توانایی رشد در pH=۹/۶ و غلظت ۶/۵(w/v)٪ کلرید سدیم، تخمیر قندها و آزمون هیدرولیز هیپورات سدیم به همراه شناسایی میکروسکوپی استفاده شد.

*** یافته‌ها:** از ۲۵۰ کلونی انتخابی، ۲۰ کلونی، باکتری‌های کاتالاز منفی، گرم مثبت و کوکسی بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که شیر الاغ عمدتاً حاوی گونه‌هایی از دو جنس استرپتوکوکوس و انتروکوکوس است. بیشترین نوع باکتری جداسازی شده به گونه‌ی انتروکوکوس فکاليس (حدوداً ۵۵٪) تعلق داشتند. برای اولین بار در ایران، نتایج این آزمایش توانست گونه‌ی استرپتوکوکوس دیورسی را از شیر الاغ جداسازی و گزارش نماید.

*** بحث و نتیجه‌گیری:** علیرغم فراوانی لیزوزیم در شیر الاغ، وجود باکتری‌های پروبیوتیک مفید نشان می‌دهد که این شیر می‌تواند جایگزین مناسبی برای تغذیه کودکان حساس به پروتئین‌های شیر گاو باشد. تولید باکتریوسین‌ها توسط انتروکوکوس فکاليس، می‌تواند از رشد و تکثیر سایر باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کند. شناسایی گونه استرپتوکوکوس دیورسی در شیر الاغ می‌تواند زمینه را برای مطالعات بعدی در خصوص مشخصات این باکتری در کشور فراهم کند.

*** واژه‌های کلیدی:** شیر الاغ، انتروکوکوس، باکتری‌های اسید لاکتیک، استرپتوکوکوس دیورسی، پروبیوتیک.

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات.

پست الکترونیک: Nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

پروبیوتیک ها یک و یا مخلوطی از میکروارگانیسم- های زنده هستند، که در انسان و حیوانات، به وسیله بهبود شرایط برای رشد جمعیت میکروارگانیسم های بومی روده می توانند سودمند باشند (۱). اثرات پروبیوتیک ها شامل سرکوب میکروارگانیسم های پاتوژن، ضدجوش، ضد- سرطان، افزایش پاسخ های ایمنی و کاهش سطوح کلسترول است (۲).

بر اساس برآورد آکادمی آلرژی آمریکا، حدود ۵ درصد از کودکان زیر ۵ سال و ۴ درصد از نوجوانان به ترکیبات مواد غذایی آلرژی دارند (۳). از این میان، در حدود ۰/۳ درصد تا ۷/۵ درصد از نوزادان در سراسر دنیا به شیر گاو بخصوص پروتئین های موجود در شیر گاو آلرژی دارند. با این حال، در صورتی که مادر نتواند به نوزادش شیر بدهد، شیر گاو یکی از بهترین و اولین راه- حل های پیش روی والدین است. عدم تحمل شیر گاو و حساسیت به آن ممکن است خفیف، متوسط تا شدید بوده و در مواردی خطرناک و کشنده شود (۳).

اگرچه سابقه تغذیه نوزادان در یتیم خانه ها با شیر الاغ در فرانسه به اواخر قرن نوزدهم می رسد (۴)، تنها در سال های اخیر دانشمندان متوجه شده اند که باید به دنبال جایگزینی برای تغذیه نوزادان مبتلا به آلرژی به شیر گاو بگردند. این موضوع سبب شده است که به تازگی شیر الاغ به دلیل خواص تغذیه ای، برخورداری از فعالیت های ایمنولوژیکی و جلوگیری از آترواسکلروزیس توجه متخصصان تغذیه را به خود جلب نماید (۵) شیر الاغ سرشار از پروتئین های α -لاکتالبومین و β -لاکتوگلوبولین به ترتیب با ۳۵٪ و ۵۰٪ کل بخش نیتروژن دار در مقایسه با ۲۰٪ شیر گاو است. میزان کازئین موجود در شیر الاغ حدود ۷/۸ گرم بر لیتر است که از این نظر بسیار شبیه به شیر انسان است (۶). علاوه بر خصوصیات چون خواص تغذیه ای، خواص فیزیولوژیکی نظیر ایمنی زایی

(ایمنوگلوبولین ها و سایر پروتئین ها)، کمک گوارشی (آنزیم ها و مهارکننده های آنزیمی، تثبیت کننده، انعقاد کنندگی، یا حامل پروتئین ها) و تولید فاکتورهای رشد (هورمون ها) (۷)، بار میکروبی پایین به دلیل مقادیر فراوان لیزوزیم در مقایسه با شیر سایر احشام (۴) عدم وجود میکروب های بیماری زایی مانند *Salmonella spp.*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis* و *Listeria monocytogenes* در صورت رعایت اصول بهداشتی در شیر الاغ و خواص درمانی از جمله اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد تصلب شرائین این شیر را در زمره بهترین منابع تأمین شیر برای نوزادان قرار داده است (۸). به علاوه، تحقیقات اخیر نشان می دهند که ترکیبات شیر الاغ دارای اثرات ضد سرطانی (۹)، خواص ضد ویروسی (۱۰)، اثرات ضد میکروبی گسترده ای بوده (۱۱، ۱۲) و می تواند باعث انگیزش و تقویت سیستم ایمنی سالمندان گردد (۱۳).

شناسایی، جداسازی و غربال میکروارگانیسم ها از منابع طبیعی، وسیله ای مؤثر برای دستیابی به گونه هایی از باکتری هاست که از لحاظ ژنتیکی حائز اهمیت هستند. طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها در شرایط مختلف در اطراف ما در حال زندگی هستند. بسیاری از این میکروارگانیسم ها نقش مؤثری در بهبود شرایط زندگی سایر موجودات از جمله انسان دارند. برای مثال، باکتری های اسید لاکتیک، پروبیوتیک های زنده ای هستند که با اصلاح تعادل میکروبی داخل دستگاه گوارش به خصوص محیط روده در موجودات زنده و به دنبال آن تغییر متابولیسم میکروبی، باعث افزایش سیستم ایمنی بدن، جلوگیری از عفونت های باکتریایی و جلوگیری و درمان اسهال در انسان می شوند (۱۴). مواد لبنی از جمله مواد غذایی هستند که این باکتری ها در آن زندگی می کنند. بشر سال هاست که برای تغییر خصوصیات طعم و بافت محصولات لبنی به منظور افزایش زمان ماندگاری آن ها از این باکتری ها

دو پستان مقدار ۱۰ میلی لیتر شیر جمع آوری شد. نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس برای ادامه ی مراحل بعدی آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

آنالیزهای میکروبی

به منظور فراهم آوردن شرایط کشت، رقت های 10^{-1} تا 10^{-6} از نمونه های شیر با استفاده از افزودن سرم فیزیولوژی (۰/۹ NaCl w/v) تهیه گردید. از هر یک از رقت های یاد شده، مقدار یک میلی لیتر در محیط MRS جامد شده توسط آگار، کشت گردید. محیط کشت در دو دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت در شرایط هوازی انکوبه شدند. پس از رشد باکتری ها، کلونی های تشکیل شده بر روی محیط کشت از نظر اندازه و شکل مورد ارزیابی قرار گرفتند. از تمام کلونی هایی که نماینده همه اندازه ها و اشکال بودند، به صورت تصادفی ۲۵۰ کلونی برداشته شد و در محیط های MRS جامد تازه کشت داده شدند. عمل باز کشت تا اطمینان از خلوص کلونی های تک هر دو روز یکبار انجام گرفت. تعداد ۷۰ کلونی مجزا و خالص از مجموعه همه نمونه ها انتخاب و از آن ها برای آزمایش های بعدی استفاده شد.

آزمون های تشخیصی

آزمون گرم بر اساس روش کریستیان گرم (۲۳) و کاتالاز بر اساس روش آکابندا صورت گرفت (۲۴)، توانایی رشد در دماهای ۱۵ و ۴۲ درجه سانتی گراد و همچنین توانایی رشد در pH=۹/۶ بر اساس روش اسنیت و همکاران، توانایی رشد در غلظت (۶/۵ W/V)٪ کلرید سدیم، آزمودن حرکت در محیط آگار بر اساس روش تیسلر و سن هولزر، تولید اسید از کربوهیدرات های مختلف در محیط نوترینت و فنول رد به عنوان معرف رنگی و ۲ درصد کربوهیدرات بر اساس روش تورس لینانز برای تمامی کلونی های انتخاب شده صورت گرفت (۲۶، ۲۵).

استفاده می کنند (۱۵) نقش اولیه ی باکتری های اسید لاکتیک تخمیر کربوهیدرات ها و به دنبال آن کاهش pH محصولات لبنی است. وجود pH اسیدی به دلیل تولید اسیدهای آلی به خصوص اسید لاکتیک، دی استیل، پروکسید هیدروژن و باکتریوسین های متعدد، از جمله عوامل اصلی حفظ خواص مفید فرآورده های لبنی است (۱۶). افزودن باکتری های اسید لاکتیک به مواد غذایی روز به روز در حال افزایش است به طوری که تقاضا برای مصرف مواد غذایی بخصوص مواد لبنی حاوی باکتری های مفید به طرز چشمگیری افزایش یافته است. از این رو، جستجوی گونه های جدیدی از باکتری های مفید اسید لاکتیک از منابع مختلف برای بهره برداری در تغذیه انسان بسیار حائز اهمیت است. با وجود آنکه در مورد ترکیبات شیمیایی و تغذیه ای شیر الاغ اطلاعات کافی در دسترس وجود دارد (۱۷، ۱۸)، در خصوص میکروفلور (میکروارگانیسم های موجود در شیر) شیر الاغ اطلاعات بسیار ناچیز و انگشت شمار است (۲۱-۱۹، ۸، ۶). به جرأت می توان گفت که در مورد باکتری های اسید لاکتیک شیر الاغ تعداد تحقیقات از تعداد انگشت های یک دست هم کمتر است (۲۲، ۱۷). این تحقیق به منظور شناسایی باکتری های اسید لاکتیک شیر الاغ به امید یافتن گونه یا سویه های جدید برای استفاده در صنایع لبنی انجام شده است.

مواد و روش ها

نمونه گیری

در یک مطالعه تجربی سه نمونه شیر الاغ از سه ماده الاغ سالم عشایر منطقه سلسه الشتر در شمال استان لرستان در سال ۱۳۹۳ تهیه و در شرایط استریل در دمای ۴ درجه سانتی گراد در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. برای نمونه گیری ابتدا سطح پستان دام ها توسط الکل اتیلیک ۷۰٪ کاملاً ضد عفونی شد. سپس با دستمال کاغذی استریل سطح پستان خشک و در نهایت مبادرت به شیر دوشی گردید. از هر کدام از دام ها از هر

ATCC29212 به عنوان شاهد مثبت و از باکتری لئوکونوستوک مزنترویدس به عنوان شاهد منفی در آزمون هیدرولیز هیپورات سدیم استفاده شد.

یافته ها

مشاهدات این آزمایش نشان داد رشد تعداد کلونی ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد خیلی کمتر از تعداد کلونی ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بود. به علاوه کلونی های حاصل در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد از نظر اندازه ریزتر و رشد کمتری نسبت باکتری های دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داشتند. با کشت مجدد و انتقال این باکتری ها به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رشد آن ها بیشتر شده و اندازه کلونی بزرگ تر شد.

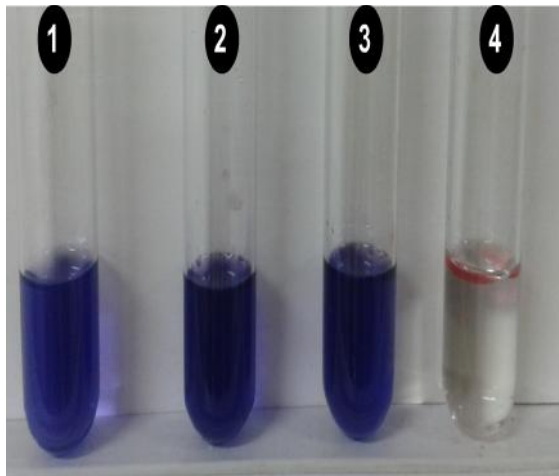
نتایج نشان داد که بهترین رقت برای رشد باکتری ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رقت 10^{-4} بود. با این حال، باکتری ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و در تمام رقت ها رشد کمی داشتند و از تمام رقت ها برای انتخاب کلونی برای مراحل بعد استفاده شد، به طوری که در مجموع تعداد ۲۵۰ عدد کلونی به تصادف از هر دو دما انتخاب شد. پس از کشت مجدد کلونی ها از بین ۲۵۰ عدد باکتری، تعداد ۷۰ باکتری که از نظر اندازه و شکل نماینده همه باکتری ها بودند، انتخاب شدند و برای آزمون های تشخیصی مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد، ۴۵ کلونی ($64/28$) کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند. مشاهدات میکروسکوپ نوری با درشت نمایی $100\times$ حضور باکتری های کوکسی شکل در دسته های دوتایی و چندتایی را نشان داد که مشخصه حضور فراوان این گونه باکتری ها در شیر بود (شکل ۱). از تعداد ۴۵ باکتری، تعداد ۳۳ باکتری ($73/3$) باکتری ها قادر به رشد در دمای ۱۵ و ۴۲ درجه سانتی گراد بودند و ۱۲ باکتری ($26/4$) در این دو دما رشد ضعیفی داشتند. تعداد ۲۰ باکتری از میان ۴۵ باکتری انتخاب شدند و آزمون های تشخیصی مختلف در مورد آن ها صورت گرفت. از تعداد

به طور کلی، جهت انجام آزمون کاتالاز، کشت تازه ی هر یک از کلونی ها از محیط MRS جامد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ساعت تهیه شد. تولید حباب های اکسیژن پس از مجاورت باکتری ها با پراکسید هیدروژن نشانه ی مثبت بودن آزمون کاتالاز تلقی گردید (۲۴). برای آزمون رشد در محیط کشت حاوی کلرید سدیم از روش دمن و همکاران (۲۷) استفاده شد. در این آزمون از محیط رشد نوترینت به همراه کلرید سدیم به عنوان محیط رشد انتخابی برای باکتری های مقاوم به نمک کلرید سدیم استفاده گردید. رشد باکتری در این محیط به عنوان مثبت بودن آزمون تلقی می شود (۲۷).

آزمون حرکت باکتری در محیط آگار برای تمایز باکتری ها بر اساس حرکت باکتری ها با استفاده از تاژک است. در این آزمون از محیط نوترینت جامد به عنوان محیط کشت و از دیسک های آغشته به سوسپانسیون باکتری استفاده شد. انتشار هاله رشد باکتری از لبه دیسک نشان دهنده مثبت بودن آزمون حرکت باکتری است (۲۵).

برای انجام آزمون تخمیر قندها، از قندهای گلوکز، ملی بیوز، سوربیتول، رافینوز، لاکتوز، ساکارز، زایلوز، ترهالوز، فروکتوز، گالاکتوز، آرابینوز و مانیتول استفاده شد. از هر یک از قندهای یاد شده مقدار $2/2$ به هریک از لوله های حاوی محیط نوترینت اضافه شد. سپس محیط کشت مایع پس از تلقیح با باکتری و افزودن فنول رد به عنوان معرف، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. تبدیل رنگ ارغوانی به رنگ زرد نشانه تخمیر قند و تولید اسید در نظر گرفته شد (۲۶). برای آزمون تولید گاز، از تخمیر قند از لوله های دورهام استفاده شد. تجمع حباب هوا در لوله های دورهام مثبت بودن آزمون تولید گاز حاصل از تخمیر قند را نشان می دهد (۲۸). آزمون هیدرولیز هیپورات سدیم به کمک معرف نین هیدرین بر اساس روش کولینز صورت گرفت. از باکتری انتروکوکوس فکالیس

SD93929 مربوط به گونه‌ی دیورسی نام‌گذاری و آزمایش‌های بعدی روی آن‌ها انجام شد.



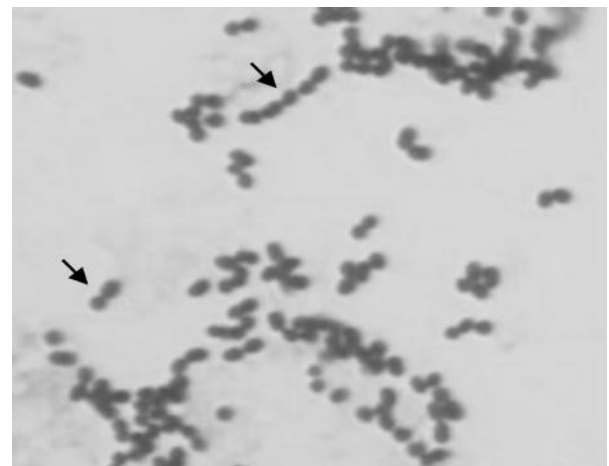
شکل ۲. آزمون هیپورات سدیم. (۱) استرپتوکوکوس دیورسی (SD93929)، (۲) انتروکوکوس فکالایس (EF93929)، (۳) انتروکوکوس فکالایس ATCC29212، (۴) لئوکونوستوک مزنترویدس.

از نتایج حاصل از تخمیر قندها و آزمون حرکت باکتری برای تشخیص باکتری‌ها در سطح گونه استفاده شد که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری‌های جنس انتروکوکوس متعلق به گونه فکالایس هستند. همچنین باکتری‌های جنس استرپتوکوکوس به گونه استرپتوکوکوس دیورسی تعلق دارند. آزمون هیدرولیز هیپورات سدیم برای باکتری‌های شناسایی شده در این تحقیق در حضور نین هیدرین تولید رنگ بنفش پر رنگی نمود که نشانه‌ی هیدرولیز این ماده بود (جدل ۱). باکتری‌های شاهد این آزمون مطابق انتظار واکنش نشان دادند (شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های اسید لاکتیک نقش مهمی در سلامت، ارزش غذایی و خواص فیزیکی-شیمیایی شیر دارند. تا آنجا که اطلاعات ما نشان می‌دهد، این تحقیق برای اولین بار است که در ایران روی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در

۲۰ باکتری انتخابی، ۹ باکتری (۴۵٪) توانایی رشد در ۹/۶ pH و رشد در نمک کلرید سدیم (۶/۵٪ w/v) را نداشتند و ۱۱ باکتری (۵۵٪) توانایی رشد در ۹/۶ pH و کلرید سدیم (۶/۵٪ w/v) را داشتند. همه باکتری‌ها توانایی تخمیر گلوکز بدون تولید گاز را داشتند.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری (۱۰۰×) باکتری انتروکوکوس فکالایس. فلش‌ها زنجیره‌های دوتایی و چند تایی باکتری‌های کوکسی شکل را نشان می‌دهند. با توجه به نتایج آزمون‌های گرم و کاتالاز، خصوصیات مورفولوژی سلولی و تولید گاز از گلوکز و توانایی رشد باکتری‌ها در ۹/۶ pH و نمک کلرید سدیم (۶/۵٪ w/v)، باکتری‌ها در دو گروه فنوتیپی جداسازی شدند. کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی که به خوبی قادر به رشد در دمای ۱۵ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد بودند و همچنین با توانایی رشد در ۹/۶ pH و نمک کلرید سدیم (۶/۵٪ w/v)، به عنوان انتروکوکوس در نظر گرفته شدند. همچنین کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی که رشد متغیر و ضعیفی در دماهای ۱۵ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد نشان دادند و همچنین توانایی رشد در ۹/۶ pH و نمک کلرید سدیم (۶/۵٪ w/v) را نداشتند به عنوان استرپتوکوکوس در نظر گرفته شدند (۲۹). از میان باکتری‌های هر یک از دو جنس غالب، یک نمونه انتخاب و به نام EF93929 مربوط به گونه فکالایس و

شیر الاغ به عنوان منبع جدیدی از این باکتری ها متمرکز شده است.

جدول ۱. نتایج آزمایش های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری های استخراج شده از شیر الاغ SD: *Streptococcus devriesei* EF و *Enterococcus faecalis* W: رشد ضعیف

SD93929	EF93929	
+	+	آزمون گرم
-	-	آزمون کاتالاز
-	-	تولید CO ₂ از گلوکز
+	+	رشد در دما (°C) ۱۵
W	+	۴۲
-	+	رشد در pH=۹/۶
-	+	رشد در NaCl ۶/۵٪
+	+	لاکتوز
+	+	مانیتول
+	+	ساکارز
+	-	ملی بیوز
+	+	گالاکتوز
-	-	آرابینوز
+	+	ترهالوز
+	+	فروکتوز
-	-	زایلوز
+	+	گلوکز
+	+	سوربیتول
+	-	رافینوز
-	+	آزمون حرکت
+	+	هیدرولیز هیپورات سدیم

درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، به این نتیجه رسیدند که ترکیبات ضد میکروبی موجود در شیر مثل لیزوزیم و لاکتوفرین قادر به جلوگیری از رشد باکتری های اسید لاکتیک نیستند (۱۲). کارمیناتی و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده کردند که نگهداری شیر الاغ در ۴ درجه سانتی گراد باعث کاهش باکتری های لاکتوکوک و لاکتوباسیل در شیر می شود. وجود میزان زیاد لیزوزیم (۴۰۰ mg/l) در شیر الاغ از جمله موانع تکثیر این قبیل باکتری هاست، به گونه ای که وجود لیزوزیم زیاد در شیر الاغ باعث هیدرولیز باندهای گلیکوزیدی پلی ساکاریدهای موجود در دیواره باکتری ها می شود (۱۷).

انتروکوکوس فکالیس سویه غالب از انتروکوکوس در دستگاه گوارش انسان است (۳۱). تحقیقات نشان داده است که حضور انتروکوکوس فکالیس در تعداد زیادی از مواد غذایی همیشه با آلودگی مدفوعی ارتباط ندارد. انتروکوکوس ها ارزش کمی از نظر شاخص آلودگی در مراحل صنعتی مواد غذایی دارند. هر چند انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس به فراوانی از مدفوع انسان جدا شده اند، اما این گونه ها در احشام اهلی مثل؛ گاو، گوسفند و خوک کمتر دیده می شوند. انتروکوکوس ها جمعیت غالب شیر خام را در الاغ به خود اختصاص داده اند (۱۷). انتروکوکوس ها نه تنها در حیوانات خونگرم، بلکه در خاک، منابع آب، بافت های گیاهان، سبزیجات و حشرات وجود دارند (۳۲).

دمای بهینه برای رشد باکتری های انتروکوکوس ۳۷ درجه سانتی گراد است. همچنین رشد زیاد در این دما به دلیل مقاومت نسبت به مواد ضد میکروبی شیر الاغ، مانع از رشد سایر باکتری ها می شود (۳۳، ۳۴). پواتا و همکاران (۲۰۰۷) بهترین دما را برای تولید و فعالیت باکتریوسین های موجود در انتروکوکوس فکالیس را ۳۷ درجه سانتی گراد تشخیص دادند. در این دما، باکتریوسین مربوط به انتروکوکوس فکالیس روی رشد چندگونه از

بعد از آنکه شیر خام در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت انکوبه می شود، به طور طبیعی شرایط رشد برای باکتری های اسید دوستی همانند باکتری های اسید لاکتیک فراهم می شود. تیمار گرمایی شیر خام سبب افزایش رشد و ظهور باکتری های گرمادوست و اسیددوست در شیر می شود. کارمیناتی و همکاران (۲۰۱۰) با انکوبه کردن شیر در دماهای ۳۷، ۴۵، ۶۲ و ۶۵ درجه سانتی گراد مشاهده کردند که تعداد باکتری های استریتوکوکوس و انتروکوکوس در مقایسه با سایر باکتری ها افزایش پیدا کرد (۳۰). همچنین ژانگ و همکاران (۲۰۰۸) پس از نگهداری نمونه های شیر الاغ در دمای ۲۰

باکتری های جنس انتروکوکوس و چند جنس دیگر اثر بازدارندگی داشت (۳۵) از طرف دیگر، در میان باکتری های جنس انتروکوکوس، گونه فکاليس برای مقاومت فراوان آن به سطوح بالایی از لیزوزیم معروف هستند (۳۳). این موضوع می تواند نتایج این مطالعه را توجیه کند که تقریباً تمام گونه های انتروکوکوسی موجود در شیر الاغ از گونه ی فکاليس بودند. کارمینیاتی و همکاران (۲۰۱۴) نیز علیرغم بهینه سازی محیط و شرایط کشت از ۹ گونه انتروکوکوس، ۵ نمونه از گونه فکاليس پیدا کردند (۱۷).

در این تحقیق باکتری استرپتوکوکوس دیورسی برای اولین بار است که در ایران شناسایی و گزارش می شود. در سال ۲۰۰۴ کولینز و همکاران این باکتری را از دندان اسب استخراج کردند (۳۶). آزمون هیپورات سدیم یکی از آزمون های مؤثر برای تشخیص گونه های استرپتوکوکوس به خصوص گونه تازه شناسایی شده دیورسی است (۳۷). با این حال برخی از گونه های انتروکوکوس مانند فکاليس نیز در این آزمون مثبت هستند (شکل ۲).

با وجود تلاش برای شناسایی و جداسازی بیشتر باکتری های اسید لاکتیک موجود در شیر الاغ، این مطالعه تنوع اندکی در جنس ها و گونه های شناسایی شده را نشان

داد. چنین تنوع اندکی توسط دیگر محققان نیز در مورد شیر الاغ گزارش شده است (۲۲، ۱۷). لذا به نظر می رسد تا با جمع آوری نمونه های بیشتر و کشت در شرایط مختلف، این امکان وجود داشته باشد تا باکتری های اسید لاکتیک مربوط به جنس های معروف موجود در شیر سایر احشام را شناسایی و جداسازی نمود.

از آنجایی که امروزه از انتروکوکوس فکاليس به عنوان یکی از باکتری های اسید لاکتیک فرصت طلب در مقاوم شدن به آنتی بیوتیک ها یاد می شود (۳۹، ۳۸)، پیشنهاد می شود تا در صورت نیاز و مصرف شیر الاغ، حتماً به صورت پاستوریزه (تیمار حرارتی مناسب) مصرف شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقایان دکتر شیرخانی و دکتر رفیعی و همچنین سرکار خانم اعتمادی برای مساعدت های بی دریغشان قدردانی می شود. همچنین از عشایر و دامداران عزیزی که امکان جمع آوری نمونه ها را فراهم نمودند، کمال قدردانی به عمل می آید.

References

1. Patrick OM. The lactic acid bacteria in health and disease *Journal of Health Sciences*. 2012;1:45-56.
2. Du Toit M, Franz C, Dicks L, Schillinger U, Haberer P, Warlies B, et al. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*. 1998;40(1):93-104.
3. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;126(6 Suppl):S1-58.
4. Salimei E, Fantuz F. Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal*. 2012;24(2):130-142.
5. Tafaro A, Magrone T, Jirillo F, Martemucci G, D'Alessandro A, Amati L, et al. Immunological properties of donkey's milk: its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*. 2007;13(36):3711-3717.
6. Salimei E, Fantuz F, Coppola R, Chiofalo B, Polidori P, Varisco G. Composition and characteristics of ass's milk. *Animal Research*. 2004;53(1):67-78.
7. Fox P. Milk proteins: general and historical aspects. *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins*: Springer; 2003. p. 1-48.
8. Pilla R, Daprà V, Zecconi A, Piccinini R. Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. *Journal of Dairy Research*. 2010;77(04):392-397.
9. Mao X, Gu J, Sun Y, Xu S, Zhang X, Yang H, et al. Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *International Dairy Journal*. 2009;19(11):703-708.
10. Brumini D, Furlund CB, Comi I, Devold TG, Marletta D, Vegarud GE, et al. Antiviral activity of donkey milk protein fractions on echovirus type 5. *International Dairy Journal*. 2013;28(2):109-111.
11. Tidona F, Sekse C, Criscione A, Jacobsen M, Bordonaro S, Marletta D, et al. Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *International Dairy Journal*. 2011;21(3):158-165.
12. Zhang XY, Zhao L, Jiang L, Dong ML, Ren FZ. The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control*. 2008;19(12):1191-1195.
13. Amati L, Marzulli G, Martulli M, Tafaro A, Jirillo F, Pugliese V, et al. Donkey and goat milk intake and modulation of the human aged immune response. *Current Pharmaceutical Design*. 2010;16(7):864-869.
14. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and*

- Environmental Microbiology. 1999;65(9):3763-3766.
15. Roissart Hd, Luquet F. Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques. Uriage: Lorica. 1994.
 16. Oyetayo V, Adetuyi F, Akinyosoye F. Safety and protective effect of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei used as probiotic agent in vivo. African Journal of Biotechnology. 2004;2(11):448-452.
 17. Carminati D, Tidona F, Fornasari M, Rossetti L, Meucci A, Giraffa G. Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. Letters in Applied Microbiology. 2014;59:299-305.
 18. Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, et al. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews. 2013;37(5):664-698.
 19. Conte F, Foti M, Malvisi M, Giacobello C, Piccinini R. Assessment of antibacterial activity of donkey milk lysozyme. Safety and hygiene issues. Large Animal Review. 2012;18(1):13-16.
 20. Naccari F, Foti M, Giacobello C, Mariavitale, Passantino A, Russo C, et al. Methicillin resistant Staphylococcus sp isolated from donkey's milk in Sicily: preliminary study. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics; 2009: wiley-blackwell publishing, inc commerce place, 350 main st, malden 02148, ma USA.
 21. Sarno E, Santoro AM, Di Palo R, Costanzo N. Microbiological quality of raw donkey milk from Campania Region. Italian Journal of Animal Science. 2012;11(3):e49.
 22. Nazzaro F, Anastasio M, Fratianni F, Orlando P. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from raw donkey milk. International Journal of Probiotics and Prebiotics. 2008;3:374.
 23. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biología de los microorganismos. 2004.
 24. Akabanda F, Owusu-Kwarteng J, Glover R, Tano-Debrah K. Microbiological characteristics of Ghanaian traditional fermented milk product, Nunu. Nature and Science. 2010;8(2):178-187.
 25. Tittsler RP, Sandholzer LA. The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility. Journal of Bacteriology. 1936;31(6):575-580.
 26. Torres-Llanez M, Vallejo-Cordoba B, Díaz-Cinco M, Mazorra-Manzano M, González-Córdova A. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. Food control. 2006;17(9):683-690.
 27. De Man J, Rogosa d, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology. 1960;23(1):130-135.
 28. Kelly WJ, Davey GP, Ward LJ. Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh fruit and vegetables. International Journal of Food Microbiology. 1998;45(2):85-92.
 29. Salminen S, Von Wright A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects: CRC Press; 2004.
 30. Carminati D, Giraffa G, Quiberoni A, Binetti A, Suárez V, Reinheimer J. Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. Biotechnology of lactic

- acid bacteria: Novel Applications. 2010;177-192.
31. Foulquié Moreno M, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of Enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;106(1):1-24.
 32. Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002;26(2):163-171.
 33. Hébert L, Courtin P, Torelli R, Sanguinetti M, Chapot-Chartier M-P, Auffray Y, et al. Enterococcus faecalis constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. *Infection and Immunity*. 2007;75(11):5390-5398.
 34. Wayne L, Kubica G, Sneath P, Mair N, Sharp M, Holt J. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1986;2.
 35. Poeta P, Costa D, Rojo-Bezares B, Zarazaga M, Klibi N, Rodrigues J, et al. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in Enterococci faecalis of wild animals. *Microbiological Research*. 2007;162(3):257-263.
 36. Collins MD, Lundström T, Welinder-Olsson C, Hansson I, Wattle O, Hudson RA, et al. *Streptococcus devrieseisp. nov.*, from Equine Teeth. *Systematic and Applied Microbiology*. 2004;27(2):146-150.
 37. Bortolaia V, Guardabassi L. Zoonotic Transmission of Antimicrobial Resistant Enterococci: A Threat to Public Health or an Overemphasised Risk? *Zoonoses-Infections Affecting Humans and Animals*: Springer; 2015. p. 407-431.
 38. Christoffersen TE, Jensen H, Kleiveland CR, Dorum G, Jacobsen M, Lea T. In vitro comparison of commensal, probiotic and pathogenic strains of Enterococcus faecalis. *British Journal of Nutrition*. 2012;108(11):2043-2053.
 39. Vebø HC, Solheim M, Snipen L, Nes IF, Brede DA. Comparative genomic analysis of pathogenic and probiotic Enterococcus faecalis isolates, and their transcriptional responses to growth in human urine. *PLoS One*. 2010;5(8):e12489.