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

محمد جواد اکرمی[1]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[*2]، احمد اسماعیلی[3]

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

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

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

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

چکیده

دریافت مقاله: ۹۴/۸/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۲۳

مقدمه: استفاده شیر الاغ به‌عنوان یک منبع تغذیه جدید، به دلیل خواص تغذیه‌ای و فقدان پروتئین‌های آلرژی‌زا در حال افزایش است. فلور میکروبی شیر الاغ، به‌خصوص باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) آن هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند. این تحقیق برای اولین بار با هدف بررسی فلور میکروبی شیر الاغ به‌منظور 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 (w/v)٪۶/۵ 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 فکالیس (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 فکالیس، 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

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

مقدمه

پروبیوتیک‌ها یک و یا مخلوطی از میکروارگانیسم-های زنده هستند، که در انسان و حیوانات، به‌وسیله بهبود شرایط برای رشد جمعیت میکروارگانیسم‌های بومی روده می‌توانند سودمند باشند (۱). اثرات پروبیوتیک‌ها شامل سرکوب میکروارگانیسم‌های پاتوژن، ضدجوش، ضد-سرطان، افزایش پاسخ‌های 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 پروتئین‌های 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-حل‌های 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 یتیم‌خانه‌ها با شیر الاغ در فرانسه به اواخر قرن نوزدهم می‌رسد (۴)، تنها در سال‌های اخیر دانشمندان متوجه شده‌اند که باید به دنبال جایگزینی برای تغذیه نوزادان مبتلا به آلرژی به شیر گاو بگردند. این موضوع سبب شده است که به‌تازگی شیر الاغ به دلیل خواص تغذیه‌ای، برخورداری از فعالیت‌های ایمنولوژیکی و جلوگیری از آترواسکلروزیس توجه متخصصان تغذیه را به خود جلب نماید (۵) شیر الاغ سرشار از پروتئین‌های α-لاکتالبومین و β-لاکتوگلوبولین به ترتیب با ۳۵٪ و ۵۰٪ کل بخش نیتروژن‌دار در مقایسه با ۲۰ ٪در 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 خصوصیاتی چون خواص تغذیه‌ای، خواص فیزیولوژیکی نظیر ایمنی‌زایی (ایمنوگلوبین‌ها و سایر پروتئین‌ها)، کمک گوارشی (آنزیم‌ها و مهارکننده‌های آنزیمی، تثبیت کننده، انعقاد کنندگی، یا حامل پروتئین‌ها) و تولید فاکتورهای رشد (هورمون‌ها) (۷)، بار میکروبی پایین به دلیل مقادیر فراوان لیزوزیم در مقایسه با شیر سایر احشام (۴) عدم وجود میکروب‌های بیماری‌زایی مانند *Salmonella spp.*، *Streptococcus equi*، *Streptococcus equisimilis* و *Listeria monocytogenes* در صورت رعایت اصول بهداشتی در شیر الاغ و خواص درمانی ازجمله 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). به‌علاوه، تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که ترکیبات شیر الاغ دارای اثرات ضد سرطانی (۹)، خواص ضد ویروسی (۱۰)، اثرات ضد میکروبی گسترده‌ای بوده (۱۲, ۱۱) و می‌توانند باعث انگیزش و تقویت سیستم ایمنی سالمندان گردد (۱۳).

شناسایی، جداسازی و غربال میکروارگانیسم‌ها از منابع طبیعی، وسیله‌ای مؤثر برای دست‌یابی به گونه‌هایی از باکتری‌هاست که از لحاظ ژنتیکی حائز اهمیت هستند. طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها در شرایط مختلف در اطراف ما در حال زندگی هستند. بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها نقش مؤثری در بهبود شرایط زندگی سایر موجودات از جمله انسان دارند. برای مثال، باکتری‌های اسید لاکتیک، پروبیوتیک‌های زنده‌ای هستند که با اصلاح تعادل میکروبی داخل دستگاه گوارش به‌خصوص محیط روده در موجودات زنده و به دنبال آن تغییر متابولیسم میکروبی، باعث افزایش سیستم ایمنی بدن، جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی و جلوگیری و درمان اسهال در انسان می‌شوند (۱۴). مواد لبنی از جمله مواد غذایی هستند که این باکتری‌ها در آن زندگی می‌کنند. بشر سال‌هاست که برای تغییر خصوصیات طعم و بافت محصولات لبنی به منظور افزایش زمان ماندگاری آن‌ها از این باکتری‌ها

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

استفاده می‌کند (۱۵) نقش اولیه‌ی باکتری‌های اسید لاکتیک تخمیر کربوهیدرات‌ها و به دنبال آن کاهش pH محصولات لبنی است. وجود pH اسیدی به دلیل تولید اسیدهای آلی به‌خصوص اسید لاکتیک، دی استیل، پروکسید هیدروژن و باکتریوسین‌های متعدد، از جمله عوامل اصلی حفظ خواص مفید فرآورده‌های لبنی است (۱۶). افزودن باکتری‌های اسید لاکتیک به مواد غذایی روز به روز در حال افزایش است به‌طوری که تقاضا برای مصرف مواد غذایی بخصوص مواد لبنی حاوی باکتری‌های مفید به طرز چشمگیری افزایش یافته است. از این‌رو، جستجوی گونه‌های جدیدی از باکتری‌های مفید اسید لاکتیک از منابع مختلف برای بهره‌برداری در تغذیه انسان بسیار حائز اهمیت است. با وجود آنکه در مورد ترکیبات شیمیایی و تغذیه‌ای شیر الاغ اطلاعات کافی در دسترس وجود دارد (۱۸, ۱۷)، در خصوص میکروفلور (میکروارگانیسم‌های موجود در شیر) شیر الاغ اطلاعات بسیار ناچیز و انگشت شمار است (۲۱-۱۹, ۸, ۶). به جرأت می‌توان گفت که در مورد باکتری‌های اسید لاکتیک شیر الاغ تعداد تحقیقات از تعداد انگشت‌های یک دست هم کمتر است (۲۲, ۱۷). این تحقیق به منظور شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک شیر الاغ به امید یافتن گونه یا سویه‌های جدید برای استفاده در صنایع لبنی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

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 نمونه‌گیری ابتدا سطح پستان دام‌ها توسط الکل اتیلیک ۷۰٪ کاملاً ضدعفونی شد. سپس با دستمال کاغذی استریل سطح پستان خشک و در نهایت مبادرت به شیر دوشی گردید. از هر کدام از دام‌ها از هر دو پستان مقدار ۱۰ میلی‌لیتر شیر جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس برای ادامه‌ی مراحل بعدی آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

آنالیزهای میکروبی

به منظور فراهم آوردن شرایط کشت، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} از نمونه‌های شیر با استفاده از افزودن سرم فیزیولوژی (NaCl w/v ۰/۹٪) تهیه گردید. از هر یک از رقت‌های یاد شده، مقدار یک میلی‌لیتر در محیط MRS جامد شده توسط آگار، کشت گردید. محیط کشت در دو دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در شرایط هوازی انکوبه شدند. پس از رشد باکتری‌ها، کلونی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت از نظر اندازه و شکل مورد ارزیابی قرار گرفتند. از تمام کلونی‌هایی که نماینده همه اندازه‌ها و اشکال بودند، به‌صورت تصادفی ۲۵۰ کلونی برداشته شد و در محیط‌های MRS جامد تازه کشت داده شدند. عمل باز کشت تا اطمینان از خلوص کلونی‌های تک هر دو روز یک‌بار انجام گرفت. تعداد ۷۰ کلونی مجزا و خالص از مجموعه همه نمونه‌ها انتخاب و از آن‌ها برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

آزمون‌های 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 سانتی‌گراد و همچنین توانایی رشد در pH=۹/۶ بر اساس روش اسنیت و همکاران، توانایی رشد در غلظت (w/v) ۶/۵٪ کلرید سدیم، آزمودن حرکت در محیط آگار بر اساس روش تیسلر و سن‌هولزر، تولید اسید از کربوهیدرات‌های مختلف در محیط نوترینت و فنول رد به‌عنوان معرف رنگی و ۲ درصد کربوهیدرات بر اساس روش تورس لینانز برای تمامی کلونی‌های انتخاب شده صورت گرفت (۲۶, ۲۵).

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

به‌طور کلی، جهت انجام آزمون کاتالاز، کشت تازه‌ی هر یک از کلونی‌ها از محیط MRS جامد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ساعت تهیه شد. تولید حباب‌های اکسیژن پس از مجاورت باکتری‌ها با پراکسید هیدروژن نشانه‌ی 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 به‌عنوان محیط رشد انتخابی برای باکتری‌های مقاوم به نمک کلرید سدیم استفاده گردید. رشد باکتری در این محیط به‌عنوان مثبت بودن آزمون تلقی می‌شود (۲۷).

آزمون حرکت باکتری در محیط آگار برای تمایز باکتری‌ها بر اساس حرکت باکتری‌ها با استفاده از تاژک است. در این آزمون از محیط نوترینت جامد به‌عنوان محیط کشت و از دیسک‌های 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، ملی‌بیوز، سوربیتول، رافینوز، لاکتوز، ساکارز، زایلوز، ترهالوز، فروکتوز، گالاکتوز، آرابینوز و مانیتول استفاده شد. از هر یک از قندهای یاد شده مقدار ۲٪ به هریک از لوله‌های حاوی محیط نوترینت اضافه شد. سپس محیط کشت مایع پس از تلقیح با باکتری و افزودن فنول رد به‌عنوان معرف، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 لوله‌های دورهام استفاده شد. تجمع حباب هوا در لوله‌های دورهام مثبت بودن آزمون تولید گاز حاصل از تخمیر قند را نشان می‌دهد (۲۸). آزمون هیدرولیز هیپورات سدیم به کمک معرف نین هیدرین بر اساس روش کولینز صورت گرفت. از باکتری انتروکوکوس فکالیس ATCC29212 به‌عنوان شاهد مثبت و از باکتری لئوکونوستوک مزنترویدس به‌عنوان شاهد منفی در آزمون هیدرولیز هیپورات سدیم استفاده شد.

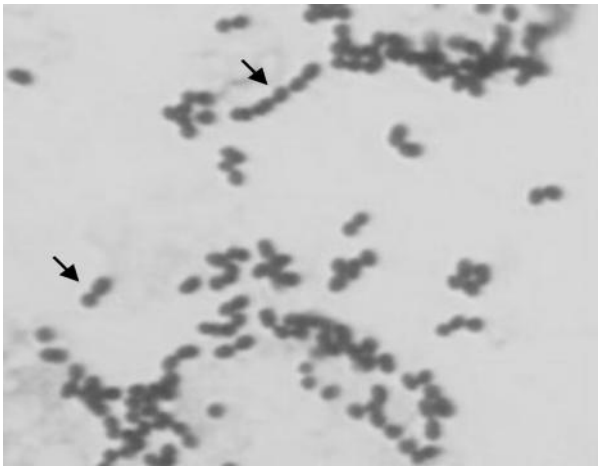
یافته‌ها

مشاهدات این آزمایش نشان داد رشد تعداد کلونی‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد خیلی کمتر از تعداد کلونی‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. به‌علاوه کلونی‌های حاصل در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد از نظر اندازه ریزتر و رشد کمتری نسبت باکتری‌های دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داشتند. با کشت مجدد و انتقال این باکتری‌ها به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد آن‌ها بیشتر شده و اندازه کلونی بزرگ‌تر شد.

نتایج نشان داد که بهترین رقت برای رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رقت 10^{-4} بود. با این حال، باکتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و در تمام رقت‌ها رشد کمی داشتند و از تمام رقت‌ها برای انتخاب کلونی برای مراحل بعد استفاده شد، به‌طوری که در مجموع تعداد ۲۵۰ عدد کلونی به تصادف از هر دو دما انتخاب شد. پس از کشت مجدد کلونی‌ها از بین ۲۵۰ عدد باکتری، تعداد ۷۰ باکتری که از نظر اندازه و شکل نماینده همه باکتری‌ها بودند، انتخاب شدند و برای آزمون‌های تشخیصی مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد، ۴۵ کلونی (۶۴/۲۸٪) کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند. مشاهدات میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ×۱۰۰ حضور باکتری‌های کوکسی شکل در دسته‌های دوتایی و چندتایی را نشان داد که مشخصه حضور فراوان این گونه باکتری‌ها در شیر بود (شکل ۱). از تعداد ۴۵ باکتری، تعداد ۳۳ باکتری (۷۳/۳٪) باکتری‌ها قادر به رشد در دمای ۱۵ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد بودند و ۱۲ باکتری (۲۶/۶٪) در این دو دما رشد ضعیفی داشتند. تعداد ۲۰ باکتری از میان ۴۵ باکتری انتخاب شدند و آزمون‌های تشخیصی مختلف در مورد آن‌ها صورت گرفت. از تعداد

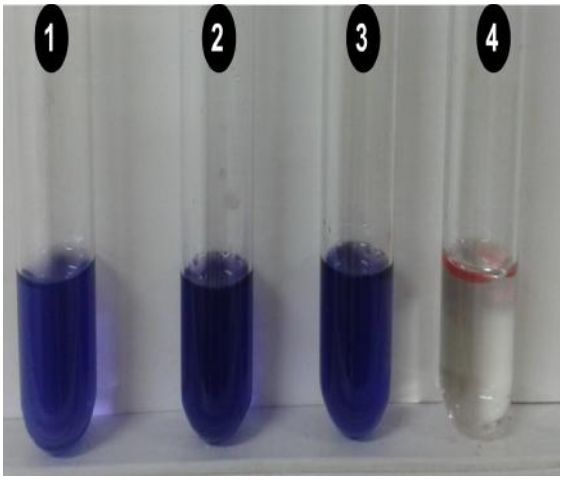
[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

۲۰ باکتری انتخابی، ۹ باکتری (۴۵٪) توانایی رشد در ۹/۶ =pH و رشد در نمک کلرید سدیم (w/v)۶/۵٪ را نداشتند و۱۱باکتری (۵۵٪) توانایی رشد در ۹/۶ pH و کلرید سدیم (w/v)۶/۵٪ را داشتند. همه باکتری‌ها توانایی تخمیر گلوکز بدون تولید گاز را داشتند.



شکل ۱. تصویر میکرسکوپ نوری (×۱۰۰) باکتری انتروکوکوس فکالیس. فلش‌ها زنجیره‌های دوتایی و چند تایی باکتری‌های کوکسی شکل را نشان می دهند

با توجه به نتایج آزمون‌های گرم و کاتالاز، خصوصیات مورفولوژی سلولی و تولید گاز از گلوکز و توانایی رشد باکتری‌ها در pH=۹/۶ و نمک کلرید سدیم (w/v) ۶/۵٪، 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 (w/v)۶/۵٪، به‌عنوان 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 pH=۹/۶ و نمک کلرید سدیم (w/v)۶/۵٪ را نداشتند به‌عنوان 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 فکالیس و SD93929 مربوط به گونه‌ی دیورسی نام‌گذاری و آزمایش‌های بعدی روی آن‌ها انجام شد.



شکل ۲. آزمون هیپورات سدیم. (۱) استرپتوکوکوس دیورسی (SD93929)، (۲) انتروکوکوس فکالیس(EF93929)، (۳) انتروکوکوس فکالیس 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 فکالیس 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 فیزیکو- 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

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

شیر الاغ به‌عنوان منبع جدیدی از این باکتری‌ها متمرکز شده است.

جدول۱. نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری‌های استخراج شده از شیر الاغ *SD*: *Streptococcus devriesei*، EF:*Enterococcu faecalis* و W: رشد ضعیف

			SD93929	EF93929
آزمون گرم			+	+
آزمون کاتالاز			-	-
تولید Co_2 از گلوکز			-	-
رشد در دما (°C)		۱۵	+	+
		۴۲	+	w
رشد در pH=۹/۶			+	-
رشد در NaCl ٪۶/۵			+	-
تولید اسید از تخمیر قند	لاکتوز		+	+
	مانیتول		+	+
	ساکارز		+	+
	ملی‌بیوز		-	+
	گالاکتوز		+	+
	آرابینوز		-	-
	ترهالوز		+	+
	فروکتوز		+	+
	زایلوز		-	-
	گلوکز		+	+
	سوربیتول		+	+
	رافینوز		-	+
آزمون حرکت			+	-
هیدرولیز هیپورات سدیم			+	+

بعد از آنکه شیر خام در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت انکوبه می‌شود، به‌طور طبیعی شرایط رشد برای باکتری‌های اسید دوستی همانند باکتری‌های اسید لاکتیک فراهم می‌شود. تیمار گرمایی شیر خام سبب افزایش رشد و ظهور باکتری‌های گرمادوست و اسیددوست در شیر می‌شود. کارمیناتی و همکاران (۲۰۱۰) با انکوبه کردن شیر در دماهای ۳۷، ۴۵، ۶۲ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده کردند که تعداد باکتری‌های استرپتوکوکوس و انتروکوکوس در مقایسه با سایر باکتری-ها افزایش پیدا کرد (۳۰). همچنین ژانگ و همکاران (۲۰۰۸) پس از نگهداری نمونه‌های شیر الاغ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، به این نتیجه رسیدند که ترکیبات ضد میکروبی موجود در شیر مثل لیزوزیم و لاکتوفرین قادر به جلوگیری از رشد باکتری‌های اسید لاکتیک نیستند (۱۲). کارمیناتی و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده کردند که نگهداری شیر الاغ در ۴ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش باکتری‌های لاکتوکوک و لاکتوباسیل در شیر می‌شود. وجود میزان زیاد لیزوزم (۴۰۰۰mg/l) در شیر الاغ از جمله موانع تکثیر این قبیل باکتری‌هاست، به گونه‌ای که وجود لیزوزیم زیاد در شیر الاغ باعث هیدرولیز باندهای گلیکوزیدی پلی‌ساکاریدهای موجود در دیواره باکتری‌ها می‌شود (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. انتروکوکوس‌ها 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 شده‌اند، اما این گونه‌ها در احشام اهلی مثل؛ گاو، گوسفند و خوک کمتر دیده می‌شوند. انتروکوکوس‌ها جمعیت غالب شیر خام را در الاغ به خود اختصاص داده‌اند (۱۷). انتروکوکوس‌ها نه‌تنها در حیوانات خونگرم، بلکه در خاک، منابع آب، بافت‌های گیاهان، سبزیجات و حشرات وجود دارند (۳۲).

دمای بهینه برای رشد باکتری‌های انتروکوکوس ۳۷ درجه سانتی‌گراد است. همچنین رشد زیاد در این دما به دلیل مقاومت نسبت به مواد ضد میکروبی شیر الاغ، مانع از رشد سایر باکتری‌ها می‌شود (۳۴, ۳۳). پواِتا و همکاران (۲۰۰۷) بهترین دما را برای تولید و فعالیت باکتریوسین-های موجود در انتروکوکوس فکالیس را ۳۷ درجه سانتی‌گراد تشخیص دادند. در این دما، باکتریوسین مربوط به انتروکوکوس فکالیس روی رشد چندگونه از

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

باکتری‌های جنس انتروکوکوس و چند جنس دیگر اثر بازدارندگی داشت (۳۵) از طرف دیگر، در میان باکتری‌های جنس انتروکوکوس، گونه فکالیس برای مقاومت فراوان آن به سطوح بالایی از لیزوزیم معروف هستند (۳۳). این موضوع می‌تواند نتایج این مطالعه را توجیه کند که تقریباً تمام گونه‌های انتروکوکوسی موجود در شیر الاغ از گونه‌ی فکالیس بودند. کارمیناتی و همکاران (۲۰۱۴) نیز علیرغم بهینه‌سازی محیط و شرایط کشت از ۹ گونه انتروکوکوس، ۵ نمونه از گونه فکالیس پیدا کردند (۱۷).

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

با وجود تلاش برای شناسایی و جداسازی بیشتر باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در شیر الاغ، این مطالعه تنوع اندکی در جنس‌ها و گونه‌های شناسایی شده را نشان داد. چنین تنوع اندکی توسط دیگر محققان نیز در مورد شیر الاغ گزارش شده است (۲۲, ۱۷). لذا به نظر می‌رسد تا با جمع‌آوری نمونه‌ای بیشتر و کشت در شرایط مختلف، این امکان وجود داشته باشد تا باکتری‌های اسید لاکتیک مربوط به جنس‌های معروف موجود در شیر سایر احشام را شناسایی و جداسازی نمود.

از آنجایی که امروزه از انتروکوکوس فکالیس به‌عنوان یکی از باکتری‌های اسید لاکتیک فرصت طلب در مقاوم شدن به آنتی‌بیوتیک‌ها یاد می‌شود (۳۹، ۳۸)، پیشنهاد می‌شود تا در صورت نیاز و مصرف شیر الاغ، حتماً به‌صورت پاستوریزه (تیمار حرارتی مناسب) مصرف شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از آقایان دکتر شیرخانی و دکتر رفیعی و همچنین سرکار خانم اعتمادی برای مساعدت‌های بی‌دریغشان قدردانی می‌شود. همچنین از عشایر و دامداران عزیزی که امکان جمع‌آوری نمونه‌ها را فراهم نمودند، کمال قدردانی به عمل می‌آید.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

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 ofLactobacillus. Applied and

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

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, Giacopello 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, Giacopello 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

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]

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.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-03]