نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد اول، شماره چهارم، ۱۳۹۲
http://ejrr.gau.ac.ir

# جداسازی و بررسی باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک از شکمبه گوسفند مهربان

**وحیده وحدت منش[۱]، *داریوش علیپور[۲]، محمدیوسف علیخانی[۳] و حسن علی‌عربی[۴]**

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد، [۲]استادیار و [٤]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان،
[۳]دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

تاریخ دریافت: ۹۲/۰٤/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۰۳

## چکیده

اسیدوز شکمبه‌ای در نشخوارکنندگان می‌تواند پس از مصرف کربوهیدرات‌های سریع التخمیر رخ دهد که به دلیل تولید بیش از حد اسید لاکتیک منجر به از بین رفتن تعادل میکروبی و کاهش pH شکمبه می‌شود. به منظور شناسایی باکتری‌های تولید کننده لاکتات تعداد ۳۰ جدایه از مایع شکمبه ۳ راس گوسفند نر مهربان (با جیره شامل ٦۰ درصد کنسانتره و ٤۰ درصد علوفه یونجه تغذیه می‌شدند) با استفاده از محیط کشت اختصاصی جداسازی گردیدند. خصوصیات جدایه‌ها بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، دارا بودن کاتالاز، تولید ایندول و تخمیر برخی از قندها مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی این جدایه‌ها براساس توالی‌های نوکلئوتیدی ژن ١٦S rRNA انجام گرفت. برای تعیین یکنواختی ژنتیک جدایه‌ها از آزمون RFLP استفاده شد. بر اساس اطلاعات به‌دست آمده از پایگاه اطلاعاتی بانک ژنی نزدیک‌ترین گونه‌ها به جدایه‌ها *استرپتوکوکوس ماسدونیکوس، استرپتوکوکوس لوتشیا، انتروکوکوس فکالیس و اشریشیا فرگوسنی* (بیش از ۹۹ درصد شباهت) بودند.

***واژه‌های کلیدی:*** باکتری تولید کننده‌ی اسیدلاکتیک، ژن ١٦S rRNA، *استرپتوکوکوس ماسدنیکوس، استرپتوکوکوس لوتشیا، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا فرگوسنی*

*نویسنده مسئول: alipourd@basu.ac.ir

**مقدمه**

اسیدوز شکمبه‌ای یکی از ناهنجاری‌های متابولیکی است و در نشخوارکنندگانی مشاهده می‌شود که جیره‌های حاوی مقادیر بالای کربوهیدرات‌های سهل الهضم مصرف می‌کنند (اونز و همکاران، ۱۹۹۸). تحت شرایط طبیعی شکمبه در ارتباط با متابولیسم اسید لاکتیک دو دسته باکتری وجود دارد که یک دسته تولیدکننده لاکتات و یک دسته مصرف کننده‌ی لاکتات هستند (هابسون و استوارت، ۱۹۹۷). باکتری‌های تولید کننده لاکتات در مقابل کاهش pH مقاومند و پس از مصرف جیره‌های با مقدار زیاد کربوهیدرات‌های سهل الهضم تعداد آنها افزایش می‌یابد (دهوریتی، ۲۰۰۳). از باکتری‌هایی که در هضم نشاسته و تولید اسید لاکتیک نقش دارند می‌توان به *استرپتوکوکوس بویس*[1]، *سلنوموناس رومینانتیوم* و انواعی از لاکتوباسیل‌ها اشاره نمود (دهوریتی، ۲۰۰۳). تاکنون چندین پ ژوهش برای شناسایی خصوصیات فیزیولوژیکی و ژنتیکی باکتری‌های مولد لاکتات در شکمبه نشخوارکنندگان انجام شده و باکتری‌های مختلفی شناسایی شده‌اند (هانگیت و همکاران، ۱۹۵۹؛ ورنری و ونسوورت، ۱۹۹۲؛ هرناندز و همکاران، ۲۰۰۸). به‌عنوان مثال در گاوهایی که در مرتع از علوفه‌ها تغذیه می‌کردند تولید کننده‌های غالب لاکتات عبارت بودند از: *استرپتوکوکوس بویس*، *لاکتوباسیلوس ویتولینوس*[2]، *بوتریوویبریو فیبروسولونس*[3]، *پروتلا بریانتی*[4] و *سلنوموناس رومینانتیوم*[5] (هرناندز و همکاران، ۲۰۰۸). در تعدادی از متون علمی از شکمبه به‌عنوان جعبه سیاه یاد می‌شود که دلیل آن تنوع جمعیت‌های میکروبی و تعاملات درون و بین گونه‌ای است. با وجود پیشرفت‌های فراوان، هنوز بخش زیادی از جمعیت میکروبی شکمبه ناشناخته مانده است (ناگاراجا، ۲۰۱۲). شناسایی باکتری‌های موجود در شکمبه نشخوارکنندگان که در متابولیسم مواد غذایی مختلف دخیل هستند می‌تواند به شناخت بیشتر این جعبه سیاه کمک کند.

امروزه شناسایی گونه‌های باکتریایی بر اساس روش‌های پلی‌فازیک انجام می‌گیرد که در برگیرنده استفاده از ژن ۱٦S rRNA، هیبریدیزاسیون DNA-DNA، مورفولوژی، فیزیولوژی و کموتاکسونومی است (استاکبرانت و گوبل، ۱۹۹٤). استفاده از ژن ۱٦S rRNA در شناسایی باکتری‌ها اهمیت فراوانی

1- *Streptococcus bovis*
2- *Lactobacillus vitulinus*
3- *Fibrobacter succinogenes*
4- *Prevotella bryantii*
5- *Selenomonas ruminantium*

دارد زیرا این ژن در طول میلیون‌ها سال تکامل دچار کمترین تغییرات شده است و در گونه‌های مختلف محافظت شده است (مدیگان و همکاران، ۲۰۰۹).

عواملی مانند نوع جیره، گونه میزبان و موقعیت جغرافیایی بر تنوع و تعداد گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌های شکمبه اثر می‌گذارد (دهوریتی، ۲۰۰۳). از سوی دیگر برای مقابله و پیشگیری اسیدوز شکمبه‌ای شناخت خصوصیات باکتری‌های مؤثر در این ناهنجاری ضروری است. بر اساس اطلاعات نگارندگان تاکنون گزارشی در ارتباط با شناسایی میکروارگانیسم‌های شکمبه با استفاده از روش‌های مولکولی (استفاده از ژن ١٦S rRNA) به‌خصوص باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک در شکمبه نشخوارکنندگان در ایران منتشر نشده است. لذا هدف از انجام این پژوهش جداسازی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و شناسایی آن‌ها با استفاده از روش‌های زیستی مولکولی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ژن ١٦S rRNA بود.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری و کشت جدایه‌های باکتری:** مایع شکمبه از طریق فیستولا از شکمبه سه رأس گوسفند نر مهربان جمع‌آوری گردید. جیره دریافتی گوسفندان ۵۹٪ دانه جو، ۱٪ مکمل مواد معدنی و ویتامین و ٤٠٪ علوفه یونجه خشک بود. پس از انتقال مایع شکمبه به آزمایشگاه مقدار ۵ گرم محتویات شکمبه با ٤۵ میلی‌لیتر محلول ADS[1] (دی پتاسیم فسفات ($K_2HPO_4$) ۰/٤۵ گرم در لیتر، مونو پتاسیم فسفات ($KH_2PO_4$) ۰/٤۵ گرم در لیتر، آمونیوم سولفات ($(NH_4)_2SO_4$) ۰/۹ گرم در لیتر، نمک ($NaCl$) ۰/۹ گرم در لیتر، منیزیم سولفات ($MgSO_4$) ۰/۰۹ گرم در لیتر، کلرید کلسیم ($CaCl_2$) ۰/۱۱۹ گرم در لیتر) و رزازورین ۱ میلی گرم در لیتر مخلوط و پس از این که به خوبی مخلوط گردید از طریق ٤ لایه پارچه متقال صاف گردید. مقدار ۱ میلی‌لیتر از مایع صاف شده به لوله‌های هانگیت محتوی ۹ میلی‌لیتر ADS منتقل و به صورت سریالی تا رقت $10^{-6}$ رقیق شدند. سپس از آخرین رقت مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ADS حاوی باکتری به لوله‌های هانگیت حاوی محیط کشت اختصاصی برای جداسازی باکتری‌های تولید کننده لاکتات (آمونیوم فسفات ($(NH_4)_3 PO_4$) ۲ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۰/۱ گرم در لیتر، اینولین ٤ گرم در لیتر، رافینوز ۳ گرم در لیتر، سدیم بتا گلیسروفسفات

1- Anaerobic Dilution Solution

۱ گرم در لیتر، سدیم آزید ۰/۱ گرم در لیتر، نمک ۰/۱ گرم در لیتر، بروموکرسول بنفش ۰/۰۵ گرم در لیتر، منیزیم سولفات هفت آبه ($MgSO_4.7H_2O$) ۰/۲ گرم در لیتر و دی پتاسیم فسفات ($K_2HPO_4$) ۰/۱ گرم در لیتر) و آگار (ذوب شده) اضافه و بلافاصله روی یخ غلتانده شد تا آگار منجمد گردد. لوله‌های کشت داده شده به انکوباتور منتقل و به‌مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مدت کلونی‌های مجزا و منفرد بوسیله لوپ استریل برداشته شده و به محیط کشت مایع BM10[1] ($K_2HPO_4$ ٤٥/ گرم در لیتر، $KH_2PO_4$ ۰/٤٥ گرم در لیتر، $(NH_4)_2SO_4$ ۰/۹ گرم در لیتر، NaCl ۰/۹ گرم در لیتر، $MgSO_4$ ۰/۰۹ گرم در لیتر، $CaCl_2$ ۰/۱۱۹ گرم در لیتر، رزازورین ۱ میلی‌گرم در لیتر، مخلوط اسیدهای چرب فرار ۱ درصد، همین کلراید ۰/۱ گرم در لیتر، کربنات سدیم ($Na_2CO_3$) ٥/٦ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۰/٥ گرم در لیتر، پپتون سویا ۲ گرم در لیتر، سلوبیوز ۰/۳۳ گرم در لیتر و گلوکز ۰/۳۳ گرم در لیتر) منتقل شدند. لوله‌های حاوی کلونی‌های رشد یافته نسبت به محیط کشت شاهد کدر شده بودند. بر همین مبنا از مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از محیط کشت رشد یافته به لوله‌های هانگیت حاوی ۲/۸ میلی‌لیتر BM10 آگاردار منتقل و چندین بار کشت متناوب در محیط کشت مایع و جامد انجام شد و با بررسی میکروسکوپی باکتری‌ها، از خالص بودن آن‌ها اطمینان حاصل گردید. محیط‌های کشت بر اساس روش الجسیم و همکاران (۲۰۰۳) تهیه شدند. کلیه مراحل در شرایط بی‌هوازی و دمیدن گاز $CO_2$ انجام شد. محیط‌های کشت بعد از تهیه به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کشت خالص باکتری‌ها با افزودن محلول حاوی گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری گردید (قالی و همکاران، ۲۰۰٤).

**اندازه‌گیری رشد و بعضی خصوصیات بیوشیمیایی:** برای اندازه‌گیری زمان دو برابر شدن[2] مقدار ۲/٥ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی هر باکتری که در مرحله رشد تصاعدی بودند به بطری‌های حاوی محیط کشت BM10 (٤۷/٥ میلی‌لیتر) منتقل شده و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار گرفتند. هر ۳۰ دقیقه جذب نوری محیط کشت در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از اعداد به دست آمده زمان دو برابر شدن محاسبه شد. تست تولید ایندول با استفاده از معرف کواکس انجام شد (مکفادین، ۲۰۰۰). فعالیت کاتالازی با افزودن آب اکسیژنه به محیط کشت حاوی هر باکتری بررسی و تولید حباب نشان‌دهنده‌ی فعالیت کاتالازی بود (مدیگان و همکاران، ۲۰۰۹). تخمیر قندهای

1- Basal Medium 10
2 - Generation time

گلوکز، ساکارز، مالتوز و لاکتوز با افزودن هر قند به محیط کشت فنل قرمز بررسی و تبدیل رنگ قرمز به زرد بیانگر استفاده از قند مورد نظر بود (مدیگان و همکاران، ۲۰۰۹).

**شناسایی مولکولی:** برای شناسایی باکتری‌ها از ژن ١٦S rRNA استفاده گردید. بدین‌منظور ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری در لوله‌های اپندورف ریخته شد و با سرعت g× ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از دور ریختن مایع بالایی، با افزودن آب مقطر استریل به پلت میکروبی سوسپاسیون تشکیل شد. سوسپانسیون به‌دست آمده ورتکس و با سرعت g× ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد و مرحله قبل تا زمان به‌دست آمدن پلت میکروبی عاری از محیط کشت ادامه داده شد. پلت نهایی به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰ میکرولیتر سود ۵۰ میلی مولار جوشانده شد و سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر تریس هیدروکلراید ۲۰ میلی مولار به آن، به مدت ۲ دقیقه با سرعت g× ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید تا سلول‌ها تخریب و DNA آزاد گردد (یوزا و همکاران، ۲۰۰۲). با استفاده از تکنیک PCR[1] و با استفاده از پرایمرهای ٢٧F (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) و ١٥١٢R (5-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3) ژن ١٦s rRNA تکثیر گردید (ویلسون و همکاران، ۱۹۹۰). شرایط PCR به صورت ٩٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ٩٤ درجه سانتی‌گراد ۰/۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، و مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه بود (فلایت و اندریس، ۲۰۰۹). طول محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورز و رنگ آمیزی با سایبر سیف حدود bp ۱۵۰۰ تعیین شد. برای تعیین یکنواختی ژنتیکی از تکنیک PCR RFLP[2] استفاده شد. بدین‌منظور آنزیم‌های Dde1 و Alu1 به محصول PCR اضافه و سپس بر روی ژل الکتروفورز منتقل شدند. از ۳۰ جدایه، از باکتری‌های دارای الگوی مشترک یکی انتخاب شده و محصول PCR آن برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت Bioneer در کره‌جنوبی ارسال شد. توالی‌های آغازگر رفت و آغازگر برگشت با استفاده از نرم افزار BioEdit ترکیب و توالی به دست آمده در پایگاه اطلاعات ژنتیکی (BLAST[3]) وارد گردید. نزدیک‌ترین خویشاوندان هر جدایه شناسایی شد. دندروگرام فیلوژنتیکی در برگیرنده جدایه‌ها، نزدیک‌ترین خویشاوندان و *استرپتوکوکوس بویس* JB1 به‌عنوان باکتری تیپیک تولیدکننده لاکتات با استفاه از نرم‌افزار MEGA 5.05 و بر اساس

1- Polymerase Chain Reaction
2- Restriction Fragment Length Polymorphism
3- Basic Local Alignment Search Tool

الگوریتم Neighbor-joining رسم شد. برای ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنی از *ترموتوگا ترماروم*[1] به عنوان Out-group استفاده شد. شماره دسترسی[2] اختصاص یافته برای هر توالی در بانک ژنی عبارت بود از: VMB14 (KF255795), VMB18 (KF25796), VMB02 VMC02 (KF255794), (KF255797).

## نتایج و بحث

خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری‌های به‌دست آمده در جدول ۱ ارائه شده است. جدایه VMB02 بیش از ۹۹ درصد به *انتروکوکوس فکالیس*[3]، VMC02 بیش از ۹۹ درصد به *استرپتوکوکوس لوتشیا*[4]، VMB18 بیش از ۹۹ درصد به *استرپتوکوکوس ماسدونیکوس*[5] و VMB14 بیش از ۹۹ درصد به *اشریشیا فرگوسنی*[6] شباهت داشتند.

**جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها**

| خصوصیات | VMB02 | VMB14 | VMB18 | VMC02 |
|---|---|---|---|---|
| مورفولوژی گرم | مثبت | منفی | مثبت | مثبت |
| مورفولوژی | کوکسی | میله‌ای | کوکسی | کوکسی |
| زمان دوبرابر شدن(دقیقه) | ۲۷۰ | ۱۲۰ | ۲۳ | ۶۰ |
| آزمون کاتالاز | مثبت | منفی | منفی | منفی |
| آزمون ایندول | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت |
| تخمیر پروتئین | عدم تخمیر | تخمیر کم | تخمیر کم | تخمیر کم |
| تخمیر لاکتوز | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت |
| تخمیر گلوکز | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت |
| تخمیر ساکارز | منفی | منفی | مثبت | مثبت |
| تخمیر مالتوز | مثبت | مثبت | مثبت | مثبت |
| شماره دسترسی | KF255797 | KF255796 | KF255795 | KF255794 |
| نزدیکترین‌خویشاوند | *Enterococcus faecalis* | *Escherichia fergusonii* | *Streptococcus macedonicus* | *Streptococcus luteciae* |

1- *Thermotoga thermarum*
2- Accession number
3- *Entrococcus faecalis*
4- *Streptococcus luteciae*
5- *Streptococcus macedonicus*
6- *Escherichia fergusonii*

از لحاظ رشد جدایه VMB18 که قرابت ژنتیکی بالایی با *استرپتوکوکوس ماسدونیکوس* دارد، بیش‌ترین سرعت رشد را دارا بود که با نتایج قالی و همکاران (۲۰۰٤) همخوانی داشت. سایر جدایه‌ها زمان دو برابر شدن طولانی داشتند که نشان‌دهنده سرعت رشد کمتر آن‌ها در شکمبه است. همین محققین که باکتری‌های *استرپتوکوکوس بویس* را از شکمبه شتر و گوزن جداسازی کردند زمان دو برابر شدن آن‌ها را ۲۳ تا ۲۷ دقیقه گزارش کردند.

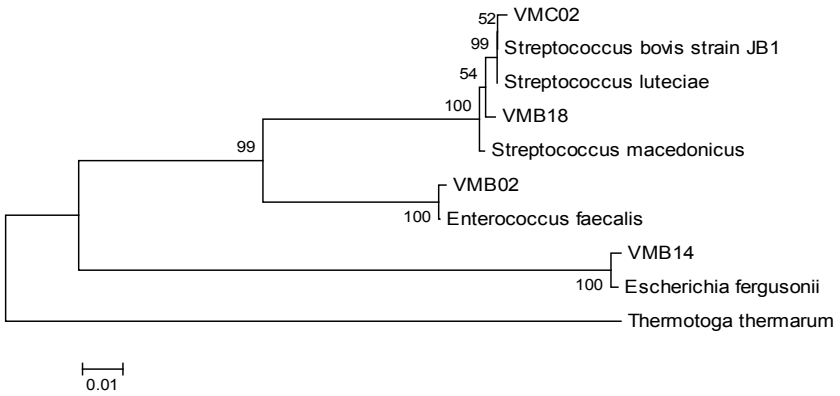
تولید ایندول نشان‌دهنده توانایی باکتری‌ها برای تجزیه تریپتوفان به ایندول و مشتقات آن است (مدیگان و همکاران، ۲۰۰۹). باکتری‌هایی که توانایی تولید اندول و اسکاتول را دارند از اهمیت خاصی برخوردارند زیرا متابولیت‌های حاصل از این مواد باعث ایجاد طعم خاصی در محصولات لبنی و گوشت بعضی از دام‌ها می‌شود که اصطلاحا طعم روستایی یا مرتعی[1] نامیده می‌شود. وجود این طعم باعث می‌شود محصولات دامی موردپسند بعضی از مصرف‌کنندگان قرار نگیرد (آتوود و همکاران، ۲۰۰٦).

در شکل ۱ درخت فیلوژنی جدایه‌های به دست آمده رسم شده است که شامل نزدیک‌ترین خویشاوندان و استرپتوکوکوس بویس سویه JB1 است. بعضی از پژوهشگران براساس فراسنجه‌هایی مانند بیوشیمیایی و فنوتیپی در نام‌گذاری استرپتوکوکوس بویس تغییراتی داده‌اند. در کتاب باکتری‌شناسی سیستماتیک برگی[2] برای این گروه از باکتری‌ها نام‌های *استرپتوکوکوس بویس* و *استرپتوکوکوس اکووینوس* مشابه در نظر گرفته شده‌اند (شیلیفر و همکاران، ۲۰۰۹). هرچند بعضی از میکروبیولوژیست‌ها تمایل دارند از نام *استرپتوکوکوس اکووینوس* برای نوع غیربیماری‌زا که در دستگاه گوارش حیوانات اهلی زندگی می‌کنند و *استرپتوکوکوس بویس* برای نوع بیماری‌زا استفاده کنند. *استرپتوکوکوس ماسدونیکوس* که بیش از ۹۹ درصد شباهت با VMB18 داشت جزء خوشه دو می‌باشد و با *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس*[3] در یک خانواده قرار دارد. براساس درخت فیلوژنی VMC02 شباهت بیشتری با *استرپتوکوکوس بویس* سویه JB1 دارد و VMB18 فاصله بیشتری با این باکتری *استرپتوکوکوس بویس* سویه JB1 دارد (شکل ۱). در یک پژوهش شلگل و همکاران (۲۰۰۳) نیز نتیجه مشابهی را به‌دست آوردند. آن‌ها اعلام کردند که *استرپتوکوکوس بویس* سویهJB1 و *استرپتوکوکوس لوتشیا* در خوشه DNA شماره سه قرار دارند. بر اساس نتایج آن‌ها باکتری‌های خوشه سه، هیبریدیزاسیون کمی با سویه‌های *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* داشتند که *استرپتوکوکوس ماسدونیکوس* نیز یکی از زیرگونه‌های *استرپتوکوکوس گالولیتیکوس* است

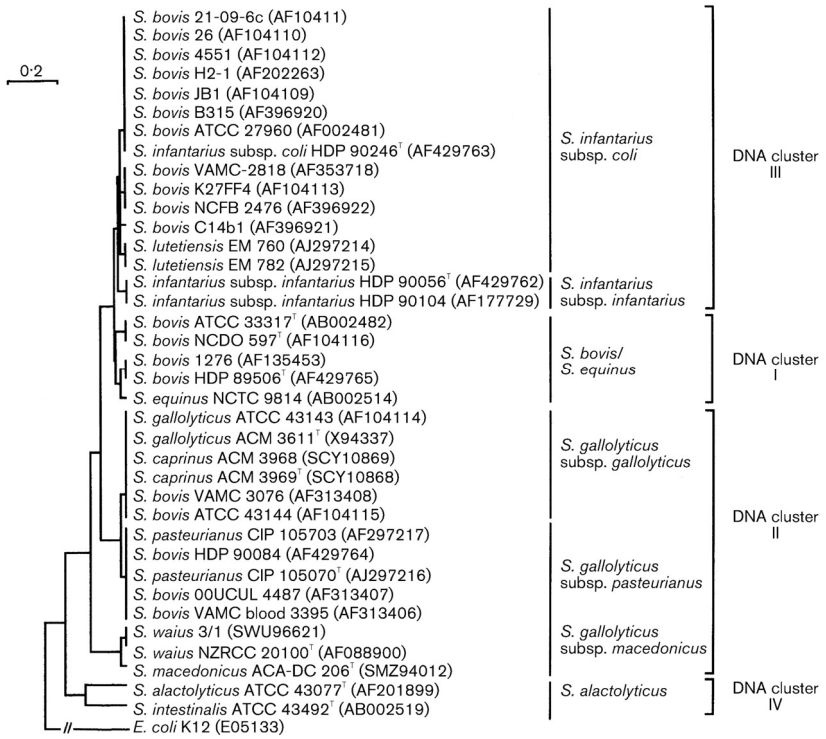
1- Pastoral flavor
2- Bergey's manual of systematic bacteriology
3- *Streptococcus gallolyticus*

(شکل ۲). این باکتری بیشتر از محصولات تخمیری لبنی جدا شده است (دی ووست و ساکالیدو، ۲۰۰۸)، و گزارشی از جداسازی آن از شکمبه نشخوارکنندگان ارائه نشده است. یکی از باکتری‌هایی که در بیشتر منابع به عنوان تولید کننده اسیدلاکتیک معرفی شده است *استرپتوکوکوس بویس* سویه JB1 است که توسط جیمز راسل در دانشگاه کرنل جداسازی و تعیین توالی شد (وایتهد و کوتا، ۲۰۰۰). این باکتری پس از دریافت نشاسته زیاد توسط حیوان نشخوارکننده به سرعت تکثیر می‌یابد. از محصولات تولیدی آن ال- لاکتات و مقدار کمتری استات، اتانول و فرمات است (راسل و رابینسون، ۱۹۸٤). در یک گزارش هانگیت و همکاران (۱۹۵۲) اعلام کردند که این باکتری در کاهش شدید هضم مواد خوراکی در شکمبه گوسفند نقش دارد و نتیجه‌گیری کردند که کاهش pH شکمبه به مقدار ٤/۱ و ٤/۷ در اثر حضور این باکتری است. سویه‌های مختلفی از این باکتری در شکمبه دام‌های مختلف از جمله گاو، گوسفند، شتر و گوزن جداسازی شده است (قالی و همکاران، ۲۰۰٤). علی‌رغم اینکه این باکتری مهمترین تولید کننده اسیدلاکتیک در شکمبه شناخته شده است (مکی و همکاران، ۲۰۰۲)، اما گزارشاتی نیز ارائه شده‌اند که تحت شرایط خاص تغذیه‌ای باکتری‌های دیگری مانند *لاکتوباسیلوس ویتولینوس* و *سلنوموناس رومینانتیوم* اهمیت بیشتری در تولید لاکتات دارند و سرعت رشد بیشتری دارند (قالی و همکاران، ۲۰۰٤). باکتری *انتروکوکوس فکالیس* نیز از باکتری‌های تولیدکننده لاکتات است که از دستگاه گوارش انسان و حیوانات جداسازی شده است (هابسون و استوارت، ۱۹۹۷). یکی از خصوصیات این باکتری‌ها تولید انواعی از باکتریوسین‌هاست که به عنوان یک آنتی بیوتیک طبیعی علیه بعضی از باکتری‌ها عمل می‌کنند (گالوز و همکاران، ۱۹۹۸). آزمایشات برون‌تنی نشان داده‌اند که بعضی از باکتریوسین‌ها مانند نیسین می‌توانند سبب کاهش تولید متان و کاهش تولید آمونیاک شوند (راسل و مونتاناوی، ۲۰۰۲). همچنین در بعضی از پژوهش‌ها سویه‌هایی از این باکتری‌ها به سیلاژها افزوده شده‌اند تا با تولید اسیدلاکتیک کیفیت سیلاژ را بهبود ببخشند (لیندگرین و همکاران، ۱۹۸۵).

براساس اطلاعات نگارندگان این مقاله اولین گزارش در ارتباط با بررسی باکتری‌های اسید لاکتیک در شکمبه دام‌های ایرانی است. از آنجا که مرحله اول تغذیه حیوان نشخوارکننده، تغذیه میکروب‌های شکمبه است، شناسایی این میکروارگانیسم‌ها و بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی آن‌ها به درک ما از نحوه تغذیه و متابولیسم آن‌ها کمک می‌کند. براساس نتایج این تحقیق مشخص شد که جمعیت غالب تولیدکننده‌های لاکتات در شکمبه گوسفند مهربان، *استرپتوکوکوس ماسدونیکوس*، *استرپتوکوکوس لوتیشیا*، *انتروکوکوس فکالیس* و انواعی از کلی‌فرم‌ها می‌باشد. لازم است پژوهش‌های بیشتری در مورد حساسیت این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، مقدار تولید لاکتات و احتمال تولید باکتریوسین‌ها بررسی شود.




**شکل ۱- درخت فیلوژنی توالی‌های ۱٦S rRNA از جدایه‌های این پژوهش و گونه‌های مشابه آن‌ها. ترموتوگا ترماروم به‌عنوان Outgroup در نظر گرفته شد. مقادیر Bootstrap از ۲۰۰۰ محاسبه بر روی انشعابات شاخه‌ها نشان داده شده است.**




**شکل ۲- درخت فیلوژنی کمپلکس S. bovis/S. equines بر اساس توالی‌های ژن 16s rRNA (برگرفته از شلگل و همکاران، ۲۰۰۳)**

## منابع

Al Jassim, R.A.M. 2003. *Lactobacillus ruminis* is a predominant lactic acid producing bacterium in the caecum and rectum of the pig. Lett. Appl. Microbiol.37: 213-217.

Atwood, G., Li, D., Pacheco, D. and Tavendale, M. 2006. Production of indolic compounds by rumen bacteria isolated from grazing ruminants. J. Appl. Microbiol. 100: 1261-1271.

Dehority, B.A. 2003. Rumen Microbiology. First edition. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK. Pp: 253-269.

De Vuyst, L. and Tsakalidou, E. 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. Int. Dairy J. 18: 476–485.

Flythe, M.D. and Andries, K. 2009. The effects of monensin on amino acid catabolizing bacteria isolated from the Boer goat rumen. Small Rumin. Res. 81: 178–181

Gálvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Bueno, M.M. and Maqueda, M. 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. Arch Microbiol. 171: 59–65.

Ghali, M.B., Scott, P.T. and Al Jassim, R.A.M. 2004. Characterization of *Streptococcus bovis* from the rumen of the dromedary camel and Rusa deer. Lett. Appl. Microbiol. 39: 341–346.

Hernandez, D., Scott, P.T., Shephard, R.W. and Al Jassim, R.A.M. 2008. The characterization of lactic acid producing bacteria from the rumen of dairy cattle grazing on improved pasture supplemented with wheat and barley grain. J. Appl. Microbiol. 104: 1754-1763.

Hobson, P.N. and Stewart, C.S. 1997. The Rumen Microbial Ecosystem. Chapman and Hall, London. pp. 10–72.

Hungate, R.E., Dougherty, R.W., Bryant, M.P. and Cello, R.M. 1952. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. Cornell Veterinarian. 42: 421–449.

Hungate, R.E., Phillips, G.D., McGregor, A., Hungate, D.P. and Buechner, H.K. 1959. Microbial fermentation in certain mammals. Science. 130: 1192–1194.

Lindgreen, S., Petterson, K., Johnson, A., Lingvall, P. and Kasperson, A. 1985. Silage inoculation. Swed J Agric Res. 15: 9–18.

MacFaddin, J.F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.3rd ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 363-7.

Mackie, R.I., McSweeney, C. and Klieve, A.V. 2002. Microbial Ecology of the Ovine Rumen. In Sheep Nutrition, Freer, M. and Dove, H. CAB international, London, UK, pp: 71-94.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. 2009. Brock Biology of Microorganisms. 12th edn. Pearson Education International, New York. Pp:4-25

Nagaraj, T.C. 2012. A microbiologist's view on improving nutrient utilization in ruminants. Proceedings of 23rd symposium of ruminant nutrition, Florida, USA available at: http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2012/11NagarajaRNS2012.pdf

Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J. and Gill, D.R. 1998. Acidosis in cattle: a review. J. Anim. Sci. 76: 275-286.

Russell, J.B. and Robinson, P.H. 1984. Composition and characteristics of strains of *Streptococcus bovis*. J. Dairy Sci. 67: 1525–1531.

Russell, J.B. and Montanavi, H.C. 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. J. Mol. Micro. Biotech. 4: 347-355.

Schileifer, K.H. 2009. Pylum XIII *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmacutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). in De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, W.B. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology–Volume Three – The *Firmicutes* (second ed.), Springer, New York , Pp. 1317-1319.

Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P.A. and Bouvet, A. 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. Nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. Int J Syst Evol Micr. 53: 631–645.

Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Micr. 44: 846-849.

Wernery, U. and Wensvoort, J. 1992. Experimentally induced rumen acidosis in a 1-year-old camel bull (Camelus dromedarius)–a preliminary report.Brit. Vet. J. 148: 167–170.

Whitehead, T.R. and Cotta, M.A. 2000. Development of molecular methods for identification of *Streptococcus bovis* from human and ruminal origins. FEMS Microbio. Lett. 182: 237-240.

Wilson, K.H., Blitchington, R.B. and Greene, R.C. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28: 1942-1946.

Yoza, B., Matsumoto, M. and Matsunaga, T. 2002. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. J. Biotech. 94: 217–224.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
*J. of Ruminant Research, Vol. 1 (4), 2014*
*http://ejrr.gau.ac.ir*

# Isolation and evaluation of lactic acid producing bacteria isolated from the rumen of Mehraban sheep

**V. Vahdat Manesh[1], *D. Alipour[2], M.Y. Alikhani[3] and H. Ali Arabi[4]**

[1]M.Sc. Graduated, [2]Assistant and [4]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, [3]Associate Prof., Dept. of Microbiology, Faculty of Medicin, Hamedan University of Medical Science
Received: 05/22/2013; Accepted: 12/24/2013

**Abstract**

Rumen acidosis can be caused by overeating of readily fermentable carbohydrate, and as a result an imbalance may be seen in rumen microbial population. In order to characterization of lactate producing bacteria 30 isolates were collected from ruminal fluid of three male Mehraban sheep (receiving a diet containing 60% concentrate and 40% alfalfa hay) using specific cultural media. The isolates were evaluated based on gram staining, catalase activity, indole production test and their ability to ferment some sugars. Identification of isolates was undertaken using 16s rRNA gene sequences. A RFLP procedure was used to test the genetic homogeneity of isolates. Four isolates were selected and their 16s rRNA were sequenced. Based on information obtaind from Gene Bank, the isolates were closely (>99%) related to *Streptococcus macedonicus, Streptococcus luteciae, Enterococcus faecalis and Escherichia fergusonii*.

***Keywords*:** lactate producing bacteria, 16s rRNA gene, *Streptococcus macedonicus, Streptococcus luteciae, Enterococcus faecalis*, *Escherichia fergusonii*

*Corresponding author; alipourd@basu.ac.ir