جداسازی و بررسی برخی از ویژگی‌های پروبیوتیکی آنتروکوک‌ها در شیر گاو جرسی و فرآورده‌های تخمیری آن در قم

زهرا نوری حامد[1]، حمید میرزایی[2]*

۱. دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *hmirzaei@iaut.ac.ir*

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۹/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۴

چکیده

آنتروکوک‌ها از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک با ویژگی‌های پروبیوتیکی هستند که در محصولات لبنی و بویژه در فرآورده‌های تخمیری یافت می‌شوند.. هدف از مطالعه حاضر جداسازی آنتروکوک‌ها از شیر گاو جرسی و فرآورده‌های تخمیری آن در قم و تعیین برخی از ویژگی‌های پروبیوتیکی آنها بود. از هرکدام از نمونه‌های شیر، دوغ، ماست ، پنیر و کره ۵ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت. ۱۲ سویه از گونه‌های *آنتروکوکوس فاسیوم، آنتروکوکوس آویوم و آنتروکوکوس فکالیس* جدا سازی و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها روی ۹ میکروارگانیسم شاخص بررسی شد. تمام جدایه‌ها دارای اثر مهاری روی این میکروارگانیسم‌ها بودند. میزان حساسیت *اشریشیا کولای* بیشتر از سایرین بوده، بعد از آن *سودوموناس آئروژینوزا و لیستریا ایوانوی* قرار داشت و کمترین حساسیت نیز به ترتیب در *لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس و کلبسیلا پنومونیا* مشاهده شد. میانگین اثر مهاری جدایه‌ها روی مجموع میکروارگانیسم‌های گرم منفی بطور معنی دار بیشتر از میکرارگانیسم‌های گرم مثبت بود ($p\leq ۰/۰۵$). در بررسی مقاومت جدایه‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۳ درصد صفرا، از مجموع ۱۲ جدایه حاصله از نمونه‌های مورد آزمایش، ۲ جدایه از گونه آویوم (۴۰٪)، ۳ جدایه از گونه فکالیس (۱۰۰٪) و یک جدایه از گونه فیسیوم (۲۰٪) مقاوم تشخیص داده شدند. و از میان آن‌ها، تنها یکی از جدایه‌های *آنتروکوکوس آویوم* نسبت به شرایط اسیدی مقاوم بود. در مجموع می‌توان شیر و فرآورده های تخمیری را منبع غنی از گونه‌های آنتروکوکوس دانست که تعداد اندکی از آنها نسبت به شرایط معده و روده انسان مقاوم می‌باشند. البته این جدایه‌ها باید از نظر ایمن بودن نیز مورد ارزیابی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آنتروکوک‌ها، ویژگی‌های پروبیوتیکی، شیر، فرآورده های تخمیری، شهر قم.

مقدمه

آنتروکوک‌ها (Enterococci) کوکسی‌های مقاوم، گرم مثبت و جزو باکتری‌های گروه لاکتیک اسید (LAB) (Lactic Acid Bacteria) بوده و بطور گسترده در طبیعت پراکنده هستند. جنس آنتروکوکوس (Enterococcus) بیش از ۲۰ گونه دارد ولی *آنتروکوکوس فکالیس* (*Enterococcus faecium*) و *آنتروکوکوس فیسیوم* (*Enterococcus faecalis*) شایع‌ترین این گونه‌ها در مواد غذایی می‌باشند (Gomes et al., 2008). این باکتری‌ها قسمتی از فلور طبیعی دستگاه گوارش بسیاری از پستانداران از جمله انسان و پرندگان بوده و در سنوات اخیر به عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی و اجتماعی (Community-acquired infections) مطرح شده‌اند (Bender *et al.*, 2009). آنتروکوک‌ها به دلیل پخش شدن از طریق مدفوع و نیز مقاومت آنها به شرایط محیطی معمولا در گیاهان، خاک و آب یافت می‌شوند (Belgacem et al. 2010). برخی

گونه‌های انتروکوکوس به دلیل دارا بودن ویژگی مقاومت به حرارت در صورت عدم کفایت پاستوریزاسیون و یا آلودگی ثانویه سبب آلودگی شیر پاستوریزه می‌گردند. براساس تحقیقات و مطالعات انجام شده، وجود گونه‌های مختلف انتروکوکوس در شیر و فراورده‌های آن به اثبات رسیده است (Domingos-Lopes et al. 2017) . از جمله ویژگی‌های مهم این باکتری‌ها می‌توان به ایجاد عطر و طعم مطلوب از طریق پروتئولیز، لیپولیز و تولید دی‌استیل و اگزوپلی‌ساکارید در محصولات لبنی به خصوص پنیر سنتی اشاره کرد (Domingos-Lopes et al. 2017). تولید باکتریوسین توسط آنتروکوک‌ها که از جمله باکتری‌های غالب در پنیر می‌باشند، مانع رشد پاتوژن‌های با منشاء مواد غذایی می‌شود. اخیرا به آنتروکوک‌ها برای استفاده به عنوان پروبیوتیک در محصولات لبنی توجه خاصی شده است. گونه‌های فکالیس و فاسیوم این میکروارگانیسم به عنوان پروبیوتیک در بعضی از محصولات به‌کار رفته‌اند (Schittler et al. 2019). تحمل سویه‌ها نسبت به محیط اسیدی و نمک-های صفراوی نیز دو معیار برای یک سویه پروبیوتیک مورد نظر برای زنده ماندن در دستگاه گوارش انسان و حیوانات است (Nami et al., 2019). در مطالعات مختلف ویژگی‌های تکنولوژیکی جدایه‌های *آنتروکوکوس فکالیس و آنتروکوکوس فیسیوم* از منابع مختلف شامل قدرت تولید اسید، توانایی پروتئولیتیک، لیپولیتیک و تولید آنزیم آلفا آمیلاز، تولید هیدروژن پراکسید، دی استیل و اگزوپلی‌ساکارید مورد توجه قرار گرفته است (Belgacem et al. 2010; Domingos-Lopes et al. 2017; Landeta et al. 2013) تمامی این ویژگی‌های مطلوب منجر به ترغیب تولید کنندگان فرآورده‌های لبنی برای استفاده ا ز آنتروکوک‌های جدا شده از فراورده های لبنی همچون پنیر شده است. اما علی رغم داشتن تمامی این ویژگی‌ها آنتروکوک‌ها به عنوان GRAS (Generally Recognized As Safe) شناخته نمی‌شوند و حضور آنها در محصولات غذایی نشانه‌ای از آلودگی مدفوعی می‌باشد. در واقع آنتروکوک‌ها به عنوان پاتوژن‌های فرصت طلبی شناخته می‌شوند که در ایجاد طیف وسیعی از عفونت های شایع در انسان مثل آندوکاردیت، باکتریمی، مننژیت و سپتی سمی نقش دارند. از طرف دیگر همچنین گزارشات زیادی مبنی بر بروز مقاومت در انتروکوکوس های بیماری زا به انواع آنتی بیوتیک و محدود شدن روش‌های درمانی موثر برعفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری ذکر شده است (Demirgül and Tuncer 2017) خواص دوگانه آنتروکوک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های مفید یا پاتوژن‌های فرصت طلب امروزه محققان را بر آن داشته تا به بررسی دقیق آنتروکوک‌های جدا شده از مواد غذایی بپردازند و تاثیر آنها برسلامت مصرف کننده و امکان استفاده به عنوان آغازگر را در محصولات لبنی مورد بررسی قرار دهند (Kouhi et al., 2022; Graham et al., 2020; Achemchem et al., 2006). هدف از مطالعه حاضر جداسازی آنتروکوک‌ها از شیر خام و فرآورده های تخمیری شیر گاو جرسی در شهر قم و بررسی اثر مهاری آنها بر تعدادی از باکتری‌های بیماری زای مهم غذایی و همچنین میزان مقاومت آن‌ها در مقابل اسید و صفرا است.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌گیری

مجموعه مرسا در شهر قم مرجع پرورش گاو اصیل جرسی در ایران می‌باشد که توانسته زنجیره تولید شیر و تبدیل آن به انواع فرآورده‌های لبنی و عرضه مستقیم محصولات را داشته باشد و محصولات تولیدی را با نام تجاری مرسا عرضه نماید. این مجموعه در حال پرورش و نگهداری گاو جرسی بوده و از شیر حاصل از آن انواع لبنیات را تولید می نماید. در سال ۱۴۰۰ از هر کدام از نمونه‌های شیر خام، ماست، دوغ، ماست کفیر، دوغ کفیر، پنیر و کره دوغی که تمام این محصولات به صورت سنتی تهیه شده-

اند، ۵ نمونه بطور تصادفی انتخاب و در مجاورت یخ به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز دانشگاه آزاد اسلامی منتقل شد و آزمایش‌های ذیربط در همین آزمایشگاه انجام گرفت.

جداسازی و شناسایی انتروکوکوس‌ها

مقدار ۱۰ میلی لیتر (۱۰ گرم) از هر نمونه به ۹۰ میلی لیتر از محیط کشت Buffered Peptone Water (Merck, Germany) اضافه و بعد از حدود ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری، در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ۵ دقیقه با شدت ۲۳۰ دور در دقیقه بر روی شیکر همگن گردید و سپس به مدت ۱۲-۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد (Fracalanzza et al., 2007; Morandi et al., 2006). از نمونه غنی شده در محیط Kanamycin Esculin Azide agar (Merck, Germany) به صورت خطی کشت و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. بر اساس شکل پرگنه‌ها، تعداد ۳ تا ۵ پرگنه با هاله سیاه رنگ جهت خالص سازی انتخاب و به صورت خطی در محیط Brain Heart Infusion agar (Merck, Germany) کشت داده شد (Fortina *et al.*, 2008; Fracalanzza *et al.*, 2007). برای تایید جنس انتروکوکوس از آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی نظیر رنگ‌آمیزی گرم، رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک، توانایی هیدرولیز اسکولین استفاده شد. جدایه‌های کوکسی شکل، گرم مثبت، کاتالاز منفی، با قابلیت تحمل ۶/۵ درصد نمک و هیدرولیز اسکولین، به عنوان جنس انتروکوکوس لحاظ شد. جهت تشخیص تفریقی گونه‌ها از آزمون‌های توانایی رشد در دماهای ۱۰ و ۴۵ درجه سلسیوس، قابلیت حرکت، تولید رنگدانه زرد، تولید H_2S، تولید اسید از قند-های تاگاتوز، ملی‌زیتوز، ملی‌بیوز، آرابینوز، گلیسرول، سوربوز، سوربیتول، و هیدرولیز آرژنین استفاده شد (Fortina *et al.*, 2008; Morandi *et al.*, 2006).

ارزیابی اثر مهاری جدایه‌ها بر روی باکتری‌های غذایی

ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی جدایه‌های انتروکوکوس‌ها علیه باکتری‌های شاخص با روش دولایه (Overlay) مطابق با روشی که قبلاً در مطالعات مشابه مورد استفاده قرار گرفته انجام شد (Hockett and Baltrus, 2017). باکتری‌های شاخص مورد مطالعه در تحقیق حاضر شامل *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسایتوجنز، لیستریا ایوانووی، باسیلوس سرئوس، سالمونلا انتریکا زیرگونه انتریکا سرووار تایفی‌موریوم، اشریشیا کولای، یرسینیا انتروکولیتیکا، کلبسیلا نومونیه و سودوموناس آیروجینوزا* بود. برای انجام آزمایش، مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون (با کدورت معادل نیم مک‌فارلند) هر جدایه انتروکوکوس بر روی BHI agar به‌صورت نقطه‌ای (Spot) کشت داده شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس (تا رشد کامل پرگنه) گرمخانه‌گذاری گردید. برای لایه دوم، از ۷ میلی‌لیتر محیط کشت BHI soft agar (حاوی ۰/۶ الی ۰/۷ درصد آگار) استفاده شد. برای این کار محیط کشت بعد از اتوکلاو، تا دمای ۴۵ درجه سلسیوس خنک سازی و با ۷۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته هر یک از باکتری‌های شاخص با کدورت معادل نیم مک‌فارلند تلقیح و همگن گردید. پس از افزودن لایه دوم بر روی لایه اول کشت، تا زمان منعقد شدن کامل لایه دوم در دمای تقریبی ۲۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. در ادامه محیط‌های کشت به‌مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و قطر هاله عدم رشد در پیرامون پرگنه‌های انتروکوکوس با کولیس اندازه‌گیری شد.

بررسی میزان زنده‌مانی در حضور نمک‌های صفراوی

به‌منظور بررسی میزان تحمل صفرا، هر کدام از جدایه‌ها در لوله حاوی محیط کشت MRS مایع تلقیح و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. لوله‌ها باسرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی تخلیه شد و سرم فیزیولوژی استریل به لوله اضافه و بعد از شیک شدن دوباره سانتریفیوژ گردید و بعد از تخلیه مایع رویی با

اضافه نمودن سرم فیزیولوژی استریل و شیک نمودن، محلول با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه شد. نیم میلی‌لیتر از محلول حاصل به ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS مایع حاوی ۰/۳ درصد صفرای گوساله (Sigma- Aldrich, USA) و بدون آن (به‌عنوان شاهد) تلقیح و لوله ها به‌مدت ۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید (Yamazaki *et al.*, 2012). میزان جذب نوری نمونه ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، در طول موج ۶۳۰ نانومتر (Vernazza et al., 2006) با دستگاه اسپکتروفتومتر(BIOTECK ELx 808, USA) اندازه گیری شد. جدایه های آنتروکوکی که میزان رشد آن‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۳ درصد صفرا بیش از ۵۰ درصد میزان رشدشان در محیط شاهد بود به‌عنوان جدایه‌های مقاوم به صفرا در نظر گرفته شد (Kumar and Kumar, 2015). درصد تحمل صفرا با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مقاومت} = \frac{\text{افزایش OD در MRS مایع با نمک صفراوی}}{\text{افزایش OD در MRS مایع بدون نمک صفراوی}}$$

بررسی میزان زنده‌مانی در pH اسیدی

برای تعیین میزان تحمل pH اسیدی جدایه‌های دارای توانایی تحمل صفرا ۰/۳ درصد از روش از قبل توصیه شده (Yamazaki *et al.*, 2012) با مقداری تغییر استفاده شد. برای این منظور نیم میلی‌لیتر از محلول با کدورت نیم مک‌فارلند حاوی هرکدام از جدایه‌های (تهیه شده طبق روش فوق الذکر) مقاوم به صفرا، به ۳ میلی‌لیتر از محیط MRS مایع با pH برابر ۲/۵ (نمونه با شرایط اسیدی) و با pH برابر ۵/۷ (نمونه شاهد) تلقیح و به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد.

پس از سپری شدن این زمان تعداد سلول‌های زنده با کشت ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های سریالی۱۰ هر کدام از محیط‌های کشت با روش کشت سطحی بر روی محیط MRS آگار و گرمخانه‌گذاری به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری محاسبه شد.

آنالیز و تجزیه تحلیل آماری

برای ارزیابی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون آماری آزمون کولموگروف اسمیرنف (Kolmogorov-Smirnov) در سطح $\alpha=$ ۰/۰۵ استفاده شد. با عنایت به نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون آماری آنایز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) (One-Way Analysis of Variance) برای مقایسه بین گروه‌ها و از آزمون آماری تعقیبی توکی در سطح $\alpha=$ ۰/۰۵ برای مقایسه بین دوبدوی گروه‌ها استفاده شد. برای مقایسه میانگین بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از آزمن آماری تی مستقل (Independent Samples t Test) در سطح $\alpha=$ ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

همانطوری‌که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در مجموع ۱۲ جدایه شامل ۳ گونه آنتروکوکوس فاسیوم، آنتروکوکوس آویوم و آنتروکوکوس فکالیس از نمونه های مورد آزمایش جدا سازی شد. خاصیت ضد میکروبی جدایه‌ها روی ۹ میکروارگانیسم شاخص براساس میانگین قطر هاله مهار رشد بر حسب میلی‌متر در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطوری‌که مشاهده می‌شود همه جدایه‌ها دارای اثر مهاری روی تک‌تک میکروارگانیسم‌های شاخص بوده و میزان اثر مهاری گونه‌های مختلف و نیز جدایه متفاوت هر گونه روی میکروارگانیسم‌های شاخص متفاوت ارزیابی شده است. براساس نتایج مندرج در جدول ۲ میانگین قطر مهاری ایجاد شده توسط مجموع ۴ جدایه *آنتروکوکوس فاسیوم*، ۵ جدایه *آنتروکوکوس آویوم* و ۳ جدایه *آنتروکوکوس فکالیس* روی مجموع میکروارگانیسم‌های گرم منفی بطور معنی دار بیشتر از میکرارگانیسم گرم مثبت برآورده شده است. براساس نتایج مندرج در شکل ۱ میانگین قطر مهاری جدایه‌های شناسایی شده بر علیه مجموع میکروارگانیسم‌های شاخص گرم منفی بطور معنی دار بیشتر از میکروارگانیسم‌های شاخص گرم مثبت می باشد ($p\leq0.05$).

جدول۱- تنوع گونه‌های جدا شده از نمونه‌های مورد آزمایش و میانگین برحسب میلی‌متر قطر هاله مهاری ایجاد شده توسط هر از کدام از آن‌ها بر علیه میکروارگانیسم‌های شاخص

گونه آنتروکوک	شماره جدایه	نمونه غذا	میکروارگانیسم شاخص						
			P. a	K. p	Y. e	E. c	Sal. e	B. car	L. i	L. m	St. a
	۱	شیر خام	/۶۶ ۱۱abcd	۵ab	۶/۳ab	۸/۷abc	۹/۷bcd	٦/۳ab	۱۴/۷d	۱۰/۷de	۵/۷a
	۷	شیر خام	۱۲/۷b cd	۷ab	۷b	۱۰/۷a bc	۱۰/۷bc de	۷ab	۷ab	۵a	۷a
فاسیوم	۲۳	دوغ کفیر	۱۸e	۱۳/۳ d	۱۲/۷c	۱۳/۷c de	٤/۷c	۱٤cd	۱۰/۳b c	٦/۳abc	۱۲/۳ cd
	٤٤	پنیر	۱٤/۳d e	۱۰bc d	۱۲c	۱۷def	۱٤/۳c	۱۲bcd	۱۱/٦c de	۱۲/۷c	۱۰/۳ a
	PTCC= ۱۲۳۹	–	۸a	۵/۳a	۳/۳a	٦/۳e	۸ab	٦ab	۱۵/۳d	۵/۷ab	۵/۷a
	۲	شیر خام	/۳۳ ۱۲abcd	۷/۷a bc	٦/۳ab	۱۲/۳b cd	۹bc	۵a	۵/۲a	٦/۷abc	۶/۷a
	۲۶	دوغ کفیر	۱۱/۷a bcd	۷/۳a b	۱۲/۷c	۱۸def	۱۱/۳bc de	۷/۷ab	۱٤/۲c de	۷/۳abc	۱۰/۳ bc
آویوم	۲۸	دوغ کفیر	۱٤cde	۱۱/۷ d	۱۳c	۹/۳abc	۱۳/۳cd e	۷/۳ab	۱۲/۷c de	۶abc	۹/۷b
	۳۹	پنیر	۱۳/۷c de	۱۲d	۱۰/۷c	۷/۳ab	۱۳cde	۷ab	۱۲cde	۸/۷cd	۱۰/۳ bc
	۴۰	پنیر	۱۳cd	۱۲d	٦/۷b	۱۳/۳c de	۱۰bcd	۸abc	۱۲cde	۷/۳abc	۱۰b
فکالیس	۶۳	کره	۱۰/۷a bcd	۷/۷a bc	۱۳/۳c	۱۸/۳e f	۱۰/۳bc de	۱۱/۷bc d	۱۳/۷	۵/۷ab	۱۳e
	۶۷	کره	۱۸e	۹/۲b cd	۱۱c	۲۰f	۱۳/۳de	۱۰/۳ab cd	۱۱/۷c de	۸bcd	۱۲/۷ e
	۶۸	کره	۹/۷abc	۱۱/۳ cd	۱۰/۷c	۱۸def	۱۳cde	۱۵/۳e	۱۰/۳c de	۱۱/۷e	۱۱/۳ bcd
	PTCC= ۱۷۸۷	-	۸/۳ab	۷/۷a bc	٦/۲ab	۱۰/۳a bc	۹bc	۷/۳ab	٦/۷ab	۷/۷abc	٦/۷a

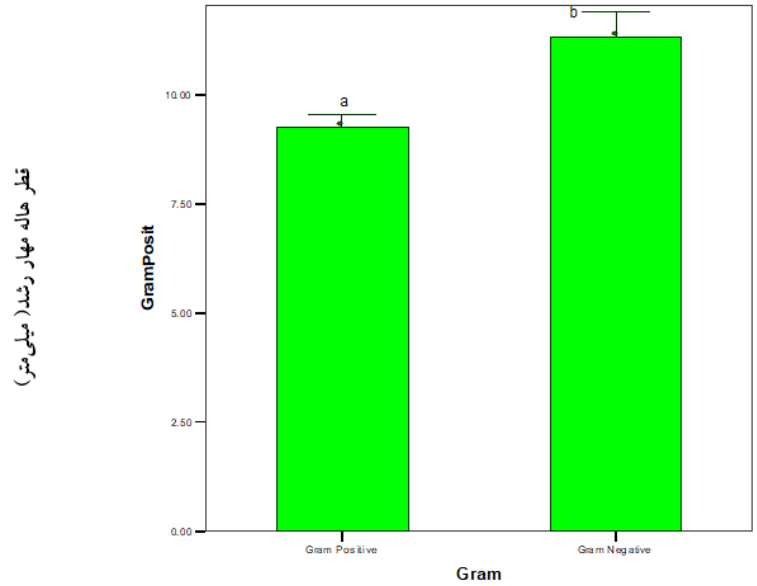
St.a:*Staphylococcus aureus*, L.m:*Listeria monocytogenes*, L.i:*Listeria ivanovii*, B.cer:*Bacillus cereus*, Sal.e:*Salmonella entritidis*, E.c:*Escherichia coli*,Y.e:*Yersinia enterocolitica*, K.p:*Klebsiella pneumonia*,P.a:*Pseudomonas aeruginosa*

a، b، c، d و e: تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون مربوط به هر کدام از گونه‌ها معنی‌دار می‌باشد ($p\leq0.05$).

جدول۲- میانگین (Mean±SD) برحسب میلی‌متر قطر هاله مهار رشد گونه‌های آنتروکوکوس بر روی مجموع میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی

گونه آنتروکوکوس	میکروارگانیسم‌های شاخص	
	گرم مثبت	گرم منفی
فاسیوم	۹/۱۳±۱/۸۵ a	۱۰/۹۱±۱/۱۲ b
آویوم	۸/۷۲±۱/٦۱ a	۱۱/۲۳±۱/۰٤ b
فکالیس	۱۱/۲۸±۰/۸۸ a	۱۲/۹۷±۱/۳۲ b

a و b: تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ردیف معنی‌دار می‌باشد ($p\leq0.05$).

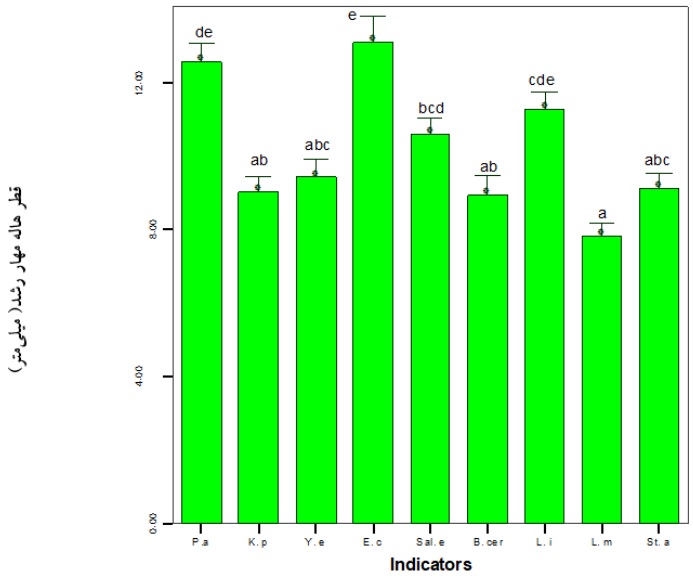


شکل ۱- نمودار میانگین (Mean±SD) (میلی‌متر) قطر هاله مهار رشد بر روی مجموع میکروارگانیسم‌های شاخص گرم مثبت و گرم منفی توسط جدایه‌های آنتروکوکوس

a و b: تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p\leq0.05$).

میزان حساسیت هر کدام از میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش نسبت به اثر ضد میکربی مجموع ۱۲ جدایه در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطوری که مشاهده می شود میزان حساسیت *اشریشیا کولای* بیشتر از سایرین بوده و بعد از آن *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریا ایوانوی* قرار دارند. و کمترین حساسیت نسبت به خاصیت ضد میکروبی جدایه‌های آنتروکوکوس نیز به ترتیب در *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *کلبسیلا پنومونیا* مشاهده شد. میزان مقاومت جدایه‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۳ درصد صفرا در شکل ۳ نشان داده شده است.

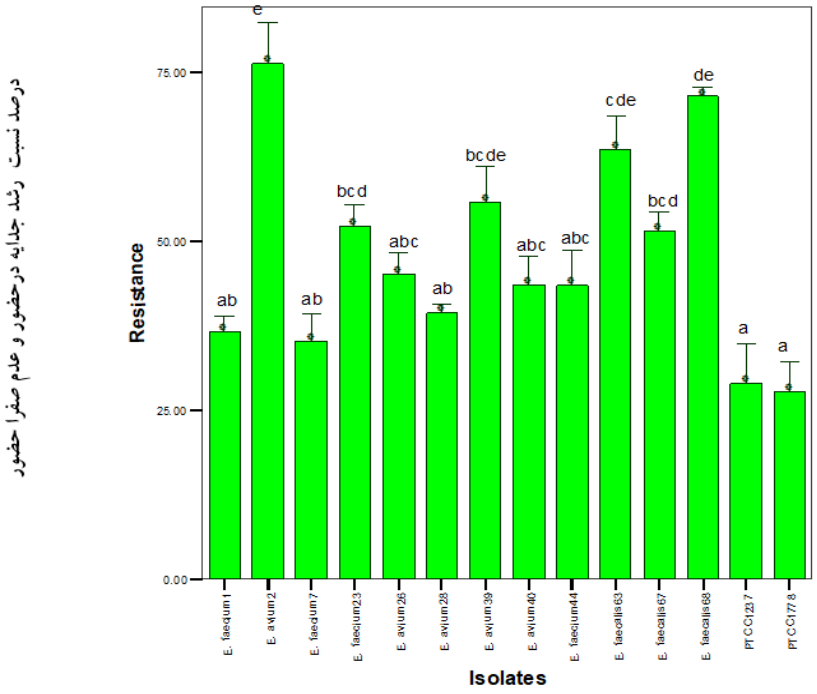
همانطوری‌که مشاهده می شود از مجموع ۱۲ جدایه حاصله از نمونه‌های مورد آزمایش ۲ جدایه از گونه آویوم (۴۰٪)، ۳ جدایه از گونه فکالیس (۱۰۰٪) و یک جدایه از گونه فیسیوم (۲۰٪) دارای رشد بیشتر از ۵۰٪ شرایط عاری از صفرا بوده و لذا نسبت به صفرا مقاوم تشخیص داده شدند. براساس نتایج مندرج در جدول ۳ از میان ۶ جدایه‌ای که نسبت به محیط حاوی ۰/۳ درصد صفرا مقاوم تشخیص داده شدند، تنها یکی از جدایه‌های *آویوم* همچنان پس از گذشت ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری، در برابر محیط اسیدی با pH=۲/۵ مقاوم تشخیص داده شد.



شکل ۲- نمودار میانگین (Mean±SD) (میلی‌متر) قطر هاله مهار رشد بر روی هرکدام از میکروارگانیسم‌های شاخص توسط مجموع جدایه‌های آنتروکوکوس

St.a:Staphylococcus aureus, L.m:Listeria monocytogenes, L.i:Listeria ivanovii, B.cer:Bacillus cereus, Sal.e:Salmonella entritidis, E.c:Escherichia coli,Y.e:Yersinia enterocolitica, K.p:Klebsiella pneumonia,P.a:Pseudomonas aeruginosa

a، b، c، d و e: تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p\leq0.05$).



شکل۳- نمودار میانگین (Mean±SD) درصد نسبت رشد هر کدام از جدایه‌ها در حضور و عدم حضور ۰/۳٪ صفر در محیط کشت

St.a:Staphylococcus aureus, L.m:Listeria monocytogenes, L.i:Listeria ivanovii, B.cer:Bacillus cereus, Sal.e:Salmonella entritidis, E.c:Escherichia coli,Y.e:Yersinia enterocolitica, K.p:Klebsiella pneumonia,P.a:Pseudomonas aeruginosa

a، b، c، d و e: تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p\leq0.05$).

جدول ۳- میانگین (Mean±SD) لگاریتم تعداد جدایه‌ها بعد از ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری در محیط MRS با pH=۲/۵ و pH=۵/۷

جدایه	محیط کشت MRS	
	با pH=5.7	با pH=3
E. avium 2	۸/۵۲±۰/۱۳	۵/۴۶±۰/۱۳
E. faecium 23	۸/۱۶±۰/۰۸	___
E. avium 39	۸/۴۴±۰/۰۶	___
E. faecalis 63	۸/۶۳±۰/۰۳	___
E. faecalis 67	۸/۶۳±۰/۰۳	___
E. faecalis 68	۸/۴۶±۰/۱۳	___

بحث

بر اساس یافته‌های به‌دست آماده، در مجموع ۱۲ جدایه شامل ۴ جدایه از گونه آنتروکوکوس فاسیوم، ۵ جدایه از گونه آنتروکوکوس آویوم و ۳ جدایه از آنتروکوکوس فکالیس از نمونه های مورد آزمایش جدا سازی شد (جدول ۱). نتایج حاصله در مقایسه با مطالعات مشابه در مناطق مختلف داخل ایران مثل سبزوار، تبریز، آذربایجان شرقی (Nami *et al.*, 2019) و حتی مطالعات مشابه خارج ایران (Nieto-Arribas *et al.*, 2011) نشان می‌دهد که مجموعا شیر و فرآورده‌های تخمیری آن منبع غنی از گونه‌های متعدد آنتروکوکوس می‌باشد. تنوع گونه‌ای بسته به تنوع محصول، گستردگی مناطق نمونه‌گیری، نحوه تولید و حجم نمونه‌ها و جدایه‌های تحت مطالعه می‌تواند متفاوت باشد ولی آنچه که حدودا در همه مطالعات مشاهده می‌شود غالب بودن وجود گونه‌های آنتروکوکوس فکالیس و فاسیوم در نمونه‌های مورد آزمایش می‌باشد هرچند در مطالعه حاضر تعداد جدایه آنتروکوکوس آویوم (۵ جدایه) بیشتر از هر کدام از دوگونه دیگر بود. آنتروکوک‌ها به دلیل پخش شدن از طریق مدفوع و نیز مقاومت آنها به شرایط محیطی معمولا در گیاهان، خاک و آب یافت می‌شوند (Belgacem *et al.*, 2010) لذا در شیر و فرآورده‌های تخمیری بخصوص سنتی احتمال آلودگی به انواع گونه‌های آن وجود دارد در ضمن برخی گونه‌های انتروکوکوس به دلیل دارا بودن ویژگی مقاومت به حرارت درصورت عدم کفایت پاستوریزاسیون و یا آلودگی ثانویه سبب آلودگی شیر و سایرفرآورده‌های پاستوریزه می‌گردند (Domingos-Lopes *et al.*, 2017). آنتروکوک‌ها در بسیاری از مواد غذایی خام و فرآوری شده یافت می‌شوند؛ در این میان شیر و فرآورده‌های آن حاوی انواع متنوعی از گونه‌های این باکتری هستند (Jamet *et al.*, 2012). آنتروکوک‌ها جزو باکتری‌های مولد اسید لاکتیک دسته‌بندی می‌شوند و به همراه لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها به عنوان آغازگر در انواع سنتی محصولات تخمیری شیر عمل می‌کنند و با توجه به داشتن خواص پروتئولیتیک و لیپولیتیک در تولید عطر و آروما مؤثر هستند (Sánchez Valenzuela *et al.*, 2009; Nieto-Arribas *et al.*, 2011) نتایج مطالعه حاضر نشان داد گونه‌های مختلف انتروکوکوس و هم‌چنین جدایه‌های متنوع یک گونه، اثر مهاری متفاوتی بر باکتری‌های شاخص داشتند؛ به‌طوری‌که قطر هاله مهاری ایجاد شده از ۳/۳ میلی‌متر در انتروکوکوس فاسیوم تا ۲۰ میلی‌متر در انتروکوکوس فکالیس متغیر بود. این تفاوت نه‌تنها در بین گونه‌های متنوع انترکوکوس، بلکه در بین جدایه‌های یک گونه مشخص، مشاهده گردید (جدول ۱). در مطالعات مختلف کم و بیش نتایج مشابه تحقیق حاضر به‌دست آمده است. برای مثال، گونه‌های انتروکوکوس جداسازی شده از کفیر فعالیت ضدمیکروبی علیه *سالمونلا انتریکا، سودوموناس آیروجینوزا، شیگلا فلکسنری، اشریشیا*

کولای، لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس داشتند (Carasi *et al.*, 2014). هم‌چنین گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جداسازی شده از فرآورده‌های پروبیوتیکی شیر در بازار چین اثر بازدارنده علیه لیستریا مونوسایتوجنز نشان دادند (Lei *et al.*, 2015). در مطالعه‌ی دیگری تمام جدایه‌های آنتروکوکوس مقاوم به صفرا و شرایط اسیدی حاصله از فرآورده‌های تخمیری در آذربایجان‌شرقی اثر مهاری در برابر باکتری های *شیگلا فلکسنری، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، یرسینیا انتروکولیتیکا، کلبسیلا پنومونیه، اشرشیا کلای و باسیلوس سوبتلیس* نشان دادند (Nami *et al.*, 2019). نکته قابل‌توجه در نتایج تحقیق حاضر، تفاوت در میزان بازدارندگی گونه‌های انتروکوکوس بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر میانگین قطر مهاری جدایه‌های شناسایی شده به‌صورت انفرادی (**جدول ۲**) و همراه با هم (نمودار ۱) علیه مجموع میکروارگانیسم‌های شاخص گرم منفی بطور معنی دار بیشتر ($p\leq0.05$) از میکروارگانیسم‌های شاخص گرم مثبت است. این یافته با نتایج تحقیقات دیگر روی جدایه‌های آنتروکوک‌ها و (Nami *et al.*, 2019) همخوانی دارد ولی با نتایج تحقیقات دیگر روی تأثیر آنتاگونیستی سایر باکتری‌های لاکتیکی نظیر لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها (Alvarado *et al* ., 2006; Aguilar *et al*., 2011; Uraipan and Hongpattarakere, 2015) متناقض می باشد. تفاوت در یافته‌های حاصله می‌تواند ناشی از تنوع و میزان عوامل آنتاگونیستی (کاهش pH، تولید H_2O_2، تولید باکتریوسین‌ها و نظایر آن) باشد که توسط انتروکوکوس‌ها و سایر باکتری‌های لاکتیکی تولید می‌شوند (Alvarado *et al*., 2006).

از دیگر ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها، مقاومت در برابر صفرا است. میزان مقاومت ۱۲ جدایه بررسی شده در محیط کشت حاوی ۰/۳ درصد صفرا در تحقیق حاضر حاکی از آن است که ۲ جدایه از گونه آویوم (۴۰٪)، ۳ جدایه از گونه فکالیس (۱۰۰٪) و یک جدایه از گونه فاسیوم (۲۰٪) یعنی در مجموع ۶ جدایه از ۱۲ جدایه (۵۰٪) دارای رشد بیشتر از ۵۰٪ در شرایط عاری از صفرا بوده و در نتیجه نسبت به صفرا مقاوم تشخیص داده شدند. بیشترین میزان مقاومت به صفرا در جدایه مربوط به گونه آنتروکوکوس آویوم و کمترین میزان مقاومت در جدایه مربوط به گونه آنتروکوکوس فاسیوم مشاهده شد. در مطالعه روی جدایه‌های آنتروکوکوس از لبنیات سنتی آذربایجان‌شرقی ۷ جدایه از ۳۲ جدایه (حدود ۲۲٪) نسبت به حضور ۰/۳٪ از صفرا در محیط کشت مقاوم تشخیص داده شده‌اند که بیشترین میزان مقاومت مربوط در ۳ جدایه از گونه آنتروکوکوس دیورانس (*E. durans*) مشاهده شد (Nami *et al.*, 2019). همچنین در مطالعات دیگر *آنتروکوکوس دیورانس* (Hussein *et al.*, 2020) و نیز انتروکوکوس فاسیوم (Singhal *et al.*, 2019) مقاوم به صفرا گزارش شده‌اند. بنابراین به نظر می‌رسد که جدایه-های زیادی از انتروکوک‌ها نسبت به صفرا مقاوم هستند.

یکی دیگر از ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها، مقاومت در برابر محیط اسیدی است. در این بررسی از میان ۶ جدایه که نسبت به محیط حاوی ۰/۳ درصد صفرا مقاوم تشخیص داده شدند، تنها یکی از جدایه‌های آنتروکوکوس *آویوم* (حدود ۱۷٪) همچنان پس از گذشت ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری، در برابر محیط اسیدی با pH=۲/۵ مقاوم تشخیص داده شد. در مطالعه‌ی توانمندی پروبیوتیکی آنتروکوک‌های جدا شده از پنیر قاینی در خراسان جنوبی ۶ سویه از ۳۰ جدایه‌ی آنتروکوکوس انتخاب شده (۲۰٪) نسبت به شرایط اسیدی مقاوم تشخیص داده شدند. همچنین در بررسی خواص پروبیوتیکی آنتروکوکوس‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی، تمام جدایه‌های انتخاب شده با درصدهای متفاوت از حدود ۱۰٪ تا ۸۲٪ نسبت به شرایط اسیدی مقاوم بودند (Nami, et al., 2019). در مطالعه روی ۶ سویه آنتروکوکوس دیورانس به عنوان تنها گونه جدا شده از دانه‌های کفیر نشان داده شده است که همه سویه‌ها نسبت به شرایط مشابه با محتویات

معده مقاوم بودند هرچند تفاوت بین میزان مقاومت بین جدایه‌ها به‌طور معنی‌دار متفاوت بود (Carasi, *et al.*, 2014). به نظر می‌رسد که میزان مقاومت جدایه‌های آنتروکوک‌ها نسبت به محیط اسیدی کمتر از میزان مقاومت آن‌ها نسبت به صفرا می‌باشد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان به این جمع‌بندی رسید که شیر خام و فرآورده‌های تخمیری گاو جرسی در شهر قم منبع نسبتا غنی از گونه‌های انتروکوکوس می‌باشند. انتروکوکوس دارای خاصیت آنتاگونیستی علیه باکتری‌های شاخص غذایی بودند و میزان اثر مهاری در بین گونه‌های مختلف و سویه‌های یک گونه واحد، متفاوت برآورد شد. بر اساس این یافته‌ها ۳ گونه *آنتروکوکوس فاسیوم، آنتروکوکوس آویوم و آنتروکوکوس فکالیس* توانستند بر روی ۹ باکتری شاخص غذایی اثر مهاری ایجاد کنند که در بین آن‌ها میزان حساسیت *اشریشیا کولای* بیشتر از سایرین بوده و بعد از آن *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریا ایوانوی* قرار دارند و کمترین حساسیت نسبت به خاصیت ضد میکروبی جدایه‌های *آنتروکوکوس* نیز به ترتیب در *لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس* و *کلبسیلا پنومونیا* مشاهده شد.

همچنین در بررسی میزان مقاومت جدایه‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۳ درصد صفرا، از مجموع ۱۲ جدایه حاصله از نمونه‌های مورد آزمایش ۲ جدایه از گونه *آنتروکوکوس آویوم* (۴۰٪)،۳ جدایه از گونه *آنتروکوکوس فکالیس* (۱۰۰٪) و یک جدایه از گونه *آنتروکوکوس فیسیوم* (۲۰٪) مقاوم تشخیص داده شدند. در نهایت از مجموع سویه‌های مقاوم به صفرا، تنها یکی از جدایه‌های مربوط به گونه آنتروکوکوس *آویوم* همچنان پس از ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری، در شرایط اسیدی زنده ماند.

منابع

1. Achemchem, F., J. Abrini, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia, and M. Maqueda. 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's Jben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. J. Food Prot. 69 (10):2370–6.
2. Aguilar, C., Vanergas, C. and Klotz, B. 2011. Antagonistic effect of Lactobacillus strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. J Dairy Res. 78(2): 136-143.
3. Alvarado, C., García Almendárez, B.E., Martin, S.E., and Regalado, C. 2006. Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods. Rev Latinoam Microbiol. 48(3-4): 260-268.
4. Belgacem, Z.B., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., and Manai, M. 2010. "Antimicrobial Activity, Safety Aspects, and Some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. Food Control. 21(4):462–70.
5. Bender E.A., De Freitas, A.L.P., Reiter, K.C., Lutz, L., Barth, A.L. 2009. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of enterococcus spp. Isolated in Porto Alegre, Brazil. Braz J Microbiol. 40: 693-700.
6. Carasi, P., Jacquot, C., Romanin, D.E., Elie, A.M., De Antoni, G.L., Urdaci, M.C. et al. 2014. Safety and potential beneficial properties of Enterococcus strains isolated from kefir. Int Dairy J. 39(1): 193–200.
7. Demirgül, F., and Tuncer, Y. 2017. "Detection of Antibiotic Resistance and Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sucuk, a Traditional Turkish Dry-Fermented Sausage. Korean J Food Sci Anim Resour . 37(5):670–81.
8. Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., and Silva, C. C. G. 2017. "Genetic Diversity, Safety and Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Artisanal Pico Cheese. Food Microbiol.. 63:178–90.

on biotechnological potential and safety of the novel Enterococcus species of dairy origin, *E. italicus*. Int J Food Microbiol. 123(3): 204-211.

10. Fracalanzza, S.A.P., Scheidegger, E.M.D., Santos, P.F.D., Leite, P.C. and Teixeira, L.M. 2007. Antimicrobial resistance profiles of Enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Crus, Rio de Janeiro. 102(7): 853-859.
11. Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C. V., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L. A., et al. 2008. Prevalence and characterization of Enterococcus spp. Isolated from Brazilian foods. Food Microbiol. 25:668–675.
12. Graham, K., Stack, H. and Rea, R. 2020. Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications – a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60: 3836-3861.
13. Hockett, K.L., and Baltrus, D.A. 2017. Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. J Vis Exp. (119): 550-564.
14. Hussein, W.E., Abdelhamid, A.G., Rocha-Mendoza, D., García-Cano, I., and Yousef, A.E. 2020. Assessment of safety and probiotic traits of *Enterococcus durans* OSY-EGY, isolated from egyptian artisanal cheese, Using comparative genomics and phenotypic analyses. Front Microbiol. 11:608314.
15. Jamet, E., Akary, E., Poission, M.A. Cham, J.F., Bertrand, X. and Serror, P. 2012. Prevalence and characterization of antibiotic-resistant *Enterococcus feacalis* in French cheese. Food Microbiol. 31(2): 191–198.
16. Kouhi, F., Mirzaei, H., Nami, Y., Khandaghi, J., Javadi. A. 2022. Potential probiotic and safety characterisation of enterococcus bacteria isolated from indigenous fermented motal cheese. Int. Dairy J. 126: 105247.
9. Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M.Y., Grohmann, E. 2008. A survey
17. Kumar, A., and Kumar, D. 2015. Characterization of lactobacillus isolated from dairy samples for probiotic properties. Anaerobe. 33: 117-123.
18. Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., and De las Rivas, B. 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. Meat Sci. 95(2):272–80.
19. Lei, M., Dai, X., and Liu, M. 2015. Biological characteristics and safety examination of five enterococcal strains from probiotic products. J Food Safety. 35(3): 324–335.
20. Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A. and Lodi, R. 2006. Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. Int. Dairy J. 16(8): 867-875.
21. Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S., Hejazi, M. A. 2019. Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products. *Front. Microbiol.* 10:300.
22. Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Chicón, R., Cabezas, L., and Palop, L. 2011. Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity and safety aspects. Food Microbiol. 28(5): 891–899.
23. Sanchez Valenzuela, A., ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Veljovic, K., Martinez Canamero, M. et al. .2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. Food Control. 20(4): 381–385.
24. Schittler, L., Martins Perin, L., de Lima Marques, J., Lando, V., Dimitrov Todorov, S., Augusto Nero, L., and Padilha da Silva, W. 2019. Isolation of *Enterococcus faecium*, characterization of Its antimicrobial metabolites and viability in

probiotic minas frescal cheese. J Food Sci Tech, 56(11):5128–37.
25. Singhal, N., Maurya, A.K., Mohanty, S., Kumar, M., and Virdi, J.S. 2019. Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from rhizosphere. Front Microbiol. 10:1567.
26. Uraipan, S., and Hongpattarakere, T. 2015. Antagonistic characteristics against food-borne pathogenic bacteria of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from feces of healthy Thai infants. Jundishapur J Microbiol. 8(6): 18264.
27. Vernazza, L., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. 2006. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of Bifidobacterium. J Appl Microbiol. 100(4):846-53.
28. Yamazaki, M., Ohtsu, H., Yakabe, Y., Kishima, M. and Abe, H. 2012. In vitro screening of lactobacilli isolated from chicken excreta to control *Salmonella enteritidis* and *typhimurium*. Brit Poultry Sci. 53(2): 183-189.

Isolation and evaluation of some probiotic features of enterococci from Jersey cow milk and its fermented products in Qom

Nourihamed Z[1], Mirzaei H[2*]

1. Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

***Corresponding author**: *hmirzaei@iaut.ac.ir*

Received: 24 November 2021 Accepted: 05 March 2022

Abstract

Enterococci are among the lactic acid bacteria with probiotic potential which are found in dairy products and especially in fermented products. The study aimed to isolate enterococci from raw milk of Jersey cows and its fermented products as well as to determine some probiotic properties of the isolates. Five specimens from each of raw milk, buttermilk, yogurt, cheese, and butter were obtained. Twelve isolates of *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium*, and *Enterococcus faecalis* were isolated. The antimicrobial effects of the isolates were investigated on indicator microorganisms. All isolates had an inhibitory effect on these microorganisms. *Escherichia coli* was more sensitive than the others. *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria ivanovii* followed, and the lowest susceptibility was observed in *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, and *Klebsiella pneumoniae*, respectively. Overall, gram-negative microorganisms were significantly more sensitive than gram-positive microorganisms ($p \leq 0.05$). In the study of resistance of isolates in culture medium containing 0.3% bile, out of 12 isolates obtained from the tested samples, two isolates of *E. avium* (40%), three *E. faecalis* isolates (100%), and one *E. faecium* (20%) were found to be resistant. Amongst, one isolate of *E. avium* was resistant to acidic conditions. In general, milk and fermented products can be considered rich sources of *Enterococcus* species, a small number of which are resistant to the human gastrointestinal tract environment. Of course, these isolates must be further evaluated for safety.

Keywords: Enterococci, Probiotic properties, Milk, Dairy fermented products, Qom.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.