Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Isolation, Identification, and Selection of Lactic Acid Bacteria from the Digestive System of Sistani Cattle for Probiotic Production

Afsaneh Ahrari[1], Mostafa Yousef Elahi[2*], Mohammad Reza Sanjabi[3], Nahid Mojgani[4], Mehdi Vafaye Valleh[5], Abdolfatah Ben Salem[6]

[1] PhD student, Department of Animal science, Faculty of Animal Science, Zabol University, Zabol, Iran
[2] Associate Professor, Department of Animal science, Faculty of Animal Science, Zabol University, Zabol, Iran, Email: m_yousefelahi@uoz.ac.ir
[3] Associate Professor, Department of Animal Science, Poultry & Fisheries, Agriculture Research Institute, (IROST), Iran
[4] Professor, Razi vaccine and serum Research Institute, Agricultural research, Education and extension organization, Iran,
[5] Associate Professor, Department of Animal science, Faculty of Animal Science, Zabol University, Zabol, Iran,
[6] Professor, Universidad Autónoma del Estado de México

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 03/01/2022
Revised: 12/02/2022
Accepted: 14/02/2022

Keywords:
Probiotic
Lactic acid bacteria
Sistani cattle

ABSTRACT

Background and Objectives: The bovine rumen is the suitable growth medium for many of the bacteria responsible for converting food into energy. In recent years, many rumen microbes have been identified and isolated using 16sRNA gene sequencing. Some microbes are suggested as food additives to promote the growth and production of animals. The use of probiotics as a feed additive has been induced by stimulating the positive effects on the host by creating a favorable balance of intestinal microflora. Therefore, this study aimed to isolate, identify and select lactic acid bacteria to produce probiotics from the rumen and feces of Sistani cows.

Material and Methods: In this experiment, samples were taken from the rumen of 12 and the feces of 4 Sistani cows in the industrial slaughterhouse of Zabol city. The samples were transferred to test tubes containing liquid MRS culture medium and incubated at 39°C for 48 hours. After growing from the mentioned medium, the plates containing MRS agar were linearly cultured and the plates were incubated in aerobic conditions at 39°C for 48 hours. The emerged colonies were examined for growth characteristics and morphology as well as purity. Gram-positive, spore-free, spherical negative catalase, and rod-shaped bacteria that did not produce beta hemolysis were tested for antimicrobial, acid, bile salt, and antibiotic susceptibility testing.

Results: 84 isolates were investigated for antimicrobial activity against four species of *Salmonella* and one species of *E. coli* from the initial 158 isolates of lactic acid bacteria, then the isolates obtained from the antimicrobial test were examined for pH resistance test. Thirteen samples selected from this experiment were studied for bile resistance test, of which five isolates were examined for antibiotic susceptibility testing and entered the final stage for genetic and molecular testing. There were only two isolates that were obtained by molecular testing and after sequencing and using NCBI software had a high genetic affinity with two bacteria *Streptococcus infantarius* (isolate A) and *Enterococcus faecium* (isolate B). These two isolates were observed as potential probiotics in Sistani cows.

Conclusion: The general results of the study showed that isolates A and B

have suitable properties for being used as probiotics. These characteristics include high survival rates at low pH and 3% bile concentration, in addition to inhibition of pathogenic bacteria such as E. coli and Salmonella, as well as antibiotic resistance. Therefore, isolates A and B could later be used as probiotics in the ruminants' feed.

Cite this article: Ahrari, A., Yosefelahi, M., Sanjabi, M.R., Mojgani, N., Vafaei Valeh, M., Ben Salem, A. (2022). Isolation, Identification and Selection of Lactic Acid Bacteria from the Digestive System of Sistani Cattle for Probiotic Production. *Journal of Ruminant Research*, 10 (1), 119-132.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejrr.2022.19800.1828
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

جداسازی، شناسایی و انتخاب باکتری‌های اسید لاکتیک دستگاه گوارش گاوهای سیستانی جهت تولید پروبیوتیک

افسانه احراری[۱]، مصطفی یوسف الهی[۲*]، محمدرضا سنجابی[۳]، ناهید مژگانی[٤]، مهدی وفای‌واله[٥]، عبدالفتاح بن سالم[٦]

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران، رایانامه: m_yousefelahi@uoz.ac.ir
۳. دانشیار گروه دام، طیور و آبزیان، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
٤. استاد موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران
٥. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
٦. استاد دانشگاه ملی اتونوس مکزیک

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۱۰/۱۳
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۰/۱۱/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۱/۲۵

واژه‌های کلیدی:
باکتری‌های اسید لاکتیک
پروبیوتیک
گاو سیستانی

چکیده

سابقه و هدف: شکمبه گاو محل نگهداری بسیاری از باکتری‌ها است که مسئول تبدیل مواد غذایی به انرژی هستند. در سال‌های اخیر بسیاری از میکروب‌های شکمبه با استفاده از توالی یابی ژن 16sRNA شناسایی و جداسازی شده‌اند. بعضی از میکروب‌ها به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی برای پیشرفت رشد و تولید حیوانات پیشنهاد می‌شوند. استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان افزودنی خوراک سبب تعادل مطلوب میکروفلور روده میزبان می‌شود. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق جداسازی، شناسایی و انتخاب باکتری‌های اسیدلاکتیک برای تولید پروبیوتیک از شکمبه و مدفوع گاوهای سیستانی است.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش از شکمبه ۱۲ رأس و مدفوع ٤ رأس گاو سیستانی در کشتارگاه صنعتی شهرستان زابل نمونه گرفته شد. نمونه‌های اخذ شده به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت MRS مایع منتقل و به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از رشد از محیط مذکور بر روی پلیت‌های حاوی محیط MRS[1] آگار کشت خطی انجام شد و پلیت‌ها به مدت ٤۸ ساعت در شرایط هوازی در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پرگنه‌های ظاهرشده از نظر خصوصیات رشد و مورفولوژی و همچنین، خلوص مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌های گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز منفی کروی و میله‌ای شکل که همولیز بتا ایجاد نکردند، برای انجام آزمایشات ضد میکروبی، تحمل به اسید، نمک صفراوی و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از تعداد اولیه ۱۵۸جدایه باکتری اسید لاکتیک ۸٤ جدایه جهت انجام فعالیت ضدمیکروبی علیه چهار گونه باکتری سالمونلا و یک گونه باکتری (*Escherichia.coli* (E Coli مورد بررسی قرار گرفتند. سپس جدایه‌های حاصل از آزمون ضدمیکروبی جهت انجام آزمایش مقاومت به pH بررسی شدند. تعداد ۱۳ نمونه منتخب از این آزمایش جهت انجام آزمون مقاومت به صفرا مورد مطالعه قرار گرفتند که از این

1. de Man Rogosa & Sharpe

تعداد پنج جدایه جهت انجام آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفت و به‌منظور آزمایش ژنتیکی و مولکولی وارد مرحله نهایی شد. آنچه از آزمون مولکولی و توالی ژنتیکی 16sRNA به دست آمد، تنها دو جدایه بود که بعد از توالی یابی و استفاده از نرم‌افزار NCBI قرابت ژنتیکی بالایی با دو باکتری *Streptococcus infantarius* (جدایه A) و *Enterococcus faecium* (جدایه B) داشت. این دو جدایه به‌عنوان پروبیوتیک بالقوه در گاوهای سیستانی مشاهده شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج کلی تحقیق نشان داد جدایه‌های A و B ویژگی‌های مناسبی برای استفاده به‌عنوان پروبیوتیک دارند. این ویژگی‌ها شامل نرخ زنده‌مانی بالا در شرایط pH پایین و غلظت ۳ درصد صفرا و همچنین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عدم رشد در مواجهه با باکتری‌های بیماری‌زایی همچون (*E.Coli*) *Escherichi.coli* و *Salmonella* است. بنابراین، از جدایه‌های A و B به‌عنوان پروبیوتیک در خوراک نشخوارکنندگان می‌توان استفاده نمود.

استناد: احراری، الف.، یوسف الهی، م.، سنجابی، م.ر.، مژگانی ن.، وفای واله، م.، بن سالم، ع.ف. (۱٤۰۱). جداسازی، شناسایی و انتخاب باکتری‌های اسیدلاکتیک دستگاه گوارش گاوهای سیستانی جهت تولید پروبیوتیک. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۰ (۱)، ۱۱۹-۱۳۲.

DOI: 10.22069/ejrr.2022.19800.1828

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

میکروب‌های شکمبه با محدودیت‌های مختلف اعم از محدودیت‌های طبیعی (چون چربی) و فاکتورهای ضد تغذیه‌ای برخی از خوراک‌ها (مثل تانن و ساپونین) مواجه‌اند. بنابراین، میکروب‌هایی که در شکمبه پرورش می یابند، منحصربه فرد هستند، لذا به منظور فهم بهتر محیط شکمبه، تشخیص و خصوصیت میکروب‌ها ضروری است (۱).

آنتی بیوتیک‌ها اولین افزودنی های خوراک به‌منظور حفاظت حیوانات علیه عفونت و همچنین، تحریک رشد آن ها هستند که منجر به استفاده وسیع آن‌ها به‌عنوان افزودنی خوراک شده است. آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل ایجاد مقاومت و حساسیتی که در انسان به وجود می‌آورند، نگران کننده هستند. به دلیل ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در انسان و حیوان، استفاده از آنتی بیوتیک ها در خوراک حیوانات از سال ۱۹۹۰ کاهش یافت و مصرف آن در ژانویه ۲۰۰۶ در کشورهای اتحادیه اروپا به طورکلی ممنوع شد (۲). جهت غلبه بر این مشکل، محققین توجه خود را به یافتن مکمل‌هایی متمرکز نمودند که علاوه بر حفظ ویژگی‌های مطلوب فاقد تبعات سوء بهداشتی و زیست محیطی باشند. بنابراین، استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان افزودنی خوراکی مطرح گردیده است تا با تحریک اثرات مثبت بر میزبان توسط ایجاد تعادل مطلوب میکروفلور روده، اثر خود را القاء نماید. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که می‌توانند در طول دستگاه گوارش عبور کرده و زنده بمانند و اثرات سودمندی در میزبان چه انسان (۳) و چه حیوان (٤) داشته باشند که این کار را از طریق بهبود سیستم هضم و جذب انجام می‌دهند (۵). پروبیوتیک ها می توانند با کمک به توازن میکروبی شکمبه، سبب دفاع طبیعی حیوانات در برابر باکتری های بیماری‌زا شوند. اثرات مثبت پروبیوتیک ها بر فراسنجه‌های عملکرد و سلامتی حیوانات را می توان به نقش آن‌ها به‌عنوان مهارکننده‌های رشد میکروفلور نامطلوب روده نسبت داد. به طوری‌که باکتری‌های پروبیوتیک یافت شده روی غشای مخاطی مجاری گوارشی، اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و باکتربوسین تولید نموده که به‌عنوان کنترل‌کننده پاتوژن هایی نظیر *Escherichi.coli* و *Salmonella* که عوامل اصلی ایجاد اسهال گوساله طی هفته های اول زندگی می باشد؛ عمل می نماید (٦). در انتخاب سویه های میکروبی برای استفاده به‌عنوان پروبیوتیک، معیارهای زیادی باید مورد توجه قرار بگیرد که شامل جنبه های ایمنی زیستی، جنبه های تولید و فرآوری، روش تجویز پروبیوتیک، موقعیت آن در بدن، زنده مانی یا کلونی شدن در میزبان و تحمل به اسید و صفرا است. نتایج مرتبط با مصرف پروبیوتیک ها در گوساله های جوان غیر قاطع و نامشخص است. بااین‌وجود بسیاری از محققان تأثیرات مثبت پروبیوتیک را بر رشد حیوانات گزارش نموده‌اند (۷ و ۸). بیشتر پروبیوتیک ها شامل باکتری های اسیدلاکتیک هستند که مقاوم به اسید و نمک صفراوی می‌باشند. این گروه از باکتری ها شامل گونه های مختلف *لاکتوباسیلوس ها*، *بیفیدوباکتریوم*، *استرپتوکوکوس و انتروکوکوس‌ها* هستند (۹). لذا هدف این مقاله جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک از گاو سیستانی و ارزیابی توان پروبیوتیکی سویه های جدا شده و استفاده از آن به‌عنوان پروبیوتیک در خوراک حیوانات در جانشینی با آنتی‌بیوتیک است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و جداسازی نمونه‌های باکتری اسیدلاکتیک: تعداد ۱۱٦ نمونه تازه از شکمبه ۱۲ گاو و ٤۲ نمونه از مدفوع ٤ رأس گاو سیستانی در کشتارگاه شهرستان زابل جمع‌آوری شد و در

بطری های پلاستیکی در شرایط هوازی و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. نمونه های مایع شکمبه بعد از صاف شدن از کاغذ صافی در لوله‌های دربسته نگهداری شد. نمونه های اخذ شده به لوله های آزمایش حاوی محیط کشت MRS مایع منتقل و به‌مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از رشد از محیط مذکور بر روی پلیت‌های حاوی محیط MRS آگار کشت خطی انجام شد و پلیت‌ها به مدت ٤٨ ساعت در شرایط هوازی در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پرگنه‌های ظاهر شده از نظر خصوصیات رشد، مورفولوژی و همچنین، خلوص مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ٨٤ باکتری خالص که همگی گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز منفی کروی شکل و فاقد همولیز بتا بودند، برای انجام آزمایش‌های ارزیابی توان مهار رشد به لوله‌های حاوی محیط MRS آگار نیمه جامد منتقل و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این کشت‌ها به صورت ادواری تجدید شدند. سپس این نمونه‌های خالص جهت انجام آزمایش‌های بعدی در میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری با گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند (۱۰).

الف) رنگ آمیزی گرم: به منظور شناسایی مقدماتی ازنظر تعلق به گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک، از کلنی‌های تک به‌دست‌آمده، برای مشاهدهٔ میکروسکوپی نمونه گرفته شد. این نمونه‌ها پس از انتقال بر روی لام میکروسکوپ و تهیهٔ گسترش به کمک محلول فسفات بافر سالین (PBS)، بر روی شعله تثبیت شدند و با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی گشته و در زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ٤٠x و ١٠٠x برابر بررسی شدند. باکتری‌های گرم مثبت که به رنگ بنفش قابل مشاهده بودند برای انجام آزمایش‌های دیگر انتخاب شده و شکل آنها ازنظر کروی، میله‌ای یا کوکوباسیل بودن مشخص شد (۱۱ و ۱۲).

ب) آزمون کاتالاز: با کمک لوپ پلاتین استریل شده با شعله مقداری از یک کلنی از باکتری‌های گرم مثبت انتخاب شده از آزمون رنگ‌آمیزی گرم، به سطح یک لام میکروسکوپ تمیز منتقل شد و بر روی آن یک قطره آب اکسیژنه ۳ درصد ریخته شد. در باکتری‌های کاتالاز مثبت واکنش رها شدن اکسیژن در اثر فعالیت آنزیم کاتالاز به‌صورت حباب‌های جوشان مشاهده می‌شود. در باکتری‌های کاتالاز منفی هیچ واکنشی رخ نداد (۱۲ و ۱۱).

ج) رنگ‌آمیزی اندوسپور: برای تعیین وجود اندوسپور در باکتری‌های جدا شده، از رنگ آمیزی اندوسپور (مالاشیت گرین) و جستجوی اندوسپور در گسترش استفاده شد. به این منظور گسترش‌های میکروسکوپی بر روی لام تهیه شد. لام‌ها بر روی ظرف دارای آب در حال جوش قرار داده شد و گسترش با قطعه‌ای از دستمال کاغذی پوشانده و با محلول مالاشیت گرین ۵ درصد آبی اشباع شد. حرارت به‌مدت ۵ دقیقه ادامه یافته و به آرامی با آب شسته شد. به‌مدت ۳۰ ثانیه با رنگ سفرانین رنگ‌آمیزی تباینی انجام و سپس لام شستشو و خشک شد. سپس زیر میکروسکوپ با درشت نمایی ١٠٠x جستجوی اندوسپورهای سبز رنگ انجام گردید (۱۲).

بررسی خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌ها: ٨٤ جدایه باکتری اسیدلاکتیک جهت ارزیابی خواص پروبیوتیکی از جمله فعالیت ضد میکروبی، تحمل به اسید، نمک‌های صفرا و حساسیت آنتی‌بیوتیکی انتخاب شدند.

آزمون فعالیت ضدمیکروبی: در این تحقیق اثرات ضد میکروبی باکتری اسیدلاکتیک جدا شده از دستگاه گوارش با چهار سروتیپ *سالمونلا* (۱۷۳۰، ۱۷٤۰، ۱٦۲۱ و ۱٦٤۸) و یک سروتیپ *ای کولای*

موردبررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است سروتیپ‌ها از گنجینه میکروبی بخش میکروب‌شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شدند. تکثیر و نگهداری باکتری‌های *ای کولای* و *سالمونلا* در محیط آبگوشت انفوزیون مغز و قلب و آبگوشت مغذی انجام گرفت (۱۳).

توان ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک به روش نفوذ در چاهک آگار: ابتدا باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده به‌صورت بی‌هوازی در محیط MRS مایع به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. با سانتریفیوژ کردن کشت‌ها در ٦٥۰ دور به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سلول‌های باکتریایی حذف شدند. استریل کردن مایع رویی کشت به کمک پالایه با منافذ ۰/۲۲ میکرون انجام شد. مایع به‌دست‌آمده در همان روز به کار برده شد. پلیت‌های حاوی ۲۰ سی‌سی آگار مغذی جامد با ۱۰ میلی‌لیتر آگار مغذی نرم که پیش‌تر با ۵۰ میکرون کشت شبانه از باکتری‌های شاخص (*سالمونلا و ای کولای*) تلقیح شده بود، پوشش داده شد. سپس با استفاده از یک لوله فلزی چوب‌پنبه سوراخ کن به قطر ٦ میلی‌متر در مجاورت شعله ۵ حفره روی پلیت ایجاد شد. در داخل هر یک از حفرات مایع رویی کشت شبانه استریل یکی از باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده (تولیدکننده) به مقدار ۵۰ میکرون ریخته شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی در گرمخانه نگه‌داری شد. در صورت ایجاد هاله شفاف عدم رشد در اطراف چاهک قطر آن با کولیس اندازه‌گیری شد (۱٤).

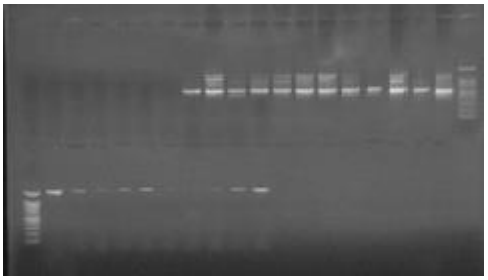
آزمون تحمل اسید: تعداد ۸٤ جدایه به‌دست‌آمده از آزمون ضد میکروبی، جهت آزمون تحمل به اسید استفاده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی (۸/۹ تا ۹/۱ log cfu/ml) وارد ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین شد. یک سری آزمایشی سالین با مقادیر pH ۲، ۳ و ۵ (با استفاده از HCl ۸ مولار) تنظیم شدند. از pH ۵ به‌عنوان شاهد استفاده شد. لوله‌ها در ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شده و ارگانیسم‌های زنده پس از ۰، ۲/۵ و ٤ ساعت بر روی آگار MRS (pH =۵/٦) به‌مدت ٤۸ ساعت در ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه و شمارش شدند (۱۵ و ۱٦).

اثر نمک‌های صفرا: تعداد ۱۳ جدایه مقاوم به شرایط اسید جهت مطالعهٔ اثرات نمک‌های صفرای با روش شیهاتا و همکاران ۲۰۱٦ مورد آزمایش قرار گرفتند (۱۷). مقدار ۰/۳گرم نمک صفراوی در ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت MRS براث اضافه شد. سپس محلول حاصل با ۳٤۰۰ دور در ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و دو بار شستشو شد. بعد از ۰، ٤، ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد تعداد باکتری‌های زنده بر روی آگار MRS (pH =۵/٦) شمارش شد (۱۸).

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: پنج جدایه باکتری اسیدلاکتیک انتخاب شده (مقاوم به اسید و صفرا) برای آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک (۱۹) با استفاده از محیط کشت MRS آگار انتخاب شدند. شش آنتی‌بیوتیک در این روش از گروه‌های مختلف استفاده شد. ۱- گروه Lactam: بازدارنده سنتز دیواره سلولی شامل پنی‌سیلین، ۲- گروه باکتری‌های گرم مثبت: اریترومایسین، وانکومایسین ۳- گروه باکتری‌های وسیع الطیف: تتراسایکلین ٤- گروه بازدارنده پروتئین: جنتامایسین و استرپتومایسین. هر جدایه باکتری اسیدلاکتیک در MRS مایع در دمای ۳۹ درجه به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. محلول کشت داده شده با استفاده از سوآپ استریل روی پلیت ریخته شد و در سه پلیت حاوی MRS آگار سوآپ شد. دیسک‌های استاندارد عوامل آنتی‌بیوتیکی بر روی پلیت‌ها قرار گرفت و به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۹ درجه

گرمخانه‌گذاری شد. قطر مناطق بازدارنده آنتی‌بیوتیک با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد. همه آنتی‌بیوتیک‌ها دو بار چک شدند.

شناسایی جدایه‌های اسیدلاکتیک به روش توالی‌یابی ژن 16sRNA: ویژگی ژنتیکی جدایه‌های اسیدلاکتیک تشکیل شده از واکنش PCR برای ژن 16sRNA با استفاده از پرایمر جهانی 27 F و 1429 R راه اندازی شد. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به قرار زیر بود: شرایط دمایی واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد ٤٥ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ٤٥ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱/۵ دقیقه، در پایان یک بسط انتهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصول PCR سپس در یک ژل اگارز ۱٪ دیده شد (شکل ۱). پس از گذشت زمان لازم، ژل آگارز از تانک الکتروفورز خارج و تحت اشعه فرابنفش در دستگاه تصویربرداری از آن عکس‌برداری شد. محصول خالص شده PCR برای توالی یابی فرستاده شد. توالی مورد پژوهش در دیتابیس NCBI BLAST قرار گرفت.



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR

Figure 1- Electrophoresis gel PCR product

نتایج و بحث

باکتری‌های اسیدلاکتیک در میان اعضای میکروفلورای طبیعی بخش‌های هضمی بسیاری از گونه‌ها شامل انسان‌های اولیه و حیوانات، به‌عنوان باکتری‌ها با توان پروبیوتیکی انتخاب می‌شوند. باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده ابتدا بر اساس خصوصیات فنوتیپی و به‌طور دقیق‌تر با روش مولکولی شناسایی و غربال شدند.

بررسی خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌ها

آزمایش ضدمیکروبی: جدایه‌های خالص جهت آزمون فعالیت ضدمیکروبی که شامل پاتوژن‌های *Escherichi.coli* و *Salmonella* بود، مورد ارزیابی قرار گرفت. بازدارندگی باکتری‌های بیماری‌زا توسط اندازه‌گیری قطر منطقه بازدارنده (منطقه روشن) بررسی شد. نتایج نشان داد ۸٤ جدایه از ۱۵۸ جدایه خالص اولیه می‌توانند از رشد باکتری‌های *ای کولای* و *سالمونلا* جلوگیری کنند (جدول ۱). این نتایج با نتایج گزارش شده توسط اویارزابال و کنر (۱۹۹۵) که نشان دادند باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌تواند رشد باکتری‌های *ای کولای* و *سالمونلا* را محدود کند، مطابقت داشت (۲۰).

باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند عوامل ضد میکروبی تولید کند که سبب فعالیت ضد میکروبی علیه بیشتر میکروارگانیسم‌های پاتوژن و فاسد شود. باکتری‌های اسیدلاکتیک بعضی مواد بازدارنده رشد ازجمله اسیدهای آلی، اسیدلاکتیک، پراکسید هیدروژن، باکتریوسین، اتانول، دی استیل استالدهید، دی اکسید کربن و روترین تولید می‌کنند (۲۱) اسیدهای آلی تولیدشده از باکتری‌های اسیدلاکتیک منجر به کاهش سطح pH و افزایش تولید پراکسید هیدروژن می‌شود (۲۲). این تولیدات سبب ایجاد مقاومت ضد باکتری علیه پاتوژن‌های مختلف (شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی) می‌شوند (۲۳). یکی از معیارهای مهم WHO/FAO برای انتخاب ارگانیسم به‌عنوان پروبیوتیک توانایی‌شان برای بروز فعالیت آنتی‌میکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن می‌باشد (۲٤). نتایج نشان داد جدایه‌های A (*Streptococcus infantarius*) و B (*Enterococcus faecium*) بیشترین اثر ممانعت کنندگی را داشتند. این نتایج با

نتایج اویارزابال و کنر (۱۹۹۵) مطابقت داشت (۲۰). باکتری *انتروکوکوس فاشیوم* با مکانیسم افزایش عملکرد متابولیکی (۲۵) و جلوگیری از باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش اثر مفیدی بر سلامت میزبان دارد (۲۶ و ۲۷).

جدول ۱- آزمایش حساسیت ضد میکروبی جدایه‌های شکمبه و مدفوع گاو سیستانی

Table 1- Antimicrobial susceptibility testing of ruminal and fecal isolates of Sistani cattle

نمونه جداشده Isolated sample	تعداد جدایه‌ها Number of isolates	سویه *E. coli* *E.coli*	سویه‌های بیماری‌زای سالمونلا Pathogenic strains of Salmonella			
شکمبه Rumen			1730	1740	1648	1621
1	5	11.5	12.4	12.2	11.6	12.6*
2	4	13.25	11.5	11.0	12.5	13.0
3	6	15.6	16.0	13.8	14.6	16.3
4	5	13.6	13.2	10.8	11.0	12.6
5	10	12.8	14.8	11.6	12.5	13.4
6	7	12.3	12.6	11.5	10.8	12.0
7	7	12.4	12.7	11.7	10.8	11.5
8	6	12.1	12.1	11.1	10.6	10.5
9	9	11.3	13.1	12.1	10.4	11.7
10	7	13.8	14.1	11.7	11.0	11.2
11	6	13.1	12.3	11.1	13.8	13.6
12	7	10.8	11.0	10.8	8.5	10.5
مدفوع Feces						
M-1	7	11.7	11.4	13.8	10.1	12.1
M-3	4	12.0	13.2	13.7	11.7	13.2
M-7	5	11.8	14.8	12.0	12.8	14.4
M-8	3	12.6	14.3	13.3	11.6	14.0
جمع Sum	84					

*Numbers in millimeters

*اعداد برحسب میلی‌متر.

آزمون تحمل به اسید: مقاومت به pH و صفرا پیش‌نیاز پروبیوتیک‌ها برای زنده ماندن و رشد در دستگاه گوارش است (۱۶). سطح pH شیرابه گوارشی بسته به زمان تغذیه، مرحله رشد و نوع حیوان بین ۱/۵ تا ۳/۵ تغییر می‌کند (۲۸). شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک زنده مانده در مخلوط باکتری‌ها نشان می‌دهد باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بعد از یک ساعت انکوباسیون در pH ۲/۶ چینه‌دان طیور و pH ۳/۲ شیرابه گورشی خوک تغییر می‌کند (۲۹). تعداد ۸۴ جدای برای تحمل اسید در pHهای ۲، ۳ و ۵ در مدت‌زمان‌های ۰، ۲/۵ و ٤ ساعت بعد از انکوباسیون آزمایش شدند. pH ۵ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد ۱۵ درصد جدایه‌ها شرایط اسیدی فوق را تحمل کردند (جدول ۲). آزمون تحمل اسید به شکل شبیه‌سازی شرایط شکمبه حیوان انجام شد. به‌طوری‌که pH طبیعی معده حیوان ۰/۹ است که بعد از دریافت خوراک به ۳ می‌رسد. بنابراین، باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده اگر مقاوم به شرایط اسیدی نباشند، می‌میرند (۳۰).

جدول ۲- آزمون تحمل به اسید (رقت 10^{-3})

Table 2- Acid tolerance test (dilution 10^{-3})

pH=2 T=4h	pH=3 T=2.5h	pH=5 T=0h	تعداد جدایه‌ها Number of isolates	نمونه جدا شده Isolated sample
				شکمبه Rumen
365.0*	575.0	735.0	1	1
7.0	99.75	572.5	1	4
184.93	213.31	250.5	4	5
38.95	145.62	862.5	2	6
269.0	322.5	336.5	1	10
8.0	10.25	25.5	2	12
				مدفوع Feces
17.5	25.0	75.5	1	M-1
32.5	257.5	390.0	1	M-7
			13	جمع Sum

*تعداد کلونی باکتری اسید لاکتیک زنده بر میلی‌متر محیط کشت

Number of live lactic acid bacteria per millimeter of culture medium

با عبور باکتری‌ها از معده (جایی که سطح pH به زیر ۱/۵ تا ۳ می‌رسد) (۳۱)، و پیش از رسیدن به بخش‌های روده‌ای در مدت تقریباً ٤ ساعت، اغلب باکتری‌های پروبیوتیکی زنده می‌مانند (۲۰). ویلر و نولر (۱۹۹۷) گزارش کردند دامنه pH در حیواناتی که با نشاسته تغذیه می‌شوند در بخش‌های گوارشی ٦/۲- ۲/۵ است (۲۹). به‌طوری‌که pH شکمبه ۲/۵±۵/۸، شیردان ۱/٤±۲/۵، روده کوچک و رکتوم ۱/۷± ٦/۲ می‌باشد. ظرفیت تحمل به pH پایین بستگی به ویژگی‌های دیواره سلولی دارد (۱۰ و ١٤). دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت ضخیم‌تر از باکتری‌های گرم منفی است که شامل پپتیدوگلیکان، اسید تیکونیک و اسید کلونیک است (۱۵). پپتیدوگلیکان ساختار پلیمری دی ساکاریدی پنتوپپتیدی هستند که شامل دو قند ان- استیل گوکز آمین (NAG) و ان- استیل مورامیک اسید (NAM) و چهار گروه آمینواسیدی پیوند شده با این قندها توسط یک باند پپتیدی می‌باشند. همچنین، تحمل باکتری‌ها به اسید بستگی به فعالیت آنزیم ATPase (کنترل کننده انتقال پروتون از دیواره سلول)، نوع محیط کشت و شرایط کشت را دارد (۳۲ و ۳۳). باکتری‌های پروبیوتیکی باید قبل از رسیدن به روده کوچک (جایی که pH به زیر ۱/۵ تا ۲ می‌رسد) (۳۱). در حین انتقال از شکمبه تا ٤ ساعت یا بیشتر توان زنده‌مانی داشته باشند (۲۹). نتایج تحمل به اسید نشان می‌دهد وقتی pH ۳ به مقدار ۱ و ۲ می‌رسد (٣٤)، همه ایزوله‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌تواند تحمل زیادی داشته باشد. کاهش درصد بقا باگذشت زمان مشاهده می‌شود، این نتایج با نتایج گزارش شده توسط اوهند و همکاران، ۱۹۹۹ همخوانی داشت (٣٤).

آزمون تحمل به صفرا: چون پروبیوتیک‌ها معمولاً به‌صورت دهانی تجویز می‌شوند، باید توانایی زنده‌مانی حین عبور از شکمبه و روده کوچک را داشته باشند. بنابراین، مقاومت به pH پایین شیرابه هضمی در شکمبه و نمک صفراوی در روده کوچک معیار مهم انتخاب پروبیوتیک هاست (٣٤). مقاومت به نمک‌های صفراوی پیش‌نیاز کلونی شدن و فعالیت متابولیکی باکتری در روده کوچک میزبان است (۳۵). این امر کمک خواهد کرد که لاکتوباسیل ها و لاکتوکوکسی‌ها به آسانی به روده کوچک رسیده و

تشکیل کلنی دهند و سبب تعادل میکروفلورای روده‌ای گردند (۲۱). میانگین غلظت صفرا حدود ۰/۳ درصد می‌باشد که ممکن است در طول اولین ساعات هضم به ۲ درصد نیز برسد (۳). در این مطالعه تحمل صفرا در سویه‌ها، مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). ۳۸ درصد سویه‌ها مقاومت صفراوی را در غلظت ۰/۳ درصد بعد از گذشت ٢٤ ساعت انکوباسیون نشان دادند. درهرحال در غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد تفاوت در توان زنده مانی سویه‌های آزمون شده وجود دارد و همچنین، غلظت ۰/۳ درصد معیار غلظت نمک‌های صفراوی جهت غربال سویه‌های مقاوم بود که مطابق با گزارش‌ها (١٦ و ٣٦) می‌باشد. مقاومت به نمک‌های صفراوی در سویه‌های مختلف و حتی بین گونه‌ها متفاوت است (۳۷). مقاومت صفرا در بعضی سویه‌ها بستگی به آنزیم BSH (آنزیم هیدرولیز کننده نمک‌های صفراوی) دارد که سبب هیدرولیز نمک‌های صفراوی کونژوگه و کاهش هیدرولیز سمیت نمک‌های صفراوی فعال می‌شود.

جدول ۳- آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی در جدایه‌های شکمبه و مدفوع گاو سیستانی

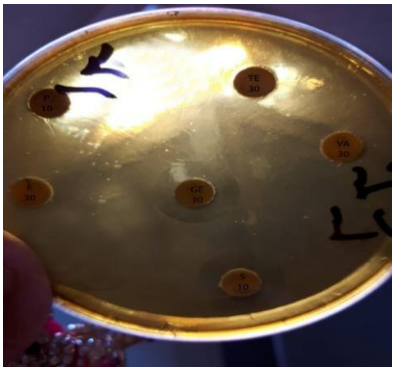
Table 3- Bile salt resistance test in ruminal and fecal isolates of Sistani cattle

نمونه جدا شده Isolated sample	تعداد جدایه ها Number of isolates	زمان انکوباسیون Incubation time				
		0	4	8	12	24
شکمبه Rumen						
1	1	832.0*	725.5	712.0	620.3	540.5
6	2	1321.0	1000.0	951.5	920.0	800.5
10	1	723.5	698.0	620.2	500.0	480.0
مدفوع Feces						
M-7	1	923.0	834.0	800.5	722.0	682.5
جمع Sum	5					

*تعداد کلونی باکتری زنده در هر میلیمتر محیط کشت

Number of live bacterial colonies per millimeter of culture medium

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از روش انتشار دیسک در جدول ٤ نشان داده شد. این نتایج بیان کرد جدایه A مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اریترومایسین، تتراسایکلین و جدایه B حساس به استرپتومایسین و جنتامایسین بودند (شکل ۲). این نتایج با نتایج ماسی کاسانگ (۲۰۰۸) موافق بود که نشان داد بیشتر باکتری‌های اسیدلاکتیک مقاوم به پنی‌سیلین، تتراسایکلین و اریترومایسین بودند (۷). جدایه‌های باکتری اسیدلاکتیک از مدفوع جوجه‌های بومی همچنین مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مثل کانامایسین و استرپتومایسین (گروه آمینوگلوکوسید) بودند (۳۸). این ویژگی طبیعی باکتری‌های اسیدلاکتیک است که مقاومت ذاتی و اکتسابی داشته باشند (۳۹). درهرحال هیچ گزارشی مبنی بر انتقال ژن از باکتری‌های اسیدلاکتیک مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به میکروفلورا در بخش‌های گوارشی وجود ندارد (٤٠).



شکل ۲: حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه

Figure 2- Antibiotic sensitivity

جدول ٤- آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بدست آمده از شکمبه و مدفوع گاو سیستانی

Table 4- Antibiotic susceptibility test of isolates obtained from rumen and feces of Sistani cow

M-7	10	6	1	نام آنتی‌بیوتیک Antibiotic name	
R	R	R	R	Penicillin	پنی‌سیلین
R	R	R	R	Tetracycline	تتراسایکلین
R	R	R	R	Erythromycin	اریترومایسین
R	S	S	S	Vancomycin	ونکومایسین
S	R	R	R	Streptomycin	استرپتومایسین
S	R	R	R	Gentamycin	جنتامایسین

مقاوم:R حساس:S

R: Resistant – S: Sensitive

شناسایی جدایه‌های اسیدلاکتیک به روش توالی‌یابی ژن 16sRNA: توالی یابی 16sRNA جدایه‌های A و B است که قرابت فامیلی زیادی به *Streptococcus infantarius* و *Enterococcus faecium* دارند. این گونه‌ها در اتحادیه اروپا به‌عنوان پروبیوتیک گزارش‌شده است (۱).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد پس از انجام آزمایش‌های توان پروبیوتیک و آزمایش ژنتیکی و مولکولی، جدایه‌های A و B (به ترتیب باکتری‌های *Streptococcus infantarius* و *Enterococcus faecium*) ویژگی‌های مناسبی برای استفاده به عنوان پروبیوتیک دارد. این ویژگی‌ها شامل نرخ زنده‌مانی بالا در شرایط pH پایین و غلظت ۰/۳٪ صفرا و جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا همچون *Escherichi.coli* و *Salmonella* و همچنین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. بنابراین، جدایه‌های A و B می‌تواند به‌عنوان پروبیوتیک در خوراک گاوها استفاده شود. اما نیازمند آزمایش‌های درون تنی می‌باشد.

منابع

1.Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R. and Martinez, M.A. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. Regulatory Toxicology Pharmacology, 45: 91-95.

2.Castanon, J.I.R. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. Poultry Science, 86: 2466-2471.

3.Goldin, B. and Gorbach, S. 1992. Probiotics for humans. Londron: Chapman and Hall, 355-376.

04.Gill, H.S., Shu, Q., Lin, H., Rutherfurd, K.J. and Cross, M.L. 2001. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. Medical Microbiology Immunology, 190: 97–104.

5.Chukeatirote, E. 2003. Potential use of probiotics. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 25: 275-282.

6.Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L.J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. Journal of Dairy Science. 67: 3045- 3051.

7.Musikasang, H. 2008. Screening of lactic acid bacteria as probiotics in chicken and enhancement of bacteria survival by microencapsulation. Master Thesis, Prince of Songkla University, Thailand.

8.Treagan, L. and Pulliam, L. 1982. Medical Microbiology Laboratory Procedures. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 233-243.
9.Gotcheva, V., Histozova, E., Hristozova, T., Guo, M., and Roshkova, Z. 2007. Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. Food Biotechnology, 16: 211-225.
10.Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, M.A., Ali, M.A. and Jalaludin, S. 1996. Adhesion of intestinal *Lactobacillus* isolates to intestinal epithelial cells of chicken. Letters in Applied Microbiology, 22:229-232.
11.Sornplang, P., 2009. Characterization of *Lactobacillus* from Thai native chicken gut and utilization in the diet to improve growth performance and cholesterol reduction in broilers. Ph.D. Thesis, Khon Kaen University, Thailand.
12.Shehata, M.G., El Sohaimy, S.A., El-Sahn, M.A. and Youssef, M.M. 2016. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. Food Science and Technology Department, 61: 65-75.
14.Maragkoudakis, P.A., Mountzouris, K.C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Canter, M.D. and Tsakalidou, E. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteridis*. International Journal of Food Microbiology, 3: 219-226.
15.Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378.
16.Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. Federation of European Microbiological Societies, 7: 175- 186.
17.Singleton, P. 1999. Bacteria in biology, biotechnology and medicine. 5th ed. John Wiley, UK.
18.Meyer, P.M., Vaz Pires, A., Bagaldo, A.R., Correira de Simas, J.M. and Susin, I. 2001. Addition of probiotic to whole milk or milk replacer and Holstein calves' performance. Scientia Agricology, 58: 215–221.
19.Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. 1997. Lactic Acid Bacteria. Caen Presses Universitaires de Canada. Wayne, Pa.
20.Oyarzabal, A.O. and Conner, D.E. 1995. *In vitro* fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Samonella spp*. by selected bacteria. Poultry Science, 74: 1418-1425.
21.Tambekar, D.H. and Bhutada, S.A. 2010. Studies on antimicrobial activity and characteristics of Bacteriocins produced by *Lactobacillus* strains isolated from milk of domestic animals. Internet Journal of Microbial, 8: 1-6.
22.Seeley, H.W. Jr. and VanDemark, P.J. 1981. Microbes in action. New Biological books, 39: 429-440.
23.Mathur, S. and Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. International Journal Food Microbiology, 105: 281-295.
24.Adeniyi, B.A., Adetoye, A. and Ayeni, F.A. 2015. Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. Africian Health Science, 15 (3):888-895.
25.Madureira, A.R., Pereira, C.I., Truszkowska, K., Gomes, A.M., Pintado, M.E. and Malcata, F.X. 2005. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. International of Dairy Journal, 15: 921-927.
26.Lozupone, C., Faust, K., Raes, J., Faith, J.J., Frank, D.N., Zaneveld, J., Gordon, J.I. and Knight, R. 2012. Identifying genomic and metabolic features that can underlie early successional and opportunistic lifestyles of human gut symbionts. Genome Research, 22: 1974–1984.
27.Canibe, N., Hojberg, O., Hojsgaard, S. and Jensen, B.B. 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. Journal of Animal Science, 83: 1287–1302.

28.Yu, B. and Tsen, H.Y. 1993. *Lactobacillus* cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution. Journal Applied Bacteriology, 75: 269-275.
29.Wheeler, W.E. and Noller, C.H. 1997. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. Journal of Animal Science, 44: 131-135.
30.Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, 55: 297-300.
31.Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Freeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G., Shanahan, F., Collins, J. 2001. *In vitro* selection criteria of probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. American Journal of Clinical Nutrition, 73: 386–392.
32.ISO-15214. 1998. Microbiology of food animal breeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of Mesophilic Lactic Acid Bacteria-colony count technique 15214.
33.Konstantinov, S.R., Favier, C.F., Zhu, W.Y., Williams, B.A., Klu_, J., Souffrant, W.-B., De Vos, W.M., Akkermans, A.D.L. and Smidt, H. 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. Animal Research, 53: 317–324.
33.Makras, L., and De Vuyst, L. 2006. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by *bifidobacteria* is caused by the production of organic acids. International of Dairy Journal, 16: 1049–1057.
34.Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt C. and Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 9: 43-52.
35.Hood, S.K. and Zotolla, E.A. 1998. Effect of low pH on viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. Journal of Food Science, 53:1514-1516.
36.Havenaar, R., Brink, B.T., Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotic use. Chapman and Hall, London, 209–224.
37.Wen Hsin, L., Bi Yu., Sheng Hon, H. and Hau Yang T. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. Journal Anaerobe, 107-113.
38.Suskovic, J., Blazenka, K., Jasna B., Andreja, L., Ksenija, H. and Srecko, M. 2010. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria, Food Technology of Biotechnology, 48 (3): 296–307.
39.Ammor, M.S., Florez, A.B. and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and Bifidobacteria. Food Microbiology, 24: 559-570.
40.Matijasic, B. and Rogelj, I. 2000. *Lactobacillus K7*: A new candidate for a probiotic strain. Food Technology and Biotechnology, 38(2): 113-119.