Animal Production Research

Vol. 12, No. 4, 2023 (37-49)
doi: 10.22124/AR.2024.24901.1775
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Evaluation of probiotic properties of predominant lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract and reproductive system of Ross 308 broiler breeders

Zh. Bohlool[1], S. R. Hashemi[2*], A. Sadeghi[3], S. M. Jafari[4], M. Heidari[5], J. Seifdavati[6]

1. Ph.D. Student, Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4. Professor, Department of Food Materials and Process Design Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
5. Associate Professor, Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
6. Professor, Department of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil, Iran

(Received: 07-07-2023 – Revised: 11-11-2023 – Accepted: 12-11-2023)

Introduction: Probiotic bacteria are Gram-positive and negative-catalase with various characteristics including resistance to acid and bile salt conditions, antimicrobial characteristics, bacitracin production, and lack of capability for transferring genes resistant to antibiotics. These bacteria are a part of selected and useful bacteria in the digestive system, which leads to reinforcement of the body's immune system if they are adequately consumed (10^6-10^7 CFU/g). This research aimed to identify molecular identification and assessment of probiotic characteristics of lactic acid bacteria (*LAB*) isolates separated from the digestive and reproduction system of Ross 308 broiler breeders.

Materials and methods: Twenty Ross 308 broiler breeders were selected and samples of the vagina and ileum of them, and the cecum and feces of roosters were taken to separate *LAB*. The Gram and catalase test was used to approve the biochemical characteristics of *LAB*. The suspension containing each *LAB* isolate was harvested at 4℃ for five min (10,000×g) to assess the survival of the selected *LAB* isolated under conditions simulating the GI tract. Then, remained sediment in the buffer solution containing HCL (1N) reached to pH equal to two by eliminating the supernatant. After adding 0.1 % (w/v) pepsin to bacterial suspension, it was stored at 37℃ for three hours. After incubation, the pH of suspension with NaCl (1N) was reached to six. Then, tolerance to small intestine condition was evaluated in PBS solution (pH=7), containing Oxgall (0.3% w/v) and pancreatin (0.1% w/v) of washed suspensions of the *LAB* was mixed and incubated at 37℃. Finally, the *LAB* isolate population was determined by consecutive dilution in sterile PBS and plate media on MRS agar compared to a blank sample (untreated). For molecular identification of dominant lactic acid bacteria, the DNA of the dominant lactic acid isolate was extracted by polymerase chain reaction (PCR) kit. Then, it was amplified using primers (44F; 1542 R) in temperature conditions. Afterward, for initial approval, PCR products were transferred to 1.5 % agarose gel and electrophoresis was performed in TBE buffer in the presence of positive control and negative control samples. The good diffusion method was used to determine the anti-bacterial effect of the selected *LAB* isolated against pathogenic factors. To assess auto-aggregation of the selected isolate, the cells obtained from its 24-hour culture were separated by refrigerated centrifugation (10 min, 4℃, 6000×g) and was dissolved in phosphate buffer during two phases (pH=7.2) so that the obtained suspension had absorption equal to $\mathrm{OD}\ 600 = 0 \cdot 108$. Then, the

* Corresponding author: hashemi711@yahoo.co.uk

CC BY

suspension was put at the temperature of 37℃ for four hours. Then, the absorption of *LAB* isolate suspension in 600 nm was read. A combination of an equal volume of *LAB* isolates suspension and pathogenic bacteria were vortexed and incubated at 37℃ for four hours to assess auto-aggregation of isolate. The surface part of the suspensions was read at 600 nm and calculated. About 200 µl of 24 h culture of selected *LAB* was added to four mL of 1 % MRS agar medium to evaluate the selected *LAB* isolated antibiotic susceptibility. This combination was overlaid on plates containing 1.5 mL of 1.5% MRS agar, and then, discs of antibiotics including Ampicillin, Gentamicin, Streptomycin, Cefazolin, Ciprofloxacin, Penicillin, Cephalothin, Imipenem, Novobiocin, Clindamycin, Vancomycin, Ceftriaxone, and Nalidixic acid was placed on each plate. After 24 h of incubation at 37℃, the diameter of the inhibition zone (mm) was measured and reported as resistant, relatively sensitive, and sensitive. To consider the capability of hemolysis of blood, *LAB* isolate was streaked on the surface of a blood agar plate supplemented with 5% sheep blood. After 48 h of incubation at 37℃, the plates were considered in terms of diameter inhibition zone creation and color change in the medium.

Results and discussion: The results of the sequencing test led to the identification of *Levilactobacillus brevis*. The predominant *LAB* isolated from the gastrointestinal tract (GIT) and reproductive tracts of Ross 308 broiler breeders and *L. brevis* isolated from the ileum (82.00%) (P<0.05) in the simulated conditions of the GIT compared to the *L. brevis* isolated from other parts GIT and the reproductive system had more survival than acid and bile. Examining the anti-bacterial effect of the aforementioned isolate showed that the *L. brevis* bacterium had an inhibitor influence *on Shigella dysentery* bacteria (87.00%) and *Staphylococcus aureus* (81.25%). In addition, the highest and the lowest characteristics of co-aggregation of this isolate were observed against *Listeria monocytogenes* (46.00%) and *Salmonella typhimurium* (38.00%). This isolate had 43% auto-aggregation characteristics and no hemolytic activity. Assessing antibiotic resistance of *LAB* isolate showed that the biggest diameter of inhibition zone of bacterium (23.5 mm) was related to Imipenem that had no significant difference with Ampicillin (22.5 mm) and Vancomycin (22.5 mm) and its lowest value (12 mm) was related to Ceftriaxone that had no significant difference with Gentamicin and Cephalotin. The results of this study showed that *L. brevis* bacterium can be used in the nutrition of broiler breeders as a probiotic bacterium.

Conclusions: The use of probiotics in the feeding of Ross 308 broiler breeders may eliminate the public health concerns of antimicrobial resistance development to some extent, as this could replace the use of antibiotics. According to antimicrobial characteristics, antibiotic resistance, hemolytic activity, auto-aggregation, and co-aggregation of predominant *LAB* isolate, it can be concluded that *L. brevis* can be useful and applicable as a probiotic supplement in producing food and pharmaceutical products for broiler breeders.

Keywords: Probiotic, Lactic acid bacteria isolate, *Lactobacillus*, Broiler breeder

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

How to cite this article:

Bohlool, Zh., Hashemi, S. R., Sadeghi, A., Jafari, S. M., Heidari, M., & Seifdavati, J. (2023). Evaluation of probiotic properties of predominant lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract and reproductive system of Ross 308 broiler breeders. *Animal Production Research*, *12*(4), 37-49. doi: 10.22124/AR.2024.24901.1775

تحقیقات تولیدات دامی

سال دوازدهم/شماره چهارم/زمستان ۱۴۰۲ (۴۹-۳۷)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه لاکتیکی غالب دستگاه گوارش و تولیدمثل مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸

ژیلا بهلول[۱]، سید رضا هاشمی[۲*]، علیرضا صادقی[۳]، سید مهدی جعفری[۴]، محمود حیدری[۵]، جمال سیف دواتی[۶]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- استاد، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۵- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

۶- استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۶ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱)

چکیده

برای ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه لاکتیکی غالب دستگاه گوارش و تولیدمثل مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸، نمونه‌هایی از غده پوسته، واژن، ایلئوم، روده کور و مدفوع مرغ و خروس مادر گوشتی گرفته شد. آزمون‌های مختلف در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج آزمون توالی‌یابی منجر به شناسایی *لوی‌لاکتوباسیلوس برویس* به‌عنوان باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از دستگاه گوارش و تولیدمثل مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ شد و *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از ایلئوم (۸۲/۰۰ درصد) ($P<0/05$) در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش نسبت به *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از سایر قسمت‌های دستگاه گوارش و دستگاه تولیدمثل نسبت به اسید و صفرا زنده‌مانی بیشتری داشت. بررسی اثر ضد باکتریایی جدایه مذکور نشان داد که باکتری *لوی‌لاکتوباسیلوس برویس* بیشترین اثر مهارکنندگی را بر باکتری‌های *شیگلا دیسانتری* (۸۷/۰۰ درصد) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۸۱/۲۵ درصد) داشت. علاوه بر این، بیشترین و کمترین ویژگی دگر اتصالی این جدایه در برابر *لیستریا مونوسایتوژنز* (۴۶/۰۰ درصد) و *سالمونلا تیفی‌موریوم* (۳۸/۰۰ درصد) ($P<0/05$) مشاهده شد. این جدایه دارای ۴۳/۰۰ درصد خاصیت خود اتصالی و فاقد فعالیت همولیزی بود. ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه لاکتیکی نشان داد که بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد باکتری (۲۳/۵۰ میلی‌متر) مربوط به تیمار ایمیپنم بود که با تیمارهای *آمپی‌سیلین* (۲۲/۵۰ میلی‌متر) و *ونکومایسین* (۲۲/۵۰ میلی‌متر) ($P<0/05$) اختلاف نداشت و کمترین میزان آن (۱۲/۰۰ میلی‌متر) مربوط به تیمار *سفتریاکسون* بود که با تیمارهای *جنتامایسین* و *سفالوتین* اختلاف نداشت. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *لوی‌لاکتوباسیلوس برویس جدا شده از ایلئوم* قابلیت استفاده در تغذیه طیور به‌عنوان باکتری پروبیوتیک را دارد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، جدایه لاکتیکی، *لاکتوباسیلوس*، مرغ مادر گوشتی

* نویسندهٔ مسئول: hashemi711@yahoo.co.uk

doi: 10.22124/AR.2024.24901.1775

مقدمه

تعادل فلور میکروبی دستگاه گوارش، نقش مهمی در ساختار و ریخت‌شناسی روده، تقویت سیستم ایمنی، محافظت در برابر عوامل بیماری‌زای روده و هضم مواد غذایی دارد. در گذشته از آنتی‌بیوتیک‌ها برای رشد حیوانات و مدیریت فلور میکروبی روده استفاده می‌شد، ولی مقاومت آنتی‌بیوتیکی حاصله باعث تهدید سلامت انسان شد (Yousefi-Kelarikolaei *et al.,* 2013; Noohi *et al.,* 2021). با توجه به مشکلاتی که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دام و طیور ایجاده کرده است، استفاده از پروبیوتیک‌های جدا شده از حیوانات بومی می‌تواند جایگزین مناسبی برای آن‌ها باشد. لذا جداسازی، شناسایی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از دام و طیور بومی اهمیت دو چندانی می‌یابد. از سال ۲۰۰۶، اتحادیه اروپا مطالعه استفاده از پروبیوتیک‌ها را به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک آغاز نمود (Noohi *et al.,* 2021). باکتری‌های اسید لاکتیک، گرم مثبت و کاتالاز منفی بوده و دارای خصوصیات مختلف ازجمله مقاومت به شرایط اسیدی و صفراوی، خواص ضد میکروبی، تولید باکتریوسین و عدم قابلیت انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند (Goktepe *et al.,* 2005; Boirivant *et al.,* 2007; Kumar *et al.,* 2015). این باکتری‌ها بخشی از باکتری‌های غالب و مفید دستگاه گوارش بوده که در صورت مصرف به مقدار کافی (10^{7}CFU/g - 10^{6}) سبب تقویت سیستم ایمنی بدن مصرف‌کننده می‌شوند (Pourjafar *et al.,* 2020). معمولاً این باکتری‌ها در برخی مواد غذایی وجود داشته و یا به‌صورت مکمل‌های پروبیوتیک وارد دستگاه گوارش شده و در قسمت انتهایی روده کوچک و روده بزرگ مستقر می‌شوند. در غیر این صورت، همراه مدفوع خارج شده و آثار مفیدی از خود بر جای نمی‌گذارند. اتصال پروبیوتیک‌ها به مخاط روده به دلیل ممانعت از اتصال عوامل بیماری‌زا به روده حائز اهمیت است (Nikoskelainen, *et al,.* 2003). علاوه بر این، پروبیوتیک‌ها در روده، قندها را برای رشد خود و تولید ترکیبات سازنده اسیدهای چرب فرار استفاده می‌کنند. اسیدهای چرب فرار احتمالاً نقش مهمی در افزایش طول ریز پرزهای روده دارند (Pelicano *et al.,* 2005). نتایج پژوهش Bozkurt (2010) نشان داد که استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره مرغ‌های تخم‌گذار و مادر، تولید تخم‌مرغ را افزایش داد. پروبیوتیک‌ها با اتصال به دیواره روده از اتصال باکتری‌های بیماریزا به روده جلوگیری کرده و باعث افزایش ارتفاع پرزهای روده و بهبود کیفیت گوشت در قبل و بعد از انجماد شده (Lutful Kabir, 2009)، میزان و کیفیت تخم‌مرغ را افزایش داده، و بر آپوپتوز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارند (EL jein *et al.,* 2021). بنابراین، استفاده از پروبیوتیک‌های جداسازی شده از طیور می‌تواند در بهبود زنجیره غذایی انسان و دام و همچنین افزایش تولیدات حیوانات مفید و موثر واقع شود و به‌عنوان مکمل پروبیوتیکی طیور استفاده شود. این مکمل‌های پروبیوتیکی می‌توانند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را در طیور کاهش داده و با افزایش عملکرد رشد و بهبود سیستم ایمنی از بروز بیماری‌های مختلف جلوگیری کنند. هدف از این پژوهش، شناسایی مولکولی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی غالب جدا شده از دستگاه گوارش و تولیدمثل مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ بود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه و کشت میکروبی: در این پژوهش از ۲۰ مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ مزرعه گرگان جوجه گلستان استفاده شد. کشت‌های لیوفیلیزه باکتری‌های بیماریزا نظیر *اشیرشیا کلی* (PTCC ۱۳۹۹)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC ۱۱۱۲)، *لیستریا مونوسایتوژنز* (PTCC ۱۲۹۸)، *سودوموناس ایروژینوزا* (PTCC ۱۹۵۰)، *سالمونلا تیفی-موریوم* (PTCC ۱۰۹۳) و *شیگلا دیسانتری* (PTCC ۱۹۴۷) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST, Iran) تهیه شد. مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک: جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک، ابتدا نمونه‌هایی از غده پوسته، واژن مرغ مادر گوشتی و ایلئوم، روده کور و مدفوع خروس گرفته شد. سپس از نمونه‌ها، رقت‌های متوالی ده‌دهی تهیه و از هر نمونه روی محیط کشت MRS آگار، کشت سطحی داده شد. به منظور رسیدن به تک پرگنه خالص جدایه‌های لاکتیکی، پس از تهیه کشت سطحی و مطالعه ریخت-شناسی میکروسکوپی جدایه‌های لاکتیکی، از آنها کشت خطی تهیه شد. جهت تایید خصوصیات بیوشیمیایی

باکتری‌های اسید لاکتیک نیز از آزمون گرم و کاتالاز استفاده شد (Cappuccino *et al.*, 2014).

غربالگری جدایه‌های لاکتیکی بر اساس ارزیابی زنده‌مانی جدایه‌های لاکتیکی غالب در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش: برای این منظور، ابتدا سوسپانسیون حاوی هر جدایه لاکتیکی در دمای چهار درجه سلسیوس و به مدت پنج دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (سیگما-آلمان) شد. سپس با حذف روماند، رسوب باقیمانده در محلول بافر فسفات حاوی HCL یک نرمال به pH معادل دو رسانده شد، به نحوی که جذبی معادل نیم مک فارلند به‌دست آمد. بعد از اضافه کردن آنزیم پپسین ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) به سوسپانسیون باکتریایی، سوسپانسیون مذکور به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. در پایان زمان گرمخانه‌گذاری، pH سوسپانسیون با سود یک نرمال به حدود شش رسانده شد. در ادامه، هر جدایه لاکتیکی به مدت چهار ساعت در مجاورت صفرا با غلظت ۰/۳ (درصد وزنی/حجمی) و آنزیم پانکراتین ۰/۱ (درصد وزنی/حجمی) قرار گرفته شد و در انتها، جمعیت جدایه لاکتیکی با رقت‌سازی متوالی در بافر فسفات استریل و کشت سطحی بر MRS آگار در مقایسه با نمونه شاهد (تیمار نشده) تعیین شد (Zhang *et al.*, 2011).

شناسایی مولکولی باکتری اسید لاکتیک غالب: بدین منظور ابتدا DNA جدایه لاکتیکی غالب، به وسیله کیت (بیونر-کره جنوبی) جهت اجرای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR استخراج شد. سپس با استفاده از پرایمرهای S- و (F44;5c- AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3c) *-Univ-1542R-b-A-21 (1542 R;5c-GGTTACCTTGTTACGACTT-3c) در شرایط دمایی مشخص (۳۰ چرخه حرارتی اصلی شامل وا سرشت در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه) تکثیر یافت. در ادامه به منظور تایید اولیه، محصولات PCR به ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل شدند و در بافر تریس/بورات-ای دی تی آ یا TBE (Tris/Borate/EDTA) در حضور نمونه‌های شاهد مثبت (حاوی DNA استخراج شده از باکتری اسید لاکتیک کلکسیونی-*Lactobacillus spp 1332*) و شاهد منفی (فاقد DNA)، الکتروفورز انجام شد. محصولات PCR پس از توالی‌یابی (بیونر-کره جنوبی) با استفاده از رویه ابزار پایه‌ای برای جستجوی هم‌ترازی موضعی یا Blast با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI هم‌ردیف شدند. سپس درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA 10 رسم شد (Abnous *et al.*, 2009).

تعیین اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی غالب: به منظور تعیین اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی غالب در برابر باکتری‌های بیماری‌زا از روش انتشار چاهک استفاده شد. در این روش، ابتدا جذب کشت‌های تازه جدایه‌های لاکتیکی و باکتری‌های بیماری‌زا به‌صورتی که جمعیت میکروبی آن‌ها معادل نیم مک فارلند باشد، تنظیم شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زا روی محیط کشت آگار برین هارت اینفیوژن یا BHI به-صورت سطحی کشت داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه در مرکز این پلیت‌ها، چاهک ایجاد شد و مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت جدایه‌های لاکتیکی در این چاهک‌ها ریخته شد. سپس، پلیت‌ها به گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شدند و نتایج پس از ۲۴ ساعت به‌صورت هاله عدم رشد بررسی شد (Herreros *et al.*, 2005).

تعیین اثر دگر اتصالی و خود اتصالی جدایه لاکتیکی غالب: برای ارزیابی خاصیت خود اتصالی جدایه لاکتیکی غالب، سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته آن با سانتریفیوژ یخچال‌دار (۱۰ دقیقه، دمای چهار درجه سلسیوس، دور ۶۰۰۰g)، جدا و طی دو مرحله شستشو در بافر فسفات (pH= ۷/۲) حل شدند، به‌طوری که سوسپانسیون به‌دست آمده، جذبی معادل ۰/۱۰۸ =$OD_{۶۰۰}$ داشت. در ادامه، سوسپانسیون مذکور به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس، جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و مطابق رابطه زیر، میزان خود اتصالی محاسبه شد:

$[1-(A_t/A_0)]*100$

در این رابطه، A_0 و A_t به ترتیب میزان جذب سوسپانسیون در ابتدا و انتهای گرمخانه‌گذاری هستند (Collado *et al.*, 2008). به منظور ارزیابی دگر اتصالی جدایه نیز مخلوطی از حجم‌های مساوی سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری-های بیماری‌زا تهیه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت چهار ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس، جذب بخش رویی سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از معادله زیر، میزان خاصیت دگر اتصالی محاسبه شد:

$\{(AP+Alac)/2-(Amix)/AP+Alac)/2\}*100$

در این رابطه، AP: جذب سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا، Alac: جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و Amix: جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری‌های بیماری‌زا پس از چهار ساعت است (Zhang *et al*., 2011).

بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک: جهت بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک، ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری اسید لاکتیک منتخب به چهار میلی‌لیتر محیط کشت MRS آگار یک درصد اضافه شد. سپس، مخلوط مذکور بر روی سطح پلیت‌های از پیش آماده شده حاوی ۱۵ میلی‌لیتر MRS آگار ۱/۵ درصد، ریخته شد و در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل آمپی‌سیلین (۱۰ µg)، جنتامایسین (۱۵ µg)، استرپتومایسین (۱۰ µg)، سفازولین (۳۰ µg)، سیپروفلاکساسین (۵ µg)، پنی‌سیلین (۶ µg)، سفالوتین (۳۰ µg)، ایمیپنم (۱۰ µg)، نووبیوسین (۳۰ µg)، کلیندامایسین (۱۰ µg)، ونکومایسین (۳۰ µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg) روی سطح هر پلیت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شده و به‌صورت مقاوم (کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر)، حساسیت نسبی (۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر) و حساس (بیش از ۲۰ میلی‌متر) گزارش شد (Rojo-Bezares *et al*., 2006).

بررسی قابلیت همولیز خون: همچنین، جهت بررسی قابلیت همولیز خون، جدایه لاکتیکی روی سطح کشت محیط کشت خون‌دار حاوی پنج درصد خون گوسفند، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، از نظر ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی شد (Angmo *et al*., 2016).

طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آزمایش زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک غالب جدا شده در شرایط شبیه‌سازی معده و روده با چهار تیمار، بررسی خاصیت ضد باکتریایی و دگر اتصالی *جدایه لاکتیک منتخب* با شش تیمار و آزمایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه با ۱۳ تیمار انجام شد. نتایج حاصل با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه با مقایسه بین گروهی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها و آثار متقابل آنها از روش میانگین حداقل مربعات استفاده شد و نتایج به همراه اشتباه معیار گزارش شد. برای تجزیه آماری از نرم افزار SAS 9.1 و ترسیم داده‌ها با نرم افزار Microsoft office Excel نسخه ۲۰۱۰ انجام شد.

نتایج و بحث

مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش: همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود از بین چهار زیستگاه منتخب (ایلئوم، رحم، واژن و مدفوع)، باکتری‌های اسید لاکتیک غالب (گرم مثبت و کاتالاز منفی) جدا شده از ایلئوم به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) دارای بیشترین زنده‌مانی در شرایط دستگاه گوارش بوده (۸۲/۰۰ درصد) و کمترین میزان زنده‌مانی نیز مربوط به باکتری اسید لاکتیک جدا شده از مدفوع (۳۴/۸۰) بود.

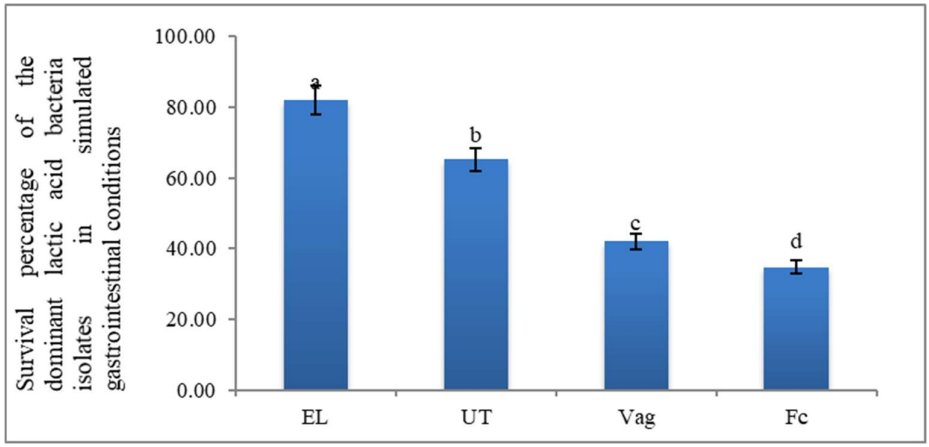


Fig. 1. Survival percentage of the dominant lactic acid bacteria Isolates in simulated gastrointestinal conditions. Vagina: Vag - Uterus: UT - Feces: Fc - Ileum: EL. [a- d] Values with different letters indicate significant differences at P<0.05

شکل ۱- زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک غالب جدا شده در شرایط شبیه‌سازی معده و روده

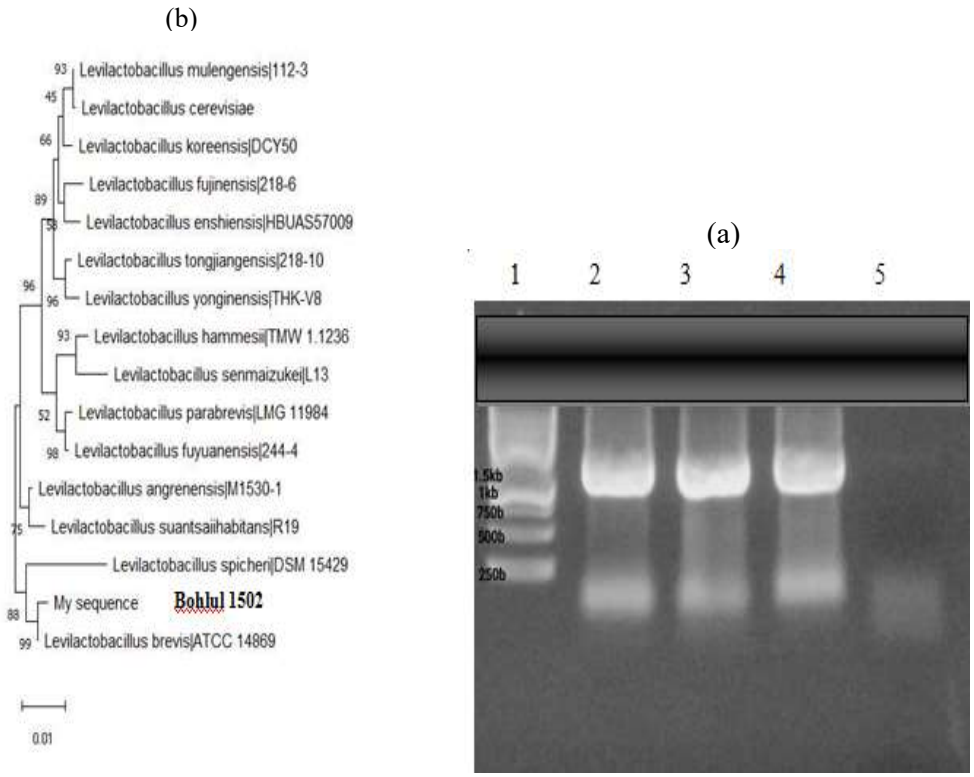
نتایج پژوهش حاضر با مطالعه Wang (2014a) که نشان داد باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از ایلئوم نسبت به باکتری‌های اسید لاکتیک مدفوع، زنده‌مانی بیشتری را در تیمارهای متوالی اسید و صفرا داشتند، مطابقت دارد. محققین علت این امر را تعداد زیاد باکتری‌های اسید لاکتیک در ایلئوم عنوان نمودند، در حالی‌که بیشتر باکتری-ها در مدفوع، بی‌هوازی هستند. مقاومت بالای بعضی از باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به pH پائین می‌تواند به دلیل تولید ترکیباتی مانند انواع پلی‌ساکاریدها باشد که از اثر اسید بر غشای سلولی آنها ممانعت می‌کند (Vinderola *et al.,* 2003; Barakat *et al.,* 2011; Pumriw *et al.,* 2021). عواملی نظیر قابلیت هیدورلیز نمک‌های صفراوی نیز در افزایش مقاومت این باکتری‌ها نسبت به نمک‌های صفراوی تاثیرگذار هستند (Saarela *et al.,* 2000). در واقع، قابلیت هیدرولیز نمک‌های صفراوی یک مزیت انتخابی برای جدایه‌های لاکتیکی در شرایط بسیار رقابتی روده است (Begley *et al.,* 2006). این امر بیانگر آن است که مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش با توجه به نوع گونه و زیستگاه باکتری جداسازی شده متفاوت است (Jin, 1998). همچنین، ظرفیت تحمل باکتری اسید لاکتیک به pH پائین بستگی به ویژگی‌های دیواره سلولی (Maragkoudakis, 2009)، فعالیت آنزیم آدنوزین تری فسفات یا ATPase، نوع محیط کشت و شرایط کشت دارد. مقاومت به pH پائین معده و نمک صفراوی روده کوچک، معیار مناسبی برای انتخاب پروبیوتیک‌ها است (Ouwehand *et al.,* 1996).

شناسایی باکتری اسید لاکتیک منتخب: بر اساس نتایج به-دست آمده، همه باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده، گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود تکثیر توالی هدف bp ۱۵۰۰ در ژل الکتروفورز محصولات PCR مورد تائید قرار گرفت. مقایسه نتایج توالی‌یابی محصولات PCR با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی منجر به شناسایی *لوی‌لاکتوباسیلوس برویس* با ۹۹ درصد تشابه شد. علاوه بر این، بر اساس نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنتیک، *Levilactobacillus bervis* ATCC 14869 نزدیک‌ترین باکتری به جدایه لاکتیکی منتخب بود.

لوی‌لاکتوباسیلوس برویس یک باکتری اسید لاکتیک است که Slps (S-layer proteins) تولید می‌کند. این باکتری در محیط‌های مختلف مانند کلم ترش، خمیرترش، سیلو، شیر، پنیر، دهان و مجرای روده انسان و حیوان زیست می‌کند. تولید Slps به‌عنوان عامل اتصال سلول عمل نموده و از پروبیوتیک‌ها در برابر تنش‌های دستگاه گوارش محافظت می‌کند. علاوه بر این، نقش کلیدی در چسبندگی باکتری به سلول‌های میزبان داشته و سیستم ایمنی روده را تعدیل می‌کند. نتایج پژوهش حاضر با مطالعه wang (2014b) که در آن، *لاکتوباسیلوس روتری*، باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از دستگاه گوارش طیور بود، مطابقت نداشته و با مطالعات Noohi (2021) و Rushdy (2013) که در آن‌ها، *لاکتوباسیلوس برویس*، باکتری اسید لاکتیک غالب بود، مطابقت دارد. مطالعه Jin (1996b) نیز نشان داد که باکتری اسید لاکتیک غالب ایلئوم، *لاکتوباسیل برویس* بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی غالب در برابر باکتری‌های بیماری‌زا: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی بر *شیگلا دیسانتری* به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) نسبت به سایر باکتری‌های بیماری‌زا به‌غیر از *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر بود (۸۲/۰۰ درصد). علاوه بر این، بین اثر ضد باکتریایی *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *لیستریا مونوسایتوژنز* تفاوتی مشاهده نشد (شکل ۳).

در پژوهش Jin (1996a)، حساسیت پنج گونه *سالمونلا enteritidis 448/94 یا انتریتیدس ۴۴۸/۹۴، pullorum یا پلورم، typhimurium یا تیفی‌موریوم، blockley با بلوکلی، enteritidis ۹۳۵/۷۹ یا انتریتیدس ۹۳۵/۷۹*) در برابر جدایه پروبیوتیک احتمالاً به دلیل تولید اسیدهای آلی، بیشتر از سایر عوامل باکتریایی بود. مطالعه Van (2013) نشان داد که اثر ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس برویس* بر *اشیرشیا کلی* از سایر باکتری‌ها بیشتر بود، که با مطالعه حاضر مطابقت ندارد. فعالیت ضد باکتریایی باکتری‌های اسید لاکتیک به قابلیت آن‌ها در محدود نمودن دسترسی میکروارگانیسم-های ناخواسته به مواد مغذی و یا تولید ترکیبات بازدارنده نسبت داده می‌شود (Kumar *et al.,* 2015). با تولید اسید لاکتیک طی رشد باکتری‌های پروبیوتیک، اسیدیته محیط به شدت کاهش یافته و باکتری‌های بیماری‌زا به‌طور طبیعی در این شرایط از بین می‌روند (Heller, 2001).



شکل ۲- (الف)- ژل الکتروفورز محصولات PCR جهت تائید تکثیر توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی در جدایه لاکتیکی منتخب (۱: لدر- ۲ و ۳: جدایه لاکتیکی منتخب-۴: شاهد مثبت- ۵: شاهد منفی). (ب)- درخت فیلوژنتیک حاصل از توالی‌یابی محصولات PCR (نرم افزار مگا ۱۰)

Fig. 2. A: Gel electrophoresis of PCR products to confirm the amplification of the target sequence of 1500 bp in the selected *LAB* isolate (1: Ladder-2 and 3: Selected *LAB* isolate-4: positive control) amplified DNA of an identified strain)-5: negative control). B: Phylogenetic tree Obtained from sequencing of PCR products (MEGA 10)

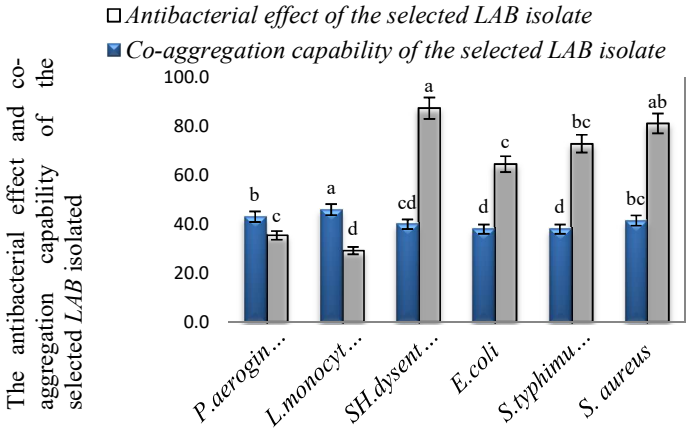


Fig. 3. The antibacterial effect and Co-aggregation capability of the selected LAB isolated: *P.aeroginosa-L.monocytogene-SH.dysenteriae-E.coli-S.typhimurium-S.aureus*. [a- d] Values with different letters indicate significant differences at $P<0.05$

شکل ۳- خاصیت ضد باکتریایی و دگر اتصالی جدایه لاکتیک منتخب: *استافیلوکوکوس اورئوس-سالمونلا تیفی‌موریوم – اشیرشیا کلی- شیگلا دیسانتری - لیستریا مونوسیتوژنز – سدوموناس ایروژینوزا*

قابلیت‌های دگر اتصالی و خود اتصالی جدایه لاکتیک منتخب: نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که *لاکتوباسیلوس برویس* دارای ۴۳/۰۰ درصد خاصیت خود اتصالی بود. نتایج حاصل از بررسی خاصیت دگر اتصالی جدایه لاکتیکی (شکل ۳) نشان داد که بیشترین خاصیت دگر اتصالی جدایه لاکتیکی (۴۶/۰۰ درصد) در برابر *لیستریا مونوسایتوژنز* مشاهده شد که نسبت به سایر باکتری‌های بیماری‌زا بیشتر بود. همچنین، کمترین میزان دگر اتصالی (۳۸/۰۰ درصد) در برابر *سالمونلا تیفی‌موریوم* مشاهده شد که نسبت به نتایج دگر اتصالی با تیمارهای *اشیرشیا کلی* و *شیگلا دیسانتری* تفاوتی نداشت. نتیجه پژوهش حاضر با مطالعه Noohi (2021) که *لاکتوباسیل برویس* بیشترین خاصیت دگر اتصالی را در برابر *اشیرشیا کلی* از خود نشان داد و با مطالعه Van (2007) که بیشترین اثر دگر اتصالی را بر *اشیرشیا کلی* داشت، مطابقت نداشت. قابلیت اتصال در باکتری‌ها به دو صورت خود اتصالی و دگر اتصالی بررسی می‌شود. اتصال سویه‌های باکتریایی هم‌نوع عموماً موجب اتصال آن‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، لانه‌گزینی و محافظت از دستگاه گوارش می‌شود. علاوه بر این، توانایی خود اتصالی در سویه‌های *لاکتوباسیلوس* سبب ایجاد یک مانع در برابر فعالیت و اتصال باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود (Gómez *et al.,* 2016). مطالعه Bao (2010) نشان داد که *لاکتوباسیل برویس* ایلئوم توانایی بیشتری در چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیال روده دارد که با پژوهش حاضر مطابقت دارد. اتصال سویه‌های باکتریایی به باکتری‌های بیماری‌زا، منجر به ممانعت از لانه‌گزینی آن‌ها در دستگاه گوارش می‌شود (Jankovic *et al.,* 2012). عواملی مانند نوع سویه باکتری اسید لاکتیک و بیماری‌زا و همچنین زمان گرمخانه‌گذاری بر میزان خاصیت دگر اتصالی باکتری‌های اسید لاکتیک تاثیرگذار هستند (Zhang *et al.,* 2011).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه لاکتیکی: نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف نشان داد (شکل ۴) که بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد جدایه لاکتیکی منتخب (۲۳/۵۰ میلی‌متر) مربوط به تیمار ایمیپنم بود که به لحاظ آماری با تیمارهای آمپی‌سیلین (۲۲/۵۰ میلی‌متر) و ونکومایسین (۲۲/۵۰ میلی‌متر) اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین میزان آن (۱۲/۰۰ میلی‌متر) مربوط به تیمار سفتریاکسون بود که به لحاظ آماری با تیمارهای جنتامایسین و سفالوتین اختلاف معنی‌داری نداشت.

نتایج مطالعات پژوهشگران دیگر نیز نشان داد که تمام جدایه‌های لاکتیکی نسبت به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، کلیندامایسین و اریترومایسین حساس بوده و یا حساسیت نسبی داشتند (Abushelaibi, 2017)، که با نتایج پژوهش حاضر که جدایه لاکتیکی نسبت به آمپی‌سیلین حساس بود، مطابقت داشت. نتایج پژوهش حاضر با پژوهش Ma (2023) که بیشترین قطر هاله عدم رشد جدایه لاکتیکی مربوط به آمپی‌سیلین و کمترین آن نیز مربوط به جنتامایسین بود، مطابقت داشت، ولی با مطالعه Ma (2023) که در آن، *لاکتوباسیلوس برویس* به ونکومایسین مقاوم بود، مطابقت نداشت. هچنین، مطالعات پیشین نشان داد که باکتری‌های *لاکتوباسیلوس برویس* در اردک و جوجه‌ها نسبت به استرپتومایسین مقاوم هستند که با پژوهش حاضر مطابقت نداشت (Ludfiani *et al.,* 2021). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده یک قابلیت بسیار مفید جهت استفاده به‌عنوان سویه-های پروبیوتیک موجود در روده است زیرا این میکرو-ارگانیسم‌ها سبب حفظ جمعیت فلور میکروبی در روده به هنگام درمان آنتی‌بیوتیکی می‌شوند (Palaniyandi *et al.,* 2017).

قابلیت همولیز خون: در این پژوهش مشخص شد که جدایه *لوی‌لاکتوباسیلوس برویس* فاقد فعالیت همولیزی بود (شکل ۵). نتیجه پژوهش حاضر با مطالعات پیشین (Maragkoudakis 2006; Rao 2015; Adetoye 2018; Padmavathi 2018; Ludfiani 2021) که نشان دادند جدایه لاکتیکی آن‌ها فاقد فعالیت همولیزی بود، مطابقت داشت. عدم فعالیت همولیزی نشان‌دهنده قابلیت استفاده از جدایه لاکتیکی منتخب به‌عنوان پروبیوتیک ایمن است (Padmavathi *et al.,* 2018). معمولاً سه نوع فعالیت همولیزی آلفا (هاله سبز)، بتا (هاله زرد) و گاما (بدون تشکیل هاله) وجود دارد. فعالیت همولیزی در باکتری‌های اسید لاکتیک از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است زیرا فعالیت همولیزی باکتری‌ها می‌تواند لایه‌های اپی‌تلیال در محیط اسیدی روده را دچار اختلال کند. عامل اصلی همولیز آلفا، تولید پراکسیداز در محیط به وسیله باکتری است. همولیز آلفا، همولیز ناقص و یا جزئی است. عامل ایجاد بتا همولیز، تولید همولیزین در محیط است. آلفا و بتا همولیز معمولاً مربوط به باکتری‌های بیماری‌زا است، زیرا این میکروارگانیسم‌ها، آنزیم‌هایی نظیر کواگولاز تولید می‌کنند

که توانایی تجزیه گلبول‌های قرمز را دارند. اگر میکروارگانیسمی منجر به ایجاد همولیز نشود به‌عنوان گاما همولیز شناخته می‌شود (Abushelaibi *et al.*, 2017). عدم فعالیت همولیتیک برای طبقه‌بندی باکتری‌ها به‌عنوان افزودنی مجاز طبق قوانین سازمان مواد غذایی اروپا الزامی است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که *لوی‌لاکتوباسیل برویس* نسبت به شرایط اسیدی و صفراوی دستگاه گوارش مقاوم بوده و آلودگی به *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *شیگلا دیسانتری* را کنترل می‌کند. بنابراین می‌تواند به‌عنوان مکمل پروبیوتیک در طیور استفاده شود.

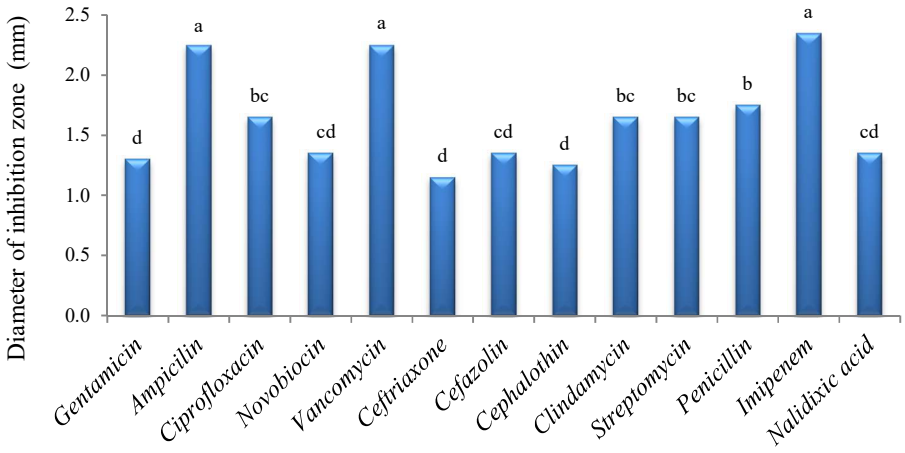


Fig. 4. Antibiotic susceptibility of *Levilactobacillus brevis*. [a- d] Values with different letters indicate significant differences at $P<0.05$

شکل ۴- مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه *لوی‌لاکتوباسیلوس برویس*

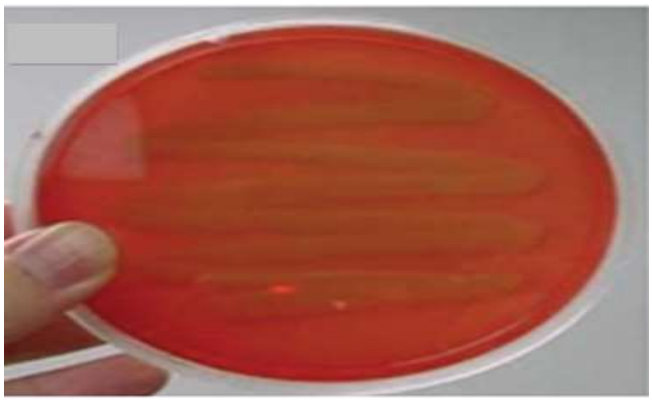


Fig. 5. Haemolityic activity

شکل ۵- قابلیت همولیز خون

فهرست منابع

Abnous, K., Brooks, S. P., Kwan, J., Matias, F., Green-Johnson, J., Selinger, L. B., & Kalmokoff, M. (2009). Diets enriched in oat bran or wheat bran temporally and differentially alter the composition of the fecal community of rats. *The Journal of nutrition*, *139*(11), 2024-2031. doi: 10.3945/jn.109.109470

Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., & Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, *79*, 316-325. doi: 10.1016/j.lwt.2017.01.041

Adetoye, A., Pinloche, E., Adeniyi, B. A., & Ayeni, F. A. (2018). Characterization and *anti-salmonella* activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. *BMC Microbiology*, *18*(1), 1-11. doi: 10.1186/s12866-018-1248-y

Angmo, K., Kumari, A., Savitri, D., & Bhalla, A. K. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, *66*, 428-435. doi: 10.1016/j.lwt.2015.10.057

Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., & Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, *21.5*, 695-701. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.10.010

Barakat, O. S., Ibrahim, G. A., Tawfik, N. F., El-Kholy, W. I., & El-Rab, G. D. (2011). Identification and probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from traditional Domiati cheese. *International Journal of Microbiology Research*, *3(1),* 59. doi: 10.9735/0975-5276.3.1.59-66

Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, *72(3),* 1729-1738. doi: 10.1128/AEM.72.3.1729-1739.2006

Boirivant, M., & Strober, W. (2007). The mechanism of action of probiotics. *Current Opinion in Gastroenterology, 23*(6), 679- 692. doi:10.1097/MOG.0b013e3282f0cffc

Bozkurt, M., Kucukyilmaz, K., Ayhan, V., Çabuk, M., & Çatli, A. U. (2011). Performance of layer or broiler breeder hens varies in response to different probiotic preparations. *Italian Journal of Animal Science*, *10*, 162-169. doi: 10.4081/ijas.2011.e31

Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). Microbiology. A Laboratory Manual (10th Edition). Pearson Publishing.

Collado, M. C., Jussi, M., & Seppo, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, *226*, 1065-1073. doi: 10.1007/s00217-007-0632-x

El Jeni, R., Dittoe, D. K., Olson, E. G., Lourenco, J., Corcionivoschi, N., Ricke, S. C., & Callaway, T. R. (2021). Probiotics and potential applications for alternative poultry production systems. *Poultry Science*, *100(7)*, 101156. doi: 10.1016/j.psj.2021.101156

Goktepe, I., Juneja, V. K., & Ahmedna, M. (2005). Probiotics in Food Safety and Human Health. CRC Press. doi: 10.1201/9781420027570

Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., & de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria *(LAB)* biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology, 7*, 863. doi: 10.3389/fmicb.2016.00863

Heller, K. J. (2000). Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2), 374s-379s. doi: 10.1093/ajcn/73.2.374s

Herreros, M. A., Sandoval, M. A., Gonzalez, H., Castro, J. M. Fresono, J. M., & Tornadijo, M. E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats milk cheese). *Food Microbiology*, *22*(5), 455-459. doi: 10.1016/j.fm.2004.11.007

Jankovic, T., Frece, J., Abram, M. & Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, *6(1)*, 19-24.

Jin, L. Z., Ho, Y. W., Ali, M. A., Abdullah, N., Ong, K. B., & Jalaludin, S. (1996a). Adhesion of *Lactobacillus* isolates to intestinal epithelial cells of chicken. *Letters in Applied Microbiology, 23(3),* 229-232. doi: 10.1111/j.1472-765x.1996.tb01149.x

Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M. A., & Jalaludin, S. (1996b). Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Letters in Applied Microbiolog, 23(2),* 67-71. doi: 10.1111/j.1472-765x.1996.tb00032.x

Jin, L. Z., Abdullah, H. Y., & Jalaludin, S. (1998). Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, *77*(9), 1259-1265. doi: 10.1093/ps/77.9.1259

Kumar, S., Chaunhan, N., Gopal, M., Kumar, R., & Dilbaghi, N. (2015). Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 631-637. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.08.062

Ludfiani, D. D., Asmara, W., Wahyuni, A. E. T. H., & Astuti, P. (2021). Identification of *Lactobacillus spp.* on basis morphological, physiological, and biochemical characteristic from Jawa Super Chicken Excreta. *In BIO Web of Conferences*, (Vol. 33, p. 06012). EDP Sciences. doi: 10.1051/bioconf/20213306012

Lutful Kabir, S. M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences, 10(8),* 3531-3546. doi: 10.3390/ijms10083531

Ma, K., Chen, W., Lin, X. Q., Liu, Z. Z., Wang, T., Zhang, J. B., & Yang, Y. J. (2023). Culturing the Chicken Intestinal Microbiota and Potential Application as Probiotics Development. *International Journal of Molecular Sciences, 24(3),* 3045. doi: 10.3390/ijms24033045

Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., & Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, *130(3),* 219-226. doi: 10.1016/j.ijffoodmicro.2009.01.027

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., & Lilius, E. M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology*, *15*(5), 443-452. doi: 10.1016/s1050-4648(03)00023-8

Noohi, N., Papizadeh, M., Rohani, M., Talebi, M., & Pourshafie, M. R. (2021). Screening for probiotic characters in *lactobacilli* isolated from chickens revealed the intra-species diversity of *Lactobacillus brevis*. *Animal Nutrition*, *7*(1), 119-126. doi: 10.1016/j.aninu.2020.07.005

Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., & Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *9*, 34-52. doi: 10.1016/s0958-6946(99)00043-6

Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjan, N. R., & Pavitra, P. V. (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16(2),* 357-362. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.03.005

Palaniyandi, S. A., Damodharan, K., Suh, J. W., & Yang, S. H. (2017). *In vitro* characterization of *Lactobacillus plantarum* strains with inhibitory activity on enteropathogens for use as potential animal probiotics. *Indian Journal of Microbiology*, *57*, 201-210. doi: 10.1007/s12088-017-0646-4

Pelicano, E. R. L., Souza, P. A., Souza, H. B. A., Figueiredo, D. F., & Boiago, M. M. (2005). Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 221-229. doi: 10.1590/S1516-635x200500040005

Pourjafar, H., Noori, N., Gandomi, H., Basti, A. A., & Ansari, F. (2020). Viability of microencapsulated and non-microencapsulated. *Biotechnology Reports*, *25*, e00432. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00432

Pumriw, S., Luang-In, V., & Samappito, W. (2021). Screening of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented Pak-Sian for use as a starter culture. *Current Microbiology*, *78*(7), 2695-2707. doi: 10.1007/s00284-021-02521-w

Rao, K. P., Chennappa, G., Suraj, U., Nagaraja, H., Raj, A. P., & Sreenivasa, M. Y. (2015). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from sorhumbased traditional fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Protein*, *7*, 146-156. doi: 10.1007/s12602-015-9186-6

Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Poeta, P., Zarazang, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2006). Assessment if antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology, 111*, 234-240. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.007

Rushdy, A. A., & Eman, Z. G. (2013). Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. *Annals of Microbiology*, *63*, 90-81. doi: 10.1007/s13213-012-0447-2

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, *84*(3), 197-215. doi: 10.1016/S0168-1656(00)00375-8

Van Coillie, E., Goris, J., Cleenwerck, I., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Immerseel, F., & Heyndrickx, M. (2007). Identification of *lactobacilli* isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(4), 1095-1106. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03164.x

Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria: A Comparative "in Vitro" Study of Probiotic Characteristics and Biological Barrier Resistance. *Food Research International*, *36*(9-10), 895-904. doi: 10.1016/S0963-9969(03)00098-x

Wang, W., Chen, L., Zhou, R., Wang, X., Song, L., Huang, S., & Xia, B. (2014a). Increased proportions of *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(2), 398-406. doi: 10.1128/JMC.01500-13

Wang, L., Fang, M., Hu, Y., Yang, Y., Yang, M., & Chen, Y. (2014b). Characterization of the most abundant *Lactobacillus* species in chicken gastrointestinal tract and potential use as probiotics for genetic engineering. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *46*(7), 612-619. doi: 10.1093/abbs/gmu037

Yousefi-Kelarikolaei, K., Mohiti-Asli, M., Hosseini, S. A., & Yousefi-Kelarikolaei, H. (2013). Effect of antibiotic, probiotic, prebiotic and multi-enzyme in pelleted diet on the performance of broilers. *Animal Production Research*, *1*(4), 63-72.

Zhang, Y., Zhang, l., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., Han, X., Li, J., Zh, L., & Yang, L. (2011). Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild *lactobacilli* from fermented food. *Microbiological Research*, *167*(1), 27-31. doi: 10.1016/j.micres.2011.02.006