عزل وتوصيف عصيات لبنية نوع Lactobacillus salivarus لاستخدامها كمعزز حيوي للدجاج

علي عبد الحسين شلش * ابتسام جواد علي العبيدي*

*فرع الأمراض والدواجن – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

الخلاصة

أ ستهدف البحث عزل وتوصيف عصيات لبنية و ذلك بتشخيصها من خلال خواصها الكيمياحياتية و دراسة بعض صفاتها البايولوجية كتثبيطها لنمو أشريكيا القولون (EC) و سالمونيلا تايفيميوريوم .(ST) مختبريا invitro و معرفة حساسيتها لـ Ph =3 و فحص حساسيتها لبعض المضادات الجرثومية .

تم عزل عزلتين من عصيات لبنية نوع Lactobacillus salivarus (LS) من حواصل دجاج بالغ على وسط مرق .M.R.S و كانت العزلتين موجبة لصبغة الكرام ، عصوية و سالبة لكل من الكتاليز و إنتاج الامونيا من الأرجنين .

عزلة I ذو تأثير اثباطي ضد (EC)بقطر 22 ملم و ضد (S T) بقطر19 ملم أما عزلة II فكانت ذو تأثير إثباطي بقطر 1 ملم ضد (EC)و ليس لها تأثير ضد (S T) و كانت القابلية الالتصاقية عالية للعزلة I و ضعيفة للعزلة II و أظهرت العزلة I نمواً على وسط الركوزا و تحت pH = 3 كما وان العزلة I كانت مقاومة للمضادات الجرثومية Enrofloxacine ، Sulfanomide، Furaltadone ، Flumequine ، Norfloxacine، Ciprofloxacine Doxycycline، Tetracycline، و حساسة لكل من Ampicillin ، Neomycine و chloramphenicol .

يستنتج من هذه الدراسة إمكانية نجاح استخدام العزلة الأولى من عصيات البنية نوع Lactobacillus salivarus كمعزز حيوي للدجاج.

Isolation and Identification of Lactobacillus salivarus to be used as probiotic in chickens

*Ali A.H. Shalash *Ebtisam G. A. Al-Oubaidi

*Department of pathology and poultry

Baghdad University-College of Veterinary Medicine

Summary

The study was conducted to isolate and identified Lactobacillus through its biochemical and some biological characters.

The growth inhibition of E. coli (E C) and Salmonella typhimurium (ST) invitro and its sensitivity to pH=3 and its antibiogram were studied.

Two isolates of Lactobacillus salivarus (LS) were obtained. The isolated bacteria were taken from the crops of adult chicken, and cultured on M.R.S. broth, they were Gram positive bacilli, negative for catalase and amonia production from Arginin.

The first isolate showed inhibitory zone of 22 mm diameter against (EC) and 19 mm. against (ST)

The second isolate showed inhibitory zone of 1mm diameter against (EC) and did not show an inhibitory zone against (ST)

Adhesive ability of the first isolate was strong while that of the second isolate was weak.

The first isolate showed growth on Rogosa media in pH=3 and

It was resistant to the following antimicrobial drugs:

Enrofloxacine, Ciprofloxacine, Norfloxacine, Flumequine, Doxycycline, Tetracycline, Sulfanomide, Furaltidone, and sensitive to Ampicillin, Neomycin, Chloramphenicol.

It was concluded that the first isolate of Lactobacillus salivarus could be successfully used as probiotic in chickens.

المقدمة

اكتشفت أهمية العصيات اللبنية من قبل العالم Metchnikoff عام 1907 الذي اعتقد بأنها مهمة في خلق تجمع جرثومي متوازن داخل القناة الهضمية ، وان التحسن في الصحة ناتج عن اخذ هذه العصيات و قد تمت دراسة هذه الظاهرة في الدجاج كون الحوصلة تحتوي على أحياء مجهرية طبيعية و العصيات اللبنية سائدة على كل من جراثيم coliform ، Streptococci [1] و تلعب دورا في التوازن الجرثومي داخل القناة الهضمية [2،3] مما جعل العصيات اللبنية من الجراثيم الرئيسية و المهمة كمعززات حيوية .

تلتصق جراثيم العصيات اللبنية بالخلايا الطلائية للحوصلة [4] وقد اعتقد Fuller [5] إن هذه القابلية الالتصاقية العصيات اللبنية يساعد على وجودها بصورة دائمة بهذا العدد .

إن عملية الالتصاق تحدث بواسطة طبقة من الكاربوهيدرات التي تحيط بالجدار الخلوي للجراثيم ، وان المكان الرئيس للالتصاق ، يكون عبارة عن امتداد سوط من سطح الجرثومة إلى سطح الخلايا الطلائية للحوصلة [6] .

وقد يحدث الالتصاق نتيجة تفاعل يحدث بين جزيئات خاصة موجودة على سطح الخلايا الجرثومية و الموجودة على سطح القناة الهضمية للمضيف حيث وجد ان الالتصاق يحدث بواسطة

مركبات بروتينية موجودة على سطح الجرثومة [7] كما ويحدث الالتصاق نتيجة وجود تراكيب ذات طبيعة كاربوهيدراتية تدعى لكتين Lectin على سطح الخلية الجرثومية [8] وان هذا يعلل سبب خصوصية عملية التصاق الجراثيم للخلايا الطلائية و امتلاكها صفة الخصوصية للمضيف (Host specific) حيث أن اخذ عتر جرثومية تنمو في داخل القناة الهضمية للحيوانات من الممكن أن لا تنمو ، و لا تتكاثر في الأنواع الأخرى ، و هذا يؤدي إلى عدم تطور استخدام المعزز الحيوي في الحيوانات ، لان العصيات اللبنية المعزولة من الدجاج ، وبعض الأنواع الأخرى من الطيور كالحمام تستطيع ان تلتصق بالخلايا الطلائية لحويصلة الدجاج فقط [5] .

ومن الخصائص الأخرى التي تتصف بها العصيات اللبنية في مستحضرات المعززات الحيوية هي عملها كعوامل مضادة للجراثيم الأخرى ، وقدرتها على تحفيز الجهاز المناعي، وامتلاكها الأنزيمات التي تزيد من فعالية هضم و امتصاص المواد الغذائية الضرورية، والأيونات[9].

وبصورة عامة تعد العصيات اللبنية كتوابع غذائية (dietary adjuncts) تضاف للعليقة ، وذلك لعمل توازن جرثومي مبكر [10] ، وتعتبر العصيات اللبنية نوع Lact. acidophillus من اشهر أنواعها ، و انسبها في مجال المعززات الحيوية [11] و ذكر Holt et. al. [12] ان من اكتشفها أول مرة هو Morr في عام 1900 . و تمتلك هذه الجراثيم الخصائص التي تمكنها من أن تكون ملائمة في مجال المعززات الحيوية ، فمثلا قابليتها على النمو بصورة تقليدية في المختبر و قدرتها على الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للحوصلة ، و تحمله الأس الهيدروجيني الواطئ و أملاح الصفراء و بقاء عدد اكبر من الخلايا الجرثومية حية في المدة الواقعة بين إضافتها للعلف ، واستهلاك الدجاج لها ، [13] .

المواد وطرائق العمل

عزل العصيات اللبنية

بحسب طريقة Fuller [14] و Al-Chalaby[15]

و بعد إخراج الأطباق من الحاضنة أجريت الفحوصات التشخيصية و التأكيدية على المستعمرات الجرثومية النامية في وسط اكار الركوزا

الجراثيم المستخدمة:-

أ-أشريكيا القولون:- عزلات حقلية مرضية عزلت وعرفت في العيادة الاستشارية التخصصية لامراض الدواجن في الخضراء .

ب-سالمونيلا تايفيميريوم:- نمط مصلي من خزين شعبة الدواجن في كلية الطب البيطري / جامعة بغداد عزل في العيادة الاستشارية التخصصية لامراض الدواجن في الخضراء ، وصنفها من الناحية البايوكيمياوية و المصلية [16] .

الأوساط الزرعية المستخدمة النمو العصيات اللبنية :-

أ- وسط اكار الركوزا Rogosa Agar : تم تحضيره حسب طريقة Rogosa [17] ، واستخدم لغرض العزل الجرثومي ، ولإجراء العد الجرثومي .

ب- وسط اكار M.R.S : تم تحضيره حسب طريقة Demand et. al. [18] وتم استخدامه لتنمية عزلات العصيات اللبنية .

ج- مرق M.R.S: حضر حسب الطريقة أعلاه ولكن من دون إضافة الأكار ، فقد استخدم لتنمية العزلات الجرثومية .

د- مرق M.R.S التفريقي : تم تحضيره حسب طريقة Harrigan and Maccanae [19] .

الدراسة المختبرية :-

اجري هذا الجزء من الدراسة للحصول على بعض العزلات العصيات اللبنية المعزولة من محتويات حوصلة الدجاج وتم اختبار قابلية هذه العزلات الجرثومية على تثبيط نمو (EC) و (ST) وإجراء فحص قابلية هذه العزلات الجرثومية للعصيات اللبنية على الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للحوصلة ، وكذلك فحص قابليتها على تحمل الأس الهيدروجيني الواطئ . وكذلك فحص حساسيتها ضد العديد من المضادات الجرثومية . وقد تم اختيار العزلات الجرثومية ذات القابلية العالية على تثبيط نمو ، (EC) و(ST) ذات القابلية الالتصاقية العالية ، وذات القدرة على النمو تحت أس هيدروجيني واطئ.

- فحص القابلية التثبيطية للعصيات اللبنية ضد كل من أشريكيا القولون و سالمونيلا تايفيميوريوم:- تم هذا الفحص بواسطة إجراء الانتشار في الحفر كما يلي: زرعت أطباق وسط أكار Muller Hinton من (ST), (EC) وعملت حفر بعد ساعتين من الحضن في 37م ولمدة ساعتين وبعد ذلك ملأت الحفر بكميه من مستخلص حر للخلايا معاملة وغير معاملة بهيدروكسيد الصوديوم معيارية 1 على انفراد من (EC) (ST) وملأت الحفر الوسطيه بمرق .M.R.S بعدها نقلت الأطباق لمدة ساعتين بدرجة 4م ثم لمدة 18 ساعة بدرجة 37م ولمدة 18 ساعة وبعدها قيست أقطار هالات التثبيط بمسطرة مدرجة. و بحسب طريقة.Cupta et. al [20], Straford [21]

- فحص قابلية التصاقية العصيات اللبنية حسب طريقة Fuller [22]

- فحص قابلية العصيات اللبنية على تحمل الأس الهيدروجيني pH =3 و بحسب طريقة Chateau et. al [23].

- فحص حساسية العصيات اللبنية للمضادات الجرثومية : استخدمت طريقة التطويف بحسب طريقة Cruckshank (24).

فحص قابلية تخمير السكريات بحسب طريقة Maccanae ,Harrigan [19]

طريقة حفظ العصيات اللبنية : - استخدمت طريقة Gilliland [25].

النتائـــــج

العزل الجرثومي

1- العصيات اللبنية

تم فحص المستعمرات الجرثومية النامية على وسط اكار الركوزا و قد أظهرت الاختبارات النتائج الآتية ، وكما هو موضحة في الجدول 1 .

الجدول 1 يبين نتائج الاختبارات الكيمياحياتية التشخيصية لعزلات العصيات اللبنية المعزولة من محتويات حواصل الدجاج

الاختبارات	النتيجة
• صبغة كرام	+
• الشكل العصوي	+
فحص الكتاليز	-
النمو على وسط الأكار المغذي	-
فحص إنتاج الامونيا من الأرجنين	-
النمو في القعر لوسط مرق M.R.S	+

2- أشريكيا القولون

أخذت الجراثيم المعزولة من الأفراخ ، وقد أظهرت نموا على وسط اكار الماكونكي متمثلا بمستعمرات وردية اللون (مخمرة لسكر اللاكتوز) و للتأكد من أنها جراثيم أشريكيا القولون تم إجراء الاختبارات الكيمياحياتية الخاصة وقد أظهرت النتائج كما هو مبين في الجدول2.

الجدول 2 الاختبارات الكيمياحياتية لعزلات أشريكيا القولون

الاختبارات	النتيجة
صبغة كرام Gram stain	-
اختبار الحركة Motility	غير متحركة
اختبار الاندول Indole test	+
اختبار اليوريز Urease	-
اختبار Phenylalanine	-
اختبار Simmon's citrate	-
اختبار Lysine Iron Agar	+
اختبار مرق TSI	مخمرة من دون إنتاج غاز (H2S)
اختبار Kligler Iron Agar	مخمرة (+)
اختبار مرق VP/MR	- / +
اختبار وسط الجلاتين	-

3- سالمونيلا تايفيموريوم: -

أخذت المستعمرات النامية على وسط Brilliant green agar ذات المواصفات الآتيـــة : مستعمرات ملساء دائرية كاملة (كافة ، وهي محدبة بيضاء - وردية اللون وتلون الوسط الزرعي باللون الأحمر الأرجواني (لكونها غير مخمرة للاكتوز). فقد زرعت هذه المستعمرات على وســط MacConky No.3 ، وحضنت تحت درجة 37م° ، ومستعمرات السالمونيلا تكون عــادة عديمــة اللون قطرها (2-3) ملم و تغير لون الوسط الزرعي ويميل إلى الاصفرار (26) ، و أجريت علــى هذه المستعمرات الاختبارات الكيمياحياتية ، فكانت نتائجها في جدول 3.

الجدول 3 الاختبارات الكيمياحياتية لعزلات سالمونيلا تايفيميوريوم

الاختبارات	النتيجة
صبغة كرام Gram stain	-
اختبار الحركة Motility	متحركة
اختبار الاندول Indole test	-
اختبار Phenylalanine	-
اختبار اليوريز Urease	-
اختبار Simmon's citrate	+
اختبار SIM sulfate – Indol Motility	+
اختبار Oxidase test	-
اختبار Lysin Iron	-
اختبار Kligler	+

نتائج فحص قابلية العصيات اللبنية على تثبيط نمو أشريكيا القولون و سالمونيلا تايفيميوريوم :-أظهرت بعض عزلات العصيات اللبنية تأثيرا اثباطيا على نمو أشريكيا القولون و سالمونيلا تايفيميوريوم في المختبر ، فقد تراوح قطر هالة التثبيط بالنسبة للعزلة I بقطر 22 ملم و 1 ملم بالنسبة للعزلة II.

وكذلك بعض عزلات العصيات اللبنية لها تأثير اثباطي لنمو سالمونيلا تايفيميوريوم في المختبر إذ تراوح قطر هالة التثبيط 19 ملم بالنسبة للعزلة I ، ولم يظهر أي تأثير للعزلة II ضد سالمونيلا تايفيميوريوم .

ولم يظهر أي تأثير اثباطي لنمو أشريكيا القولون و سالمونيلا تايفيميوريوم بعد معادلة حامضية السائل الطافي لوسط النمو السائل لعزلتي العصيات اللبنية حين استخدم مادة هيدروكسيد الصوديوم كما موضحة في الجدول 4.

الجدول 4 التأثير الاثباطي للعصيات اللبنية ضد أشريكيا القولون و سالمونيلا تايفيميوريوم

عزلات العصيات اللبنية	قطر منطقة التثبيط			
	قبل إضافة NaoH		بعد إضافة NaoH	
	أشريكيا القولون	سالمونيلا تايفيميوريوم	أشريكيا القولون	سالمونيلا تايفيميوريوم
عزلة I	22 ملم	19 ملم	-	-
عزلة II	1 ملم	-	-	-

نتائج فحص قابلية التصاق العصيات اللبنية بالخلايا الطلائية

اجري الفحص من اجل التعرف على قابلية عزلات العصيات اللبنية على الالتصاق بالخلايا الطلائية لحوصلة الدجاج في المختبر ، وقد أظهر هذا الفحص وجود قابلية التصاقية عالية للعزلة I على حين إن العزلة رقم II ذات التصاقية ضعيفة .

نتائج فحص تخمير السكريات :

أظهرت العزلة رقم I قابليتها على تخمير السكريات المختلفة مع عدم إنتاج الغاز كما موضح في جدول 5 .

الجدول 5 تخمير السكريات للعصيات اللبنية .

السكر	عزلة رقم 1
الارابينوز	–
الكالكتوز	+
الكلوكوز	+
اللاكتوز	+
المالتوز	+
المانيتول	+
الراميتوز	–
السوربيتول	–
السالسين	+
الزايلوز	–
تريهالوز	+

نتائج اختبار حساسيتها لأس الهيدروجين الواطئ :-

بالنسبة للعزلة II لم تظهر نموا على وسط الركوزا 1 بعد تخفيض الأس الهيدروجيني إلى3 بينما العزلة I أظهرت نموا على وسط الركوزا 1 و تحت أس هيدروجيني منخفض 3.

نتائج فحص الحساسية للمضادات الجرثومية :-

تم اختبار حساسية العزلة لبعض الأنواع من المضادات الجرثومية ، فقد وجـــد أن هنـــالك حساسية لبعض الأنواع من المضادات الجرثومية كما موضح في جدول 6 .

الجدول 6 فحص الحساسية للمضادات الجرثومية للعصيات اللبنية

المضاد الجرثومي	القراءة القياسية		قطر منطقة التثبيط	النتيجة
Ampicillin	15 or more 14-13 12	ح و م	22mm	حساس
Doxycyclin	19 or more 15-8 14	ح و م	-	مقاوم
Ciprofloxacin	21 or more 20-16 15	ح و م	-	مقاوم
Neomycin	17 or more 16-13 12	ح و م	19mm	حساس
Tetracyclin	19 or more 18-15 14	ح و م	-	مقاوم
Chloramphenicol	18 or more 17-13 12	ح و م	20mm	حساس
Sulfonamide	17 or more 16-12 11	ح و م	-	مقاوم
Flumequine	22 or more 21-17 16	ح و م	-	مقاوم

المضاد الجرثومي	القراءة القياسية		قطر منطقة التثبيط	النتيجة
Enrofloxacine	ح و م	21 or more 20-16 15	-	مقاوم
Furaltidone	ح و م	17 or more 16-15 14	-	مقاوم
Norfloxacin	ح و م	21 or more 20-16 15	-	مقاوم

ح : حساس ، و : وسط ، م : مقاومة

المناقشة

إن عزل العصيات اللبنية من محتويات حواصل الدجاج في هذه الدراسة تعد الخطوة الأولى في استخدام المعززات الحيوية و تطويرها في الدجاج وذلك لعدم إمكانية استخدام سلالات جرثومية من مضائف أخرى غير الدجاج كالإنسان مثلا ، لما تمتلكه هذه الجراثيم من خصوصية تجاه المضيف[27].

فقد تم اختيار الحوصلة لعزل هذه الجراثيم ، وذلك بوصفها المصدر الأساسي للنبيت المعوي الطبيعي المفيد ، الذي تسود فيه العصيات اللبنية [28] .

و أظهرت العصيات اللبنية التي تم عزلها من محتويات حواصل الدجاج صفات مشابهة في الأنواع القياسية من العصيات اللبنية فبعد إجراء الاختبارات البايوكيميائية التشخيصية لعزلات العصيات اللبنية المنماة على وسط اكار الركوزا استبعدت العزلات التي كانت سالبة لصبغة كرام أو مكونة للابواغ أو غير عصوية و استبقيت العزلات التي اتفقت مواصفاتها مع المواصفات القياسية في العصيات اللبنية وذلك من حيث الشكل و الصفات الوظيفية [29].

ومن ملاحظة نتائج عملية تخمر العصيات اللبنية المعزولة للسكريات في هذه الدراسة وكما هي موضحة في جدول 5 ، فقد وجد إنها مطابقة لنتائج تخمير السكريات للعصيات اللبنية نوع Lactobacillus salivarus [12] وان هذه النتيجة جاءت مطابقة مع ما توصل إليه من قبل

Edens and Parkhust [30] فقد أكد على وجود ثلاثة انواع سائدة من العصيات اللبنية في قناة الدجاج الهضمية ، وهم Lact. animales ، Lact. salivarus، Lact. reuteri.

و كانت هذه العزلة من العصيات اللبنية حساسة لكل المضادات الجرثومية الآتية:Ampicillin، Neomycin ، Chloramphenicole وكما هو مبين في جدول 6 إن هذا يؤكد على أن استخدام هذه المضادات في علاج بعض الحالات المرضية سوف يؤدي إلى حدوث خلل في التوازن الجرثومي للنبيت المعوي الطبيعي المفيد داخل القناة الهضمية ، وذلك لتأثيرها على اكثر الجراثيم سيادة ، و نقصد بها العصيات اللبنية في النبيت المعوي لذلك فان إعطاء العصيات اللبنية بعد استعمال تلك المضادات قد يعالج الخل بالتوازن الجرثومي للنبيت المعوي من خلال زيادة أعداد العصيات اللبنية [31] .

و أظهرت عزلة العصيات اللبنية فعالية تثبيطه ضد كل من أشريكيا القولون ، و سالمونيلا تايفيميوريوم مختبرياً ، ،فعند ملاحظة الجدول 5 وجدت فعالية تثبيطية عالية للعزلة I ضد أشريكيا القولون ،فقد بلغ قطر منطقة التثبيط 22 ملم ، على حين أن العزلة II لم تظهر أي فعالية تثبيطية ضدها ، فأن هذا يدل على وجود قابلية تثبيطية عالية في العزلة المستخدمة من العصيات اللبنية [2 و 14] .

وكذلك العزلة I تمتلك فعالية تثبيطية ضد سالمونيلا تايفيميوريوم فقد بلغ قطر منطقة التثبيط 19 ملم على حين لم تظهر العزلة II أي فعالية تثبيطية ضدها ، فان هذا يتفق مع نتائج Shaniani et. al. و الشيخ [33،32] فقد أكدى على قدرة العصيات اللبنية على تثبيط سالمونيلا تايفيميوريوم مختبرياً . أما عند معادلة حامضية السائل الطافي في وسط النمو السائل للعزلات الجرثومية وذلك بواسطة محلول هيدروكسيد الصوديوم عيارية 1 ، فلم يظهر هنالك أي تأثير اثباطي ، مما يدل على إن الفعل التثبيطي المختبري كان سببه الحموضة العالية الناتجة من عملية التخمر السكري أي أن التأثير الأثباطي ، كان بفعل النواتج الايضية الأولية ، التي تشمل حامض الخليك ، بيروكسد الهدروجين ، أو لمواد أخرى تلفت عند معادلة السائل الطافي بمادة هيدروكسد الصوديوم [33 و 34].

إن الحوامض التي تنتجها العصيات اللبنية يمكنها أن تدخل إلى داخل الخلايا الجرثومية الحساسة ، فتؤثر على عمليات الأيض الضرورية مثل عملية انتقال المواد الأولية Substrate Translocation، وعمليات الفسفرة التاكسدية Oxidative Phosphorelation فتعطلها ، وكذلك تؤدي إلى انخفاض الأس الهيدروجيني الداخلي للخلية الجرثومية [35] وتشير الدراسات إلى وجود

عمل تآزري بين حامض اللبنيك ، وحامض الخليك في تثبيط نمو بعض الجراثيم المرضية سالمونيلا و أشريكيا القولون [36] .

وبالنسبة آلى نتائج فحص الالتصاقية , اظهرت العزلة I قابلية التصاقية عالية في الخلايا الظهارية للحوصلة ، على حين أظهرت العزلة II قابلية التصاقية ضعيفة وقد لاحظ مثل هذه النتائج Fuller and Brooker و[6] فقد أشاروا إلى أن العصيات اللبنية المعزولة من الدجاج تختلف في قابليتها الالتصاقية في خلايا الحوصلة .

يعد S. Protein (SPL) وهو أحد مكونات الجدار الخلوي الأثر الفعال في صفة الالتصاق ، فعند إزالة هذه الطبقة عن طريق تشتيت الأواصر الهيدروجينية التي تربط طبقة S. Layer مع الجدار الخلوي ، تفقد الجرثومة قابليتها على الالتصاق مع الغشاء المخاطي للأمعاء [37] .

وقد تبين من خلال نموها على وسط الركوزا ، تحت أس هيدروجيني واطئ 3 إن قابليتها على تحمل الأس الهيدروجيني الواطئ وهذا مطابق لما ذكره Sharp et. al.[38] إن العصيات اللبنية متطبعة للعيش في الظروف الحامضية حيث أنها تتحمل قيماً واطئة من الأس الهيدروجيني .

ولهذا نستنتج بان العزلة I يمكن استخدامها كمعززات حيوية تجريبيا في بحوث لاحقة.

المصادر

1. Smith, H. W. (1965). Observation on the flora of the alimentary tract of animal and factor affecting its composition .J. Path. Bact. 89:95 –122.
2. السامرائي ، علي كريم (1993). تأثير العصيات اللبنية في إصابات الأكياس الهوائية في دجاج اللحم رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد.
3. Fuller, R. (1989). Probiotic in man and animals: A review. J. Appl. Bacteriol. 66:365 –378.
4. Fuller, R. and Turvey, A. (1971). Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl. J. App. Bact. 34: 617 –622.
5. Fuller, R. (1973). Ecological studies on the Lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the fowl. J.Appl. Bacteriol. 36: 131 –139.
6. Fuller, R. and Brooker. (1974) Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. Am.J.Clin.Nutr.27: 1305-1312.
7. Henriksson, A.; Szewzyk, R. and Conway, P.L. (1991). Characteristics of the adhesive determinants of Lactobacillus fermentum 104.Appl. Environ. Microbiol. 57:499-502

8. Tannock, G.W. (1987). Demonstration of mucosa – associated microbial population in the colons of mice. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1965 –1968
9. Gusils, C.; Perez, A.; Gonzalez, S. and Oliver, G. (1998). Lactobacilli isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. Journal of Food protection Vol.62, No.3 Pages 252 –256.
10. Abdulrahim, S.M.; Haddadin, M.S.Y.; Hashlamoun, E.A.R. and Robinson, R.K. (1996). The influence of Lactobacillus acidophillus and Bactracin on layer performance of chickens and cholesterol content of plasm and egg yolk. Br.poult.Sci.37: 341-346.
11. Havenaar, R. and Huiint vedl, J. H. (1992). Probiotic: A general review. In: " The lactic acid bacteria ". Wood, J. B. Ed. Blackie. Academic and professional Glasgow, UK
12. Hott, J.C. and Krieg, N. R. (1986). "Bergey's manual of determinative bacteriology ". Williams and Wilkins .Eds. 9th ed. Baltimore Maryland, U.S.A.
13. Haddadin, M. S. Y.; Abdulrahim, S. M.; Hashlmoun, E. A. R. and Robinson, R. K. (1997). A proposed protocol for checking the suitability of Lactobacillus acidophillus for use during feeding trials with chicken. Trop.Sci.37: 16-20.
14. Fuller, R. (1977). The importance of lactobacillus in maintaining normal microbial balance in the crop. Br. Poul. Sc. 18:85 – 94.
15. Al-Chalaby, Z.A.M.(1983).The ecology of Salmonella infection in chickens and it`s influence on hygenic meat production. Ph.D. Thesis University of Bristol.
16. البياتي،لينا فلاح (2000). استخدام لقاح 9R في السيطرة على جراثيم السالمونيلا باراتيفوئيد في أفراخ الدجاج . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد .
17. Rogosa, M. (1951). A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. J. Bacteriol. 62: 132 –133
18. DeMand, J. C.; Rogosa, M. and Sharpe, M. E. (1960). A medium for cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bact.23: 130 –135
19. Harrigan, W.F.; Mccance, M. F. (1976). Laboratory methods in: Food and dairy microbiology. Academic press London.
20. Cupta, P.K.; Mital, B.K. and Grag, S.K. (1996). Characterization of Lactobacillus acidophilus for uses as dietary adjunct. International J. of food microbiology, Vol.29, No.7.
21. Stratford, B.C. (1977). Simple test of sensitivity (well diffusion technique). In: An atlas of medical microbiology pp. 138. Black well scientific publication.

22. Fuller, R. (1975). Nature of determinant responsible for adhesion of Lactobacilli to chicken crop epithelial cell. J.Gen.Micro.87: 245-250.
23. Chateau, N.; Gastellanos, I. and Deschamps, A.M. (1993). Distribution of pathology inhibition in the lactobacillus isolates of commercial Probiotic consortium. J. of Appl.Bacteriol.74:36-40
24. Cruickshank, R. (1975)."Medical Microbiology". 12th. ed. Churchill Livingston. Edinburgh, London and New York.pp.199-200
25. Gilliland ,S.E.(1985). Bacterial starter culture for food CRS.press.Inc.Boca Rotan Florida U.S.A.
26. Farmer, J. J. 111. (1995). Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: " Manual of clinical microbiology " (Baron, E. J.; Faller, M. A.P.; Tenover, F. C.; Yolken, R. H. Eds.).Pp. 438 – 449.
27. Barrow, P.A.; Brooker, B.E.; Fuller, R. and Newport, M.J. (1980). The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. J.Appl-Bacteriol.48: 147.
28. Sarra, P. G.; Morelli, L. and Bottazzi, V. (1992). The lactic acid microflora of fowl. In: " The lactic acid bacteria in health and disease " Wood, B.J. B Ed. Essex, UK: Elsevier Applied Science. Pp. 3-19.
29. Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Genus lactobacillus. In: " Bergey's Manual of Systemic Bacteriology " Vol.2 (Sneath, P. H. A., Ed.) Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. PP.1208 –1234
30. Edens, F. W.; Parkhurst, C.R.; Cassas, I.A. and Dobrogosz, W.J. (1997). Principles of Ex-ovo competitive exclusion and in – ovo administration of Lactobacillus reuteri. Poult. Sci. 76:169 –179.
31. Jernigan, M.A.; Miles, R.D. and Arafa, A.S. (1985). Probiotic in poultry nutrition –Areview. World's Poult.Sci.J. 41:99.
32. Shanhani, K. M.; Vakil, J. R. and Kilara, A. (1976). Natural antibiotic activity of lactobacillus acidophillus and L. bulgaricus. 1-Cultural condition for the production of antibiosis. Cult. Dair.Prod. J. 11: 14 –17.
33. الشيخ ، عامر عبد الرحمن (1999). دراسة مقارنة للصفات الكيموحيوية لعزلة محلية وسلالة مستوردة من بكتريا Lactobacillus acidophillus واستخدامها في تصنيع منتجات علاجية. رسالة دكتوراه ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد.
34. MacGroarty, J. A.; Rosanne, A. and Roger, L. Cook. (1998). Lactobacillus inhibitor production against E. coli Coaggregation ability with uropathogens. Can. J. Micro. 34: 344 –351

35. Smulder, F. J.M.; Barendson, P.; Vanlogtestijn, J.G.; Mossel, D.A.A. and Yan Der Marel, G.M. (1986). Review: Consideration in favour of it's acceptance as meat decontamenant. J.Food Tech.21: 419-436.26.

36.Adams, M.R. and Hall, C.J. (1988). Growth inhibition of food – borne pathogens lactic and acetic acid and their mixtures.Int.J.Food.Sci.Techno.23: 287-292.

37. Bhowmik, T.; Johnson, M.C. and Ray, B. (1986). Cellular damage in dried Lactobacillus acidophillus. J. of Food prod. 49,No.1.

38. Sharpe, M.E.; Fryer, T.F. and Smith, D.G. (1972). Identification of lactic acid bacteria .In: "Identification methods for microbiologist " Skinner, F. A. ED. Academic press. London.