بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از دستگاه گوارش ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*)

- **عاطفه بزرگی‌ماکرانی**: گروه زیست‌شناسی و علوم پزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
- **شهلا جمیلی**: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- **امید خان‌محمدی‌اطاقسرا***: گروه زیست‌شناسی و علوم پزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

چکیده

باکتری‌های اسیدلاکتیک، متداول‌ترین نوع باکتری‌هایی هستند که به‌عنوان پروبیوتیک معرفی شده‌اند. درمطالعه حاضر ابتدا به‌منظور جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک، نمونه‌گیری از روده ماهی اسکار انجام شد و مقاومت به املاح صفراوی، تحمل شرایط اسیدی و قابلیت تخمیر قندها مورد بررسی قرارگرفت. در این تحقیق، از روده ۵۰ ماهی اسکار نمونه‌برداری صورت گرفت و درمحیط کشت MRS براث کشت داده شد. برای رسیدن به این هدف، باکتری‌های اسیدلاکتیک توسط روش‌های فنوتیپی (رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست حرکت و تست‌های بیوشیمیایی) جداسازی شدند و شاخص‌های اولیه پروبیوتیکی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس برای شناسایی مولکولی با جفت آغازگرهای اختصاصی (پرایمر)، ژن ۱۶s rDNA باکتری‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casi* با استفاده از PCR تکثیر داده شد. سپس با استفاده از الکتروفورز باند اختصاصی نوع باکتری اسیدلاکتیک مشخص گردید. در پایان تحقیق، بعد از رنگ‌آمیزی و تست PCR، از بین ۵۰ نمونه به تعداد ۲۱ نمونه مثبت *Lactobacillus acidophilus* و ۱۸ مورد *Lactobacillus casei* شناسایی و گزارش گردید.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیل اسیدو فیلوس، لاکتو باسیلوس کازئی، ماهی اسکار، پروبیوتیک

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: bio_kh@yahoo.com

مقدمه

پروبیوتیک‌ها با استقرار در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن‌ها ایجادکنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و بیماری‌زا شوند (Andanil و همکاران، ۲۰۱۲؛ Klaenhammer، ۲۰۰۰). باکتری‌های اسیدلاکتیک مهم‌ترین میکرواورگانیسم‌های پروبیوتیک بوده که شامل باکتری‌های متنوعی مانند لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم است. لاکتو باسیل‌ها، باسیل گرم مثبت، بدون حرکت، بدون اسپور وکاتالاز منفی هستند و قندهای مختلف را به لاکتات و استات تبدیل می‌کنند (Jean Guy و همکاران، ۲۰۱۴؛ Forbes، ۲۰۱۳).هم‌چنین لاکتوباسیلوس‌ها دارای اثر آنتاگونیستی خوبی بر استافیلوکوک اورئوس، اشریشیاکلی و آئروموناس هیدروفیلا هستند (صالحی، ۱۳۹۲). اکثر لاکتوباسیل‌ها بی‌خطر بوده و ممکن است آنتاگونیست باکتری‌های پاتوژن باشد، اثرات ضدمیکروبی برخی از لاکتوباسیل‌ها شناسایی شده است. برای مثال لاکتوباسیلوس‌ها توانایی مهار رشد ویبریو و آئروموناس را دارا می‌باشند که می‌توان از این باکتری در تغذیه آبزیان در حوضه آبزی پروری و با توجه به بیماری‌های مختلف آبزیان، در جهت مهار یا کاهش خطر بیماری‌ها استفاده نمود (Allameh و همکاران، ۲۰۱۷). مهم‌ترین فعالیت پروبیوتیک‌ها در لوله گوارش ماهی، از طریق بهبود جذب غذا با تولید آنزیم‌های خارج سلولی و ویتامین‌ها است. نتایج آزمایشات مختلف نشان داده‌است که رشد، درصد افزایش وزن، سرعت رشد ویژه، راندمان مصرف خوراک، نسبت راندمان پروتئین و افزایش پروتئین در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک بیش‌تر بوده است (جعفریان و همکاران، ۱۳۸۸). تاثیر مهم دیگر پروبیوتیک‌ها کاهش میزان بروز و شیوع بیماری‌ها، تقویت سیستم‌ایمنی و فعالیت‌های ضدویروسی است (Behnsen و همکاران، ۲۰۱۳). ماهی اسکار با نام علمی *Astronotus ocellatus*، از شناخته شده‌ترین ماهیان زینتی گوشت‌خوار و از خانواده Chichlidae است این ماهی در آب‌های شیرین زندگی می‌کند و بومی رودخانه‌های آمازون، پاراگوئه و شرق ونزوئلا است (Froese و Pauly، ۲۰۰۷). طول این ماهی در زیستگاه طبیعی به ۶۰ سانتی‌مترهم می‌رسد. ولی در فضای بسته مانند آکواریوم، تقریباً تا ۴۵-۴۰ سانتی‌متر بیش‌تر رشد نمی‌کند. دمای مورد نیاز برای نگه‌داری اسکار ماهی ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد pH=۶-۸ وسختی کل ۸-۵میلی‌گرم‌برلیتر کربنات‌کلسیم است (Kullander، ۲۰۰۷). برای شناسایی باکتری از روش مولکولی (PCR) و بیوشیمیایی، شامل تخمیر قندها، مقاومت به املاح صفراوی و تحمل شرایط اسیدی انجام شد. در روش مولکولی با استفاده از آغازگر یا پرایمرهای ژن اختصاصی ۱۶S rRNA، برای تشخیص جنس‌های لاکتوباسیل‌ها، مورد استفاده قرار گرفت که در بانک ژن (NCBI) ثبت می‌باشد، استفاده گردید. سپس پرایمر مخصوص باکتری طراحی شد (Noraphat، ۲۰۱۰؛ Kwon و همکاران، ۲۰۰۴؛ Hajibabaei و همکاران، ۲۰۰۲).

مواد و روش‌ها

به تعداد ۵۰ عدد نمونه با میانگین طولی ۸-۵ سانتی‌متری و با میانگین وزن ۱۰-۸ گرمی را به‌صورت تصادفی از مراکز فروش ماهی زینتی، در نقاط مختلف جمع‌آوری گردید. سپس نمونه‌گیری از روده ماهی انجام گرفت و در محیط کشت MRS براث، کشت داده شد و در جار بی‌هوازی با شرایط میکروائروفیلیک (گاز پک C) در انکوباتور به مدت زمان ۲۴ الی ۴۸ انکوبه گردید بعد از رشد باکتری‌ها دوباره از آن نمونه‌برداری کرده و در محیط MRS آگار کشت داده بعد از زمان انکوبه کلنی موردنظر رابرداشته و رنگ‌آمیزی گرم انجام می‌دهد (Dimitonova و همکاران، ۲۰۰۸).درصورت مثبت بودن که باسیل گرم مثبت می‌باشد که تست کاتالاز و تست حرکت را در محیط SIM انجام داده در صورت منفی بودن دوباره از کلنی مورد نظر برداشته و برای انجام عمل PCR کشت می‌دهد.استخراج DNA از تمام ایزوله‌ها جداسازی شده و با استفاده از روش C-TAB (Cardinal و همکاران، ۱۹۹۷) و لیز بافر انجام شد. ترکیبات لیز بافر شامل تریس ۱ مولار با pH= ۷/۵، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، SDS ۲ درصد و آب مقطر می‌باشد. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز یک درصد برای الکتروفورز استفاده به‌عمل آمد. بعد از استخراج DNA، پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه ۱۶s rRNA برای سویه‌های لاکتوباسیلوس با توالی‌های ۱۶s rRNA موجود در سایت بانک ژنی NCBI طراحی گردید. پرایمر اختصاصی از شرکت سیناژن جهت تکثیر قطعه ژنی ۱۶SrRNA استفاده گردید (Kwon و همکاران، ۲۰۰۴). بعد از عمل PCR و برای تایید ژن، از الکتروفورز استفاده نموده، تا باندهای اختصاصی را با توجه به مارکر مشخص شود، با پیدا شدن باند مورد نظر با توجه به پروتکل، نمونه‌های مثبت (که دارای جفت باز مورد نظر و یا همان ژن اختصاصی) مشخص و شناسایی شد و محصول PCR از طریق ترادف‌سنجی و مقایسه ترادف آن با ترادف‌های موجود در بانک ژنی مورد تایید قرار گرفت.

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازیی که طراحی گردید و در PCR استفاده شد

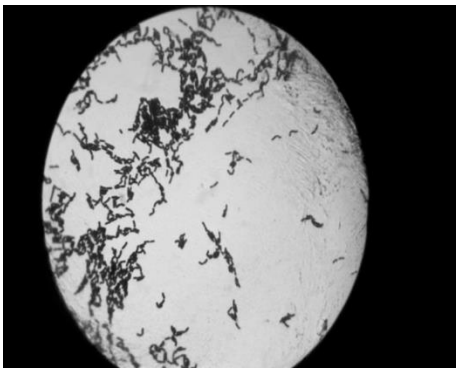
پرایمر اختصاصی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	LF (۵'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG۳')
	LR (۵'AAGGTTACCTCACCGACTTC۳)'
پرایمر اختصاصی لاکتوباسیلوس کازیی	F (۵'CAGACTGAAAGTCTGACGG۳')
	R (۵'GCGATGCGAATTTCT TTTTC ۳')

نتایج

از بین ۵۰ نمونه روده ماهی که به‌صورت تصادفی از مراکز فروش ماهیان زینتی انتخاب شدند در محیط کشت MRS براث کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی انکوبه شد سپس از محیط کشن مایع به محیط کشت MRSجامد انتقال داده شد بعد از مدت ۲۴ ساعت به بررسی کلنی‌ها پرداخته شد. در رنگ‌آمیزی گرم ۵۰ باسیل گرم مثبت جدا شد که همگی کاتالاز و حرکت منفی بودند. نمونه باکتری‌ها با پرایمرهای اختصاصی (جدول۱) توسط دستگاه ترموسایکلر عمل PCR انجام گرفت و از ۵۰ نمونه باکتری به تعداد ۲۱ نمونه *Lactobacillus acidophilus* و ۱۸ مورد *Lactobacillus casei* گزارش گردید (جدول ۲).

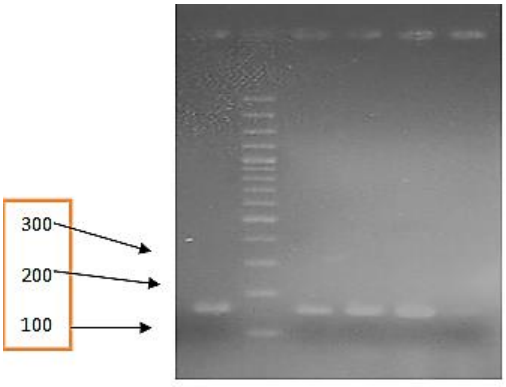
جدول۲: انواع باکتری‌های جدا شده از روده ماهی اسکار

جمع نمونه‌ها	لاکتوباسیل اسیدوفیلوس	لاکتوباسیل کازئی	سایر باکتری‌ها
۵۰	۲۱	۱۸	۱۱

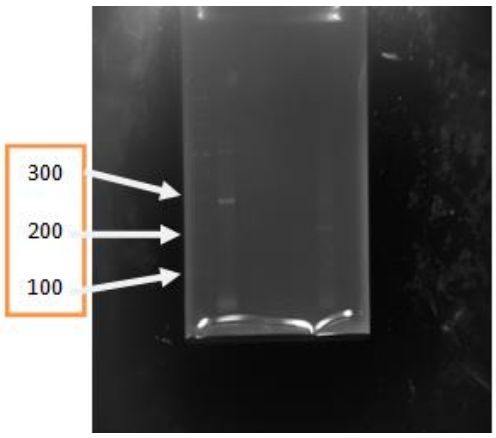


شکل ۱: رنگ‌آمیزی گرم

نتایج PCR: بعداز PCR و انجام الکتروفورز نتایج جفت باز براساس مارکر در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱۹۹ جفت باز و در لاکتوباسیلوس کازئی ۲۹۹جفت باز بوده است (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۲: الکتروفورز اختصاصی *L. acidophilus*



شکل ۳: الکتروفورز اختصاصی *L. casei*

نتایج حاصل از تعیین مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی بر طبق پیشنهاد ارائه شده توسط Chateau و همکاران (۱۹۹۴) که چهار گروه متمایز، براساس تاخیر رشد ایجاد شده به‌وسیله نمک‌های صفراوی تشخیص داده بودند، تحلیل گردیدند (جدول۳): سویه‌های مقاوم (دارای تاخیر رشدی مساوی یا کم‌تر از ۱۵ دقیقه)، سویه‌های با تحمل بالا (تاخیر رشدی بین ۱۵ و ۴۰ دقیقه)، سویه‌های با تحمل ضعیف (تاخیر رشدی بین ۴۰ و ۶۰ دقیقه)، گونه‌های حساس (تاخیر رشدی بیش از ۶۰ دقیقه)

جدول ۳ : تعیین مقاومت به نمک‌های صفراوی

تاخیر رشد(d) برحسب دقیقه	d≤۱۵	۴۰≤d≤۱۵	۶۰≤d≤۴۰	d≥60
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس		+		
لاکتوباسیلوس کازیی	+			

نتایج حاصل از تعیین مقاومت سویه‌ها به اسید (HCL=۴/۵) که در محیط کشت MRS مایع در طول موج۶۲۰ نانومتر بررسی و گزارش شد (جدول۴).

جدول ۴: تعیین درصد بقا ایزوله ها در pH= ۴،۵ به مدت ۱ ساعت

باکتری	کم‌تر از ۱۰ ٪	بین ۱۰ تا ۶۰ ٪	بین ۶۰ تا۸۰٪	بیش از ۸۰٪
لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس		*		
لاکتو باسیلوس کازئی		*		

تخمیر قند: که از قندهای مختلف استفاده گردید و باکتری اسیدلاکتیک توانایی تخمیر برخی از قندها را دارد که در جدول ۵ نتایج آن گزارش گردید.

جدول ۵ : تست تخمیر قند

	Lactobacillus acidophilus	*Lactobacillus casei*
سلوبیوز	+	+
لاکتوز	+	+
مانیتول	–	+
رافینوز	-	+
گالاکتوز	+	+
ملی بیوز	-	-
سوکروز	+	+
مالتوز	+	+
مانوز	+	+
ترهالوز	+	+
سوربیتول	-	+
آسکولین	+	+

بحث

در این پژوهش، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در محیط MRS، با انجام تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی از دستگاه گوارش ماهی جدا شدند و توان پروبیوتیکی آن‌ها با تست مقاومت به املاح صفراوی، محیط اسیدی و تخمیر قند بررسی شد.

در سایر تحقیق های انجام شده که توسط Diaz و همکاران (۲۰۱۳) صورت گرفت، گونه‌های لاکتو باسیل را از دستگاه گوارش دولفین جدا کردند و نشان دادند که لاکتوباسیل‌ها در سلامت در پستانداران دریایی نقش مهمی دارد. از ویژگی دیگر که مربوط به باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد تحمل املاح صفراوی است. صفرا نقش اساسی در مکانیسم دفاعی روده بازی می‌کند که لاکتو باسیل اسیدوفیلوس در بازه زمانی ۱۵-۴۰ دقیقه و لاکتو باسیلوس کازئی در بازه زمانی ۴۰-۶۰ دقیقه دارای مقاومت بوده است (جدول۳)، که تحقیق حاضر با بررسی Chateau و همکاران (۱۹۹۴) و تاثیر نمک‌های صفراوی را در زیر یک ساعت و مقایسه با نمونه شاهد بررسی کردند، مطابقت دارد. که این مقاومت ناشی از هیدرولیز آنزیمی توسط لاکتوباسیل‌ها می‌باشد که نهایتاً لاکتوباسیل‌ها باعث کاهش اثر دترجنتی نمک‌های صفراوی می‌شود (Maragkoudakis و همکاران، ۲۰۰۶).

در مطالعه حاضر سویه‌ها از نظر تحمل در برابر شرایط اسیدی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۴) که بعد از مدت یک ساعت، روند کاهشی از تحمل لاکتوباسیل را شاهد بود که با نتایج Succi و همکاران (۲۰۰۵) و هم‌چنین با نتایج محمدیان و همکاران (۱۳۹۳) نیز هم‌خوانی دارد. باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی نیز می‌توانند با تولید اسیدلاکتیک و کاهش pH و تولید ترکیبات ضدمیکروبی مانند پراکسید هیدروژن، باکتریوسین‌ها، اتانل، آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات دیگر مانع رشد سایر باکتری‌های بیماری‌زا شوند (خنافری و همکاران، ۱۳۸۸؛ Aroutcheva و همکاران، ۲۰۰۱).

آزمایش تست تخمیر قند هم صورت گرفت. که نتایج آن در جدول ۵ ثبت شده است (Harrigan و McCance، ۱۹۷۶) که نتایج حاصله با نتایج فرح‌بخش و همکاران (۱۳۹۲) مطابقت دارد. هم‌چنین با نتایج محمدیان و همکاران (۱۳۹۳) نیز مطابقت دارد.

با توجه به این که تحقیقات متعددی مبنی بر نقش حیاتی لاکتوباسیل‌ها در ارتقا سلامت جانوران از طریق جلوگیری از ابتلا به بیماری‌های مختلف و افزایش راندمان رشد ایفا می‌کند، باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده در این مطالعه می‌توانند در آینده به‌عنوان پروبیوتیک در محصولات انسانی و آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

۱. **جعفریان، ح.؛ طاعتی‌کلی، م. و نظرپور، ع.، ۱۳۸۸.** بررسی اثر باسیل‌های پروبیوتیکی بر رشدلارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchusmykiss*) ازطریق مکمل‌سازی با آرد دافنی ماگنا (*Daphnia magna*). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. دوره ۱۶، شماره ۳، صفحات ۴۸ تا ۵۹.

۲. **خنافری، آ.؛ اسماعیل‌زاده، م. و اخوان‌سپهی، ع.، ۱۳۸۸.** ارزیابی توان تولید لاکتوسین‌ها توسط سویه‌های پروبیوتیکی در نمونه ماست‌های محلی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال ۴، شماره ۱، صفحات ۶۷ تا ۷۸.

۳. **صالحی، م.، ۱۳۹۲.** ارزیابی اثر آنتاگونیستی لاکتوباسیل‌های جدا شده از مواد غذایی بومی ایران. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی. دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۷۹ تا ۸۴.

۴. **فرح‌بخش، م.؛ حکیمی، ح.؛ بهرام‌آبادی، ر. و ذولفقاری، ن.، ۱۳۹۲.** جداسازی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک از ماست سنتی مناطق روستایی رفستجان و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن‌ها. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. دوره ۱۲، صفحات ۷۳۳ تا ۷۴۶.

۵. **محمدیان، ت.؛ قربانپور، م.؛ علیشاهی، م.؛ تابنده، م. و غریبی، د.، ۱۳۹۳.** جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شربت. مجله دامپزشکی ایران. سال ۱۰، شماره ۲، صفحات ۸۸ تا ۹۷.

۶. **میر داوودی، ف.؛ قائمی، ن.؛ میرپور، م. و کاظمی‌درسنکی،ر .، ۱۳۹۰.** اثر محیط کشت برفعالیت‌های متابولیکی و ضدباکتریایی پروبیوتیک‌ها. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم. دوره ۵، شماره ۴، صفحات ۴۳ تا ۵۸.

۷. **Allameh, S.K.; Noamanand, V. and Nahavandi, R., 2017.** Effects of probiotic Bacteria on Fish Performance. Advanced Techniques in Clinical Microbiology. Vol. 1, No. 2, pp: 11-28.

۸. **Aroutcheva Alla, A.; Simoes Jose, A. and Sebastian, F., 2001.** Antimicrobial protein produced by vaginal Lactobacillus acidophilus that inhibits Gardnerella vaginalis. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Vol. 9, No. 1, pp: 33-39

۹. **Andanil H.R.; Tukmechi, A.; Meshkini, S. and Sheikhzadeh, N., 2012.** Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines andinvestigation of their effects on growth performance and immune response in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Ichthyology. Vol. 8, No. 5, pp: 728-734

۱۰. **Behnsen, J.; Deriu, E.; Sassone-Corsi, M. and Raffatellu, M., 2013.** Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. Cold Spring Harb Perspect Med. Mar. Vol. 3, No. 3, pp: 74-92.

۱۱. **Cardinal, M.J.; Meghrous jlacroix, C. and Simard, R.E., 1997.** Isolation of lactococcus lactic strain producing inhibitory activity against listeria. food Biotechnology. Vol. 11, pp:129-146.

۱۲. **Chateau, N.; Deschamp, A.M. and Hadj Sassi, A., 1994.** Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology. Vol. 18, PP: 42-44.

۱۳. **Dimitonova, S.P.; Bakalov, B.V.; Aleksandrova Georgieva, R.N. and danova, S.T., 2008.** Phenotypic and molecular identification of Lactobacilli from vaginal secretions. Journal of Microbiology, lmmunology and Infection. Vol. 41, No. 6, pp: 469-477.

۱۴. **Diaz, M.A.; Bik, E.M.; Carlin, K.P.; Venn-Watson, S.K.; Jensen, E.D.; Jones, S.E.; Gaston, E.P.; Relman, D.A. and Versalovic, J., 2013.** Identification of Lactobacillus strains with probiotic features from the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). J Appl Microbiol. Vol. 115, No. 4, pp: 1037-1051.

۱۵. **Froese, R. and Pauly, D., 2007.** *Astronotus ocellatus*, Oscar. FishBase. Retrieved. Vol. 3, pp: 11-16.

۱۶. **Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S., 2013.** Diagnostic Microbiology. 13th, Mosby Elsevier, Philadelphia, America. pp: 10-59

۱۷. **Jacobsen, C.N.; Rosenfeldt Nielsen, V.; Hayford, A.E.; Møller, P.L.; Michaelsen, K.F. and Paerregaard, A., 1999.** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl Environ Microbiol. Vol. 65, No. 11, pp: 4949-56.

۱۸. **Jean Guy, L.; Alejandra, de M.; de LeBlanc, R.; Pinheiro, de K.; Oliveira, S. and Svetoslav, D.T., 2014.** Use of Synbiotics (Probiotics and Prebiotics) to Improve the Safety of Foods.

۱۹. **Hajibabaei, M.; Singer, A.C.; Hebert, D.N. and Hickey, A., 2002.** DNA barcoding: how it comoplements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends in Genetics. Vol. 6, pp: 520-526.

۲۰. **Harrigan, W.F. and McCance, M.E., 1976.** Biochemical test for bacteria laboratory method in food and dairy microbiology. Academic Press. London, New York.

۲۱. **Klaenhammer, T.R., 2000.** Probiotic bacteria: today and tomorrow. Jour of Nutrition. Vol. 130, No. 2, pp: 415-416.

۲۲. **Kullander, S.O., 2007.** Cichlids: Astronotus ocellatus. Swedish Museum of Natural History. Retrieved. Vol. 03, pp: 16-27.

۲۳. **Kwon, H.; Sang, Y.; Eun-Hee, Y.; Seung-Woo, K.; Byoung-Hwa, K. and Tae-Yong, C., 2004.** Rapid identification of probiotic Lactobacillus species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. Vol. 239, No. 2, pp: 267-275.

۲۴. **Maragkoudakis, P.A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B. and Tsakalidou, E., 2006.** Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from

dairy products. Int. Dairy Journal. Vol. 16, No. 3, pp: 189-199

۲۵. **Noraphat, H.; Nisit, W.; Siriporn, R.; Soottawat, B.; Aran, K.H. and Suppasil, M., 2010.** Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolatscreening, inhibition of pathogenic bacteria. International Journal of Food Science and Technology. Vol. 45, No. 3, pp: 594-601.

۲۶. **Succi, M.; Tremonte, P.; Reale, A.; Sorrentino, E.; Grazia, L. and Pacifico, S., 2005.** Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiol. Vol. 244, No. 1, pp: 129-137