الجمهوريّـــة العربيّـــة السّوريّـــة
جـــــامـعـة حـمـــــــــــاة
كليّـــــــة الطّـــــب البيـــطري
قسم الصحة العامة والطب الوقائي

تأثير التغليف الدقيق للمعززات الحيوية في فعاليتها وانعكاسه على المؤشرات الصحية لدجاج اللحم

أطروحة اعدت لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الطبية البيطرية

اختصاص الصحة العامة والطب الوقائي

إعداد طالب الدراسات العليا

مبارك ماجد السعد

المشرف العلمي

أ.م.د. عبد الكريم حلاق

حماة

1448هـ - 2026م

فهرس المحتويات

الفصل	قائمة المحتويات	الصفحة
	فهرس المحتويات	I
	قائمة الجداول	V
	قائمة المخططات	VIII
	قائمة الصور	IX
	قائمة الاختصارات	X
	ملخص البحث باللغة العربية	XI
الفصل الأول	المقدمة وأهداف البحث	1
1-1	المقدمة	1
2-1	أهداف الدراسة	5
الفصل الثاني	الدراسة المرجعية (Literature Review)	6
1-2	الأغذية الوظيفية	6
2-2	المعززات الحيوية	8
1-2-2	الخصائص الواجب توافرها في المعززات الحيوية	10
2-2-2	آليات عمل الجراثيم النافعة او المعززات الحيوية	10
3-2-2	المعززات الحيوية وصحة المضيف	11
4-2-2	بعض الفوائد الصحية للمعززات الحيوية	14
5-2-2	جراثيم حمض اللبن	26
6-2	التغليف الدقيق	36
6-6-2	التقنيات المستعملة في تغليف المعززات الحيوية	43

الفصل الثالث	المواد وطرائق العمل (Materials and Methods)	49
1-3	مكان وزمان إجراء الدراسة	49
2-3	المواد المستخدمة	49
1-2-3	العينات	49
2-2-3	الأوساط المزرعية	49
3-2-3	الصبغات	50
4-2-3	الكواشف	50
5-2-3	المحاليل	51
6-2-3	المضادات الحيوية المستخدمة في اختبارات الحساسية الدوائية	51
7-2-3	المواد الكيميائية	52
8-2-3	الأجهزة المستخدمة	53
3-3	طرائق البحث	54
2-3-3	تحضير الكواشف والمحاليل	55
3-3-3	تحضير العينات	58
2-1-3-3-3	تأكيد هوية عزلات (*Lactobacillus*) باستخدام PCR	61
2-3-3-3	حساسية عزلات جراثيم *Lactobacillus* للمضادات الحيوية	63
1-2-3-3-3	دراسة التأثير التثبيطي خارج الجسم الحي	63
3-3-3-3	التغليف	65
4-3-3-3	عيوشية *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف ومقاومتها لبعض الظروف المتطرفة	68
5-3-3-3	تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات السليمة والمريضة	70
5-3-3	التحليل الاحصائي	72

الفصل الرابع	النتائج (Results)	73
1-4	عزل جراثيم *Lactobacillus*	73
2-4	الحساسية للمضادات الحيوية	76
1-2-4	التأثير المضاد لجراثيم *Lactobacillus* على بعض الجراثيم الممرضة	78
3-4	تغليف جراثيم *Lactobacillus*	80
4-4	تأثير عملية التغليف على تعداد *Lactobacillus* عند تعريضها لبعض الظروف الفيزيائية والكيميائية	83
1-4-4	طول مدة التخزين	83
2-4-4	تأثير المعاملة الحرارية في عيوشية جراثيم *Lactobacillus*	86
3-4-4	مقاومة *Lactobacillus* للحموضة المتطرفة	91
4-4-4	مقاومة *Lactobacillus* لأملاح الصفراء	100
5-4	تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات السليمة	109
6-4	تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات المريضة	112
7-4	الجدوى الاقتصادية	115
الفصل الخامس	المناقشة (Discussion)	118
1-5	عزل *Lactobacillus*	118
2-5	الحساسية الدوائية لجراثيم *Lactobacillus*	119
1-2-5	التأثير المضاد لجراثيم *Lactobacillus* على بعض الجراثيم الممرضة	120
3-5	التغليف الدقيق لجراثيم *Lactobacillus*	123
4-5	عيوشية *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف ومقاومتها لبعض الظروف المتطرفة	125
1-4-5	تأثير المعاملة الحرارية في عيوشية *Lactobacillus*	125
2-4-5	مقاومة *Lactobacillus* للحموضة المتطرفة	128
3-4-5	مقاومة *Lactobacillus* لأملاح الصفراء	132
4-4-5	التخزين	134
5-5	تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات السليمة	136
6-5	تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات المريضة	139

الفصل السادس	الاستنتاجات والتوصيات (Conclusions and Recommendations)	143
1-6	الاستنتاجات	143
2-6	التوصيات	144
الفصل السابع	المراجع (References)	145
1-7	المراجع العربية	145
2-7	المراجع الأجنبية	146
	المحلق (Appendice)	183
	ملخص البحث باللغة الانكليزية	

قائمــة الجداول List of Tables

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1	الأحياء الدقيقة التي تعتبر من البروبيوتيك	9
2	بعض التقنيات الرئيسية المستخدمة لتغليف المعززات الحيوية	48
3	الأوساط المزرعية والمواد المستخدمة في الاختبارات	49
4	الكواشف الكيميائية المستخدمة في الاختبارات	50
5	المحاليل المستخدمة في الاختبارات	51
6	أقراص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية ورمزها	51
7	المواد الكيميائية المستخدمة في الاختبارات	52
8	الأجهزة المستخدمة	53
9	تسلسل البرايمرات المستخدمة للكشف عن *Lactobacillus*	62
10	برنامج اللقاح المتبع لتحصين الطيور	71
11	أنواع العزلات وعددها	73
12	حساسية عزلات *Lactobacillus* لبعض المضادات الحيوية	76
13	متوسط أقطار (ملم) مناطق التثبيط لعزلات جراثيم *L. Plantarum* و *L. acidophilus* ضد الجراثيم الممرضة	78
14	تـأثير التغليف الدقيق في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus*	80
15	معدل حجم وقطر الكبسولات	82

16	تأثير التخزين على الاعداد الحية لجراثيم *L. acidophilus* و *L. plantarum*	84
17	تأثير البسترة البطيئة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دون تغليف	86
18	تأثير البسترة البطيئة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة	86
19	تأثير البسترة البطيئة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين	87
20	تأثير البسترة السريعة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دن تغليف	87
21	تأثير البسترة السريعة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة	88
22	تأثير البسترة السريعة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين	88
23	تأثير درجات مختلفة من الحموضة على الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دون تغليف.	92
24	تأثير درجات مختلفة من الحموضة على الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة	95
25	تأثير درجات مختلفة من الحموضة على الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين.	98
26	تأثير تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء على الاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دون تغليف.	101
27	تأثير تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء على الاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة.	104
28	تأثير تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء على الاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين.	107

29	الحالة الصحية العامة لمجموعات التجربة السليمة خلال فترة التربية 42 يوم	109
30	متوسط الوزن الاسبوعي لطيور التجربة السليمة	109
31	متوسط الاستهلاك اليومي للعلف للطيور السليمة (غ)	110
32	نسبة التحويل العلفي اليومي للطيور السليمة	110
33	نسبة النفوق للطيور السليمة	111
34	الحالة الصحية العامة لمجموعات التجربة الممرضة خلال فترة التربية 42 يوم	112
35	متوسط الوزن الاسبوعي لطيور التجربة الممرضة	113
36	متوسط الاستهلاك اليومي للعلف للطيور الممرضة (غ)	113
37	نسبة التحوية العلفي اليومي للطيور الممرضة	114
38	نسبة النفوق للطيور الممرضة	114
39	الجدوى الاقتصادية	116
40	تأثير البروبيوتيك على أداء نمو الدواجن	183
41	تأثير البروبيوتيك على الاستجابة المناعية للدواجن	184
42	تأثير المعززات الحيوية في صحة الامعاء عن الدواجن	186

قائمــة المخططات List of Diagrams

رقم المخطط	عنوان المخطط	الصفحة
1	آلية التغليف	67
2	النسب المئوية للأعداد الحية لبكتيريا *Lactobacillus* بعد التغليف الدقيق	81
3	النسب المئوية لانخفاض الاعداد الحية *L. acidophilus* خلال مدة الخزن بدرجة حرارة 4 مْ	85
4	النسب المئوية لانخفاض الاعداد الحية *L. plantarum* خلال مدة الخزن بدرجة حرارة 4 مْ	85
5	النسب المئوية لانخفاض الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* بعد المعاملة بالبسترة البطيئة	89
6	النسب المئوية لانخفاض الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* بعد المعاملة بالبسترة السريعة	90
7	النسب المئوية للاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دون تغليف بعد المعاملة بدرجات حموضة مختلفة	93
8	النسب المئوية للاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة بعد المعاملة بدرجات حموضة مختلفة	96
9	النسب المئوية للاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين بعد المعاملة بدرجات حموضة مختلفة	99
10	النسب المئوية للاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف بعد المعاملة بأملاح الصفراء	102
11	النسب المئوية للاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة بعد المعاملة بأملاح الصفراء	105
12	النسب المئوية للاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين بعد المعاملة بأملاح الصفراء	108

قائمة الصور

رقم الصورة	اسم الصورة	الصفحة
1	جراثيم *Lactobacillus* مصبوغة بصبغة غرام	74
2	*Lactobacillus* على منبت MRS AGAR	74
3	نتائج الرحلان الكهربائي في هلام الآغاروز لنواتج التضخيم البوليميراز المتسلسل المتعدد (PCR) للكشف عن جينات أنواع اللاكتوباسيلس (bp 216) لـ 9 عزلات.	74
4	نمط الرحلان الكهربائي في هلام الأغاروز لنواتج التضخيم البوليميراز المتسلسل المتعدد (PCR) للكشف عن الجينات المميزة *L. plantarum* (147)	75
5	نمط الفصل الكهربائي في هلام الأغاروز لنواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد (PCR) للكشف عن الجينات المميزة *L. acidophilus* (129)	75
6	اختبار تحسس لجراثيم *L. acidophilas* اتجاه المضادات الحيوية	77
7	اختبار تحسس لجراثيم *L. Plantarum* اتجاه المضادات الحيوية	77
8	التأثير المضاد لـ *L. Plantarum* ضد المكورات العنقودية الذهبية	**79**
9	اختبار تحسس دوائي لجراثيم الإشريكية القولونية	**79**
10	اختبار تحسس دوائي لجراثيم المكورات العنقودية الذهبية	**79**
11	اختبار تحسس دوائي لجراثيم السلمونيلة	79
12	جراثيم Lactobacillus بعد التغليف الدقيق	81

جدول المصطلحات والمختصرات

المُختصرات Abbreviation	المصطلح باللغة الأجنبية	المصطلح باللغة العربية
FAO	Food and Agriculture Organization	منظمة الأغذية والزراعة
WHO	World Health Organization	منظمة الصحة العالمية
AAD	antibiotic associated diarrhea	الاسهال المصاحب لاستخدام المضادات الحيوية
LAB	Lactic Acid Bacteria	جراثيم حمض اللبن
REV	Rotavirus Enteritis	التهاب الأمعاء الفيروسي العجلي
TD	Traveller's diarrhea	إسهال المسافرين
CDAD	Clostridium difficile associated diarrhea	الإسهال المتسبب عن جراثيم المطثيات
FDA	Food and Drug Administration	منظمة الغذاء والدواء الأمريكية
ADG	Average Daily Gain	متوسط الزيادة الوزنية اليومية
ADFI	Average Daily Feed Intake	متوسط الاستهلاك اليومي من العلف
FCR	Feed Conversion Ratio	نسبة تحويل العلف
CDC	Centers for Disease Control	مركز السيطرة على الأمراض
EPEC	Enteropathogenic Escherichia coli	الإشريكية القولونية الممرضة للأمعاء
CFU	Colony- forming unit	الوحدة المشكلة للمستعمرات
MRS	DeMan-Rogosa-Sharpe	منبت دي مان - روجوزا - شارب
APEC	Avian Pathogenic Escherichia coli	الإشريكية القولونية الممرضة للطيور

ملخص البحث

ABSTRACT

الملخص

أدى الاستخدام المكثف للمضادات الحيوية كمحفزات نمو في صناعة الدواجن إلى ظهور مشاكل صحية خطيرة، أبرزها تطور المقاومة الجرثومية وتراكم البقايا الدوائية في المنتجات الحيوانية، مما دفع العلماء إلى البحث عن بدائل آمنة وفعالة مثل المعززات الحيوية (البروبيوتيك). إلا أن فعالية هذه المعززات تواجه تحديات كبيرة بسبب تعرضها للظروف القاسية في الجهاز الهضمي (حموضة المعدة، أملاح الصفراء) وأثناء التصنيع والتخزين، مما يقلل من أعدادها الحية ويحد من وصولها إلى الأمعاء بأعداد كافية لتحقيق فوائدها الصحية.

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم تأثير التغليف الدقيق لجراثيم *Lactobacillus* المعزولة من أمعاء دجاج اللحم في تعزيز بقائها حية تحت الظروف المتطرفة، ودراسة انعكاس ذلك على المؤشرات الصحية والأداء الإنتاجي للطيور السليمة والوقاية من الإصابة تجريبياً بجراثيم ممرضة.

شملت الدراسة عزل وتشخيص 16 عزلة من جراثيم *Lactobacillus* من 50 عينة من محتويات أمعاء دجاج اللحم. شخصت العزلات بطرق الزرع على المنابت التميزية والانتقائية، وأكّدت باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) حيث تم تحديد 9 عزلات تعود لنوع *L. plantarum* وعزلتين لنوع *L. acidophilus* أما باقي العزلات فقد أهملت. اختبر النوعين لدراسة فعاليتهما التثبيطية ضد جراثيم *E. coli* و*Salmonella* و*Staph. aureus*، ودراسة حساسيتهما للمضادات الحيوية. وبعدها تم تغليف العزلات بطريقتين: بطبقة واحدة من ألجينات الصوديوم 3%، وبطبقتين (ألجينات الصوديوم + كايتوسان 1%) باستخدام تقنية البثق. قُيّمت فعالية التغليف في حماية الجراثيم من خلال اختبارات المعاملات الحرارية (بسترة بطيئة وسريعة)، ومقاومة الحموضة (pH 1, 2, 3) وأملاح الصفراء (1%، 2%، 3%)، ودراسة الثباتية أثناء التخزين المبرد (4°م) لمدة 3 أشهر.

طبقت التجربة الحقلية على 648 طيراً من دجاج اللحم (ROSS 308) قسمت إلى مجموعتين رئيسيتين (سليمة ومصابة تجريبياً بالإشريكية القولونية) ضمن تصاميم تجريبية مختلفة لتقييم تأثير المعززات غير المغلفة والمغلفة (بجرعة 10^8 CFU/kg) في مؤشرات النمو (الوزن، الاستهلاك العلفي، معامل التحويل، نسبة النفوق) والصحة العامة.

أظهرت العزلات صفات جراثيم حمض اللاكتيك (إيجابية غرام، سلبية الكاتالاز).

وأظهرت كل من *L. acidophilus* و *L. plantarum* قدرة تثبيطية واضحة ضد الجراثيم الممرضة الثلاث، خاصة في الراشح الجرثومي، وكانت فعالية التثبيط أكبر ضد المكورات العنقودية الذهبية.

أظهرت العزلات مقاومة تامة لبعض المضادات الحيوية (أموكسيسلين، إريثرومايسين، سيفالكسين) وحساسية لأخرى (سبيرامايسين، كولستين، دوكسي سايكلين، فوسفومايسين، سيبروفلوكساسين).

أدت عملية التغليف إلى انخفاض في الأعداد الحية مقارنة بالشاهد قبل التغليف، لكنها حافظت على أعداد عالية كافية لتحقيق الفائدة الصحية، إذ كانت الأعداد الحية لكل من *L. acidophilas , L. Plantarum* (13.33) (13.21) $\log_{10}$ cfu\ml على التوالي قبل عملية التغليف الدقيق، ثم انخفضت أعدادها الحية بعد عملية التغليف الدقيق بطبقة واحدة إلى (11.67) (10.56) $\log_{10}$ cfu\g على التوالي، وانخفضت أعدادها الحية بعد التغليف بطبقة ثانية إلى (10.92) (10.16) $\log_{10}$ cfu\g على التوالي.

حقق التغليف بطبقتين أفضل حماية للجراثيم ضد البسترة البطيئة والسريعة، حيث بلغت النسب المئوية للبقاء 84.61% لـ *L. acidophilus* و80.01% لـ *L. plantarum* في البسترة البطيئة، مقارنة بـ 29.03% و25.13% على التوالي في الشاهد غير المغلف.

أظهر التغليف بطبقتين تفوقاً واضحاً في حماية الجراثيم عند pH 2 و3 ولمدة 3 ساعات (7.73 – 6.88) $\log_{10}$ cfu\g. أما عند pH 1، ففشلت الطبقة الواحدة في حماية الجراثيم (1.53– 0) $\log_{10}$ cfu\g بينما حافظت الطبقتان على أعداد حية بلغت (5.64 – 3.41)$\log_{10}$ cfu\g .

حسّن التغليف بطبقتين بشكل كبير من بقاء الجراثيم في تراكيز أملاح الصفراء المختلفة (1%، 2%، 3%)، مع نسب بقاء عالية جداً (أكثر من 96% في تركيز 1%).

حافظ التغليف بطبقتين على أعلى نسبة بقاء للجراثيم خلال ثلاث أشهر تخزين مبرد (96.98% لـ *L. acidophilus* و 95.28% لـ *L. plantarum*) مقارنة بالشاهد (91.38% و 88.35%) على التوالي.

تفوقت المجموعة التي تم تغذيتها على المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين معنوياً ($P\leq0.05$) في الوزن النهائي (3291 غ) ومعامل التحويل العلفي (1.586) وأقل نسبة نفوق (1.38%) مقارنة بباقي المجموعات (الشاهد، المضاد الحيوي، المعزز غير المغلف، والمغلف بطبقة واحدة).

أظهرت المجموعة التي تغذت على المعزز المغلف بطبقتين قبل التحدي الجرثومي مقاومة عالية للعدوى، حيث سجلت أعلى وزن نهائي (3101 غ) وأقل نسبة نفوق (4.16%) مقارنة بمجموعة التحدي غير المعالجة التي سجلت أعلى نفوق (30.55%) وأدنى وزن.

يؤكد التغليف الدقيق بطبقتين (ألجينات الصوديوم والكايتوسان) فعاليته العالية في حماية جراثيم *Lactobacillus* من الظروف القاسية أثناء التصنيع والتخزين والمرور عبر الجهاز الهضمي. وذلك يؤدي إلى تحسين وصول أعداد حية وكافية من الجراثيم النافعة إلى الأمعاء، مما ينعكس إيجاباً على صحة الطيور وأدائها الإنتاجي، ويعزز قدرتها على مقاومة التحديات المرضية. تشير النتائج إلى أن استخدام المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين يمثل استراتيجية واعدة وفعالة كبديل آمن للمضادات الحيوية المعززة للنمو في صناعة دجاج اللحم، مما يسهم في إنتاج دواجن أكثر صحة وأماناً للمستهلك.

الكلمات المفتاحية: التغليف الدقيق، معزز حيوي، ألجينات الصوديوم، الكايتوسان، دجاج اللحم.

الفصل الأول

المقدمة
والأهداف

INTRODUCTION
& OBJECTIVES

المقدمـــــة
Introduction

1 – 1 المقدمة Introduction

منذ أوائل الخمسينيات من القرن الماضي، تم استخدام المضادات الحيوية كمحفزات النمو على نطاق واسع لتعزيز أداء النمو والحماية من الأمراض في صناعة الدواجن. ولكن الاستخدام المكثف لمحفزات النمو بالمضادات الحيوية، كان سبباً في العديد من العواقب الوخيمة، بما في ذلك تطور مسببات الأمراض المقاومة للأدوية، وبقايا المضادات الحيوية في منتجات الدواجن، واختلال توازن الجراثيم المعوية، وبالتالي، تم حظر استخدامها كإضافات للأعلاف في أوروبا (منذ عام 2006)، والولايات المتحدة (منذ عام 2014)، والصين (منذ عام 2020)(Dong *et al*., 2016; Xu *et al*., 2021). يلعب المجتمع الميكروبي المتنوع والمعقد دوراً أساسياً في هضم الطعام وامتصاص العناصر الغذائية، واستبعاد مسببات الأمراض، وتطور الجهاز المناعي، ويعزز الصحة العامة للمضيف (Wang *et al*., 2017; Shang *et al*., 2018) ومع ذلك، قد يؤدي اختلال توازن ميكروبات الأمعاء بسبب المضادات الحيوية إلى حالة مرضية تؤثر على صحة الحيوانات. لذلك، لتحسين الأحياء الدقيقة للأمعاء، وتحسين أداء النمو، وتحسين صحة الدواجن، اقتُرحت بدائل آمنة وفعّالة مثل البروبيوتيك، البريبيوتيك، السينبيوتيك، الفايتوبيوتيك العاثيات، الإنزيمات الخارجية، الأحماض العضوية، والببتيدات المضادة للميكروبات وغيرها (Huyghebaert *et al*., 2011; Yadav and Jha, 2019; Albaker *et al*., 2026).

البروبيوتيك هي ميكروبات حية، وعند تناولها تُضفي فوائد صحية (Vivek *et al*., 2023)، من خلال تعديل ميكروبات الأمعاء. وقد أشارت دراسات سابقة، بناءً على العديد من الأبحاث، إلى أن البروبيوتيك يُحسّن أداء الدواجن وصحة أمعائها من خلال تعديل مجتمع الميكروبيوم المعوي، وتقليل الالتهابات، وتحفيز الجهاز المناعي، وتقليل إفراز الأمونيا واليوريا (Jha *et al*., 2020) ومن ناحية أخرى، لوحظ أيضاً أن أنواع البروبيوتيك نفسها قد تُظهر نتائج متفاوتة، وبعضها لا يُحسّن الأداء أو صحة الأمعاء (Bahule and Silva, 2021)، فقد يكون التباين والتأثيرات المتفاوتة للبروبيوتيك ناتجة عن الاختلافات في طبيعة البروبيوتيك المستخدمة (الأنواع، والقدرة على البقاء، والقدرة على التكيف مع ارتفاعات مختلفة)، والجرعات وطرق الإدارة، والحالة الفزيولوجية للطيور (Yadav and Jha, 2019; Kalia *et al*., 2017; Huyghebaert *et al*., 2011).

وتعد المعززات الحيوية وسيلة من وسائل الدفاع عن صحة الجسم، وتعزيز مناعة الجسم، إذ تمتلك هذه الأحياء تأثيراً صحياً في جسم المضيف (Rodrigues *et al.*, 2020)، ولاسيما عند استهلاكها بالأساليب العلمية الصحيحة، إذ تعمل على كبح الإصابات المرضية للجهاز الهضمي، لأنها تمتلك خصائص مضادة للأحياء المجهرية المرضية، فضلاً عن دورها في تحسين استقلاب اللاكتوز وخفض الكولسترول الكلي في الدم، وتقليل نسبة الإصابة بالسرطان (Reis *et al.*, 2017; Markowiak and Śliżewska, 2017).

يمكن للأحماض العضوية، وبيروكسيد الهيدروجين (الماء الاوكسجيني)، والبكتريوسينات، وثنائي الاستيل كنواتج استقلاب تنتجها الجراثيم، أن تساعد في وقف نمو الجراثيم المسببة للأمراض مثل *E.coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* (Arief *et al.*, 2014; Jungersen *et al.*, 2014; Todorov *et al.*, 2011). ومع إنتاج حمض اللبن، يمكن لهذه الجراثيم زيادة كفاءة امتصاص الكالسيوم والحديد والفوسفور (Arief *et al.*, 2015; Maxton *et al.*, 2013). فضلاً عن الدور الفعال الذي تلعبه في عملية الالتصاق بسطوح الأغشية المخاطية للأمعاء عند تواجدها بكمية كافية، وبذلك تثبط أو تعيق عملية التصاق الجراثيم المرضية بتلك السطوح المخاطية كما أنها تمنع ارتباط الخلايا الجرثومية بمستقبلاتها وبذلك تخفف إمراضيتها (Prakash *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2017; Markowiak and Śliżewska, 2017).

وعلى الرغم من الفوائد الكثيرة للبروبيوتيك فإن استخدامها وقائياً أو علاجياً يواجه العديد من الصعوبات حيث أنه أثناء التخزين أو النقل، قد يؤدي التعرض لدرجة حرارة أعلى ومستويات أكسجين ورطوبة نسبية إلى تقليل قابلية أنواع البروبيوتيك للبقاء (Rodrigues *et al.*, 2011). وبالإضافة لذلك، فإن تناول البروبيوتيك يواجه العديد من التحديات في الجهاز الهضمي، بما في ذلك انخفاض درجة حموضة السوائل المعدية، وارتفاع التركيز العالي لأملاح الصفراء، والإنزيمات الهضمية في الأمعاء (Dumitru *et al.*, 2021) وما إلى ذلك، مما يؤدي إلى انخفاض عدد الجراثيم القابلة للحياة التي تصل إلى الأمعاء السفلية بسبب انخفاض قدرتها على البقاء (Sarao and Arora, 2017; Yao *et al.*, 2020). وبالتالي، فإن التأثيرات المفيدة للبروبيوتيك على الدواجن تكون ضعيفة. ولذلك تم البحث عن حلول لهذه الصعوبات واعتبر التغليف الدقيق طريقة بارزة لحماية الجراثيم من البيئات الضارة وتحسين حيويتها حتى الأمعاء السفلية (Vivek *et al.*, 2023; Cook *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2020). في تقنية التغليف الدقيق، يتم تغليف الجراثيم النافعة داخل مادة محددة لتكوين كبسولة دقيقة. وبشكل أساسي، تحتفظ الكبسولة الدقيقة ببنيتها في الجهاز الهضمي العلوي وتتحلل في موقع الهدف المحدد لإطلاق الجراثيم للاستعمار (Cook *et al.*, 2012).

ولكن لا تزال هناك العديد من التحديات التي تم الإبلاغ عنها في هذه التقنية. قد لا تتحلل بعض الكبسولات الدقيقة بشكل مناسب في الموقع المحدد ويمكن أن تطرح دون استخدام، ولا يظهر البعض الآخر أي تأثير مفيد على المضيف ولكن قد يظهر تأثيراً ساماً. ونظراً للحقائق المذكورة أعلاه، لا يزال من الصعب العثور على مادة تغليف مناسبة (Chen *et al.*, 2017).

شهد السوق العالمي للمكملات الغذائية والأطعمة الغنية بالبروبيوتيك نمواً سريعاً في السنوات الماضية (Peruzzolo *et al.*, 2025). وخاصةً بسبب فوائدها الصحية المحتملة، ففي عام 2019، قُدِّر سوق البروبيوتيك العالمي بنحو 48.4 مليار دولار أمريكي، ومن المتوقع أن يصل إلى 77.09 مليار دولار أمريكي بحلول عام 2025 (Size, 2019). لذلك عمل الباحثون والمتخصصون في مجال علوم الأحياء الدقيقة في الأغذية على حماية المعززات الحيوية أثناء عمليات تصنيع الأغذية الحاوية على لمعززات الحيوية، ومواجهة الظروف المتطرفة في الجهاز الهضمي عن طريق توفير طبقة من مادة ما تعزل المعززات الحيوية عن ظروف البيئة المحيطة وعدم التأثر الكبير بها وللوصول بالأعداد المطلوبة التي تعود بمنافع صحية على جسم الإنسان والحيوان والتي تسمى بعملية التغليف الدقيق للمعززات الحيوية (Setiarto *et al.*, 2025)، وهي تقنية فعّالة ومبتكرة لتحسين قابلية بقاء المعززات الحيوية واستقرارها في كل من المنتجات الغذائية والدوائية في الجهاز الهضمي (Abbas *et al.*, 2022)، وذلك باستعمال تقنيات عديدة في التغليف وباستعمال العديد من المواد الآمنة صحياً والتي توفر الحماية للمعززات الحيوية (Kim *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2017)، ومن هذه: المواد الكاربوهيدراتية مثل الألجينات، والنشا، والسليلوز، والأصماغ وغيرها وكذلك المواد البروتينية منها بروتينات الحليب مثل الكازين، والشرش والبروتينات النباتية مثل بروتينات فول الصويا، وغيرها من المواد البروتينية، ويشترط أن تكون المواد المستعملة في التغليف الدقيق للمعززات الحيوية أن تكون متوافقة مع طبيعة الأغذية المعززة حيوياً، ولا تؤثر في الخصائص الطبيعة للأغذية المعززة حيوياً والتي تشمل اللون والطعم والرائحة وقوام الغذاء (Ozyurt and Ötles, 2014).

يتضمن اختيار البروبيوتيك متطلبات أساسية منها فوائد صحية محددة وقابلة للقياس، الجدوى الاقتصادية، اعتبارات السلامة، خصائص عزل السلالات الجرثومية، الاستقرار الجيني، يجب أن تتحمل على الطعام عند عدد خلايا مرتفع يبلغ حوالي 10^6 – 10^7 وحدة تشكيل مستعمرة وأكثر، القدرة على مقاومة الظروف المعدية المعوية، قدرة عالية على الالتصاق بظهارة الأمعاء، تثبيت الجراثيم المعوية، البقاء على قيد الحياة أثناء المعالجة والتخزين، يمكن إنتاجها بسهولة على نطاق واسع، تمنع نمو مسببات الأمراض، تمتلك خصائص مضادة للطفرات ومضادة للسرطان (de Melo Pereira *et al.*, 2018; Pradhan *et al.*, 2020).

لذلك، في هذه الدراسة، تم إعداد كبسولة دقيقة لتحسين وصول أنواع البروبيوتيك إلى الأمعاء السفلية، مما يُظهر تأثيراً إيجابياً على الدواجن. ولدراسة تأثير جراثيم *Lactobacillus* المُغلّفة، قمنا بدراسة تأثير الظروف الفيزيائية والكيميائية المتطرفة على الجراثيم نفسها قبل وبعد التغليف، ثم تأثيرها على أداء النمو، ومقاومتها للأمراض، وفي الوقت نفسه، تم إجراء مقارنة الكبسولة الدقيقة المُحضّرة بتأثير المضاد الحيوي.

أهداف الدراسة

Objectives of the study

2-1 تتلخص الأهداف الرئيسة للدراسة بالنقاط الآتية:

تقييم جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف وتأثيره الصحي على الحيوان والدور التثبيطي لهذه الجراثيم على الأحياء الدقيقة المرضية داخل الجسم وخارجه وذلك من خلال:

1- عزل وتشخيص بعض أنواع جراثيم *Lactobacillus* من أمعاء دجاج تسمين.

2- دراسة التأثير المضاد لجراثيم *Lactobacillus* على بعض الجراثيم الممرضة.

3- تغليف جراثيم *Lactobacillus*.

4- مقارنة تحمل جراثيم *Lactobacillus* قبل وبعد التغليف ضد بعض العوامل الخارجية.

5- تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات السليمة.

6- تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على حيوانات مرضية.

الفصل الثاني

الدراسة المرجعية

LITERATURE REVIEW

الدراسة المرجعية

Literature Review

2-1. الأغذية الوظيفية (Functional Foods):

شهدت العقود الأخيرة تزايداً ملحوظاً في استهلاك الغذاء وإنتاجه. ولم يعد يُنظر إلى الغذاء على أنه مجرد وسيلة للتغلب على الجوع والعطش فحسب، بل أصبح مصدراً للمركبات الغذائية التي يحتاجها المستهلك لتحسين صحته أو للمساهمة في علاج الأمراض المرتبطة بسوء التغذية. هذا التطور في المفهوم قاد إلى ظهور ما يُعرف بالأغذية الوظيفية (Turasan *et al.*, 2015).

2-1-1. تعريف الأغذية الوظيفية:

تتعدد تعريفات الأغذية الوظيفية. فوفقاً ل Hornstra وآخرون (1998) كان التعريف بسيطاً، حيث وصفها بأنها منتجات غذائية لها دور مميز في تدعيم الصحة.

وعرفها Bigliardi and Galati (2013) بأنها الأغذية التي تحسن الحالة العامة للجسم، وتقلل من مخاطر الإصابة ببعض الأمراض، كما يمكن استخدامها في العلاج المساعد لأمراض أخرى.

وآخرون عرفوا الأغذية الوظيفية بأنها منتجات تحتوي على مركبات نشطة بيولوجياً، تُستهلك ضمن النظام الغذائي اليومي، وتساهم في الحفاظ على حالة صحية مثالية وتقليل خطر الإصابة بالأمراض (Turasan *et al.*, 2015).

يتم إنتاج هذه الأغذية حالياً في العديد من البلدان، وتشمل أمثلة عليها: الحليب قليل الدسم، الحليب المقشود، اللبن الغني بالبروبيوتيك، كبسولات أوميغا 3، العصائر المدعمة بالفيتامينات والكالسيوم، كبسولات زيت السمك، حبوب الإفطار (cereals) الغنية بالألياف، وخبز القمح الكامل (Butnariu and Sarac, 2019).

2-1-2. تصنيف الأغذية الوظيفية:

وفقاً ل Mudondo وآخرون (2025) وأيضا كما ورد في (Butnariu and Sarac, 2019)، يمكن تصنيف الأغذية الوظيفية إلى الفئات التالية:

1. **أغذية تقليدية:** وهي غنية طبيعياً بمواد نشطة بيولوجياً، مثل الخضروات والفواكه المحتوية على الليكوبين واللوتين والإيزوتيوسيانات والسالفورافان.
2. **أغذية مدعمة:** وهي أغذية تم تعديلها بإضافة مواد نشطة بيولوجياً، مثل عصائر الفاكهة المدعمة بحمض الفوليك، الكالسيوم، أو الجنسينغ.
3. **أغذية-أدوية:** وهي منتجات تؤخذ بوصفة طبية، مثل بعض أغذية الأطفال المتخصصة.
4. **أغذية لنظم غذائية خاصة:** مثل الأغذية الخالية من الغلوتين، اللاكتوز، أو الدسم.
5. **أغذية صنعية المكونات:** مثل بعض أنواع الكربوهيدرات المصممة لتكون غنية بالبروبيوتيك.

ويمكن تحويل أي غذاء إلى غذاء وظيفي باتباع إحدى الطرق التالية (Butnariu and Sarac, 2019):

1. **إزالة مكون ضار:** مثل إزالة بعض البروتينات المسببة للحساسية.
2. **زيادة تركيز مكون موجود:** كما في حالة زيادة تركيز السيلينيوم في الخضروات الورقية.
3. **استبدال مكون بمكون آخر أكثر نفعاً:** مثل استبدال الأحماض الدهنية المشبعة بنشاء معدل.
4. **زيادة الوفرة الحيوية أو الثباتية:** وذلك لمحتوى غذائي مميز له تأثيرات مضادة للأمراض، مثل الكركمين أو الزعفران.

وقد لوحظ تركيز كبير في مجال تطوير الأغذية الوظيفية على حل مشكلة الفساد السريع للمركبات النشطة. ويتم ذلك بالاعتماد على فكرة تغليف المركب المرغوب قبل إضافته إلى الغذاء لمنع فقدانه أو تلفه. تُعد الكبسلة (Encapsulation) واحدة من أهم تقنيات التغليف هذه (Feng *et al.*, 2018).

شهدت سوق الأغذية تغيرات ملحوظة في السنوات الأخيرة، ترتبط بتزايد الوعي الغذائي لدى المستهلكين. حيث لم يعد دور منتجي الأغذية يقتصر على تقديم تشكيلة واسعة من المنتجات للمستهلكين، بل إن تركيبتها لا يخلو من الأهمية. هناك اهتمام متزايد بما يُسمى "الأغذية الوظيفية"، التي تُوفر، بالإضافة إلى العناصر الغذائية التقليدية، مكونات ذات خصائص مُحددة تُؤثر إيجاباً على صحة المضيف. ومن بين هذه الأغذية ما يُسمى "أغذية البروبيوتيك". تلعب البروبيوتيك دوراً رئيسياً في تصميم الأغذية الوظيفية، إذ تُساهم في تحسين صحة الجهاز الهضمي، وتقوية المناعة، وتُقدم حماية وقائية من العديد من الأمراض (Sionek and Szydłowska, 2025).

2-2. المعززات الحيوية probiotics

كلمة المعززات الحيوية probiotics تعني في اللغة اليونانية لأجل الحياة "for life" (Pro_biotic) (Longdet *et al*., 2011)، تُستخدم البروبيوتيك في تغذية الحيوانات والبشر على حد سواء، إذ توفر حاجزاً طبيعياً وآمناً وفعالاً ضد مسببات الأمراض (Dumitru *et al*,. 2020). ووفقاً لمنظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (FAO) ومنظمة الصحة العالمية (WHO) تعرف المعززات الحيوية بأنها عبارة عن أحياء دقيقة، تشمل الجراثيم والخمائر، تكون داعمة للغذاء وتؤثر إيجابياً على صحة المضيف عند تقديمها بكميات كافية والتي تتواجد في الأطعمة مثل لبن الزبادي والمكملات الغذائية (Peivasteh-Roudsari *et al*., 2019; Hill *et al*., 2014) ويوضح الجدول رقم (1) الأحياء الدقيقة التي تعتبر من البروبيوتيك. وآخرون عرفوا Probiotic بأنها المواد التي تنتجها الأحياء الدقيقة، التي تساهم في تحقيق توازن الأحياء الدقيقة في الأمعاء ومن ثم تكون مفيدة لصحة المضيف وتسمى بـ Friendly bacteria أو Good bacteria. ويمكن أن تكون المعززات الحيوية منتجات طبيعية أو صيدلانية تحتوي على جراثيم حية تستخدم لعلاج اضطرابات معينة وتحسين الصحة العامة (Soni, 2018; Gyawali, 2020). وهناك خصائص متعددة تمتاز بها أنواع جراثيم حمض اللبن جعلت منها معززات حيوية وهي حيويتها عند النقل والتخزين وسلامتها الصحية عند تناولها وبقائها وامكانية عزلها من الأغذية والمصادر الأمينة الأخرى والتأثيرات المفيدة نتيجة تثبيط العوامل الأخرى غير المرغوب فيها، وامتلاكها فعاليات استقلابية متنوعة كاستهلاك الكوليسترول وإنتاج الأنزيمات كأنزيم galactosidase – ، فضلاً عن مقدرتها في إنتاج عديد من الفيتامينات، وثبات السلالة وثبات العمر الخزني لأنواع هذه الجراثيم، إذ أن سرعة نمو السلالات وبقائها خلال مدة الخزن تعد من شروط اختيار المعززات الحيوية مقاومتها للعوامل غير الطبيعية والتغير في درجة الحموضة إلى مستويات منخفضة وإمكانيتها في إنتاج بيروكسيد الهيدروجين يعطيها تأثيراً ضد الأحياء الدقيقة السالبة والموجبة لصبغة غرام مسببا تلفاً لعدد من الأنزيمات وتكون لها القابلية على إنتاج العديد من البكتريوسينات (Brashears *et al*., 2003).

من أهم أنواع المعززات الحيوية وأكثرها استعمالاً هما جنس *Bifidobacterium* و*Lactobacillus* (Solanki *et al*., 2013) وتشمل Probiotic أيضا أنواع منها ما يستعمل للبشر، ومنها يستعمل *للحيوانات* *Lactococcus* و *Enterococcus* و *Leuconostoc* و *Oenococcus* و *Pediococcus* و *Streptococcus genera* (Sonia Indri *et al*., 2019) والمتواجدة والمستوطنة في الجهاز الهضمي، وأن لكل منها العديد من الفوائد التي تعود بمنافع صحية للمضيف، وبشكل ملحوظ داخل الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان (Vitali *et al*., 2012; Zeashan *et al*., 2020). وهناك أنواع من الخمائر والتي تعد من المعززات الحيوية مثل *Saccharomyces boulardii* (Cheng, 2015).

ويعد أول من اكتشف الفوائد الصحية للبروبايوتيك هو العالم الدكتور Eli Methnikoff. تستوطن الجراثيم النافعة probiotics جسم الإنسان والحيوان حيث تتكون الفلورا الطبيعية والتي يحتويها الجسم الصحي القليل من الفطريات والابتدائيات وأنواع من الفيروسات والكثير من الجراثيم، ولا تتواجد الجراثيم في أنسجة الجسم الداخلية مثل الدم والمخ والعضلات، أما الأنسجة التي تمثل أسطح الجسم مثل الجلد والأغشية المخاطية تكون دائما مستعمرة بأنواع مختلفة من هذه الأحياء، وذلك بسبب اتصالها المباشر بالأحياء الدقيقة للبيئة التي يعيش فيها الإنسان والحيوان وتنمو هذه الجراثيم في الجهاز الهضمي خاصة الأمعاء حيث يصل عدد أنواعها لأربعمائة نوع والتي تتكون من 85% من الجراثيم التي تتحمل الحموضة (Falfan-Cortés *et al*., 2022).

في عام 1954 ولأول مرة اقترح مصطلح المعززات الحيوية من قبل Vergio عند مقارنتها مع التأثيرات الضارة لإستخدام المضادات الحيوية Antibiotic والمواد المثبطة الأخرى تجاه الأحياء الدقيقة للقناة الهضمية من جهة، وبين عوامل (Probiotika) المفضلة من قبل الأحياء الدقيقة للقناة الهضمية من جهة أخرى في كتابه المعنون anti_and probiotika (Al-Sahlany *et al*., 2022).

الجدول رقم (1): الأحياء الدقيقة التي تعتبر من البروبيوتيك (Corona-Hernandez *et al*., 2013).

	Lactobacillus species	Bifidobacterium species	أجناس أخرى
1.	*L. acidophilus*	*B. adolescentis*	*Enterococcus faecalis*
2.	*L.amylovorous*	*B.animalis*	*Enterococcus faecum*
3.	*L.Casei*	*B.bifidum*	*Lactococcus lactis*
4.	*L.Crispatus*	*B.breve*	*Leuconostoc mesenteroids*
5.	*L. delbrueckii*	*B.infantis*	*Pediococcus acidilactici*
6.	*L.gallinarum*	*B.lactis*	*Sporolactobacillus inulinus*
7.	*L.gasseri*	*B.longum*	*Streptocococcus thermophilus*
8.	*L.johnsonii*		*Bacillus cereus (Toyoi; Propionibacterium freudenreichii)*
9.	*L.paracasei*		*Escherichia coli Nissle 1917 (EcN)*
10.	*L.plantarum*		*Propionibacterium freudenreichii*
11.	*L.reuteri*		*Saccharomyces cervisiae*
12.	*L.rhamnosus*		*Saccharomyses boulardii*
13.	*L.Salivarius*		

2-2-1. الخصائص الواجب توافرها في المعززات الحيوية:

من بين الخصائص التي يجب أن تتوافر في المعززات الحيوية هي أن تكون غير مرضية وآمنة صحياً عند تناولها فضلاً عن قدرتها على مقاومتها الظروف المتطرفة للجهاز الهضمي، والبقاء على قيد الحياة وبحيوية عالية ، ولا سيما في الجزء العلوي من الجهاز الهضمي الذي يبدأ من الفم الذي يحتوي على الأنزيمات الهاضمة في اللعاب، ولا سيما اللايسورايم، ومروراً بحموضة المعدة وأنزيماتها الهاضمة مثل الببسين وغيرها، والتصاقها بالأمعاء ومقاومة للانجراف مع المادة الغذائية إلى خارج الأمعاء مع مقاومة أملاح الصفراء وباقي الأنزيمات الهاضمة، بالإضافة إلى قدرتها على البقاء والاستقرار أثناء الاستخدام والخزن (Kandulna and Gupta, 2023; Naeem and Bourassa, 2025; Shehata *et al.*, 2024).

وأشار Zendeboodi وآخرون (2022) إلى أن المعززات الحيوية التي تستعمل على النطاق البشري يجب أن تكون من مصدر بشري، وذلك لامتلاكها صفة تخصص المضيف، وتكون مستقرة وراثياً فضلاً عن أنها تكون أكثر مقاومة لحموضة المعدة وأملاح الصفراء.

2-2-2. آليات عمل الجراثيم النافعة أو المعززات الحيوية:

لقد عُرفت الجراثيم النافعة probiotics بقدرتها على دعم صحة المضيف والأداء الإنتاجي (Yadav and Jha, 2021)، وهناك الكثير من الدراسات التي حاولت شرح الآليات التي تستخدمها الجراثيم النافعة والتي تحمي المضيف من الاضطرابات الهضمية (Plaza-Diaz *et al.*, 2018; Khalique *et al.*, 2020). ومنها:

1- تحفيز المناعة: وتكون إحدى الأليات التي تستخدمها probiotics لحماية المضيف من أمراض الأمعاء.

2- إنتاج المواد المثبطة: تنتج بعض الأحماض العضوية وبيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسينات والتي تعتبر مثبطة للجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة غرام.

3- المنافسة على المغذيات: حيث أن probiotics يقوم بتثبيط مسببات الأمراض وذلك من خلال استهلاك المواد الغذائية التي تحتاجها.

4- حجب مواقع الالتصاق: تمنع المعززات الحيوية الجراثيم الممرضة من الالتصاق من خلال التمسك بالأسطح الظهارية المعوية عن طريق سد مواقع الالتصاق.

2-2-3. المعززات الحيوية وصحة المضيف:

في الوقت الحاضر يدرك المستهلكون الصلة بين النظام الغذائي والصحة الجيدة وهو ما يفسر الطلب المتزايد على المنتجات القادرة على تعزيز الصحة وتستمر قائمة الفوائد الصحية المعتمدة للأغذية الوظيفية في الازدياد. وتعد المعززات الحيوية واحدة من التطبيقات العلاجية ويمكن من خلالها الوقاية من أمراض الجهاز البولي والتناسلي، وتخفيف الإمساك والحماية من الإسهال والحد من فرط كوليسترول الدم والحماية من سرطان القولون والمثانة والوقاية من هشاشة العظام والحساسية الغذائية (Sivamaruthi *et al.*, 2020) ولا تقتصر قائمة الفوائد الصحية التي تؤمنها المعززات الحيوية على تلك المذكورة حتى الآن وتتضمن مجموعة من التأثيرات الواعدة التي تتطلب دراسات إضافية من أجل إثباتها، وهناك أدلة على أن جراثيم المعززات الحيوية هي: مكونات غذائية قد تلعب دورا في تقليل الإصابة بالسرطان والآليات الدقيقة قيد التحقيق ولكن الدراسات أظهرت أن بعض أنواع *Lactobacillus* يقلل من مستويات الأنزيمات المسرطنة التي تنتجها فلورا القولون من خلال إصلاح نفاذية الأمعاء وتوازن الجراثيم وكذلك إنتاج الأحماض العضوية المضادة للطفرات وتقوية الجهاز المناعي للمضيف (Connor *et al.*, 2020). وتشير الدلائل إلى أن المنتجات الغذائية التي تحتوي على جراثيم المعززات الحيوية يمكن أن تسهم في الوقاية من أمراض القلب التاجية عن طريق خفض مستويات الكوليسترول في الدم وكذلك التحكم في ضغط الدم. كذلك تتضمن الأليات المقترحة التدخل في امتصاص الكوليسترول من الأمعاء. وإنتاج منتجات التخمر النهائية التي تؤثر على المستويات الجهازية للدهون في الدم ولا تزال تأثيرات الأحياء الدقيقة هذه موضع نقاش حيث أن هناك حاجة إلى مزيد من البحث في الدراسات البشرية طويلة المدى (Goh *et al.*, 2019). وأظهرت سلالات الأحياء الدقيقة التي تعطي في منتجات الألبان أنها تحسن النتيجة العلاجية لدى النساء المصابات بالتهاب المهبل الجرثومي، من خلال دعم جراثيم اللبنية المهبلية الطبيعية (Adesulu-Dahunsi, 2022). وتشير العديد من الدراسات إلى أن التخمر اللبني له تأثير إيجابي على القيمة الغذائية وزيادة قابلية هضم المواد الخام الخاضعة للعملية. تزيد الطبيعة الحمضية للتخمير من نشاط الأنزيمات التي تنتجها أحياء دقيقة معينة، بما في ذلك الأميلاز والبروتياز والليباز، وبالتالي تعديل المادة الخام من خلال التحلل المائي للسكريات والبروتينات والدهون من خلال زيادة نشاط الأنزيمات الميكروبية (Melini *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020).

بينت الأبحاث الحديثة عن وجود أنواع من جراثيم *Lactobacillus* في بنية الميكروبات المعوية الطبيعية للدجاج (Dumitru *et al*., 2021; Sorescu *et al*., 2021; Noohi *et al*., 2021; Shahbaz *et al*., 2024; Tian *et al*., 2024; Thuy, 2025) المعروفة بفوائدها الصحية للدجاج. تؤدي جراثيم *Lactobacillus* دوراً تكافلياً في صحة الدجاج، حيث تُساهم نواتجها الاستقلابية في عملية الهضم ومكافحة مسببات الأمراض (Duar *et al*., 2017). وأظهرت دراسة Zou وآخرون (2018) أن *Lactobacillus* تُحدث تأثيراً مُستقطباً على ميكروبيوم الأعور (المجتمع الكامل من الكائنات الحية الدقيقة مثل الجراثيم، الفيروسات، الفطريات، والأوالي التي تعيش في بيئة معينة، بالإضافة إلى مجموع مادتها الوراثية (الجينات) والمواد الكيميائية التي تنتجها أثناء تفاعلها) في الدجاج، مما يُشير إلى دورٍ هامٍ لهذا الجنس في الميكروبيوم المحلي، مع وجود ارتباطات سلبية (مع عائلتي *Ruminococcaceae* و*Lachnospiraceae*) أو إيجابية (مع أنواع أخرى من *Lactobacillus* ، وجراثيم *Bacteroides*، وجراثيم *Clostridiales*، وعائلة *Christensenellaceae*).

عند فقس البيضة، تتكون الميكروبات المعوية في أعور الدواجن بشكل رئيسي من جراثيم المكورات المعوية، والجراثيم القولونية، والمطثيات (Coates & Fuller, 1977)، ومع التقدم في العمر وابتداءً من اليوم الرابع من العمر، تصبح جراثيم العصيات اللبنية مكوناً هاماً من الميكروبات المعوية (Zhu *et al*., 2002). وفي اليوم السابع من العمر، تطغى جراثيم العصيات اللبنية على الميكروبات المخاطية في اللفائفي، تليها جراثيم *Lachnospiraceae* والمكورات المعوية (Cressman *et al*., 2010). وبعد اليوم الرابع عشر من العمر، تتطور في أعور وأمعاء دجاج التسمين مجتمعات جرثومية متنوعة (Pedroso & Lee, 2015)، ولكن من اليوم الحادي والعشرين إلى اليوم الثاني والأربعين من العمر، تصبح جراثيم العصيات اللبنية الكائن الحي الأكثر وفرة في الأمعاء الدقيقة. من هذا الجنس، تم الكشف عن أنواع *L. salivarius* و *L. johnsoni* و *L. reuteri* و *L. oris* و *L. crispatus* (Nakphaichit *et al*., 2011). يثير هذا التنوع مسألة اختيار السلالة الأنسب لتطوير إضافات علفية جرثومية في تغذية الدواجن.

يشير Akram (2025) إلى أن إدراج البروبيوتيك في أعلاف الصيصان منذ مرحلة مبكرة بعد الفقس يسهم في تحقيق توازن الجراثيم النافعة داخل القناة الهضمية. وتتميز هذه الأحياء الدقيقة المفيدة بقدرتها الفائقة على النمو والتكاثر حتى في الأوساط منخفضة الحموضة، مما ينعكس إيجاباً على صحة الصيصان ونموها، ويعزز سلامة جهازها الهضمي. كما يؤدي ذلك إلى رفع كفاءتها الإنتاجية وتحسين أدائها العام بشكل ملحوظ.

يتمثل الهدف الأساسي من استخدام المعززات الصحية الطبيعية في التغذية المبكرة للصيصان حديثة الفقس في تحقيق سيادة الأحياء الدقيقة المفيدة داخل القناة الهضمية، نظراً لخلوها منها في البداية، مما يسهم في التصدي للإصابات المرضية وينعكس إيجاباً على صحتها وسلامتها وأدائها طوال فترة التربية (Akram, 2025). وتسهم هذه الأحياء النافعة في منافسة الجراثيم الممرضة على العناصر الغذائية، مما يعزز التوازن الميكروبي المفيد في الأمعاء (Pewan *et al*., 2025). إضافة إلى ذلك، تحفز هذه المعززات الطبقة الطلائية المبطنة للقناة المعوية على الإسراع في تصنيع الميوسين – وهو هلام لزج يتكون من بروتينات سكرية – ليشكل حاجزاً وقائياً غير نافذ عبر غلق المستقبلات ضد الجراثيم الممرضة وسمومها، ومن ثم طرحها خارج الجسم (Cho and Finocchiaro, 2010).

كما تؤدي هذه المعززات إلى إحداث تغيرات مورفولوجية في النسيج المبطن للأمعاء، تشمل زيادة سُمك الطبقة الطلائية، وارتفاع عدد وطول ومساحة الزغابات المعوية، إلى جانب تعزيز نضج الخلايا المعوية وزيادة الحركة التموجية للأمعاء (اشقيفي، 2023). ويترتب على ذلك تحسين امتصاص العناصر الغذائية، وزيادة فعالية الأنزيمات الهاضمة في الطبقة المخاطية، مما ينعكس إيجاباً على كفاءة الهضم (Pewan *et al*., 2025).

المعززات الحيوية الموجودة في الأمعاء لها أنشطة مفيدة مثل هضم بعض مكونات الأغذية وإنتاج الفيتامينات وخاصة فيتامينات B وتنشيط الجهاز المناعي للجسم وإنتاج بعض الأنزيمات الهاضمة. ولها دور في تخليص الجسم من الخلايا المسرطنة. كذلك إنتاج الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة ذات التأثير السلبي في الجراثيم المرضية فيما يعني احتياج الجسم لها ليس مقتصراً في بداية حياته وإنما في أي عمر من الأعمار (Di Cerbo *et al*., 2015). وبحسب Kerry (2018) ما ذكره ان المعززات الحيوية تمثل تطور علاجي ممتاز للإنسان والحيوان.

وذكر Shehata وآخرون (2024) بأن المعززات الحيوية هي الأحياء الدقيقة المتواجدة في المزارع المفردة أو المختلطة التي تمتلك تأثيرات مفيدة على صحة الإنسان والحيوان من خلال دورها في تحسين التوازن للأحياء الحية الدقيقة المعوية.

أما Szajewska وآخرون (2023) فقد أكدوا أن المعزز الحيوي يعطى بطرق متعددة للإنسان والحيوان فإما يعطى بصورة مباشرة أو من خلال الغذاء الذي يتناوله الذي يتوافر بأشكال متعددة، فقد يكون بشكل مسحوق أو كبسول (capsules) إذ يتناول (1–4) كبسولة ولثلاث مرات يومياً أو أقراص (tablets) أو بشكل معلق (suspention).

2-2-4. بعض الفوائد الصحية للمعززات الحيوية *Lactobacillus*

2-2-4-1. الآليات المتعددة للجراثيم النافعة في تعزيز مناعة الأمعاء ومقاومة الأمراض الهضمية:

تعد القناة الهضمية أكبر جهاز مناعي للجسم، وذلك بسبب احتوائها على عوامل متعددة تؤهلها لذلك مثلاً احتواءها على النبيت المعوي الذي له الدور الفعال في مقاومة مسببات الأمراض (Di Cerbo *et al*., 2015)، مثل جراثيم حمض اللبن إذ تمتلك مواصفات متعددة تؤهلها أن تقوم بتثبيط الأحياء الدقيقة المتواجدة في القناة الهضمية ومعالجة الاضطرابات في الجهاز الهضمي (Rehaiem *et al*., 2014)، إذ أن معظم الأمراض التي تصيب الجهاز الهضمي والمنقولة خلال الأغذية تعد السبب الرئيس لوفاة معظم الأشخاص في كل أنحاء العالم.

فلقد أوضح Fuochi (2015) أنّ جراثيم حمض اللبن المستخدمة كمعزز حيوي يجب أن تكون معزولة من الإنسان عندما يكون الهدف منها اعطاءها أيضا للإنسان، وتتمكن من التداخل المتخصص مع المضيف وتستطيع الالتصاق بسطوح الأغشية المخاطية المبطنة للأمعاء، وذلك لكي تتمكن من الاستيطان في الأمعاء، وإن الأغشية المخاطية مفرزة من قبل خلايا الكأسية ومن ثم تعمل كحاجز يمنع التصاق الأحياء الدقيقة الممرضة بجدار الأمعاء، إذ أن التصاق الأحياء الدقيقة الممرضة بجدار الأمعاء هي الخطوة الأولى للإصابة ودور الجراثيم العلاجية هو التنافس مع تلك الأحياء الدقيقة على المكان أو تقوم بتغطية بعض أجزاء جدار الأمعاء التي من الممكن أن ترتبط بها الجراثيم المرضية، ومن ثم تمنع التصاقها أو من خلال إنتاجها لمواد تمنع التصاق الأحياء الدقيقة المرضية، وتتمثل هذه المركبات بـ surface active components وهي بروتينات مانعة للالتصاق (Wang *et al*., 2025; Nishiyama *et al*., 2016; Segui-Perez *et al*., 2025; Nataraj *et al*., 2025) كذلك إحداث تغيرات في استقلاب الأحياء الدقيقة الأخرى من خلال زيادة أو تقليل فعالية بعض الأنزيمات (Bromfield *et al*., 2024).

فضلاً عن أن الجراثيم النافعة لها القدرة على مقاومة الظروف الفيزيائية والكيميائية للقناة الهضمية كتغير درجة الحموضة نتيجة لإنتاجها لحمضي الخليك واللبن، وهي عبارة عن أحماض دهنية طيارة قصيرة السلسلة (Wang *et al.*, 2025)، فضلاً عن قابليتها على تحمّل أملاح الصفراء وإنتاجها لمواد مثبطة للأحياء الدقيقة المرضية (Liu *et al.*, 2025)، وبذلك تعطي للجسم مقاومة للأمراض المعدية ولاسيما المعوية مثل تقليل حالات الإمساك والإسهال في البالغين والأطفال، الذي يكون السبب في موت معظم الأطفال في العالم (Martins *et al.*, 2024) وإسهال المسافرين Traveller's diarrhea (TD) إذ تكون نسبة حدوثه 60% ولا يقتصر وجوده في الدول النامية فهو يحصل أيضا في أوروبا.

وقد أكد Wei وآخرون (2025) في دراستهم أن الجمع بين *L. acidophilus* والمونتموريلونيت يؤدي إلى تقصير زمن تعافي الأعراض وتحسين الاستجابة الالتهابية لدى الأطفال المصابين بالتهاب الأمعاء الفيروسي العجلي (RVE)، مع الحفاظ على درجة أمان عالية. والإسهال المصاحب لاستخدام المضادات الحيوية antibiotic associated diarrhea (AAD) (Fadin *et al.*, 2023) والإسهال المتسبب عن جراثيم *Clostridium difficile associated diarrhea* (CDAD)، والتي تسبب الإسهال المزمن مع التهاب القولون pseudomen braneous colitis (Hamo *et al.*, 2025) إذ تتم المعالجة من خلال التصاقها في الخلايا الظهارية للأمعاء الدقيقة والغليظة وتثبيط نمو الأحياء الدقيقة الممرضة (Zheng *et al.*, 2024).

وتعمل على تثبيط الجراثيم الضارة التي تسبب عسر الهضم مما يحسن هضم الطعام (Balasubramanian *et al.*, 2013) وتعمل جراثيم *Lactobacillus* على تثبيط جراثيم *Yersinia enterocolitica, Shigella flexneri, Listeria monocytgenes, Salmonella spp., Clostridium spp., Staphylococcus aureus, Escherichia coli* (Colautti *et al.*, 2022).

تشترك أحياء النبيت المعوي بشكل أساس في عملية تخمير العديد من المواد الغذائية الناتجة عن أميلاز البنكرياس، وأيضا بعض أنواع السكريات المتعددة والألياف الذائبة، وينتج عن عملية التخمر هذه العديد من الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة مثل البيوتريت وبعض الأحماض العضوية مثل اسيتيك وبروبيونيك وحمض اللبن. وهذه الأحماض العضوية تعمل على خفض درجة الحموضة pH لتجويف الأمعاء التي تستوطن فيه الأحياء الدقيقة المرضية، الأمر الذي يحد من قابلية استيطانها ونموها وتقليل السيطرة على فعلها الضار (Nag, 2011).

ومن أهم آليات عمل المعززات الحيوية في الجهاز الهضمي هي:

2-2-4-1-1. خفض درجة الحموضة للتجويف المعوي:

تعمل المعززات الحيوية على تخمير الكاربوهيدرات في الأمعاء الغليظة والقولون وإنتاج بعض الأحماض العضوية، إذ تعمل الأنزيمات النازعة على تحويل حمض البايروفيك إلى حمض اللبن وأحماض أخرى مثل الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة وحمض الخليك وحمض البروبيونيك وحمض البيوتريك وهذه الأحماض تعمل على خفض درجة الحموضة للتجويف المعوي وبالتالي تخلق بيئة غير مناسبة، ولا سيما لنمو الأنواع المرضية من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة غرام، إذ إن الأحماض الدهنية وحمض اللبن وحمض الخليك المنتجة من قبل المعززات الحيوية المتواجدة في الأمعاء لها القدرة على التأثير في الجدار الخلوي للأحياء الدقيقة المرضية ومنع نموها، وأن حمض اللبن والخليك المنتج من جراثيم *Bifidobacteria* و *Lactobacillus* وغيرها من المعززات الحيوية الأخرى سواء كانت ذات التخمر المتجانس أو غير المتجانس تعمل على تثبيط نمو جراثيم مثل *monocytogenes, B.vulgatus,Clostridium difficile, Clostridium histolyticum, Listeria Salmonella choleraesuis, St. aureus*، وبعض سلالات *E.coli* وغيرها من الأنواع الاخرى، أو الحد من نموها (Shokryazdan *et al*., 2014).

2-2-4-1-2. إنتاج مركبات النكهة:

ينتج ثنائي الأستيل عن طريق تخمر حمض البايروفيك، وجراثيم حمض اللبن لها القدرة على إنتاج ثنائي الأستيل والأسيتالدهيد، إذ يعمل الأول على التداخل مع الحمض الأميني الأرجنين المستعمل من قبل الجراثيم السالبة لصبغة غرام في بناء البروتين مما يجعلها شديدة الحساسية لثنائي الأستيل، مثل جراثيم *E.coli* التي تكون أكثر عرضة لثنائي الأستيل كذلك بالنسبة لجراثيم *Yersinia enterocolitica, Aeromonas hydrophila, Salmonella anatum* وبذلك فهو يؤثر بشكل أكثر فعالية تجاه الجراثيم السالبة لصبغة غرام مقارنة مع الجراثيم الموجبة لصبغة غرام (Nag, 2011).

2-2-4-1-3. معالجة حالات الإسهال

بيّنت الدراسات قابلية المعززات الحيوية على تخفيض حالات الإسهال الناتجة من تناول المضادات الحيوية عن طريق الفم بعد الإصابة بجراثيم *Clostridium difficile* وخفض حالات الإسهال الحاد، ولمجمل أسباب حالات الإسهال المختلفة، إذ وجد أن قابلية خميرة *Saccharomyces boulardii* وجراثيم *L.GG* على خفض حالات الإسهال ومعالجة التهابات المعدة والأمعاء المسببة للإسهال (Shah, 2007).

وأشارت العديد من الدراسات في أوروبا والولايات المتحدة الأمريكية أن تناول المعززات الحيوية في شكل مغلفات يساهم في تقصير مدة الإصابة بالإسهال الحاد لدى الأطفال. كما أن للمعززات الحيوية قدرة على تقليل الالتهابات المعوية وتقليل مدة الإسهال عند الأطفال، وذلك من خلال تناول منتجات الحليب المخمرة بانتظام والتي تحتوي على هذه المعززات. بالإضافة إلى ذلك، فإن تناول الألبان المخمرة المحتوية على المعززات الحيوية قبل السفر يقلل من فرص الإصابة بإسهال المسافرين. (Parvez *et al.*, 2006).

إن من الفوائد الصحية المثلى التي أثبتها المعززات الحيوية قدرتها في خفض مخاطر الإسهال، وتقليل عدد أيام علاج الإسهال الحاد لدى الأطفال، إذ أجريت مراجعة واسعة ل 14 دراسة في اليابان، أثبتت النتائج خروج الأطفال المصابين بالإسهال الحاد بشكل أسرع من المستشفى عندما تم علاجهم عن طريق تناول محلول حاوي على جراثيم *L.GG* من الأطفال الذين تم علاجهم عن طريق تناول محلول علاج وهمي فضلاً عن قدرتها على تقليل الإصابة بالإسهال نتيجة تناول المضادات الحيوية (Higuchi *et al.*, 2024).

2-2-4-1-4. الوقاية والعلاج من قرحة المعدة:

تسبب جراثيم *Helicobacter pylori* مشاكل صحية للإنسان وأن الإصابة بجراثيم *H. pylori* عادة تكون في الطفولة، وهي تعد العامل الرئيس للإصابة بقرحة المعدة والاثنى عشر لدى الأطفال وتعد عاملاً مساعداً في الإصابة بسرطان المعدة، وإن للمعززات الحيوية دوراً في جراثيم *H. pylori* عند طريق تثبيط نموها ومنافستها على الالتصاق بجدران المعدة وإفراز مواد تمنع من التصاقها في جدران المعدة والاثنى عشر (Shan *et al.*, 2014). أشار Parvez وآخرون (2006) إلى أن بعض أجناس جراثيم *Lactobacillus* لها القدرة على إنتاج كميات كبيرة من حمض الخليك الذي يؤدي إلى تثبيط نمو *H. pylori* خارج الخلية إذ يثبط فعالية أنزيم urease المنتج من قبل الجراثيم وتقليل تأثيرها غير المباشر في حدوث القرحة.

2-2-4-1-5. أمراض التهابات الأمعاء:

تتضمن أمراض التهابات الأمعاء عدة أنواع منها التهاب القولون التقرحي، والتهاب الأمعاء الدقيقة كذلك التهاب الجيوب المعوية إذ يعد عدم توازن النبيت المعوي في الأمعاء أحد العوامل الرئيسة المسببة لأمراض التهابات الأمعاء المختلفة (Ganesh *et al.*, 2012; Zaylaa *et al.*, 2018).

تشير الدراسات إلى ان للمعززات الحيوية دوراً في تنظيم توازن النبيت المعوي في الأمعاء، وقتل الأحياء الممرضة والتخفيف من أمراض التهابات الأمعاء، وأن تناول منتجات الحليب المخمرة التي تحتوي على نوع واحد أو أكثر من المعززات الحيوية تكون فعالة في السيطرة على أمراض التهابات الأمعاء (Zhang and Cai, 2014).

2-2-4-1-6. مقاومة أملاح الصفراء

تتميز جراثيم حمض اللبن بمقاومتها لأملاح الصفراء، وهي من الصفات المهمة التي يجب توافرها في الجراثيم المستخدمة كمعزز حيوي (Pyar and Peh, 2014)، لأن إفراز أملاح الصفراء في الأمعاء الدقيقة يؤدي إلى تحطيم غشاء الخلية الذي يتكون من مركبات وأحماض دهنية حساسة لعمل تلك الأملاح، ومن ثم تكشف عن السيتوبلازم مؤدية إلى موت الجراثيم، لذا يجب أن تكون مقاومة لأملاح الصفراء (Hu *et al.*, 2026).

يعد الفعل الأساسي لأملاح الصفراء هو استحلاب الدهون وجعلها مستحلبة بالماء والتراكيز العالية من أملاح الصفراء تؤدي إلى استحلاب الطبقة الدهنية بالجدار الخلوي لخلايا الأحياء الدقيقة الداخلة مع الكتلة الغذائية، الأمر الذي يؤدي إلى سيولة الجدار الخلوي التي تؤدي بدورها إلى خروج مكونات الخلية ثم موتها. وغالباً ما تستعمل صفة مقاومة أملاح الصفراء معياراً لاختيار سلالة المعززات الحيوية لكونها مؤهلة لمقاومة الظروف القاسية للجهاز الهضمي وقادرة على الاستيطان داخل الجسم المضيف، والكبد يفرز يومياً حوالي لتر من أملاح الصفراء إلى الأمعاء الدقيقة، وبالتالي فإن جراثيم المعززات الحيوية ستتعرض وبشكل كبير إلى تأثير أملاح الصفراء، وبالتالي سيشكل تحدياً للجراثيم من حيث النمو والاستيطان (Begley *et al.*, 2005).

تتراوح نسبة أملاح الصفراء المفروزة من 0.2–2% بعد تناول الطعام، ويعتمد ذلك على نوعية الغذاء المتناول ونسبة الدهن فيه (Nag, 2011)، حيث تعمل على هضم وامتصاص الدهون عن طريق استحلابها أولاً، وذوبان الدهون في الدم. وتعد أملاح الصفراء من المواد الفعالة المضادة للميكروبات التي تتسبب في قتل أعداد هائلة من الأحياء الدقيقة الداخلة إلى الجسم. وعندما تتعرض الجراثيم إلى الأملاح الصفراء فإنها تعمل على تغيير خصائص الجدار الخلوي مثل تركيب غشاء الأحماض الدهنية وتركيب الببتيدوغليكان فضلاً عن شحنة الجدار الخلوي. وأملاح الصفراء لها تأثير سلبي في الخلايا الجرثومية، ولا سيما الأحياء المرضية التي تؤثر في الجدار الخلوي للخلايا إذ تعمل على تدمير بعض طبقات الجدار الخلوي، وكذلك تؤدي إلى مسخ بعض بروتينات الجدار الخلوي، وتسبب تلف الأحماض النووية، وتؤثر على تغيير ترتيب الحمض النووي الرايبوزي وكذلك تؤثر بالحموضة الداخلية للجراثيم نتيجة لتأثيرها في الجدار الخلوي (Lebeer *et al*., 2008; Ruiz *et al*., 2007).

عند تعريض المعززات الحيوية لأملاح الصفراء ستدخل في ما يسمى حالة حدوث الصدمة وعليه فإن الجراثيم ستعمل على إنتاج بروتينات خاصة بكميات مفرطة في الجدار الخلوي، ولا سيما عند التعرض إلى أملاح الصفراء لحماية نفسها من تأثير هذه الأملاح مثل بروتينات GroEL GroES, Dnak فضلاً عن إنتاجها بروتينات الصدمة الحرارية ومجموعة بروتينات Clp أيضا. إذ تعمل هذه البروتينات على حماية الجراثيم من مواجهة أي ظرف ولا سيما أملاح الصفراء، وأن هذه البروتينات تساعد في إصلاح الأضرار التي تحدث للحمض النووي وتعالجها (Lee *et al*., 2012; Sánchez *et al*., 2007).

وأشار Wu وآخرون (2010) إلى قابلية جنس *Lactobacillus spp* على إنتاج بروتينات ال Clp بكميات كبيرة ومفرطة عند التعرض إلى أملاح الصفراء بنسبة 1.5% التي لها دور في عيوشية الخلايا عند مواجهة أملاح الصفراء وغيرها من الظروف غير الملائمة.

فضلاً عما سبق فإن البروتينات المشتقة من المستين والمثيونين مثل thioredoxin وglutathione لها القدرة على محافظة الصفة الاختزالية للجراثيم كما في جراثيم *L. pla* التي تعمل على تقليل تأثير أملاح الصفراء لجدار الخلايا (Irmler *et al.*, 2008). فضلاً عن قدرة المعززات الحيوية على إنتاج الأنزيمات المحللة لأملاح الصفراء مثل (EC 3.5.1.24) التي تحفز على التحلل المائي للرابطة الأميدية بين الستيرويد والحمض الأميني الجانبي لأحماض الصفراء (Begley *et al.*, 2005).

وقد أشار Sánchez وآخرون (2007) إلى أن الجراثيم *Lactobacillus* لها القدرة على إنتاج أنزيم يحلل أملاح الصفراء الذي يعمل على منع ارتباط أملاح الصفراء بالمادة الأساس بالجدار الخلوي للجراثيم.

وقد أشار كل من Oh وآخرون (2008) و Zago وآخرون (2011) إلى أن الجراثيم لها القدرة على مقاومة أملاح الصفراء بتركيز (0.5) بنسبة 100% و لمدة 4 ساعات، وأن بعض السلالات لها القدرة أيضا على مقاومة أملاح الصفراء بتركيز (1 % و 8 PH) خلال مدة 24 ساعة، وعلى العموم فإن تركيز (املاح الصفراء 1%) لم يكن له تأثير كبير على معدل بقاء جراثيم *L. pla* على قيد الحياة (Jiménez- Pranteda *et al.*, 2012).

2-2-4-2. السيطرة على ارتفاع ضغط الدم

للمعززات الحيوية القدرة على خفض ضغط الدم للأشخاص المصابين بارتفاع ضغط الدم (Liu *et al.*, 2017) عن طريق إنتاج بعض الببتيدات النشطة أثناء تخمر الأغذية، ولا سيما تخمر الحليب مثل angiotensin. وتشير الدراسات الحديثة إلى أن بعض أجناس جراثيم حمض اللبن لها القدرة في خفض ارتفاع ضغط الدم مثل جراثيم *Lactobacillus johnsonii La1* حيث أن الجراثيم الملتصقة ببطانة أمعاء الفئران تعمل على خفض نشاط العصب الكلوي وزيادة نشاط العصب المبهم المعوي الذي له دور مهم في السيطرة على ارتفاع ضغط الدم (Tanida *et al.*, 2014).

2-2-4-3. معالجة الحساسية لسكر اللاكتوز

الحساسية لسكر اللاكتوز هي ظاهرة عدم امتصاص سكر اللاكتوز في الأشخاص الذين يعانون من انخفاض أو فقدان انزيم B-D-galactosidase ، والمتواجد في الأمعاء الدقيقة، مما يؤدي إلى تخمر السكر إذ يمر خلال الأمعاء الدقيقة، وبوساطة الجراثيم الطبيعية في الأمعاء سوف يتحول إلى أحماض وغازات مثل (H_2,CO_2,CH_4) فضلاً عن الأحماض الدهنية القصيرة السلسلة. تتمثل أعراض هذا المرض بمغص في الأمعاء مع انتفاخ في البطن وإسهال وتشنج، وتمتلك المعززات الحيوية دوراً في معالجة وتقليل أعراض المرض، ويكون دور جراثيم المعزز الحيوي في معالجة هذه الظاهرة بانخفاض معدل سكر اللاكتوز في الأغذية المتخمرة وهذا يرجع إلى ارتفاع نشاط انزيم Lactase في التحضيرات الجرثومية المستخدمة في الإنتاج، وهذا الانزيم بدوره يحلل اللاكتوز إلى غلوكوز وغالاكتوز عند دخوله إلى الأمعاء الدقيقة (Masood *et al*., 2011; Gaudana *et al*., 2010; De Vrese and Schrezenmeir, 2008).

إن تناول منتجات الحليب المتخمرة الحاوية على المعززات الحيوية تؤدي إلى تحسين قابلية تخمر سكر اللاكتوز وامتصاصه بسبب محتواها القليل من سكر اللاكتوز إذ تقوم جراثيم حمض اللبن بتحليل السكر أثناء عملية التخمر بسبب امتلاكها أنزيم بيتا كالاكتوسايديز كذلك تساهم المعززات الحيوية المتواجدة في الأمعاء من هضم سكر اللاكتوز في الجسم (Vonk *et al*., 2012; Cheng, 2015).

2-2-4-4. الوقاية من الأمراض السرطانية

ينشأ السرطان نتيجة طفرة، أو نشاط جيني غير طبيعي أثناء حدوث الانقسام الخلوي ونمو الخلايا وغيرها. وللجهاز المناعي للجسم القابلية على تشخيص الخلايا غير الطبيعية وتدميرها، وإن العمليات الحيوية في الجسم تؤدي إلى إنتاج خلايا غير طبيعية إذ أن العمليات الاستقلابية للنبيت المعوي المتواجدة في الجهاز الهضمي تعمل على تقليل المسببات الكيميائية التي تحث خلايا الجسم على الانقسام غير الطبيعي عن طريق إزالة المواد المسرطنة بعملية البلعمة كذلك تغيير بيئة الأمعاء ومنع نمو الأحياء المرضية التي تساعد في إنتاج المواد المسرطنة ولاسيما سرطان القولون، وكذلك قدرة حمض البيوتريك في التأثير في الأحياء المرضية ويمنع نموها فضلاً عن تحفيز مناعة الجسم.

إن الأحياء الدقيقة التي تستخدم كمعزز حيوي تمتلك صفات متعددة منها معالجة الأورام الخبيثة من خلال تقليل المسرطنات (Tador, 2008; Sangeetha *et al*., 2009; Baldwin *et al*., 2010)، وتتم آلية عملها من خلال فعلها المضاد للمواد المطفرة (Dunne *et al*., 2001) ومن ثم المنع المباشر للمسرطنات أو ادمصاصها إلى بوليميرات الكاربوهيدرات الموجودة في الجدار الخلوي، وبعدها خفض امتصاصها وتنشيط الجهاز المناعي (De Roos and Katan, 2000).

ومن آليات عمل البروبيوتيك ضد سرطانات الجهاز الهضمي: تثبيط التكاثر وتحفيز موت الخلايا، الحد من السمية المرتبطة بالعلاج الكيميائي، تعديل الميكروبات المعوية، إنتاج المركبات المضادة للسرطان، تحسين حاجز الأمعاء، النشاط المضاد للأكسدة، التأثيرات المناعية والمضادة للالتهابات، إزالة سمية المواد المسرطنة (Thoda and Touraki, 2025).

إن للمعززات الحيوية دوراً في موت الخلايا السرطانية في القولون والعمل على تحفيز مناعة الجسم فضلاً عن منع نمو الأحياء المرضية المسببة للسرطان، وبالتالي تقلل من نسبة المواد المسرطنة في الجهاز الهضمي (Chang *et al*., 2018; Zhong *et al*., 2014; Heydari *et al*., 2019; Jacouton *et al*., 2017).

2-2-4-5. تقليل الكوليسترول Reduce cholesterol

للمعززات الحيوية القدرة على التمثيل الغذائي للدهون وبالتالي خفض مستوى الكولسترول الكلي في الدم (Bharti *et al.*, 2017, Park *et al.*, 2018)، ومنع حدوث أمراض ارتفاع ضغط الدم وتصلب الشرايين (Ishimwe *et al.*, 2015; Khalesi *et al.*, 2014) ولجراثيم *Lactobacillus* القدرة على خفض الكولسترول والحد من الأخطار الصحية التي يسببها ارتفاعه، ويمكن لجراثيم *L. pla* التأثير في أمراض ارتفاع معدل الكولسترول ولها القدرة على خفض مستوى الكولسترول وتزداد هذه القدرة باستعمال أنواع أخرى من الجراثيم معها (Fuentes *et al.*, 2013).

من الجدير بالذكر أن جراثيم حمض اللبن تقوم بتخفيض مستوى الكوليسترول (Gaudana *et al.*, 2010) من خلال إنتاج Hydroxymethyl glutarate، الذي بدوره يثبط انزيم Hydroxymethyl - glutarate - COA reductase، وهو من متطلبات تكوين الكوليسترول أما الآلية التي تستعملها المعززات الحيوية في خفض الكولسترول فتعد غير معروفة بشكل كامل إلى الآن، إذ أشارت الدراسات السابقة بوجود ثلاث آليات مقترحة تعمل على خفض الكولسترول من قبل المعززات الحيوية وهي:

1- تحويل الكولسترول المتواجد في الكتلة الغذائية بالأمعاء الدقيقة إلى شكل غير قابل للامتصاص، وبالتالي جعل الكولسترول غير قابل للامتصاص وطرحه مع الفضلات.

2- تعمل إنزيمات تُسمى (Bile Salt Hydrolase) التي تنتجها بعض الجراثيم النافعة في الأمعاء على تفكيك أملاح الصفراء. وعندما يتم تفكيك هذه الأملاح، فإنها تفقد قدرتها على العودة إلى الكبد عبر الدورة الدموية المعوية (وهي العملية التي تعيد فيها الأمعاء امتصاص أملاح الصفراء ليعيد الكبد استخدامها). يضطر الكبد إلى تعويض النقص الحاصل في أملاح الصفراء ولتصنيع أملاح صفراء جديدة، يحتاج الكبد إلى مادة الكولسترول كمادة خام أساسية. هذا يدفع الكبد إلى سحب كمية أكبر من الكولسترول من الدم لاستخدامه في الصنع. وبالتالي ينخفض مستوى الكولسترول الكلي في الدم بشكل طبيعي.

3- ارتباط الكولسترول مع المعززات الحيوية، ولا سيما على الجدران مما يمنع امتصاص الكولسترول وتقليل النسبة القابلة للاستقلاب (Kumar *et al.*, 2012).

2-2-4-6. علاج الجهاز البولي والتناسلي:

إن اضطراب الأحياء الدقيقة الطبيعية المتواجدة في المهبل يسمح للأحياء الدقيقة المرضية مثل (*Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, Esherichia coli and Staphlococcus aureus*) بالغزو لتسبب الأمراض (Tariq *et al.*, 2025)، وإن جراثيم *Lactobacillus* تكون من المعززات الحيوية التي تقوم بعلاج إصابات الجهاز البولي والتناسلي (Nami *et al.*, 2025).

يعود الفعل التثبيطي لجراثيم حمض اللبن المتواجدة في المهبل إلى إنتاجها لبيروكسيد الهيدروجين الذي يقلل من وجود الجراثيم المرضية المتواجدة في الجهاز البولي التناسلي (Miko and Barakonyi, 2023)، حيث أن عصيات الجراثيم التي تلتصق بالطبقة الطلائية المبطنة للقناة البولية تمنع عملية ارتباط الأحياء الدقيقة المرضية على سطوح الخلايا (Lima *et al.*, 2025)، كذلك إلى خفض حموضة الوسط (المهبل) (Chung *et al.*, 2025).

2-2-4-7. تحفيز مناعة الجسم

تتسبب جراثيم حمض اللبن بتحفيز مناعة الجسم، إذ درست الكثير من الأبحاث عملية تحفيز مناعة الجسم من خلال مكونات الجدار الخلوي، لهذه الجراثيم التي تظهر خصائص محفزة لمناعة الجسم كزيادة كفاءة الجهاز المناعي الخلوي كعملية البلعمة، وزيادة إنتاج الأجسام المضادة وزيادة تركيز الانترفيرون Interferon، زيادة كبيرة في عدد الخلايا القاتلة الطبيعية Natural killer cells (NKC) في الأمعاء الدقيقة (Furnari *et al.*, 2025; Murthy *et al.*, 2025; Assandri *et al.*, 2025;.

2-2-4-8. معالجة الإصابات الفطرية

تُعدّ أنواع المبيضات من الأحياء المتعايشة الشائعة في الميكروبيوم البشري، ولكنها قد تتحول انتهازياً إلى أحياء ممرضة عند اختلال التوازن بين المضيف والميكروبات. ونظراً لقدرتها على الالتصاق بالأغشية المخاطية والأجهزة الطبية المزروعة، وتكوين أغشية حيوية سميكة، وغزو الأنسجة الظهارية، فإن داء المبيضات يُشكل خطراً خاصاً على الأشخاص ذوي المناعة الضعيفة وكبار السن. النشاط المضاد للفطريات الذي تم الإبلاغ عنه لأجناس البروبيوتيك الشائعة، مثل *Lactobacillus, Bacillus, Bifidobacterium, and Saccharomyces across*، في تجويف الفم، والجهاز الهضمي، والمهبل. كشف آليات عمل البروبيوتيك بالتفصيل، مثل الإقصاء التنافسي، وإفراز المستقلبات المضادة للفطريات، وتعديل المناعة، تُظهر قدرة سلالات وتركيبات معينة من البروبيوتيك على الحدّ بشكل ملحوظ من استعمار المبيضات وتقليل انتشار أعراض داء المبيضات (Wright *et al.*, 2025; Vega-Vásconez *et al.*, 2026).

2-2-4-9. تحسين المؤشرات الانتاجية والصحية لدى دجاج اللحم

تشير الدراسات إلى أن إضافة مزيج من *Lactobacillus* يحسّن وزن الجسم ومعدل الزيادة اليومية ومعامل تحويل العلف بشكل ملحوظ. وتكمن الآلية الرئيسية في تحسين الصحة المعوية، إذ تطيل زغابات الأمعاء وتقلل عمق الخبايا، مما يزيد مساحة امتصاص العناصر الغذائية . إضافة إلى ذلك، تخفض مستويات الكوليسترول والدهون في مصل الدم(اشفيقي، 2023). وبالإضافة لذلك فإن *Lactobacillus* تعزز المناعة عبر رفع مستويات الغلوبولين المناعي (IgG) وبعض السيتوكينات (IL-2, IL-4) (Beirão *et al.*, 2018; Waititu *et al.*, 2014). وتساهم في تقليل الجراثيم الممرضة كالسالمونيلة والإشريكية القولونية (Manafi *et al.*, 2017).

2-2-4-10. التأثيرات العلاجية الأخرى

فضلاً عن كل التأثيرات العلاجية التي ذكرت سابقاً فإن جراثيم حمض اللبن تستخدم في الوقاية من مرض الكبد الدهني غير الكحولي (Liang *et al.*, 2018) وعلاج أمراض الكبد وتخفيف حدة التهابات الجلد وعلاج الحساسية (Hemaiswarya *et al.*, 2013; Ouwehand, 2007). وتقوم بعلاج التأثيرات الجانبية التي يسببها العلاج عند استخدام المضادات الحيوية، ولقد بينت شبكة البحوث الأوربية European Research Network أن لقاحات جراثيم حمض اللبن تضاهي كفاءة اللقاحات المتوافرة حالياً، إذ وجد Zulkapli وآخرون (2025) أن هناك بعض أجناس جراثيم حمض اللبن تعمل على حماية الفم والوقاية من تسوس الأسنان، إذ تشير التقارير التابعة لمنظمة الصحة العامة إلى أن 5 مليارات شخص أو ثمانية من أصل 10 مليارات يعانون من التسوس، كما وجد أن بعض أجناس *Lactobacillus* ذات تأثير مفيد في صحة الفم (Inchingolo *et al.*, 2025)، والوقاية من متلازمة القولون العصبي (Cremon *et al.*, 2018)، بالإضافة إلى دورها في الوقاية من داء الأكريات (لقمس، 2023).

وإن المعزز الحيوي تعم فائدته على الإنسان ويستخدم في أعلاف الحيوانات وتربية الأحياء المائية، إذ تعمل على استبعاد مسببات الأمراض وتحسين عملية الهضم وامتصاص المواد الغذائية (Hemaiswarya *et al.*, 2013).

2-2-5 جراثيم حمض اللبن *Lactobacillus lactis*

استهلك البشر جراثيم حمض اللبن *Lactic Acid Bacteria* (LAB) عن طريق الأطعمة المخمرة لآلاف السنين لخصائصها الاستقلابية الفريدة وتعد جراثيم حمض اللبن من أكثر أنواع الجراثيم أهمية في العديد من المنتجات الغذائية وفي مقدمتها منتجات الألبان من حيث فعاليتها الحيوية وكثافتها، وتستخدم هذه الجراثيم على نطاق واسع في إنتاج الأغذية المتخمرة ومعترف بها عموما بأنها أحياء آمنه حيث يمكن استخدامها بأمان في التطبيقات الطبية والبيطرية (Wang *et al.*, 2022)، حيث استخدمت كبادئات في العديد من المنتجات الغذائية المتخمرة كالألبان والخضار واللحوم، وتبين أن أهم خصائص هذه الأحياء الدقيقة هو إطالة مدة حفظ المنتجات الغذائية المتخمرة مقارنة بتلك التي لم تعامل بها، ويعزى ذلك لقدرة جراثيم حمض اللبن على تثبيط نمو العديد من الأنواع الجرثومية الممرضة والمفسدة للغذاء الموجبة والسالبة الصبغة غرام من خلال إنتاجها للعديد من المواد الاستقلابية مثل الأحماض العضوية (حمض اللبن، حمض الخل) وبيروكسيد الهيدروجين وثنائي استيل والبكتيريوسينات (Ghanbari *et al.*, 2018).

هذا وتعد منتجات الألبان المخمرة تقليديا ليس فقط كغذاء، ولكن أيضا غذاء متكامل غني بالفوائد الصحية (Dehghan *et al.*, 2018)، وتشكل جراثيم LAB مجموعة ميكروبية موجودة بشكل طبيعي في الألبان والخل وهي مسؤولة عن الطعم والرائحة والملمس والاستقرار الميكروبي لهذه المنتجات (Palavecino Prpich *et al.*, 2021). وغيرها من الميزات المعززة للصحة جنبا إلى جنب مما أدى إلى زيادة شعبية منتجات الألبان المخمرة مثل الزبادي والجبن وكعكة الألبان القشدة، الزبدة والتي تكون غنية بمجموعة متنوعة من جراثيم حمض اللبن بصفات وظيفية مختلفة والتي تعتبر موارد ميكروبية ممتازة للإنتاج الصناعي خاصة في صناعة الألبان كمكونات أساسية للمزارع البادئة المستخدمة في إنتاج الأغذية المخمرة فإن أنواع مجموعة LAB لها أهمية صناعية رئيسية (Granato *et al.*, 2022).

أيضا تتميز عزلات جراثيم حمض اللبن المستخدمة كمزارع بادئة للإنتاج التجاري بمميزات عديدة والتي تعتمد على العزلة مثل القدرة على تخمير اللاكتوز ونشاط تحلل البروتين وإنتاج عديد السكريد الخارجية وإنتاج النكهة. كما تلعب دورا أساسيا في تكوين الرائحة والملمس والحموضة في المنتجات النهائية (Li *et al.*, 2020).

ولأول مرة في عام 1919 استخدم Oral_Jensen مصطلح *Lactic acid bacteria* حينها صنف هذه المجموعة من الجراثيم على أربعة أجناس رئيسة *Tetracoccus, Streptococcus, Betacoccus* وتشمل الأنواع متجانسة التخمر التي تستطيع النمو في درجات حرارة عالية (*Tetracoccus*) وأفرادها تستطيع النمو بدرجة حرارة معتدلة، وتكون متجانسة التخمر (*Streptococcus*) وغير متجانسة التخمر (*Betacoccus*) بعد دراسة الخواص والصفات التابعة لهذه المجموعة (Priest and Campbell, 1999; Axelsson, 1998).

وفي عام 1948 قسم Breed وآخرون جراثيم حمض اللبن إلى 7 أجناس ضمن تصنيف موسوعة بيرجي Bergey's manual، ووضعوها في عائلة واحدة سميت *Lactobacteriaceae*، وفي عام 1957 عدل اسم العائلة إلى *Lactobacillaceae* بعد ذلك اتسعت هذه العائلة لتضم (10) أجناس (Tammime, 1981; Stamer, 1976). وصنفت جراثيم حمض اللبن ضمن تصنيف موسوعة بيرجي لعام 1974 على عائلتين منفصلتين هما:

Streptococceae و *Lactobacillaceae* والأخيرة تضم جنساً واحداً فقط هو *Buchanan* *Lactobacillus* اشتق اسم جراثيم حمض اللبن من حقيقة إنتاج حمض اللبن نتيجة تخمر الكربوهيدرات لإنتاج مركبات الطاقة ATP (Noufeu *el al*., 2025)، وفي عام 1873 تم عزل أول جراثيم تابعة لهذه المجموعة (مجموعة حمض اللبن) من قبل Lister وحينها اسماها بـ *Bacterium lactis* ، والآن تسمى بـ *Lactococcus lactis* (Wood, 1998)، اكتشفت جراثيم حمض اللبن في المخمرات اللبنية من قبل Scheel عام (1780) وعرفت بالأحياء المسببة للحموضة من قبل Schwan عام 1837 (Foster *et al*., 1958). تعد جراثيم حمض اللبن ذات اهمية كبيرة وذلك باعتبارها مفيدة وواسعة الانتشار في البيئة وقد بدء استخدام هذه الجراثيم لإنتاج الحموضة أثناء تصنيع منتجات الألبان المتخمرة قبل معرفتها حيث كان الحليب يترك في درجة حرارة الغرفة لساعات عديدة يتم من خلالها تكاثر خلايا جراثيم حمض اللبن (LAB) ثم يستخدم في تصنيع منتجات الألبان المتخمرة (Singh, 2018). استمر هذا العمل على هذا النحو حتى اثبت العالمان Hammer و Baily عام 1919 أن البادئ الواجب استخدامه في إنتاج مشتقات لبنية ذات طعم ونكهة مرغوبين ويجب أن يحتوي على نوعين من الجراثيم: النوع الأول ينتج حمض اللبن، في حين النوع الثاني قادرا على إنتاج الأحماض التي تمنح النكهة والطعم المميز، إن الأحياء الدقيقة الموجودة بصورة طبيعية في الحليب تعمل على تكوين الحموضة فيه من خلال تحويل سكر اللاكتوز Lactose إلى Lactate وعلى هذا الأساس تكون أي جراثيم تنتج Lactate كناتج رئيسي لتخمر السكريات يطلق عليها بجراثيم حمض اللبن (LAB)،

وقد تم وصف اللبن الرائب لعلاج اضطرابات المعدة والامعاء وفي عام (1908) كان العالم الروسي أيلي ميتشينكوف (معهد باستير، فرنسا) هو أول من طرح تفسيراً علمياً لفوائد جراثيم حمض اللبن في الحليب المخمر حيث عد ميتشينيكوف الصحة الجيدة وطول عمر البلغار إلى استهلاكهم العالي من الحليب المخمر المسمى ياغورت (Ayivi *et al*., 2020). وهكذا افترضت نظريته حول طول العمر دون شيخوخة على أساس مبدأ أن جراثيم حمض اللبن كانت تحل محل الجراثيم المنتجة للسموم الموجودة في الأمعاء والتي تطيل الحياة، وأكد أيضا أن حمض اللبن وغيره من المنتجات التي تنتجها جراثيم حمض اللبن في اللبن الرائب تثبط نمو وسمية الجراثيم اللاهوائية والجراثيم المكونة للأبواغ في الأمعاء الغليظة.

إن انتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين الجراثيم السالبة والموجبة قد دفع الباحثين المهتمين بمجال العلاج إلى اكتشاف بدائل علاجية، ومن بين هذه البدائل بروتينات مثبطة تفرز من بعض أنواع جراثيم *Lactobacillus* يعرف بالبكتريوسين Bacteriocin الذي ينتج من قبل الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة غرام، يرتبط بعض أنواع البكتريوسينات مع مستقبلات خاصة موجودة على السطح الخارجي للجراثيم الهدف فيسبب لها تحللاً أو يهاجم مواقع داخل الخلية الجرثومية مثل الرايبوسومات أو يعيق استمرار المسارات الاستقلابية وبالتالي يوقف عملية إنتاج الطاقة (Banerjee *et al*., 2022).

وبذلك تمتلك جراثيم حمض اللبن صفة التأثير التثبيطي ضد الأحياء الدقيقة ويعود استخدام هذه الجراثيم في تحسين حفظ الأغذية في قابليتها على تثبيط نمو الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة غرام أو تلك المسببة لتلف الأغذية، ويعد هذا الاستخدام أحد أهم الوسائل الطبيعية للحد من نمو الأحياء الغير مرغوب فيها وقد أطلق على هذا النوع من الحفظ بالحفظ الحيوي (Shafigue *et al*., 2023). وترجع فعالية النيسين (بكتريوسين) العالية ضد الأنواع الجرثومية الممرضة إلى قدرته على تكوين فتحات في طبقة الفوسفات الدهنية المزدوجة Phosphilipid bilayer الموجودة ضمن تركيب غشاء السايتوبلازم مما يسبب إعاقة القوة المحركة للبروتونات (Zimina *et al*., 2020).

إن السمة الاستقلابية الرئيسية المرتبطة ب LAB هي إنتاج حمض اللبن من خلال تخمر الكاربوهيدرات، والتي تعرف بإسم تحمض الطعام أو عملية التحمض الأولية (Bintsis, 2018). ينتج عن تكوين الحمض بواسطة LAB ظروفا مرهقة للأحياء الدقيقة المسببة للأمراض أو التي تسبب التلف الموجودة في الأطعمة المخمرة تقليديا عن طريق تقليل قيم درجة الحموضة وبالتالي تحسين الخصائص الصحية وإطاله التخزين الآمن للمنتجات النهائية ومن ناحية أخرى فإن درجة الحموضة 5.3-5.1 لها تأثير إيجابي على رطوبة الأطعمة المخمرة حيث إن انخفاض درجة الحموضة يؤدي إلى انخفاض في احتباس الماء لذلك يتم تسريع عمليات النضج (Grujović *et al*., 2022).

إن أنواع حمض اللبن على الرغم من أنها تكون بأنواع مختلفة وغير متشابهة في أغلب صفاتها إلا أنها تشترك في صفة إنتاجها لحمض اللبن بصورة رئيسية وتشمل أنواع متعددة تابعة إلى الأجناس *Leuconostoc, Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Aerococcus, Alloiococcus, Enterococcus*، *Enterococcus, Oenococcus, Dolosigranulum, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella*، ويعد جنس *Lactobacillus* أوسع هذه الأجناس انتشارا والذي يتضمن أكثر من 100 نوع تم عزل معظمها من الألبان والجهاز الهضمي للإنسان والحيوان (Mokoena, 2017). بعد ذلك قام العلماء مؤخرا بإعادة تصنيف جنس *Lactobacillus* إلى 25 جنس، وكان إعادة التصنيف هذا ضرورياً نظراً لمدى تنوع الجنس الأصلي الذي جعل تصنيف العصيات اللبنية المختلفة وتسميتها والتمييز بينها صعباً للغاية (Zheng *et al.*, 2020).

2-5-2-1 أجناس جراثيم حمض اللبن Genera of lactic acid bacteria

تضم جراثيم حمض اللبن أجناس عديدة منها:

Streptococcus(S)
Leuconostoc (Leu)
Lactobacillus (Lc)
Pediococcus (Pd)
Bifidobacterium (Bif)

وأهمها جنس *Lactobacillus*

2-5-2-2 جنس *Lactobacillus* (العصيات اللبنية)

أحد أهم أنواع المعززات الحيوية، والأكثر انتشاراً والأكثر استعمالاً (Chew *et al.*, 2019)، ويصنف جنس *Lactobacillus* ضمن عائلة العصيات اللبنية *Lactobacillaceae*، وتمتاز أجناس جراثيم حمض اللبن بكونها موجبة لصبغة غرام وأن خلاياها يمكن أن تكون كروية أو عصوية الشكل، مفردة أو ثنائية أو بشكل سلاسل أو تجمعات، غير متحركة، غير مكونة للأبواغ، غير مرضية وغير منتجة للسموم، وتخمر العديد من أنواع السكريات، غير منتجة للصبغات، ومتحملة للحموضة والملوحة، ومتحملة للحرارة بمدى يتراوح بين 5 – 50 °م إلا ان درجة الحرارة المثلى لأغلبها هي 30م، أغلب أنواعها تكون لاهوائية أو متحملة لوجود كميات قليلة من الهواء وأنواع قليلة تكون هوائية كما انها تحتاج لأجل نموها العديد من العناصر الغذائية المعقدة كالأحماض الأمينية والقواعد النيتروجينية والفيتامينات والمواد الكاربوهيدراتية القابلة للتخمر لتكون مصدراً للطاقة (Ge *et al.*, 2021).

تحاط بعض أنواع هذا الجنس بطبقة خارجية من متعدد السكريات، ويختلف تركيب متعدد السكريات باختلاف الأنواع والسلالات، إلا أنه يتكون بصورة رئيسة من وحدات متكررة بنسب مختلفة من D – D- galactose glucose. Rhaminose. وتحوي 33–55 من القواعد النتروجينية (G+C) وخالية من السايتوكروم ومتجانسة أو غير متجانسة التخمر والناتج النهائي للتخمر المتجانس لسكر الكلوكوز هو حمض اللبن، والناتج النهائي للتخمر غير المتجانس هو حمض اللبن، ومجموعة متنوعة من الأحماض مثل حمض الخليك وحمض الفورميك وايثانول وغاز ثاني أكسيد الكربون وتكون لا هوائية أو شحيحة الاحتياج للهواء Microaerophilic ومتحملة للحموضة وذات متطلبات تغذوية عالية (شرهة) منها (الكاربوهيدرات والأحماض الأمينية والببتيدات واسترات الأحماض الدهنية ومشتقات الأحماض النووية والفيتامينات)، كما تعد جراثيم *Lactobacillus* سالبة لاختبار الكاتلاز وسالبة لاختبار الأوكسيداز غير مميعة للجيلاتين، وتظهر مستعمراتها على الأوساط الزرعية الصلبة مدورة إلى محدبة وغير مسننة الحواف وتكون كريمية اللون (Abrahamsson *et al*., 2009; Melgar-Lalanne *et al*., 2012).

نشرت Orla-Jensen عام 1919 لأول دراسة وضعت فيها أسس تصنيف جراثيم حمض اللبن حيث اعتمدت في تصنيفها هذا على عوامل معينه منها الأساس الشكلي (مورفولوجيا الخلية عصوي، كروي، ونمط التجمع مفرد ثنائي سلسلي وكذلك نمط تخمير سكر الكلوكوز متجانس، غير متجانس وكذلك نطاق درجه حراره النمو الأمثل لهذه الجراثيم (Ayivi *et al*., 2020).

ويضم جنس العصيات اللبنية مجموعة متنوعة من الأنواع الجرثومية والتي تضم ثلاث مجاميع:

A – العصيات اللبنية المتجانسة التخمر إجباريا Obligate homofermentativelactobacilli

وهي تخمر السكريات السداسية إلى حمض اللبن. إذ تتميز هذه المجموعة بكونها تنتج حمض اللبن بنسبة 85% كناتج استقلابي نهائي لتخمر السكريات السداسية وهذا يؤدي إلى تقليل درجة الحموضة (Gereková *et al*., 2011) وهي لا تخمر السكريات الخماسية و كلوكونيت (Gluconate) (Hammes and Vogel, 1995; Belkacem *et al*., 2001). تنمو في (45) درجة مئوية ولا تنمو في (15) درجة مئوية (Marth and Steele, 2001). مثل: *Lb.acidophilus, Lb.amylovarus, Lb.gasser, Lb.crispatus, Lb.gallinarum, Lb.helveticus, Lb.delbrueckii subsp.bulgaricus, Lb.johnsonii, Lb.salivarius subsp. salivarius* (Kleanhammer, 2001).

B- **العصيات اللبنية غير متجانسة التخمر اختياريا** Facultative heterofermentative lactobacilli تكون لها القابلية على تخميرها السكريات السداسية والخماسية (Marth and Steele, 2001) فهي تنتج حمض اللبن فضلاً عن حمض الخليك والايثانول إذ تعتمد كمية الايثانول والخلات على جهد الأكسدة والاختزال، وكذلك تنتج الفورمات والأوكسجين وغاز ثنائي أوكسيد الكاربون وبنسبة 50% الذي ينعدم إنتاجه في المجموعة الأولى (متجانسة التخمر)، أما الحرارة المثلى لنمو أجناس هذه المجموعة فهي (15) درجة مئوية، ولا تنمو في (45) درجة مئوية (Corsetti and *Settanni*, 2007). مثل: *Lb.casei, Lb.paracasei subsp.tolerans, Lb.paracasei subsp.paracasei, Lb.rhamnosus, Lb.plantarum* (Kleanhammer, 2001).

C-**العصيات اللبنية غير متجانسة التخمر اجباريا Obligate heterofermentative**

والتي تخمر السكريات السداسية إلى حمض الخليك وحمض اللبنيك وكحول الايثانول وغاز ثنائي أوكسيد الكاربون وكذلك تخمر السكريات الخماسية أيضا (Rossi *et al.*, 2019) ، وتتميز أيضا هذه المجموعة بقابليتها على النمو في درجة حرارة 15 مئوية (Ravyts and De Vuyst, 2011). مثل: *Lb.fermentum, Lb.reuteriLb. brevis, Lb. buchneri*، (Kleanhammer, 2001).

تنمو أنواع هذا الجنس بصورة جيدة في وسط De Man Regosa Sharp agar (MRS) وتكون مستعمراتها ملساء، صغيرة، معتمة، متحملة للحموضة، ولها القدرة على خفض درجة الحموضة حتى 4 بسبب إنتاجها حمض اللبن وهذا ما يفسر تواجدها في القناة الهضمية للإنسان والطبقات الرطبة المخاطية للمهبل (Chee *et al.*, 2020). كما تتواجد في القناة الهضمية للعديد من الحيوانات وفي أنواع مختلفة من الأغذية كاللحوم ومنتجات الألبان والنباتات كالفاكهة والخضراوات والمخللات والعصائر (da Silva *et al.*, 2023).

3-5-2-2 عمليات التخمير بواسطة LAB Fermentation using LAB

التخمير هو عملية كيميائية تحدث في غياب الاوكسجين تقوم بواسطتها الأحياء بتكسير الكاربوهيدرات وتكون نواتج هذه العملية غاز مثل ثنائي أوكسيد الكاربون وقد تتخذ العملية نفسها شكل تخمير اللبن والأحماض (الكحول أو البروبيونيك أو الستريك أو الزبد أو الميثانول أو المانيتول أو الأسيتيك) (Comasio *et al.*, 2020). وكذلك يكون التخمير من استقلاب البروتينات والدهون تحت تأثير أحياء دقيقة معينة، بما في ذلك الخمائر والجراثيم والفطريات الخيطية من أجل تحديد اتجاه محدد لعملية التخمير يتم استخدام أنماط محددة وسلالات الأحياء الدقيقة (Śmiechowska *et al.*, 2018).

وتعد عمليات التخمير أقدم تقنيات التكنولوجيا الحيوية المستخدمة في إنتاج الغذاء، وهي حالياً من بين العمليات الأساسية المستخدمة في صناعة الأغذية، بما في ذلك الخبز والجبن وصلصة الصويا والنبيذ والبيرة والخل وغيرها الكثير، وفي الوقت الحاضر يتم استخدام مزارع البادئ المختارة في شروط الإنتاج الصناعي، ولا تزال المنتجات الإقليمية والحرفية تعتمد في الغالب على التخمير التلقائي (Yu *et al.*, 2021; Leonard *et al.*, 2021).

4-5-2-2 القابلية التثبيطية لجراثيم حمض اللبن The inhibitory ability of lactis acid bacteria

تعود القدرة التثبيطية لهذه الجراثيم إلى إنتاجها مادة البكتريوسين Bacteriocin وهي مجموعة غير متجانسة من المواد النشطة بيولوجيا التي تنتجها الجراثيم والتي تشمل الببتيدات والبروتينات والتي تظهر نشاطا مضادا للميكروبات والببتيدات الجرثومية يتم تصنيعها وإفرازها عن طريق الرايبوسوم من قبل مجموعة متنوعة من الجراثيم بغرض قتل الجراثيم الأخرى وبالتالي إزالة المنافسة الميكروبية في بدائيات النوى (Yi *et al.*, 2022). تختلف البنية والخصائص الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية الكيميائية للبكتريوسينات على نطاق واسع بالإضافة إلى فعاليتها المضادة للميكروبات والتي يمكنها إظهار نشاط مضاد للميكروبات موجه ضد نفس السلالات الجرثومية التي أنتجتهم أو ضد سلالات من الأنواع وثيقة الصلة (Benítez-Chao *et al.*, 2021). يتم تنظيم جينات ترميز البكتريوسينات عن طريق اوبيرونات موجودة في الكروموسوم أو البلازميدات أو العناصر الوراثية المتنقلة الأخرى، بشكل عام تكون هذه العوامل محفزة وتتطلب إفراز وتراكم خارج الخلية من الببتيدات الجرثومية (Kumariya *et al.*, 2019). علاوة على ذلك فأن تأثير العوامل البيئية يعزز تأثير إفراز البكتريوسينات بما في ذلك كثافة الخلايا الجرثومية ووفرة المغذيات ووجود حمض الاسيتيك والببتيدات (Meade *et al.*, 2020).

من المزايا المهمة للبكتريوسينات أنه يمكن أن يكون لها نشاط ضد الجراثيم المسببة للأمراض والجراثيم الانتهازية بما في ذلك الأنواع المقاومة للأدوية المتعددة دون التمييز بين السلالات الحساسة والمقاومة للمضادات الحيوية وثبت أن العديد من البكتريوسينات تعمل بالتآزر مع المضادات الحيوية التقليدية لتقليل الأعراض الجانبية غير مرغوب فيها وتقليل انتشار السلالات المقاومة (Hernández-González, 2021). وبذلك تعتبر البكتريوسينات بدائل جديدة للمضادات الحيوية والعلاجات المبتكرة في الطب البشري وكذلك العلوم البيطرية (Bédard *et al.*, 2018; Juturu and Wu, 2018).

تستخدم المركبات المضادة للميكروبات في الأطعمة نظراً لقدرتها على تأخير تطور الأحياء الدقيقة غير المرغوب فيها في المنتج. يمكن تصنيفها إلى مجموعتين: مضادات الميكروبات الاصطناعية والطبيعية من بين 36 من مضادات الميكروبات المعتمدة كمواد حافظة من قبل هيئة سلامة الأغذية الأوروبي (Pasca *et al.*, 2018).

ويمكن إدخال الجراثيم المستخدمة في الحفظ البيولوجي في الغذاء بثلاث طرق

1- دمج الجراثيم في المنتج الغذائي.

2- إضافة بكتريوسينات نقية أو منقاة جزئياً في الطعام.

3- إضافة مكون مخمر بواسطة سلالات منتجة للجراثيم (Barbosa *et al.*, 2018; Chikindas *et al.*, 2018).

تعرف البكتريوسينات على إنها مجموعة متنوعة من البروتينات التي تنتجها رايبوسومات الخلية والمتمثلة بنوائج الاستقلاب الثانوية للمعززات الحيوية، وغيرها من الأحياء الدقيقة، التي تعمل مضادات نمو، أو قاتلة، أو معرقلة لنمو بعض الأحياء الدقيقة، ولا سيما الأنواع الممرضة منها، ويكون عملها شبيهاً بعمل المضادات الحيوية، ولكنها أكثر تخصصاً من المضادات الحيوية، وغالباً ما تنتج البكتريوسينات تلقائياً أو عن طريق الحث من قبل الجراثيم المنتجة لها ضد الأحياء الدقيقة الضارة أي أن وجود الأحياء الدقيقة المرضية يحث الأنواع المنتجة للبكتريوسينات، ولا سيما المعززات الحيوية مما سيحثها على إنتاج وإفراز البكتريوسينات القاتلة (Reis *et al.*, 2012). إن تأثير البكتريوسينات في الخلايا يشابه آليات عمل المضادات الحيوية، فقد تؤثر في الجدار الخلوي من خلال تحطيم، أو تكوين ثقوب في الجدار الخلوي، أو قد تؤثر في الغشاء السيتوبلازمي أو تثبط عمل الأنزيمات المتواجدة فيه، ومنها ما يثبط تخليق البروتين إذ تتداخل مع الفعاليات الاستقلابية للمادة الوراثية، وتثبط تضاعف المادة الوراثية داخل الخلية المستهدفة (O'Shea *et al.*, 2012). ذكرت AL-Marsoomy (2008) قدرة جراثيم *L. pla* على إنتاج مركبات استقلابية تعد من المضادات الميكروبية Antimicrobial التي تؤدي دوراً مهماً في الحفاظ على صحة الفم، وعزت هذا التأثير إلى وجود جراثيم *L.pla* ضمن الفلورا الطبيعية للفم وتنافسها مع الجراثيم المرضية على مواقع الإلتصاق في الفم وحماية الفم من الإصابة بالجراثيم المرضية، فضلاً عن ذلك إنتاجها العديد من البكتريوسينات وأهمها Plantaricin الذي يكون عبارة عن بروتين مقاوم للحرارة، ومضاد ميكروبي لعديد من الأنواع المرضية والأنواع المسببة لتلف الأغذية، ولا سيما الجراثيم الموجبة لصبغة غرام مثل. *Pediococcus spp*، *StapHylococcus spp*، *Listeria spp*.

2-2-5-5-2 طيف نشاط البكتريوسين Bacteriocin activity spectrum

يُعرف الطيف المضاد للميكروبات بأنه مجموعة من السلالات الحساسة لجراثيم معينة وفي عام (1988) حدد Klaenhammer فئتين من البكتريوسينات اعتماداً على طيف نشاطها احتوى احدهما على بكتريوسينات نشطة ضد الجراثيم تصنيفياً قريبة من المنتج والآخر يتكون من بكتريوسينات ذات طيف واسع نسبياً من النشاط ضد الجراثيم موجبة لصبغة غرام. وتم تقسيم البكتريوسينات إلى ثلاث فئات:

1- بكتريوسينات ذات طيف مثبط ضيق، تؤثر فقط على الأنواع ذات الصلة الوثيقة بالجراثيم الممرضة.

2- بكتريوسينات ذات طيف مثبط واسع، توثر على الجراثيم موجبة الغرام، بما في ذلك مسببات الأمراض التي تنقلها الأغذية.

3-بكتريوسينات ذات طيف غير عادي من النشاط، بما في ذلك الجراثيم سالبة الغرام والفيروسات والخمائر (Zimina *et al.*, 2020).

2-2-5-5-3 أنواع البكتريوسينات Types of bacteriocins

من أهم أنواع البكتريوسينات المنتجة من قبل جراثيم حمض اللبن هي:

- Nisin الذي تنتجه جراثيم *Lactococcus lactis*
- Lactococcin الذي تنتجه جراثيم *Lactococcus lactis*
- Plantaricin الذي تنتجه جراثيم *Lactobacillus plantarum*
- Reutricin الذي تنتجه جراثيم *Lactobacillus reuteri*
- Acidocin . الذي تنتجه جراثيم *Lactobacillu acidophiluss*
- Lacticin الذي تنتجه جراثيم *Lactobacillus acidophilus*

وهناك أنواعا أخرى من البكتريوسينات والتي تنتجها الجراثيم الموجبة لصبغة غرام منها: Subtilosin الذي تنتجه جراثيم *Bacillus subtilis* و gassericin الذي تنتجة جراثيم *Lactobacillus gasseri* و enterocin الذي تنتجه جراثيم Enterococcus faecalis (Darbandi *et al.*, 2022).

تتعدد العوامل المسؤولة عن الفعالية التثبيطية لجراثيم حمض اللبن، ولا تقتصر على البكتريوسينات فقط، بل تشمل أيضاً: إنتاج الأحماض العضوية (كحمض اللبن وحمض الخليك)، وتراكم بيروكسيد الهيدروجين الناتج عن غياب إنزيم الكاتلاز، وإطلاق غاز ثاني أكسيد الكربون أثناء تخمر السكريات، وأخيراً مركب الداي أستيل الذي يُنتج أيضاً من تخمر السكريات، وهو المسؤول عن النكهة المميزة لمنتجات الألبان، وله دور أساسي في تثبيط كل من الجراثيم موجبة وسالبة صبغة غرام (Zapaśnik *et al.*, 2022).

2-6. التغليف الدقيق

2-6-1. تعريف التغليف الدقيق:

يعرف التغليف الدقيق بأنه: عملية إحاطة مادة بمادة أخرى، أو إحاطة مادة مهمة بمادة أقل أهمية، وكلاهما لا يتجاوز حجمهما بضع المايكرومتر أو المليمتر (Melgar-Lalanner *et al*., 2012).

ويعرف أيضا بأنه عملية إحاطة مادة واحدة (العامل الأساسي) بمادة أخرى (مادة الجدار أو المادة الواقية وعادة ما تسمى المادة المغلفة بالطلاء أو الغشاء أو المادة الناقلة أو النسيج) (Ozyurt and Otles, 2014)، ومن الأمثلة على المواد التي يتم تغليفها على مستوى علوم الأغذية هي النكهات والصبغات والمثبتات والمواد المستحلبة ومضادات الأكسدة والأنزيمات والدهون والفيتامينات والأملاح المعدنية والمعززات الحيوية (Estevinho *et al*., 2013). وكذلك يعرف التغليف الدقيق بأنه عملية فيزيائية أو ميكانيكية لإحاطة مادة بمادة أخرى وإنتاج جسيمات بأقطار نانومترية إلى بضعة مليمترات تعرف بالكبسولات أو الحبيبات التي تعد جزيئات صغيرة تحتوي على مادة أساسية محاطة بطبقة حامية، وتشمل المواد التغليف مجموعة متنوعة من البوليمرات أو الكاربوهيدرات والدهون والشموع، وهذا يتوقف على نوع المادة الأساسية المطلوب حمايتها (Chávarri *et al*., 2012).

التغليف هي عملية تغطية وتغليف لمواد صلبة أو سائلة أو غازية، ضمن حاضنة بوليميرية، مشكلة دقائق صغيرة، وتبعاً لأبعادها تصنف إما تغليف مكروي microencapsulation (μm5000-0.2) أو نانوي nanoencapsulation (>0.2μm). يستخدم مصطلح الحبيبات المكروية Microcapsuls لوصف دقائق أو حبيبات كروية الشكل، لها نواة داخلية تحوي مادة فعالة تم تغطيتها بطبقة بوليميرية بسماكات مختلفة. يتصرف البوليمير كغشاء عازل للنواة، ويحميها من أثر التعرّض الجائر لعوامل خارجية، ويستطيع هذا الغشاء أن يذوب أو يخرب ذاته من خلال محفزات محدّدة، محرّراً المادة الفعالة المحتجزة، في المكان المطلوب، أو الزمن الأمثل (Tolve *et al*., 2016).

كما تساعد الكبسلة في تحويل السوائل إلى مواد صلبة، مما يجعل التعامل معها أسهل. تحمي الكبسلة المواد الغذائية الحساسة من الأكسجين، والحرارة والرطوبة، وتغير pH الوسط إلى أن يتم تحريرها في منطقة الهدف، ومن ثم نتجنب فقدان القيمة الغذائية لها، كما يتم بالكبسلة تغطية الطعم أو الرائحة لبعض المتممات الغذائية التي تضاف للطعام بغرض تدعيمه، كما تتحسّن بالكبسلة الثباتية على الرّف Shelf life stability ، كما أنها تقدم حلولاً ناجحة للعديد من المشاكل التي تواجهها الصناعات الدوائية والغذائية (Tolve *et al*., 2016).

ينجح التغليف في تحضير دقائق مكروية أو نانوية قادرة على تحرير الدواء في المكان المطلوب (المعدة، القولون، أعضاء محدّدة)، كما تنجح في حماية الدواء من العوامل القاسية (الوسط، درجة الحرارة وغيرها) (Mishra, 2019).

التغليف هو حجز لمركبات محبّة أو كارهة للماء، ضمن أنظمة محبة للماء، خصوصاً المكوّنات النباتية الفعالة حيوياً Phytoceutical ، كالألكالوئيدات، الفلافونيدات، التربنويدات، والبولي فنولات، والزيوت الأساسية (Cuma, 2018)، والتي صنفت كمنتجات نباتية فاعلة بيولوجياً، وطبياً، مستخلصة من النباتات، والكثير من المستحضرات الصيدلانية التى تستعمل حالياً مشتقة من النبات، بالإضافة إلى الفيتامينات المعادن، وجراثيم حمض اللبن (البروبيوتيك) (Akolade *et al*., 2017).

فيما يعرف التغليف الدقيق للجراثيم على أنه حماية الجراثيم من العوامل البيئية القاسية بهدف خلق بيئة ملائمة لها يمكن من خلالها البقاء على قيد الحياة أثناء التصنيع والخزن وإطلاقها أو تحررها في المواقع المناسبة (Saeed *et al*., 2022).

هذه الأغلفة توفر بيئة جيدة ولا هوائية وملائمة للمعززات الحيوية في مواجهة الظروف القاسية وتقليل الأضرار إلى أقل ما يمكن (Antunes *et al*., 2013).

2-6-2. الغرض من إجراء التغليف الدقيق:

استعملت عملية التغليف الدقيق قبل أكثر من ثلاثين سنة لحماية بعض المركبات الأساسية، أو الخلايا البايولوجية من البيئة المحيطة بها، والتي قد تكون مدمرة لها، وعلى العموم فإن عملية التغليف الدقيق تسمح للجزيئات بالدخول أو الخروج من الكبسولة أو الحبيبة، ويتم تشبيهها ببيضة الطيور أو غلاف البذرة أو جدار الأبواغ الجرثومية أو الجلد والصدف وغيرها (Nag, 2011).

وغلفت جراثيم حمض اللبن لأول مرة من قبل العالم Bert Saddles عام 1975 باستعمال حبيبات الألجينات لغرض تخمير اليوغرت، وتعمل عملية التغليف الدقيق على تحسين خصائص تدفق المادة الأساسية وحمايتها من فقدان الرطوبة والأوكسجين والحرارة العالية، ويمكن لهذه العملية تحسين جودة الأغذية عن طريق حماية بعض مكونات الأغذية الحساسة للأوكسجين مثل الفيتامينات والدهون وكذلك في صناعة الأدوية، وتعمل على التحكم في إطلاق النكهات والروائح والعقاقير ومضادات الأكسدة وغيرها من المواد المغلفة ولذا فإن السيطرة على هذه المواد والتحكم في إطلاقها وايصالها بصورة فعالة والتحكم في وقت إطلاق المكونات وزيادة استقرارها واخفاء طعم المركبات غير المرغوبة، وهذا لا يتحقق إلا من خلال تقنية التغليف الدقيق (Nag, 2011).

2-6-3. أهمية التغليف الدقيق

يؤدي التغليف الدقيق للمعززات الحيوية إلى حمايتها من الظروف البيئية القاسية المحيطة بها أثناء عمليات التجهيز والتصنيع ودرجات الحرارة العالية والمنخفضة والأوكسجين والضغط الأزموزي العالي أثناء تصنيع وخزن الأغذية، وتوفير الحماية اللازمة تجاه حموضة المعدة العصارة المعوية بالجهاز الهضمي فضلاً عن حمايتها تجاه الظروف البيئية القاسية الأخرى مثل درجات الحرارة المنخفضة والتجميد والحموضة، وبالتالي تقليل الأضرار للمعززات الحيوية أقل ما يمكن مما يعني أن الأعداد الحية المغلقة تغليفاً دقيقاً تمثل من الناحية العلمية أعداداً أعلى بالمقارنة مع غيرها. لأن هذه الأعداد تكون مقاومة وأعلى عيوشية للظروف المتطرفة من دون المساس بفعاليتها الحيوية (Antunes *et al*., 2013; Jiménez-Colmenero, 2013; Kailasapathy, 2006).

وتتضمن أهمية التغليف الدقيق ما ذكره (Int 1, 2015; Burgain *et al*., 2011) (عطرة، 2020). ومنها:

1- تقليل الفائض عن طريق حماية المركبات الحيوية بالمادة الغذائية عند عمليات التصنيع، وعدم إضافة المركبات الحيوية للتعويض عن الخسارة المتوقعة أثناء التصنيع مثل الفيتامينات الحساسة للحرارة، وبالتالي تقليل الخسارة المادية.

2- حمايتها تجاه الرطوبة والأوكسجين وأشعة الشمس والحرارة والتفاعل مع بقية المكونات مثل الدهون ومواد النكهة ومضادات الأكسدة وغيرها من المواد.

3- توفير الحماية اللازمة والكافية للمواد المغلفة الأمر الذي يتيح إطلاق المواد التي تم تغليفها بالموقع المناسب لها بعد اتمام حمايتها من الظروف غير المرغوبة مثل الحرارة أو الحموضة أو الأوكسجين وهذا يعني تجاوزها لهذه الظروف.

4- إخفاء الروائح ومركبات النكهة غير المرغوبة والمرتبطة بالمادة الغذائية، وزيادة تقبل المستهلك لها.

5- إنتاج المواد المغلفة بالتغليف الدقيق بأحجام صغيرة، وقد تكون جافة أو شبة جافة مما يسهل نقلها وتداولها واستعمالها وزيادة عمرها الافتراضي.

6- يحافظ التغليف الدقيق على فعالية المواد المغلفة سواء كانت مادة غذائية أو طبية حيث توفر الحماية اللازمة للاستقرار والتسليم والعمل المطلوب مثل الحفاظ على العقار الطبي الحساس تجاه الحموضة واطلاقه في الأمعاء لغرض الامتصاص.

7- الانتشار والتوزّع على مساحة واسعة من المخاطية المعدية المعوية، مما يحسّن انحلال الدواء ويخفف تأثيره المخرّش.

8- توفر تقنيعاً لطعم الدواء.

9- تعتبر صيغاً عالية الثباتية، وجيدة الأمان حيث لا يستلزم تحضيرها استخدام مذيبات عضوية.

يُعدّ التغليف الدقيق من أكثر الطرق فعالية، وقد أولى العديد من الباحثين اهتماماً خاصاً له. ومن الطرق المفيدة لإطالة عمر الجراثيم وإيصالها إلى الأمعاء توفير حاجز مادي للبروبيوتيك. ويُعزى نجاح هذه التقنية غالباً إلى الاختيار الأمثل لمادة التغليف الدقيق، وسلالة البروبيوتيك، وآلية إطلاق البروبيوتيك، وعملية التغليف (Setiarto *et al.*, 2025).

2-6-4. تركيب الأغلفة:

يعتمد الأداء الوظيفي للأغلفة على الطبيعة الكيميائية وخصائص السطح للمادة المغلفة، تتكون الأغلفة من غشاء نصف نفاذ، أو غير نفاذ ويكون شكلها أما كروي أو بيضوي الشكل، وقوامها قد يكون رقيقاً أو قوياً صلباً يميل إلى الهلامي ويكون حجمها من بضعة مايكرومتر الي بضعة مليمترات (Butstraen and Salaün, 2014).

تتكون الأغلفة من مادة غذائية طبيعية واحدة أو أكثر مثل سكريات أو أصماغ أو بروتينات أو سكريات متعددة أو دهون أو البوليمرات الصناعية أو المعدلة التي تستعمل في تغليف المادة الأساسية وبذلك تنتج هذه الأغلفة بشكل شبة صلب أو بشكل مسحوق جاف، والشكل الظاهري لسطح هذه الأغلفة يكون منتظماً أو غير منتظم، وقد تحتوي أو لا تحتوي على المسامات، حيث إن وجود المسامات يؤدي إلى عدم جدوى عملية تغليف المادة الأساس (Mortazavian *et al.*, 2007).

وتعد أغلفة الالجينات من الأغلفة ذات الخصائص الجيدة وسطحها أملس، ولا تحتوي على مسامات، بينما عند استعمال بروتينات الحليب مادةً مغلفة فإنها تكون بطيئة التبلور، وسوف تكون الأغلفة غير منتظمة الشكل وأسطحها غير منتظمة. كذلك يمكن تصنيف الأغلفة حسب الطريقة المستعملة للتغليف الدقيق (Muthukumarasamy *et al.*, 2006; Ainsley-Reid *et al.*, 2007).

2-6-5. بعض المواد المستعملة في التغليف الدقيق:

من الضروري أن تكون المواد المستعملة في عملية التغليف الدقيق من المواد الآمنة صحياً والأكثر شيوعاً والمعترف بها وتعد Generally Recognized as Safe 'GRAS والمعروفة بأنها تستعمل في التصنيع الغذائي وبشكل آمن وموثقة وتم التصريح باستعمالها (Shi *et al.*, 2013). ويفضل استعمال المواد الطبيعية مثل البوليمرات الطبيعية لقابليتها على التحلل البيولوجي داخل الجسم وتوافقها مع طبيعة الغذاء وتوافرها بكثرة (Antunes *et al.*, 2013).

استعمل العديد من المواد في تغليف الجراثيم، مثل السكريات الهلامية مثل النشا والسليلوز والألجينات والبكتين والكاراجين والكايتوسان والبروتينات مثل فول الصويا وبروتينات الشرش والكازين والجيلاتين والدهون والشموع (Imran *et al.*, 2010; Rokka and Ranamaki, 2010).

ومن المهم مراعاة أن تكون الأغلفة غير قابلة للذوبان في الماء للحفاظ على هيكلها في الغذاء وفي الجهاز الهضمي، ويمكن استعمال طبقة واحدة من الأغلفة أو أكثر من طبقة، وهذا يساعد على زيادة مقاومتها للظروف الحمضية وتراكيز أملاح الصفراء وكذلك يقلل من التعرض للأوكسجين أثناء مدة الخزن وغيرها من الظروف الأخرى وحسب الغرض من الاستعمال مما يزيد من عيوشية الجراثيم المغلفة (Chávarri *et al*., 2012).

تستخدم البوليميرات على نطاق واسع في عمليات الكبسلة إذ أثبتت أنها تزيد من قابلية البروبيوتيك للبقاء أثناء التصنيع والتخزين والمرور عبر المعدة الحمضية (Asgari *et al*., 2020)، ونميز ثلاثة أنواع لها (Loquercio, 2014):

- البوليمرات طبيعية المنشأ Natural origin polymers
- البوليمرات الصنعية Synthetic polymers
- البوليمرات القابلة للتحلّل الحيوي Biodegradable polymers

وتم التركيز في هذا البحث على البوليمرات طبيعية المنشأ Natural origin polymers نظراً لخصائصها الفريدة وهي بوليميرات متوفرة ومتجدّدة، تستخدم في التطبيقات الغذائية بشكل واسع لما تتميز به من ثبات، وأمان على الصحة، واحتوائها على عدد كبير من الزمر الفعّالة، ووفرتها في الطبيعة، بالإضافة إلى خواصها الفريدة مثل مجال واسع من الكتل المولية والتركيب الكيميائي المتنوع وقابليتها للتعديل الجزيئي (Huang *et al*., 2010).

تستخدم البوليميرات الطبيعية مثل البروتينات ومتعددات السكريات الأيونية، واللاأيونية خصوصاً الألجينات، الكايتوسان، الجيلاتين، الألبومين، البكتين، والنشاء في إيصال الغذاء والدواء، من خلال تشكيلها لمواد محبة للماء والتي تستطيع امتصاص حجم كبير من الماء من مصدر طبيعي أو صنعي (Huang *et al*., 2010).

ولقد ركزنا في بحثنا على متعدّدات السكريات بشكل كبير بسبب استخدامها الواسع في تطبيقات الكبسلة؛ والذي مردّه إلى الخصائص الفيزيائية المميزة، مثل الذوبانية، فهي ذات ثبات كبير، غير سامة، ومحبة للماء (Loquercio, 2014).

ومن بين أكثر المواد المستعملة في التغليف الدقيق للجراثيم هي:

2-6-5-1. الألجينات:

الجينات الصوديوم هي بوليمير طبيعي المنشأ يشكل هلاماً (جلاً) في شروط آمنة وسهلة، لذلك تُستخدم في كبسلة العديد من المواد مثل الخلايا، والأنزيمات، والدّسم، وتعتبر أهم نماذج أنظمة الكبسلة ذات المنشأ الهدروجلي، استعملت الألجينات لأول مرة في ميدان الكبسلة في السبعينات ومن ثم تم تطوير طرائق عديدة لإنتاج حبيبات الهدروجل من الألجينات وبأحجام وأشكال مختلفة. هذا وتشكل البوليميرات المكوّنة للجل والتي مصدرها طبيعي مجموعة مميزة من مجموعات مواد الكبسلة الحيوية بسبب قابليتها للتجدّد، والتفكك الحيوي وتوافقيتها الحيوية وعدم سميتها (Loquercio, 2014). ومن بين هذه المجموعة برزت الألجينات، ولفتت الانتباه إليها في الأدبيات، لأنها تشكل مواد هدروجل من خلال الجلتنة الأيونية ionotropic gelation مع أيونات ثنائية التكافؤ Ca^{+2} مثلا وباستخدام أدوات بسيطة (بيشر ومحقن طبي) (Loquercio, 2014).

وهذه المواد لها خاصيات فيزيائية مميزة (Leirvåg, 2017)

- ثباتها الحراري الكبير.
- تشكيل الجل بشكل سريع
- إمكانية التحكّم بخاصياتها المكيانيكية، وتحرّر المادة الفعالة.
- قابلة للتحلل الحيوي.

إن الألجينات من السكاكر المتعدّدة الأيونيّة وتوجد كمكوّن بنيوي في الطحالب الألجيا algae البحرية بنية اللون (Phasophyceae) وتشكل 40% من المحتوى الجاف له، وتنتج الألجينات التجارية من طحالب الألجيا البنية Laminaria hyperborea, Macrocystis pyrifera, Laminaria digitata, Ascophyllum nodosum فهي متوفرة في الطبيعة، كما في بعض جراثيم الأرض مثل *Azotobacter vinelandii* وأصناف متعدّدة من *Pseudomonas* تنتج مادة بوليميرية خارجة الخلية extracellular مشابهة للألجينات التي تنتجها الطحالب البنية (تلي، 2016) (Gudmund *et al.*, 2006).

2-5-6-1-1. بنية الجينات الصوديوم

إن الألجينات بوليمير خطي مشترك ثنائي مؤلف من B-D-mannuronic acid (M) و L- αguluronic acid المرتبطين بروابط غليكوزيدية 1,4. يمكن أن يوصف بأنه بوليمير قالبي block polymer يحوي وحدات كتل بوليميرية متشابهة من M و G ووحدات متناوبة منها (Leirvåg, 2017). تأخذ هذه الوحدات تماكبات مختلفة، لذا تحوي الألجينات الارتباطات الغليكوزيدية الأربعة: (Kashima and Imai, 2012) ثنائي استوائي (MM) – ثنائي محوري (GG) استوائي محوري (MG) – محوري استوائي (GM).

من مميزات مادة الألجينات هي سهولة تشكيل الهلام حول الخلايا الجرثومية، وسلامة وأمان استعمالها بشرياً من الإنسان وكما أنها رخيصة، ومتوافرة وسهلة التداول وتحتاج إلى حرارة فقط لإتمام أدائها، وتكون جاهزة للذوبان بسهولة مما يسبب بأطلاق الجراثيم بكامل فعاليتها في الأمعاء، ويمكن تدعيم الألجينات بماد بوليميرية أخرى لتقليل عيوب الألجينات وجعلها أكثر مقاومة للظروف الحمضية لتكوين نسيج ذو خواص أفضل وأكثر مقاومة ولا تعد من المواد المضادة للجراثيم (Rodrigues *et al.*, 2020).

2-5-6-2. الكايتوسان:

يُستخرج الكايتوسان تجارياً من عملية نزع الأسيتيل الجزئي للكيتين المستخرج من القشريات، وهو عديد سكاريد كيتوني يتكون من بقايا د-جلوكوزامين ون-أسيتيل-جلوكوزامين، مرتبطين بروابط بيتا-(1 → 4) (da Silva *et al.*, 2019) وقد حاز على تصنيف "آمن بشكل عام (GRAS) "من قِبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية(FDA)، وهو متوافق حيوياً (Qi *et al.*, 2020).

قد يُسبب استخدام الكايتوسان كمواد تغليف للجراثيم الحيوية عيوباً، إذ يمتلك هذا السكاريد المتعدد تأثيراً مثبطاً ضد الأحياء الدقيقة (Goy *et al.*, 2009)، بما في ذلك جراثيم حمض اللبن (Groboillot *et al.*, 1993)، مع ذلك، لم يُوضَّح تأثير هذه المادة على البروبيوتيك المُغلَّف بشكل كامل.

استُخدم الكايتوسان كمادة طلاء في حبيبات ألجينات تحتوي على *جراثيم Bifidobacterium longum* بتقنية التجلط الداخلي. حسّن طلاء الكيتوزان من بقاء *Bifidobacterium longum* المُغلّفة في سائل الجهاز الهضمي ودرجات الحرارة العالية (Ji *et al.*, 2019)، بالتوازي مع ذلك، حقق تغليف *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus casei* في ألجينات-كيتوزان بتقنية البثق كفاءة تغليف تزيد عن 76%، وحظيت كلتا الجراثيم بالحماية في ظروف محاكاة الجهاز الهضمي، ومع ذلك، قد تُظهر سلالات مُغلّفة مختلفة سلوكيات مختلفة (de Farias *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2011).

فضلاً عن العديد من مواد التي تستعمل في التغليف بنسبة قليلة أو استعمالها في تغليف مواد أخرى مثل صمغ الجيلان، صمغ الزانتان، كاراجينان، النشا، الجلاتين، بروتينات الحليب، كربوكسي متيل السيللوز والدكستران الحلقي والسيليلوز والخلات وبروتينات فول الصويا وغيرها من المواد (Tomasz *et al., 2014;* Ghorai *et al.*, 2014; Chen and Chen, 2007; Int 2, 2017; Gbassi and Vandamme, 2012; Heidebach *et al.*, 2009; Livney, 2010; Mitropoulou *et al.*, 2013; Ngov, 2017).

2-6-6. التقنيات المستعملة في تغليف المعززات الحيوية:

إن مبدأ تحضير الحبيبات هو الجلتنة الأيونية lonic gelation الذي يقوم على أساس قدرة المركبات متعدّدة الشحن الكهربائية (متعددة الوظائف الحرّة المشحونة) على الارتباط بشكل متصالب عند وجود أيون معاكس لها بالشحنة، حيث يتم في المرحلة الأولى تشكيل حلالة Sol للبوليمير، وإضافة المادة الفعالة له، ومن ثمّ تقسيمه إلى قطيرات عديدة بالوسيلة المناسبة (محقن ،إرذاذ، استحلاب...)، وفي المرحلة الثانية تتم مصالبة القطرات البوليميرية المشكلة بعامل مناسب (عطرة، 2020).

يستعمل العديد من التقنيات في تغليف المعززات الحيوية (Leong *et al.*, 2016) ومن بينها:

2-6-6-1. التجفيف بالرش Spray drying:

التجفيف من الطرائق الشائعة الاستعمال في التصنيع الغذائي لإنتاج مواد غذائية بصورة مجففة واستعملت أول مرة سنة 1930 لإنتاج مواد الذكية واستعملت فيما بعد في تجفيف الكثير من المواد الغذائية مثل الفيتامينات والمعادن وبعض الأحماض الدهنية، والتجفيف بالرش تقنية مستعملة على نطاق واسع في العديد من التطبيقات الصناعية مثل الحليب المجفف والعصائر والعقاقير وغيرها، وتتلخص الطريقة برش الخليط السائل عبر فتحات ضيقة أو قرص إلى غرفة مغلقة، وتبخر المذيب بعد ملامسته للهواء الحار أو غاز معين (Serna-Cock and Vallejo-Castillo, 2013).

واستعملت في نهاية القرن العشرين في التجفيف المعززات الحيوية، وأن عملية التجفيف تؤدي إلى خسائر بالأعداد الحية نتيجة استعمال درجات حرارة عالية أثناء عملية التجفيف، ومن أجل تقليل الخسارة بالأعداد الحية استعملت بعض المواد الحامية للجراثيم لاحتواء الصدمة الحرارية وتقليل درجة الحرارة النافذة المستعملة بالتجفيف على الجراثيم، وكذلك تهيئة المادة قبل التجفيف عن طريق تسخين الخليط قبل التجفيف (Vivek, 2013).

فالتجفيف بالرش هي تقنية من تقنيات التغليف الدقيق التي يتم استعمالها عند ذوبان عامل التغليف في العامل الأساس، وتشكيل مستحلب أو معلق والمذاب عادة ما يكون غروياً مائياً مثل الجيلاتين، الصمغ النباتي، النشا المحور، ديكسترين أو غيرها من المواد لذلك يتم تجفيف المحلول للحصول على مادة مجففة، مما يوفر حاجزاً ضد الأوكسجين والعوامل التي يراد عدم التعرض لها أو تقليل تأثيرها (Chávarri *et al*., 2012).

بعض النقاط الواجب اتخاذها عند اجراء التجفيف بالرش (Liliana and Vladimir, 2013).

1- أن يكون انسياب الهواء المتدفق مساوياً لانسياب التيار المضاد.

2- أن تكون الأعداد الجرثومية عالية وملائمة مع المادة المغلفة

3- أن تتصف المادة المغلفة بكونها ذات لزوجة منخفضة لسهولة الانسياب وذات ثباتية عالية وتكون فقيرة الطعم والنكهة.

4- يجب أن تكون درجة الحرارة المستعملة في التجفيف منخفضة قدر الإمكان، حيث تنخفض الأعداد الحية للجراثيم انخفاضاً خطياً مع درجة حرارة الهواء النافذة، ويجب أن تكون درجة حرارة التجفيف لا تزيد عن 170 م.

5- وقت التجفيف: كلما قل وقت التجفيف زادت عيوشية الخلايا الحية.

6- الخزن: لتحقيق أفضل الظروف المثالية للخزن تستعمل درجة حرارة 4 م وتكون نسبة الرطوبة 0.25%.

2-6-6-2. التجفيد Lyophilization

ويسمى أيضا عملية التجفيف بالتجميد وهي أفضل الطرق لتجفيف المواد الغذائية، والتجفيد عملية تجفيف المواد التي تتم عن طريق تجميد المادة المراد تجفيفها ثم تليها مرحلة تقليل الضغط المحيط بالمادة المراد تجفيفها والسماح للماء الموجود بالمادة التحول من الحالة الصلبة إلى الحالة الغازية مباشرة دون المرور بالحالة السائلة (التسامي) (Semyonov *et al*., 2011). وتستعمل عملية التجفيد في تغليف المعززات الحيوية عن طريق تجفيد المعززات الحيوية جنباً إلى جنب مع المواد المغلفة بعد مزجهما بدرجة حرارة ما بين (-20 إلى -30)م، ثم تتبعها عملية تفريغ الهواء تحت ضغط مخلخل 0.05-0.1 ملي بار لسحب الماء المتسامي لتنخفض درجة حرارة التجفيد ما بين (-40 إلى -50) م. وفي هذه العملية يتم تجنب عمليات أكسدة مواد التغليف التي تسبب أضراراً للخلايا من أجل تحسين ثبات ونشاط المعززات الحيوية المغلفة بالتجفيد، وكذلك زيادة استقرار الخلايا أثناء مدة التخزين، وتكون عملية التجفيد ذات تكلفة عالية حيث تصل تكلفتها إلى 4-7 أضعاف من تكلفة عملية التجفيف الاعتيادية (Liliana and Vladimir, 2013).

إن عملية التجميد تسبب أضراراً في الأغشية الخلوية للمعززات الحيوية بسبب تكوّن البولورات الثلجية التي تسبب أضراراً للجدار الخلوي فضلاً عن الأضرار الناتجة عن الأزموزية العالية بسبب زيادة تركيز المواد الذائبة، وتؤدي عملية التجفيد إلى مسخ بعض الجزيئات الخلوية الصغيرة فضلاً عن الأضرار الناتجة للجدار الخلوي للخلايا، لذلك تضاف بعض المواد الحامية مثل سكر اللاكتوز وتريهالوز وسوربتول وغليسيرول وبروتينات الحليب لحماية المعززات الحيوية من تأثير خفض درجات الحرارة وتكون البلورات الثلجية أثناء عملية التجميد وضمان سلامة الجدار الخلوي للخلايا كذلك للحفاظ على عيوشية وأستقرار الخلايا أثناء الخزن (Semyonov *et al*., 2011; De Angelis and Gobbetti, 2004).

أشار Zuidam and Nedovic (2010) إلى أن استعمال عملية التغليف الدقيق بتقنية التجفيد أعطت كبسولات ذات ثباتية عالية عند استعمال درجة حرارة منخفضة بواسطة النيتروجين السائل وضغط مخلخل.

2-6-6-3. تقنية البثق Extrusion

وهي أقدم وأكثر التقنيات المستعملة في التغليف الدقيق وإنتاج الأغلفة ذات صفة هلامية من المواد الغروية المائية (Rodrigues *et al*., 2017) مثل (الجينات وكاراجينات والبكتين)، وتتلخص العملية بتحضير محلول التغليف وإضافة الخلايا الجرثومية، وتشكيل الخليط المناسب، ثم بثق الخلية بمحلول التصلب المتكون من كلوريد الكالسيوم أو كلوريد البوتاسيوم (de Araújo Etchepare *et al*., 2016; Liliana and Vladimir, 2013).

والتفسير الكيميائي لتشكيل الهلام هو ارتباط الجذور الكاربوكسيلية المتعدده الحرة للألجينات مع كلوريد الكالسيوم وبالتالي إنتاج شبكة هلامية يمكنها إطالة عمر الخلايا المغلفة أثناء التخزين وفي بيئات معدية ومعوية محاكاة (Rodrigues *et al*., 2020).

يعتمد حجم وشكل الأغلفة التي تكونت على قطر فوهة آلة البثق، كذلك المسافة بين هذه الفوهة ومحلول لتصلب. وهذه الطريقة بسيطة وفعالة؛ لأنها لا تتطلب أجهزة ومعدات معقدة (Vivek, 2013). وفي هذه التقنية لا تستعمل المذيبات الضارة، ويمكن القيام بالعملية تحت أي ظروف. لكن العيب الرئيس لهذه الطريقة هو عدم القدرة على إنتاج أغلفة على النطاق التجاري بسبب بطء تشكيل الأغلفة، ولكن هناك محاولات حثيثة لاستعمال أجهزة تسرع من تشكيل الأغلفة بتقنية البثق (Liliana and Vladimir, 2013). وأشار Chávarri وآخرون (2012) إلى أن التطور الكنولوجي بمرور الزمن أدى إلى تطوير تقنية البثق في إنتاج الحبيبات بكميات كبيرة وبالحجم المطلوب خلال مدة زمنية قليلة اعتماداً على تقنيات عديدة تعمل على قذف مواد التغليف بشكل قطرات من خلال فتحات صغيرة جداً، وبسرعة عالية إلى محلول تصلب الأغلفة مثل تقنية القطع النفاث، وتقنية القطع بالاهتزاز، وتقنية القدرة الألكتروساتيكية، وتقنية التدفق المحوري للسائل والفوهات المغمورة وتقنية الجاذبية.

أشار Mortazavian وآخرون (2007) إلى أن معظم أقطار حبيبات المعززات الحيوية المتكونة بطريقة البثق يعتمد على قطر فوهة المحقنة المستعملة في عملية تقطير محلول التغليف إلى محلول التصلب، أيضا يؤدي نوع وتركيز الألجينات ولزوجة المحلول تؤدي دوراً مهماً في حجم الحبيبات الناتجة حيث كلما قل تركيز الجينات الصوديوم كلما صغر قطر الحبيبات المتكونة.

2-6-6-4. تقنية الاستحلاب:

الاستحلاب هو تشتيت سائلين غير قابلين للامتزاج بوجود مركبات مثبتة أو مستحلبة مثل ماء وزيت، مثلاً عندما يكون الماء هو الطور المستمر، والزيت هو الطور الثابت فيسمى مستحلب زيت في ماء، وعندما يكون الزيت هو الطور المستمر والماء هو الطور الثابت فيسمى المستحلب ماء في زيت، والاستحلاب المزدوج مثل ماء في زيت في ماء أيضا (Chávarri *et al*., 2012).

تعد هذه التقنية تحويراً لتقنية البثق إذ يتم فيها استحلاب المادة التي يراد تغليفها المحلول مائي في محلول زيتي كاره للماء ثم يتم تشتيتها في الوسط لتصبح على شكل حبيبات صغيرة، ثم يضاف إلى هذا المستحلب (ماء في زيت) محلول مائي يحتوي على مواد مثبتة (كلوريد الكالسيوم أو البوتاسيوم) مع التحريك بصورة سريعة، ثم يتم جمع الحبيبات المتكونة في المحلول المائي عن طرق الترشيح أو الطرد المركزي. وأن قدرة تحمل الطور الكاره للماء (الزيت) محدودة نتيجة الاختلاف بالثباتية والانتشار في المحلول المائي الحاوي على المادة المثبتة، وأن التطبيقات الأساسية لهذه التقنية في إنتاج المواد الصيدلانية (Chávarri *et al*., 2012).

تكون مادة الألجينات هي المادة المفضلة من قبل الباحثين، وكذلك يفضل استعمال زيت نباتي صالح للاستهلاك البشري مثل زيت الزيتون أو زيت زهرة الشمس الذي يمثل الطور الكاره للماء، الأغلفة المتكونة بتقنية الاستحلاب أصغر من حجم الحبيبات المتكونة بتقنية البثق، وتعد تقنية سهلة الاستعمال ويمكن تطويرها للإنتاج على المستوى الصناعي (Nag, 2011).

فضلاً عن الكثير من تقنيات التغليف الدقيق التي يتم استعمالها، ولكن على مستوى محدود بسبب بعض المشاكل التي تسببها للمعززات الحيوية أثناء التغليف الدقيق منها تقنية التبلور وتقنية التقوصر وتقنية التجلتن باستعمال الأنزيمات وتقنية التجفيف بالرش البارد وغيرها من التقنيات (Nag, 2011; Vivek *et al*., 2023).

وفيما يلي تم إجمال أهم تقنيات التغليف والجراثيم التي تم تغليفها بحسب كل مرجع (جدول رقم 2).

الجدول رقم (2): بعض التقنيات الرئيسية المستخدمة لتغليف المعززات الحيوية

تقنية	الأحياء الدقيقة المغلفة	مرجع
Extrusion البثق	*Lactobacillus casei 01* *Lactobacillus casei BGP93*	Rodrigues *et al.* (2017)
	Lactobacillus acidophilus La3	Silva *et al.* (2018a)
	Lactococcus lactis spp. cremoris	Ramos *et al.* (2018)
	Lactobacillus acidophilus KBL409	Lee *et al.*, (2019)
	Lactobacillus casei ATCC 393	Dimitrellou *et al.* (2019)
	Lactobacillus rhamnosus GG	Hugues-Ayala *et al.*, (2020)
	Faecalibacterium prausnitzii	Raise *et al.* (2020)
Emulsion الاستحلاب	*Akkermansia muciniphila*	van der Ark *et al.* (2017)
	Lactobacillus rhamnosus GG	Singh *et al.*, (2018)
	Saccharomyces boulardii *Enterococcus faecium*	Qi *et al.*, (2019)
	Lactobacillus paracasei spp. paracasei	Shafizadeh *et al.*, (2020)
	Lactobacillus acidophilus LA-5	Raddatz *et al.* (2020)
	Lactobacillus acidophilus PTCC 1643	Dehkordi *et al.* (2020)
Spray drying التجفيف بالرش	*Lactobacillus rhamnosus GG*	Guerin *et al.* (2017)
	Lactobacillus plantarum ATCC 8014 *Bifidobacterium infantis ATCC 15679*	Bustamante *et al.* (2017)
	Lactobacillus acidophilus NCDC 016	Arepally and Goswami (2019)
	Lactobacillus plantarum NCIM 2083	Yoha *et al.*, (2020)
	Kluyveromyces marxianus VM004	Vanden Braber *et al.* (2020)
	Lactobacillus fermentum K73	Aragón-Rojas *et al.* (2020)
Spray chilling التبريد بالرش	*Bifidobacterium animalis spp. lactis BI-01* *Lactobacillus acidophilus LAC-04*	de Lara Pedroso *et al.* (2012)
	Lactobacillus acidophilus LAC-04	Okuro *et al.*, (2013)
	Lactobacillus acidophilus *Bifidobacterium animalis spp. lactis*	Bampi et al. (2016)
	Saccharomyces boulardii *Lactobacillus acidophilus LA-5* *Bifidobacterium bifidum BB-12*	Arslan-Tontul and Erbas (2017)
	Lactobacillus acidophilus La3 *Bifidobacterium animalis spp. lactis BLC1*	Silva *et al.* (2018b)
	Saccharomyces boulardii *Lactobacillus acidophilus LA-5* *Bifidobacterium bifidum BB-12*	Arslan-Tontul *et al.* (2019)

الفصل الثالث

المواد و الطرائق

MATERIAL & METHODS

مواد وطرائق البحث

3-1. مكان وزمان إجراء الدراسة

أجريت هذه الدراسة في مخبر الأحياء الدقيقة ومخبر الكيمياء الحديثة في كلية الطب البيطري – جامعة حماة، في الفترة الواقعة ما بين 1 / 1 / 2025 إلى 15 / 3 / 2026.

3-2. المواد المستخدمة:

3-2-1. العينات:

تم جمع 50 عينة من محتويات أمعاء دجاج لحم بعمر 42، وذلك بعد سلخ الجلد ثم تعقيم منطقة عضلات البطن في اسفل الصدر قبل الشق الجراحي بواسطة مقص معقم بعدها تم استخراج الأمعاء الدقيقة لفتحها بواسطة مقص معقم آخر ثم تم أخذ العينات بواسطة ماسحة قطنية معقمة ووضعت العينات في حاويات بلاستكية معقمة حاوية على وسط مرق MRS، ثم وضعت في حافظة عازلة للحرارة ومحتوية على قطع من الثلج ونقلت إلى المختبر.

3-2-2. الأوساط المزرعية :

استخدمت الأوساط المزرعية التالية والمبينة في الجدول رقم (3).

الجدول رقم (3): الأوساط المزرعية والمواد المستخدمة في الاختبارات

ت	اسم الوسط او المادة	الاستخدام	الشركة المصنعة
.1	وسط MRS الصلب MRS Agar	عزل وتعداد جراثيم *Lactobacillus*	HiMedia (India)
.2	وسط MRS السائل MRS Broth	تنشيط جراثيم *Lactobacillus*	HiMedia (India)
.3	آغار الماكونكي MacConkey agar	الكشف عن جراثيم الكوليفورم	HiMedia (India)
.4	وسط الحليب الفرز Skim milk	تنمية *Lactobacillus*	Regilait (Franc)
.5	وسط تخمر السكريات Sugar fermentation Medium	الكشف عن قابلية الجراثيم على تخمر السكريات	حضر مختبريا
.6	وسط s. s agar	لتنمية جراثيم السلمونيلة	حضر مختبريا
.7	الوسط المغذي الصلب Nutrient agar	لتنمية الجراثيم *Lactobacillus*	HiMedia (India)
.8	وسط بيرد باركر	لتنمية جراثيم المكورات العنقودية الذهبية	HiMedia (India)
.9	ماء البيتون	لاكثار الجراثيم وغسل المعززات المغلفة	HiMedia (India)

حضرت الأوساط المزرعية المجهزة في جدول (3) حسب توصيات الشركات المنتجة، ثم عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1,5 بار ولمدة 15 دقيقة وبردت وحفظت في الثلاجة إلى حين الاستعمال.

استعمل وسط الحليب الفرز المجفف بعد استحلابه بنسبة 10 % الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل (Robinson *et al.*, 2002)، واستعمل في محلول التغليف بالطبقة الاولى وفي تنشيط الجراثيم طيلة مدة الدراسة بعد توزيعه في أنابيب زجاجية، ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط، 1,5 بار ولمدة 5 دقائق (Prasad *et al.*, 2015)

3-2-3. الصبغات The stains

استخدمت صبغة غرام Gram stain التفريقية لدراسة الخواص الشكلية والتلوينية للجراثيم.

3-2-4. الكواشف The Reagents

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من الكواشف وهي مبينة في الجدول رقم (4).

الجدول رقم(4): الكواشف الكيميائية المستخدمة في الاختبارات

ت	الكاشف	الاستخدام
1.	احمر المثيل Methyl red	**الكشف عن قدرة الجراثيم على تخمر الغلوكوز وانتاج الاحماض العضوية**
2.	كاشف فوكس بروسكاور Voges-proskauer (ألفا نفتول وهيدروكسيد البوتاسيوم)	**الكشف عن قدرة الجراثيم على تكوين Diacetyl carbinol**
3.	كوفاك Kovac's	**الكشف عن قدرة الجراثيم على إطلاق غاز الاندول**
4.	الأوكسيداز Oxidase	**الكشف عن انتاج انزيم سايتوكروم الاوكسيداز من قبل الجراثيم**
5.	الكاتالاز Catalase	**الكشف عن انتاج انزيم الكاتالاز من قبل الجراثيم**
6.	اليوريا Urea	**الكشف عن انتاج انزيم اليوريز من قبل الجراثيم**
7.	اندريد Andrade´s indicator	**للكشف عن تخمر السكاكر**

5-2-3. المحاليل The solutions

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من المحاليل وهي مبينة في الجدول رقم (5).

الجدول رقم(5): المحاليل المستخدمة في الاختبارات

ت	المحلول	الشركة المصنعة	
	ألجينات الصوديوم Sodium alginate	SIGMA Alderch	– الولايات المتحدة الأمريكية
	ستريت ثلاثي صوديوم $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$	BDH	– انكلترا
	حمض الخليك الثلجي CH_3COOH 95%	Scharlau	– المانيا
	حمض الستريك $C_6H_8O_7, H_2O$	BDH	– انكلترا
	حمض الهيدروكلوريك HCl	Merck	– ألمانيا
	حليب فرز Skim milk	Regilait	– فرنسا
	فوسفات الصوديوم الحمضية $NaH_2PO_4. H_2O$	BDH	– انكلترا
	فوسفات الصوديوم القاعدية Na_2HPO_4	BDH	– انكلترا
	كايتوسان Chitosan	SIGMA Alderch	– الولايات المتحدة الأمريكية
	كلوريد الصوديوم NaCl	SIGMA Alderch	– الولايات المتحدة الأمريكية
	كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$	N R	– الصين
	هيدروكسيد الصوديوم NaOH	Merck	– ألمانيا

6-2-3. المضادات الحيوية المستخدمة في اختبارات الحساسية الدوائية

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من المضادات الحيوية وهي مبينة في الجدول رقم (6).

الجدول رقم(6): أقراص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية ورمزها

المضاد الحيوي	التركيز (ميكروغرام/القرص)	اختصار
أموكسيسلين	30 ميكروغرام	AMC
سلفاتريموثبريم	25 ميكروغرام	SXT
سبيرامايسين	30 ميكروغرام	SP
كولستين	30 ميكروغرام	C
دوكسي سايكلين	30 ميكروغرام	DXT
إريثرومايسين	15 ميكروغرام	E
تتراسكلين	30 ميكروغرام	TE
سيفالكسين	30 ميكروغرام	CL
فوسفومايسين	200 ميكروغرام	FOS
سيبروفلوكساسين	30 ميكروغرام	CIP

3-2-7. المواد الكيميائية Chemical materials

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من المواد الكيميائية وهي مبينة في الجدول رقم (7).

الجدول رقم (7): المواد الكيميائية المستخدمة في الاختبارات

ت	المادة		الشركة المصنعة
.1	لاكتوز	lactose	**England (BDH)**
.2	سكروز	Sucrose	**England (BDH)**
.3	آرابينوز	Arabinose	**England (BDH)**
.4	مالتوز	Maltose	**England (BDH)**
.5	اسكولين	Esculine	**England (BDH)**
.6	زايلوز	Xylose	**Fluka**
.7	غلكوز	Glugose	**England (BDH)**
.8	مانوز	Mannose	**England (BDH)**
.9	مانيتول	Mannitol	**Fluka**
.10	مليبايوز	Melibiose	**England (BDH)**
.11	سالسين	Salicine	**Maknur**
.12	سوربتول	Sorbtol	**Difco**
.13	سيليبايوز	Cellobiose	**England (BDH)**
.14	رافينوز	Raffinose	**England (BDH)**
.15	رايبوز	Ribose	**England (BDH)**
.16	تريهالوز	Trehalose	**England (BDH)**
.17	غليسيرول	Glycerol	**England (BDH)**
.18	غلوكونيت	Gluconate	**England (BDH)**
.19	غلاكتوز	Galactose	**England (BDH)**
.20	ثيو سلفات الصوديوم	Sodium Thiosulphate	
.21	أملاح الصفراء		

3-2-8. الأجهزة المستخدمة

استخدمت في هذه الدراسة الأجهزة المبينة في الجدول رقم (8).

الجدول رقم (8): الأجهزة المستخدمة

ت	الجهاز	الشركة المصنعة
1	حاضنةُ	Yamato (Japan)
2	جهاز تقطير الماء	Exelo (England)
3	محراك مغناطيسي	Labinco
5	فرن كهربائي	Memmert (Germany)
6	ميزان حساس	Sartorius
7	غرفة زرع جرثومي	Sanyo
8	مؤصدة	Yamato (Japan)
9	مجهر	Yamato (Japan)
10	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني PH	
11	ثلاجة	
12	جهاز الطرد المركزي	
13	جرة ماكنتوش	
14	حمام مائي	Memmert (Germany)
15	ماصة دقيقة	Benchmate
16	المدور الحراري	Techne
17	جهاز الرحلان	
18	جهاز إظهار أشعة فوق بنفسجية	

3-3. طرائق البحث:

3-3-1. خطة البحث

3-3-1-1. تحضير الأوساط المزرعية التركيبية

3-3-1-1-1. وسط آغار اليوريا Urea agar

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإضافة 5 مل من محلول اليوريا المحضر بتركيز 40% بعد تعقيمه بالترشيح باستخدام مرشحة غشائية دقيقة 0.22 ميكرون إلى 95 مل من آغار اليوريا الأساس Urea agar base المعقم بالموصدة والمبرد إلى الدرجة 50 مْ. وبعد مجانسة الوسط تم صبّه في أنابيب اختبار معقمة وتركه ليتصلب بشكل مائل .

استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية الجراثيم على انتاج انزيم اليورياز Urease.

3-3-1-1-2. وسط تخمر السكريات Sugars fermentation

حضرت بإضافة السكر المختبر المعقم بالترشيح إلى الوسط بنسبة 1% بنسبة 1%إلى وسط ماء الببتون وعقم بالموصدة بدرجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة وبعد التبريد أضيف كاشف (Andrade´s indicator) ووزع المحلول على انابيب بواقع 5 مل (الويناوي وزوين، 2020). واستخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة الجراثيم للتخمير السكاكر.

3-3-1-1-3. وسط بيرد باركر Baird-Parker Medium

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة، وتمت إضافة 50 مل من مستحلب صفار البيض إلى 950 مل من وسط بيرد باركر الأساس المعقم بالموصدة والمبرد إلى 50 مْ و3 مل من محلول تيلوريت البوتاسيوم 3.5% المعقم وتمزج جيداً ثم تصب في أطباق بيتري. واستخدم هذا الوسط لتنمية جراثيم *Staph.aureus*.

كما حضرت باقي الأوساط المستخدمة حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك بوزن الكمية المطلوبة وحلها بالماء المقطر، ثم التسخين حتى الذوبان وعقمت بالموصدة على درجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة وعلى ضغط 1.5 بار.

3-3-2. تحضير الكواشف والمحاليل Solutions and reagents

3-3-2-1. محلول حمض الخليك الثلجي 1 %حجم/حجم:

حضر محلول حمض الخليك بتركيز 1 % بإضافة 1 مل من حمض الخليك المركز إلى ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل من الماء المقطر واستعمل المحلول في إذابة الكايتوسان (stoica *et al*., 2010).

3-3-2-2. محلول كلوريد الكالسيوم 0.1 مولاري:

أذيب 11.1 غ من كلوريد الكالسيوم في الماء المقطر ثم أكمل إلى حجم 1000 مل من الماء المقطر واستعمل كمحلول التصلب غلاف الطبقة الثانية(AOAC, 2016) .

3-3-2-3. محلول فوسفات الصوديوم القاعدي 0.2 مولاري:

أذيب 28.4 غ من فوسفات الصوديوم القاعدية في الماء المقطر، ثم أكمل الحجم إلى 1000 مل من الماء المقطر واستعمل في تحضير محلول إزالة الطبقة الأولى(AOAC, 2016) .

3-3-2-4. محلول فوسفات الصوديوم الحمضي 0.2 مولاري:

أذيب 27.6 غ من فوسفات الصوديوم الحمضية في الماء المقطر، ثم أكمل الحجم إلى 1000 مل من الماء المقطر واستعمل في تحضير محلول إزالة الطبقة الأولى(AOAC, 2016) .

3-3-2-5. محلول ستريت ثلاثي صوديوم 0.1 مولاري:

أذيب 29.41 غ من ثلاثي صوديوم ستريت في الماء المقطر، ثم أكمل الحجم إلى 1000 مل من الماء المقطر واستعمل في تحضير محلول إزالة الطبقة الثانية(AOAC, 2016).

3-3-2-6. محلول حمض الستريك 0.1 مولاري:

أذيب 21.01 غ من بلورات حمض الستريك في الماء المقطر، ثم أكمل الحجم إلى 1000 مل من الماء المقطر واستعمل في تعديل درجة الحموضة لمحلول ستريت ثلاثي الصوديوم (AOAC, 2016)

3-3-2-7. محلول هيدروكسيد الصوديوم 1 مولاري:

أذيب 40 غ من NaOH في الماء المقطر، ثم نقل إلى دورق حجمي، ثم أكمل الحجم الى 1000 مل باستعمال ماء مقطر واستعمل في تعديل درجة الحموضة لمحلول الكايتوسان (AOAC, 2016)

3-3-2-8. محلول ماء الببتون 0.1%:

أذيب 1 غ من الببتون في 1 لتر من الماء المقطر ووزع في أنابيب التخافيف العشرية بواقع 9 مل في كل أنبوبة وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ ولمدة 15 دقيقة (Abubakr and Al-Adiwish, 2017)

3-3-2-9. محلول أملاح الصفراء 2 و 4 و 6% :

حضرت محاليل أملاح الصفراء بإذابة 2 و 4 و 6 غ في ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل باستعمال ماء مقطر وتم اضافتها بنسبة 1:1 للحصول على تراكيز 1 و 2 و 3 % من أملاح صفراء لتقدير عيوشية المعززات الحيوية تجاه أملاح الصفراء وتم تعقيمها بدرجة حرارة 121 مْ.

3-3-2-10. محاليل التغليف بالطبقة الاولى:

3-3-2-10-1. محلول ألجينات الصوديوم 3 % وزن/حجم:

أذيب 3 غ من الجينات الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر، ثم سخن المزيج حتى الغليان لمدة دقيقة واحدة ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1,5 بار ولمدة 15 دقيقة واستعمل في تغليف المعززات الحيوية طبقة أولى (Talebzadeh *et al.*, 2014)

3-3-2-10-2. محلول كلوريد الكالسيوم وكلوريد الصوديوم:

حضر حسب الطريقة التي ذكرها El-Shafei وآخرون (2015) لتصلب غلاف الطبقة الأولى والمكون من كلوريد الكالسيوم 0.2 عياري وكلوريد الصوديوم عياري 0.05 بإذابة 22.2 غ من كلوريد الكالسيوم و2.925 غ من كلوريد الصوديوم في الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 1000 مل من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1,5 بار ولمدة 15 دقيقة.

3-3-2-11. محلول إزالة غلاف الطبقة الأولى:

حضر المحلول حسب طريقة Teoh وآخرون (2011) وذلك بمزج 45 مل من محلول فوسفات الصوديوم القاعدي المعد في الفقرة (3-3-2-3) مع 35 مل محلول فوسفات الصوديوم الحمضي المعد في الفقرة (3-3-2-4) وأن تكون درجة الحموضة متعادلة PH=7 بعدها اكمل حجم المحلول إلى 160 مل بالماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1,5 بار ولمدة 15 دقيقة. واستعمل في حل الغلاف الأول للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة.

3-3-2-12. محاليل التغليف بالطبقة الثانية:

3-3-2-12-1. محلول كايتوسان:

حضر محلول الكايتوسان بتركيز 1% حسب الطريقة التي أوردها stoica وآخرون (2010) وذلك بإذابة الكايتوسان في محلول حمض الخليك الثلجي بتركيز 1 % والمحضر كما في الفقرة (3-3-2-1) مع التحريك المستمر بدرجة حرارة 37 م لحين الذوبان وعّدلت درجة الحموضة للمحلول إلى pH=6 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم 1 عياري المعد في الفقرة (3-3-2-7)، ورشح المحلول الناتج من خلال قطعة قماش معقمة للتخلص من الأجزاء غير الذائبة، ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 1,5 بار ولمدة 15 دقيقة واستعمل في تغليف المعززات الحيوية طبقة ثانية.

3-3-2-12-2. محلول التصلب لغلاف الطبقة الثانية:

استعمل محلول كلوريد الكالسيوم المحضر كما في الفقرة (3-3-2-2) ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 1,5 بار ولمدة 15 دقيقة (Talebzadeh *et al.*, 2014)

3-3-2-13. محلول إزالة غلاف الطبقة الثانية:

حضر المحلول بمزج 100 مل من محلول سترات ثلاثي الصوديوم بعيارية 0.1 المعد كما في الفقرة (3-3-2-5) مع 15 مل من حمض الستريك بعيارية 0.1 المعد كما في الفقرة (3-3-2-6) وأن تكون درجة الحموضة لمحلول إزالة غلاف الطبقة الثانية pH= 6.3 ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1,5 بار ولمدة 15 دقيقة (Talebzadeh *et al.*, 2014).

3-3-2-14. كاشف أحمر المثيل Methyl red reagent

حضر الكاشف بإذابة 0.1 غ من أحمر المثيل في 300 مل من الكحول الاثيلي 95% ويكمل الحجم إلى 500 مل بالماء المقطر. استعمل هذا الكاشف للكشف عن قدرة الجراثيم على انتاج حمض كناتج نهائي للتحلل الكامل للسكريات (Benson, 2002).

3-3-2-15. محلول اليوريا Urea Solution

حضر بإذابة 40 غ من مسحوق اليوريا في 100 مل ماء مقطر معقم، عقم المحلول بالترشيح (Atlas, 2010)

3-3-2-16. محلول تيللوريت البوتاسيوم Potassium Tellurite Solution

تم إذابة 3.5 غ من مادة تيللوريت البوتاسيوم في 100 مل ماء مقطر وعقمت بالترشيح.

3-3-2-17. مستحلب صفار البيض:

تم تحضير مستحلب صفار البيض وذلك بتعقيم البيض بوضعه في الكحول الإيتيلي لمدة ساعتين ثم يفصل صفار البيض ويمزج بإضافة 3 أضعاف حجمه من الماء الفيزيولوجي المعقم (ISO, 1999).

3-3-3. تحضير العينات:

3-3-3-1 عزل جراثيم *Lactobacillus* :

1 مل من العينة من وسط ووضعت في أنبوب اختبار حاوي على 9 مل من وسط De Man Rogosa and Sharpe broth MRS وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مئوية وتحت ظروف لا هوائية، وبعدها نقل 1 مل وأضيف لها 9 مل من وسط MRS broth وتحضن لمدة 24 ساعة وبدجة حرارة 37 مئوية وبظروف لا هوائية وتم تكرار العملية ثلاث مرات، والهدف من تكرار العملية ثلاث مرات هو إنتاج مجموعة جراثيم شابة، نشطة للغاية، متجانسة، وكثيفة

وبعدها تم عمل تخافيف بماء البيتون وسحب 1 مل من التخفيف الأول، وتم زرعه على وسط MRS agar بطريقة صب الأطباق، وتم تحضينها تحت ظروف لا هوائية وبدرجة حرارة 37 مئوية ولمدة 48 ساعة، وبعدها اختيرت المستعمرات المحدبة والملساء ذات اللون الكريمي، عصوية إلى مغزلية الشكل إيجابية لصبغة غرام، بعدها تم زراعة المستعمرات التي تمتلك الصفات أعلاه وزراعتها على،MRS agar بطريقة التخطيط باستعمال اللاقحة الجرثومية، وتم الحضن بدرجة حرارة 37 مئوية ولمدة 48 ساعة وبظروف لا هوائية.

المستعمرات التي نمت على الوسط MRS agar والتي تتصف بكونها ذات سلاسل قصيرة ومتغايرة الشكل، عصياتها منحنية وتكون طويلة وضعيفة وموجبة غرام وغير متحركة فسوف تم تنميتها MRS لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مئوية لغرض إكمال الفحوصات التشخيصية (Buck and Gilliland, 1995; Int. Dairy Fed, 1997).

3-3-3-1-1. الفحوصات التشخيصية (تم الاعتماد على دليل بيرجي للتصنيف الجرثومي).

3-3-3-1-1-1. دراسة الخواص المزرعية والشكلية والتلوينية:

تم ملاحظة أشكال المستعمرات ولزوجتها وألوانها وحافاتها، وبعدها صبغت بصبغة غرام للتعرف على شكلها ونوع اصطباغها (Singleton, 1997; Macfaddin, 2000).

3-3-3-1-1-2-2. الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests:

3-3-3-1-1-2-1-1. اختبار الاندول Indol test

زرع على وسط ماء البيتون المستعمرات الجرثومية وحضنت على درجة حرارة 37 م لمدة 24–48 ساعة بعدها اضيف لكل انبوبة 5 قطرات من كاشف كوفاكس ورجت الانبوبة بهدوء. حيث إن النتيجة الموجبة لهذا الاختبار هي ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط اذ تدل على انفصال جذر الاندول من البيتون (الوناوي وزوين، 2020).

3-3-3-1-1-2-2-1. اختبار الأحمر المثيل Methyl red test

تم زرع المستعمرات الجرثومية على مرق مثيل الأحمر ثم حضنت بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة بعد ذلك تم اضافة بعض القطرات من كاشف أحمر مثيل ويستدل على النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط إلى اللون الأحمر بسبب انخفاض الرقم الهيدروجيني pH (الوناوي وزوين، 2020).

3-3-3-1-1-2-3-1. اختبار فوكس بروسكاور voges proskaur test

تم تلقيح مرق فوكس – بروسكاور ببعض المستعمرات الجرثومية ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة ثم اضيف اليه كاشف فوكس– بروسكاور حيث تكون النتيجة موجبة بتغير لون الوسط إلى اللون احمر– قرمزي وذلك بسبب تكون مركبات Acetyl – methyl carbinol (الوناوي وزوين،2020).

3-3-3-1-1-2-4-1. اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

تم تلقيح وسط السترات ببعض الجراثيم المعزولة ثم تحضن بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة ثم تم قراءة النتيجة حيث يستدل على النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق وذلك باستخدام السترات مصدراً للكربون وأملاح الأمونيوم مصدراً للنتروجين، فنتيجة لتحلل أملاح الأمونيوم يتكون غاز الامونيا NH_3 وهو قاعدي يحول الوسط المغذي من المتعادل إلى القاعدي بتغير لون الكاشف Bromothymol blue إلى اللون الأزرق (الوناوي وزوين، 2020).

3-3-3-1-1-2-5-1. اختبار تخمر السكريات وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H2S production and sugers fermentation test

زرعت موائل آغار كليجلر والحديد بالنمو الجرثومي بتقنية الطعن والتخطيط باستعمال ابرة ناقلة معقمة وحضنت عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة وبعدها تم قراءة التغيرات الحاصلة في القعر والسطح المائل ويلاحظ في الحالات الإيجابية التخمر بتغير لون كاشف أحمر الفينول من الأحمر إلى الأصفر وأن غالبا ما يلاحظ الغاز على شكل فقاعات أسفل الوسط، أما الجراثيم المنتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين يلاحظ تكوينها راسب أسود في قعر الانبوبة (Macfaddin, 2000).

3-3-3-1-1-2-6. اختبار انزيم اليورياز Urease test

زرعت موائل آغار اليوريا بمستعمرة من الجراثيم المعزولة ويحضن بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة. حيث أن النتيجة الموجبة هي تغير لون الوسط نتيجة افراز انزيم اليورياز من اللون الأصفر إلى اللون الوردي (الونداوي وزوين، 2020).

3-3-3-1-1-2-7. اختبار الكاتالاز Catalase test

تم نقل مستعمرة بواسطة لوب معقم إلى شريحة زجاجية نظيفة وجافة ووضع فوقها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3%. إن تكوّن فقاعات هوائية نتيجة تحرر غاز الأوكسجين من على النمو الجرثومي المختبر دليل على إيجابية الاختبار (Talaro and Chess, 2018).

3-3-3-1-1-2-8. اختبار الأنزيم المؤكسد Oxidase test

تم نقل مستعمرة من النمو الجرثومي الحديث إلى الأقراص المحملة بالكاشف. إن ظهور اللون البنفسجي الغامق في خلال 10 ثوان يدل على نتيجة موجبة للاختبار (Procop *et al*., 2020).

3-3-3-1-1-2-8. اختبار الجيلاتين Gelatinase

حضر بإضافة 12 غم من مادة الجيلاتين إلى 100 مل وسط المرق المغذي، وزرع الوسط في أنابيب اختبار بمعدل 5 مل لكل انبوبة، عقمت الأنابيب بالموصدة وتركت لتتصلب (الونداوي وزوين، 2020).

3-3-3-1-1-2-10. اختبار تخمر السكاكر

لقح وسط تخمر السكاكر بالنمو الجرثومي وحضن على درجة حرارة 37مْ وفحصت الأنابيب بعد 24 ساعة، النتيجة الموجبة هي تغير لون الوسط إلى الوردي (الونداوي وزوين، 2020).

3-3-3-1-1-2-11. النمو في درجات حرارة مختلفة

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط MRS–broth بالمزارع الجرثومية بعمر 24 ساعة، وحضنت لمدة 5 أيام بدرجات حرارة مختلفة (5–10–15–20–25–30–35–40–45)، وملاحظة النمو من خلال العكارة والترسبات (Yavuzdurmaz, 2007).

2-1-3-3-3. تأكيد هوية عزلات (*Lactobacillus*) باستخدام PCR

تم إجراء تحديد هوية عزلات *Lactobacillus* باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد (المتعدد PCR). حيث استُخدمت بادئات (مشغلات) خاصة بالأنواع للكشف عن وجود (*Lactobacillus*) والأجناس ذات الصلة بناءً على مناطق محفوظة من جين 16S rRNA (الجدول 9).

استخلاص الحمض النووي :

تم استخلاص الحمض النووي بالغليان حسب طريقة Ripon وآخرون (2011)، تم نقل 1.5 مل من مزروع العزلات السابقة النقية إلى أنبوب إيبندورف وطُرد مركزي لمدة 10 دقائق عند 13000 دورة في الدقيقة. بعد التخلص من المادة الطافية، أُخذت الكتلة الصلبة (الراسب) وأُعيد تعليقها بمحلول PBS (مخلب الفوسفات الملحي) بكمية 150–200 ميكرولتر، ثم طُردت مركزيًا لمدة 10 دقائق عند 13000 دورة في الدقيقة. مرة أخرى، تم التخلص من المادة الطافية وأُعيد تعليق الراسب بالمحلول الملحي العادي أو محلول PBS (150– 200 ميكرولتر) وغُلي في ماء ساخن لمدة 10 دقائق تقريبًا عند درجة حرارة 100 درجة مئوية. فورًا، نُقلت أنابيب الإيبندورف إلى صندوق ثلج لمدة 30 دقيقة، ثم طُردت مركزيًا لمدة 10 دقائق عند 13000 دورة في الدقيقة. تم جمع المادة الطافية (supernatant) وتجميدها عند درجة حرارة –20 درجة مئوية في أنبوب إيبندورف جديد.

أولاً: تأكيد الجنس *Lactobacillus spp*

تكون مزيج تفاعل PCR (بحجم نهائي 25 ميكرولتر) مما يلي: (2 ميكرولتر من قالب الحمض النووي DNA، 1 ميكرولتر لكل من البادئ الأمامي والبادئ العكسي (تركيز 100 بيكومول/ميكرولتر)، 2.5 ميكرولتر من مزيج تفاعل PCR، 1.5 ميكرولتر من كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$) بتركيز 25 ملي مول، 1 ميكرولتر من خليط النيوكليوتيدات الرباعية ((dNTP mix، 0.3 ميكرولتر من إنزيم بوليميراز الحمض النووي (Taq polymerase)، واستكمال الحجم إلى 25 ميكرولتر بماء خالٍ من النيوكليازات). وضع مزيج التفاعل المحضر سابقاً في مدور الحرارة وفق البرنامج التالي: 40 دورة، 95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، درجة حرارة الالتحام (annealing) 61 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، 72 درجة مئوية لمدة 60 ثانية، واستطالة نهائية عند 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق (Nzingula *et al*., 2023).

ثانياً: تأكيد أنواع *Lactobacillus*:

أُجريت اختبارات PCR لتأكيد خصوصية أزواج البادئات المصممة خصيصًا للأنواع. تم تقييم الخصوصية باستخدام 4 سلالات مرجعية من (*Lactobacillus*) (الجدول (9)). تم تضخيم نواتج PCR باستخدام الشروط التالية في جهاز التدوير الحراري (thermocycler) 94 درجة مئوية لمدة 10 دقائق، تليها 30 دورة من 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، 60 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، 72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، ثم 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق. تألف مزيج تفاعل PCR (بحجم نهائي 25 ميكرولتر) مما يلي: (2 ميكرولتر من قالب الحمض النووي DNA، 1 ميكرولتر لكل من البادئ الأمامي والبادئ العكسي (تركيز 100 بيكومول/ميكرولتر)، 2.5 ميكرولتر من مخزن تفاعل PCR، 1.5 ميكرولتر من 25 $MgCl_2$ ملي مول، 0.5 ميكرولتر من مزيج dNTP، 0.3 ميكرولتر من إنزيم Taq polymerase، واستكمال الحجم إلى 25 ميكرولتر بماء خالٍ من النيوكليازات) (Kim *et al.*, 2020).

الكشف عن نواتج PCR:

تم تحليل نواتج (منتجات) تفاعل PCR بواسطة الرحلان الكهربائي على هلام أجاروز بتركيز 2% (من إنتاج شركة GeneDire®، الولايات المتحدة الأمريكية) محضر في دارئة TBE بتركيز 1× وإضافة صبغة بروميد الإيثيديوم (تركيز 1 ميكروغرام/مل). أُجريت عملية الرحلان الكهربائي عند جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة، تم إظهار نوتج التضخيم باستخدام نظام إظهار الأشعة فوق البنفسجية (UviPro).

الجدول رقم (9):تسلسل البرايمرات المستخدمة للكشف عن *Lactobacillus*
(Kim *et al.*, 2020) (Abdulla *et al.*, 2013)

		Primer sequence 5'-3'	Product size (bp)
Lactobacillus spp	**F**	**GGA ATC TTC CAC AAT GGA CG**	**216**
	R	**CGC TTT ACG CCC AAT AAA TCC GG**	
L. plantarum	**F**	**GCT GGC AAT GCC ATC GTG CT**	**147**
	R	**TCT CAA CGG TTG CTG TAT CG**	
L. acidophilus	**F**	**CCT TTC TAA GGA AGC GAA GGA T**	**129**
	R	**ACG CTT GGT ATT CCA AAT CGC**	
L. salivarius	**F**	**TAC ACC GAA TGC TTG CAT TCA**	**138**
	R	**AGG ATC ATG CGA TCC TTA GAG A**	
L. reuteri	**F**	**GAT TGA CGA TGG ATC ACC AGT**	**161**
	R	**CAT CCC AGA GTG ATA GCC AA**	

3-3-3-2 حساسية عزلات جراثيم *Lactobacillus* للمضادات الحيوية:

تم تحديد حساسية العزلات لأنواع مختلفة من المضادات الحيوية كما هو موضح في الجدول رقم (6)، وذلك باستخدام طريقة انتشار بالآغار (Bauer and Kirby, 1966) على أطباق أغار مولر هينتون. حيث تم نشر 100 ميكرولتر من كل معلق جرثومي، بعكارة تعادل معيار ماكفارلاند 0.5، (أي ما يعادل حوالي 1×10^8 وحدة تشكيل مستعمرة/مل)، على سطح طبق بتري باستخدام ماسحة قطنية معقمة. بعد حضانة العزلات عند درجة حرارة 37 درجة مئوية، لمدة 24 ساعة في ظروف لاهوائية، قُيس قطر منطقة منع النمو بمسطرة بالمليمتر. وبعد مقارنتها بجداول قياسية تم قُراءة النتائج كحساسية (S) ومقاومة (R) بناءً على قطر منطقة منع النمو (Pa, 2010).

3-3-3-2-1. دراسة التأثير التثبيطي خارج الجسم الحي:

3-3-3-2-1-1. دراسة التأثير التثبيطي لجراثيم *Lactobacillus* تجاه بعض الجراثيم الممرضة:

تم استخدام طريقة الانتشار بالآغار التي وصفها (Al-Qassab, 1988) للكشف عن الفعالية التثبيطية لجراثيم *Lactobacillus*،

1- تلقح انابيب اختبار تحتوي على 10 مل من MRS broth بمستعمرة جرثومية من آغار MRS.

2- تحضن بدرجة حرارة 37م° لمدة (72) ساعة لحين وصول الجراثيم لطور النمو الثابت اللوغاريتمي.

3- يعدل تركيز المعلق الجرثومي إلى 10^8 تقريبا (0.5 ماكفرلاند).

4- تغمس أوراق الترشيح دائرية ومن نوع Whatman no: 3 بالمعلق الجرثومي.

5- وضع اوراق الترشيح المحملة بالمعلق البكتري على أطباق مزروعة بالجراثيم الممرضة.

6- قياس هالة منع النمو المتكونة حول الأقراص المشبعة بمعلق جراثيم *Lactobacillus* بعد الحضن لمدة 18-24 ساعة وبدرجة حرارة 37م°.

وتم زراعة كل من *E.coli* و*Salmonella* و *Staph.aureus* (التي تم الحصول عليها من بنك العزولات الجرثومية في كلية الطب البيطري) على وسط الاغار مولر هينتون، وذلك بنشر 0.1 مل من الجراثيم أعلاه بوساطة ماسحة قطنية، وتركت لمدة (5-10) دقيقة لكي تجف، بعدها وضعت أقراص أوراق الترشيح المحملة بجراثيم المزرعة السائلة لعزلات جراثيم العصيات اللبنية بعدها حضنت الأطباق بدرجة 37 مئوية ولمدة (24) ساعة، وتم قياس مناطق منع النمو وبنفس الوقت استخدم اقراص من أوراق الترشيح غمرت بوسط MRS السائل غير مزروع واستخدمت كشاهد سلبي. تم قياس قطر مناطق التثبيط بعد مقارنتها بالشاهد السلبي واعتبرت منطقة التثبيط 1 ملم هي النتيجة الموجبة، وأعيدت التجارب مرتين وبمكررين لكل عزلة (Sgouras *et al.*, 2004; Rajaram *et al.*, 2010).

3-3-3-2-1-1. دراسة التأثير التثبيطي لراشح جراثيم *Lactobacillus* تجاه بعض الجراثيم الممرضة:

تم استخدام طريقة Well diffusion الموصوفة من قبل Gupta وآخرون (1998) وذلك باتباع الفقرة السابقة إلا أنه وضع 100 مايكروليتر من الراشح الجرثومي (باستخدام جهاز الطرد المركزي وبسرعة 6000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة لغرض الحصول على سائل الخلايا الحرة، بعدها تم ترشيح السائل لغرض تعقيمه باستخدام أوراق ترشيح وبقطر 0.22 مايكروليتر، ولغرض تثبيط H_2O_2 أضيف الكتالاز بتركيز 1 ملغ/مل بعدها تم حفظ الراشح لمدة ساعتين وبدرجة حرارة 37 مئوية لحين استعماله) وتعتبر منطقة التثبيط 1 mm نتيجة موجبة.

1- فصل خلايا الجراثيم عن وسط النمو باستعمال جهاز الطرد المركزي للحصول على راشح الجراثيم.

2- غمس أوراق الترشيح دائرية من نوع Whatman no: 3 في الجزء الرائق (وسط نمو الجراثيم)

3- وضع أوراق الترشيح المحملة برواشح الجراثيم على أطباق مزروعة بالجراثيم المرضية.

4- قياس الهالة الشفافة المتكونة حول الأقراص بعد الحضن لمدة 18 -24 ساعة وبدرجة حرارة 37م°.

ولمقارنة التأثير التثبيطي للجراثيم ورواشحها مع التأثير التثبيطي للمضادات الحيوية، تم زراعة الجراثيم الممرضة المذكورة سابقة نفسها على طبق مولرهينتون آخر ثم تم وضع أقراص تحسس دوائية عليه بعد جفافها (أموكسيسلين، دوكسي سايكلين، اريثرومايسين، كولستين، سبيرامايسين، فوسفومايسين، سيفالكسين، تريموثبريم، تتراسكلين، سيبروفلوكساسين).

3-3-3-3 التغليف: مخطط رقم (1)

3-3-3-3-1. أجريت العملية حسب الطريقة التي ذكرها Talebzadeh وآخرون (2014):

1- استعمل 80 مل من محلول التغليف (محلول ألجينات الصوديوم 3%وزن/حجم) والمحضر في الفقرة (3-3-2-10-1).

2- استعمل 200 مل من محلول التصلب (محلول كلوريد الكالسيوم وكلوريد الصوديوم) والمحضر في الفقرة (3-3-2-10-2)

3- يمزج 10 مل من المزرعة الجرثومية *Lactobacillus* مع 10 مل حليب فرز المعقم، مع المزج الجيد ومع تجنب تكون الفقاعات.

4- يضاف مزيج جراثيم *Lactobacillus* والحليب فرز إلى محلول التغليف ومزجهما بصورة جيدة على جهاز صفيح مسخن مع التحريك باستعمال محرك مغناطيسي ولمدة 45 دقيقة وعلى درجة حرارة 37 مئوية.

5- وبعد إكمال عملية المزج ينقل المزيج إلى محقنة معقمة ويتم تقطير المزيج بشكل قطرات متقطعة ومتتالية ومن ارتفاع 10 سم في محلول التصلب لتكوين الحبيبات.

6- بعد الانتهاء من عملية التقطير سيتم تحريك الحبيبات في محلول التصلب على جهاز صفيح مسخن مع التحريك باستعمال محرك مغناطيسي ولمدة 10 دقائق.

7- ثم تترك الحبيبات في محلول التصلب لمدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة.

8- ثم تغسل الحبيبات بماء البيتون للتخلص من آثار كلوريد الكالسيوم على ثلاث دفعات بعدها تنقل الحبيبات إلى زجاجيات حاوية على ماء البيتون للحفظ على درجة حرارة 4 مئوية لإجراء الاختبارات عليها فيما بعد.

3-3-3-3-2-1. إزالة الغلاف الدقيق لحساب الأعداد الحية :

تم إزالة غلاف الحبيبات لغرض احتساب الاعداد الحية حسب طريقة (Teoh *et al*,. 2011). وحسب ما يأتي:

1- في بيشر حاوي على 10 مل من محلول إزالة غلاف التغليف والمعد كما في الفقرة (3-3-2-11) مع 35 مل من محلول فوسفات الصوديوم الحمضي 0.2 غ المعد (3-3-2-4) وأن يكون درجة الحموضة متعادل PH =7 بعدها اكمل حجم المحلول إلى 160 مل بالماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مئوية وضغط 1.5 بار ولمدة 15 دقيقة، بعدها وزّن غرام واحد من المعززات الحيوية المغلفة ووضع في المحلول الناتج بالبيشر.

2- وضع البيشر على جهاز صفيح مسخن مع محرك مغناطيسي بدرجة حرارة 37 مئوية ولمدة ساعة واحدة.

3- بعد إتمام عملية إحلال الغلاف بصورة تامة تم احتساب الأعداد الحية لها بطريقة صب الأطباق القياسية.

3-3-3-3-3. عملية التغليف الدقيق بالطبقة الثانية:

أجريت العملية حسب الطريقة التي استخدمها Talebzadeh وآخرون (2014) وحسب ما يأتي:

1 – استعمل 100 مل من محلول التغليف الثاني والمحضر كما في الفقرة (3-3-2-12-1)

2 – غمر 15 غم من الحبيبات جراثيم كل على انفراد في محلول التغليف الثاني المعد كما في الفقرة (3-3-2-12-1) وخلط على جهاز صفيح المسخن مع المحرك المغناطيسي لمدة 45 دقيقة.

3 – بعد الانتهاء من عملية الخلط أضيف 100 مل من محلول التصلب الثاني المعد كما في الفقرة (3-3-2-12-2) وخلط لمدة 5 دقائق، ثم تركت الحبيبات لمدة ساعة.

4 –غسلت الحبيبات بمحلول ماء البيتون المعد كما في الفقرة (3-3-2-8) على ثلاث دفعات للتخلص من آثار محلول التصلب الثاني.

5 –نقلت الحبيبات الي عبوات زجاجية حاوية على ماء البيتون المعد في الفقرة (3-3-2-8) و حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 مْ

3-3-3-3-1. إزالة الغلاف الدقيق الثاني لحساب الأعداد الحية:

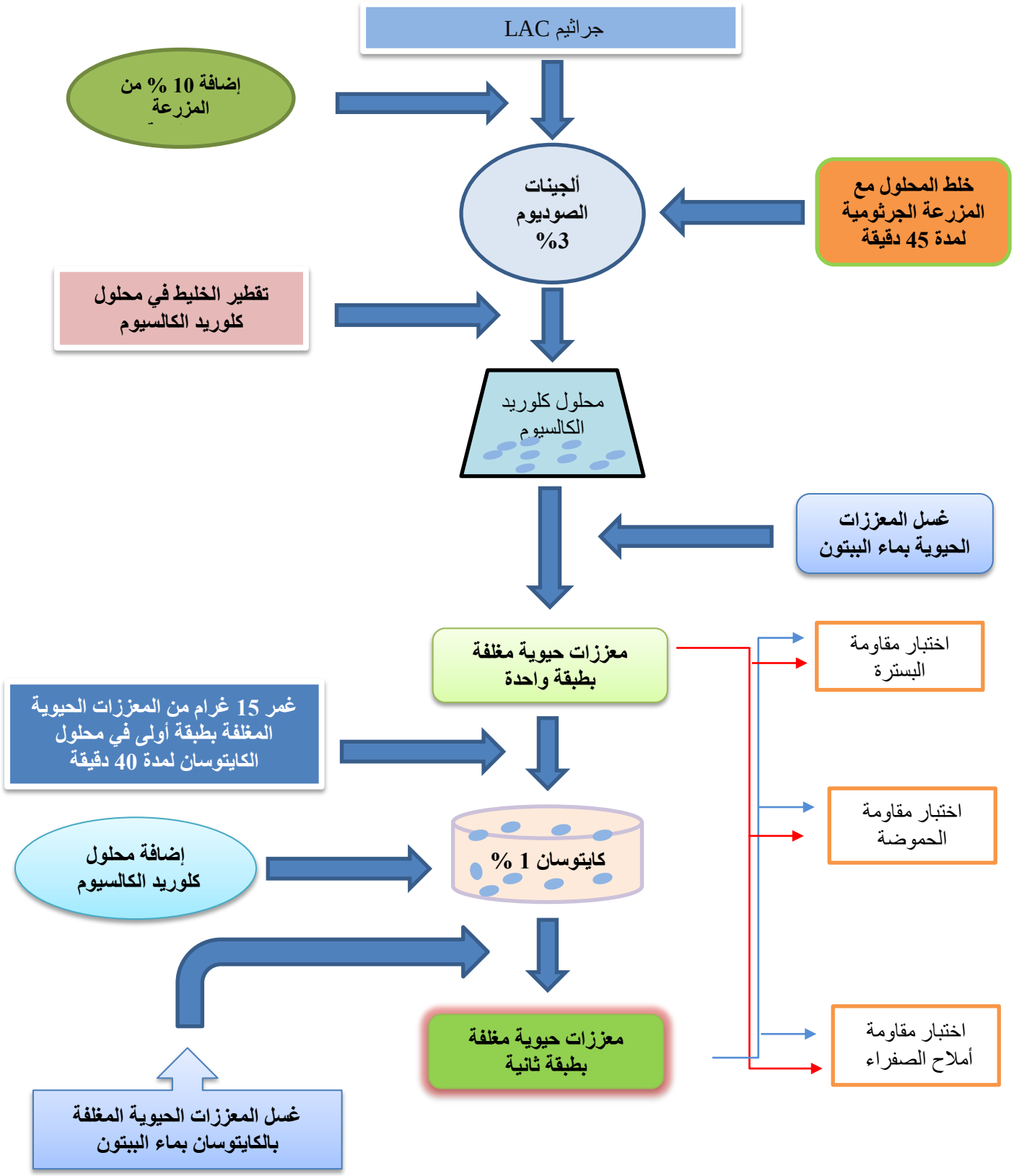
تم حساب الأعداد الحية بعد إزالة الأغلفة حسب طريقة Talebzadeh وآخرون (2014) وحسب ما يأتي:

1 – أخذ غرام واحد من المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين والمحضرة كما في الفقرة (3-3-3-3-3) وتوضع كلاً على انفراد في زجاجة حاوية على 10 مل من محلول إزالة غلاف الطبقة الثانية المحضر كما في الفقرة (3-3-2-13).

2 – وضعت الأنبوبة على جهاز صفيح مسخن مع التحريك باستعمال محرك مغناطيسي لمدة ساعة كاملة وبدرجة حرارة 37 مْ

4– بعد إتمام عملية إحلال الغلاف بصورة تامة تم حساب الأعداد الحية لها بطريقة صب الأطباق القياسية كما في الفقرة (3-3-4).

مخطط رقم (1): آلية التغليف



3-3-3-4. عيوشية جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف ومقاومتها لبعض الظروف المتطرفة:

3-3-3-4-1. التخزين:

لغرض معرفة عيوشية المعززات الحيوية قبل وبعد التغليف طوال مدة الخزن؛ تم خزن جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعدها في زجاجة حاوية على ماء الببتون في درجة حرارة الثلاجة 4 مئوية وتم احتساب الاعداد الحية شهريا لدراسة عمرها الخزني الافتراضي (Lee, 2012).

أما لاختبار مقاومة المعززات للظروف المتطرفة فتم إجراء عدة اختبارات منها:

3-3-3-4-2. المعاملات الحرارية:

3-3-3-4-2-1. البسترة البطيئة:

تم اختبار قدرة المعززات الحيوية على مقاومة حرارة البسترة البطيئة كما يلي:

- أخذ غرام من المعززات الحيوية من جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف كلا على انفراد ووضعت في زجاجية حاوية على 10 مل من الحليب الفرز المعقم.
- وضعت الزجاجة في حمام مائي بدرجة حرارة 63 مئوية ولمدة 30 دقيقة مع التحريك المستمر (El-shafei *et al.*, 2015)
- بعد الانتهاء من عملية البسترة البطيئة نقلت الأنابيب إلى حمام ثلجي لغرض تبريدها بشكل سريع.
- تم حساب الأعداد الحية للمعززات الحيوية قبل التغليف وبعد التغليف (بعد إحلال طبقة التغليف) (Talebzadeh *et al.*, 2014) بعد المعاملة الحرارية بطريقة صب الأطباق القياسية وحضنت لا هوائياً بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 48 ساعة (Ranjan, 2007).

3-3-3-4-2-1. البسترة السريعة:

نفس الفقرة السابقة ولكن درجة حرارة الحمام المائي التي وضعت فيه الأنابيب 72 مئوية ولمدة 15 ثانية.

3-3-3-4-3. مقاومة الحموضة المتطرفة:

تم الاختبار حسب طريقة (Ding and Shah, 2009)، وذلك بتعريض المعززات الحيوية قبل التغليف وبعد التغليف كلا على انفراد لدرجة حموضة منخفضة 1 و 2 و 3 كلاً على انفراد لمدة (60 و 120 و 180) دقيقة بدرجة حرارة 37 مئوية باستعمال حمض الهيدروكلوريك المركز بنسبة 37%، وبعد انتهاء فترة الحضن تم احتساب الأعداد الحية للجراثيم قبل التغليف وبعد التغليف (بعد إحلال طبقة التغليف) وذلك بطريقة صب الأطباق وحضنت لا هوائياً بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة.

3-3-3-4-4. مقاومة أملاح الصفراء:

تم الاختبار حسب طريقة (Ding and Shah, 2009)، وذلك بتعريض المعززات الحيوية قبل التغليف وبعد التغليف كلا على انفراد لتراكيز عالية من أملاح الصفراء 1 و 2 و 3 % وزن/حجم كلاً على انفراد لمدة (60 و 120 و 180) دقيقة بدرجة حرارة 37 مئوية، وبعد انتهاء فترة الحضن تم احتساب الأعداد الحية للجراثيم قبل التغليف وبعد التغليف (بعد إحلال طبقة التغليف) وذلك بطريقة صب الأطباق وحضنت لا هوائياً بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة.

تم حساب نسبة البقاء على قيد الحياة للرقم الهيدروجيني وأملاح الصفراء باستخدام الطريقة التي ذكرها Ritter وآخرون (2018) على النحو التالي:

نسبة البقاء (٪) = (عدد الخلايا الباقية CFU/ml ÷ عدد الخلايا الأولية CFU/ml) × 100

3-3-3-5. تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات السليمة والممرضة.

تم استخدام 360 دجاج لحم بعمر يوم واحد (ROS 308، وزن ابتدائي 42 ± 0.5 غرام). قُسِّمت جميع الصيصان عشوائيًا إلى مجموعات، واعطيت المعززات الحيوية بالعلف، حيث شمل:

3-3-3-5-1. القطيع الأول ست مجموعات 216 طير لكل مجموعة 36 طير: (6 مكررات، كل منها 6 طيور).

A. نظامًا غذائيًا أساسيًا بدون إضافات (اعطيت ماء فيزيولوجي) كمجموعة شاهد سلبية.

B. نظامًا غذائيًا أساسيًا مع اضافة اموكسيسلين.

C. نظامًا غذائيًا أساسيًا يحتوي على جراثيم *Lactobacillus* بدون تغليف بجرعة 10^8 CFU\Kg من اليوم صفر وحتى نهاية التربية (Vimon *et al.*, 2023).

D. نظامًا غذائيًا أساسيًا يحتوي على كبسولات من الالجينات والكيتوسان من دون جراثيم *Lactobacillus*.

E. نظامًا غذائيًا أساسيًا يحتوي على جراثيم *Lactobacillus* المغلف بطبقة واحدة بمستويات 10^8 CFU\Kg من اليوم صفر حتى نهاية التربية.

F. نظامًا غذائيًا أساسيًا يحتوي على جراثيم *Lactobacillus* المغلف بطبقتين بمستويات 10^8 CFU\Kg من اليوم صفر حتى نهاية التربية.

3-3-3-5-2. القطيع الثاني خمس مجموعات 180 طير لكل مجموعة 36 طير: (6 مكررات، كل منها 6 طيور)

A. نظامًا غذائيًا أساسيًا بدون إضافات (جرعت ماء فيزيولوجي) كمجموعة شاهد سلبية.

G. نظامًا غذائيًا أساسيًا مع اعطاء جراثيم (*E. coli*) ممرضة للدواجن بعمر 21.

H. نظامًا غذائيًا أساسيًا مع اعطاء جراثيم (*E. coli*) ممرضة للدواجن بعمر 21 مع المعالجة بأموكسيسلين.

I. نظامًا غذائيًا أساسيًا يحتوي على جراثيم *Lactobacillus* بدون تغليف بمستويات 10^8 CFU\Kg من اليوم صفر حتى نهاية التربية وفي عمر 21 اعطيت جراثيم ممرضة (*E. coli*).

J. نظاماً غذائيًا أساسيًا يحتوي على جراثيم *Lactobacillus* المغلف بطبقتين 10^8 CFU\Kg من اليوم صفر حتى نهاية التربية وفي عمر 21 اعطيت جراثيم ممرضة (*E. coli*).

حيث كانت جرعة *E. coli* مقدارها 10^6 وحدة تشكيل مستعمرة (CFU) عن طريق الفم (Tobia and Ohimain, 2024)، وتم حساب الجرعة نصف المعدية حسب طريقة (Reed and Muench, 1938).

يتكون برنامج التغذية من 3 مراحل: نظام غذائي مفتت (من 1 إلى 15 يومًا) بمقدار 0.5 كيلو غرام لكل طائر، ونظام غذائي مُحبب للنمو (من 16 إلى 32 يومًا) بمقدار 1.5 كيلو غرام لكل طائر، ونظام غذائي مُحبب للإنهاء (من 32 إلى 42 يومًا) على التوالي. تمت صياغة الأنظمة الغذائية الأساسية لتلبية متطلبات الغذائية لدجاج التسمين Ross 308 (Shakouri and Malekzadeh, 2016). تم توفير النظام الغذائي والتدفئة ومياه نظيفة والإضاءة طوال التجربة. تمت تربية دجاج التسمين في مزارع أرضية مغلقة (500 م^2) في مزرعة خاصة بريف حمص دون الفصل بين الذكور والإناث، مع فرشة من نشارة الخشب، تم الحفاظ على درجة الحرارة عند 33 درجة مئوية خلال الأيام الثلاثة الأولى، ثم تم خفضها تدريجياً بمقدار 2–3 درجة مئوية أسبوعياً لتصل إلى 22 درجة مئوية في اليوم 42. تم الحفاظ على الرطوبة النسبية بين 55–65%. كانت الإضاءة لمدة 23 ساعة يومياً خلال الأسبوع الأول، ثم 18 ساعة يومياً بعد ذلك، وتم توفير العلف والماء.

وتم اتباع برنامج لقاح لتحصين الطيور المدروسة في كل المجموعات وفق الجدول رقم (10).

الجدول رقم (10): برنامج اللقاح المتبع لتحصين الطيور

العمر	نوع اللقاح	طريقة إعطاء اللقاح
اليوم الثاني	نيوكاسل + برونشيت	قطرة
اليوم الرابع عشر	جمبورو	ماء الشرب
اليوم الواحد والعشرون	نيوكاسل	ماء الشرب
اليوم الثامن والعشرون	نيوكاسل	ماء الشرب
اليوم الخامس والثلاثون	نيوكاسل	ماء الشرب

سُجِّل وزن جسم دجاج التسمين في كل مجموعة في اليوم الأول. وسُجِّلت الحالة الصحية، واستهلاك العلف، ونفوق الطيور يوميًا. وبالمثل. قُيِّم أداء النمو بحساب متوسط الزيادة الوزنية اليومية Average Daily Gain (**ADG**)، ومتوسط الاستهلاك اليومي من العلف Average Daily Feed Intake (**ADFI**) ، ونسبة تحويل العلف Feed Conversion Ratio (**FCR**) خلال مراحل الغذاء المفتت (1 – 15 يومًا)، والنامي (16 – 32 يومًا)، والإنهاء (33 – 42) يومًا والإجمالي (1– 42) يومًا

حيث أن:

ADG = الوزن النهائي – الوزن الابتدائي/عدد الايام

ADFI = إجمالي العلف المستهلك/ عدد الايام

FCR = كمية العلف التراكمي/وزن الجسم الحي.

3-3-4. حساب أعداد الجراثيم:

استخدمت طريقة صب الاطباق (Pour plate) (العيسى وعلوش، 2006) لعد المستعمرات حيث تم إجراء سلسلة من التخفيفات العشرية (مثل 1:10، 1:100، 1:1000، وهكذا) عن طريق نقل حجم معين (1 مل) من العينة إلى أنبوب يحتوي على 9 مل من ماء مقطر معقم، ثم نقل 1مل من كل تخفيف للعينة المستخدمة كلاقحة إلى طبق بتري معقم ثم صب عليه وسط MRS agar وحرك الطبق حركة رحوية لضمان التجانس؛ وترك الوسط ليتصلب ثم حضن لا هوائياً بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 48 ساعة، وتم حساب التعداد الجرثومي من خلال عد المستعمرات النامية في الأطباق مضروباً بمقلوب التخفيف ويقاس بواحدة CFU (وحدة مشكلة للمستعمرة الجرثومية Colony- forming unit)

لإجراء التعداد الجرثومي اختبرت الاطباق التي يتراوح عدد مستعمراتها بين 30−300 مستعمرة (Ranjan, 2007).

3-3-5. التحليل الإحصائي:

تم استخدام برنامج (SPSS) وذلك لحساب النسب المئوية، المتوسطات والانحراف المعياري والفروق المعنوية عند مستوى احتمال ($P\leq0.05$).

الفصل الرابع

النتائج

RESULTS

النتائج

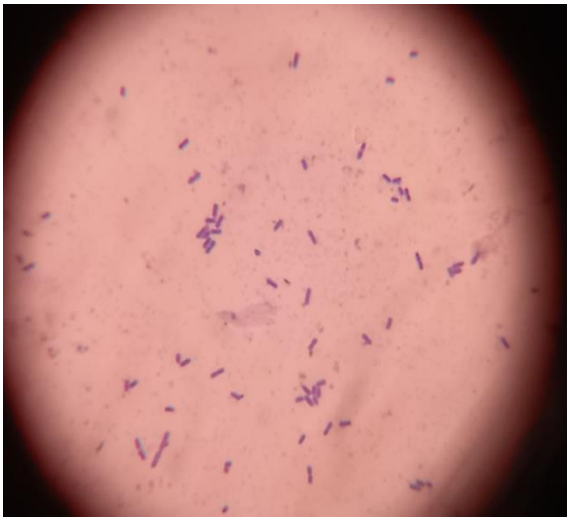
Results

1-4. عزل جراثيم *Lactobacillus*:

أظهرت نتائج البحث عزل 16 مستعمرة من محتويات الأمعاء (اللفائفي والأعور) لدى دجاج اللحم تنتمي إلى جراثيم *Lactobacillus* وذلك من أصل 50 عينة، وتم تشخيص العزلات بناءاً على الخواص المزرعية (مستعمرات لمحدبة وملساء ذات لون كريمي) والشكلية (جراثيم عصوية إلى مغزلية الشكل إيجابية لصبغة غرام) (الصورة رقم 1 و الصورة رقم 2) والخواص الكيمياحيوية، ثم تم هوية العزلات باستخدام تفاعل PCR الصورة رقم (3)، حيث كانت العزلات تنتمي *إلى* (9) *L. Plantarum* (2), *L. acidophilas* (الصورة رقم 4 والصورة رقم 5) وأما عن باقي ال (5) عزولات فقد أهملت لعدم توفر برايمرات للكشف عنها ويظهر الجدول رقم (11) أنواع العزلات وعددها:

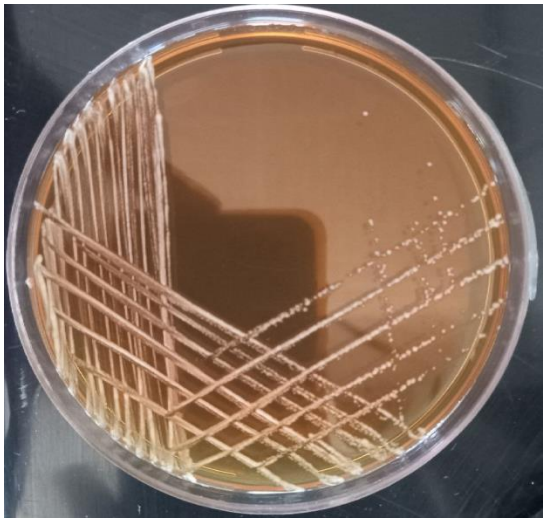
جدول رقم (11): أنواع العزلات وعددها

النوع	العدد	النسبة %
L. acidophilas	2	%4
L. Plantarum	9	%18
العزلات التي أهملت	5	%10
المجموع	16	%32



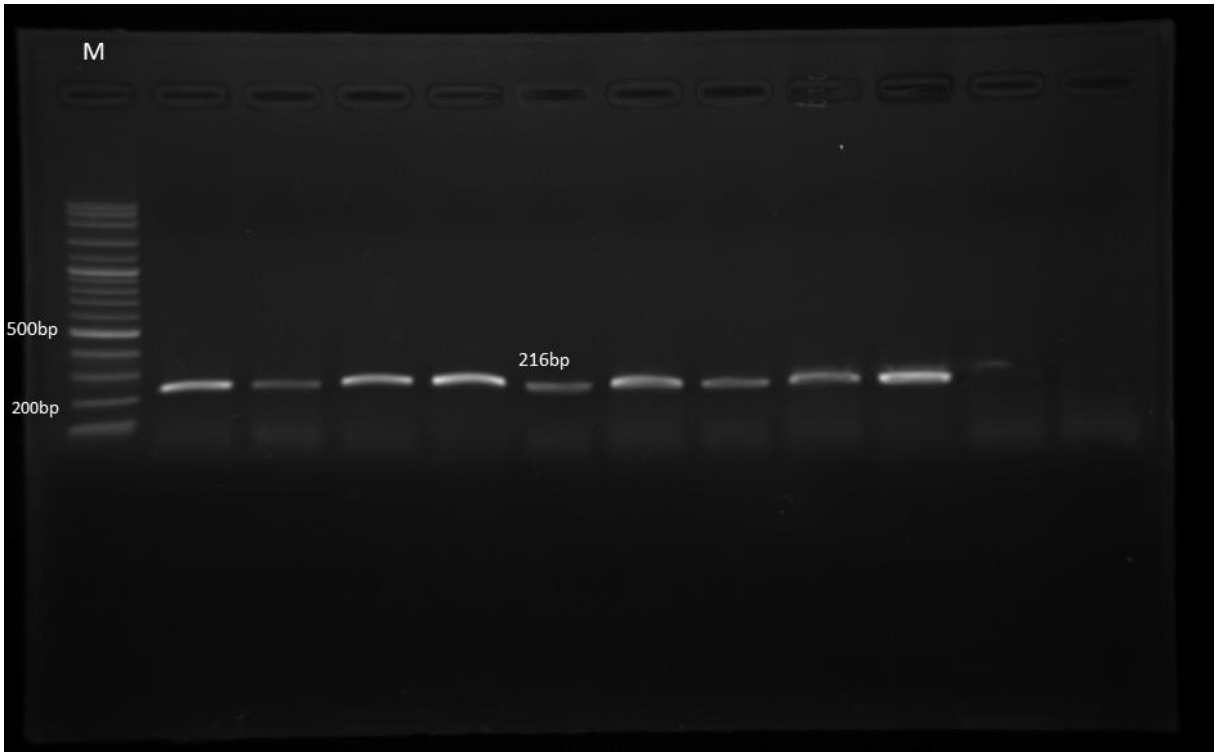
الصورة رقم (1)

جراثيم *Lactobacillus* مصبوغة بصبغة غرام



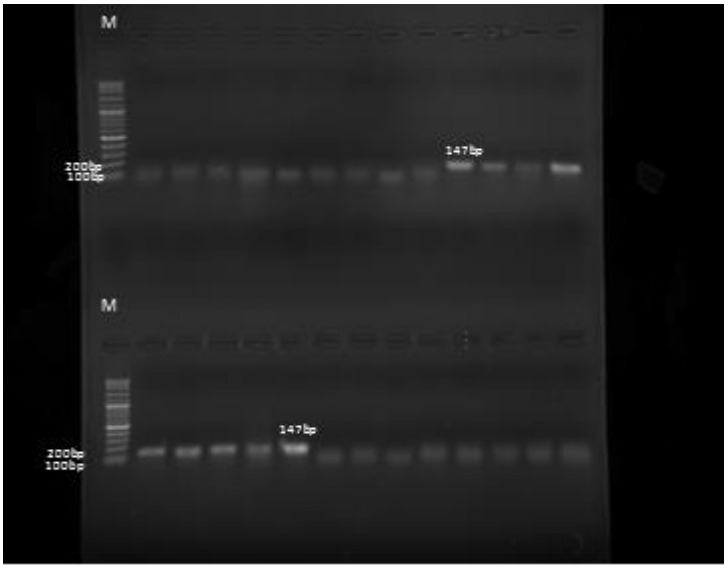
الصورة رقم (2)

Lactobacillus على منبت MRS AGAR

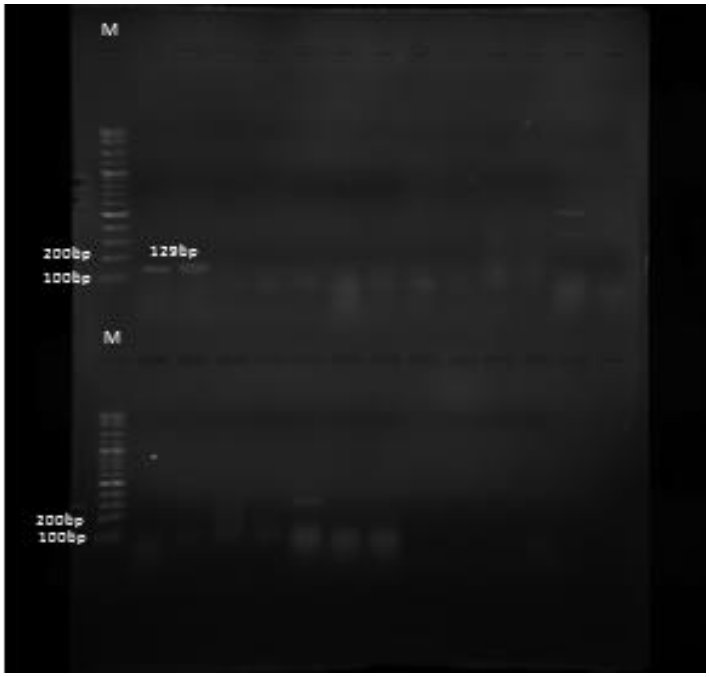


الصورة رقم (3)

نتائج الرحلان الكهربائي في هلام الآغاروز لنواتج التضخيم البوليميراز المتسلسل المتعدد (PCR) للكشف عن جينات جنس *Lactobacillus* (bp 216) لـ 9 عزلات. المسار :M سلم 100 bp كمعلم الوزن الجزيئي للحمض النووي.



الصورة رقم (4)



الصورة رقم (5)

نمط الرحلان الكهربائي في هلام الأغاروز لنواتج التضخيم البوليميراز المتسلسل المتعدد (PCR) للكشف عن الجينات المميزة للأنواع *L. plantarum* (147 bp)، *L. acidophilus* (129 bp))، *L. salivarius* (138 bp)، و *L. reuteri* (161 bp) ، لدى 16 عزلة جرثومية. المسار M: معلم الوزن الجزيئي للحمض النووي (100 bp).

الصورة رقم (4): *L. plantarum* ، الصورة رقم (5): *L. acidophilus*

2-4. الحساسية للمضادات الحيوية:

أجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية لجميع العزلات الجرثومية، وقد أظهرت النتائج كما هو موضح في الجدول رقم (12) أن العزلات مقاومة تامة وبنسبة 100% للمضادات (أموكسيسلين، ارثرومايسين، سيفالكسين، سلفاتريموثبريم)، كما يظهر الجدول رقم (12) وجود مقاومة لعزلات (*L. acidophilas*) تجاه المضاد الحيوي (تتراسكلين)، بينما أظهرت عزلات (*L. Plantarum*) تحسساً متوسطًا تجاه هذا المضاد. وأظهرت عزلات (*L. Plantarum*) مقاومة تجاه المضاد الحيوي (سبيرامايسين)، بينما أظهرت عزلات (*L. acidophilas*) تحسسًا تجاه هذا المضاد.

إن جميع العزلات الجرثومية المدرسة أبدت حساسيتها للمضادات (كولستين، دوكسي سايكلين، فوسفومايسين، سيبروفلوكساسين)، حيث تراوحت أقطار مناطق منع النمو (11 – 24) مم بالنسبة لعزلات (*L. acidophilas*)، بينما كان قطر منطقة منع النمو بالنسبة إلى عزلات (*L. Plantarum*) حوالي (11 – 22) مم.

الجدول رقم (12): حساسية عزلات *Lactobacillus* لبعض المضادات الحيوية

الجراثيم / المضاد الحيوي	*L. acidophilas*	*L. Plantarum*
أموكسيسلين	R	R
سلفاتريموثبريم	R	R
سبيرامايسين	S	R
كولستين	S	S
دوكسي سايكلين	S	S
اريثرومايسين	R	R
تتراسكلين	R	I
سيفالكسين	R	R
فوسفومايسين	S	S
سيبروفلوكساسين	S	S

تعبر الأحرف في الجدول عن الحساسية (S) وعن المقاومة (R)، ومتوسطة الحساسية (I)

الصورة رقم (6)

اختبار حساسية لجراثيم *L. acidophilas*

اتجاه المضادات الحيوية

الصورة رقم (7)

اختبار حساسية لجراثيم *L. Plantarum*

اتجاه المضادات الحيوية

4-2-1. التأثير المضاد لجراثيم *Lactobacillus* على بعض الجراثيم الممرضة:

أظهرت النتائج كما هو موضح في جدول رقم (13) والصورة رقم (8) أن الأنواع الجرثومية الممرضة المستعملة في الدراسة كانت حساسة لأنواع المعززات الحيوية وراشحاتهم، إذ عد قطر 1 مم نتيجة موجبة حسب ما جاء في (Gupta *et al.*, 1998).

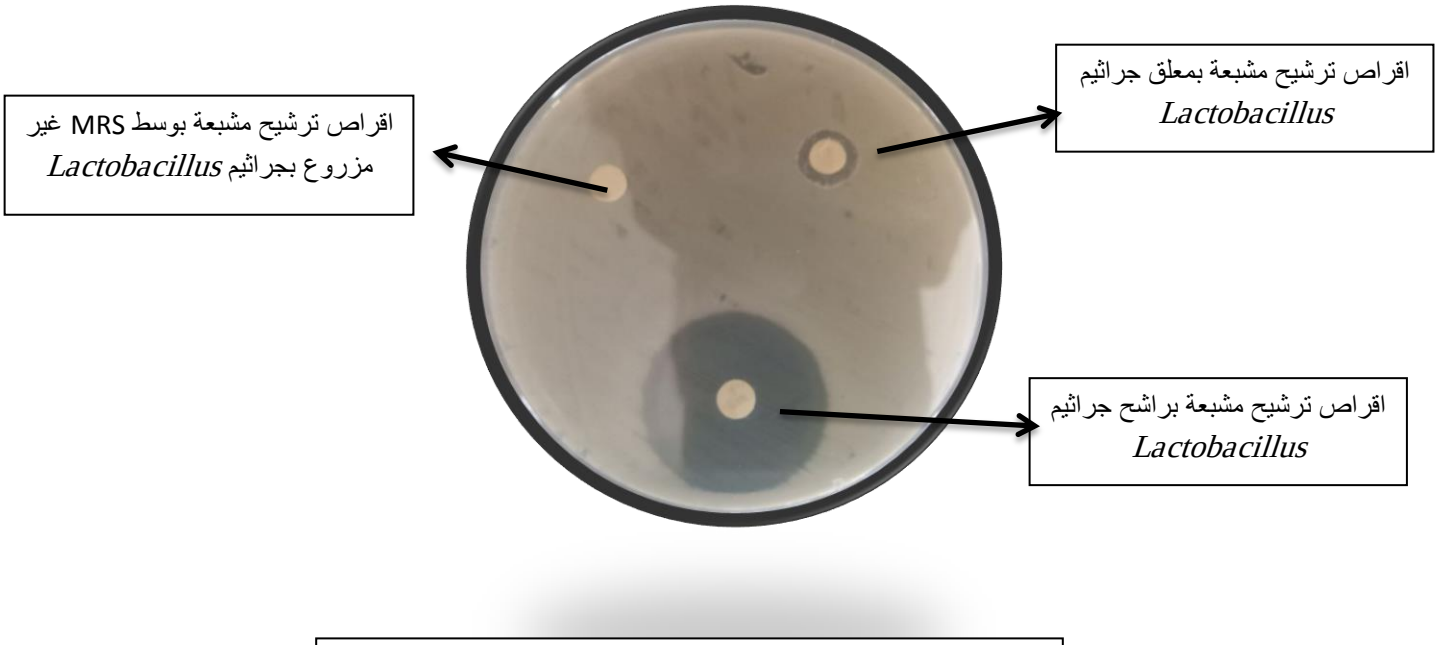
إذ كانت جراثيم الإشريكية القولونية *E.coli* حساسة لنوعي جراثيم *Lactobacillus* وبأقطار متقاربة، إذ كان قطر منطقة التثبيط باستعمال المعلق الجرثومي *L. acidophilus* (2) مم، بينما كانت أقطار مناطق التثبيط بالنسبة لراشح الجراثيم نفسها (9) مم، أما جراثيم *L. Plantarum* فقد كان قطر منطقة التثبيط لجراثيم *E.coli* (2) ملم بالنسبة للمعلق الجرثومي، أما عند استعمال الراشح الجرثومي للجراثيم نفسها فقد بلغ (8) مم.

وبالنسبة إلى جراثيم السلمونيلة *Salmonella* فقد كانت النتائج مشابهة في قطر منطقة التثبيط من قبل *Lactobacillus* المعزولة، إذ بلغ قطر منطقة التثبيط عند استعمال معلق جراثيم *L. acidophilus* (2) مم والراشح الجرثومي (8) مم، أما بالنسبة لمعلق جراثيم *L. Plantarum* فقد كان قطر منطقة التثبيط (3) مم والراشح الجرثومي (7) مم.

وأما الجنس الثالث من الجراثيم الممرضة المستخدم في الدراسة هو *Staph.aureus* وكانت النتائج في قطر منطقة التثبيط لمعلق جراثيم *L. acidophilus* (4) مم وقطر منطقة التثبيط للراشح الجرثومي (15) مم، أما بالنسبة لجراثيم *L. acidophilus* فقد كان قطر منطقة التثبيط للمعلق الجرثومي (4) مم والراشح الجرثومي (14) مم.

الجدول رقم (13): متوسط أقطار (مم) مناطق التثبيط لعزلات جراثيم *L. Plantarum* و *L. acidophilus* ضد الجراثيم الممرضة

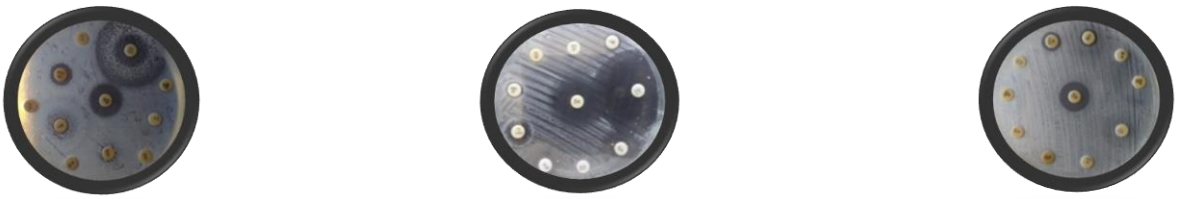
الجراثيم		الاشريكية القولونية	المكورات العنقودية الذهبية	السلمونيلة
L. acidophilus	المعلق الجرثومي	2±0.7	4±0.8	2±0.6
	الراشح الجرثومي	9±0.9	15±1	8±0.8
L. Plantarum	المعلق الجرثومي	2±0.7	4±0.7	3±0.5
	الراشح الجرثومي	8±0.6	14±1	7±0.6



الصورة رقم (8): التأثير المضاد ل *Lactobacillus Plantarum*
ضد المكورات العنقودية الذهبية

وبينت النتائج (الصورة رقم 9 والصورة رقم 10 والصورة 11) مقاومة أنواع الجراثيم الثلاث لأغلب المضادات الحيوية (اريثرومايسين، كولستين، سيفالكسين، سلفا تريموثبريم، تتراسكلين)، بينما أظهرت الجراثيم المرضية حساسية تجاه السيبروفلوكساسين، و حساسية تجاه الفوسفومايسين وحساسية ضد الأموكسيسلين ما عدا جراثيم الاشريكية القولونية فقد أظهرت مقاومة ضد هذا الصاد الحيوي،

وكانت جراثيم الاشريكية القولونية مقاومة للصاد الحيوي السبيرامايسين وجراثيم المكورات العنقودية الذهبية حساسية تجاهه وجراثيم السلمونيلة متوسطة الحساسية تجاهه، بينما كانت كل من جراثيم الاشريكية القولونية وجراثيم المكورات العنقودية الذهبية متوسطة الحساسية للدوكسي سايكلين أما جراثيم السلمونيلة أظهرت حساسية ضد الصاد الحيوي المذكور، وأظهرت كل من جراثيم الاشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية مقاومة وجراثيم السلمونيلة حساسية متوسطة تجاه التريموثبريم.



الصورة رقم (9) الصورة رقم (10) الصورة رقم (11)

اختبار تحسس دوائي لجراثيم الاشريكية القولونية _ اختبارتحسس دوائي لجراثيم المكورات العنقودية الذهبية _ اختبارتحسس دوائي لجراثيم السلمونيلة

4-3. تغليف جراثيم *Lactobacillus*.

4-3-1. تأثير التغليف بطبقة واحدة وبطبقتين في الأعداد الحية:

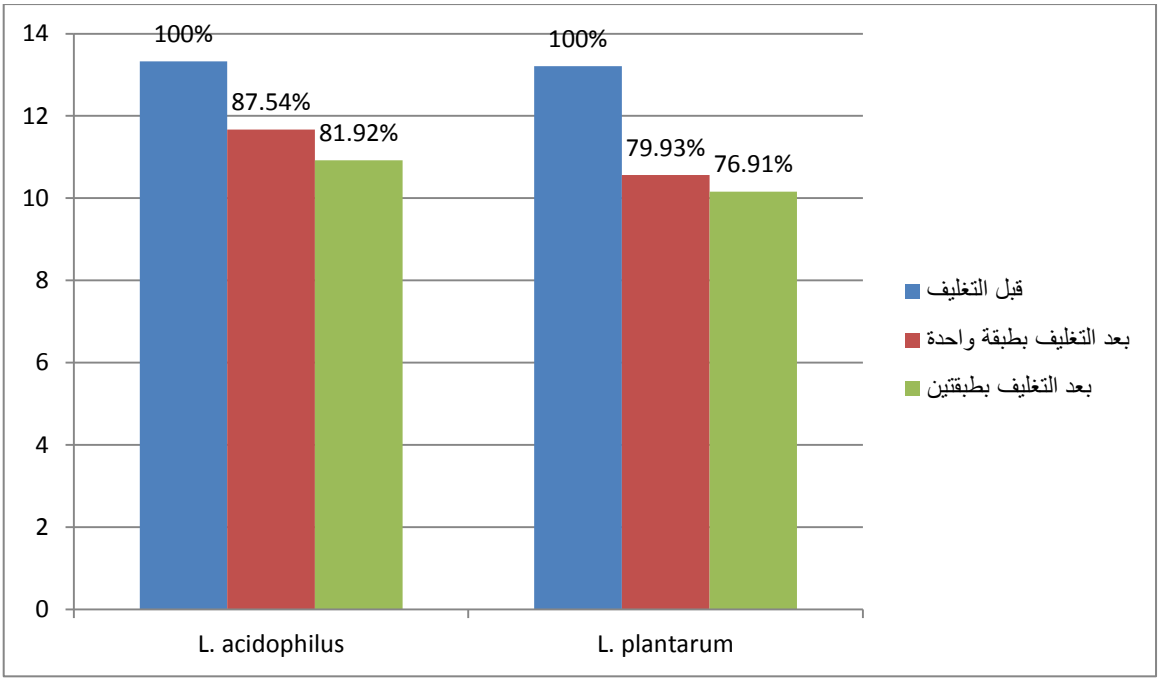
يبين الجدول رقم (14) تأثير التغليف الدقيق بطبقة واحدة من الألجينات والطبقة الثانية من الكايتوسان في الأعداد الحية لكلاً من جراثيم *L. acidophilas* , *L. Plantarum*، إذ كانت الأعداد الحية لكل من *L. acidophilas* , *L. Plantarum* (13.33) (13.21) $\log_{10}$ cfu\ml على التوالي قبل عملية التغليف الدقيق، ثم انخفضت أعدادها الحية بعد عملية التغليف الدقيق بطبقة واحدة إلى (11.67) (10.56) $\log_{10}$ cfu\g على التوالي، وانخفضت أعدادها الحية بعد التغليف بطبقة ثانية إلى (10.92) (10.16) $\log_{10}$ cfu\g على التوالي.

الجدول رقم (14): تأثير التغليف الدقيق في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* ($\log_{10}$ cfu\ml,g)

	قبل التغليف	بعد التغليف بطبقة واحدة	بعد التغليف الطبقتين
L. acidophilus	$^{A}13.33^{a}$ ±1.38	$^{A}11.67^{b}$ ±1.41	$^{A}10.92^{b}$±1.13
L. plantarum	$^{A}13.21^{a}$ ±1.41	$^{A}10.56^{b}$ ±1.43	$^{A}10.16^{b}$ ±1.21

تشير التشابه في الأحرف الصغيرة a إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.
أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.

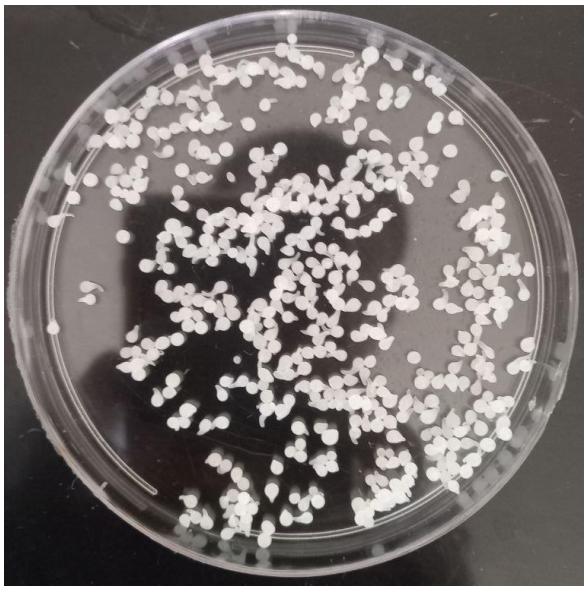
ويبين المخطط رقم (2) النسب المئوية للأعداد الحية للجراثيم المذكورة أعلاه بعد التغليف بطبقة واحدة وبطبقتين، وقد بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين الاعداد الحية قبل وبعد التغليف لكلا نوعي *Lactobacillus*، حيث أن عملية التغليف أدت إلى انخفاض أعداد الجراثيم الحية *L. acidophilus* بنسبة (12.46%، 18.08%) على التوالي عند التغليف الدقيق بطبقة واحدة وطبقتين، وانخفضت أيضاً أعدادها الحية *L. plantarum* عند التغليف الدقيق بطبقة واحدة وطبقتين بنسبة (20.07%، 23.09%) على التوالي.



المخطط رقم (2): النسب المئوية للأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* بعد التغليف الدقيق.

4-3-2 حجم وقطر وشكل حبيبات المعززات الحيوية المغلفة:

يبين الصورة رقم (12) حجم الحبيبات التي تشكلت بعد عملية التغليف الدقيق بطبقة واحدة من الألجينات والطبقة الثانية من الكايتوسان لكل من بكتريا *L. acidophilas , L. Plantarum*، إذ كان معدل حجم ($v=3/4\pi r^3$) عشرون حبة لكل من البكتريا المذكورة أعلاه والمغلفة بطبقة واحدة هو (0.278) (0.289) ملم^3، والمغلفة بالطبقة الثانية (0.289) (0.310) ملم^3 على التوالي.



صورة رقم (12): جراثيم *Lactobacillus* بعد التغليف الدقيق.

ويبين الجدول رقم (15) قطر الحبيبات التي تشكلت بعد عملية التغليف الدقيق بطبقة واحدة وبطبقتين لكل من البكتريا *L. acidophilas , L. Plantarum,* إذ كان معدل قطر عشرون حبة للبكتريا المغلفة بطبقة واحدة (0.1±0.81) ملم ، والمغلفة بالطبقة الثانية (0.1±0.82) على التوالي لبكتريا *L. acidophilas* و معدل قطر عشرون حبة للبكتريا المغلفة بطبقة واحدة (0.1±0.82) ملم، والمغلفة بالطبقة الثانية (0.1±0.84) على التوالي لبكتريا *L. Plantarum*.

الجدول رقم (15): معدل حجم وقطر الكبسولات

	المغلفة بطبقة واحدة		**المغلفة بطبقتين**	
	L. acidophilus	*L. plantarum*	*L. acidophilus*	*L. plantarum*
الحجم (ملم^3)	0.278	0.289	0.289	0.310
القطر (ملم)	0.81±0.1	0.82±0.1	0.82±0.1	0.84±0.1

كانت أشكال المعززات الحيوية المغلفة والمتكونة بتقنية البثق باستعمال الألجينات ذات أشكالاً كروية الى بيضوية الشكل وذات تشوهات قليلة وذات ملمس ناعم وهذا يرجع الى اللزوجة العالية لمحلول 3 % الألجينات ويعود لون المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة بيضاء الى كريمية اللون يعزى هذا اللون الى لون الحليب الفرز الأبيض المضاف بنسبة 10 % في تركيب أغلفة المعززات الحيوية المغلفة.

بينت النتائج الى عدم وجود فروق معنوية وواضحة بين أحجام وأقطار الحبيبات المتكونة بين البكتريا المغلفة نتيجة استعمال نفس الظروف والمكونات المستعملة في عملية التغليف الدقيق بتقنية البثق.

4-4. تأثير عملية التغليف على تعداد *Lactobacillus* عند تعريضها لبعض الظروف الفيزيائية والكيميائية.

4-4-1. طول مدة الخزن:

أظهرت النتائج كما هو موضح بالجدول رقم (16) أن عملية التغليف الدقيق أدت الى زيادة تحسين قابلية بقاء *Lactobacillus* بشكل أكثر فعالية من الجراثيم الغير مغلفة طوال مدة الخزن بدرجة حرارة 4 مْ، إذ كان الانخفاض في جراثيم *L. acidophilus* في وقت الصفر من (13.33) الى (12.18) $\log_{10}$ cfu\ml خلال ثلاث أشهر، وكان انخفاض في جراثيم *L. plantarum* في من وقت الصفر (13.21) الى (11.67) $\log_{10}$ cfu\ml خلال ثلاث أشهر مع عم وجود فروق معنوية لكلا النوعين خلال 3 اشهر.

وكان الانخفاض في الجراثيم المغلفة بطبقة واحدة ل *L. acidophilus* في وقت الصفر من (11.67) الى (11.09) $\log_{10}$ cfu\g خلال ثلاث أشهر، وكان انخفاض في جراثيم *L. plantarum* المغلفة بطبقة واحدة في وقت الصفر من (10.56) الى (10.01) $\log_{10}$ cfu\g خلال ثلاث أشهر مع عدم وجود فروق معنوية ($p<0.05$) لكلا النوعين خلال 3 اشهر.

وكان الانخفاض في الجراثيم المغلفة بطبقتين ل *L. acidophilus* في وقت الصفر من (10.92) الى (10.59) $\log_{10}$ cfu\g خلال ثلاث أشهر، وكان انخفاض في جراثيم *L. plantarum* المغلفة بطبقتين في وقت الصفر من (10.16) الى (9.68) $\log_{10}$ cfu\g خلال ثلاث أشهر مع عدم وجود فروق معنوية ($p<0.05$) لكلا النوعين خلال 3 اشهر.

الجدول رقم (16): تأثير التخزين على الاعداد الحية لجراثيم *L. acidophilus* و *L. plantarum*

(log_{10} cfu\ml,g)

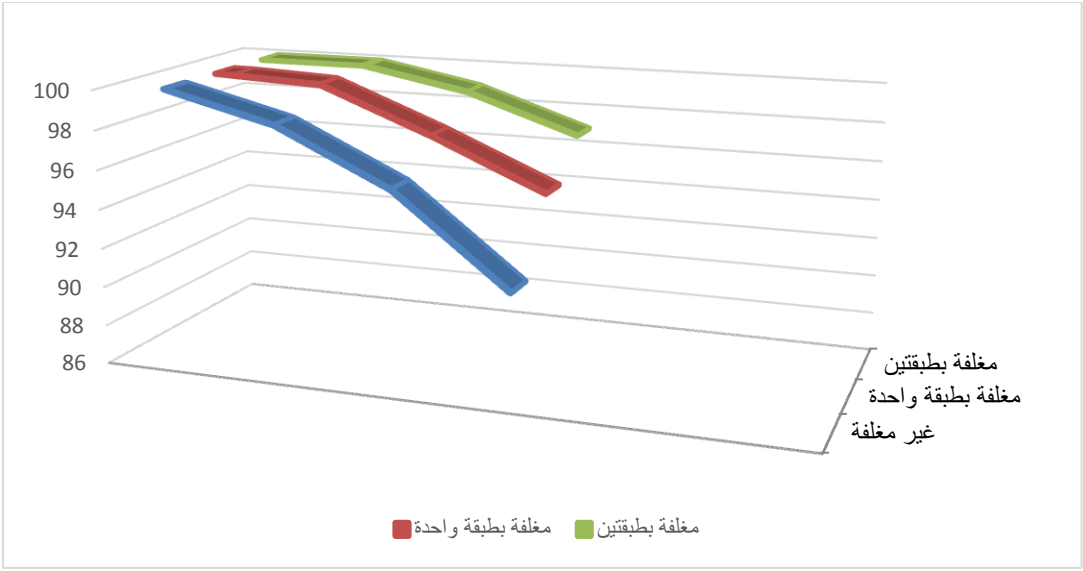
		اليوم 0	شهر	شهرين	ثلاثة أشهر
الغير مغلفة	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	$^{A}13.14 \pm 1.32^{a}$	$^{A}12.78 \pm 1.30^{a}$	$^{A}12.18 \pm 1.29^{a}$
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	$^{A}12.82 \pm 1.29^{a}$	$^{A}12.25 \pm 1.25^{a}$	$^{A}11.67 \pm 1.23^{a}$
التغليف بطبقة واحدة	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{b} \pm 1.41$	$^{A}11.64 \pm 1.71^{a}$	$^{A}11.38 \pm 1.21^{a}$	$^{A}11.09 \pm 1.14^{a}$
	L. plantarum	$^{A}10.56^{b} \pm 1.43$	$^{A}10.51 \pm 1.11^{a}$	$^{A}10.24 \pm 1.04^{a}$	$^{A}10.01 \pm 1.06^{a}$
التغليف بطبقتين	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{b} \pm 1.13$	$^{A}10.92 \pm 1.18^{a}$	$^{A}10.80 \pm 1.12^{a}$	$^{A}10.59 \pm 1.10^{a}$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{b} \pm 1.21$	$^{A}10.15 \pm 1.09^{a}$	$^{A}9.91 \pm 1.02^{a}$	$^{A}9.68 \pm 1.01^{a}$

تشير التشابه في الأحرف الصغيرة a إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

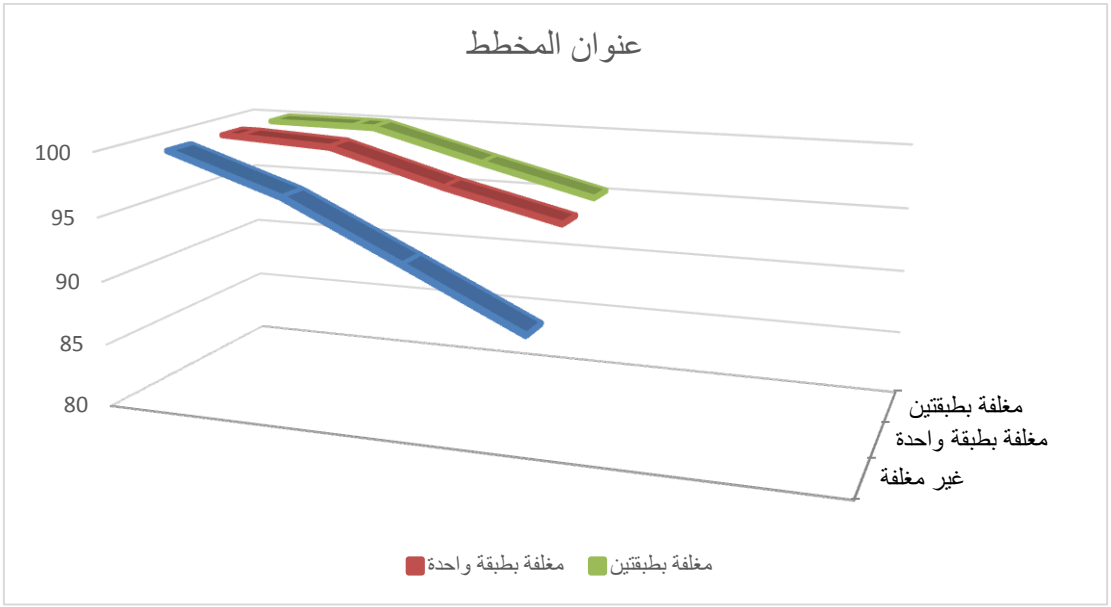
أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.

وتبين المخططات رقم (3) ورقم (4) النسب المئوية لانخفاض الاعداد الحية للمعززات الحيوية خلال مدة الخزن بدرجة حرارة 4 مْ لمدة ثلاثة أشهر سواء كانت الجراثيم دون تغليف أو المغلفة بطبقة واحدة أو طبقتين، حيث بلغت نسبة انخفاض الاعداد الحية للمعززات الحيوية الغير مغلفة لكل من جراثيم *L. acidophilus* و *L. plantarum* خلال 90 يوم (8.62%) (11.65%) على التوالي، وكانت النسبة المئوية لانخفاض الاعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة لكل من جراثيم *L. acidophilus* و *L. plantarum* خلال 90 يوم (4.97%) (5.20%) على التوالي، وقد بلغت النسبة المئوية لانخفاض الاعداد الحية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقتين لكل من *L. acidophilus* و *L. plantarum* خلال 90 يوم (3.02%) (4.72%) على التوالي.

وأظهرت النتائج أفضلية جراثيم *L. acidophilus* عن *L. plantarum* مع عدم وجود فروق معنوية.



مخطط رقم (3): النسب المئوية لانخفاض الاعداد الحية *L. acidophilus* خلال مدة الخزن بدرجة حرارة 4 مْ



مخطط رقم (4): النسب المئوية لانخفاض الاعداد الحية *L. plantarum* خلال مدة الخزن بدرجة حرارة 4 مْ

4-4-2. تأثير المعاملة الحرارية في عيوشية *Lactobacillus*:

4-4-2-1. تأثير المعاملة بالبسترة البطيئة في عيوشية *Lactobacillus*:

4-4-2-1-1. تأثير المعاملة بالبسترة البطيئة في عيوشية *Lactobacillus* دون تغليف:

أظهرت النتائج انخفاض معنوي في الأعداد الحية لكل من الجراثيم *L. Plantarum* , *L. acidophilas* في عينة الجراثيم دون تغليف عند معاملتهم بالبسترة البطيئة (بدرجة حرارة 63 مْ لمدة 30 دقيقة)، إذ انخفضت الأعداد الحية من (13.33) (13.21) ($\log_{10}$ cfu\ml) قبل المعاملة إلى (3.87) (3.32) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد المعاملة على التوالي، كما هو موضح في الجدول رقم (17)

الجدول رقم (17): تأثير البسترة البطيئة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دون تغليف

البسترة	جراثيم	الغير مغلفة	
		الوقت صفر	بعد 30 دقيقة
البسترة البطيئة	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	$^{A}3.87^{b} \pm 1.06$
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	$^{A}3.32^{b} \pm 1.09$

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.
أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.

4-4-2-1-2. تأثير المعاملة بالبسترة البطيئة في عيوشية *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة:

يبين الجدول رقم (18) انخفاض معنوي في الأعداد الحية لجراثيم *L. Plantarum* , *L. acidophilas* المغلفة بطبقة واحدة تحت تأثير المعاملة الحرارية بالبسترة البطيئة (درجة حرارة 63 مْ لمدة 30 دقيقة)، إذ انخفضت الأعداد الحية من (11.67) (10.56) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل المعاملة إلى (8.53) (7.12) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد المعاملة على التوالي.

الجدول رقم (18): تأثير البسترة البطيئة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة

البسترة	جراثيم	المغلفة بطبقة واحدة	
		الوقت صفر	بعد مرور 30 دقيقة
البسترة البطيئة	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{a} \pm 1.41$	$^{A}8.53^{b} \pm 1.58$
	L. plantarum	$^{A}10.56^{a} \pm 1.43$	$^{A}7.12^{b} \pm 1.71$

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.
أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.

4-4-2-1-3. تأثير المعاملة بالبسترة البطيئة في عيوشية *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين:

يبين الجدول رقم (19) انخفاض معنوي في الأعداد الحية لجراثيم *L. acidophilas , L. Plantarum* المغلفة بطبقتين تحت تأثير المعاملة الحرارية بالبسترة البطيئة (درجة حرارة 63 مْ لمدة 30 دقيقة)، إذ انخفضت الأعداد الحية من (10.92) (10.16) (log_{10} cfu\g) قبل المعاملة إلى (9.24) (8.13) (log_{10} cfu\g) بعد المعاملة على التوالي.

الجدول رقم (19): تأثير البسترة البطيئة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين

البسترة	جراثيم	المغلفة بطبقتين	
		الوقت صفر	بعد مرور 30 دقيقة
البسترة البطيئة	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{a} \pm 1.13$	$^{A}9.24^{b} \pm 1.12$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{a} \pm 1.21$	$^{A}8.13^{b} \pm 1.20$

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.
أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.

4-4-2-2. تأثير المعاملة بالبسترة السريعة في عيوشية *Lactobacillus*:

4-4-2-2-1. تأثير المعاملة بالبسترة السريعة في عيوشية *Lactobacillus* دون تغليف:

أظهرت النتائج انخفاض معنوي في الأعداد الحية لكل من الجراثيم *L. acidophilas , L. Plantarum* في عينة الجراثيم دون تغليف عند معاملتهم بالبسترة السريعة (بدرجة حرارة 72 مْ لمدة 15 ثانية)، إذ انخفضت الأعداد الحية من (13.33) (13.21) (log_{10} cfu\ml) قبل المعاملة إلى (3.97) (3.43) (log_{10} cfu\ml) بعد المعاملة على التوالي، كما هو موضح في الجدول رقم (20)

الجدول رقم (20): تأثير البسترة السريعة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دون تغليف

البسترة	جراثيم	الغير مغلفة	
		الوقت صفر	بعد 15 ثانية
البسترة السريعة	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	$^{A}3.97^{b} \pm 1.07$
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	$^{A}3.43^{b} \pm 1.01$

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.
أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.

4-5-2-2-2. تأثير المعاملة بالبسترة السريعة في عيوشية *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة:

يبين الجدول رقم (21) انخفاض معنوي في الأعداد الحية لجراثيم *L. acidophilas , L. Plantarum* المغلفة بطبقة واحدة تحت تأثير المعاملة الحرارية بالبسترة السريعة (درجة حرارة 72 مْ لمدة 15 ثانية)، إذ انخفضت الأعداد الحية من (11.67) (10.56) (log_{10} cfu\g) قبل المعاملة إلى (8.61) (7.08) (log_{10} cfu\g) بعد المعاملة على التوالي .

الجدول رقم (21): تأثير البسترة السريعة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة

البسترة	جراثيم	المغلفة بطبقة واحدة	
		الوقت صفر	بعد 15 ثانية
البسترة السريعة	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{a} \pm 1.41$	$^{A}8.61^{b} \pm 1.36$
	L. plantarum	$^{A}10.56^{a} \pm 1.43$	$^{A}7.08^{b} \pm 1.41$

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.
أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.

4-4-2-2-3. تأثير المعاملة بالبسترة السريعة في عيوشية *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين:

يبين الجدول رقم (22) انخفاض معنوي في الأعداد الحية لجراثيم *L. acidophilas , L. Plantarum* المغلفة بطبقتين تحت تأثير المعاملة الحرارية بالبسترة السريعة (درجة حرارة 72 مْ لمدة 15 ثانية)، إذ انخفضت الأعداد الحية من (10.92) (10.16) (log_{10} cfu\g) قبل المعاملة إلى (8.95) (8.02) (log_{10} cfu\g) بعد المعاملة على التوالي.

الجدول رقم (22): تأثير البسترة السريعة في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين

البسترة	جراثيم	المغلفة بطبقتين	
		الوقت صفر	بعد 15 ثانية
البسترة السريعة	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{a} \pm 1.13$	$^{A}8.95^{b} \pm 1.18$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{a} \pm 1.21$	$^{A}8.02^{b} \pm 1.22$

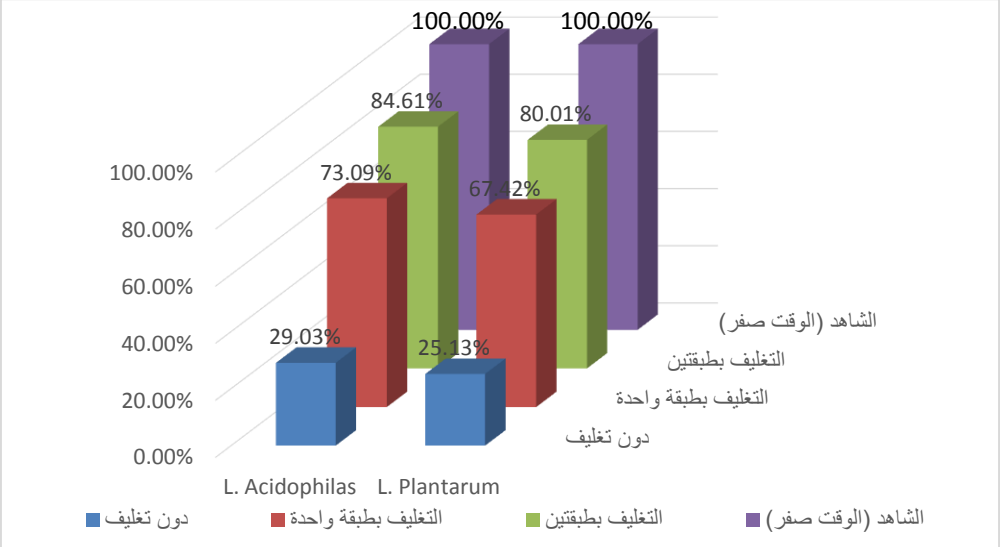
تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b، c إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.
أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.

4-4-2-3. تأثير المعاملة الحرارية في النسب المئوية للأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus*:

يوضح المخطط رقم (5) النسب المئوية المتبقية للأعداد الحية المنخفضة للجراثيم المدروسة عند المعاملة بالبسترة البطيئة، حيث كان النسب المئوية المتبقية الأعداد الحية للجراثيم من دون تغليف لكل من الجراثيم , *L. acidophilas* ، *L. Plantarum* (29.03%) و(25.13%) بعد المعاملة بالبسترة البطيئة على التوالي .

وكانت النسب المئوية المتبقية للأعداد الحية المنخفضة للجراثيم المغلفة بطبقة واحدة *L. acidophilas* , *L. Plantarum* ، (73.09%) و(67.42%) بعد المعاملة بالبسترة البطيئة على التوالي.

بينما بلغت النسب المئوية المتبقية للأعداد الحية المنخفضة للجراثيم المغلفة بطبقتين *L. acidophilas* , *L. Plantarum* ، (84.61%) و(80.01%) بعد المعاملة بالبسترة البطيئة على التوالي.

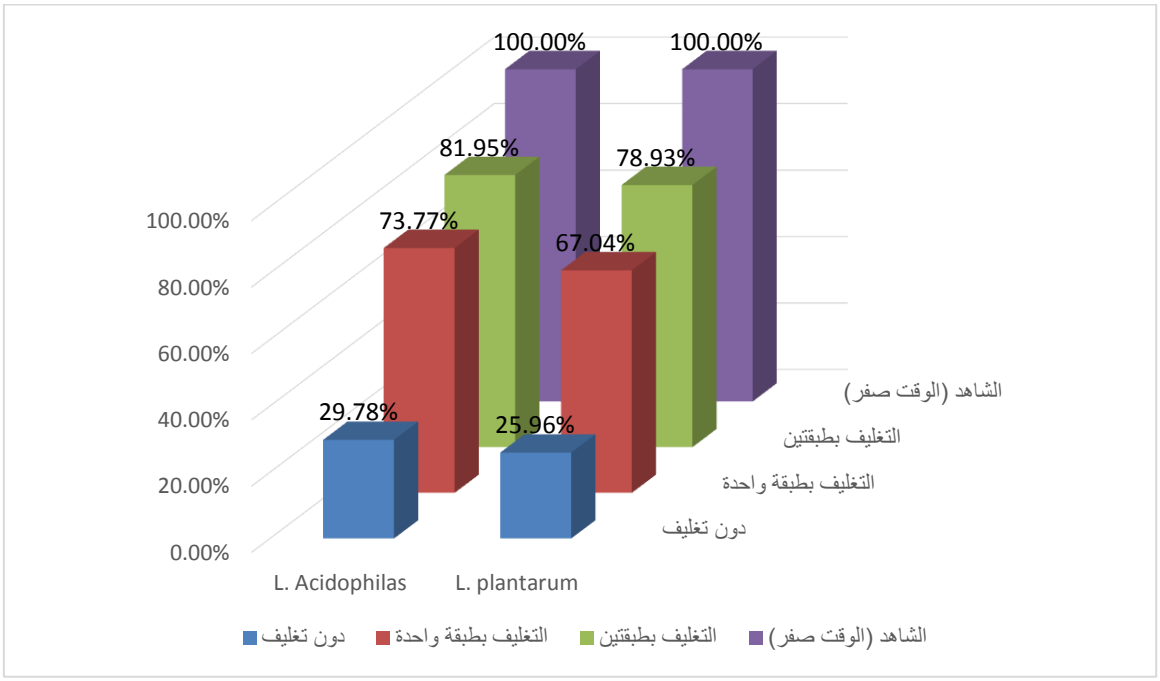


المخطط رقم (5): النسب المئوية لانخفاض الأعداد الحية بعد المعاملة بالبسترة البطيئة.

يوضح المخطط رقم (6) النسب المئوية المتبقية للأعداد الحية المنخفضة للجراثيم المدروسة عند المعاملة بالبسترة السريعة، حيث كان النسب المئوية لانخفاض الأعداد الحية للجراثيم من دون تغليف لكل من الجراثيم *L. acidophilas* و *L. Plantarum* ، (29.78%) و(25.96%) بعد المعاملة بالبسترة السريعة على التوالي .

وكانت النسب المئوية المتبقية للأعداد الحية المنخفضة للجراثيم المغلفة بطبقة واحدة *L. acidophilas* و *L. Plantarum*، (73.77%) و(67.04%) بعد المعاملة بالبسترة السريعة على التوالي.

بينما بلغت النسب المئوية المتبقية للأعداد الحية المنخفضة للجراثيم المغلفة بطبقتين *L. acidophilas* و *L. Plantarum* ، (81.95%) و(78.93%) بعد المعاملة بالبسترة السريعة على التوالي.



المخطط رقم (6): النسب المئوية لانخفاض الأعداد الحية بعد المعاملة بالبسترة السريعة.

4-4-3 مقاومة *Lactobacillus* للحموضة المتطرفة:

4-4-3-1 مقاومة *Lactobacillus* دون التغليف للحموضة :

4-4-3-1-1 مقاومة الحموضة عند PH 3

يبين الجدول رقم (23) والمخطط (7) انخفاضاً ملحوظاً معنوياً في الأعداد والنسب المئوية الحية لجراثيم *Lactobacillus* عند PH 3 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على حدا، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) في الجراثيم الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.33)($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (8.83) و (8.51) و(8.18) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) في معاملة الشاهد في الوقت صفر من (13.21) ($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (8.52) و (8.02) و(7.66) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-3-1-2 مقاومة الحموضة عند PH 2

يبين الجدول رقم (23) والمخطط رقم (7) انخفاضاً ملحوظاً معنوياً في الأعداد والنسب المئوية الحية لجراثيم *Lactobacillus* عند PH 2 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على حدا، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.33)($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (5.59) و (4.17) و(3.69) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.21) ($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (4.28) و (3.06) و(2.25) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-3-1-3 مقاومة الحموضة عند PH 1

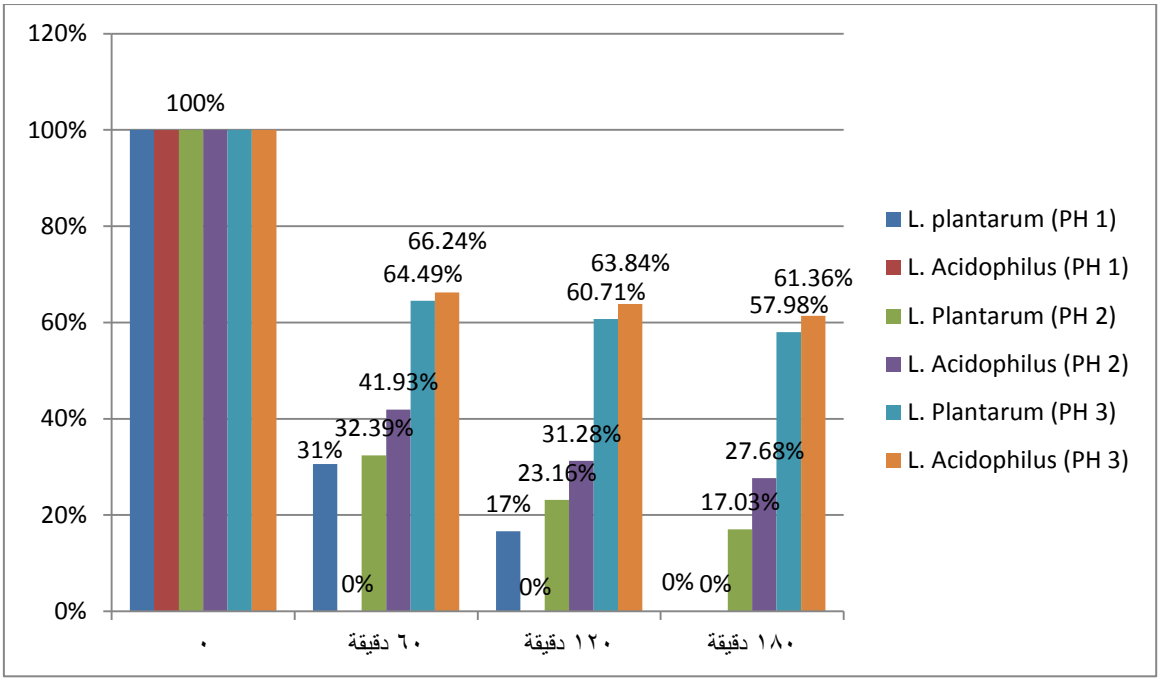
يبين الجدول رقم (23) أن لجراثيم *Lactobacillus* الغير مغلفة لم تقاوم درجة PH 1 بعد مرور 60 دقيقة كلا على حدا لكل من جراثيم *L. acidophilus* و *L. plantarum*.

الجدول رقم (23): تأثير درجات مختلفة من الحموضة على الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دون التغليف $\log_{10}$ cfu\ml.

درجة الحموضة	جراثيم	الوقت صفر	بعد 60 دقيقة	بعد 120 دقيقة	بعد 180 دقيقة
من دون تغليف					
PH=3	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	$^{A}8.83^{b} \pm 1.47$	$^{A}8.51^{b} \pm 1.69$	$^{A}8.18^{b} \pm 1.17$
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	$^{A}8.52^{b} \pm 1.71$	$^{A}8.02^{b} \pm 1.82$	$^{A}7.66^{b} \pm 1.4$
PH=2	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	$^{B}5.59^{b} \pm 1.55$	$^{B}4.17^{c} \pm 1.32$	$^{B}3.69^{c} \pm 1.01$
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	$^{C}4.28^{b} \pm 1.60$	$^{B}3.06^{c} \pm 1.29$	$^{C}2.25^{c} \pm 1.01$
PH=1	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	0	0	0
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	0	0	0

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b، c إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

أما الاختلافات في الأحرف الكبيرة A، B، C فتشير إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.



مخطط رقم (7): النسب المئوية للأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* دون تغليف بعد المعاملة بدرجات حموضة مختلفة

4-4-3-2 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقة واحدة للحموضة:

4-4-3-2-1 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقة واحدة للحموضة PH3:

يبين الجدول رقم (24) والمخطط رقم (8) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة عند PH 3 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (11.67)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (9.99) و (9.62) و(9.27) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (10.56) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (9.07) و (8.85) و(8.34) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-3-2-2 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقة واحدة للحموضة PH2:

يبين الجدول رقم (24) والمخطط رقم (8) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة عند PH 2 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (11.67)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (8.83) و (8.11) و(7.54) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (10.56) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (6.88) و (6.96) و(6.23) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-3-2-3 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقة واحدة للحموضة PH1:

يبين الجدول رقم (24) والمخطط رقم (8) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة عند PH 1 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (11.67)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (4.28) و (2.62) و(1.53) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (10.56) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (3.23) و (1.76) و(0) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

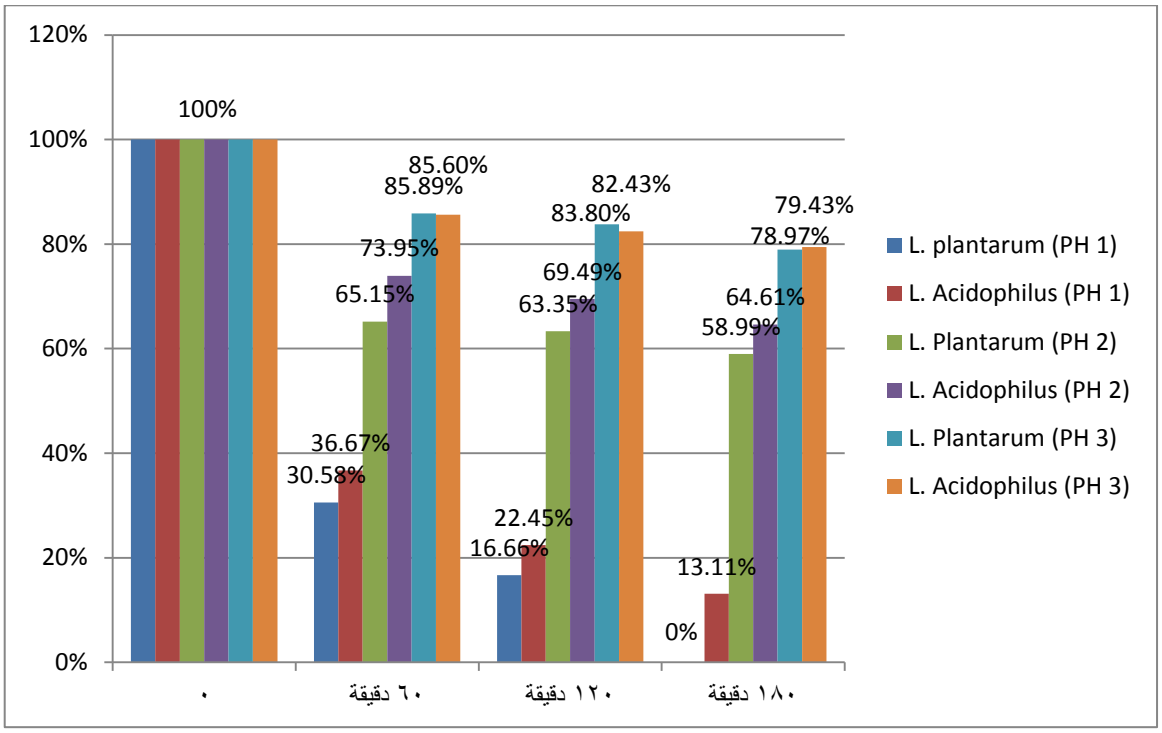
الجدول رقم (24): تأثير درجات مختلفة من الحموضة على الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة $\log_{10}$ cfu\g.

درجة الحموضة	جراثيم	الوقت صفر	بعد 60 دقيقة	بعد 120 دقيقة	بعد 180 دقيقة
PH=3	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{a} \pm 1.41$	$^{A}9.99^{b} \pm 1.27$	$^{A}9.62^{b} \pm 1.51$	$^{A}9.27^{b} \pm 1.32$
	L. plantarum	$^{A}10.56^{a} \pm 1.43$	$^{A}9.07^{b} \pm 1.41$	$^{A}8.85^{b} \pm 1.35$	$^{A}8.34^{b} \pm 1.42$
PH=2	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{a} \pm 1.41$	$^{A}8.63^{b} \pm 1.18$	$^{A}8.11^{b} \pm 1.21$	$^{A}7.54^{b} \pm 1.31$
	L. plantarum	$^{A}10.56^{a} \pm 1.43$	$^{B}6.88^{b} \pm 1.30$	$^{B}6.69^{b} \pm 1.33$	$^{A}6.23^{b} \pm 1.35$
PH=1	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{a} \pm 1.41$	$^{C}4.28^{b} \pm 1.09$	$^{C}2.62^{c} \pm 1.02$	$^{A}1.53^{c} \pm 1.03$
	L. plantarum	$^{A}10.56^{a} \pm 1.43$	$^{C}3.23^{b} \pm 1.02$	$^{C}1.76^{c} \pm 1.06$	0

المغلفة بطبقة واحدة

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b، c إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

أما الاختلافات في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.



مخطط رقم (8): النسب المئوية للأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة بعد المعاملة بدرجات حموضة مختلفة

4-4-3-3 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقتين للحموضة:

4-4-3-3-1 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقتين للحموضة PH3:

يبين الجدول رقم (25) والمخطط رقم (9) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين عند PH 3 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مع عدم وجود فروق معنوية مقارنةً بالوقت صفر لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.92)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (10.49) و (10.26) و(10.15) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.16) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (9.52) و (9.23) و(9.08) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-3-3-2 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقتين للحموضة PH2:

يبين الجدول رقم (25) والمخطط (9) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين عند PH 2 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مع وجود فروق معنوية مقارنةً بالوقت صفر لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.92)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (8.23) و (7.99) و(7.73) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.16) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (7.53) و (7.19) و(6.88) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-3-3-3 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقتين للحموضة PH1:

يبين الجدول رقم (25) والمخطط (9) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين عند PH 1 بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مع وجود فروق معنوية مقارنةً بالوقت صفر لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.92)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (6.29) و (5.86) و(5.64) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.16) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (4.75) و (3.99) و(3.41) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

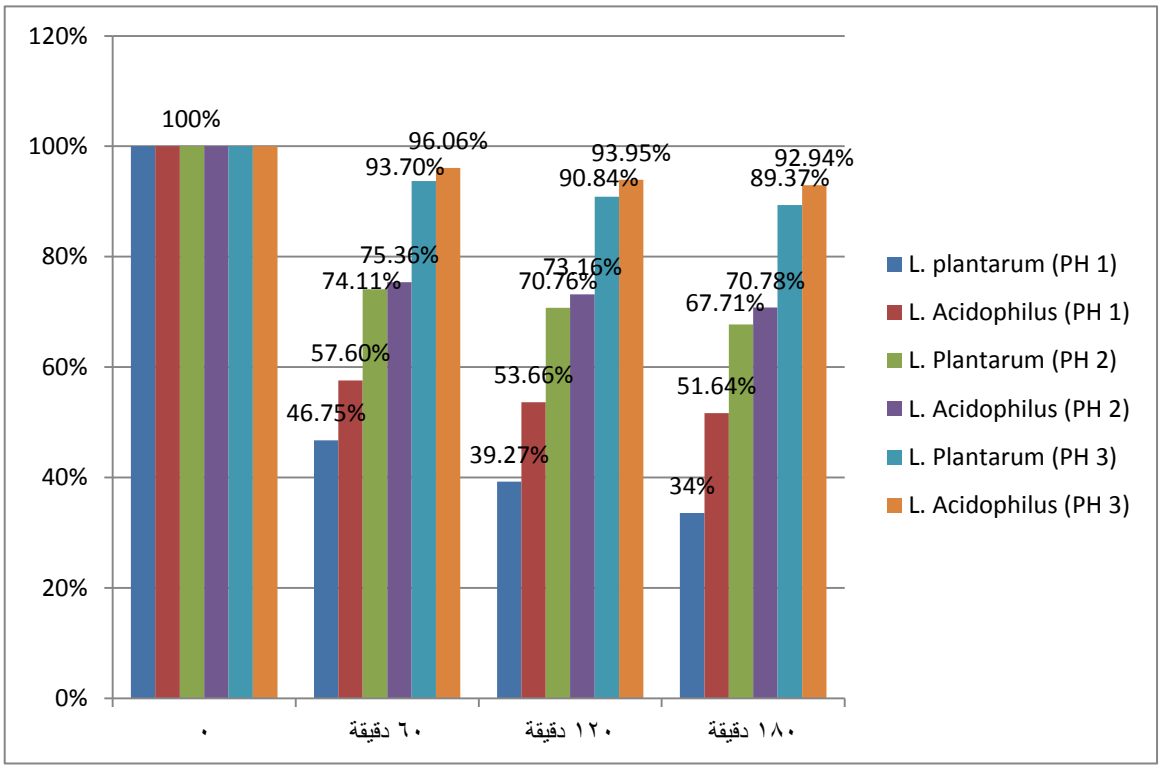
الجدول رقم (25): تأثير درجات مختلفة من الحموضة على الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين $\log_{10}$ cfu\g.

درجة الحموضة	جراثيم	الوقت صفر	بعد 60 دقيقة	بعد 120 دقيقة	بعد 180 دقيقة
PH=3	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{a} \pm 1.13$	$^{A}10.49^{a} \pm 1.22$	$^{A}10.26^{a} \pm 1.13$	$^{A}10.15^{a} \pm 1.41$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{a} \pm 1.21$	$^{A}9.52^{a} \pm 1.25$	$^{A}9.23^{a} \pm 1.16$	$^{A}9.08^{a} \pm 1.51$
PH=2	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{a} \pm 1.13$	$^{B}8.23^{b} \pm 1.32$	$^{B}7.99^{b} \pm 1.46$	$^{B}7.73^{b} \pm 1.34$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{a} \pm 1.21$	$^{B}7.53^{b} \pm 1.52$	$^{B}7.19^{b} \pm 1.64$	$^{B}6.88^{b} \pm 1.37$
PH=1	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{a} \pm 1.13$	$^{C}6.29^{b} \pm 1.48$	$^{C}5.86^{b} \pm 1.09$	$^{C}5.64^{b} \pm 1.06$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{a} \pm 1.21$	$^{D}4.75^{b} \pm 1.02$	$^{D}3.99^{b} \pm 1.03$	$^{D}3.41^{b} \pm 1.02$

المغلفة بطبقتين

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

أما الاختلافات في الأحرف الكبيرة A، B، C، D فتشير إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.



مخطط رقم (9): النسب المئوية للأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين بعد المعاملة بدرجات حموضة مختلفة

أظهرت النتائج أن جراثيم (*L. acidophilus*) كانت اكثر مقاومة للظروف الحمضية المتطرفة سواء كانت الشاهد أو المغلفة بطبقة واحدة أو المغلفة بطبقتين عند درجة حموضة 3 , 2 , 1 PH ولمدة 60 و 120 و 180 دقيقة وقد يعود ذلك الى الفروقات الفردية بين السلالات.

4-4-4 مقاومة *Lactobacillus* لأملاح الصفراء:

4-4-4-1 مقاومة *Lactobacillus* دون التغليف لأملاح الصفراء:

4-4-4-1-1 مقاومة أملاح الصفراء بتركيز 1%

يبين الجدول رقم (26) والمخطط رقم (10) انخفاضاً ملحوظاً في الأعداد والنسب المئوية الحية لجراثيم *Lactobacillus* عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 1% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على حدا مع وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.33)($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (10.98) و (10.27) و(9.81) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.21) ($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (10.88) و (10.11) و(9.56) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-4-1-2 مقاومة أملاح الصفراء بتركيز 2%

يبين الجدول رقم (26) والمخطط (10) انخفاضاً ملحوظاً في الأعداد والنسب المئوية الحية لجراثيم *Lactobacillus* عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 2% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على حدا مع وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.33)($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (8.42) و (7.84) و(7.36) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.21) ($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (8.36) و (7.71) و(7.02) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-4-1-3 مقاومة أملاح الصفراء بتركيز 3%

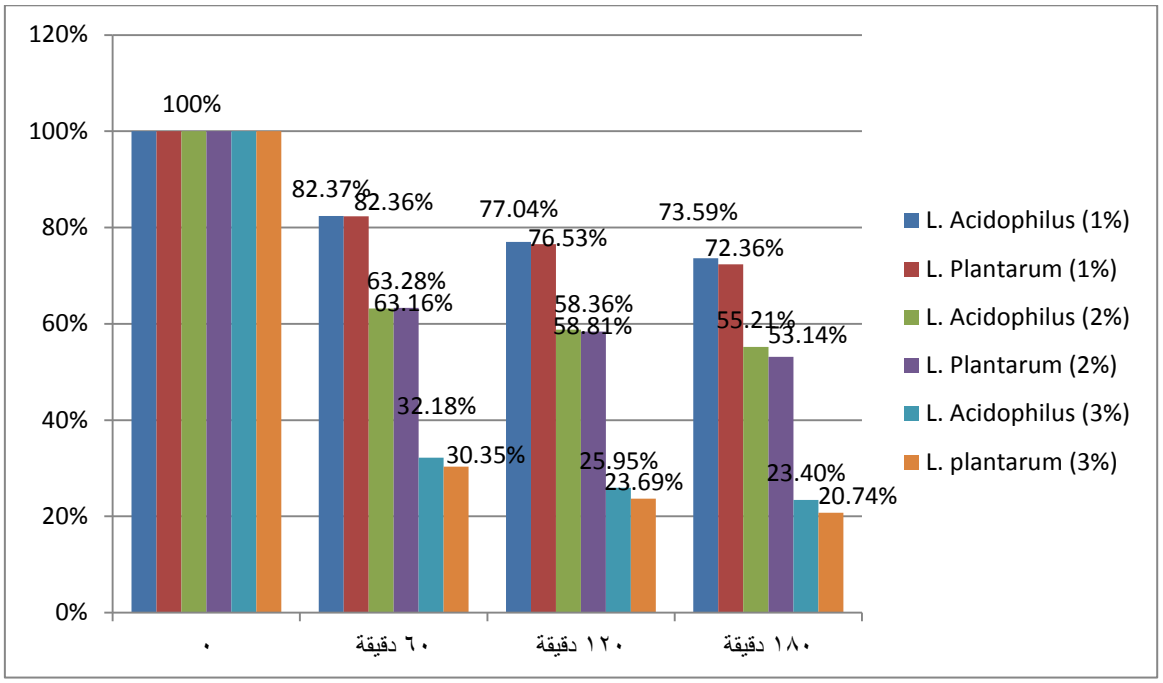
يبين الجدول رقم (26) والمخطط (10) انخفاضاً ملحوظاً في الأعداد والنسب المئوية الحية لجراثيم *Lactobacillus* عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 3% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة كلاً على حدا مع وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.33)($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (4.29) و (3.46) و(3.13) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) الغير مغلفة في الوقت صفر من (13.21) ($\log_{10}$ cfu\ml) قبل التجربة الى (4.01) و (3.13) و(2.74) ($\log_{10}$ cfu\ml) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

الجدول رقم (26): تأثير تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء على الاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف $\log_{10}$ cfu\ml.

تركيز أملاح الصفراء	جراثيم	الوقت صفر	بعد 60 دقيقة	بعد 120 دقيقة	بعد 180 دقيقة
من دون تغليف					
1%	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	$^{A}10.98^{b} \pm 1.47$	$^{A}10.27^{b} \pm 1.36$	$^{A}9.81^{b} \pm 1.82$
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	$^{A}10.88^{b} \pm 1.53$	$^{A}10.11^{b} \pm 1.35$	$^{A}9.56^{b} \pm 1.84$
2%	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	$^{B}8.42^{b} \pm 1.66$	$^{B}7.84^{b} \pm 1.47$	$^{B}7.36^{b} \pm 1.85$
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	$^{B}8.36^{b} \pm 1.64$	$^{B}7.71^{b} \pm 1.62$	$^{B}7.02^{b} \pm 1.91$
3%	*L. acidophilus*	$^{A}13.33^{a} \pm 1.38$	$^{C}4.29^{b} \pm 1.05$	$^{C}3.46^{b} \pm 1.06$	$^{C}3.13^{b} \pm 1.08$
	L. plantarum	$^{A}13.21^{a} \pm 1.41$	$^{C}4.01^{b} \pm 1.04$	$^{C}3.13^{b} \pm 1.01$	$^{C}2.74^{b} \pm 1.02$

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

أما الاختلافات في الأحرف الكبيرة A، B، C فتشير إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.



مخطط رقم (10): النسب المئوية للأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف بعد المعاملة بأملاح الصفراء

4-4-4-2 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقة واحدة لأملاح الصفراء:

4-4-4-2-1 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقة واحدة لأملاح الصفراء بتركيز 1%:

يبين الجدول رقم (27) والمخطط رقم (11) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 1% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر مع عدم وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (11.67)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (11.15) و (10.81) و(10.28) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (10.56) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (10.19) و (9.96) و(9.49) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-4-2-2 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقة واحدة لأملاح الصفراء بتركيز 2%:

يبين الجدول رقم (27) والمخطط رقم (11) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 2% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر مع وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (11.67)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (9.91) و (9.37) و(8.58) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (10.56) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (9.07) و (8.69) و(8.23) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-4-2-3 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقة واحدة لأملاح الصفراء بتركيز 3%:

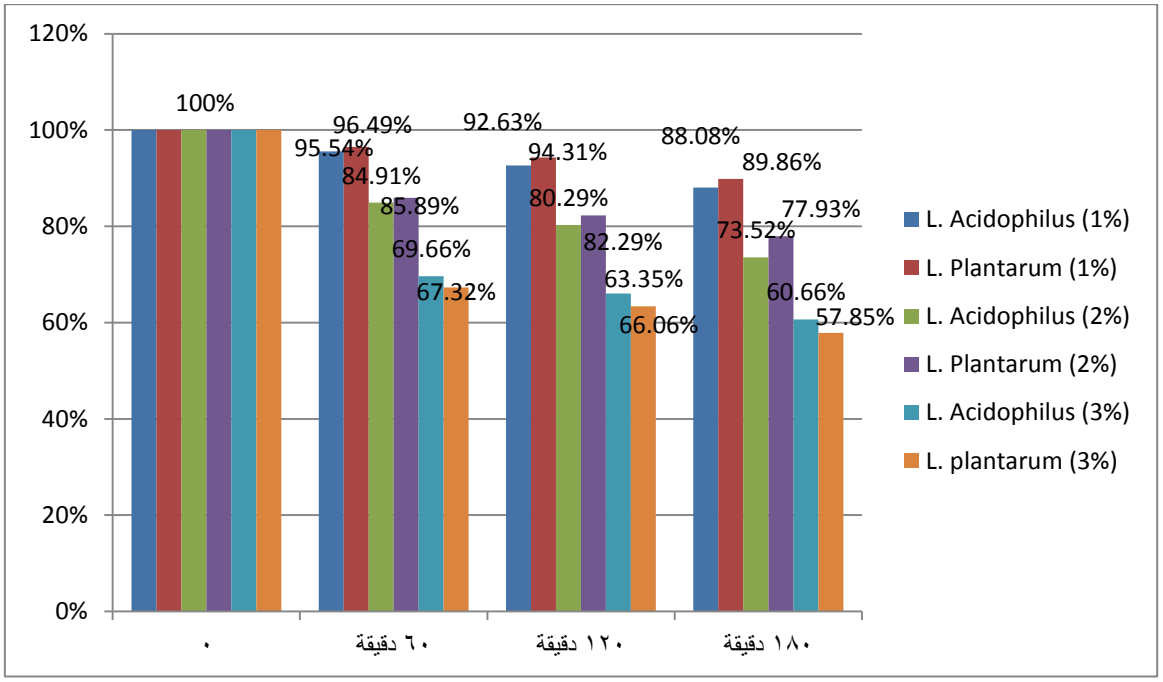
يبين الجدول رقم (27) والمخطط رقم (11) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 3% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر مع وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (11.67)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (8.13) و (7.71) و(7.08) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقة واحدة في الوقت صفر من (10.56) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (7.11) و (6.69) و(6.11) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

الجدول رقم (27): تأثير تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء على الاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة $\log_{10}$ cfu\g.

	تركيز أملاح الصفراء	جراثيم	الوقت صفر	بعد 60 دقيقة	بعد 120 دقيقة	بعد 180 دقيقة
المغلفة بطبقة واحدة	1%	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{a} \pm 1.41$	$^{A}11.15^{a} \pm 1.15$	$^{A}10.81^{a} \pm 0.62$	$^{A}10.28^{a} \pm 1.16$
		L. plantarum	$^{A}10.56^{a} \pm 1.43$	$^{A}10.19^{a} \pm 1.13$	$^{A}9.96^{a} \pm 0.83$	$^{A}9.49^{a} \pm 1.34$
	2%	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{a} \pm 1.41$	$^{A}9.91^{b} \pm 1.29$	$^{A}9.37^{b} \pm 1.27$	$^{A}8.58^{b} \pm 1.29$
		L. plantarum	$^{A}10.56^{a} \pm 1.43$	$^{A}9.07^{b} \pm 1.30$	$^{A}8.69^{b} \pm 1.52$	$^{A}8.23^{b} \pm 1.21$
	3%	*L. acidophilus*	$^{A}11.67^{a} \pm 1.41$	$^{A}8.13^{b} \pm 1.35$	$^{A}7.71^{b} \pm 1.18$	$^{A}7.08^{b} \pm 1.58$
		L. plantarum	$^{A}10.56^{a} \pm 1.43$	$^{A}7.11^{b} \pm 1.53$	$^{A}6.69^{b} \pm 1.22$	$^{A}6.11^{b} \pm 1.42$

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.



مخطط رقم (11): النسب المئوية للأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة بعد المعاملة بأملاح الصفراء

4-4-4-3 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقتين لأملاح الصفراء:

4-4-4-3-1 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقتين لأملاح الصفراء بتركيز 1%:

يبين الجدول رقم (28) والمخطط رقم (12) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 1% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر مع عدم وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.92)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (10.92) و (10.67) و(10.54) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.16) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (10.16) و (10.01) و(9.92) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-4-3-2 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقتين لأملاح الصفراء بتركيز 2%:

يبين الجدول رقم (28) والمخطط رقم (12) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 2% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر مع عدم وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.92)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (10.58) و (10.21) و(9.83) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.16) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (9.95) و (9.75) و(9.54) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

4-4-4-3-3 مقاومة *Lactobacillus* بعد التغليف بطبقتين لأملاح الصفراء بتركيز 3%:

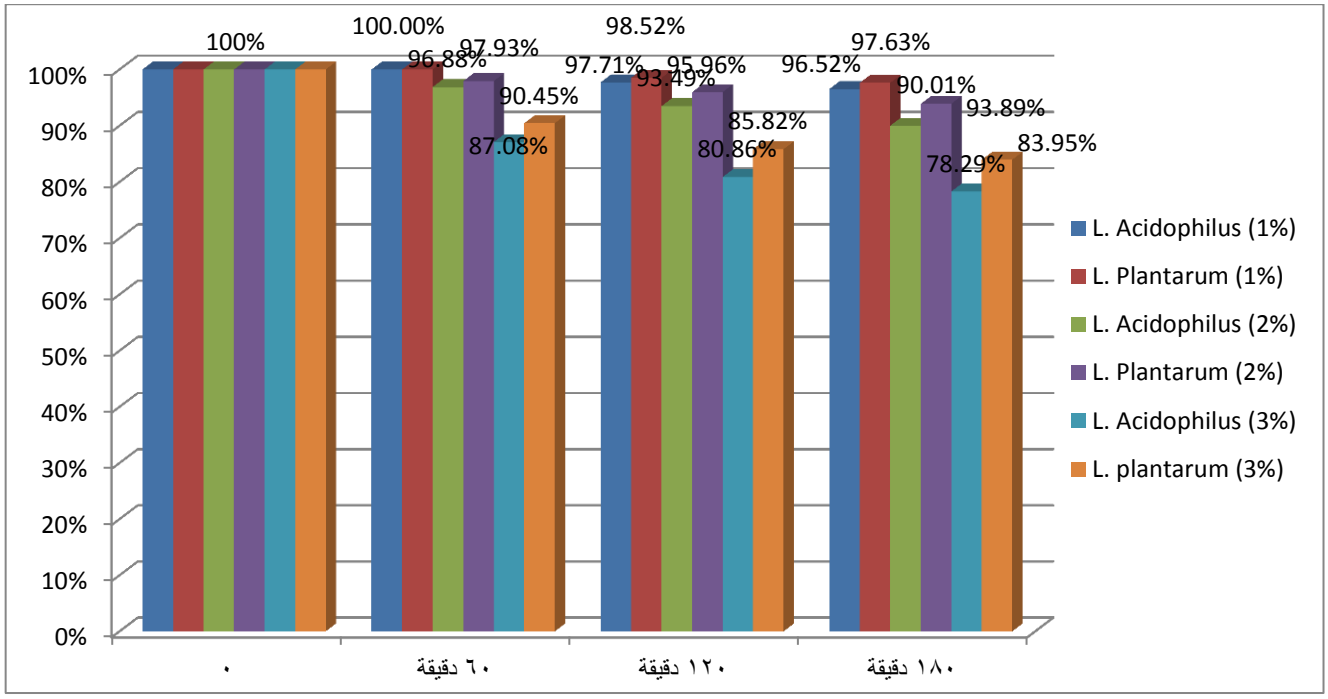
يبين الجدول رقم (28) والمخطط رقم (12) الأعداد الحية والنسب المئوية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين عند التعرض لأملاح الصفراء بتركيز 3% بعد مرور 60 و 120 و 180 دقيقة مقارنةً بالوقت صفر مع وجود فروق معنوية لكلا النوعين، اذ انخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. acidophilus*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.92)($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (9.51) و (8.83) و(8.55) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي. وانخفضت الأعداد الحية لجراثيم (*L. plantarum*) المغلفة بطبقتين في الوقت صفر من (10.16) ($\log_{10}$ cfu\g) قبل التجربة الى (9.19) و (8.72) و(8.53) ($\log_{10}$ cfu\g) بعد 60 و 120 و 180 دقيقة من المعاملة على التوالي.

الجدول رقم (28): تأثير تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء على الاعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين $\log_{10}$ cfu\g.

تركيز أملاح الصفراء	جراثيم	الوقت صفر	بعد 60 دقيقة	بعد 120 دقيقة	بعد 180 دقيقة
المغلفة بطبقتين					
1%	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{a} \pm 1.13$	$^{A}10.92^{a} \pm 1.10$	$^{A}10.67^{a} \pm 1.49$	$^{A}10.54^{a} \pm 1.55$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{a} \pm 1.21$	$^{A}10.16^{a} \pm 1.11$	$^{A}10.01^{a} \pm 1.50$	$^{A}9.92^{a} \pm 1.47$
2%	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{a} \pm 1.13$	$^{A}10.58^{a} \pm 1.57$	$^{A}10.21^{a} \pm 1.68$	$^{A}9.83^{a} \pm 1.52$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{a} \pm 1.21$	$^{A}9.95^{a} \pm 1.52$	$^{A}9.75^{a} \pm 1.72$	$^{A}9.54^{a} \pm 1.44$
3%	*L. acidophilus*	$^{A}10.92^{a} \pm 1.13$	$^{A}9.51^{b} \pm 1.78$	$^{A}8.83^{b} \pm 1.10$	$^{A}8.55^{b} \pm 1.88$
	L. plantarum	$^{A}10.16^{a} \pm 1.21$	$^{A}9.19^{b} \pm 1.91$	$^{A}8.72^{b} \pm 1.11$	$^{A}8.53^{b} \pm 1.90$

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a، b إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

أما التشابه في الأحرف الكبيرة A فتشير إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل العمود الواحد.



مخطط رقم (12): النسب المئوية للأعداد الحية لجراثيم Lactobacillus المغلفة بطبقتين بعد المعاملة بأملاح الصفراء

تشير النتائج أن جراثيم (*L. plantarum*) كان لها أفضلية في مقاومة أملاح الصفراء من جراثيم (*L. acidophilus*) سواء كانت في الغير مغلفة أو مغلفة بطبقة واحدة أو بطبقتين عند مواجهة أملاح الصفراء عند تركيز 1 و 2 و 3 % ولمدة 60 و 120 و 180 دقيقة على التوالي.

4-5. تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات السليمة.

4-5-1.الحالة العامة:

يبين الجدول رقم (29) الحالة العامة لصحة الطيور في مجموعات التجربة للقطيع الأول (صفحة رقم 68) خلال مرحلة التربية لمدة 42 يوم، حيث أظهرت النتائج عن الحالة الطبيعية للمجموعات الخمسة من حيث الشكل العام، النشاط ،الحركة ،الانتشار، الاقبال على الماء والعلف.

الجدول رقم (29): الحالة الصحية العامة لمجموعات التجربة السليمة خلال فترة التربية 42 يوم.

	المجموعة A	المجموعة B	المجموعة C	المجموعة D	المجموعة E	المجموعة F
الحالة العامة	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي
الاقبال على الطعام والشراب	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي

4-5-2. متوسط الوزن الاسبوعي:

يبين الجدول رقم (30) الوزن الاسبوعي لمجموعات التجربة خلال 42 يوم. إذ أظهرت النتائج تفوق معنوي لمجموعات التجربة التي اعطيت البروبيوتيك بأشكاله الثلاث (الحر والمغلف بطبقة واحدة والمغلف بطبقتين) (C, E, F) وبين باقي مجموعات التربية في نهاية التجربة، إذ نلاحظ أن الفروق بين المجموعات بدأت تظهر من الاسبوع الرابع. مع تفوق مجموعة D على كل المجموعات B ثم A مع عدم وجود فروق معنوية بينها.

الجدول رقم (30): متوسط الوزن الاسبوعي لطيور التجربة السليمة

المدة الزمنية بالإسبوع	المجموعة A	المجموعة B	المجموعة C	المجموعة D	المجموعة E	المجموعة F
الاول	^{a}210±21.4	^{a}211±19.1	^{a}212±12.4	^{a}210±18.7	^{a}214±15.9	^{a}217±14.7
الثاني	^{a}529±41.2	^{a}536±35.3	^{a}534±24.1	^{a}539±40	^{a}544±35.2	^{a}553±28.6
الثالث	^{a}1010±88.4	^{a}1035±75.2	^{a}1030±48.3	^{a}1015±88.6	^{a}1040±84.7	^{a}1065±85.3
الرابع	^{b}1610±172.5	^{a}1640±135.6	^{a}1640±98.2	^{b}1615±186.2	^{a}1670±176.8	^{a}1700±178.2
الخامس	^{c}2290±241.7	^{b}2330±239.2	^{b}2340±210.8	^{c}2295±240.6	^{a}2380±225	^{a}2420±228.3
السادس	^{d}2991±354.5	^{d}3050±346.8	^{c}3100±240.9	^{d}3000±358.2	^{b}3200±263.3	^{a}3300±271.6

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a, b, c, d إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

4-5-3. متوسط استهلاك العلف الاسبوعي

يبين الجدول رقم (31) متوسط الاستهلاك اليومي للعلف (غ / طير) لمجموعات التجربة، حيث أسفرت النتائج عن عدم وجود فروق معنوية من اليوم الاول وحتى اليوم 42 لكل مجموعات التجربة (A, B, C, D, E, F) مع ارتفاع بسيط غير معنوي لمجموعة (C, E, F) في كمية العلف الاجمالي عن مجموعة (A, B, D).

الجدول رقم (31): متوسط الاستهلاك اليومي للعلف للطيور السليمة (غ)

المدة الزمنية بالإسبوع	المجموعة A	المجموعة B	المجموعة C	المجموعة D	المجموعة E	المجموعة F
الاول	^{a}165.125	^{a}165.751	^{a}165.752	^{a}164.807	^{a}167.7	^{a}168.356
الثاني	^{a}531.795	^{a}535.506	^{a}530.576	^{a}535 .48	^{a}533.819	^{a}539.633
الثالث	^{a}1150.606	^{a}1156.304	^{a}1130.453	^{a}1130.888	^{a}1139.296	^{a}1139.253
الرابع	^{a}2049.53	^{a}2050.557	^{a}2033.548	^{a}2009.862	^{a}2060.435	^{a}2040.735
الخامس	^{a}3208.792	^{a}3299.722	^{a}3219.893	^{a}3189.1	^{a}3231.476	^{a}3229.653
السادس	^{a}4580.208	^{a}4699.989	^{a}4616.875	^{a}4570.794	^{a}4630.701	^{a}4672.293

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a, b, c, d, e إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد

4-5-4. معامل التحويل العلفي

يبين الجدول رقم (32) نسبة التحويل العلفي اليومي عند مجموعات التجربة، حيث نلاحظ وجود فروق معنوية بين المجموعات التي اعطيت بروبيوتيك (C, E, F) عن باقي مجموعات التجربة حيث كانت أفضل نتيجة هي مجموعة F وتليها E ثم C على التوالي، ثم تليها باقي المجموعات D, B, A على التوالي.

الجدول رقم (32): نسبة التحوية العلفي اليومي للطيور السليمة

المدة الزمنية بالإسبوع	المجموعة A	المجموعة B	المجموعة C	المجموعة D	المجموعة E	المجموعة F
الاول	0.785	0.785	0.781	0.784	0.783	0.775
الثاني	1.003	0.999	0.986	0.993	0.981	0.975
الثالث	1.137	1.117	1.095	1.113	1.090	1.069
الرابع	1.172	1.250	1.239	1.244	1.233	1.200
الخامس	1.1400	1.416	1.376	1.389	1.357	1.334
السادس	1.531	1.540	1.489	1.523	1.447	1.415

4-5-5. نسبة النفوق

يبين الجدول رقم (33) نسبة النفوق في مجموعات التجربة حيث تراوحت بين 2.77% و 8.33%، وكانت أعلى نسبة نفوق في المجموعة A 8.33% والتي اختلفت معنويًا ($p \leq 0.05$) عن باقي المجموعات، بينما تفوقت مجموعات التجربة C و E و F بنسبة 2.77% على باقي المجموعات ثم تليها مجموعة B و D بنسبة 5.55%.

الجدول رقم (33): نسبة النفوق للطيور السليمة

المدة الزمنية بالإسبوع	المجموعة A	المجموعة B	المجموعة C	المجموعة D	المجموعة E	المجموعة F
الاول	2	1	–	1	1	1
الثاني	–	–	1	–	–	–
الثالث	1	–		–	–	–
الرابع		–	–	–	–	–
الخامس	–	1	–	1	–	–
السادس	–	–	–	–	–	–
اجمالي النفوق	3	2	1	2	1	1
نسبة النفوق %	^{a}%8.33	^{b}%5.55	^{c}%2.77	^{c}%5.55	^{d}%2.77	%2.77

4-6. تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات المريضة.

4-6-1.الحالة العامة

يبين الجدول رقم (34) الحالة العامة لصحة الطيور في مجموعات التجربة لقطيع الثاني (صفحة رقم) خلال مرحلة التربية بأول 21 يوم، حيث أظهرت النتائج عن الحالة الطبيعية للمجموعات الخمسة من حيث الشكل العام، النشاط ،الحركة ،الانتشار، الاقبال على الماء والعلف. وبعد عمر 22 يوم (بعد تحدي *E. coli*) نلاحظ بقاء الحالة الطبيعية لصحة الطيور لمجموعة التجربة (A, J) ، وتدهور الحالة الصحية لمجموعة (G) حتى عمر 35 يوم وعودتها الى الحالة الطبيعية بشكل بطيء، وفي المجموعة (I, H) كانت الحالة الصحية أفضل من المجموعة (F).

الجدول رقم (34): الحالة الصحية العامة لمجموعات التجربة الممرضة خلال فترة التربية 42 يوم.

		المجموعة A	المجموعة G	المجموعة H	المجموعة I	المجموعة J
الحالة العامة	اول 21 يوم	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي
الاقبال على الطعام والشراب		طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي	طبيعي
الحالة العامة	بعد عمر 22	طبيعي	ضعيف/ جيد / طبيعي	جيد/ طبيعي	جيد / طبيعي	طبيعي
الاقبال على الطعام والشراب		طبيعي	ضعيف/ جيد / طبيعي	جيد / طبيعي	جيد / طبيعي	طبيعي

4-6-2. متوسط الوزن الاسبوعي

يبين الجدول رقم (35) الوزن الاسبوعي لمجموعات التجربة في القطيع الثاني خلال 42 يوم. إذ أظهرت النتائج عن عدم وجود فروق معنوية بين مجموعات التجربة (A, G, H, I, J) حتى اليوم الواحد والعشرون، أما في الاسبوع الرابع فتبدأ الفروق تصبح معنوية في الوزن الحي لمجموعة (J) وحتى نهاية التجربة مقارنتًا بباقي مجموعات التجربة (A, G, H, I) تليه مجموعة (A , I) ثم مجموعة (H) ثم (G) ونلاحظ في المجموعة (G) بدء تفاوت الحجم في القطيع ويصبح غير متجانس حتى نهاية التجربة، بينما في الاسبوع الخامس تبدأ الفروق المعنوية بالظهور بشكل ملحوظ بين مجموعة (G) مقارنتًا مع مجموعات (A, H, I, J)، وفي الأسبوع الخامس أيضا تبدأ مجموعة (I) تحسنًا مقارنتًا مع مجموعة (G) مع تفوق مجموعة (A) على المجموعات (G, H) ونلاحظ في المجموعة (G)، أما في نهاية اليوم 42 للتجربة نلاحظ تفوق مجموعة (J) مقارنتًا بباقي مجموعات التجربة (A, G, H, I) تليه مجموعة (A , I) ثم مجموعة (H) ثم (G).

الجدول رقم (35): متوسط الوزن الاسبوعي لطيور التجربة الممرضة

المدة الزمنية بالإسبوع	المجموعة A	المجموعة G	المجموعة H	المجموعة I	المجموعة J
الاول	^{a}210±21.4	^{a}211±21.3	^{a}209±20.9	^{a}213±12.6	^{a}217±14.8
الثاني	^{a}529±41.2	^{a}530±41.3	^{a}528±40.9	^{a}536±24.2	^{a}552±28.6
الثالث	^{a}1011±88.4	^{a}1012±88.5	^{a}1010±88.7	^{a}1030±48.3	^{a}1066±60.1
الرابع	^{b}1610±172.5	^{d}1150±115.3	^{c}1450±188.4	^{b}1580±115.9	^{a}1685±135.6
الخامس	^{b}2290±241.7	^{e} 1500±373.4	^{d}1900±284.2	^{c}2150±228.5	^{a}2390±237.8
السادس	^{b}2991±354.5	^{d}1900±572.6	^{c}2500±364.9	^{b}2900±281.8	^{a}3180±284.9

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a, b, c, d, e إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

4-6-3. متوسط استهلاك العلف الاسبوعي

يبين الجدول رقم (36) متوسط الاستهلاك اليومي للعلف (g / طير) لمجموعات التجربة، حيث أسفرت النتائج عن عدم وجود فروق معنوية من اليوم الاول وحتى اليوم 21 لكل مجموعات التجربة (A, G, H, I, J)، حيث تبدأ الفروق المعنوية بالظهور بعد اليوم 21 من تحدي الجراثيم الممرضة، ففي الاسبوع الرابع والخامس والسادس نلاحظ تفوق مجموعتي (A, J) تليها مجموعة (I) على باقي المجموعات (G, H)، مع تفوق اجمالي لمجموعة (A) على باقي المجموعات في نهاية التجربة.

الجدول رقم (36): متوسط الاستهلاك اليومي للعلف للطيور الممرضة (غ)

المدة الزمنية بالإسبوع	المجموعة A	المجموعة G	المجموعة H	المجموعة I	المجموعة J
الاول	^{a}165.125	^{a}165.236	^{a}165.012	^{a}165.938	^{a}168.948
الثاني	^{a}531.795	^{a}531.958	^{a}531.237	^{a}530.739	^{a}539.794
الثالث	^{a}1150.606	^{a}1150.776	^{a}1150.192	^{a}1130.453	^{a}1139.275
الرابع	^{a}2049.53	^{d}1500.514	^{c}1650.548	^{b}1850.554	^{a}1905.937
الخامس	^{a}3208.792	^{d}2000.632	^{c}2500.893	^{b}2812.964	^{a}3130.714
السادس	^{a}4580.208	^{d}2976.724	^{c}3750.875	^{b}4363.577	^{a}4600.523

تشير الاختلافات في الأحرف الصغيرة a, b, c, d, e إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p \leq 0.05$) داخل الصف الواحد.

4-6-4. معامل التحويل العلفي

يبين الجدول رقم (37) نسبة التحويل العلفي اليومي عند مجموعات التجربة، حيث أظهرت نتائج هذه الدراسة تفوق مجموعتي (J,I) عن باقي مجموعات التجربة (A, G, H) مع تقدم العمر حتى اليوم 21، ثم تفاوتت الكفاءة بين المجموعات بدءًا من اليوم 28. إذ سجلت المجموعة (J) أفضل كفاءة تحويل علفي بنهاية التجربة (1.446) يليها المجموعة H (1.500) والمجموعة I (1.504)، بينما كانت أقل كفاءة في المجموعة G (1.566) والمجموعة A (1.531).

الجدول رقم (37): نسبة التحوية العلفي اليومي للطيور الممرضة

المدة الزمنية بالإسبوع	المجموعة A	المجموعة G	المجموعة H	المجموعة I	المجموعة J
الاول	0.785	0.783	0.782	0.779	0.778
الثاني	1.003	1.003	1.006	0.990	0.977
الثالث	1.137	1.137	1.138	1.097	1.068
الرابع	1.273	1.304	1.138	1.171	1.131
الخامس	1.140	1.333	1.316	1.308	1.309
السادس	1.531	1.566	1.500	1.504	1.446

4-6-5. نسبة النفوق

يبين الجدول رقم (38) نسبة النفوق في مجموعات التجربة، حيث سجلت المجموعة G أعلى نسبة نفوق (30.55%)، تلتها المجموعتان H و I (13.88% و 11.11% على التوالي)، بينما كانت أقل نسب النفوق في المجموعتين J (5.55%) تليها مجموعة A (8.33%). تركزت معظم حالات النفوق في الأسبوعين الرابع والخامس من التجربة، مما يشير إلى أن ذروة تأثير المرض كانت في منتصف فترة التجربة. تؤكد هذه النتائج تباين استجابة الطيور للمرض باختلاف العوامل التجريبية، حيث كانت المجموعة J الأكثر مقاومة والمجموعة G الأكثر حساسية

الجدول رقم (38): نسبة النفوق للطيور الممرضة

المدة الزمنية بالإسبوع	المجموعة A	المجموعة G	المجموعة H	المجموعة I	المجموعة J
الاول	2	1	–	1	1
الثاني	–	–	1	–	–
الثالث	1	–	–	–	–
الرابع		5	2	1	1
الخامس	–	4	1	1	–
السادس	–	1	1	1	
إجمالي النفوق	3	11	5	4	2
نسبة النفوق %	[a]%8.33	[b]%30.55	[c]%13.88	[c]%11.11	[d]%5.55

4-7 الجدوى الاقتصادية:

أظهرت نتائج الجدوى الاقتصادية تبايناً كبيراً بين المجموعات كما هو موضح في الجدول رقم (39)، حيث تراوحت نسبة الربح الصافي الإجمالي لمجموعات الطيور السليمة مقارنةً مع مجموعة الشاهد A بين 113.96% في المجموعة C و 63.15% في المجموعة D. كانت أفضل نسبة ربح مقارنة مع الشاهد (المجموعة A) للمجموعة C 113.96%، تليها المجموعة E 111.35% والمجموعة B 101.96% والمجموعة F 83.37% والمجموعة D 63.15%.

كما تأثرت المجموعتان D و F سلباً بارتفاع تكاليف التغليف بطبقتين بالرغم من التحسن الملحوظ في متوسط الوزن ونسبة النفوق مقارنتًا بباقي المجموعات في مجموعة F، أما مجموعة D كان سبب الانخفاض الى عدم وجود المعززات الحيوية في المغلفات التي حسنت المؤشرات الانتاجية في المجموعة F.

في المقابل وفي مجموعات الطيور الممرضة، كانت أسوأ النتائج للمجموعة G 13.56% بسبب ارتفاع نسبة النفوق (30.55%) رغم انخفاض تكاليف الإنتاج. من جهة أخرى، أظهرت المجموعة J أفضل جدوى اقتصادية بين الطيور الممرضة (76.74% من الشاهد) بفضل انخفاض النفوق (5.55%) وكفاءة تحويل علفي جيدة. تؤكد هذه النتائج أن تحسين النمو وخفض النفوق أكثر تأثيراً على الربحية من خفض تكاليف العلف أو الأدوية وحدها.

ولا يغيب عن الذكر أن عملية التغليف تمت بشكل يدوي وبأدوات وأجهزة بسيطة وهذا قد يفسر سبب ارتفاع تكليف انتاج جراثيم *Lactobacillus* مغلفة، في حين لو أن عملية التغليف تمت بشكل أكبر وبأجهزة وأدوات أكثر تطورا قد يؤدي إلى خفض هذه التكاليف وبالتالي زيادة النسبة المئوية للربح.

الجدول رقم (38): الجدوى الاقتصادية

		مجموعة الطيور السليمة						مجموعة الطيور الممرضة			
		المجموعة A	المجموعة B	المجموعة C	المجموعة D	المجموعة E	المجموعة F	المجموعة G	المجموعة H	المجموعة I	المجموعة J
1	ثمن الصوص	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
2	ثمن العلف	28969	29728	29196	28905	29285	29550	18823	22138	30683	26002
3	الادوية واللقاحات والمعززات الحيوية	1700	2000	1200	25000	6800	27700	600	950	6800	27700
4	مصاريف اخرى	9000	9000	9000	9000	9000	9000	9000	9000	9000	9000
5	التكلفة	43669	44728	43396	66905	49085	70250	32423	36088	50483	66702
6	سعر مبيع الريش للطير	110667	112850	114700	111000	118400	122100	70300	92500	103600	117660
7	المربح الصافي لكل طير	66998	68122	71304	44095	69315	51850	37877	56412	53117	50958
8	المبيع الاجمالي	2210934	2316148	2495640	1499230	2426025	1814750	946925	1748772	1699744	1732572
9	خسارة صوص + علف النفوق	40860	103460	22500	128620	9550	5480	652650	380750	279070	67200
10	المربح الصافي الاجمالي	2170074	2212688	2473140	1370610	2416475	1809270	294275	1368022	1420674	1665372
11	النسبة المئوية للربح مقارنة مع الشاهد	%100	%101.96	%113.96	%63.15	%111.35	%83.37	%13.56	%63.04	%65.46	%76.74

1- ثمن الصوص 4000 ل.س.
2- ثمن العلف 6325 ل.س لكل كيلو غرام.
3- شملت : مضادات حيوية وفيتامينات ، مضادات كوكسيديا ، احماض عضوية، المنابت الجرثومية والادوات والمركبات الكيميائية المستخدمة للتغليف.
4- المصاريف الاخرى تشمل : تدفئة، كهرباء، نشارة، عمال، مازوت، مصاريف منوعة.
5- ثمن مبيع دجاج اللحم من المزرعة 37000 ل.س.
6- وهي وزن الطائر مضرب بسعر المبيع للكيلو غرام
7- وهي سعر المبيع للطائر ناقص التكلفة
8- وهي الوزن الاجمالي للطيور التي تبقت حتى عمر 42 يوم مضروبة بثمن المبيع للكيلو غرام
9- خسارة الصوص والعلف للنفوق: عدد الطيور التي نفقت مضروبة بثمنها ، زائد كمية العلف الاجمالية التي اكلها الطير وقت نفوقه.
10- وهي المبيع الاجمالي ناقص خسارة الصوص وعلف النفوق.

الفصل الخامس

المناقشة

DISCUSSION

المناقشة

Discussion

5-1. عزل *Lactobacillus*:

أظهرت جميع عزلات العصيات اللبنية (16) المأخوذة من دجاج التسمين نتائج إيجابية في الاختبارات الشكلية واللونية، حيث كانت نتائجها إيجابية في اختبار صبغة غرام، وغير مُكوِّنة للأبواغ، ومرتبة في أزواج أو سلاسل قصيرة وسلبية الكاتلاز، ايجابية عند الكشف عليها بجهاز PCR.

حيث توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج العديد من الأبحاث وذلك حسب عدد ونوع المعززات الحيوية المعزولة من أمعاء دجاج التسمين، فقد عزل Dumitru وآخرون (2020) سلالات من جراثيم *Lactobacillus* من الجهاز الهضمي لدجاج التسمين. وبعد العزل وتحديد وتوصيف هذه السلالات المختارة شملت خمسة أنواع: *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus salivarius and Lactobacillus plantarum*. في دراسة أخرى تم عزل ثلاث وعشرين سلالة من الجراثيم *Lactobacillus* من أمعاء دجاج التسمين (*L. acidophilus*)، و(*L. brevis*)، و(*L. plantarum*)، و(*L. fermentum*)، و(*L. salivarius*) (Sorescu *et al*., 2021).

وأشارت العديد من الدراسات إلى عزل العديد من السلالات كمًا ونوعًا من أمعاء دجاج اللحم (Dumitru et al., 2021; Noohi *et al*., 2021; Shahbaz *et al*., 2024; Tian *et al*., 2024; Shahbaz *et al*., 2025; Li *et al*., 2024; Thuy *et al*., 2025; Sirisopapong *et al*., 2023; Melese *et al*., 2023; Ma *et al*., 2023; Aziz *et al*., 2019; Ahmed *et al*., 2019).

قد يكمن الاختلاف بين نتائج الدراسات السابقة ودراستنا الحالية إلى الموقع الجغرافي، تركيبة العلف، عمر الدجاج وسلالته، بالإضافة من أي جزء من الأمعاء تم عزل الجراثيم المدروسة.

2-5. الحساسية الدوائية لجراثيم *Lactobacillus* :

يوضح الجدول رقم (12) مقاومة عزلات *L. acidophilus* و *L. plantarum* ل 50% تقريبًا للمضادات الحيوية المستخدمة، إذ اختلفت نتائج هذه الدراسة مع دراسة Noohi وآخرون (2021) حيث كانت عزلاته (*L. brevis* و*L. plantarum* و*L. reuteri* و*L. vaginalis*) حساسة للأموكسيسلين والاريثرومايسين، وكانت أيضا مقاومة للسبيروفلوكساسين على عكس نتائج هذه الدراسة، وأظهرت أيضا حساسية ل (أوغمانتين، البنسلين ج، الكلورامفينيكول، الريفامبين) ومقاومة ل (الاميكاسين، الستربتومايسين، الاوكساسلين، التوبراميسين)، *وكانت L. reuteri* حساسة للتتراسيكلين، بينما كانت *L. brevis* مقاومة لهذا المضاد الحيوي.

وفي دراسة قام بها Dumitru وآخرون (2021) تم تقييم حساسية عزلات جراثيم *Lactobacillus* للمضادات الحيوية (عددها 11). أظهرت جميع عزلات الجراثيم *Lactobacillus* (*L.acidophilus* , *L. fermentum*) مقاومة بنسبة 100% للجنتاميسين والليتكومايسين والإنروفلوكساسين والستربتومايسين، مع حساسية أعلى للبنسلين. وأظهرت *L. salivarius* حساسية للكاناميسين والأميكاسين، بينما أظهرت *L. acidophilus* , *L. fermentum* مقاومة.

وكانت سلالات جراثيم *Lactobacillus* حساسة للمضادات الحيوية المختارة، بينما كانت مقاومة للأمبيسيلين والإريثروميسين، من ناحية أخرى، أظهرت جميع السلالات حساسية متوسطة للتتراسيكلين وحساسية للكلورامفينيكول (Sirisopapong *et al.*, 2023).

في حين هناك دراسات أخرى بيّنت حساسية عزلات *Lactobacillus* لجميع المضادات الحيوية المستخدمة (Shahbaz *et al.*, 2025; Shahbaz *et al.*, 2024). وعلى عكس دراسة أخرى أظهرت سلالات *Lactobacillus* مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستخدمة (Thuy *et al.*, 2025).

وقد يعود سبب اختلاف نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة إلى الظروف التي تربى فيها قطعان الدجاج وسلالته بالإضافة إلى استخدام المضادات الحيوية بطرق عشوائية واستخدامها وقائيا وكمحفزات نمو وعلاج دون تشخيص.

إن للمعزز الحيوي دورا مهما في حماية الأمعاء وعدم السماح للجراثيم المرضية بالنمو والاستعمار إذ تمتلك هذه المعززات القدرة على التنافس مع المسببات المرضية على المادة الغذائية وعلى مواقع الالتصاق إضافة إلى انتاجها للمواد المثبطة التي تعمل على تثبيط الجراثيم المرضية (Maxton *et al.*, 2013)، لذلك قد تكون صفة المقاومة لأغلب المضادات الحيوية صفة قد تكون مهمة لكي لا تتأثر جراثيم المعزز الحيوي بالمضادات التي تُعطى.

1-2-5. التأثير المضاد لجراثيم *Lactobacillus* على بعض الجراثيم الممرضة:

تظهر نتائج الحساسية الدوائية للجراثيم الممرضة مقاومة لأغلب المضادات الحيوية، وإن من أهم الأسباب التي تؤدي إلى ظهور المقاومة ضد المضادات الحيوية هو الاستخدام العشوائي للأدوية والتشخيص الخاطئ.

تُعدّ مقاومة المضادات الحيوية من أخطر التهديدات التي تواجه الصحة العامة. ويمكن الحدّ من تطور هذه المقاومة باستخدام المضادات الحيوية ضيقة الطيف التي تستهدف أنواعًا محددة من الجراثيم، ما يعني القضاء على عدد أقل من الجراثيم غير الضارة، وبالتالي حماية الجراثيم الضارة الأخرى من ضغط الانتقاء (Årdal *et al.*, 2024).

وهنا تكمن أهمية المعززات الحيوية والتي لها القدرة على إنتاج ببتيدات قصيرة السلسلة لها خصائص مضادة للميكروبات مثل (البكتيريوسينات) وإنتاج الأحماض العضوية أيضاً والأحماض الدهنية قصيرة السلسلة، وهنالك العديد من آليات المعززات الحيوية الأخرى التي لها القدرة على الحد من استعمار الأحياء الممرضة في أجهزة الجسم المختلفة (Di Cerbo *et al.*, 2015).

وأظهرت نتائج هذه الدراسة مقدرة عزلات *L. acidophilus* و *L. Plantarum* التثبيطية ضد الجراثيم الممرضة المدروسة مقارنتًا بالمضادات الحيوية وهذا ما توافق مع الدراسات السابقة ، حيث وُجد Shahbaz وآخرون (2024) تأثير مضاد في جميع العزلات (*L. antri*، *L. delbrueckii*، *L. casei*، *L. salivarius*) ضد الزائفة الزنجارية، والعصوية الرقيقة، والعصوية البروتينية، والمكورات العنقودية الذهبية.

وتم عزل ما مجموعه 44 سلالة من جراثيم (LAB) من أمعاء دجاج التسمين السليم، من بينها 3 سلالات أظهرت نشاطًا مضادًا للميكروبات، وهذه السلالات الثلاث هي *Enterococcus faecium*، و *L. plantarum*، و *L. reuteri*. وأظهرت هذه العزلات الثلاث فعاليةً قويةً في تثبيط الجراثيم ضد المكورات العنقودية الذهبية، والليستيريا المستوحدة، والإشريكية القولونية، والسلمونيلة الكوليرا، حيث تراوحت مناطق التثبيط بين 15.67 ± 1.53 و21.33 ± 0.58 مم (Li *et al.*, 2024).

وفي دراسة أخرى اختبر Sirisopapong وآخرون (2023) السلالات الخمس (*L. acidophilus* ، و *L. ingluviei* و *L. reuteri*، و *L. salivarius*، و *L. saerimneri*) المعزولة لنشاطها المضاد للميكروبات ضد مختلف مسببات الأمراض الجرثومية التي تصيب أمعاء الدواجن. أظهرت جميع السلالات الخمس نشاطًا مضادًا للجراثيم ضد الجراثيم المسببة للأمراض، بما في ذلك *E.coli, S. aureus, C. jejuni, C. perfingens* و *S. enteritidis*، في ظل الظروف الطبيعية، حيث أظهرت كل من (*L. ingluviei*) (*L. acidophilus*) (*L. salivarius*) تأثيرات مثبطة قوية.

أجرى Melese وآخرون (2023) فحص النشاط المضاد ضد خمسة مسببات أمراض مستهدفة كمؤشر: *السلمونيلة التيفية الفأرية والإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية والليستيريا المستوحدة والمعوية البرازية*، باستخدام 19 عزلة من جراثيم *Lactobacillus*، أظهرت النتائج مناطق تثبيط ضد جميع مسببات الأمراض المختبرة. من بينها، سجلت ست من العزلات نطاق تثبيط أوسع مع *L.monocytogenes* يتراوح بين 11.00 ± 0.00 مم إلى 20.33 ± 3.055 مم، تليها *E. coli* 10.50 ± 0.71 مم إلى 17.67 ± 2.517 مم، و*E. faecalis* 11.00 ± 0.00 إلى 19.33 ± 1.528 مم، و *S. auras* 9.50 ± 0.71 مم إلى 20.33 ± 1.528، و *S. Typhimurium* 9.50 ± 0.71 إلى 33.20 ± 6.11 مم.

وأظهرت نتائج Melese وآخرون (2023) أن السائل الطافي بعد تثقيل عزلات (LAB)، عمل على تثبط نمو الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض مثل *L. monocytogenes*، و*E. coli*، و*E. faecalis*، و*S. auras*، و *S. Typhimurium*. بالإضافة إلى العديد من الدراسات التي وافقت قدرة جراثيم *Lactobacillus* وخاصة رواشحها على تثبيط نمو الجراثيم الممرضة (Tian *et al*., 2024; Shahbaz *et al*., 2025; Ma *et al*., 2023; Ahmed *et al*., 2019; Jamaly *et al*., 2011; Sifour *et al*., 2012; Saranya and Hemashenpagam, 2011; Noohi *et al*., 2021; Yang *et al*., 2012).

وتعود القدرة التثبيطية لهذه الجراثيم إلى انتاجها مادة البكتريوسين Bacteriocin وهي مجموعة غير متجانسة من المواد النشطة بيولوجيا التي تنتجها الجراثيم والتي تشمل الببتيدات والبروتينات والتي تظهر نشاطا مضادا للميكروبات والببتيدات الجرثومية يتم تصنيعها عن طريق الرايبوسوم من قبل مجموعة متنوعة من الجراثيم بغرض قتل الجراثيم الأخرى وبالتالي إزالة المنافسة الميكروبية في بدائيات النوى (Yi *et al*., 2022). ومن المزايا المهمة للبكتريوسينات أنه يمكن أن يكون لها نشاط ضد الجراثيم المسببة للأمراض والجراثيم الانتهازية بما في ذلك الأنواع المقاومة للأدوية المتعددة دون التمييز بين السلالات الحساسة والمقاومة للمضادات الحيوية وثبت أن العديد من البكتريوسينات تعمل بالتآزر مع المضادات الحيوية التقليدية وتقليل الأعراض الجانبية غير مرغوب فيها وانتشار السلالات المقاومة (Hernández-González, 2021).

إن تأثير البكتريوسينات في الخلايا يشابه آليات عمل المضادات الحيوية، فقد تؤثر في الجدار الخلوي من خلال تحطيم، أو تكوين ثقوب في الجدار الخلوي، أو قد تؤثر في الغشاء السيتوبلازمي أو تثبط عمل الأنزيمات المتواجدة فيه، ومنها ما يثبط تخليق البروتين إذ تتداخل مع العمليات الاستقلابية للمادة الوراثية، وتثبط تضاعف المادة الوراثية داخل الخلية المستهدفة (O'Shea *et al*., 2012).

ويعود سبب أن اقطار التثبيط أكبر في المكورات العنقودية الذهبية لأسباب متعددة أهمها أن الجراثيم السالبة لصبغة غرام تتميز بكونها أكثر مقاومة تجاه المعززات الحيوية مقارنة بالجراثيم الموجبة لصبغة غرام. إذ أن أحد أسباب تثبيط الأحياء الدقيقة المرضية من قبل المعزز الحيوي هو إنتاج ذلك المعزز الحيوي للأحماض العضوية والبكتريوسينات، فضلا عن بيروكسيد الهيدروجين الذي يؤثر سلبا على تلك الجراثيم (Ahmed and Abdullah, 2025) باستثناء الجراثيم المرضية *E.coli*، التي تمتلك نظام مقاومة تجاه الأحماض العضوية التي تنتجها جراثيم المعزز الحيوي، إذ مكنها البقاء بوجود تلك الأحماض والبيئات ذات درجة الحموضة المنخفض من خلال خفض درجة الحموضة الداخلي للخلايا (Li *et al*., 2024) وبذلك تتمكن الجراثيم من حفظ التغير في درجة الحموضة، الذي بدورهِ يمنع تراكم وتجمع الفائض من (ATP) والأيونات سالبة الشحنة داخل الخلايا والتي تعد من العوامل السامة للجراثيم (Zhang *et al*., 2020).

والجدير بالملاحظة أن أقطار مناطق التثبيط للرواشح الجرثومية بدأت بالتناقص مقارنة بالجراثيم نفسها مع مرور الوقت، وهذا قد يعود إلى أنه عند استخدام الجراثيم نفسها كان هناك أكثر من عامل مثبط للجراثيم المرضية والمتمثلة بالأحماض العضوية وبيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسينات والأسيتالدهيد، وتتفق هذه النتائج مع ما وجده AL-Shyraida وآخرون (2012) و Servin (2004) من حيث كون الجراثيم الموجبة لصبغة غرام أكثر حساسية من الجراثيم السالبة لصبغة غرام تجاه راشح جراثيم حمض اللاكتيك. كذلك توافقت النتائج مع ماوجده Essid وآخرون (2009) اذ وجدوا أن أقطار مناطق التثبيط لراشح جراثيم *L. plantarium* تجاه *S.aureus, E.coli , P.aeuroginosa* (2 – 5 – 10) مم على التوالي.

إن تثبيط الجراثيم المرضية من قبل جراثيم *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* إما أن يعود إلى المواد المثبطة التي تنتجها الجراثيم أعلاه مثل الأحماض العضوية والبكتريوسينات، إذ تعمل جراثيم حمض اللاكتيك على تغير درجة الحموضة للوسط مما يقود إلى انتاج وتحويل البكتريوسين من الشكل غير الفعال إلى الشكل الفعال مما يؤدي إلى انخفاض قيمة درجة الحموضة الناتج عن تأثير الأحماض العضوية الذي تنتجها هذهِ الجراثيم داخل الخلية فيؤدي إلى تعطيل العمليات الاستقلابية مثل عمليات الأكسدة على مستوى المادة الأساس، وعمليات نقل المواد من وإلى الخلية (Servin, 2004)، أو إلى تنافسها مع الجراثيم المرضية على مواقع الالتصاق في الامعاء.

بالنسبة للمعززات الحيوية فهي الأخرى يختلف تأثيرها في الأحياء الدقيقة من نوع إلى آخر (Torshizi *et al*., 2008)، فقد سجلت جراثيم *L. gasseri* أعلى قدرة تثبيط ، أما جراثيم *L. acidoiphilus* كانت أقل بينما *B. bifidium* فقد كانت ذات قدرة تثبيطية أعلى من الجراثيم *L. casei* (Damayanti *et al*., 2012).

3-5. التغليف الدقيق لجراثيم *Lactobacillus*:

1-3-5. تأثير التغليف الدقيق بطبقة واحدة وبطبقتين في الأعداد الحية:

يشير الجدول رقم (14) إلى انخفاض الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* عند التغليف الدقيق بالطبقة الأولى والطبقة الثانية مع الحفاظ على نطاق بقاء مقبول (أكثر من 10^8 cfu/g) وهذا ما يتفق ما دراسات سابقة حول التغليف الدقيق (Rather *et al*., 2017) حيث بلغ الانخفاض 2−3 $\log_{10}$/cfu عند التغليف بطبقتين من الألجينات الكايتوسان ويتفق أيضا مع (Krasaekoopt *et al*., 2004; Zanjani *et al*., 2014; Mokarram *et al*., 2009; Al – Bayati, 2018)، وقد يعود سبب انخفاض أعداد جراثيم *Lactobacillus* عند التغليف الدقيق ذلك إلى حساسية أو عدم مقاومة جراثيم *Lactobacillus* للتغليف الدقيق باستعمال تقنية البثق، ونوع المادة المستعملة، وتركيزها في التغليف الدقيق وحجم الحبيبة واحتمالية تأثير كلوريد الكالسيوم (عامل التصلب) في أعداد المعززات الحيوية فضلاً عن احتمالية تأثير سرعة المزج لمادة التغليف مع المزرعة الجرثومية بسبب حساسيتها إلى مواد التغليف أثناء عملية التغليف الدقيق في أعداد المعززات الحيوية، كذلك اختلاف قابلية تركيز، وانتشار أنواع المعززات الحيوية داخل الحبيبة عند حساب الأعداد الحية (Rather *et al*., 2017; Cheng, 2015).

ويرجع ارتفاع الأعداد الحية الذي تم الحصول عليه بطرق البثق إلى استخدام درجة حرارة أقل وإجهاد اسموزي أقل في العملية مقارنة بالطرق التغليف الاخرى كالتجفيف بالرش مثلا (De Vos *et al*., 2010; Huang *et al*., 2017; Champagne & Fustier, 2007).

وأشار (Trabelsi *et al*., 2013) إلى أن أعلى نسبة من أعداد جراثيم *L. plantarum* يمكن الحصول عليها عند استعمال مزرعة جرثومية ذات حمولة 10^{10} (UFC/ml) وبتركيز بنسبة 2% من مادة الالجينات كمادة مغلفة مع كلوريد الكالسيوم كمحلول تصلب بتركيز 0.45 مولر هي 80.98%.

5-3-2. حجم وقطر وشكل حبيبات المعززات الحيوية المغلفة:

بينت النتائج الى عدم وجود فروق كبيرة وواضحة بين أحجام وأقطار الحبيبات المتكونة بين البكتريا المغلفة بطبقة واحدة والمغلفة بطبقتين نتيجة استعمال نفس الظروف والمكونات المستعملة في عملية التغليف الدقيق بتقنية البثق، وأن الأقطار التي حصلنا عليها عند تغليف المعززات الحيوية بتقنية البثق أصغر من القطر الذي استحصل عليه (Al – Bayati, 2018) عند تغليف بكتريا *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus Plantarum* 2.31 و 2.17 ملم على التوالي عند التغليف بطبقة واحدة و 2.63 و 2.44 ملم على التوالي عند التغليق بالطبقة الثانية. وكانت النتائج أصغر لما حصل عليه Adeful وآخرون (2015) عند تغليف بكتريا *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus reuteri* عند استعمال تقنية البثق وباستعمال مادة الالجينات بتركيز 3% إذ كان قطر كل منهما بعد التغليف الدقيق 2.06 و 2.08 ملم على التوالي اعتماداً على نوع وتركيز المادة المستعملة في عملية التغليف الدقيق.

أشار Mortazavian وآخرون (2007) أن معظم أقطار حبيبات المعززات الحيوية المتكونة بطريقة البثق تكون ملم، وأن قطر الحبيبات المتكونة بعملية البثق يعتمد على قطر فوهة المحقنة المستعملة في عملية تقطير محلول التغليف الى محلول التصلب، أيضاً يؤدي نوع وتركيز الالجينات ولزوجة المحلول دوراً مهماً في حجم الحبيبات الناتجة إذ كلما قل تركيز الجينات الصوديوم كلما صغر قطر الحبيبات المتكونة.

كذلك الأحجام والأقطار التي تم الحصول عليها عند تغليف المعززات الحيوية بطبقة ثانية مقاربة لما وجدته Talebzadeh وآخرون (2014) عند تغليف بكتريا *L. acidophilus* بالطبقة الثانية باستعمال الكايتوسان بتركيز 0.4% إذ كان قطر الحبيبات المغلفة بطبقتين أكبر من الحبيبات المغلفة بطبقة واحدة بمقدار 200 مايكرومتر، نتيجة ارتباط الكايتوسان بالمعززات الحيوية المغلفة بمادة الالجينات بطبقة واحدة والتي تزيد من أحجام وأقطار المعززات الحيوية المغلفة بالطبقة الثانية. إذ يعزى سبب الارتباط الى أن مجاميع الأمين ذات الشحنة الموجبة للكايتوسان ترتبط مع المجاميع الكاربوكسيلة السالبة الشحنة في الالجينات التي تؤدي الى زيادة

حجم الحبيبات، كذلك أن فعالية الكايتوسان تعتمد بشكل كبير على نسبة تركيز الكايتوسان ونسبة النقاوة فضلاً عن درجة إزالة مجاميع الأسيتيل التي تزيد من الشحنة الموجبة للكايتوسان وبالتالي تزيد من فعاليته وقوة ارتباطه بالالجينات التي تكون ذات شحنات سالبة (Ariful *et al.*, 2010; Khalifa, 2015).

أما أشكال المعززات الحيوية المغلفة والمتكونة بتقنية البثق باستعمال الالجينات أعطت أشكالاً كروية الى بيضوية الشكل وذات تشوهات قليلة وذات ملمس ناعم وهذا يتفق مع ما ذكره (Prüsse *et al.*, 2008) حول أشكال وملمس وحدوث التشوهات وهذا يرجع الى اللزوجة العالية لمحلول 3 % الالجينات والذي تم استعماله في هذا البحث ويعود لون المعززات الحيوية المغلفة بطبقة واحدة بيضاء الى كريمية اللون يعزى هذا اللون الى لون الحليب الفرز الأبيض المضاف بنسبة 10 % في تركيب أغلفة المعززات الحيوية. بينما كان شكل الحبيبات عند استعمال تراكيز أقل من الجينات 2 % ذات شكل كروي منتظم وذات ملمس ناعم وذات تشوهات قليلة بينما يكون شكل الحبيبات المتكونة عند استعمال تركيز 4 % من محلول الالجينات غير منتظمة الشكل وذات ملمس خشن وذات تشوهات أكثر بسبب زيادة لزوجة محلول التغليف الذي يؤدي الى عدم نزول المحلول الالجينات عبر فوهة المحقن بشكل قطرات منتظمة وتكون ذات تشوهات أكثر، وهذا يتفق مع ما ذكر (Samar *et al.*, 2013; (Prüsse *et al.*, 2008 .

5-4. عيوشية *Lactobacillus* قبل وبعد التغليف ومقاومتها لبعض الظروف المتطرفة:

5-4-1. تحمل المعاملات الحرارية:

إن الهدف من البسترة هو القضاء على أغلبية الأحياء المرضية الخضرية وتقليل الحمولة الجرثومية بنسبة 90-99 %، وعلى الرغم من أن هذه المعاملات ستؤدي إلى قتل نسبة عالية من الأحياء الدقيقة، إلا أن الأحياء الدقيقة المقاومة للحرارة ومن ضمنها بعض أنواع جراثيم *Lactobacillus*، لن يتم القضاء عليها بشكل كامل (Lee and Kaletunc, 2002). وأن قدرة جنس *Lactobacillus* على مقاومة البسترة يعود إلى امتلاكها بعض الآليات التي تعمل على حماية الجراثيم (Zhang and Cai, 2014).

5-4-1-1. تأثير البسترة البطيئة والبسترة السريعة:

يوضح المخطط رقم (5) والمخطط رقم (6) انخفاض الأعداد الحية للجراثيم دون تغليف لكل من الجراثيم المدروسة عند المعاملة بالسترة البطيئة والسريعة، وذلك نتيجة التعرض إلى الحرارة التي تؤدي إلى دخول الجراثيم في حالة صدمة حرارية، التي لها تأثير سلبي على هيكل وفيزيولوجيا الخلية بالجرثومية وبالتالي تدني كبير في عيوشية الجراثيم وهي نتيجة مقاربة لما وجده Al – Bayati (2018) على جراثيم *L. rhamnosus* و *L.Plantarum* و Kim وآخرون (2008) على جراثيم *L.acidophilus*، وذلك لأن الحرارة العالية تسبب تمسخ بروتينات الجدار الخلوي وتغير في الأحماض الأمينية وترتيبها في الجدار الخلوي، فضلاً عن التأثير السلبي للحرارة العالية في زعزعة استقرار الجزيئات الكبيرة داخل الخلية مثل RNA وتغيرات في سيولة الأغشية الخلوية (Zhang and Cai, 2014).

وقد يعود سبب بقاء جراثيم *L. acidophilas, L. Plantarum* دون تغليف على قيد الحياة بنسبة 29.03% ، 25.13% على التوالي في البسترة البطيئة و بنسبة 29.78% ، 25.96% على التوالي في البسترة السريعة، إلى مقاومة جراثيم *Lactobacillus* للمعاملات الحرارية إلى آليات عمل جنس *Lactobacillus* في مقاومة تأثير الحرارة المرتفعة، إذ ستعمل على انتاج أو تكوين مجموعة من البروتينات والأنزيمات المحللة للبروتينات إذ تعمل على إعادة بناء البروتينات التالفة وإزالتها في نفس الوقت وغيرها من الآليات مثل انتاج البروتينات الوقائية أو زيادة نشاط بعض الأجزاء الخلوية مثل الرايبوسومات (Zielińska *et al*., 2025; Julyanto *et al*., 2024). فضلاً عن أن جراثيم *Lactobacillus* عند موتها سوف تحرر بعض مكوناتها الخلوية التي قد توفر حماية إضافية للمعززات الحيوية التي قاومت المعاملات الحرارية (Tsakalidou and Papadimitriou, 2011).

إن عملية التغليف الدقيق لجراثيم *Lactobacillus* أدى إلى حمايتها وزيادة عيوشيتها في مقاومة معاملة البسترة، وأظهرت النتائج أن عملية التغليف الدقيق لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة وفر حماية أفضل من الجراثيم الغير مغلفة في مقاومة المعاملات الحرارية، وقد يعزى سبب تفوق جراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة عن الجراثيم الغير مغلفة إلى استعمال مادة التغليف بالالجينات على توفير الحماية لجراثيم *Lactobacillus* تجاه المعاملة الحرارية إذ تعمل على تقليل انتشار الماء داخل غلاف الحبيبة و تعمل على

عرقلة تغلغل الحرارة إلى داخل الحبيبة، إضافة إلى ثبات الالجينات ضد المعاملات الحرارية العالية وبالتالي فإن جراثيم *Lactobacillus* المغلفة لا تدخل إلى ظروف مماثلة عما هي عليه في جراثيم *Lactobacillus* الغير المغلفة (Mandal *et al*., 2006).

وإن تغليف جراثيم *Lactobacillus* بطبقة ثانية من الكايتوسان وفر دعماً إضافياً لجراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة ثانية اتجاه معاملة البسترة، وأظهرت النتائج إلى أن نسبة الجراثيم الحية ارتفعت عند تغليف جراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة ثانية مقارنة مع جراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة، وقد يعود إلى دور الكايتوسان لتوفير الدعم الإضافي كطبقة حماية ثانوية والتي تقلل من انتقال درجات حرارة البسترة إلى الغلاف الأول فضلاً عن دور أيونات الكالسيوم التي تعمل على ربط غلاف الكايتوسان بغلاف الالجينات وزيادة ثباتية الأغلفة واستقرار الحبيبات وإعطاء قوة ميكانيكية تجاه المعاملات الحرارية (Radulović *et al*., 2012; Talebzadeh *et al*., 2014)، وهذا ما يفسر مقاومة جراثيم *Lactobacillus* تجاه المعاملات الحرارية.

بينت النتائج لجميع المعاملات في المخطط رقم (5) والمخطط رقم (6) تفوق كل من جراثيم *L. acidophilas* على جراثيم *L. Plantarum* تجاه مقاومة درجة حرارة البسترة البطيئة وكذلك في البسترة السريعة. هي نتيجة لاختلاف مقاومة جراثيم *Lactobacillus* فيما بينها تجاه المعاملات الحرارية المختلفة اعتماداً على نوع وجنس المعززات الحيوية كذلك اعتماداً على مراحل نمو جراثيم *Lactobacillus* إذ تكون مرحلة الاستقرار أكثر مرحلة تكون فيها جراثيم *Lactobacillus* مقاومة للظروف البيئية الضارة (Gardiner *et al*., 2000). كذلك تبين النتائج أن البسترة البطيئة والبسترة السريعة لجراثيم *Lactobacillus* لهما نفس التأثير والقدرة على خفض الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* وأن الاختلاف بين أجناس جراثيم *Lactobacillus* فيما بينها في مقاومة والاستجابة للصدمة الحرارية (Tsakalidou and Papadimitriou, 2011). ان زيادة مقاومة جراثيم *Lactobacillus* للمعاملات الحرارية باستعمال تقنية التغليف الدقيق ربما سيفتح الأبواب لاستعمال هذه المعززات في مجال الاغذية والادوية التي يتطلب أعدادها معاملات حرارية مما سيسهم في زيادة أشكال وأصناف الأغذية المعززة حيوياً.

2-5-5. مقاومة *Lactobacillus* للحموضة المتطرفة:

تُعد القدرة على البقاء في ظل درجة حموضة منخفضة صفة مهمة لنجاح مرور المعززات الحيوية عبر الجهاز الهضمي (Mandal *et al.*, 2016)، بالإضافة إلى اعتبارها معزز حيوي قوي (Ahmed *et al.*, 2019). حيث أفاد Abbas Hilmi وآخرون (2007) أن درجة حموضة العصارة المعدية لدى الدجاج منخفضة جدًا، ويجب أن تتجاوز نسبة بقاء السلالة 70%. وتراوحت درجة الحموضة المثلى لنمو العصيات اللبنية بين 6.2 و8.8 (Yang *et al.*, 2018). في هذه الدراسة، اعتُبر انخفاض درجة الحموضة عائقًا أمام قدرتها على البقاء، إلا أن هذا النوع من التجارب عادة يجرى لاختبار واختيار العزلات الأكثر قدرة لمقاومة درجة الحموضة المنخفضة (Ma *et al.*, 2023; Del Piano *et al.*, 2011).

أظهرت مقاومة جراثيم *L. acidophilas, L. Plantarum* لظروف الحموضة المتطرفة دون تغليف عند PH3 و PH2 على التوالي بعد 180 دقيقة نتائج مقاربة لما وجده Dumitru وآخرون (2021) بعد قياس قابلية البقاء عند درجة حموضة PH3، إذ تمكنت جميع سلالات LAB المؤكدة (*L.acidophilus* IBNA 26, *L. acidophilus* IBNA 64, *L. fermentum* IBNA 37, *L. salivarius* IBNA 29, *L. salivarius* IBNA 33, *L. salivarius* IBNA 41) من البقاء على قيد الحياة لمدة 3 ساعات (≤58.53%). أما عند درجة حموضة PH2 بعد 3 ساعات، انخفضت قدرة السلالات على البقاء، وذلك بالنسبة ل IBNA 26 (0.00%)، و IBNA 37 (23.82%)، و IBNA 29 (10.22%). ووُجد أن معدل البقاء ممتاز عند درجة حموضة 2.0 بالنسبة لـ IBNA 41 (74.98%)، و IBNA 33 (65.90%)، و IBNA 64 (37.69%). وتتوافق نتائج هذه الدراسة مع Singh وآخرون (2012) والتي أفادت بأن أقصى تحمل للحمض لدى العصيات اللبنية يتراوح بين 46.70% إلى 102.48% عند درجة حموضة 3.

بينما تفوقت نتائج هذه الدراسة عن نتائج Sirisopapong وآخرون (2023) حيث أشارت النتائج إلى أن جميع السلالات المختبرة أظهرت معدلات بقاء متفاوتة في ظل ظروف حمضية مختلفة. وأظهرت النتائج أن *L. acidophilus* و *L. ingluviei* حققتا أعلى معدل بقاء، تليهما *L. reuteri* و *L. salivarius* و *L. saerimneri* (قيمة الاحتمال < 0.05). وتمكنت جميع سلالات *Lactobacillus* من البقاء على قيد الحياة

عند مستويات حموضة 3.0 و3.5 لمدة 4 ساعات. عند درجة حموضة 2.0 و2.5، استطاعت السلالات الأربع (*L. ingluviei*، و*L. reuteri*، و*L. acidophilus*، و*L. salivarius*) البقاء على قيد الحياة، باستثناء *L. saerimneri* التي لم تتجاوز نسبة بقائها 4.25% و5.78% بعد التعرض لدرجة حموضة 2.0 و2.5 على التوالي لمدة 4 ساعات. ولوحظت مقاومة كبيرة لانخفاض درجة الحموضة في سلالات *L. acidophilus*، بينما لوحظت أعلى حساسية للبيئة الحمضية في *L. saerimneri* (قيمة الاحتمال <0.05).

وتفوقت نتائج Dumitru وآخرون (2020) في مقاومة عزلات *Lactobacillus* عند درجة حموضة PH3. إذ وجد جميع السلالات المختبرة المزروعة عند درجة حموضة (3) (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus salivarius and Lactobacillus plantarum*)، أن معدل بقاء عند درجة حموضة (3)، على النحو التالي: 93.28% إلى 80.58% (*L. salivarius*)، 92.67% إلى 90.70% (*L. fermentum*)، 90.87% إلى 84.68% (*L. plantarum*)، مقارنة بمعدل البقاء الأقل لـ (*L. acidophilus*) 86.89% إلى 69.34% على التوالي، (*L. brevis*) 77.73% إلى 64.37% خلال 3 ساعات من المعاملة، وهي نتيجة مقاربة لما وجد Tian وآخرون (2024) أيضًا، و Melese وآخرون (2023).

وأيضًا تفوقت نتائج Ahmed وآخرون (2019) ، حيث وُجد السلالات (*L. paracasei* و*L. salivarius* و*L. johnsonii* و*L. agilis*، و*L. fermentum*، و*L. sakei*، و*L. curvatus*) تتمتع بمقاومة ملحوظة للحموضة (2) تراوحت نسبة بقائها بين 81.68% و85.01%.

ووجد Astawan وآخرون (2019) أن جراثيم *L. acidophilus* و*L. plantarum* مقاومتان لحمض المعدة الاصطناعي بدرجة حموضة 2.5 لمدة ثلاث ساعات، ويبقى البكتريوسين الناتج نشطًا عند درجة حموضة تتراوح بين 3 و10.

وقد يعزى سبب مقاومة جراثيم *L. acidophilas, L. Plantarum* لظروف الحموضة المتطرفة في قبل التغليف وبقائها على قيد الحياة بنسبة (61.36%) (57.98%) عند PH3 على التوالي بعد 180 دقيقة و بنسبة (27.68%) (17.03%) عند PH2 على التوالي بعد 180 دقيقة، إلى قدرتها على استعمال آليات

مختلفة ومنها تنظيم استقلاب الاحماض الأمينية مثل تحويل الأرجنين إلى أمونيا وغاز ثنائي أوكسيد الكاربون وطاقة الذي يؤدي إلى ارتفاع درجة الحموضة في السيتوبلازم لموازنة حموضة البيئة المحيطة بها (Wu *et al.*, 2014)، أو تنظيم استقلاب الأحماض الأمينية المتفرعة مثل الليوسين وأيزوليوسين والفالين ولتنظيم توازن الحموضة عند مواجهة الظروف الحمضية المتطرفة (Trip *et al.*, 2012)، أو انتاج الغلوثاثيون الذي يوفر بعض الحماية عند مواجهة الظروف الحمضية المتطرفة، أو قابلية جراثيم *Lactobacillus* على تحوير تركيب جدارها الخلوي عند مواجهة الظروف الحمضية المتطرفة عن طريق زيادة نسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة وتغيير طول سلاسل الأحماض الدهنية أو نفاذية الجدار الخلوي (Wu *et al.*, 2012).

وأظهرت النتائج في المخطط رقم (8) تفوق جراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة على الغير مغلفة إذ بلغت نسبة الانخفاض لجراثيم *L. acidophilas* المغلفة بطبقة واحدة عند درجة حموضة pH=3 بلغت 20.57% و عند درج الحموضة 2 بلغت 35.39% وعند درجة الحموضة 1 بلغت 86.89% بعد مرور 180 دقيقة بينما كانت النسبة المئوية لانخفاض جراثيم *L. Plantarum* المغلفة بطبقة واحدة عند درجة حموضة 3 21.03% وعند درجة حموضة 2 بلغت 41.01% وعند درجة حموضة 1 لم تصمد بعد مرور 180 دقيقة.

وقد أظهرت النتائج احتفاظ جراثيم *Lactobacillus* بأعداد عالية وأعلى من العدد المطلوب لأداء الفعل العلاجي والوقائي 10^6 و 10^7 cfu/g او ml (Pop *et al.*, 2015) عند درجة حموضة 2 و 3 لتوفير المنافع الصحية للمضيف، وقد يعزى سبب تفوق جراثيم *Lactobacillus* المغلفة على الغير مغلفة بسبب دور الالجينات في توفير الحماية لجراثيم *Lactobacillus* عند درجة الحموضة المنخفضة. الا أنه عند درجة حموضة 1 فإن جراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة من الالجينات انخفضت أعدادها إلى دون الأعداد المطلوبة، إذ إن مادة الالجينات لم توفر حماية الكافية عند درجة حموضة 1 وقد يعود ذلك إلى سبب تحلل لألجينات إلى حمض مانورونيك وحمض لكولورونيك في الوسط الحمضي المتطرف وبذلك لم يحافظ على جراثيم *Lactobacillus* وعزلها عن البيئة المتطرفة مما أدى إلى هلاكها (Dianawati, 2014).

ويبين المخطط رقم (9) تفوق ملحوظ بالاحتفاظ بأعداد عالية عند تغليف جراثيم *Lactobacillus* بطبقتين وبعيوشية أفضل مقارنة مع جراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقة واحدة والغير مغلفة، وقد يعزى سبب تفوق جراثيم *Lactobacillus* المغلفة بطبقتين إلى أن التغليف الكايتوسان عمل على زيادة حماية جراثيم *Lactobacillus* من الظروف الحمضية المتطرفة، ذلك عن طريق زيادة ثباتية الارتباطات بين الغلاف الأول والثاني، وتقليل انتقال الحموضة إلى جراثيم *Lactobacillus* المغلفة، بسبب تأثير مجموعة الشحنات الموجبة لمجموعة الأمين والعامل الأهم هو امتلاك الكايتوسان نقطة ترسيب منخفضة، وامتلاكه أربعة مجامع من كلوكوز – أمين من نوع D.

لقد تم استعمال درجات حموضة متطرفة 3 و 2 و 1 وهي توازي درجة الحموضة المتواجد في معدة الإنسان والحيوان إذ تتراوح درجة حموضة الجهاز الهضمي للدجاج من 2.5 إلى 4.7 (Musikasang *et al*., 2009)، حتى الأكثر تطرفاً منها مثل 1 و 2 وكذلك تم استعمال وقت للتعرض لهذه الدرجات من الحموضة 60 و 120 و 180 وهي تحاكي بقاء الكتلة الغذائية في معدة الإنسان والحيوان ويمكن أن يستغرق الابتلاع ما يصل إلى 1 إلى 3 ساعات اعتمادًا على حجم علف الحيوان، وتعتمد على طول وقصر بقاءها في هذا النوع من الغذاء (Musikasang *et al*., 2009; Nag, 2011).

ومن ذلك نعلم وجوب استعمال أعداد عالية من المعززات الحيوية فقد تصل إلى 10^8 cfu/g او ml في الغذاء، لأنها تعوض الخسائر التي تحدث للأعداد نتيجة لموت نسب عالية منها نتيجة لظروف المتطرفة في المعدة، ولكن باستعمال تقنية التغليف الدقيق بطبقة واحدة وبطبقتين لوحظ عيوشية مرتفعة لهذه المعززات مما يعني إمكانية بقائها ومرورها وتحملها للظروف المتطرفة في المعدة وذلك يعني أن استعمال أعداد وإن كانت أقل من وجهة النظر الرياضية إلا أنها أكثر مقدرةً، وأعلى عيوشيةً وبقاءً للمرور من خلال المعدة، كما إن استعمال المعززات الحيوية المغلفة تغليفاً دقيقاً، والتي قاومت درجة الحموضة المنخفضة ستؤدي إلى فسح المجال لاستعمالها في العديد من الأغذية والادوية ذات الحموضة المتدنية.

3-4-5. مقاومة *Lactobacillus* لأملاح الصفراء:

تعد قابلية المقاومة لأملاح الصفراء من الشروط الواجب توافرها في المعززات الحيوية إذ يعد جنس *Lactobacillus ssp* نشطاً في الأمعاء الدقيقة وجنس *Bifidobacterium ssp* نشطاً في الأمعاء الغليظة ويعد كلا الجنسين مقاومين لأملاح الصفراء وبنسب مختلفة وحسب النوع والجنس والسلالة (Chitprasert *et al.*, 2012)، إذ يلاحظ ان تركيز 1 % من أملاح الصفراء اثر في نسبة الأعداد الحية المتبقية للجراثيم الغير مغلفة لكل من جراثيم *L. acidophilas, L. Plantarum* بصورة ملحوظة، وقد يرجع سبب الانخفاض في الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* عند التعرض لأملاح الصفراء، ولا سيما التراكيز العالية منها نتيجة استحلاب الطبقة الدهنية في الجدار الخلوي للخلايا، الذي يؤدي إلى سيولة وتلف الجدار خلوي للخلايا، وبالتالي خروج المكونات الحيوية والجزيئات الكبيرة المهمة من الخلية، وبالتالي سوف يؤدي إلى موت الخلايا فيما بعد (Begley *et al.*, 2005). وقد يعود سبب مقاومة جراثيم *Lactobacillus* للتراكيز العالية من أملاح الصفراء إلى إنتاج بعض البروتينات الدفاعية، وبكميات عالية في الجدار الخلوي لحمايتها من التأثير القاتل للأملاح الصفراء (Leverrier *et al.*, 2003) وانتاج بعض البروتينات المشتقة من الحمض الأميني السستين والمثيونين أيضاً، التي لها القابلية على المحافظة على صفة الاختزال والتقليل من تأثيرها الضار في جراثيم *Lactobacillus* (Irmler *et al.*, 2008)، كذلك قدرتها على إنتاج الأنزيمات المحللة لأملاح الصفراء (Begley *et al.*, 2005) وهذا ما أكده Chitprasert وآخرون (2012) إلى قدرة جراثيم *Lactobacillus* على النمو في الأوساط الزرعية الحاوية على 3 % من أملاح الصفراء.

وكانت النتائج مقاربة لما وجده Rather وآخرون (2017) إلى أن تعرض جراثيم *L. Plantarum* إلى السائل المعوي لمدة 120 دقيقة ادى إلى انخفاض الأعداد الحية بنسبة 72.25 % وهي نتيجة مقاربة للنتائج التي تم الحصول عليها عند تقدير قابلية المعززات الحيوية على مواجهة أملاح الصفراء.

وفي دراسة قام بها Sirisopapong وآخرون (2023) تم فحص تحمل سلالات مختارة من جراثيم *Lactobacillus* للأملاح الصفراوية. أظهرت جميع العزلات المختبرة قدرة على مقاومة تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء تراوحت بين 0.3% و1.0%. ومع ذلك، مع زيادة تركيز أملاح الصفراء، انخفض معدل نموها، بينما أظهرت جراثيم *L. acidophilus, L. ingluviei,* و *L. reuteri* مقاومة جيدة لأملاح الصفراء عند تركيز 1.0% أكثر من *L. salivarius* و *L. saerimneri*.

وأجرى Dumitru وآخرون (2021) اختبار لـ LAB المحددة عند تركيز 0.3% من أملاح لصفراء. وتم الحصول على نتائج مختلفة فيما يتعلق بقدرة السلالات على البقاء. سجلت سلالتا *L.acidophilus* IBNA 26و *L. fermentum* IBNA 37 , أدنى مقاومة بعد 3 ساعات، مقارنةً *L. acidophilus* IBNA 64, *L.* . *salivarius* IBNA 41 *L. salivarius* IBNA 33, *L. salivarius* IBNA 29 التي أظهرت مقاومة لأملاح الصفراء حيث أظهرت سلالة IBNA 29 نسبة تحمل بلغت حوالي 90% بعد 3 ساعات في وجود 0.3% من أملاح الصفراء، ولكن عند درجة حموضة 2.0، انخفض معدل البقاء. في الوقت نفسه، تمتع IBNA 64 بثبات كافٍ، حيث أظهر بقاءً بنسبة ≤89.88% بعد 3 ساعات. بالإضافة للعديد من الدراسات التي درست تحمل جراثيم *Lactobacillus* لأملاح الصفراء (Al-Bayati, 2018; Dumitru *et al*., 2020; Noohi *et al*., 2021; Shahbaz *et al*., 2024; Tian *et al*., 2024; Ahmed *et al*., 2019; Shahbaz *et al*., 2025; Thuy *et al*., 2025; Li *et al*., 2024; Melese *et al*., 2023).

إن تغليف جراثيم *Lactobacillus* بالالجينات أسهم في توفير الحماية تجاه التعرض للظروف المتطرفة مثل أملاح الصفراء عن طريق عمل طبقة عازلة بين سطح الخلايا واملاح الصفراء بصورة مؤقته إذ ان نسبة الأعداد الحية لجراثيم *L. acidophilas, L. Plantarum* المغلفة بطبقة واحدة المتبقية كانت أعلى بكثير مقارنة مع جراثيم *Lactobacillus* الغير مغلفة. وإن الانخفاض في الأعداد الحية عند التعرض إلى أملاح الصفراء نتيجة أن لأملاح الصفراء الخاصية المخلبية التي تعمل على مسك أيونات الكالسيوم الثنائية في الحبيبة وبالتالي تؤدي إلى إحلال نسيج الالجينات، وتحرر بعض الخلايا، ولا سيما في الجزء القريب من السطح (Gbassi *et al*., 2009) وهي نتائج مقاربة لما حصل عليه Al-Bayati (2018). وقد أشار Rather وآخرون (2017) إلى ان تعرض جراثيم *L. Plantarum* المغلفة بالالجينات 2% إلى السائل المعوي لمدة 120 دقيقة أدى إلى الانخفاض بالأعداد الحية بنسبة 47.5 % ، وهي نتيجة قريبة من النتيجة التي حصلنا عليها.

وإن تغليف جراثيم *Lactobacillus* بطبقة ثانية من الكايتوسان وفر الدعم تجاه الاملاح الصفراء إذ إن طبقة الكايتوسان لم تتأثر في الأملاح الصفراء، ويعزى سبب بقاء جراثيم *Lactobacillus* بنسب عالية إلى عدم قدرة أملاح الصفراء على مسك ايونات الكالسيوم وعمل أضرار في نسيج الحبيبة، وبالتالي توفير الحماية الكافية للمعززات الحيوية المغلفة بطبقتين وهي نتيجة مقاربة لما وجده Al-Bayati (2018) و Chávarri وآخرون (2010). وأشار Corona-Hernandez (2013) إلى ان تغليف المعززات الحيوية سواء بطبقة واحدة أو بطبقتين زاد من عيوشية المعززات الحيوية مقارنة مع الخلايا الحرة في مقاومة الظروف المتطرفة لجهاز الهضمي.

يُعد اختبار أملاح الصفراء معيارًا حيويًا أساسيًا لاختبار بقاء أي سلالة جرثومية، ويُقيّم قدرتها على إتلاف بنية غشاء الخلية (Rajoka *et al.*, 2018). وأفاد Lin وآخرون (2003) أن الجهاز الهضمي للدجاج (الاثني عشر والأعور) يُظهر تركيزًا كليًا لأملاح الصفراء بنسبة 0.175 و0.008%. وقد اعتُبر مستوى أملاح الصفراء بنسبة 0.3% وهو تركيز مشابه لتركيز عصارة الصفراء البشرية (Dumitru *et al.*, 2021) قيمةً مثاليةً لاختيار بروبيوتيك (García-Hernández *et al.*, 2016)، لذلك يعتبر اجتياز جراثيم *Lactobacillus* للتراكيز 1 و 2 و 3 % من أملاح الصفراء مؤشرا جيدًا.

5-4-4. التخزين

تُعدّ قدرة البروبيوتيك على البقاء حياً أثناء التخزين والمرور عبر الجهاز الهضمي سمةً مهمةً عند اختيار السلالة (Upadrasta *et al.*, 2011; Dumitru *et al.*, 2020)، كما تؤثر حيويته وحالة جداره الخلوي ومرحلة نموه بشكل كبير في أدائه (Papadimitriou *et al.*, 2015)، لذلك استند نجاحه تجارياً إلى متانته التقنية وقدرته على الحفاظ على حيويته طوال فترة صلاحية المنتج (O'Toole *et al.*, 2017).

وتُعدّ مقاومة السلالات لدرجة 4°م ودرجة حرارة الغرفة من الخصائص التقنية المهمة، وتُعتبر المقاومة الأطول صفةً إيجابيةً أثناء عملية الاختيار، وقد اتفقت نتائج البحث مع Sorescu وآخرون (2021) أن عزلات *L. plantarum* و*L. fermentum* و*L. brevis* و*L. acidophilus* تمتعت بأطول فترة مقاومة، تراوحت بين 66 يومًا و9 أشهر عند 4°م، وبين 45 يومًا و3 أشهر عند الغرفة، وتُفيد هذه النتائج في فحص الخصائص الظاهرية للسلالات المرشحة لمنتج بروبيوتيك يتضمن مقاومة شهرين على الأقل عند 4°م، ونظراً لوجود 10^5 وحدة تشكيل مستعمرة/غرام فقط من *L. brevis*، فقد تم اختيار سلالات *L. fermentum* و*L. plantarum* و *L. acidophilus* لإجراء المزيد من الاختبارات على خصائص البروبيوتيك، وأدت الأسباب نفسها إلى اختيار السلالات في دراسات سابقة مثل *L. fermentum* من أمعاء الديك الرومي وسلالات أخرى من *L. fermentum* و*L. brevis* من فراخ عمر 26 يوماً (Sorescu *et al.*, 2019).

واتفقت النتائج مع دراسات عديدة من ناحية فعالية التغليف بأكثر من طريقة في الحفاظ على الأعداد الحية للمعززات الحيوية، مثل Dumitru وآخرون (2021) حيث حفظت سلالات جراثيم *Lactobacillus* المعزولة لفترة طويلة (سنتان) في وسط انتقائي مع إضافة 20% جلسرين (Dumitru *et al.*, 2021).

وفي مجموعة واسعة من الصناعات، أُقرّ بالتغليف الدقيق كطريقة قابلة للتطبيق لتحسين أداء الإضافات، إذ يتمتع بقدرة على تحسين خصائص الإطلاق وإطالة العمر الافتراضي وتغطية النكهات غير المرغوب فيها وتحسين الثبات الحراري.

وأفاد Rosenberg and Lee (2004) أن تقنية التغليف الدقيق تزيد من بقاء الجراثيم الحيوية بنسبة تصل إلى 80-95%.

وقد يعود اختلاف النسبة المئوية للأعداد الحيوية في البقاء إلى الاختلافات الفردية بين السلالات، وأن سبب انخفاض الأعداد الحية لجراثيم *Lactobacillus* غير المغلفة أثناء الخزن بدرجة 4°م لمدة 30 و60 و90 يوماً يعزى إلى تأثرها بدرجة الحرارة المنخفضة، مما أدى إلى انخفاض تدريجي بطيء معتمداً على عوامل كثيرة منها سلالة الجراثيم ونوع الوسط وأعدادها وغيرها، ويعزى بقاؤها إلى تكيفها في الظروف البيئية الموجودة فيها وانخفاض الفعاليات الحيوية في الخلايا الحية، فضلاً عن الآلية التي تتحسس بها الخلايا لظروف الحرارة المنخفضة وتعمل على تكيف الحمض النووي (Tsakalidou and Papadimitriou, 2011)، وتكييف عمل الفعاليات الحيوية بصورة منخفضة، بالإضافة إلى وجود البروتينات المترافقة وأهمها CSPs التي تحمي الخلايا وتقلل الأضرار الناتجة عن انخفاض الحرارة (Capozzi *et al*., 2012).

كما أن التغليف الدقيق بطبقتين زاد من فعالية جراثيم *Lactobacillus* على البقاء بأعداد أعلى خلال ثلاثة أشهر من الخزن عند 4°م مقارنةً بالمغلفة بطبقة واحدة وغير المغلفة، إذ إن التغليف بالألجينات يعمل على حماية وزيادة عيوشة المعززات الحيوية، ووجود حليب الفرز مع الألجينات بنسبة 10% يعزز الحماية لاحتوائه على الكازئين وبروتينات الشرش واللاكتوز الذي تستهلكه الجراثيم، وماء البيتون الذي يقلل أضرار انخفاض الحرارة، إضافة إلى أن الكايتوسان كطبقة ثانية يوفر دعماً إضافياً لحماية وتعزيز العيوشة للألجينات الأولى لمدة أطول مقارنة بطبقة واحدة، وبالمقارنة مع غير المغلفة التي تحتوي على بروتينات الحليب فقط ذات التأثير الأقل في الحماية، كما أن استعمال تقنية البثق في التغليف الدقيق ينتج أغلفة بأقل أضرار للخلايا المغلفة مقارنة بالرش والتجفيف اللذين يستعملان درجات حرارة مؤذية، مما يبقي المعززات بأعداد عالية ومطلوبة للفوائد الصحية (Krasaekoopt *et al*., 2006; Lee, 2012; Chávarri *et al*., 2010; Ivanovska *et al*., 2014).

5-5. تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على الحيوانات السليمة:

إن سلامة صحة الجسم تأتي من سلامة الجهاز الهضمي وتحديداً سلامة الأمعاء وقدرتها على امتصاص العناصر الغذائية، التي بدورها تعمل على تحسين الزيادة الوزنية للجسم وتحسين معامل التحويل العلفي.

يُعد تكوين ميكروبات الأمعاء ضروريًا للحفاظ على التوازن المعوي والحالة الصحية العامة للطيور. وللميكروبيوم المعوي دور حيوي في الحفاظ على صحة الأمعاء وإنتاجيتها، بما في ذلك هضم الطعام وامتصاصه، وتطور الجهاز المناعي، واستبعاد مسببات الأمراض، والحفاظ على الوظائف الفسيولوجية الطبيعية (Shang *et al.*, 2018; Rychlik, 2020).

وفي هذه الدراسة تبين أن المجموعات التي تم تغذيتها على المعززات الحيوية *L. acidophilus* و *L. plantarum* معاً سواء الغير مغلفة والمغلفة بطبقة واحدة والمغلفة بطبيقتين بجرعة($\log_{10}$ cfu/g 7<) حسّنت متوسط الزيادة اليومية في الوزن ومعدل التحويل الغذائي ونسبة النفوق لدجاج التسمين طوال فترة التجربة التي استمرت 42 يومًا، بينما لم يكن هناك فروق معنوية للمعززات الحيوية بأشكالها الثلاث على متوسط الاستهلاك اليومي من العلف مقارنةً بمجموعة الشاهد. وهذا يدل على التأثير الايجابي بقابلية الهضم والامتصاص الذي انعكس على وزن الجسم النهائي ومعامل التحويل. وتوافقت نتائجنا مع Sorescu وآخرون (2019) الذي تبين معه أن المكملات الغذائية الفموية لدجاج التسمين القائمة على بروبيوتيك جراثيم *Lactobacillus* (بجرعات تبدأ من7 – 9 $\log_{10}$ cfu/g لكل طائر) قد زادت من إجمالي جراثيم *Lactobacillus* في الجهاز الهضمي، وارتفاع الزغابات، مع تحسين أداء الدجاج. وقد أظهرت العديد من الدراسات أن البروبيوتيك يمكن أن تُغير وتُعدل تنوع وتركيب ميكروبات الأمعاء، مما يُحدث العديد من الآثار المفيدة على صحة وإنتاجية دجاج التسمين (Zhang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2021).

وتوافقت النتائج مع دراسة قام بها Vimon وآخرون (2023) إذ تبين أن المكملات الغذائية المحتوية على *L. plantarum* المغلفة حسّنت متوسط الزيادة اليومية في الوزن ومعدل التحويل الغذائي لدجاج التسمين طوال فترة التجربة التي استمرت 42 يومًا، بينما لم تؤثر *L. plantarum* المغلفة على متوسط الاستهلاك اليومي من العلف مقارنةً بمجموعة الشاهد. وحسّن كلٌّ من *L. plantarum* الحر و*L. plantarum* المغلفة من قابلية الهضم الظاهرية للبروتين الخام ومستخلص الأثير في الأمعاء الدقيقة مقارنةً بمجموعة الشاهد. وأظهر دجاج التسمين الذي تغذى على نظام غذائي مضاف إليه *L. plantarum* المغلفة تأثيرًا إيجابيًا على الشكل النسيجي المعوي لارتفاع الزغابات، وعمق القبو، ونسبة ارتفاع الزغابات إلى عمق القبو مقارنةً بمجموعة الشاهد.

وعلاوة على ذلك فقد زادت التغذية بال *L. plantarum* المغلفة أعداد كلٍّ من *Lactobacillus* و*Enterococcus* مقارنةً بالمجموعات الاخرى. وهذا ايضا توافقت النتائج مع Gyawali وآخرون (2022) حيث تبين معهم أن اعطاء المكملات الغذائية المحضرة عن طريق تغليف *Lactobacillus paracasei* في راتنج بولي أكريلات، لدجاج اللاحم تمنحه فوائد صحية دون التأثير على أداء النمو وخصائص الذبيحة. وفي الوقت نفسه، أظهرت دجاج اللاحم التي تتغذى على هذه الجراثيم المغلفة عملَ على زيادة في ارتفاع الزغابات ونسبة ارتفاع الزغابات إلى عمق القبو، مما حسن مورفولوجيا الأمعاء. علاوة على ذلك، أثر التغليف الدقيق للجراثيم المذكورة على الجهاز المناعي عن طريق تقليل الالتهاب وأظهرت تأثيرًا محتملًا كمضاد للأكسدة عن طريق تقليل الضرر التأكسدي ورفع القدرة الكلية لمضادات الأكسدة. وعدل التغليف الدقيق بشكل مفيد ميكروبيوتا الأعور وخفضت مستوى الأمونيا. من هذه النتيجة، يمكن الاستنتاج أنه يمكن استخدام الكبسولة الدقيقة الجديدة كبديل للمضادات الحيوية لتقليل التأثير السام على الإنسان والبيئة دون التأثير على أداء نمو الطيور (Gyawali *et al.*, 2022).

وفقًا لـ Zhang وآخرون (2015) الذين أفادوا بأن كبسولات الدقيقة من البروبيوتيك أظهرت إطلاقًا متأخرًا في المعدة وعملت لاحقًا في الأمعاء، مما أدى إلى انتشار الحيوية *L. acidophilus* و *L. plantarum* في الجزء السفلي من الأمعاء. وبالتالي، قد يحافظ التغليف الدقيق على أكبر كمية ممكنة من المركب النشط بيولوجيًا، مما يحسن وظيفة الأمعاء وهذا ما يتوافق مع Vimon وآخرون (2023).

من ناحية أخرى، يؤدي نوع الميكروفلورا المعوية دوراً محورياً في تحسين الهضم؛ فحسب ما أشار إليه (Jin, 2000)، فإن إعطاء الطيور خليطاً من عدة سلالات من العصيات اللبنية يرفع من نشاط إنزيم الأميليز في الأمعاء الدقيقة لفروج اللحم، مما يحسن الهضم والامتصاص، وبالتالي يزيد الإنتاجية والمردود الاقتصادي. ويتكامل هذا التحسن مع تعزيز الوضع الصحي والمناعي والسلامة المعوية، حيث تتجه الطاقة الغذائية نحو الإنتاج بدلاً من مقاومة الإصابات المرضية، مما ينعكس إيجاباً على الأداء الإنتاجي (AL-Danki, 2003).

وقد بحث Gyawali وآخرون (2022) في إضافة جراثيم *L. paracasei* المُغلّفة إلى العلف يمكن أن يُعزز وظيفة مضادات الأكسدة. وتتوافق دراسته مع دراسات سابقة التي تُشير إلى أن البروبيوتيك يُظهر خصائص مضادة للأكسدة (He *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2021) .

وقد أظهرت الأبحاث السابقة التي أجريت على الدجاج أن الطيور التي تتغذى على المكملات الغذائية التي تحتوي على سلالات *Lactobacillus* تحسنات كبيرة في تحويل العلف المستهلك ومتوسط الزيادة الوزنية اليومية (Jahromi *et al.*, 2017) .

علاوة على ذلك، كانت هناك تحسنات كبيرة في وزن الجسم وزيادة الوزن للدجاج اللاحم الذي يتغذى على سلالات *Lactobacillus* مقارنة بالدجاج اللاحم الذي يعطى أوكسي تتراسيكلين كمحفز للنمو (Zulkifli *et al.*, 2000). وقد ثبت في العديد من الدراسات أن البروبيوتيك يعزز امتصاص العناصر الغذائية، مما يعزز بدوره أداء نمو الدجاج اللاحم (Faseleh *et al.*, 2016). بالإضافة إلى دراسات أخرى (الجدول رقم (40)).

وتشير الدراسات إلى أن فعالية البروبيوتيك تعتمد على عدة عوامل، من أبرزها طبيعة سلالات الجراثيم المكونة له، ومستوى الإضافة، وتركيب العلف، والحالة الفزيولوجية للحيوان، والظروف البيئية المحيطة (Aluwong *et al.*, 2013).

إذ يُعتقد أن هذه البروبيوتيك تُؤدي إلى زيادة توافر العناصر الغذائية للامتصاص من خلال تثبيط نموّ مسببات الأمراض المعوية وأنشطتها الاستقلابية، بالإضافة إلى تغييرات في نموّ الأمعاء وشكلها ووظيفتها، مثل انخفاض سُمك ظهارة الأمعاء ودوران الخلايا الظهارية. علاوةً على ذلك، قد يشمل هذا على الأرجح إفرازًا مُحفّزًا للصفراء والمخاط والإنزيمات الذاتية (التربسين، والكيموتريبسين، والليباز، والأميليز) في البنكرياس وجدار الأمعاء بواسطة جراثيم البروبيوتيك (Obajuluwa *et al.*, 2020).

6-5. تأثير جراثيم *Lactobacillus* قبل التغليف وبعد التغليف على حيوانات مرضية:

تُعد الجراثيم المعوية الدقيقة مستقرة إلى حد كبير ولكنها تتأثر بالعوامل البيئية المختلفة والحالة الصحية للحيوانات وتشمل العوامل البيئية العلف وظروف النظافة الصحية والإجهاد.

تعتبر القناة الهضمية أكبر جهاز مناعي للجسم، وذلك بسبب احتوائها على عوامل متعددة تؤهلها لذلك، مثلاً احتواءها على النبيت المعوي الذي له الدور الفعال في مقاومة مسببات الامراض (Blaut and Clavel, 2007)، مثل جراثيم حمض اللبن إذ تمتلك مواصفات متعددة تؤهلها أن تقوم بتثبيط الأحياء الدقيقة المتواجدة في القناة الهضمية ومعالجة الاضطرابات في الجهاز الهضمي، إذ أن معظم الأمراض التي تصيب الجهاز الهضمي والمنقولة خلال الأغذية تعتبر السبب الرئيس لوفاة معظم البشر والحيوانات في كل أنحاء العالم (Thirabunyanon, 2011).

إن من بين أهم فوائد المعززات الحيوية سواء كانت سلالة مفردة أو مجموعة من السلالات هي تحسين مناعة الجسم عامة والجهاز الهضمي خاصة، ولا سيما تحسين قوة الجدار المخاطي للأمعاء والعمل على تحقيق توازن النظام البيئي للنبيت المعوي في الجسم، لقدرتها على الالتصاق بجدار الطبقة المخاطية للأمعاء، والذي يؤدي إلى منع استيطان ونمو الأحياء المرضية في الأمعاء وكذلك عن طريق منافستها على المواد الغذائية (Pandey *et al.*, 2015).

تدعم الدراسات السابقة، الجدول رقم (41)، بالإضافة إلى الدراسة التي أجراها Attia وآخرون (2020) و Duangnumsawang وآخرون (2021) دور البروبيوتيك في تعزيز التوازن الميكروبي في الجهاز الهضمي، ومنع نمو الجراثيم المُمرضة، وتعزيز الاستجابة المناعية. فهي تُحفز إنتاج الإنزيمات المسؤولة عن تحسين الهضم والامتصاص، مما يؤدي إلى تحسين الإنتاجية. ووفقًا لـ Rouissi وآخرون (2021)، فبينما لا تستعمر الخميرة الجهاز الهضمي، إلا أنها تُعزز نشاط ثنائيات السكاريد، وتُحفز الاستجابة المناعية الفطرية، وتُحدث تأثيرات مُضادة لمسببات الأمراض، مما يُعزز في النهاية الغلة الإنتاجية، بالإضافة إلى ذلك، فإن وجود الأحماض العضوية، وخاصة *Lactobacillus*، يمكن أن يخفض درجة الحموضة في الأمعاء، مما يثبط نمو الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض (Stefanello *et al.*, 2020). وهذا يدعم نتائج دراستنا حيث أظهرت مجموعة (H, I) مقاومة جيدة ضد الاشريكية القولونية، عكس مجموعة (F) التي أظهرت تدهور في الحالة الصحية، وهذا ما أكده Wang وآخرون (2023) أن جراثيم LAB حسّنت أداء النمو وصحة حاجز الأمعاء وتوازن الجراثيم المعوية والحماية المناعية لدجاج التسمين.

وبينت دراسة Śliżewska وآخرون (2020) زيادة في أعداد البيفيدوباكتيريوم (*Bifidobacterium* sp.) والعصيات اللبنية (*Lactobacillus* sp.) وانخفاض في مستوى المطثيات (*Clostridium* sp.) والإشريكية القولونية (*E. coli*) عند تناول الدجاج عن طريق العلف مزيجاً (سينبيوتيك) من *L. pentosus* ، *L. reuteri* ، *L. plantarum* ، *Saccharomyces cerevisiae* ، *L. rhamnosus* ، *L. paracasei* ، إينولين 2%.

وأفاد Song وآخرون (2019) أن التغليف الدقيقة لجراثيم *L. Plantarum* بشكل ملحوظ من أعداد *Lactobacillus* و *Enterococcus* وأكد أن بقاء *Enterococcus* و *Lactobacillus* بالأعداد الكبيرة يوفر حماية أفضل ضد اضطرابات الجهاز الهضمي. أفاد Loh وآخرون (2013) أنه تم الإبلاغ عن زيادة في أعداد جراثيم *Lactobacillus* بعد إضافة أربع مجموعات من المستقلبات المشتقة من *L. plantarum* إلى أعلاف الدجاج اللاحم والبياض. والسبب الرئيسي لهذا التأثير هو أن البروبيوتيك لديه القدرة على تعزيز نمو الجراثيم المفيدة (*Lactobacillus* و *Enterococcus*) مع إعاقة نمو الجراثيم المسببة للأمراض في ظهارة الأمعاء (Loh *et al.*, 2013).

يؤكد Milián وآخرون (2021) أن هذه الكائنات الدقيقة تلعب دورًا مهمًا في عمليات الهضم لأنها تُعزز زيادة النشاط التحفيزي للإنزيمات الهضمية، مما يسمح بتحلل الجزيئات الكبيرة إلى جزيئات أصغر، والتي يسهل نشرها وامتصاصها بواسطة جدران الأمعاء. وبالمثل أشار Anadón وآخرون (2019) إلى أن إعطاء البروبيوتيك يمكن أن يحفز الجهاز المناعي بعدة طرق: زيادة نشاط الخلايا البلعمية وزيادة قدرتها على بلعمة جزيئات الكائنات الحية الدقيقة، وزيادة إنتاج الغلوبولينات المناعية G وM والإنترفيرون، وزيادة الأجسام المضادة الموضعية على الأسطح المخاطية (Rodríguez *et al.*, 2023)، وبالتالي فإن تحسين الحالة الصحية للطيور من خلال هذا الجانب يعزز كفاءة الجهاز الهضمي.

من المعروف أن السموم الجرثومية لها آثار سلبية على مورفولوجيا الأمعاء، وقد أُفيد أن *L. plantarum* تقضي على الجراثيم المسببة للأمراض عن طريق إنتاج سموم جرثومية تسمى "باسيتراسين" (Thu *et al.*, 2011) ونتيجة لذلك، يحد الباسيتراسين من إنتاج المركبات السامة ويقلل من تلف الخلايا الظهارية المعوية لدجاج التسمين.

تشمل الجراثيم البروتينية مجموعةً واسعةً من مسببات الأمراض، بما في ذلك السلمونيلة والإشريكية القولونية. يكشف انخفاض عدد الجراثيم البروتينية أن تناول البروبيوتيك المُغلّف يمكن أن يقلل من الجراثيم المسببة

للأمراض. أشارت نتائج سابقة أيضًا إلى أن تناول البروبيوتيك يُقلل من مسببات الأمراض، بما في ذلك الإشريكية القولونية والسالمونيلة (الجدول رقم (42)).

شجعت إضافة *Lactobacillus spp* و*Bifidobacterium spp*. هضمًا كليًا واضحًا في الجهاز الهضمي لدجاج التسمين المُصاب بـ *Clostridium perfringens* عن طريق الفم (Zeng *et al.*, 2015)، حيث يهدف تناول الكائنات الحية الدقيقة (البروبيوتيك) إلى تعديل بيئة الأمعاء وتعزيز وظيفة حاجز الأمعاء من خلال تقوية الأعضاء المفيدة للجراثيم المعوية، والاستبعاد التنافسي لمسببات الأمراض، وتحفيز الجهاز المناعي المعوية.

وفي هذا السياق، أوضح (Murray, 2004) أن إضافة نوعين من جراثيم العصيات اللبنية (*Lactobacillus plantarum* و*Lactobacillus salivarius*) ضمن البروبيوتيك يؤدي إلى تخمير الكربوهيدرات، مما يزيد من تركيز كل من حمض اللبن وحمض الخل. تسهم هذه الأحماض في تثبيط نمو الجراثيم الممرضة مثل الإشريكية القولونية (*E. coli*)، والسلمونيلة تيفيموريوم (*S. typhimurium*)، والكلوستريديوم بيرفرنجنس (*C. perfringens*)، وينعكس ذلك إيجابياً على صحة الطيور وخفض معدلات النفوق طوال فترة التربية.

وقد حسنت *L. acidophilus* عن طريق العلف الاستجابة المناعية في الدجاج المختبر بالاشريكية القولونية O157 (Wu *et al.*, 2021). وثبطت كل من (نباتات طبية صينية + *B. subtilis* + *L. acidophilus*) الاشريكية القولونية وقللت نسبة النفوق مع تحسين الزيادة الوزنية عندما أعطيت عن طريق الماء (Liang *et al.*, 2021)، وهذا ما وجده Lokapirnasari وآخرون (2025) في دور استخدام البروبيوتيك في معالجة الاشريكية القولونية (APEC). و عن إمكانية استخدام بروبيوتيك كمواد للوقاية من إسهال الصيصان الناجم عن APEC والسلمونيلة (Cui *et al.*, 2025).

هذا يدل على أن جراثيم *Lactobacillus* لها دورا هاما في تحفيز آلية الدفاع وهي ذات قدرة في التغلب على التأثيرات المرضية التي تسببها جراثيم *E.coli* (Perdigon *et al.*, 1995; Al -Thwani *et al.*, 2010; Al –Thawani *et al.*, 2012)، لقد اكدت الكثير من الدراسات والبحوث التي استعملت الحيوانات المختبرية أن جراثيم *Lactobacillus* تعمل كحاجز ضد الجراثيم المسببة للأمراض وخاصة تلك المسببة للإسهال (الإشريكية القولونية والسلمونيلة)، وهذا قد يعود إلى أسباب متعددة كالتصاقها بجدران الخلايا الطلائية للأمعاء فضلا عن انتاجها للمواد والمركبات مثل Cytokines والبكتريوسينات التي لها تأثيرا قاتلا (Navidshad *et al.*, 2012)

ولها القدرة على الارتباط بمستقبلات الخلايا المتخصصة والموجودة على الغشاء البلازمي للخلية الجرثومية مما تسبب تدفق غير مسيطر عليهِ للأحماض الامينية والايونات موجبة الشحن، ومن ثم تسبب انفجار الغشاء الخلوي وموت الجراثيم الحساسة له التي تساهم في مقاومة وتثبيط الميكروبات المرضية (Mishra and Lambert, 1996)، ولا يعود الفعل التثبيطي إلى إنتاج المعزز الحيوي للأحماض العضوية، وذلك لكون جراثيم *E.coli* تمتلك نظام المقاومة للأحماض العضوية المنتجة من قبل الجراثيم العلاجية (Ogawa *et al*., 2001).

إن عملية تأزر أنواع المعززات الحيوية يعطي نتائج ايجابية في تثبيط الجراثيم المرضية مثل *Escherichia coli , Staphylococcus aureus,* وهذا يتفق مع Hamid (2005) الذي وجد أن عملية دمج خليط ثنائي (*Bifidobacterium+L.acidophilus*) والخليط الثلاثي *L.acidophilus + L. reuteri+* (*Bifidobacterium*) مقدرة تثبيطية جيدة ضد الجراثيم *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* , *Salmonella typhimurium* , *Staphylococcus aureus* المعزولة من إصابات حيوانية.

ترتبط الحالة الصحية للحيوان وأداء نموه ارتباطًا مباشرًا بصحة أمعائه وجراثيم الأمعاء الدقيقة، فالأمعاء الصحية تكون أكثر دفاعية ضد الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض وتعمل بكفاءة أعلى لامتصاص العناصر الغذائية. كما أن وجود ميكروبيوتا معوية مستقرة أمر ضروري لتجنب العدوى في الأمعاء، مما يفيد الحيوان بطرق مختلفة، وذلك عن طريق منع استعمار مسببات الأمراض من خلال التضاد البكتيري أو احتلال مواقع الالتصاق في الأمعاء والتداخل مع الأنشطة الجرثومية للجراثيم الضارة والتنافس على العناصر الغذائية، بالإضافة إلى انتاج عوامل مضادة للجراثيم مثل البكتريوسينات.

الفصل السادس

الإستنتاجات و التوصيات

CONCLUSIONS
and
RECOMMENDATIONS

الاستنتاجات

1) تم عزل وتشخيص 11 عزلة من *Lactobacillus* (*L. acidophilus , L. plantarum*) من أمعاء دجاج اللحم، مؤكدة بالفحص الجزيئي (PCR).
2) أظهرت العزلات قدرة واضحة على تثبيط الجراثيم الممرضة (*E. coli*، *Salmonella*، *Staph. aureus*)، خاصة عبر رواشحها الجرثومية الغنية بالمواد المضادة للميكروبات.
3) أثبتت تقنية البثق كفاءتها في تغليف الجراثيم بطبقة واحدة (ألجينات) وطبقتين (ألجينات + كايتوسان)، منتجة حبيبات منتظمة حافظت على أعداد حية كافية للفائدة العلاجية.
4) وفر التغليف بطبقتين حماية متفوقة للجراثيم ضد البسترة (البطيئة والسريعة)، محافظاً على نسب بقاء مرتفعة مقارنة بالشاهد.
5) حسّن التغليف بطبقتين بشكل كبير من بقاء الجراثيم في الظروف الحامضية الشديدة (pH 2 و 3) لمدة 3 ساعات، بينما فشلت الطبقة الواحدة في الحماية عند pH 1.
6) أظهر التغليف بطبقتين فعالية كبرى في حماية الجراثيم من التأثير القاتل لأملاح الصفراء بتراكيز مختلفة (1% – 3%)، مع نسب بقاء قاربت 97%.
7) حافظ التغليف الدقيق (خاصة بطبقتين) على حيوية الجراثيم بنسبة عالية (~98%) خلال التخزين المبرد (4°م) لمدة شهرين، مقارنة بالشاهد (~95%).
8) أدى تغذية الطيور السليمة على المعززات المغلفة بطبقتين إلى تحسين معنوي في الوزن النهائي ومعامل التحويل وتقليل النفوق، متفوقة على المضاد الحيوي.
9) حققت الطيور التي تغذت على المعززات المغلفة بطبقتين قبل التحدي بجراثيم *E. coli* مقاومة أفضل للعدوى، مع أعلى وزن وأقل نفوق.
10) أثبت التغليف بطبقتين تفوقاً واضحاً على التغليف بطبقة واحدة والشاهد، مما يؤكد فعاليته كاستراتيجية واعدة لإنتاج معززات حيوية محمية قادرة على تعزيز الصحة والأداء الإنتاجي كبديل آمن للمضادات الحيوية في صناعة الدواجن.

التوصيات

1) يُوصى باستخدام تقنية التغليف الدقيق بطبقتين (ألجينات الصوديوم والكايتوسان) على نطاق تجاري لحماية المعززات الحيوية وضمان وصولها بأعداد كافية وفعالة إلى أمعاء الطيور.
2) يُقترح إدراج المعززات الحيوية المغلفة بطبقتين (خاصة *L. acidophilus* و *L. plantarum*) في علائق دجاج اللحم كبديل طبيعي وفعال للمضادات الحيوية المعززة للنمو، لما لها من تأثير إيجابي في تحسين الأداء الإنتاجي وتعزيز الصحة العامة.
3) إجراء المزيد من الدراسات لعزل وتشخيص أنواع وسلالات أخرى من جراثيم *Lactobacillus* من مصادر محلية مختلفة، وتقييم كفاءتها كمعززات حيوية بعد تغليفها.
4) اختبار مواد تغليف طبيعية أخرى (مثل بروتينات مصل الحليب، النشا المعدل، أو صمغ الزانثان) ومقارنة كفاءتها مع الألجينات والكايتوسان في حماية المعززات الحيوية.
5) العمل على تطوير وتحسين ظروف عملية التغليف الدقيق (مثل درجة الحرارة، سرعة التقطير، وتركيز المواد) بهدف رفع نسبة الأعداد الحية الباقية بعد التغليف إلى أقصى حد ممكن.
6) إجراء أبحاث مستقبلية لفهم الآليات الجزيئية والمناعية التي تفسر بشكل أدق كيفية تعزيز المعززات الحيوية المغلفة للمناعة وتحسينها لامتصاص العناصر الغذائية في الأمعاء.
7) تقييم فعالية استخدام خليط من سلالات متعددة من جراثيم *Lactobacillus* المغلفة (مثل المزج بين *L. acidophilus* و *L. plantarum*) ومقارنة تأثيرها التآزري في صحة وأداء الطيور مقارنة باستخدام سلالة واحدة.
8) إجراء تقييم اقتصادي شامل لتحليل التكلفة والعائد من استخدام المعززات الحيوية المغلفة على نطاق تجاري في مزارع الدواجن.
9) تعميم دراسة تأثير المعززات الحيوية المغلفة على أنواع أخرى من الدواجن (مثل الدجاج البياض، الديك الرومي، والبط) لتأكيد فعاليتها وتحسين إنتاجيتها وصحتها.
10) دراسة تأثير إضافة المعززات الحيوية المغلفة على الخصائص الحسية والفيزيائية والكيميائية للحوم الدجاج، وضمان عدم وجود أي تأثيرات سلبية على جودة المنتج النهائي وسلامته للمستهلك.

الفصل السابع

المراجع

REFERENCES

المراجع العربية

1. **اشقيفي، محمد حكمت مصطفى، (2023).** التأثير الصحي الوقائي لاستخدام بعض البدائل الصحية في صحة الفروج، رسالة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة حماة.
2. **العيسى، عبدالله.، علوش، ميساء (2006).** أساسيات علم الأحياء الدقيقة (الجزء العملي)، منشورات جامعة البعث، كلية الزراعة.
3. **الوينـداوي، عبـاس حميـد شـكور.، زويـن، لمـى عبـدالهادي، (2020).** الاختبـارات الكيمياحيويـة التشخيصية للبكتريا دار الكتب والوثائق، بغداد .
4. **تلي، محمد، (2016).** تحضير مواد بوليميرية فائقة الامتصاص جديدة وفق تقانتي اصطناع جديدتين واختبارها في التطبيقات الزراعية، رسالة دكتوراه في علوم وهندسة المواد، المعهد العالي للعلوم التطبيقية والتكنولوجيا
5. **عطرة، سلمى، (2020).** تحضير حبيبات ألجينات كالسيوم حاوية على ايبوبروفن وضبط الصيغة الصيدلانية وبعض شروط التحضير، رسالة ماجستير، كلية الصيدلة، جامعة البعث.
6. **لقمس، عمر عبدالعزيز، (2023).** تأثير البروبيوتيك والأحماض العضوية في الوقاية من داء الأكريات عند دجاج اللحم، رسالة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة حماة.

المصادر الأجنبية

1. **Abbas Hilmi, H. T., Surakka, A., Apajalahti, J., & Saris, P. E. (2007).** Identification of the most abundant *Lactobacillus species* in the crop of 1-and 5-week-old broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, *73*(24), 7867-7873.
2. **Abbas, M. S., Saeed, F., Afzaal, M., Jianfeng, L., Hussain, M., Ikram, A., & Jabeen, A. (2022).** Recent trends in encapsulation of probiotics in dairy and beverage: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(7), e16689.
3. **Abdulla, A. A., Jebor, M. A., Abed, T. A., & Noshee, M. J. (2013).** Isolation and Identification by PCR and Analysis for Probiotic Properties of *Lactobacillusspp* from Dairy Products. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 3, 12.
4. **Abrahamsson, T. R., Sinkiewicz, G., Jakobsson, T., Fredrikson, M., & Björkstén, B. (2009).** Probiotic *lactobacilli* in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 49(3), 349-354.
5. **Abubakr, M. A., & Al-Adiwish, W. M. (2017).** Isolation and identification of *lactic acid bacteria* from different fruits with proteolytic activity. International Journal of Microbiology and Biotechnology, 2(2), 58-64.
6. **Adeful, García-Ceja, Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2015).** Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. LWT-Food Science and Technology, 63(1), 482-489.
7. **Adesulu-Dahunsi, A. T., Dahunsi, S. O., & Ajayeoba, T. A. (2022).** Co-occurrence of *Lactobacillus Species* During Fermentation of African Indigenous Foods: Impact on Food Safety and Shelf-Life Extension. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 684730.
8. **Ahmed, R. Z., & Abdullah, R. M. (2025).** Probiotics and Their Effect on Pathogenic Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Review. Journal of Biotechnology Research Center, 19(2), 85-95.
9. **Ahmed, Z., Vohra, M. S., Khan, M. N., Ahmed, A., & Khan, T. A. (2019).** Antimicrobial role of *Lactobacillus species* as potential probiotics against enteropathogenic bacteria in chickens. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *13*(02), 130-136.
10. **Ainsley-Reid, A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P., & Vuillemard, J. C. (2007).** Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus R011* microentrapped in whey protein gel particles. Journal of Food Science, 72(1).

11. **Akolade, J. O., Oloyede, H. O. B., & Onyenekwe, P. C. (2017).** Encapsulation in chitosan-based polyelectrolyte complexes enhances antidiabetic activity of curcumin. *Journal of functional foods*, *35*, 584-594.
12. **Akram, M. Z. (2025).** Hatching and Nutritional Strategies to Improve Broiler Performance and Flock Homogeneity through Modulation of Gut Health and Microbiota (Doctoral dissertation, Universite de Liege (Belgium)).
13. **Albaker, A. Keder , Saleh, M. and Alaaleh, A. (2026**). Synergisric effects of bacteriophages and antibiotics against Shiga toxigenic *Escherichia Coli* isolatrd from diarrheic calves. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology, 18(2), 68-79. doi: 10.22067/ijvst.2026.96481.1617
14. **Al–Bayati, M. A. S. (2018**). The Effect Of Microencapsulation For Some Probiotics and Application in Some Food Systems. College of Agriculture. University of Baghdad**.**
15. **Al-Danki, Z. T. M. (2003).** Production of Local Probiotic for Study Its Effect on Productive Traits of Broiler,Layers and broiler breeders. Ph.D. Thesis,Coll.of Agric., Univ.of Baghdad.
16. **Alkhalf, A., Alhaj, M., & Al-Homidan, I. (2010).** Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. Saudi journal of biological sciences, 17(3), 219-225.
17. **Al-Marsoomy, M. H. (2008).** Protectiv effect of *Lb.plantarum* and *Lb.casei* used as probiotic agent against enterotaxigenic E.coli in vitro and in vivo >A Thesis B.Sci.biotechnology- AL-Nahrain Unevercity.
18. **Al-Qassab, A. J. O. (1988).** Antagonistic effect of *Lactobacillus sp*. on some pathogenic bacteria (Master's thesis).
19. **Al-Sahlany, S. T., Khassaf, W. H., Al-Manhel, A. J., & Al-Adeeb, A. B. (2022).** Historical perspective and definition of probiotics. In R. R. Watson (Ed.), Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health and Disease (2nd ed., pp. 3–12). Academic Press.
20. **Al-Shyraida, R. M. L., Alnouri, F. F. and Mohammed, A. A.** (2012). Effect of fermented foods by *Lactobacillus casei* on some types of bathogenic bacteria .Anbar Journal of Veterinary Science.vol. **5**(2): 237-245 .
21. **Al-Thawani, A. N., Mahood. R. A., and Abdul-Barrey, H. I. (2012).** In vitro and in vivo, antibacterial effect of *lactobacillus* and ethanolic extract of sage *Salvia officinalis* on enteropathogenic *E.coli* (EPEC).Journal of Biotechnology Research Center ,**6**(2).
22. **Al-Thwani, A. N., Ghanima, K, K., and Taqi, R. A.** (2010). Effect of Ethanol Extract of Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds and *Lactobacillus acidophilus* on Enteropathogenic *Escherichia coli in vitro* and *in vivo*. Iraqi Journal of Market Research and Consumer Protection,**2**(4):166-181 .
23. **Aluwong, T., Hassan, F. B., Raji, M. A., Kawu, M. U., Dzenda, T., & Ayo, J. O. (2013).** Effect of different levels of supplemental yeast on performance indices, serum enzymes and electrolytes of broiler chickens. African Journal of Biotechnology, 12(35).

24. **Anadón, A., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2019).** Prebiotics and probiotics in feed and animal health. *Nutraceuticals in veterinary medicine*, 261-285.
25. **Antunes, A. E. C., Liserre, A. M., Coelho, A. L. A., Menezes, C. R., Moreno, I., Yotsuyanagi, K., & Azambuja, N. C. (2013).** Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. LWT-Food Science and Technology, 54(1), 125-131.
26. **AOAC, (2016).** Official Methods of Analysis, 20th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
27. **Aragón-Rojas, S., Hernández-Álvarez, A. J., Mainville, I., Arcand, Y., & Quintanilla-Carvajal, M. X. (2020).** Effect of the carrier material, drying technology and dissolution media on the viability of *Lactobacillus fermentum K73* during simulated gastrointestinal transit. *Food & function*, *11*(3), 2339-2348.
28. **Årdal, C. O. (2024).** Attempting to improve access to "forgotten" antibiotics in Europe. French National ANTIBIOTIC RESISTANCE Portal
29. **Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019).** Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *Lwt*, *99*, 583-593.
30. **Arief, I. I., Jenie, B. S. L., Astawan, M., Fujiyama, K., & Witarto, A. B. (2015).** Identification and probiotic characteristics of *lactic acid bacteria* isolated from Indonesian local beef.
31. **Arief, I. I., Wulandari, Z., Aditia, E. L., & Baihaqi, M. (2014).** Physicochemical and microbiological properties of fermented lamb sausages using probiotic *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12 as starter culture. *Procedia Environmental Sciences*, *20*, 352-356.
32. **Ariful, I, M., Yun, C. H., Choi, Y. J., & Cho, C. S. (2010).** Microencapsulation of live probiotic bacteria. J Microbiol Biotechnol, 20(10), 1367-1377.
33. **Arslan-Tontul, S., & Erbas, M. (2017).** Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *Lwt-food science and technology*, *81*, 160-169.
34. **Arslan-Tontul, S., Erbas, M., & Gorgulu, A. (2019).** The use of probiotic-loaded single-and double-layered microcapsules in cake production. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *11*(3), 840-849.
35. **Asgari, S., Pourjavadi, A., Licht, T. R., Boisen, A., & Ajalloueian, F. (2020).** Polymeric carriers for enhanced delivery of probiotics. *Advanced drug delivery reviews*, *161*, 1-21.
36. **Assandri, M. H., Malamud, M., Valeff, N. J., Trejo, F. M., & Serradell, M. D. L. A. (2025).** Effect of co-administration of *lactobacilli* S-layer proteins on immune response against S-layer proteins from pathogenic Clostridioides difficile. Journal of Medical Microbiology, 74(9), 002068.
37. **Astawan, M., Wresdiyati, T., Aisah, S., & Nurjanah, S. (2019).** Characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian commercial tempeh probiotic. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 20-(8), 2312–2319.

38. **Atlas, R. M. (2010).** Handbook of Microbiological Media. 4th ed Taylor & Francis Group, USA.
39. **Attia, Y. A., Al-Khalaifah, H., Abd El-Hamid, H. S., Al-Harthi, M. A., & El-Shafey, A. A. (2020).** Effect of different levels of multienzymes on immune response, blood hematology and biochemistry, antioxidants status and organs histology of broiler chicks fed standard and low-density diets. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 510.
40. **Axelsson, L. T. (1998).** *Lactic acid bacteria*: classification and Physiology. in: *Lactic acid bacteria*: microbiology and functional aspects, 2nd ed. Salminen, S. and A. Von Wright eds. Marcel Dekker Inc., New York, PP:1-72.
41. **Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R. & Ibrahim, S. A. (2020).** *Lactic acid bacteria*: Food safety and human health applications. *Dairy*, *1*(3): 202-232.
42. **Aziz, G., Fakhar, H., ur Rahman, S., Tariq, M., & Zaidi, A. (2019).** An assessment of the aggregation and probiotic characteristics of *Lactobacillus species* isolated from native (desi) chicken gut. *Journal of Applied Poultry Research*, *28*(4), 846-857.
43. **Bahule, C. E., & Silva, T. N. S. (2021).** Probiotics as a Promising Additive. *Advances in Poultry Nutrition Research*, 145.
44. **Balasubramanian, R., Narayanan, K. R., Chairman, K., Premalatha, M., and Ranjit Singh, A. J. A.** (2013). Isolation and screening of probiotics isolation from cow's milk and its antimicrobiolL activity. World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences . **2**(4) 1851-1865.
45. **Baldwin, C., Millette, M., Oth, D., Ruiz, M. T., Luquet, F. M., & Lacroix, M. (2010).** Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. Nutrition and cancer, 62(3), 371-378.
46. **Bampi, G. B., Backes, G. T., Cansian, R. L., de Matos Jr, F. E., Ansolin, I. M. A., Poleto, B. C., & Favaro-Trindade, C. S. (2016).** Spray chilling microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* animalis subsp. lactis and its use in the preparation of savory probiotic cereal bars. Food and bioprocess technology, 9(8), 1422-1428.
47. **Banerjee, S., Kanaujia, A., Malik, S., & Sharma, S. (2022).** Bacteriocins: potential usages and mechanism of action. Inte. J. of Recent Advances in Multidisciplinary Research, 9(8): 7897-7906.
48. **Barbosa, M. S., Jurkiewicz, C., Landgraf, M., Todorov, S. D., & Franco, B. D. G. D. M. (2018).** Effect of proteins, glucose and NaCl on growth, biosynthesis and functionality of bacteriocins of *Lactobacillus sakei* subsp. sakei 2a in foods during storage at 4°C: Tests in food models. LWT - Food Science and Technology, 95: 167-171.
49. **Bauer, A. M., and Kirby, W. M.** (1966).Antibiotics susceptibility testing by a standarised single disc method .A.M.J.Clin.Pathol.,**45**:493-496 .

50. **Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., & Biron, E. (2018).** Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. Scientific reports, 8(1), 9029.
51. **Begley, M., Gahan, C. G., & Hill, C. (2005).** The interaction between bacteria and bile. FEMS microbiology reviews, 29(4), 625-651.
52. **Beirão, B. C., Ingberman, M., Fávaro Jr, C., Mesa, D., Bittencourt, L. C., Fascina, V. B., & Caron, L. F. (2018).** Effect of an Enterococcus faecium probiotic on specific IgA following live Salmonella Enteritidis vaccination of layer chickens. Avian Pathology, 47(3), 325-333.
53. **Belkacem, B., Meriem, M., & Mebrouk, K. (2009).** Probiotic potential of thermotolerants lactobacilli isolated from chicken gastrointestinal digestive and their use as poultry feed. World Appl Sci J, 7(8), 951-7.
54. **Benítez-Chao, D. F., León-Buitimea, A., Lerma-Escalera, J. A., & Morones-Ramírez, J. R. (2021).** Bacteriocins: an overview of antimicrobial, toxicity, and biosafety assessment by in vivo models. Frontiers in microbiology, 12, 630695.
55. **Benson, H. J. (2002).** Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology .8th ed .The the McGraw-Hill Companies.USA.
56. **Bharti, V., Mehta, A., Mourya, G. K., Ahirwal, L., & Shukla, S. (2017).** Anti-hypercholesterolemia and anti-hyperlipidemic effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* in diabetic rats. *Food & Pharma International*, *1*(3), 150-155.
57. **Bigliardi, B., & Galati, F. (2013).** Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. Trends in Food Science & Technology, 31(2), 118-129.
58. **Bintsis, T. (2018).** *Lactic acid bacteria* as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. AIMS Microbiology, 4(4): 665– 684.
59. **Blaut, M., and Clavel, ,T. (2007).** Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. J Nutr ;**137**: S751-755 .
60. **Brashears, M. M., Jaroni, D., & Trimble, J. (2003)**. Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of Escherichia coli O157: H7 in cattle. *Journal of food protection*, *66*(3), 355- 363.
61. **Bromfield, J. I., Niknafs, S., Chen, X., von Hellens, J., Horyanto, D., Sun, B., ... & Roura, E. (2024).** The evaluation of next-generation probiotics on broiler growth performance, gut morphology, gut microbiome, nutrient digestibility, in addition to enzyme production of Bacillus spp. in vitro. Animal Nutrition, 18, 133-144.
62. **Buck, L. M., and Gilliland, S. E. (1994).** Comparisons of freshly isolated strains of Lactobacillus acidophilus of human intestinal origin for the ability to assimilate cholesterol during growth J. Diary Sci. 77: 2925-2933.
63. **Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011).** Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. Journal of food engineering, 104(4), 467-483.

64. **Bustamante, M., Oomah, B. D., Rubilar, M., & Shene, C. (2017).** Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (Salvia hispanica L.) and flaxseed (Linum usitatissimum L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food chemistry*, *216*, 97-105.
65. **Butnariu, M., & Sarac, I. (2019).** Functional food. International Journal of Nutrition, 3(3), 7-16.
66. **Butstraen, C., & Salaün, F. (2014).** Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. Carbohydrate polymers, 99, 608-616.
67. **Capcarova, M., Weiss, J., Hrncar, C., Kolesarova, A., & Pal, G. (2010).** Effect of Lactobacillus fermentum and Enterococcus faecium strains on internal milieu, antioxidant status and body weight of broiler chickens. Journal of animal physiology and animal nutrition, 94(5), e215-e224.
68. **Capozzi, V., Fiocco, D., Weidmann, S., Guzzo, J., & Spano, G. (2012).** Increasing membrane protection in Lactobacillus plantarum cells overproducing small heat shock proteins. Annals of microbiology, 62(2), 517-522.
69. **Champagne, C. P. & Fustier, P. (2007).** Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 184–190.
70. **Chang, C. W., Liu, C. Y., Lee, H. C., Huang, Y. H., Li, L. H., Chiau, J. S. C., & Chen, Y. J. (2018).** Lactobacillus casei variety rhamnosus probiotic preventively attenuates 5-fluorouracil/oxaliplatin-induced intestinal injury in a syngeneic colorectal cancer model. *Frontiers in microbiology*, *9*, 983.
71. **Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C. (2012).** Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In Probiotics. InTech
72. **Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarán, M. (2010).** Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. International journal of food microbiology, 142(1), 185-189.
73. **Chee, W. J. Y., Chew, S. Y., & Than, L. T. L. (2020).** Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. *Microbial cell factories*, *19*(1), 203.
74. **Chen, C. Y., Tsen, H. Y., Lin, C. L., Yu, B., & Chen, C. S. (2012).** Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce the Salmonella invasion and inflammation of broiler chicks. Poultry Science, 91(9), 2139-2147.
75. **Chen, J., Wang, Q., Liu, C. M., & Gong, J. (2017).** Issues deserve attention in encapsulating probiotics: Critical review of existing literature. *Critical reviews in food science and nutrition*, *57*(6), 1228-1238.
76. **Chen, M. J., & Chen, K. N. (2007).** Applications of probiotic encapsulation in dairy products. Encapsulation and controlled release technologies in food systems, 83-112.
77. **Cheng, F. (2015).** Microencapsulation and viability of a probiotic in a simulated gastrointestinal environment (Doctoral dissertation, University of Missouri--Columbia).

78. **Chew, S. C., Tan, C. H., Pui, L. P., Chong, P. N., Gunasekaran, B., & Lin, N. K. (2019).** Encapsulation technologies: A tool for functional foods development. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*, *8*(5), 154-162.
79. **Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018).** Functions and emerging applications of bacteriocins. Current Opinion in Biotechnology, 49: 23-28.
80. **Chitprasert, P., Sudsai, P., & Rodklongtan, A. (2012).** Aluminum carboxymethyl cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of Lactobacillus reuteri KUB-AC5. Carbohydrate polymers, 90(1), 78-86.
81. **Cho, S. S. and Finocchiaro, E. T. (2010).** Handbook of prebiotic and probiotics ingredient CRC. Press Taylor X Francis group. Printed in U.S.A.
82. **Chung, E. C., Lee, J. S., Lim, H. J., Kim, S. J., Chung, Y. J., & Shin, K. J. (2025).** Isolation and Characterization of Lactobacillus gasseri Strains from Women for Potential Vaginal Health Applications. Microbiology Research, 16(1), 12.
83. **Coates, M. E., & Fuller, R. (1977).** *The gnotobiotic animal in the study of gut microbiology* (Vol. 153, pp. 311-346). London: Academic Press.
84. **Colautti, A., Orecchia, E., Comi, G., & Iacumin, L. (2022).** Lactobacilli, a weapon to counteract pathogens through the inhibition of their virulence factors. Journal of bacteriology, 204(11), e00272-22.
85. **Comasio, A., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Verté, F., & De Vuyst, L. (2020).** Potential of bacteria from alternative fermented foods as starter cultures for the production of wheat sourdoughs. Microorganisms, 8(10), 1534.
86. **Connor, O. P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020).** Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. Current Opinion in Biotechnology, 61: 160-167.
87. **Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012).** Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release*, *162*(1), 56-67.
88. **Corona-Hernandez, R. I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., de la Rosa, L. A., & Wall-Medrano, A. (2013).** Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12(6), 614-628.
89. **Corsetti, A., & Settanni, L. (2007).** *Lactobacilli* in sourdough fermentation. Food research international, 40(5), 539-558.
90. **Cremon, C., Guglielmetti, S., Gargari, G., Taverniti, V., Castellazzi, A. M., Valsecchi, C., & Barbara, G. (2018).** Effect of Lactobacillus paracasei CNCM I-1572 on symptoms, gut microbiota, short chain fatty acids, and immune activation in patients with irritable bowel syndrome: A pilot randomized clinical trial. *United European gastroenterology journal*, *6*(4), 604-613.

91. **Cressman, M. D., Yu, Z., Nelson, M. C., Moeller, S. J., Lilburn, M. S., & Zerby, H. N.** (2010). Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, *76*(19), 6572-6582.
92. **Cui, Y., Liu, K., Chen, P., Jiang, P., Wang, X., Chen, N., ... & Li, Y. (2025).** Probiotic characteristics and protective effects of chicken-derived Enterococcus faecium against infection with Avian Pathogenic Escherichia coli and Salmonella in laying hens. Veterinary Microbiology, 110738.
93. **Cuma, D. F. (2018).** Microencapsulation using alginate systems: spray-coagulation versus superhydrophobic surfaces approach (Master's thesis, Instituto Politecnico de Braganca (Portugal)).
94. **da Silva, B. S., Díaz-Roa, A., Yamane, E. S., Hayashi, M. A., & Junior, P. I. S. (2023).** Doderlin: Isolation and characterization of a broad-spectrum antimicrobial peptide from Lactobacillus acidophilus. Research in Microbiology, 174(3): 103995.
95. **da Silva, S. B., de Souza, D., & Lacerda, L. D. (2019).** Food applications of chitosan and its derivatives. *Chitin and chitosan: Properties and applications*, 315-347.
96. **Dalloul, R. A., Lillehoj, H. S., Shellem, T. A., & Doerr, J. A. (2003).** Enhanced mucosal immunity against Eimeria acervulina in broilers fed a Lactobacillus-based probiotic. Poultry science, 82(1), 62-66.
97. **Damayanti, E., Herdian, H., Angwar, M., Febrisiantosa, A., & Istiqomah, L. (2012).** Lactic acid bacterial screening from gastrointestinal digestive tract of native and broiler chicken for probiotic candidate purposes. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture, 37(3), 168-175.
98. **Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M. & Kakanj, M. (2022).** Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory* Analysis, 36(1):e24093.
99. **De Angelis, M., & Gobbetti, M., (2004).** Environmental stress responses in Lactobacillus: A review. Proteomics 4, 106–122.
100. **de Araújo Etchepare, M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, É. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S., & de Menezes, C. R. (2016).** Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT*, *65*, 511-517.
101. **de Farias, T. G. S., Ladislau, H. F. L., Stamford, T. C. M., Medeiros, J. A. C., Soares, B. L. M., Arnaud, T. M. S., & Stamford, T. L. M. (2019).** Viabilities of Lactobacillus rhamnosus ASCC 290 and Lactobacillus casei ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. Lwt, 100, 391-396.
102. **de Lara Pedroso, D., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., & Favaro-Trindade, C. S. (2012).** Protection of Bifidobacterium lactis and Lactobacillus acidophilus by microencapsulation using spray-chilling. International Dairy Journal, 26(2), 127-132.

103. **de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018).** How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*, *36*(8), 2060-2076.
104. **De Roos, N. M., & Katan, M. B. (2000).** Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. The American journal of clinical nutrition, 71(2), 405-411.
105. **De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M. & Sikkema, J. (2010).** Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* **20**, 292–302.
106. **De Vrese, M., & Schrezenmeir, A. J. (2008).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Food biotechnology, 1-66.
107. **Dehghan, M., Mente, A., Rangarajan, S., Sheridan, P., Mohan, V., Iqbal, R., & Yusuf, S. (2018).** Association of dairy intake with cardiovascular disease and mortality in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. The Lancet, 392(10161), 2288-2297.
108. **Dehkordi, S. S., Alemzadeh, I., Vaziri, A. S., & Vossoughi, A. (2020).** Optimization of alginate-whey protein isolate microcapsules for survivability and release behavior of probiotic bacteria. *Applied biochemistry and biotechnology*, *190*(1), 182-196.
109. **Del Piano, M., Carmagnola, S., Ballarè, M., Sartori, M., Orsello, M., Balzarini, M., Pagliarulo, M., Tari, R., Anderloni, A., Strozzi, G.P. & Mogna, L., (2011).** Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics. Gut Microbes, 2(2), pp.120-123.
110. **Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J. C., & Iannitti, T. (2015).** Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. Journal of clinical pathology, jclinpath-2015.
111. **Dianawati, D. (2014).** Survival of encapsulated probiotic bacteria during storage at low water activity at ambient temperature (Doctoral dissertation, Victoria University).
112. **Dimitrellou, D., Kandylis, P., Lević, S., Petrović, T., Ivanović, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y. (2019).** Encapsulation of Lactobacillus casei ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *Lwt*, *116*, 108501.
113. **Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009).** An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. Journal of Food Science, 74(2).
114. **Dong, Z. L., Wang, Y. W., Song, D., Hou, Y. J., Wang, W. W., Qi, W. T., & Li, A. K. (2016).** The effects of dietary supplementation of pre-microencapsulated *Enterococcus* fecalis and the extract of Camellia oleifera seed on growth performance, intestinal morphology, and intestinal mucosal immune functions in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, *212*, 42-51.

115. **Duangnumsawang, Y., Zentek, J., & Goodarzi Boroojeni, F. (2021).** Development and functional properties of intestinal mucus layer in poultry. *Frontiers in immunology*, *12*, 745849.
116. **Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., & Walter, J. (2017).** Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus Lactobacillus. *FEMS microbiology reviews*, *41*(Supp_1), S27-S48.
117. **Dumitru, M., Ciurescu, G., & Sorescu, I. (2020).** In vitro evaluation of some probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from chickens' gut. *SCIENTIFIC PAPERS ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGIES*, *53*(1), 44-44.
118. **Dumitru, M., Vodnar, D. C., Elemer, S., Ciurescu, G., Habeanu, M., Sorescu, I., Georgescu, S. E., & Dudu, A. (2021).** Evaluation of Non-Encapsulated and Microencapsulated Lactic Acid Bacteria. *Applied Sciences*, *11*(21), 9867.
119. **Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., & Collins, J. K. (2001).** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. The American journal of clinical nutrition, 73(2), 386s-392s.
120. **El-Shafei, K., El-Sayed, H. S., Dabiza, N., Sadek, Z. I., & Sharaf, O. M. (2015).** The effect of microencapsulation on protection of isolated urease-producing Streptococcus thermophilus against stress conditions. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6(3), 1573-1582.
121. **Essid, I., Medini, M., & Hassouna, M. (2009).** Technological and safety properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. Meat science, 81(1), 203-208**.**
122. **Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013).** Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications–A review. Trends in Food Science & Technology, 31(2), 138-155.
123. **Fadin, L., de Oliveira Vieira, K. C., Toledo, A. C. C. G., Da Silva, A. K. F., Pereira, V. C., & Winkelstroter, L. K. (2023).** Probiotics in the management of antibiotic-associated diarrhea in children: a systematic review and meta-analysis of randomized and controlled trials. Topics in Clinical Nutrition, 38(3), 211-223.
124. **Falfan-Cortés, R. N., Mora-Peñaflor, N., Gomez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Acevedo-Sandoval, O. A., Franco- Fernandez, M. J., & Castro-Rosas, J. (2022).** Characterization and evaluation of the probiotic potential in vitro and in situ of Lacticaseibacillus paracasei isolated from tenate cheese. Journal of Food Protection , 85 (1):112-121.
125. **Faseleh Jahromi, M., Wesam Altaher, Y., Shokryazdan, P., Ebrahimi, R., Ebrahimi, M., Idrus, Z., & Liang, J. B. (2016).** Dietary supplementation of a mixture of Lactobacillus strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. *International Journal of Biometeorology*, *60*, 1099-1110.

126. **Feng, W., Yue, C., Ni, Y., & Liang, L. (2018).** Preparation and characterization of emulsion-filled gel beads for the encapsulation and protection of resveratrol and α-tocopherol. Food Research International, 108, 161-171.
127. **Foster, E. M.; Nelson, F. E.; Speck, M. L.; Doetsch, R. N. and Olson, J. G. (1958).** The microorganisms of milk and diary products. In: Diary microbiology. Macmillan and company limited. London.
128. **Fuentes, M. C., Lajo, T., Carrión, J. M., & Cuné, J. (2013).** Cholesterol-lowering efficacy of Lactobacillus plantarum CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. British Journal of Nutrition, 109(10), 1866-1872.
129. **Fuochi, V. (2015). Amensalistic activity of Lactobacillus spp., isolated from human samples.**
130. **Furnari, S., Ciantia, R., Garozzo, A., Furneri, P. M., & Fuochi, V. (2025).** Lactobacilli-Derived Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs) in Host Immune Modulation. Biomolecules, 15(11), 1609.
131. **Ganesh, B., Richter, J., Blaut, M., & Loh, G. (2012).** Enterococcus faecium NCIMB 10415 does not protect interleukin-10 knock-out mice from chronic gut inflammation. Beneficial microbes, 3(1), 43-50.
132. **Gao, P., Ma, C., Sun, Z., Wang, L., Huang, S., Su, X., & Zhang, H. (2017).** Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. Microbiome, 5(1), 91.
133. **García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicoli, J. R., Moreira-Silva, J., & Halaihel, N. (2016).** Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in veterinary science*, *108*, 125-132.
134. **Gardiner, G. E., O'sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., Ross, R. P. & Stanton, C., (2000).** Comparative survival rates of human-derived probiotic Lactobacillus para casei and Lb. salivarius strains during heat treatment and spray drying. Applied and environmental microbiology, 66(6), pp.2605-2612.
135. **Gaudana, S. B., Dhanani, A. S., & Bagchi, T. (2010).** Probiotic attributes of Lactobacillus strains isolated from food and of human origin. British Journal of Nutrition, 103(11), 1620-1628.
136. **Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012).** Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. Pharmaceutics, 4(1), 149-163.
137. **Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., & Marchioni, E. (2009).** Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with whey proteins. International Journal of Food Microbiology, 129(1), 103-105.
138. **Ge, Y., Ahmed, S., Yao, W., You, L., Zheng, J., & Hileuskaya, K. (2021).** Regulation effects of indigestible dietary polysaccharides on intestinal microflora: An overview. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(1), e13564
139. **Gereková, P., Petruláková, Z., & Sturdik, E. (2011**). Importance of *lactobacilli* for bread-making industry. Acta Chimica Slovaca, 4(2), 118-135.

140. **Ghanbari, R., Molaee Aghaee, E., Rezaie, S., Jahed Khaniki, G., Alimohammadi, M., Soleimani, M., & Noorbakhsh, F. (2018).** The inhibitory effect of lactic acid bacteria on aflatoxin production and expression of aflR gene in Aspergillus parasiticus. Journal of Food Safety, 38(1), e12413.

141. **Ghorai, S., Sarkar, A., Raoufi, M., Panda, A. B., Schönherr, H., & Pal, S. (2014).** Enhanced removal of methylene blue and methyl violet dyes from aqueous solution using a nanocomposite of hydrolyzed polyacrylamide grafted xanthan gum and incorporated nanosilica. ACS applied materials & interfaces, 6(7), 4766-4777.

142. **Goh, K. K., Liu, Y. W., Kuo, P. H., Chung, Y. C. E., Lu, M. L., & Chen, C. H. (2019**). Effect of probiotics on depressive symptoms: A meta-analysis of human studies. Psychiatry research, 282, 112568.

143. **Goy, R. C., Britto, D. D., & Assis, O. B. (2009).** A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, *19*, 241-247.

144. **Granato, D., Carocho, M., Barros, L., Zabetakis, I., Mocan, A., Tsoupras, A. & Pimentel, T. C. (2022).** Implementation of Sustainable Development Goals in the dairy sector: Perspectives on the use of agro-industrial side-streams to design functional foods. Trends in Food Science & Technology.

145. **Groboillot, A. F., Champagne, C. P., Darling, G. D., Poncelet, D., & Neufeld, R. J. (1993).** Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and bioengineering*, *42*(10), 1157-1163.

146. **Grujović, M. Ž., Mladenović, K. G., Semedo-Lemsaddek, T., Laranjo, M., Stefanović, O. D., & Kocić-Tanackov, S. D. (2022).** Advantages and disadvantages of non starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: Potential use as starters or probiotics. Comprehensive reviews in food science and food safety, 21(2): 1537-1567.

147. **Gudmund, S. B., Størker, T. M., Olav, S., & Kurt Ingar, D. (2006).** Alginates. Food Polysaccharides and Their Applications. CRC Press, 289, 334.

148. **Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., & Gaiani, C. (2017).** Lactobacillus rhamnosus GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *Journal of Food Engineering*, *193*, 10-19.

149. **Gupta, U., Rudramma, Rati, E. R., & Joseph, R. (1998).** Nutritional quality of lactic fermented bitter gourd and fenugreek leaves. International journal of food sciences and nutrition, 49(2), 101-108.

150. **Gyawali, I., Zeng, Y., Zhou, J., Li, J., Wu, T., Shu, G., & Zhu, C. (2022).** Effect of novel Lactobacillus paracaesi microcapsule on growth performance, gut health and microbiome community of broiler chickens. *Poultry Science*, *101*(8), 101912.

151. **Gyawali, R., Zimmerman, T., Aljaiond, S. O. & lbrahim, S. A. (2020).** Bactericidal activity of copper- ascorbic acid mixture against staphylococcus aureus Spp.Foodcontrol, 111:107062.

152. **Haghighi, H. R., Gong, J., Gyles, C. L., Hayes, M. A., Zhou, H., Sanei, B., & Sharif, S. (2006).** Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. Clinical and Vaccine Immunology, 13(9), 975-980.
153. **Hamid, A. H. (2005).** Use of metabolites of therapeutic Lactic acid bacteria to inhibit four species veterinary pathogenic bacteria: Ali HA Hamid, SC Abood, HR Al sharefe. The Iraqi Journal of Veterinary Medicine, 29(2), 49-55.
154. **Hammes, W. P. and Vogel, R. F. (1995).** The genus *Lactobacillus.* In : The Genera of Lactic Acid Bacteria. Edited by (Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H.)Blackie A and P.
155. **Hamo, Z., Ninio, H., Azrad, M., Binyamin, D., Zigdon, M., Roshrosh, H., & Peretz, A. (2025).** Probiotics Ameliorate Histological Alterations and Prevent Increases in Cytokine and Toxin Levels in Mice Infected with Various Clostridioides difficile Strains. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 1-10.
156. **Hatab, M. H., Elsayed, M. A., & Ibrahim, N. S. (2016).** Effect of some biological supplementation on productive performance, physiological and immunological response of layer chicks. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 9(2), 185-192.
157. **Hayashi, R. M., Lourenço, M. C., Kraieski, A. L., Araujo, R. B., Gonzalez-Esquerra, R., Leonardecz, E., & Santin, E. (2018).** Effect of feeding Bacillus subtilis spores to broilers challenged with Salmonella enterica serovar Heidelberg Brazilian strain UFPR1 on performance, immune response, and gut health. Frontiers in Veterinary Science, 5, 13.
158. **He, T., Long, S., Mahfuz, S., Wu, D., Wang, X., Wei, X., & Piao, X. (2019).** Effects of probiotics as antibiotics substitutes on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, and barrier function of broilers. *Animals*, *9*(11), 985.
159. **Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009).** Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. International Dairy Journal, 19(2), 77-84.
160. **Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., and Isabels. carvalho. (2013).** Mechanism of action of probiotics,an international journal, Vol.**56**,n. 1 :pp.113-119.
161. **Hernández-González, O. (2021).** Aproximación a los distintos tipos de muestreo no probabilístico que existen. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, *37*(3).
162. **Heydari, Z., Rahaie, M., Alizadeh, A. M., Agah, S., Khalighfard, S., & Bahmani, S. (2019).** Effects of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum probiotics on the expression of microRNAs 135b, 26b, 18a and 155, and their involving genes in mice colon cancer. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *11*, 1155-1162.

163. **Higgins, S. E., Higgins, J. P., Wolfenden, A. D., Henderson, S. N., Torres-Rodriguez, A., Tellez, G., & Hargis, B. (2008).** Evaluation of a Lactobacillus-based probiotic culture for the reduction of Salmonella enteritidis in neonatal broiler chicks. Poultry Science, 87(1), 27-31.
164. **Higuchi, T., Furuichi, M., Maeda, N., Tsugawa, T., & Ito, K. (2024).** Effects of probiotics in children with acute gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis focusing on probiotics utilized in Japan. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy, 30(4), 337–342. https://doi.org/10.1016/j.jiac.2023.11.005
165. **Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., & Sanders, M. E. (2014).** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.
166. **Hornstra, G., Barth, C. A., Galli, C., Mensink, R. P., Mutanen, M., Riemersma, R. A., & Verschuren, P. M. (1998).** Functional food science and the cardiovascular system. British Journal of Nutrition, 80(S1), S113-S146.
167. **Hu, J. W., Guo, S. J., Zhang, L. W., & Guo, C. F. (2026).** Bile resistance mechanisms in probiotics: From structural adaptation to metabolic regulation. FOOD BIOSCIENCE, 76.
168. **Huang, Q., Yu, H., & Ru, Q. (2010).** Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. Journal of food science, 75(1), R50-R57.\
169. **Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017).** Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. Trends in food science & technology, 63, 1-17.
170. **Hugues-Ayala, A. M., Sarabia-Sainz, J. A. I., González-Rios, H., Vázquez-Moreno, L., & Montfort, G. R. C. (2020).** Airbrush encapsulation of Lactobacillus rhamnosus GG in dry microbeads of alginate coated with regular buttermilk proteins. *Lwt*, *117*, 108639.
171. **Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011).** An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, *187*(2), 182-188.
172. **Imran, M., Revol-Junelles, A. M., Martyn, A., Tehrany, E. A., Jacquot, M., Linder, M., & Desobry, S. (2010).** Active food packaging evolution transformation from micro-to nanotechnology. Critical reviews in food science and nutrition, 50(9), 799-821.
173. **Inchingolo, A. D., Inchingolo, A. M., Palumbo, I., Guglielmo, M., Riccaldo, L., Morolla, R., ... & Dipalma, G. (2025).** The role of probiotics in preventing dental caries: a systematic review of clinical evidence. Frontiers in Oral Health, 6, 1720036.
174. Int 1:Moira Watson, Publish May 14, 2015 . benefits of microencapsulation. http://blog.watson-inc.com/nutri-knowledge/7-benefits-of-micro-encapsulation.

175. Int 2: Bart Jahup**,** (2017). Carrageenan – the future or the history. https://ingredientshub.com/food-news-article/carrageenan-%E2%80%93-the-future-or-the-history.
176. **Int. Dairy Fed. (FIL-IDF) IDF standard 149A: (1997).** Dairy starter culture of lactic acid bacteria. Standard of identity, **1030**. Brussels, Belgium .
177. Irm**ler, S., Raboud, S., Beisert, B., Rauhut, D., & Berthoud, H. (2008).** Cloning and characterization of two *Lactobacillus casei* genes encoding a cystathionine lyase. Applied and environmental microbiology, 74(1), 99-106.
178. **Ishimwe, N., Daliri, E. B., Lee, B. H., Fang, F., & Du, G. (2015).** The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. Molecular nutrition & food research, 59(1), 94-105.
179. **ISO, International Organization for Standardization. (1999).** Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase- Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species).
180. **Ivanovska, P.T., Smilkov, K., Zivikj, Z., Petrusevska Tozi, L., & Mladenovska, K. (2014).** Comparative Evaluation of Viability of Encapsulated Lactobacillus casei Using Two Different Methods of Microencapsulation. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Researc, 4(1), 20-24.
181. **Jacouton, E., Chain, F., Sokol, H., Langella, P., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2017).** Probiotic strain Lactobacillus casei BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer. *Frontiers in immunology*, *8*, 1553.
182. **Jahromi, M. F., Liang, J. B., Ebrahimi, R., Soleimani, A. F., Rezaeizadeh, A., Abdullah, N., & Shokryazdan, P. (2017).** Protective potential of Lactobacillus species in lead toxicity model in broiler chickens. *Animal*, *11*(5), 755-761.
183. **Jamaly, N., Benjouad, A., & Bouksaim, M. (2011).** Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products.
184. **Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., & Chirakkal, H. (2013).** Bacillus subtilis PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis. Poultry science, 92(2), 370-374.
185. **Jha, R., Das, R., Oak, S., & Mishra, P. (2020).** Probiotics (direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: a systematic review. *Animals*, *10*(10), 1863.
186. **Ji, R., Wu, J., Zhang, J., Wang, T., Zhang, X., Shao, L., & Wang, J. (2019).** Extending viability of Bifidobacterium longum in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1389.

187. **Jiménez-Colmenero, F. (2013).** Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. Food Research International, 52(1), 64-74.
188. **Jiménez-Pranteda, M. L., Poncelet, D., Náder-Macías, M. E., Arcos, A., Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., & Ramos-Cormenzana, A. (2012).** Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. Journal of bioscience and bioengineering, 113(2), 179-184.
189. **Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (2000).** Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with Lactobacillus cultures. Poultry science, 79(6), 886-891.
190. **Julyanto, P., Meirinzha, C., & Tan, T. J. (2024).** Analysis of heat-shock protein genes and their expression in *Lactiplantibacillus plantarum SU-KC1a*. Biodiversitas: Journal of Biological Diversity, 25(6).
191. **Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., & Eskesen, D. (2014).** The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. Microorganisms, 2(2), 92-110.
192. **Juturu, V., Wu, J. C. (2018).** Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. Biotechnol. Adv. 36, 2187–2200.
193. **Kabir, S. L., Rahman, M. M., Rahman, M. B., & Ahmed, S. U. (2004).** The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. International Journal of Poultry Science, 3(5), 361-364.
194. **Kailasapathy, K. (2006).** Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT-Food Science and Technology, 39(10), 1221-1227.
195. **Kalia, S., K. Bharti, V., Gogoi, D., Giri, A., & Kumar, B. (2017).** Studies on the growth performance of different broiler strains at high altitude and evaluation of probiotic effect on their survivability. *Scientific reports*, *7*(1), 46074.
196. **Kandulna, A., & Gupta, S. C. (2023).** Selection criteria for probiotics: A review on the essential properties. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 11(2), 1–11.
197. **Kashima, K., & Imai, M. (2012).** Advanced membrane material from marine biological polymer and sensitive molecular-size recognition for promising separation technology. In Advancing Desalination. InTech
198. **Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018).** Benefaction of probiotics for human health: A review. Journal of food and drug analysis, 26(3), 927-939.
199. **Khaksefidi, A., & Rahimi, S. (2005).** Effect of probiotic inclusion in the diet of broiler chickens on performance, feed efficiency and carcass quality. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 18(8), 1153-1156.
200. **Khalesi, S., Sun, J., Buys, N., & Jayasinghe, R. (2014).** Effect of Probiotics on Blood PressureNovelty and Significance. Hypertension, 64(4), 897-903.

201. **Khalifa, L. S. K. (2015).** Production of bioactive cellulosic films and their use in packaging some meat products. [Master's thesis]. College of Agriculture, University of Baghdad.

202. **Khalique, A., Zeng, D., Shoaib, M., Wang, H., Qing, X., Rajput, D. S., & Ni, X. (2020).** Probiotics mitigating subclinical necrotic enteritis (SNE) as potential alternatives to antibiotics in poultry. Amb Express, 10(1), 50.

203. **Khan, M., Raoult, D., Richet, H., Lepidi, H., & La Scola, B. (2007).** Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens. British poultry science, 48(6), 732-735.

204. **Kim, E., Yang, S. M., Lim, B., Park, S. H., Rackerby, B., & Kim, H. Y. (2020).** Design of PCR assays to specifically detect and identify 37 Lactobacillus species in a single 96 well plate. *BMC microbiology*, *20*(1), 96.

205. **Kim, J. U., Kim, B., Shahbaz, H. M., Lee, S. H., Park, D., & Park, J. (2017).** Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology*, *52*(2), 519-530.

206. **Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S., & Park, H. J. (2008).** Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. LWT-Food Science and Technology, 41(3), 493-500.

207. **Kizerwetter-Swida, M., & Binek, M. (2009).** Protective effect of potentially probiotic Lactobacillus strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. Pol. J. Vet. Sci, 12(1), 15-20.

208. **Klaenhammer, T. R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochim.*, **70**, 337-349.

209. **Kleanhammer, H. (2001).** bacteriocin of lactic acid bacteria.Biocomi. 70:337-349.

210. **Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. (2004).** The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **14**, 737–743

211. **Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. C. (2006).** Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage. LWT-Food Science and Technology, 39(2), 177-183.

212. **Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., & Yadav, H. (2012).** Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. Journal of Diabetes Research, 2012(1), 902917.

213. **Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019).** Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. Microbial Pathogenesis, 128: 171-177.

214. **Lan, P. T. N., Le, T. B., & Benno, Y. (2003**). Impact of two probiotic Lactobacillus strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken. The Journal of general and applied microbiology, 49(1), 29-36.
215. **Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008).** Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72(4), 728-764.
216. **Lee, C. H., Nalluri, L. P., & Popuri, S. R. (2019).** Optimization studies for encapsulation and controlled release of curcumin drug using Zn+ 2 cross-linked alginate and carboxy methylcellulose blend. Journal of Polymer Research, 26(1), 13.
217. **Lee, E. Y. (2012).** Effect of Atomization on viability of microencapsulated probiotics (Doctoral dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign).
218. **Lee, J. Y., Pajarillo, E. A. B., Kim, M. J., Chae, J. P., & Kang, D. K. (2012).** Proteomic and transcriptional analysis of Lactobacillus johnsonii PF01 during bile salt exposure by iTRAQ shotgun proteomics and quantitative RT-PCR. Journal of proteome research, 12(1), 432-443.
219. **Lee, J., & Kaletunç, G. (2002).** Evaluation of the heat inactivation of Escherichia coli and Lactobacillus plantarum by differential scanning calorimetry. Applied and Environmental Microbiology, 68(11), 5379-5386.
220. **Leirvåg, I. T. (2017).** Strategies for stabilising calcium alginate gel beads: Studies of chitosan oligomers, alginate molecular weight and concentration.
221. **Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Adhikari, B., & Fang, Z. (2021).** Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. Biotechnology advances, 49, 107763.
222. **Leong, J. Y., Lam, W. H., Ho, K. W., Voo, W. P., Lee, M. F. X., Lim, H. P., ... & Chan, E. S. (2016).** Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. Particuology, 24, 44-60.
223. **Leverrier, P., Dimova, D., Pichereau, V., Auffray, Y., Boyaval, P., & Jan, G. (2003).** Susceptibility and adaptive response to bile salts in Propionibacterium freudenreichii: physiological and proteomic analysis. Applied and environmental microbiology, 69(7), 3809-3818.
224. **Li, W., Ren, M., Duo, L., Li, J., Wang, S., Sun, Y., & Sun, T. (2020).** Fermentation characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. lactis isolated from naturally fermented dairy products and screening of potential starter isolates. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1794.
225. **Li, X., Li, W., Zhao, L., Li, Y., He, W., Ding, K., & Cao, P. (2024).** Characterization and assessment of native lactic acid bacteria from broiler intestines for potential probiotic properties. *Microorganisms*, *12*(4), 749.
226. **Li, Z., Huang, Z., & Gu, P. (2024).** Response of Escherichia coli to acid stress: mechanisms and applications—a narrative review. Microorganisms, 12(9), 1774.

227. **Liang, W., Li, H., Zhou, H., Wang, M., Zhao, X., Sun, X., & Zhang, X. (2021**). Effects of Taraxacum and Astragalus extracts combined with probiotic Bacillus subtilis and Lactobacillus on Escherichia coli–infected broiler chickens. Poultry Science, 100(4), 101007.
228. **Liang, Y., Lin, C., Zhang, Y., Deng, Y., Liu, C., & Yang, Q. (2018).** Probiotic mixture of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* alleviates systemic adiposity and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rats through Gpr109a and the commensal metabolite butyrate. *Inflammopharmacology*, *26*, 1051-1055.
229. **Liliana Serna-Cock, L., and Vladimir Vallejo-Castillo, V., (2013).** Probiotic encapsulation. African Journal of Microbiology Research, 7(40), 4743-4753.
230. **Lima, Â., Castro, J., Muzny, C. A., & Cerca, N. (2025).** Gardnerella species exhibit synergy in their ability to displace Lactobacillus crispatus adhered to HeLa cells. PeerJ, 13, e20076.
231. **Lin, J., Sahin, O., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2003).** Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of Campylobacter jejuni. *Infection and immunity*, *71*(8), 4250-4259.
232. **Liu, D. M., Guo, J., Zeng, X. A., Sun, D. W., Brennan, C. S., Zhou, Q. X., & Zhou, J. S. (2017).** The probiotic role of Lactobacillus plantarum in reducing risks associated with cardiovascular disease. *International Journal of Food Science and Technology*, *52*(1), 127-136.
233. **Liu, S., Ye, L., Feng, L., Luo, B., Chen, J., Xu, Q., & Zhang, L. (2025).** Bile salt hydrolase: a key target for developing high-performance probiotics. Trends in Food Science & Technology, 105383.
234. **Livney, Y. D. (2010).** Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current opinion in colloid & interface science*, *15*(1-2), 73-83.
235. **Loh, T. C., Thanh, N. T., Foo, H. L., & Hair-Bejo, M. (2013).** Effects of feeding metabolite combinations from lactobacillus plantarum on plasma and breast meat lipids in Broiler Chickens. Brazilian Journal of Poultry Science, 15(4), 307-316.
236. **Lokapirnasari, W. P., Maslachah, L., Saputro, A. L., Rokana, E., Yulianto, A. B., Rosyada, Z. N. A., ... & Shakeel, M. (2025).** Potency of Lacticaseibacillus paracasei as an alternative to antibiotic growth promoter in broiler chicken challenged with avian pathogenic Escherichia coli. Veterinary World, 18(5), 1180.
237. **Longdet, I. Y., Kutshik, R. J., & Nwoyeocha, I. G. (2011).** The Probiotic efficacy of lactobacillus of Lactobacillus casei from human breast milk against Shigellosis in Albino rats.
238. **Loquercio, A. S. (2014).** Preparation and Characterization of Chitosan-Alginate Nanoparticles for Trans-Cinnamaldehyde Entrapment (Doctoral dissertation).

239. **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.
240. **Macfaddin, J. F. (2000).** Biochemical test for identification of medical bacteria 3 rd ed Lippin cott Williams and Wilkins , USA: 555-565 .
241. **Manafi, M., Khalaji, S., Hedayati, M., & Pirany, N. (2017).** Efficacy of *Bacillus subtilis* and bacitracin methylene disalicylate on growth performance, digestibility, blood metabolites, immunity, and intestinal microbiota after intramuscular inoculation with Escherichia coli in broilers. Poultry science, 96(5), 1174-1183.
242. **Mandal, H., Jariwala, R., & Bagchi, T. (2016).** Isolation and characterization of lactobacilli from human faeces and indigenous fermented foods for their potential application as probiotics. *Canadian journal of microbiology*, *62*(4), 349-359.
243. **Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006).** Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei NCDC-298*. International Dairy Journal, 16(10), 1190-1195.
244. **Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017).** Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, *9*(9), 1021.
245. **Marth, E. H., & Steele, J. (Eds.). (2001).** Applied dairy microbiology. CRC Press.
246. **Martins, E. M. S., Nascimento da Silva, L. C., & Carmo, M. S. (2024).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics in childhood diarrhea. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 57, e13205.
247. **Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H., & Khan, I. U. (2011).** Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. Critical reviews in microbiology, 37(1), 91-98.
248. **Maxton, A., Benjamin, J. C., Ram, G. D., Bailey, S. B., & Ramteke, P. W. (2013).** Antibacterial activity of isolated human intestinal microbiota Lactobacillus strains against methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus.
249. **Meade, E., Slattery, M. A., & Garvey, M. (2020).** Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile?. Antibiotics, 9(1), 32.
250. **Melese, K., Alemu, T., & Desalegn, A. (2023).** Isolation, characterization and in-vitro evaluation of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from chicken gut.
251. **Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y., & Hernández-Sánchez, H. (2012).** Lactobacillus plantarum: An overview with emphasis in biochemical and healthy properties. Lactobacillus: Classification, Uses and Health Implications. Nova Publishing, 1-31.

252. **Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019).** Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. Nutrients, 11(5), 1189.
253. **Miko, E., & Barakonyi, A. (2023).** The role of hydrogen-peroxide (H2O2) produced by vaginal microbiota in female reproductive health. Antioxidants, 12(5), 1055.
254. **Milián, G., Rodríguez, M., González, O., Rondón, A. J., Pérez, M. L., Beruvides, A., & Placeres, I. (2021).** Evaluation of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44 in productive and health indicators in heavy pure breeds birds under production conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*, *55*(1), 67-75.
255. **Mishra, C., and Lambert, J. (1996).** Production of antimicrobial substances by probiotics. Asia Pacific J. Clin. Nutr., 5: 20-24
256. **Mishra, M. K. (2019).** Applications of Encapsulation and Controlled Release, 37-47,.
257. **Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013).** Immobilization technologies in probiotic food production. Journal of nutrition and metabolism, 24(6).
258. **Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Najafi, M. B. H. & Shahidi, F. (2009).** The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Res. Int.* **42**, 1040–1045.
259. **Mokoena, M. P. (2017).** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, *22*(8), 1255.
260. **Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007).** Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian Journal of Biotechnology, 5(1), 1-18.
261. **Mudondo, J., Happy, K., Gang, R., Ban, Y., & Kang, Y. (2025).** From nature to nutrition: exploring the synergistic benefits of functional foods and herbal medicines for holistic health. Applied Biological Chemistry, 68(1), 17.
262. **Murray, G. (2004).** Probiotics in poultry nutrition. In The nutrition of poultry (pp. 153–168). CABI Publishing.
263. **Murthy, D. K., Soman, R. J., Soman, D., & Pv, K. (2025)**. Testing the Immunomodulatory Effects of Probiotic *Bacillus coagulans SNZ 1969*® in Healthy Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Cureus, 17(10), e94845-e94845.
264. **Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., & Maneerat, S. (2009).** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(8), 1337-1345.
265. **Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., & Holley, R. A. (2006).** Stability of Lactobacillus reuteri in different types of microcapsules. Journal of Food Science, 71(1).

266. **Naeem, M., & Bourassa, D. (2025).** Probiotics in poultry: unlocking productivity through microbiome modulation and gut health. Microorganisms, 13(2), 257.
267. **Nag, A. (2011).** Development of a microencapsulation technique for probiotic bacteria Lactobacillus casei 431 using a protein-polysaccharide complex: a thesis presented in partial fulfillment of the requirements of the degree of Masters of Technology in Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand (Doctoral dissertation, Massey University).
268. **Nakphaichit, M., Thanomwongwattana, S., Phraephaisarn, C., Sakamoto, N., Keawsompong, S., Nakayama, J., & Nitisinprasert, S. (2011).** The effect of including Lactobacillus reuteri KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poultry science*, *90*(12), 2753-2765.
269. **Nami, Y., Barghi, A., Sadeghi, M., Farhadi, T., Babaei, S., & Haghshenas, B. (2025).** Probiotics in Women's Health: Mechanisms, Benefits, and Potential Applications for Preventing Bacterial Vaginosis and Sexually Transmitted Diseases in Sexual Health Products. APMIS, 133(11), e70086.
270. **Nataraj, B. H., Chette, R., & Mallappa, R. H. (2025).** Cell surface proteins of indigenous probiotics render antagonistic and protective effect on gut barrier integrity against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) Escherichia coli. Letters in Applied Microbiology, 78(8), ovaf110.
271. **Navidshad, B., Liang, J. B., & Jahromi, M. F. (2012).** Correlation coefficients between different methods of expressing bacterial quantification using real time PCR. International journal of molecular sciences, 13(2), 2119-2132.
272. **Ngov, S. (2017).** Enhancement of probiotic survival in low pH and bile salt condition using alginate-hi-maize starch encapsulation. Asia-Pacific Journal of Science and Technology, 19, 141-147.
273. **Nishiyama, K., Sugiyama, M., & Mukai, T. (2016).** Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. Microorganisms, 4(3), 34.
274. **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.
275. **Noufeu, T., Li, Y., Toure, N. F., Yao, H., Zeng, X., Du, Q., & Pan, D. (2025).** Overview of glycometabolism of lactic acid bacteria during freeze-drying: Changes, influencing factors, and application strategies. Foods, 14(5), 743.
276. **Nzingula, O., Disashi, J., Mulwahali, J., Kabututu, P., Biakas, P., & Masumu, J. (2023).** Identification of Lactobacillus and Bifidobacterium 16S rRNA Gene in Breast Milk of Some Healthy Women in Kinshasa (DR Congo). *Journal of Biosciences and Medicines*, *11*(2), 275-286.

277. **O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2017).** Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature microbiology*, *2*(5), 1-6.
278. **Obajuluwa, O. V., Sanwo, K. A., Egbeyale, L. T., & Fafiolu, A. O. (2020).** Performance, blood profile and gut morphometry of broiler chickens fed diets supplemented with Yohimbe (Pausynistalia yohimbe) and Larvacide. Veterinary and Animal Science, 10, 100127.
279. **Ogawa, M., Shimizu, k., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S. T., and Takeda, Y. (2001).** Inhibition of invitro growth of shiga toxin-producing *Escherichia coli*O157:H7 by Probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid . Intern . J . Food . Microbiol . , **68**:135 -140
280. **Oh, H. K., Lee, J.Y., Lim, S. J., Kim, M.J., Kim, G. B., Kim, J. H., Hong, S. K. & Kang, D. K., (2008).** Molecular cloning and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus acidophilus PF01*. J Microbiol Biotechnol, 18(3), pp.449-56.
281. **Okuro, P. K., Thomazini, M., Balieiro, J. C., Liberal, R. D., & Fávaro-Trindade, C. S. (2013).** Co-encapsulation of Lactobacillus acidophilus with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food research international*, *53*(1), 96-103.
282. **Olnood, C. G., Beski, S. S., Choct, M., & Iji, P. A. (2015).** Novel probiotics: Their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. Animal Nutrition, 1(3), 184-191.
283. **O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., & Hill, C. (2012).** Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. International journal of food microbiology, 152(3), 189-205.
284. **Ouwehand, A. C. (2007).** Antiallergic effects of probiotics. The Journal of nutrition, 137(3), 794S-797S.
285. **Ozyurt, V. H., & Ötles, S. (2014).** Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 13(4), 413-424.
286. **Pa, W. (2010).** Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100-S20.
287. **Palamidi, I., Fegeros, K., Mohnl, M., Abdelrahman, W. H. A., Schatzmayr, G., Theodoropoulos, G., & Mountzouris, K. C. (2016).** Probiotic form effects on growth performance, digestive function, and immune related biomarkers in broilers. Poultry science, 95(7), 1598-1608.
288. **Palavecino Prpich, N. Z., Camprubí, G. E., Cayré, M. E., & Castro, M. P. (2021).** Indigenous microbiota to leverage traditional dry sausage production. International Journal of Food Science, 2021(1), 6696856.

289. **Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015).** Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. Journal of food science and technology, 52(12), 7577-7587.
290. **Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015).** Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*, *6*, 58.
291. **Park, M. Y., Kim, J., Kim, S., & Whang, K. Y. (2018).** *Lactobacillus curvatus KFP419* and *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides KDK411* isolated from kimchi ameliorate hypercholesterolemia in rats. Journal of Medicinal Food, 21(7), 647-653.
292. **Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006).** Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of applied microbiology, 100(6), 1171-1185.
293. **Pașca, C., Coroian, A., & Socaci, S. (2018).** Risks and benefits of food additives-review. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 75, 2.
294. **Pedroso, A. A., & Lee, M. D. (2015).** The composition and role of the microbiota in chickens. In *Intestinal health* (pp. 21-50). Wageningen Academic.
295. **Peivasteh-Roudsari, L., Pirhadi, M., Karami, H., Tajdar-Oranj, B., Molaee-Aghaee, E., & Sadighara, P. (2019).** Probiotics and food safety: an evidence-based review. *Journal of Food Safety and Hygiene*, *5*(1): 1-9.
296. **Perdigon, G., Nader de Mucias, M. E., Alwares, S., Medici, M., Oliver, G., Pesce de Ruia, H., and Inas, A. (1995).** Immunoprotentiating activity of lactic acid bacteria administerd by oral route. Medicina. **46**: 751-754
297. **Peruzzolo, M., Ceni, G. C., Junges, A., Zeni, J., Cansian, R. L., & Backes, G. T. (2025).** Probiotics: Health benefits, microencapsulation, and viability, combination with natural compounds, and applications in foods. *Food Bioscience*, 106253.
298. **Pewan, S. B., Kabantiyok, D., Emennaa, P. E., Dawurung, J. S., Dawurung, C. J., Duwil, R. K., ... & Ezema, C. (2025).** Advancing Nigerian Indigenous Poultry Health and Production, Use of Probiotics as Viable Alternatives to Antibiotics: A Review. Antibiotics, 14(8), 846.
299. **Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2018).** Lmmune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. Nutrients, 10(1):42.
300. **Pop, O. L., Brandau, T., Schwinn, J., Vodnar, D. C., & Socaciu, C. (2015).** The influence of different polymers on viability of Bifidobacterium lactis 300b during encapsulation, freeze-drying and storage. Journal of Food Science & Technology, 52(7), 4146–4155.
301. **Pradhan, D., Mallappa, R. H., & Grover, S. (2020).** Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. *Food Control*, *108*, 106872.

302. **Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., & Cantor, A. (2011).** The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *BioMed Research International*, *2011*(1), 981214.
303. **Prasad, P., Wadehra, A., Munjal, K., & Behare, P. (2015).** Isolation of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria from dairy products. Asian Journal of Dairy and Food Research, 34(4), 280-284.
304. **Priest, F. G. and Campbell, I. (1999).** Brewing Microbiology. 2nded. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
305. **Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2020).** Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Jones & Bartlett Learning.
306. **Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewińska, D., Manojlovic, V., Massart, B., Nastruzzi, C. & Nedovic, V., (2008).** Comparison of different technologies for alginate beads production. Chemical Papers, 62(4), pp.364-374.
307. **Pyar, H., & Peh, K. K. (2014).** Characterization and identification of Lactobacillus acidophilus using biolog rapid identification system. *Int J Pharm Pharm Sci*, *6*(1), 189-93.
308. **Qi, W., Liang, X., Yun, T., & Guo, W. (2019).** Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation. *Journal of food science and technology*, *56*(3), 1398-1404.
309. **Qi, X., Simsek, S., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2020**). Viability of Lactobacillus rhamnosus GG microencapsulated in alginate/chitosan hydrogel particles during storage and simulated gastrointestinal digestion: role of chitosan molecular weight. *Soft Matter*, *16*(7), 1877-1887.
310. **Raddatz, G. C., da Fonseca, B. D. S., Poletto, G., Jacob-Lopes, E., Cichoski, A. J., Muller, E. I., & de Menezes, C. R. (2020).** Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing Lactobacillus acidophilus LA-5 obtained by internal gelation/emulsification. *Powder Technology*, *362*, 409-415.
311. **Radulović, Z., Mirković, N., Bogović-Matijašič, B., Petrušić, M., Petrović, T., Manojlović, V., & Nedović, V. (2012).** Quantification of viable spray-dried potential probiotic lactobacilli using real-time PCR. Archives of Biological Sciences, 64(4), 1465-1472.
312. **Raise, A., Dupont, S., Iaconelli, C., Caliri, C., Charriau, A., Gervais, P., & Beney, L. (2020).** Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium Faecalibacterium prausnitzii from the digestive tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *56*, 101608.

313. **Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravanakumar, A. (2010).** Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus lactis isolated from marine environment. Advance Journal of food science and technology, 2(2), 138-144.
314. **Rajoka, M. S. R., Hayat, H. F., Sarwar, S., Mehwish, H. M., Ahmad, F., Hussain, N., & Shi, J. (2018).** Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. *Microbiology*, *87*(1), 116-126.
315. **Rajput, I. R., Li, L. Y., Xin, X., Wu, B. B., Juan, Z. L., Cui, Z. W., & Li, W. F. (2013).** Effect of Saccharomyces boulardii and Bacillus subtilis B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. Poultry science, 92(4), 956-965.
316. **Ramos, P. E., Silva, P., Alario, M. M., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2018).** Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. *Food hydrocolloids*, *77*, 8-16.
317. **Ranjan, K. D., (2007).** Diagnostic microbiology. Medical college and hospital, medical publishers (p) Ltd Newdelhi. PP: 124.
318. **Rather, Sajad A., Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., and Wani, S. M. (2017).** Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of Lactobacillus plantarum NCDC201 and L. casei NCDC297. LWT-Food Science and Technology, 83, 50-58.
319. **Ravyts, F., & De Vuyst, L. (2011).** Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough. Food microbiology, 28(6), 1129-1139.
320. **Reed, L. J., & Muench, H. (1938).** A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Epidemiology, 27 (3), 493–497.
321. **Rehaiem, A., Belgacem, Z. B., Edalatian, M. R., Martínez, B., Rodríguez, A., Manai, M., & Guerra, N. P. (2014).** Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain Enterococcus faecium MMRA. Food Control, 37, 343-350.
322. **Reis, D. S. A., da Conceicao, L. L., Siqueira, N. P., Rosa, D. D., da Silva, L. L., & Peluzio, M. D. C. G. (2017).** Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research*, *37*, 1-19.
323. **Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012).** Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. Food Engineering Reviews, 4(2), 124-140.
324. **Ripon, M. H., Hasan, M., Ahasan, M. M., Alam, M. W., & Kabir, S. (2011).** Comparison of three different methods of genomic DNA extraction from gram positive and gram negative bacteria. *J Expt Biosci*, *2*(1), 55-60.
325. **Ritter, A. C., Paula, A., Correa, F., Veras, F. F., & Brandelli, A. (2018).** Characterization of Bacillus subtilis available as probiotics. *Journal of Microbiology Research*, *8*(2), 23-32.

326. **Robinson, R. K., Tamime, A. Y., & Wszolek, M. (2002).** Microbiology of fermented milks. Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products, 367-430.
327. **Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T., Silva, J. P., Lobo, J. S., Costa, P., & Freitas, A. C. (2011).** Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, *21*(11), 869-876.
328. **Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020).** Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications–A narrative review. *Food research international*, *137*, 109682.
329. **Rodrigues, F. J., Omura, M. H., Cedran, M. F., Dekker, R. F., Barbosa-Dekker, A. M., & Garcia, S. (2017).** Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus casei* encapsulated in alginate microspheres. *Journal of microencapsulation*, *34*(5), 431-439.
330. **Rodríguez, S. P., Herrera, A. L., & Parra, J. E. (2023).** Gene expression of pro-inflammatory (IL-8, IL-18, TNF-α, and IFN-γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in the duodenum of broiler chickens exposed to lipopolysaccharides from Escherichia coli and Bacillus subtilis. *Veterinary World*, *16*(3), 564.
331. **Rokka, S., & Rantamäki, P. (2010).** Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. European Food Research and Technology, 231(1), 1-12.
332. **Rosenberg, M., & Lee, S. J. (2004).** Calcium-alginate coated, whey protein-based microspheres: preparation, some properties and opportunities. *Journal of microencapsulation*, *21*(3), 263-281.
333. **Rossi, F., Amadoro, C., & Colavita, G. (2019).** Members of the *Lactobacillus* genus complex (LGC) as opportunistic pathogens: a review. *Microorganisms*, *7*(5): 126.
334. **Rouissi, A., Alfonso-Avila, A. R., Guay, F., Boulianne, M., & Létourneau-Montminy, M. P. (2021).** Effects of Bacillus subtilis, butyrate, mannan-oligosaccharide, and naked oat (ß-glucans) on growth performance, serum parameters, and gut health of broiler chickens. *Poultry Science*, *100*(12), 101506.
335. **Ruiz, L., Sánchez, B., Ruas-Madiedo, P., De Los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2007).** Cell envelope changes in Bifidobacterium animalis ssp. lactis as a response to bile. FEMS microbiology letters, 274(2), 316-322.
336. **Rychlik, I. (2020).** Composition and Function of Chicken Gut Microbiota. Animals, 10(1).
337. **Saeed, F., Afzaal, M., Ahmad, A., Aamir, M., Aziz, M., Aslam, S., ... & Hussain, M. (2022).** Enhanced viability of microencapsulated lyophilized probiotics under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(5), e16543.

338. **Samar, Mansouripour., Esfandiari, Z., & Nateghi, L. (2013).** The effect of heat process on the survival and increased viability of probiotic by microencapsulation: a review. Ann Biol Res, 4(4), 83-87.

339. **Sánchez, B., Champomier-Verges, M. C., Stuer-Lauridsen, B., Ruas-Madiedo, P., Anglade, P., Baraige, F., & Margolles, A. (2007).** Adaptation and response of Bifidobacterium animalis subsp. lactis to bile: a proteomic and physiological approach. Applied and environmental microbiology, 73(21), 6757-6767.

340. **Sangeetha, N., Felix, A. J. W., & Nalini, N. (2009).** Silibinin modulates biotransforming microbial enzymes and prevents 1, 2-dimethylhydrazine-induced preneoplastic changes in experimental colon cancer. European Journal of Cancer Prevention, 18(5), 385-394.

341. **Saranya, S., Hemashenpagam, N.** (2011). Antagonistic activity and antibiotic sensitivity of Lactic acid bacteria from fermented dairy products . Advances in Applied Science Research, **2** (4):528-534 .

342. **Sarao, L. K., & Arora, M. (2017).** Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *57*(2), 344-371.

343. **Segui-Perez, C., Huang, L. Z., Paganelli, F. L., Lievens, E., & Strijbis, K. (2025).** Probiotic Bifidobacterium bifidum strains desialylate MUC13 and increase intestinal epithelial barrier function. Scientific Reports, 15(1), 8778.

344. **Semyonov, D., Ramon, O., & Shimoni, E. (2011).** Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. LWT-Food Science and Technology, 44(9), 1844-1852.

345. Serna-Cock, L., & Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. African journal of microbiology research, 7(40), 4743-4753.

346. **Servin, A. L. (2004).** Antagonistic activities of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. Fems Microbial Rev., **28**(4):405-440.

347. **Setiarto, R. H. B., Anshory, L., & Wardana, A. A. (2025).** Microencapsulation Technology for Probiotic Bacteria: A Review. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1449, No. 1, p. 012153). IOP Publishing.

348. **Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. and Mentis, A.** (2004). in vitro and invivo inhibition of Helicobacter pylori by Lactobacillus casei strain shirota .APPI.Environ.M icrobiol.,**70**:518-526.

349. **Shafigue, B., Ranjha, M. M. A. N., Murtaza, M. A., Walayat, N., Nawaz, A., Khalid, W. & Ibrahim, S. A. (2023).** Recent Trends and Applications of Nanoencapsulated Bacteriocins against Microbes in Food Quality and Safety. *Microorganisms*, *11*(1): 85.

350. **Shafizadeh, A., Golestan, L., Ahmadi, M., Darjani, P., & Ghorbani-HasanSaraei, A. (2020).** Encapsulation of Lactobacillus casei in alginate microcapsules: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using flaxseed mucilage. *Journal of food measurement and characterization*, *14*(4), 1901-1908.
351. **Shah, N. P. (2007).** Functional cultures and health benefits. International dairy journal, 17(11), 1262-1277.
352. **Shahbaz, F., Muccee, F., Mirza, A. F., Tanveer, M. A., Al Haddad, A. H., & Hussain, N. (2025).** In-vitro assessment of probiotic potential of bacteria isolated from chicken gastrointestinal tract. *Antonie van Leeuwenhoek*, *118*(7), 1-21.
353. **Shahbaz, F., Muccee, F., Shahab, A., Safi, S. Z., Alomar, S. Y., & Qadeer, A. (2024).** Isolation and in vitro assessment of chicken gut microbes for probiotic potential. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1278439.
354. **Shakouri, M. D., & Malekzadeh, M. (2016).** Responses of broiler chickens to the nutrient recommendations of NRC (1994) and the Ross broiler management manual. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *29*(2), 91-98.
355. **Shan, L., Huang, X. L., Sui, J. Z., Chen, S. Y., Xie, Y. T., Deng, Y., & Peng, Q. L. (2014).** Meta-analysis of randomized controlled trials on the efficacy of probiotics in Helicobacter pylori eradication therapy in children. European journal of pediatrics, 173(2), 153-161.
356. **Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B., & Kim, W. K. (2018).** Chicken gut microbiota: importance and detection technology. *Frontiers in veterinary science*, *5*, 254.
357. **Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S. (2020).** Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. Fermentation, 6(4), 106**.**
358. **Shehata, A. A., Basiouni, S., Tellez-Isaias, G., Eisenreich, W., & Hafez, H. M. (2024).** Probiotics as alternative to antibiotics in poultry: challenges and prospects. Alternatives to Antibiotics against Pathogens in Poultry, 59-78.
359. **Shi, L. E., Li, Z. H., Zhang, Z. L., Zhang, T. T., Yu, W. M., Zhou, M. L., & Tang, Z. X. (2013).** Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. LWT-Food Science and Technology, 54(1), 147-151.
360. **Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014).** Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. BioMed research international, 18(4).
361. **Sifour, M., Tayeb, I., Haddar, H. O., Namous, H., & Aissaoui, S. (2012).** Production and Caracterization of Bacteriocin of Lactobacillus plantarum F12 with Inhibitory Activity against Listeria monocytogenes. Tojsat, 2(1), 55-61.

362. **Silva, M. P., Tulini, F. L., Martins, E., Penning, M., Favaro-Trindade, C. S., & Poncelet, D. (2018).** Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus LA3* in simulated gastrointestinal fluids. *Lwt*, *89*, 392-399.
363. **Silva, M. P., Tulini, F. L., Matos-Jr, F. E., Oliveira, M. G., Thomazini, M., & Fávaro-Trindade, C. S. (2018).** Application of spray chilling and electrostatic interaction to produce lipid microparticles loaded with probiotics as an alternative to improve resistance under stress conditions. *Food Hydrocolloids*, *83*, 109-117.
364. **Singh, P., Medronho, B., Miguel, M. G., & Esquena, J. (2018).** On the encapsulation and viability of probiotic bacteria in edible carboxymethyl cellulose-gelatin water-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, *75*, 41-50.
365. **Singh, T. P., Kaur, G., Malik, R. K., Schillinger, U., Guigas, C., & Kapila, S. (2012).** Characterization of intestinal Lactobacillus reuteri strains as potential probiotics. Probiotics and antimicrobial proteins, 4(1), 47-58.
366. **Singleton, P., (1997).** Bacteria in Biology, Biotechnology and medicine. 4th ed. John wiley and Sons. London, UK.
367. **Sionek, B., & Szydłowska, A. (2025).** Probiotics and prebiotics in the aspect of health benefits and the development of novel plant-based functional food. Applied Sciences, 15(6), 3137.
368. **Sirisopapong, M., Shimosato, T., Okrathok, S., & Khempaka, S. (2023).** Assessment of lactic acid bacteria isolated from the chicken digestive tract for potential use as poultry probiotics. *Animal bioscience*, *36*(8), 1209.
369. **Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., & Chaiyasut, C. (2020).** The role of probiotics in colorectal cancer management. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2020*.
370. **Size, P. M. (2019).** Share & Trends Analysis Report By Product (Food & Beverages, Dietary Supplements). By Ingredient (Bacteria, Yeast), By End Use, By Distribution Channel, And Segment Forecasts, 2025, 2019.
371. **Śliżewska, K., Markowiak-Kopeć, P., Żbikowski, A., & Szeleszczuk, P. (2020).** The effect of synbiotic preparations on the intestinal microbiota and her metabolism in broiler chickens. Scientific reports, 10(1), 4281.
372. **Śmiechowska, M., Jakubowski, M., & Dmowski, P. (2018).** Nowe trendy na rynku niskoalkoholowych napojów fermentowanych. Kosmos, 67(3), 575-582.
373. **Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013).** Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed research international*, *2013*(1), 620719.
374. **Song, D., Wang, Y. W., Lu, Z. X., Wang, W. W., Miao, H. J., Zhou, H., & Li, A. K. (2019).** Effects of dietary supplementation of microencapsulated Enterococcus fecalis and the extract of Camellia oleifera seed on laying performance, egg quality, serum biochemical parameters, and cecal microflora diversity in laying hens. Poultry Science, 98(7), 2880-2887.

375. **Soni, R., Tank, k., & jain, N. (2018).** Knowledge, attitude and Practice of health professionals about probiotic use in Ahmedabad , India.Nutrition & Food Science.
376. **Sonia Indri, P. M., Sri, H., & Widodo, W. (2019).** Feed supplementation with encapsulated indigenous probiotic lactic acid bacteria increased broiler chicken performance. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, *36*(1), 29-34.
377. **Sorescu, I., Dumitru, M., & Ciurescu, G. (2019).** Lactobacillus spp. and Enterococcus faecium strains isolation, identification, preservation and quantitative determinations from turkey gut content. Biotechnol. Lett, 24(1), 41-49.
378. **Sorescu, I., Dumitru, M., & Ciurescu, G. (2021**). Lactobacillus spp. strains isolation, identification, preservation and quantitative determinations from gut content of 45-day-old chickens broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *23*(01), eRBCA-2020.
379. **Stamer, J. R. (1976).** *Lactic acid bacteria*. In: Food microbiology: Public health and spoilage aspects. Defigueiredo, M.P. and Splittstoesser, D.F.(Eds.) the Avi Publishing company, Inc. (USA).
380. **Stefanello, C., Rosa, D. P., Dalmoro, Y. K., Segatto, A. L., Vieira, M. S., Moraes, M. L., & Santin, E. (2020).** Protected blend of organic acids and essential oils improves growth performance, nutrient digestibility, and intestinal health of broiler chickens undergoing an intestinal challenge. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 491.
381. **Stoica, Anicuta, G., Dobre, L., Stroescu, M., & Jipa, I. (2010).** Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for characterization of antimicrobial films containing chitosan. University Politehnica of Bucharest, Faculty Applied Chemistry and Material Science, 1234-1240.
382. **Szajewska, H., Berni Canani, R., Domellöf, M., Guarino, A., Hojsak, I., Indrio, F., ... & Weizman, Z. (2023).** Probiotics for the management of pediatric gastrointestinal disorders: position paper of the ESPGHAN special interest group on gut microbiota and modifications. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 76(2), 232-247.
383. **Tador, K. (2008).** On line textbook of bacteriology. The normal bacterial flora of human. **4**,304: p.1421.
384. **Talaro, K. P., & Chess, B. (2018).** Foundation in microbiology. 10 th New York.
385. **Talebzadeh, S., Sharifan, A., Tarzi, B. G., & Panah, H. E. (2014).** Assessment the possibility of probiotic jelly production using microencapsulation technique of Lactobacillus acidophilus bacteria.
386. **Tammime, A. Y. (1981).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy Microbiology. Vol2. The Microbiology of milk products. Robinson, R.K.(Ed.) Applied Science publishers. London and New Jersey.

387. **Tanida, M., Imanishi, K., Akashi, H., Kurata, Y., Chonan, O., Naito, E., & Shibamoto, T. (2014).** Injection of Lactobacillus casei strain Shirota affects autonomic nerve activities in a tissue-specific manner, and regulates glucose and lipid metabolism in rats. Journal of diabetes investigation, 5(2), 153-161.
388. **Tariq, N., Iqbal, M., Sheraz, M., Rusho, M. A., Naz, S., Musa, B., ... & Khalid, M. (2025).** Association of Gestational Diabetes Mellitus with Multi Drug Resistant Vaginal Infections among Pregnant Women. Indus Journal of Bioscience Research, 3(2), 245-252.
389. **Teoh, P. L., Mirhosseini, S. H., Mustafa, S., & Manap, M. Y. A. (2011).** Tolerance of free and encapsulated probiotics towards heat treatment and high sodium concentration. Journal of Food, Agriculture & Environment, 9(1), 69-73.
390. **Thirabunyanon, M. (2011).** Biotherapy for and protection against gastrointestinal pathogenic infections via action of probiotic bacteria . *Maejo Int. J. Sci. Technol.,* 2011, ***5***(01): 108-128 .
391. **Thoda, C., & Touraki, M. (2025).** Molecular mechanisms of probiotic action against gastrointestinal cancers. International Journal of Molecular Sciences, 26(16), 7857.
392. **Thu, T. V., Loh, T. C., Foo, H. L., Yaakub, H., & Bejo, M. H. (2011).** Effects of liquid metabolite combinations produced by Lactobacillus plantarum on growth performance, faeces characteristics, intestinal morphology and diarrhoea incidence in postweaning piglets. Tropical animal health and production, 43(1), 69-75.
393. **Thuy, N. P. (2025).** Isolation and selection of probiotic *Lactobacillus strains* from chicken intestinal tract: A potential solution for sustainable poultry production in Vietnam: https://doi. org/10.12982/VIS. 2025.046. *Veterinary Integrative Sciences*, *23*(2), 1-17.
394. **Tian, C., Wang, L., Liu, M., Liu, J., Qiu, M., & Chen, Y. (2024).** Isolation and identification of chicken-derived lactic acid bacteria: in vitro probiotic properties and antagonistic effects against salmonella pullorum, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli. *Microorganisms*, *12*(4), 795.
395. **Tobia, P. E. S., & Ohimain, E. I. (2024).** Treatment of avian pathogenic Escherichia coli infected broilers with aqueous extracts of Vernonia amygdalina in a challenge experiment. Journal of Food Safety and Hygiene, 10(1), 73-90.
396. **Todorov, S. D., Furtado, D. N., Saad, S. M. I., & de Melo Franco, B. G. (2011).** Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for Lactobacillus acidophilus La-14, a potential probiotic strain. New Microbiologica, 34(4), 357-370.
397. **Tolve, R., Galgano, F., Caruso, M. C., Tchuenbou-Magaia, F. L., Condelli, N., Favati, F., & Zhang, Z. (2016).** Encapsulation of health-promoting ingredients: applications in foodstuffs. International journal of food sciences and nutrition, 67(8), 888-918.
398. **Tomasz, O., Froelich, A., & Tasarek, S. (2014).** Application of gellan gum in pharmacy and medicine. International journal of pharmaceutics, 466(1), 328-340.

399. **Torshizi, M. A., Rahimi, S. H., Mojgani, N., Esmaeilkhanian, S., & Grimes, J. L. (2008).** Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 21(10), 1495-1500.

400. **Trabelsi, I., Bejar, W., Ayadi, D., Chouayekh, H., Kammoun, R., Bejar, S., & Salah, R. B. (2013).** Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. International journal of biological macromolecules, 61, 36-42.

401. **Trip, H., Mulder, N. L., & Lolkema, J. S. (2012).** Improved acid stress survival of Lactococcus lactis expressing the histidine decarboxylation pathway of Streptococcus thermophilus CHCC1524. Journal of Biological Chemistry, 287(14), 11195-11204.

402. **Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (Eds.). (2011).** Stress responses of lactic acid bacteria. Springer Science & Business Media.

403. **Turasan, H., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015).** Encapsulation of rosemary essential oil. LWT-Food Science and Technology, 64(1), 112-119.

404. **Upadrasta, A., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2011).** Improving the stress tolerance of probiotic cultures: recent trends and future directions. *Stress responses of lactic acid bacteria*, 395-438.

405. **van der Ark, K. C., Nugroho, A. D. W., Berton-Carabin, C., Wang, C., Belzer, C., de Vos, W. M., & Schroen, K. (2017).** Encapsulation of the therapeutic microbe Akkermansia muciniphila in a double emulsion enhances survival in simulated gastric conditions. *Food Research International*, *102*, 372-379.

406. **Vanden Braber, N. L., Vergara, L. D., Rossi, Y. E., Aminahuel, C. A., Mauri, A. N., Cavaglieri, L. R., & Montenegro, M. A. (2020).** Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic Kluyveromyces marxianus VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *Lwt*, *118*, 108844.

407. Vega-Vásconez, A., Castillo-Patiño, D. L., Garza-Cervantes, J. A., Santacruz, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2026). Probiotic and Postbiotic Interactions of *Lactobacillus Strains* with *Candida albicans*: Antifungal Effects Through Microbial Competition. Antibiotics, 15(3), 279.

408. **Vimon, S., Angkanaporn, K., & Nuengjamnong, C. (2023).** Microencapsulation of Lactobacillus plantarum MB001 and its probiotic effect on growth performance, cecal microbiome and gut integrity of broiler chickens in a tropical climate. *Animal bioscience*, *36*(8), 1252.

409. **Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C.G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M. & Di Cagno, R. (2012).** Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. Food microbiology, 31(1), pp.116-125.

410. **Vivek, K. (2013).** Use of encapsulated probiotics in dairy based foods. International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences, 3(1), 188-199.

411. **Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., & Gowda, N. N. (2023).** A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*, *3*(1), 100248.
412. **Vonk, R. J., Reckman, G. A., Harmsen, H. J., & Priebe, M. G. (2012).** Probiotics and lactose intolerance. In Probiotics. InTech.
413. **Waititu, S. M., Yitbarek, A., Matini, E., Echeverry, H., Kiarie, E., Rodriguez-Lecompte, J. C., & Nyachoti, C. M. (2014).** Effect of supplementing direct-fed microbials on broiler performance, nutrient digestibilities, and immune responses. Poultry science, 93(3), 625-635.
414. **Wang, L., Lin, Z., Ali, M., Zhu, X., Zhang, Y., Li, S., & Li, J. (2023).** Effects of lactic acid bacteria isolated from Tibetan chickens on the growth performance and gut microbiota of broiler. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1171074.
415. **Wang, R., Liu, Y., Wen, Y., Chen, S., Zhang, X., Zhang, C., & Liu, X. (2025).** Unraveling the secrets of probiotic adhesion: An overview of adhesion-associated cell surface components, adhesion mechanisms, and the effects of food composition. Trends in Food Science & Technology, 159, 104945.
416. **Wang, W., Dang, G., Hao, W., Li, A., Zhang, H., Guan, S., & Ma, T. (2025).** Dietary supplementation of compound probiotics improves intestinal health by modulated microbiota and its SCFA products as alternatives to in-feed antibiotics. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 17(4), 1969-1984.
417. **Wang, X., Farnell, Y. Z., Peebles, E. D., Kiess, A. S., Wamsley, K. G. S., & Zhai, W. (2016).** Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident Lactobacillus of male broilers. Poultry science, 95(6), 1332-1340.
418. **Wang, Y., Sun, J., Zhong, H., Li, N., Xu, H., Zhu, Q., & Liu, Y. (2017).** Effect of probiotics on the meat flavour and gut microbiota of chicken. *Scientific Reports*, *7*(1), 6400.
419. **Wang, Y., Zhang, C., Liu, F., Jin, Z., & Xia, X. (2022).** Ecological succession and functional characteristics of *lactic acid bacteria* in traditional fermented foods. Critical reviews in food science and nutrition, 1-15.
420. **Wei, Q., Song, L. Y., Rao, R., Yang, H. W., Wen, Y. P., Lv, L., & Wang, L. (2025).** The impact of combined therapy with Lactobacillus acidophilus and montmorillonite powder on the inflammatory response in pediatric rotavirus enteritis. International Archives of Allergy and Immunology, 186(7), 689-695.
421. **Wood, B. J. B. (1998).** Microbiology of fermented foods. 2nd· Ed., Vol. 1. Blackie Academic and Professional – Chapman & Hall, London.
422. **Wright, E., Valand, N., & Venkatraman Girija, U. (2025).** Harnessing Probiotics to Combat Candidiasis: Mechanisms, Evidence, and Future Directions. Journal of Fungi, 11(11), 779.
423. **Wu, C., Huang, J., & Zhou, R. (2014).** Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. Applied microbiology and biotechnology, 98(3), 1055-1063.

424. **Wu, C., Zhang, J., Chen, W., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2012).** A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in Lactobacillus casei Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. Applied microbiology and biotechnology, 93(2), 707-722.
425. **Wu, R., Sun, Z., Wu, J., Meng, H., & Zhang, H. (2010).** Effect of bile salts stress on protein synthesis of Lactobacillus casei Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis. Journal of dairy science, 93(8), 3858-3868.
426. **Wu, Z., Yang, K., Zhang, A., Chang, W., Zheng, A., Chen, Z., & Liu, G. (2021).** Effects of Lactobacillus acidophilus on the growth performance, immune response, and intestinal barrier function of broiler chickens challenged with Escherichia coli O157. *Poultry Science*, *100*(9), 101323.
427. **Xu, Y., Yu, Y., Shen, Y., Li, Q., Lan, J., Wu, Y., & Yang, C. (2021).** Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers. *Poultry science*, *100*(9), 101358.
428. **Yadav, A. S., & Jha, R. (2021).** Strategies to modulate gut health and immune system of broiler chickens for improving growth performance. Veterinary Sciences, 8(11), 263.
429. **Yadav, S., & Jha, R. (2019).** Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of animal science and biotechnology*, *10*, 1-11.
430. **Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., & Fillmore, S. (2012).** Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. Amb express, 2(1), 48.
431. **Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018).** Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB express*, *8*(1), 10.
432. **Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., & Li, L. (2020).** Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(2), 857-874.
433. **Yavuzdurmaz, H. (2007).** Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk (Master's thesis, Izmir Institute of Technology (Turkey)).
434. **Yi, Y., Li, P., Zhao, F., Zhang, T., Shan, Y., Wang, X., ... & Lü, X. (2022).** Current status and potentiality of class II bacteriocins from lactic acid bacteria: structure, mode of action and applications in the food industry. Trends in Food Science & Technology, 120, 387-401.
435. **Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020).** Effect of encapsulation methods on the physicochemical properties and the stability of Lactobacillus plantarum (NCIM 2083) in synbiotic powders and in-vitro digestion conditions. *Journal of Food Engineering*, *283*, 110033.

436. **Yu, Z., Su, Y., Zhang, Y., Zhu, P., Mei, Z., Zhou, X., & Yu, H. (2021).** Potential use of ultrasound to promote fermentation, maturation, and properties of fermented foods: A review. Food Chemistry, 357, 129805.
437. **Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J. & Giraffa, G., (2011).** Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiology, 28(5), pp.1033-1040.
438. **Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan, A., & Mohammadi, N. (2014).** Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 13(3), 843.
439. **Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022).** Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. Foods, 11(9): 1283.
440. **Zaylaa, M., Al Kassaa, I., Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Desramaut, J., & Grangette, C. (2018).** Probiotics in IBD: Combining in vitro and in vivo models for selecting strains with both anti-inflammatory potential as well as a capacity to restore the gut epithelial barrier. *Journal of functional foods*, *47*, 304-315.
441. **Zeashan, M., Afzaal, M., Saeed, F., Ahmed, A., Tufail, T., Ahmed, A., & Anjum, F. M. (2020).** Survival and behavior of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated human gastrointestinal and technological conditions. *Food Science & Nutrition*, *8*(5), 2419-2426.
442. **Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & Cruz, A. G. (2022).** Probiotic: Definition, isolation, selection and role in health. Applied Food Research, 2(2), 100114.
443. **Zeng, Z., Xu, X., Zhang, Q., Li, P., Zhao, P., Li, Q., & Piao, X. (2015).** Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. Animal Science Journal, 86(3), 279-285.
444. **Zhang, H., & Cai, Y. (Eds.). (2014).** Lactic acid bacteria: fundamentals and practice. Springer.
445. **Zhang, H., Li, R., & Liu, W. (2011).** Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits: a review. International Journal of Molecular Sciences, 12(2), 917-934.
446. **Zhang, L., Li, J., Yun, T. T., Qi, W. T., Liang, X. X., Wang, Y. W., & Li, A. K. (2015).** Effects of pre-encapsulated and pro-encapsulated Enterococcus faecalis on growth performance, blood characteristics, and cecal microflora in broiler chickens. *Poultry Science*, *94*(11), 2821-2830.
447. **Zhang, W., Chen, X., Sun, W., Nie, T., Quanquin, N., & Sun, Y. (2020).** Escherichia coli increases its ATP concentration in weakly acidic environments principally through the glycolytic pathway. Genes, 11(9), 991.

448. **Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020).** A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 70(4), 2782-2858.

449. **Zheng, Y., Zhao, J., Nie, X., Chitrakar, B., Gao, J., & Sang, Y. (2024).** Mutual adhesion of Lactobacillus spp. to intestinal cells: A review of perspectives on surface layer proteins and cell surface receptors. International Journal of Biological Macromolecules, 282, 137031.

450. **Zhong, L., Zhang, X., & Covasa, M. (2014).** Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology: WJG, 20(24), 7878.

451. **Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y., & Joerger, R. D. (2002).** 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, *68*(1), 124-137.

452. **Zielińska, D., Krawczyk, M., & Neffe-Skocińska, K. (2025).** Thermotolerant probiotic—the potential of improving the survivability of beneficial bacteria. Fermentation, 11(6), 313.

453. **Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M., & Noskova, S. (2020).** Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. Antibiotics, 9(9): 553

454. **Zou, A., Sharif, S., & Parkinson, J. (2018*).*** *Lactobacillus elicits* a'Marmite effect'on the chicken cecal microbiome. *npj Biofilms and Microbiomes*, *4*(1), 27.

455. **Zuidam, N. J., & Nedovic, V. (Eds.). (2010**). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing (Vol. 410). New York, NY, USA:: Springer.

456. **Zulkapli, R., Sabirin, F., Salleh, A. N., Zulaidi, N. Z. F., Rahim, I. N. A., & Aziz, M. N. M. (2025).** The role of probiotics in modulating cariogenic bacteria and oral health outcomes: A systematic review and risk of bias assessment. The Saudi Dental Journal, 37(10), 88.

457. **Zulkifli, I., Abdullah, N., Azrin, N. M., & Ho, Y. W. (2000).** Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing Lactobacillus cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *British poultry science*, *41*(5), 593-597.

الملحق

Appendice

الجدول رقم (40): تأثير البروبيوتيك على أداء نمو الدواجن

المعزز الحيوي	الحيوان	الجرعة	الايام	التأثير	المرجع
Bacillus Subtilis/سينبوتيك	دجاج اللحم	$> 10^9$	42	زيادة في معدل الوزن، تحسن معامل التحويل و عدم وجود فروق معنوية باستهلاك العلف مقارنة مع الشاهد	اشقيفي، 2023
L. plantarum strain IMAU10120 (LP-8)	دجاج اللحم	2×10^6 cfu/mL	42	تحسن FCR	Gao *et al.*, 2017
***L. fermentum* (*CIP 102980*) or a strain of *L.* spp. (*Autruche 4; DQ418552*)**	دجاج اللحم	Dose of 1 mL containing 10^7 cells	29	تحسن معنوي في زيادة الوزن وكفاءة تحويل العلف	Khan *et al.*, 2007
L. agilis JCM 1048* and *L. salivarius subsp. salicinius JCM 1230	دجاج اللحم		40	زيادة معنوية في الوزن المكتسب	Lan *et al.*, 2003
Pediococcus acidilactici MA18/5M	دجاج اللحم	0.8 to 1.6 g	42	تحسن معنوي في أداء النمو الكلي	Alkhalf *et al.*, 2010
3 Bacillus subtilis strains	دجاج اللحم	3×10^5 cfu/g of finished feed	41	تحسن في اجمالي زيادة الوزن	Wang *et al.*, 2016
A. oryzae, B. bifidum, B. thermophilus, C. pintolopessi, E. faecium, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. plantarum* and *L. rhamnosus	دجاج اللحم	2 gm/10 liters drinking water	42	زيادة معنوية في الوزن المكتسب وانتاجية لحم الصدر والفخذ	Kabir *et al.*, 2004
L. fermentum CCM 7158 ***E. faecium M 74***	دجاج اللحم	1×10^9 cfu/kg 2×10^9 cfu/kg	42	زيادة في الوزن الحي	Capcarova *et al.*, 2010
S. boulardii* and *B. subtilis B10	دجاج اللحم	1×10^8 cfu/kg of feed	72	تحسن معنوي في الوزن الحي	Hatab *et al.*,2016
B. subtilis C-3102	دجاج اللحم	0.1% of diet	42	زيادة معنوية في الوزن الحي وانخفاض في معامل التحويل الغذائي	Manafi *et al.*, 2017
B. subtilis PB6 (ATCC-PTA 6737)	دجاج اللحم	5×10^{11} cfu/kg feed	35	تحسن معنوي في معامل التحويل الغذائي	Jayaraman *et al.*, 2013
L. reuteri (DSM 16350), E. faecium (DSM 16211), Bifidobacterium animals (DSM 16284), P. acidilactici (DSM 16210)* and *L. salivarius (DSM 16351)	دجاج اللحم	10^8 cfu/kg diet	42	حسنت الوزن المكتسب ومعامل التحويل الغذائي وعامل كفاءة الانتاج	Palamidi *et al.*, 2016
Propionibacterium acidipropionici	دجاج اللحم	7.5×10^4 cfu/g of feed	21	تحسن معنوي في FCR	Waititu *et al.*, 2014
B. subtilis	دجاج اللحم	250 g/ton	21	تحسن أداء الحيوان	Hayashi *et al.*, 2018

الجدول رقم (41): تأثير البروبيوتيك على الاستجابة المناعية للدواجن

المعزز الحيوي	الحيوان	الجرعة	الايام	التأثير	المرجع
L. plantarum strain IMAU10120	دجاج اللحم	2×10^6 cfu/mL	42	احدثت اعلى مستوى من الاستجابة المناعية	Gao *et al.*, 2017
A. oryzae, B. bifidum, B. thermophilus, C. pintolopessi, E. faecium, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. plantarum* and *L. rhamnosus	دجاج اللحم	2 gm/10 liters of drinking water	42	عززت بشكل معنوي انتاج الاجسام المضادة ووزن الاعضاء المناعية	Kabir *et al.*, 2004
S. boulardii* and *B. subtilis B10	دجاج اللحم	10^8 cfu/kg of feed	72	تحسن معنوي في مستويات السيتوكينات والمضادة للالتهابات، وزيادة في الخلايا إيجابية IgA في الصائم ، وتحسن في السيتوكينات المعوية: إنترلوكين -6 (IL-6)، وعامل نخر الورم-ألفا (TNF-α)، وإنترلوكين -10 (IL-10، وعامل النمو المحول-بيتا (TGF-β).	Rajput *et al.*, 2013
B. subtilis C-3102	دجاج اللحم	0.1% of diet	42	زيادة مستويات الأجسام المضادة لفيروس نيوكاسل والتهاب الشعب الهوائية المعدي ومرض الجراب المعدي	Manafi *et al.*, 2017
L. reuteri (DSM 16350), E. faecium (DSM 16211), B. animals (DSM 16284), P. acidilactici (DSM 16210)* and *L. salivarius (DSM 16351)	دجاج اللحم	10^8 cfu/kg diet	42 days	أحدثت استجابة مضادة للالتهابات على مستوى الأعور	Palamidi *et al.*, 2016
Blend of *3 Bacillus substilis strains (BSS)* and *Propionibacterium acidipropionici* (PA)	دجاج اللحم	7.5×10^4 cfu/g	21	خفضت PA التعبير اللفائفي لكل من TLR-2b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13، بينما خفضت BSS التعبير عن TLR-2b, IL-2, IL-4, IL-6في جميع الأنسجة الثلاثة	Waititu *et al.*, 2014
E. faecium	Layer	4×10^8 cfu/kg	48	تحسن في إنتاج IgA	Beirão *et al.*, 2018

L. acidophilus, B. bifidum* and *S. faecalis	دجاج اللحم	10^6 bacteria/chick on day of hatching	14	تعزيز إنتاج الأجسام المضادة الجهازية والموضعية	Haghighi *et al.*, 2006
***Lactobacillus* spp.**	دجاج اللحم	1 g/kg feed	35	زيادة الخلايا الليمفاوية داخل الظهارة المعوية المعبرة عن العلامات السطحية CD3وCD4 وCD8	Dalloul *et al.*, 2003
L. acidophilus, L. fermentum L. plantarum* and *E. faecium (A) L. jensenii, L. plantarum, L. fermentum* and *L. casei, (B)	دجاج اللحم	0.2 mL/chick, 10^9 cfu/mL	أول 1-3	المجموعة (أ) خفضت IL-1β, IL-6, IFN-γوحسنت مستويات IL-10 في اللوزتين الأعورية مقارنة بالمجموعة (ب(	Chen *et al*., 2012

الجدول رقم (42): تأثير المعززات الحيوية في صحة الامعاء عن الدواجن

المعزز الحيوي	الحيوان	الجرعة	الايام	التأثير	المرجع
Bacillus Subtilis/سينبوتيك	دجاج اللحم	$> 10^9$	42	زيادة معنوية في طول الزغابات وعمق الخبايا للامعاء	اشقيفي، 2023
بربيوتيك	دجاج اللحم		42	مقاومة وتحمل اكثر للاصابة بداء الاكريات	لقمس، 2023
L. plantarum strain IMAU10120	دجاج اللحم	2×10^6 cfu/mL	42	تسارع نضج الميكروبيوتا المعوية، وتحفيز نمو العديد من بكتيريا *Lactobacillus* spp. المعوية	Gao *et al.*, 2017
L. agilis JCM 1048* and *L. salivarius subsp. salicinius JCM 1230	دجاج اللحم	10^7 cfu per gram of feed	40	زيادة تعداد الميكروفلورا المفيدة والحفاظ على التوازن الطبيعي للميكروبات في الأمعاء	Lan *et al.*, 2003
S. boulardii* and *B. subtilis B10	دجاج اللحم	1×10^8 cfu/kg of feed	72	تحسن معنوي في ارتفاع الزغابات المعوية وعرضها وعدد الخلايا الكأسية	Rajput *et al.*, 2013
B. subtilis C-3102	دجاج اللحم	0.1% of diet	42	انخفاض عمق الخبايا وزيادة ارتفاع الزغابات مع انخفاض معنوي في تعداد *E. coli* والبكتيريا القولونية والسالمونيلا في الأعور	Manafi *et al.*, 2017
B. subtilis PB6 (ATCC-PTA 6737)	دجاج اللحم	5×10^{11} cfu/kg feed	35	انخفاض معنوي في تعداد *Clostridium perfringens*المعوية، وتحسن طول الزغابات ونسبة طول الزغابة إلى عمق الخبية	Jayaraman *et al.*, 2013
***L. johnsonii, (No.709) L. crispatus (No.697) L. salivarius (No.461)* and *unidentified Lactobacillus* spp.**	دجاج اللحم		42	جميع المعززات الحيوية مالت إلى تقليل عدد البكتيريا المعوية في اللفائفي	Olnood *et al.*, 2015
L. reuteri (DSM 16350), E. faecium (DSM 16211), B. animals (DSM 16284), P. acidilactici (DSM 16210)* and *L. salivarius (DSM 16351)	دجاج اللحم	10^8 cfu/kg diet	42	تحسن معنوي في قابلية الهضم الظاهرية للبروتين الخام والدهون على طول القناة الهضمية وفي الامتصاص اللفائفي للمادة الجافة	Palamidi *et al.*, 2016
Blend of 3 *Bacillus substilis strains*	دجاج اللحم	7.5×10^4 cfu/g	21	كلا المعززين خفضا قابلية الهضم اللفائفي الظاهرية للمادة الجافة والبروتين الخام	Waititu *et al.*, 2014
***P. acidipropionici* (*PA*)**	دجاج اللحم				
***Lactobacillus* spp.**	دجاج اللحم	1 g/kg feed	35	زيادة مقاومة الطيور لطفيلي *Eimeria acervulina*	Dalloul

					et al., 2003
B. subtilis	دجاج اللحم	250, or 500 g/ton	21	الجرعة الأعلى حسنت الاستجابة الدفاعية في اللفائفي	Hayashi *et al.*, 2018
L. acidophilus, L. fermentum L. plantarum* and *E. faecium	دجاج اللحم	0.2 mL/chick, 10^9 cfu/mL	اول 1-3	انخفضت أعداد السالمونيلا المعزولة من اللوزتين الأعورية والطحال بشكل معنوي	Chen *et al.*, 2012
***Lactobacillus based probiotic culture* (*FM-B11*)**	دجاج اللحم	10^4, 10^6, and 10^8 cfu/chick	بعد اول ساعة من العدوى	الجرعة الأعلى خفضت بشكل معنوي تعداد *Salmonella Enteritidis*	Higgins *et al.*, 2008
A. oryzae, B. bifidum, L. casei, L. acidophilus, Torulopsis spp.* and *S. faecium	دجاج اللحم	100 mg/kg diet	35	انخفاض تعداد بكتيريا *Campylobacter* والبكتيريا القولونية في الأمعاء	Khaksefidi and Rahimi, 2005
L. salivarius	دجاج اللحم	10^8 cfu 100 µL of phosphate-buffered saline	14	تقليل أعداد *Clostridium perfringens* و *Salmonella enteritidis* في الأمعاء	Kizerwetter-Swida and Binek, 2009

ABSTRACT

The intensive use of antibiotics as growth promoters in the poultry industry has led to serious health problems, most notably the development of bacterial resistance and the accumulation of drug residues in animal products. This has driven scientists to search for safe and effective alternatives, such as probiotics. However, the efficacy of these probiotics faces significant challenges due to their exposure to harsh conditions in the gastrointestinal tract (gastric acidity, bile salts) as well as during manufacturing and storage. These conditions reduce their viable counts and limit their arrival in the intestine in sufficient numbers to achieve their health benefits.

This study aimed to evaluate the effect of microencapsulation of *Lactobacillus* spores (isolated from broiler intestines) on enhancing their survival under extreme conditions and to investigate the impact on health indicators and productive performance of healthy birds, as well as the prevention of experimental infection with pathogenic bacteria.

The study included the isolation and identification of 16 *Lactobacillus* isolates from 50 samples of broiler intestinal contents. Isolates were characterized by culture on differential and selective media, and confirmed using Polymerase Chain Reaction (PCR). Nine isolates were identified as *L. plantarum* and two as *L. acidophilus*; the remaining isolates were disregarded. Both species were tested for their inhibitory efficacy against *E. coli*, *Salmonella*, and *Staph. aureus*, as well as their antibiotic sensitivity. Subsequently, the isolates were microencapsulated using two methods: a single layer of 3% sodium alginate, and a double layer (sodium alginate + 1% chitosan) using the extrusion technique. Encapsulation efficacy was evaluated through thermal treatment tests (slow and rapid pasteurization), resistance to acidity (pH 1, 2, 3) and bile salts (1%, 2%, 3%), and stability during refrigerated storage (4°C) for 3 months. A field trial was applied to 648 broiler chickens (ROSS 308), divided into two main groups (healthy and experimentally challenged with *E. coli*) within different experimental designs to assess the effect of unencapsulated and encapsulated probiotics (at a dose of 10^8 CFU/kg) on growth indicators (body weight, feed intake, feed conversion ratio, mortality rate) and general health.

The isolates exhibited characteristics of lactic acid bacteria (Gram-positive, catalase-negative). Both *L. acidophilus* and *L. plantarum* showed clear inhibitory activity against the three pathogenic bacteria, especially in the bacterial filtrate, with the greatest inhibitory efficacy observed against *Staphylococcus aureus*. The isolates showed complete resistance to some antibiotics (amoxicillin, erythromycin, cephalexin) and sensitivity to others (spiramycin, colistin, doxycycline, fosfomycin, ciprofloxacin).

The encapsulation process resulted in a decrease in viable counts compared to the control before encapsulation; however, it maintained sufficiently high counts to achieve health benefits. The viable counts for *L. acidophilus* and *L. plantarum* were 13.33 and 13.21 log10 CFU/ml, respectively, before microencapsulation. After single-layer encapsulation, the viable counts decreased to 11.67 and 10.56 log10 CFU/g, respectively, and after double-layer encapsulation, they decreased to 10.92 and 10.16 log10 CFU/g, respectively.

Double-layer encapsulation provided the best protection against slow and rapid pasteurization, with survival percentages reaching 84.61% for *L. acidophilus* and 80.01% for *L. plantarum* during slow pasteurization, compared to 29.03% and 25.13%, respectively, in the unencapsulated control. Double-layer encapsulation showed clear superiority in protecting the bacteria at pH 2 and 3 for 3 hours (7.73 - 6.88 log10 CFU/g). At pH 1, the single-layer failed to protect the bacteria (1.53 - 0 log10 CFU/g), while the double-layer maintained viable counts of (5.64 - 3.41 log10 CFU/g). Double-layer encapsulation significantly improved bacterial survival at various bile salt concentrations (1%, 2%, 3%), with very high survival rates (over 96% at 1% concentration). Double-layer encapsulation maintained the highest bacterial survival rate during three months of refrigerated storage (96.98% for *L. acidophilus* and 95.28% for *L. plantarum*) compared to the control (91.38% and 88.35%, respectively).

The group fed double-layer encapsulated probiotics significantly outperformed ($P \leq 0.05$) all other groups (control, antibiotic, unencapsulated probiotic, and single-layer encapsulated) in final body weight (3291 g), feed conversion ratio (1.586), and lowest mortality rate (1.38%). The group fed double-layer encapsulated probiotics before bacterial challenge showed high resistance to infection, recording the highest final body weight (3101 g) and lowest mortality rate (4.16%), compared to the untreated challenged group, which recorded the highest mortality (30.55%) and lowest body weight.

Double-layer microencapsulation (sodium alginate and chitosan) demonstrates high efficacy in protecting *Lactobacillus* spores from harsh conditions during manufacturing, storage, and transit through the gastrointestinal tract. This leads to improved delivery of sufficient viable beneficial bacteria to the intestine, positively reflecting on bird health and productive performance, and enhancing their ability to resist pathogenic challenges. The results indicate that using double-layer encapsulated probiotics represents a promising and effective strategy as a safe alternative to antibiotic growth promoters in the broiler industry, contributing to the production of healthier and safer poultry for consumers.

Keywords: Microcapsulation, Probiotic, Sodium Alginate, Chitosan, Broiler Chickens

Syrian Arab Republic

Hama University

Faculty of Vet. Med

Department of Public Health and Preventive Medicine

The Effect of Microcapsulation on the Efficacy of Probiotics and its Reflection on the Health Parameters of Meat Chickens

A Thesis is presented
by

Dr. MUBARAK MAJED ALSAAD

For

The Degree of PHD in Veterinary Medical Science
(Public Health and Preventive Medicine)

Supervised By

Dr.Abdulkarim Hallak

1448 H-2026AD