استعمال النواتج الأيضية لبكتريا حامض اللاكتيك العلاجية لتثبيط نمو عزلات مرضية معزولة من حيوانات مصابة

علي حسين علي حميد صبري جثير المروزي حسن رحيم الشريفي
قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية / كلية الزراعة / جامعة بغداد

البحث مستل من رسالة ماجستير

الخلاصة

نميت ثلاثة أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية المعزولة محلياً وهي : *Lactobacillus acidophilus (Lb.acid.)* و *Lctobacillus reuteri (Lb. reut.)* و *Bifidobacterium ssp. (Bif)* في وسطي الحليب الكامل والـ MRS (Man Reqosa and Sharp) السائلين بشكل منفرد أو خليط ثنائي (*Lb. acid. + Bif.*) أوثلاثي (*Lb.acid. + Lb.reut. + Bfi.*) وقد أبدت رواشح هذه المزارع (CFE) والحاوية على نواتجها الأيضية والخالية من الخلايا الحية مقدرة تثبيطية جيدة ضد أربعة أنواع من البكتريا المرضية المعزولة من اصابات حيوانية وهي : *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris* وقد دلت نتائج التثبيط ضد بكتريا الـ*E. coli* إن أفضل مدة تحضين لجميع مزارع بكتريا حامض اللاكتيك هي 72 ساعة للحصول على أعلى مقدرة تثبيطية كما أبدت رواشح مزارع بكتريا *Lb.acid.* في وسطي الحليب والـ MRS أعلى مقدرة تثبيطية ضد جميع أنواع البكتريا المرضية فقد كان معدل قطر هالة التثبيط الإجمالي (14.6-15.3) لوسطي الحليب والـ MRS على التوالي كما احتفظت هذه الرواشح بقدرتها التثبيطية لأكثر من أسبوع من الخزن المبرد وكانت(13.4 , 14.5) لراشحي الحليب والـ MRS على التوالي .

Use of metabolites of therapeutic Lactic acid bacteria to inhibit four species veterinary pathogenic bacteria

Ali H. A . Hamid , S.C. Abood , H.R.Al sharefe
Food Sci. & Biotech. College of Agriculture University of Baghdad

Summary

This study aimed to detect metabolites inhibition activity for three therapeutic Lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* (*Lb. acid*.) , *Lactobacillus reuteri* (*Lb. reut*.) and *Bifidobacterium ssp*. (*Bif*.) which were grown in whole milk and Man Reqosa and Sharp (MRS) broth as single or double (*Lb. acid. + Bif*.) or mixed (*Lb. reut + Bif. + Lb. acid*) culture Cell Free Extract (CFE) of these culture which contained their metabolites of Lactic acid bacteria (exclusion *Lb. reut*.) showed good inhibition against four species of pathogenic *Escherichia*

coli ; *Salmonella typhimurium* ; *Proteus volgaris* and *Staphylococcus aureus*. inhibition activity against *E. coli* culture showed that 72 hours was the best incubation time for Lactic acid bacteria to produce more metabolite with best inhibition activity. Metabolite (CFE) of *Lb. Acid* culture grown in milk and MRS broth showed the best inhibition activity against all of Gram Positive and Gram negative test bacteria with over all inhibition zone diameter was 14.6 and 15.3 mm for milk and MRS broth supernatant respectively and this activity remained for more than one week as inhibition zone diameter were 13.4 and 14.5 mm for supernatant of milk and MRS respectively.

المقدمة

شهدت السنوات الأخيرة من القرن الماضي وبدايات القرن الحالي تطوراً واضحاً في طرق العلاج الحيوي وتوجهاً واسعاً نحو استعمال الأحياء المجهرية ونواتجها الأيضية في علاج بعض الحالات المرضية وتأتي بكتريا حامض اللاكتيك في مقدمة هذه الأحياء المجهرية المستعملة في هذا المجال وكان لتواجد بكتريا حامض اللاكتيك في الطبقة الطلائية للأمعاء والقناة الهظمية للانسان وبعض اللبائن نبيتاً طبيعياً واستعمالها الآمن منذ وقت طويل في مجال الأغذية المتخمرة ومنتجات الألبان أدى إلى تحفيز استعمالها في مجالات جديدة أخرى شملت تثبيط نمو الأحياء المرضية من خلال التنافس على المغذيات ومن خلال انتاجها للعديد من المواد الأيضية ذات التأثير التثبيطي كالحوامض العضوية (**لاكتيك–خليك–بروبيونيك**) وبيروكسيد الهيدروجين والمضادات الحيوية والبكتريوسينات وثنائي أوكسيد الكاربون ونواتج أخرى .. وقد أثبتت الدراسات مقدرة هذه النواتج الأيضية بشكل منفرد أو مجتمعة على تثبيط نمو العديد من أنواع الأحياء المجهرية المختلفة وقد هدفت هذه الدراسة إلى تنمية عدة أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية بشكل منفرد ومشترك في وسطي الحليب والـ MRS ثم فصل رواشح هذه المزارع واستعمالها في حالتها السائلة في تجارب تثبيط ضد البكتريا المرضية. (1,2)

المواد وطرائق العمل

1. **العزلات البكتيرية:** اختبرت ثلاثة أنواع من البكتريا العلاجية هي *Lb. reut.* و *Lb. acid.* و *Bfi.* والمعزولة والمشخصة مسبقاً في مختبرات قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية ومصدرها براز الأطفال ذوي الرضاعة الطبيعية أما البكتريا المرضية فأختبرت أربعة عزلات بكتيرية هي:

Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris

من مختبرات قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية ومصدرها عدة إصابات بيطرية ثم نشِطت هذه العزلات وأجريت عليها بعض الفحوص التأكيدية.

التثبيط ضد البكتريا المرضية :

حُضِرَ (CFE) راشح المزرعة البكتيرية للبكتريا العلاجية والحاوي على نواتجها الأيضية بالطريقة المذكورة في كل من (3, 4 , 5) وهي على النحو الآتي :-

لقحت أنواع بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية في 250 مل في وسطي الحليب الكامل والـ MRS بحجم لقاح 2.5 % وحضنت بدرجة 37° م ولمدد مختلفة(24 – 48 – 72 – 96 – 120)ساعة وبثلاثة مكررات ثم استعمل (CFE) لهذه المزارع في التضاد مع بكتريا *Escherichia coli* والتي استعملت معياراً لإختيار مدة الحضن الأمثل للحصول على الراشح ذو المقدرة التثبيطية الأمثل ثم اجريت تجارب التثبيط للـ CFE لكل من مزرعتي الحليب و الـ MRS للأنواع العلاجية الثلاثة ومشترك ثنائي (*Bfi. + Lb. acid.*) وثلاثي (*Lb. reut. + Lb. acid. + Bif*) وبشكل مباشر بعد الفصل للـ CFE وبعد اسبوع و اسبوعين من وضعه في الثلاجة , وبعد اسبوعين من وضعه بدرجة حرارة الغرفة وضد البكتريا المرضية في وسط Brain Heart infusion agar

النتائج

1. دراسة تأثير مدة الحضن في المقدرة التثبيطية للبكتريا العلاجية

درست ثلاث أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية بصورة منفردة ومشتركة كما هو واضح في جدول (1) وجدول (2) إن أفضل مدة حضن للحصول على أعلى فعالية تثبيطية ضد بكتريا الأختبار (*Escherichia coli*) هي 72 ساعة وعند حضنها في وسطي الحليب و MRS ولم تبدِ رواشح المزارع لكل من الوسطين أي فعالية تثبيطية عند مدة حضن 24 ساعة وبدأت الفعالية التثبيطية بالظهور عند مدة حضن 48 ساعة وتزايدت هذه الفاعلية عند مدة حضن 72 ساعة إلا إنه بدأت بالأنخفاض بزيادة مدة الحضن باستثناء راشح مزرعة بكتريا *Lactobacillus acid.* الذي يبقى محتفظاً تقريباً بفعالية تثبيطية بمدد حضن 96–120 ساعة.

جدول (1) تأثير مدة الحضن للبكتريا العلاجية في وسط MRS في المقدرة التثبيطية ضد بكتريا *E. coli*

ثلاثي *Lb. acido. + Lb. reut. + Bif.*	ثنائي *Bif.+ Lb. acido*	*Bifido.*	*Lb. reut.*	*Lb. acido.*	مدة الحضن ساعة
6.0	6.2	5.8	5.5	6.0	24
12.2	9.6	7.0	7.2	9.9	48
15.0	14.6	10.2	9.3	16.8	72
14.2	14.5	9.0	8.8	16.8	96
13.8	14.2	7.2	8.7	16.8	120

قطر الحفرة 5 ملم محسوب مع النتائج

جدول (2) تأثير مدد الحضن للبكتريا العلاجية في وسط الحليب في المقدرة التثبيطية ضد بكتريا *E. coli*

ثلاثي *Lb. acido. + Lb. reut. + Bif.*	ثنائي *Bif.+ Lb. acido*	*Bifido.*	*Lb. reut.*	*Lb. acido.*	مدة الحضن ساعة
لا يوجد تثبيط	لا يوجد تثبيط	لا يوجد تثبيط	لا يوجد تثبيط	لا يوجد تثبيط	24
10.0	9.4	6.9	6.7	9.2	48
13.2	13.6	9.8	6.9	16.2	72
13.0	13.2	9.0	6.7	16.2	96
12.0	13.0	6.8	6.2	16.1	120

قطر الحفرة 5 ملم محسوب مع النتائج

التثبيط ضد البكتريا الاختبارية :

بينت تجارب التثبيط لرواشح مزرعتي الحليب والـ MRS ولكل من البكتريا *Lb. acid.* و *Lb. reut.* و *Bifidobacterium ssp.* ومشترك ثنائي (*Lb. acido + Bif.*) ومشترك ثلاثي (*Lb. acido. +* *Bifido + Lb. reut.*) قدرة تثبيطية واضحة ضد 4 أنواع من البكتريا المرضية أو المسببة لتلف الأغذية جدول (3) باستثناء راشح مزرعة الحليب لبكتريا *Lb. reut.* والذي أبدى قدرة تثبيطية ضعيفة ضد بكتريا الاختبار.

جدول (3) معدلات أقطار التثبيط لرواشح عدة أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية ضد 4 أنواع من بكتريا الاختبار

راشح بكتريا	معدل التثبيط (ملم)					
	مزرعة الـ MRS			مزرعة الحليب		
	ضد الجراثيم السالبة	ضد الموجبة	الكلي (+ و–)	ضد الجراثيم السالبة	ضد الموجبة	الكلي (+ و–)
Lb. acid.	15.1	16.2	15.6	14.5	15	14.7
Lb. reut.	8.9	10.5	9.7	6.5	7.5	7
Bifidobacterium	9.5	10.4	9.9	9.1	10	9.5
Lb. acid.+Bif.	13	16	14.5	12	12.5	12.2
Lb. acid.+Lb.reut.+ Bif.	13.6	15.5	14.5	12.7	12	12.3

* قطر الحفرة 5 ملم محسوب مع النتائج

** النتائج معدل ثلاث مكررات

*** البكتريا الاختبارية السالبة لصبغة كرام هي *E.coli Sal.typhimurium Proteus vulgaris*

**** البكتريا الاختبارية الموجبة لصبغة كرام هي *Staph. aureus*

جدول (4) تأثير مدد من الخزن بدرجتي 4 م و 25 م في المقدرة التثبيطية لـ (CFE)–MRS ضد البكتريا الاختبارية

راشح بكتريا	بعد اسبوع بالثلاجة $4\ C^0$	بعد اسبوعين بالثلاجة $4\ C^0$	بعد اسبوعين بحرارة الغرفة $25\ C^0$
Lb. acid.	14.5	7.2	6.6
Lb. reut.	7.6	5.6	لا يوجد تثبيط
Bif.	6.9	6.1	لا يوجد تثبيط
Lb.acido.+Bif.	10.9	6.5	5.7
Lb.acido.+Bif.+ Lb. reut.	10.5	6.5	5.7

* النتائج هي معدلات التثبيط ضد 4 أنواع من بكتريا الاختبار

** قطر الحفرة 5 ملم محسوب مع النتائج

جدول (5) أحتفاظ (CFE – الحليب) بمقدرته التثبيطية مع الزمن

راشح بكتريا	بعد اسبوع بالثلاجة $4\ C^0$	بعد اسبوعين بالثلاجة $4\ C^0$	بعد اسبوعين بحرارة الغرفة $25\ C^0$
Lb. acid.	13.4	6.7	5.9
Lb. reut.	لا يوجد تثبيط	لا يوجد تثبيط	لا يوجد تثبيط
Bif.	6.6	لا يوجد تثبيط	لا يوجد تثبيط
Lb.acido.+Bif.	10.9	6.5	لا يوجد تثبيط
Lb.acido.+Bif.+ Lb. reut.	10.5	6.4	لا يوجد تثبيط

* النتائج هي معدلات التثبيط ضد 4 أنواع من بكتريا الاختبار

** قطر الحفرة 5 ملم محسوب مع النتائج

المناقشة

1- دراسة تأثير مدة الحضن في المقدرة التثبيطية للبكتريا العلاجية:

ان من الممكن تفسير عدم ظهور مقدرة تثبيطية في 24 ساعة بسبب بطأ نمو البكتريا و تأخر انتاجها لبعض النواتج الايضية كالبكتريوسينات و المضادات الحيوية و بما ان هذه النواتج ذات طبيعة بروتينية فهي تكون عرضة لعمل الانزيمات المحللة للبروتين و الحموضة عند زيادة مدة الحضن عن 72 ساعة (6, 7) لذا فان مدة 72 ساعة هي الامثل لانتاج راشح تثبيطي.

2- التثبيط ضد البكتريا الاختبارية:

بينت النتائج المقدرة الواضحة لرواشح البكتريا العلاجية لوسطي MRS و الحليب مع أفضلية واضحة لبكتريا *Lb.acid* بمفردها ولوسطي الحليب و MRS و ذلك بسبب فعالية النواتج الايضية ذات التأثير التثبيطي لهذه البكتريا وهي حامض اللاكتيك و بيروكسيد الهيدروجين والمضادات الحيوية Acidolin, Acidophilin و التي من الممكن انتاجها من العديد من الاوساط السائلة (9,8) وبالتالي ممكن استعمال رواشح مزارع هذه البكتريا و الحاوية على نواتجها الأيضية ذات التأثير التثبيطي و بحالتها السائلة و المجفدة في العديد من التطبيقات الطبية البشرية و البيطرية كبديل عن المضادات الحيوية التقليدية و كذلك لحفظ الأغذية و يفضل استعمال راشح مزرعة الحليب حيث يمتاز بعدة جوانب و هي :-

أ. الجانب الاقتصادي كون المواد الاولية اللازمة للانتاج و هي الحليب الخام و العزلات البكتيرية العلاجية و التي يمكن عزلها محلياً أو استعمال عزلات مستوردة و هي غير مكلفة .

ب. الجانب الصحي حيث ان الوسط المستخدم هنا هو الحليب و هي مادة طبيعية و كذلك العزلات البكتيرية و هي عزلات مصدرها بشري و متعايشة في الأمعاء .

ج. الجانب التصنيعي : ففي حالة استخدام هذه الرواشح في حفظ منتجات الأغذية كالالبان مثلاً حيث لا تحدث تغير في اللون و تكون ذات تأثير أيجابي لبعض المنتجات الأخرى (10) .

References

1. Boestroo, M. H.; Wit, J. C.; Kusters, B.J. and Robouts, F.M. (1993). Inhibition of growth of yeasts in Fermented Salad. J. Food Microbiology , 17:311-320
2. الجبوري , حسين لفتة هوير. (1996) . تأثير بكتريا حامض اللاكتيك وملح الطعام على نمو بعض البكتريا المعزولة من الجبن المحلي. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة بغداد .
3. Roy , D.; Berger, J. and Reuter , G . (1994). Characterizations of dairy related Bifidobacterium ssp. Based on their B. galactosidase electrophoretic Patterns . J. food Microbiology , 23:55-70.
4. الشيخ ظاهر , عامر عبد الرحمن . (1999) . دراسة مقارنة للصفات الكيميوحيوية لعزلة محلية وسلالة مستوردة من بكتريا Lactobacillus acidophilus واستخدامها في تصنيع منتجات علاجية. أطروحة–دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد.
5. نظام الدين , بهاء نظام عيسى . (2002) . تشخيص وانتقاء بكتريا الـ Bifidobacterium العلاجية لأستخدامها لإنتاج مثلج قشطي. أطروحة دكتوراه–كلية الزراعة – جامعة بغداد.
6. Ibrahim , S. snd Bezkorovainy , A. (1993) . Inhibition of Escherichia coli by Bifidobacteria . J . food prot. 56:713-715 .
7. Rammelsberg , M.; Muller , E. and Radler , F . (1990) . Caseicin 80: purification and characterization of new Bacteriocin From Lactobacillus casei Arch. Microbiol . 154:249-252 .
8. Gupte, P K.; Mital, B. K. and Garg , S.K.(1996). characterization of Lactobacillus acidophilus strain for use as dietary agjunct. Int. J. of food Microbiology. 29:7-9
9. القصاب، عبد الجبار عمر قوجة. (1988). التأثير المضاد لبكتريا حامض اللبنيك العصوية على بعض البكتريا المرضية. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد .
10. حميد، علي حسين علي. (2004). أستعمال النواتج الأيضية لبكتيريا حامض اللاكتيك العلاجية لحفظ منتجي الجبن والقشطة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة–جامعة بغداد.