مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 17 العدد 1 سنة 2012
ماجد كاظم عبود / عباس جواد كاظم / ثائر عبد دعيشيش ISSN-1997-2490

دراسة الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنتج من العصيات اللبنية *Lactobacillus* spp. ضد بعض العزلات التابعة لبكتريا السالمونيلا *Salmonella* spp.

ماجد كاظم عبود عباس جواد كاظم ثائر عبد دعيشيش

جامعة القادسية / كلية التربية / قسم علوم الحياة

الخلاصة :-

اختبرت قدرة ست عزلات عائدة لبكتريا *Lactobacillus* spp. (أربع عزلات تابعة لبكتريا *L. plantarum* وعزلتان تابعة لبكتريا *L. acidophilus*) على إنتاج البكتريوسينات وإعطاء أفضل فاعلية تثبيطية ضد ثمان عزلات عائدة لبكتريا *Salmonella* spp. (خمس عزلات تابعة لبكتريا *S. typhimurium* وثلاث عزلات تابعة لبكتريا *S. enteritidis*) ، بعد تنقية راشح المزارع ، إذ استخدمت طريقة الانتشار في الحفر (Well Diffusion Assay) وكانت الفعالية التثبيطية لعزلات بكتريا *Lactobacillus* spp. ضد بكتريا السالمونيلا متباينة فقد أظهرت النتائج ان تأثير العصيات اللبنية كان كبيراً على بعض عزلات السالمونيلا كل من بكتريا *S. enteritidis* رقم (2) وعزلتين من بكتريا *S. typhimurium* رقم (4 و 6) إذ تراوحت أقطار التثبيط بين اقل من 10 إلى 19 ملم ، بينما كان التأثير متقارب على عزلتين من بكتريا *S. enteritidis* رقم (1 و 2) وعزلتين من بكتريا *S. typhimurium* رقم (5 و6) إذ تراوحت أقطار التثبيط بين (2 – 12) ملم ، في حين لم تُظهر العزلة *S. typhimurium* رقم (8) أي حساسية تذكر تجاه البكتريوسين المنتج من العزلات التابعة لبكتريا *Lactobacillus* spp. . كما بينت النتائج ان العزلة *L. plantarum* رقم (5) كانت هي الأكفأ بين عزلات بكتريا *Lactobacillus* spp. في تثبيط نمو بكتريا السالمونيلا بأقطار تثبيط تراوحت بين (4 – 18) ملم ، في حين كانت العزلة *L. plantarum* رقم (4) هي الأقل تأثير إذ اقتصر فعلها التثبيطي على عزلتين فقط من بكتريا السالمونيلا هما *S. typhimurium* رقم (4 و 7) بقطري تثبيط (3 و 2) ملم وعلى التوالي .

المقدمة :-

استقطبت بكتريا العصيات اللبنية *Lactobacillus* spp. اهتمام العديد من الباحثين لما لها من فوائد عديدة من الناحية الصناعية و الطبية ، وقد أثبتت العديد من الدراسات بما لا يقبل الشك ان هذه البكتريا تساعد في الحفاظ على التوازن الطبيعي والصحي لأجسام الكائنات الحية [22]، ذلك لامتلاكها القدرة على الالتصاق بمواقع معينة في الأمعاء والتنافس مع البكتريا المرضية و إنتاج مواد ذات تأثير قاتل لها ، كما انها تعمل على تقوية الجهاز المناعي لمقاومة البكتريا المعوية المرضية لذا وصنفت ضمن البكتريا العلاجية Probiotics [19]، وقد أثبتت الدراسات ان للعصيات اللبنية القابلية على إنتاج مواد تثبط نمو البكتريا المرضية المسببة للإسهال على وجه الخصوص [2]، تدعى هذه المواد بالبكتريوسينات (Bacteriocins) هي ببتيدات موجبة الشحنة تحتوي على أقل من 60 حامض أميني وهي مخلقة من الرايبوسومات وتنتج من البكتريا ولها فعالية مضادة للأحياء المجهرية إذ تعمل على تثبيط إنتاج الطاقة وتثبيط تخليق البروتينات والأحماض النووية كما تعمل على زيادة نفاذية الغشاء السايتوبلازمي [10]. فقد أشار [21] ان للبكتريوسينات فعلاً تثبيطيا ضد البكتريا المرضية. كما وتعتبر مواد آمنه صحياً حيث تتحلل بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتينات والموجودة في إفرازات المعدة لذا فهي لا تعتبر مواداً ضارة للإنسان والحيوانات. مؤخراً تم تجهيزه نوع من البكتريوسينات lacticin3147 على شكل بودرة وأضيف بنجاح في غذاء الأطفال لوقايتهم من الإصابة ببعض المسببات المرضية [16].لذا كان الهدف من البحث دراسة الفعل المثبط للبكتريوسين المنتج من العصيات اللبنية على بعض عزلات بكتريا السالمونيلا .

المواد وطرق العمل :-

1- الأوساط الزرعية

A- الوسط الغذائي MRS السائل (De Man Rogosa Sharp broth)

حضر حسب ما جاء في [20] وأستخدم في تنشيط وتنمية بكتريا العصيات اللبنية.

B- الوسط الغذائي MRS المتصلب (De Man Rogosa Sharp agar):
حضر الوسط بإضافة 1.5% من الآكار إلى وسط MRS السائل للحصول على الوسط الغذائي المتصلب الذي أستخدم لعمليات النشر وتنقية المستعمرات النامية.
C- الوسط الغذائي MRS المتصلب والمحور الحاوي على 0.02% ازايد الصوديوم Sodium azide
حضر هذا الوسط بإضافة 0.02% أزيد الصوديوم إلى الوسط الغذائي MRS المتصلب وذلك لمنع نمو البكتيريا السالبة لصبغة كرام.

D- الوسط الغذائي Rogosa agar المحور
أستخدم هذا الوسط في عملية العزل وتشخيص بكتريا Lactobacillus حضر حسب ما جاء في [20].
E- وسط مرق التيتراثايونيت Tetrathionate broth (Oxoid)
استخدم وسطا منشطاً وانتقائياً لبكتريا السالمونيلا حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة.

F- وسط السالمونيلا ـ شيكلا اكار Salmonella- Shigella agar (Biolife)
استخدم كوسط تفريقي لبكتريا السالمونيلا حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة.

2- عزل بكتريا العصيات اللبنية .*Lactobacillus* spp
تم جمع 20 عينة من اللبن الرائب الريفي، لقحت العينات في أنابيب اختبار حاوية على الوسط الغذائي MRS السائل الذي يعد وسطاً انتخابياً لبكتريا العصيات اللبنية وحضنت في درجة حرارة 37 مْ ولمدة 48 ساعة، ثم زرعت على وسط MRS الصلب والمحور بإضافة Sodium azide وحضنت في درجة حرارة 37 مْ ولمدة 48 ساعة لا هوائية باستخدام الحاوية اللاهوائية (Anaerobic jar) ، وأكياس توليد الغاز (Gas pak). المستعمرات النامية نقلت الى وسط Rogosa Agar حضنت في درجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة وفي ظروف لا هوائية .حيث ظهرت المستعمرات النامية محاطة بهالة شفافة ذات لون أكريمي ومحورية ومغزلية، ثم شخصت العزلات حسب ما جاء في [7].

3- عزل بكتريا السالمونيلا
تم جمع 100 نموذجاً من براز الأطفال المصابين بالإسهال من المراجعين والراقدين في مستشفى النسائية والأطفال في الديوانية زرعت النماذج في انابيب اختبار حاوية على وسط مرق التيتراثايونيت وهو وسط منشط وتفريقي لعزل بكتريا السالمونيلا حضنت الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، ثم نقلت حملة Loop من النمو في مرق التيتراثايونيت وخطط على وسط السالمونيلا – الشيكلا وحضنت في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة حيث ظهرت المستعمرات صفراء باهتة شفافة ذات سواد في المركز و قد شخصت بالإستعانة بالاختبارات الكيموحيوية حسب ما ورد في [4].

4- تقدير الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية
تم تقدير الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المنماة على وسط MRS السائل بعد ان حضرت رواشح المزارع السائلة لبكتريا العصيات اللبنية وفق ما جاء في [15] ثم أجري الطرد المركزي بإتباع طريقة [17] للحصول على المستخلص الخالي من الخلايا Cell Free Extract. استخدمت طريقة الانتشار بالحفر التي وصفها [6] إذ تم عمل ست حفر في كل طبق حاوي على وسط مولر هنتون الصلب بواسطة حفار الفلين Cork Borer بقطر 6 ملم ، ملئت كل حفرة بـ(100) مايكرولتر من راشح العصيات اللبنية ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة تم بعدها قياس أقطار مناطق التثبيط بعد طرح قطر الحفرة المستعملة.
ولتلافي مشكلة التثبيط المحتمل لبكتريا السالمونيلا بتأثير الحامض تم معادلة الرقم الهيدروجيني للراشح ، اما مشكلة التثبيط بانتاج بيروكسيد الهايدروجين أمكن حلها بالتنمية اللاهوائية و للتاكد من ذلك اضيف انزيم الكاتليز الى راشح المزرعة والذي يعمل على تحليل هذا الغاز[18].

النتائج والمناقشة :-

تم تشخيص (6) عزلات من العصيات اللبنية بالاعتماد على الفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية والمصلية الواردة في [7] وكانت عزلتان *Lactobacillus acidophilus* وأربع عزلات*Lactobacillus plantarum* . كما بينت نتائج الزرع المختبري لعينات الاسهال الى تشخيص (8) عزلات من بكتريا السالمونيلا وبعد اجراء الاختبارات المصلية تبين انها (5) عزلات *Salmonella. typhimurium* وثلاثة عزلات *S. enteritidis* وكما هو مبين (جدول 1).

جدول (1): البكتريا المعزولة خلال الدراسة

رقم العزلة	*Salmonella*	*Lactobacillus*
1	*S. enteritidis*	*L. acidophilus*
2	*S. enteritidis*	*L. acidophilus*
3	*S. enteritidis*	*L. plantarum*
4	*S. typhimurium*	*L. plantarum*
5	*S. typhimurium*	*L. plantarum*
6	*S. typhimurium*	*L. plantarum*
7	*S. typhimurium*	
8	*S. typhimurium*	

يبين الجدول (2) التأثير التثبيطي للعصيات اللبنية على بكتريا السالمونيلا حيث يتضح من الجدول ان هناك تباين واضح في تاثير العصيات على بكتريا السالمونيلا . فقد كان تأثير العصيات اللبنية كبيراً على بعض عزلات السالمونيلا كل من بكتريا *S. enteritidis* رقم (2) وعزلتين من بكتريا *S. typhimurium* رقم (4 و 6) إذ تراوحت أقطار التثبيط بين اقل من 10 ملم الى 19 ملم ، جاءت النتائج مقاربة مع ما ذكره [6] من ان رواشح بكتريا العصيات اللبنية المنماة في وسط MRS السائل تكون ذات فعالية تثبيطية واسعة ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام وبمناطق تثبيط تراوحت بين(19-13) ملم . وقد يعزى سبب التثبيط الحاصل الى النواتج الايضية للعصيات اللبنية مثل البكتريوسينات حيث تتخصص كل نوع من العصيات بإنتاجه لنوع محدد من البكتريوسينات التي تمتلك فعالية تثبيطية واسعة ضد عدد من البكتريا المرضية وهذا يتماشى مع ما ذكره [11] من كون بكتريا العصيات اللبنية تمتلك القدرة على انتاج مواد بروتينية متخصصة تدعى البكتريوسينات لها فعل تثبيطي تجاه البكتريا المعوية المرضية مثل السالمونيلا و الشيكلا . كما يلاحظ وجود تجانس متقارب في التأثير على عزلتين من بكتريا *S. enteritidis* رقم (1 و 2) وعزلتين من بكتريا *S. typhimurium* رقم (5 و6) إذ تراوحت أقطار التثبيط بين (2 – 12) ملم وهذا يتفق مع ما ذكره [13] في ان بكتريا العصيات اللبنية يكون لها تاثير ضعيف ضد بعض عزلات *Salmonella typhi* و .*Pseudomonas* spp و *E. coli* و .*Proteus* spp .

من الجدول (2) يلاحظ ان العزلة *S. typhimurium* رقم (8) لم تعاني تأثر يذكر وقد يعود سبب المقاومة إلى ان البكتريوسينات تحتاج إلى مستلمات على سطوح الخلايا التي توثر فيها ، إذ تقوم بعمل ثقوب في الأغشية الخلوية مؤدية إلى خروج المكونات الصغيرة من الخلايا ثم الموت وعليه قد تحصل بعض التغيرات في سطوح الخلايا تودي إلى إفقاد البكتريوسين تأثيره على الخلايا [12] كما و ان لكل نوع من أنواع جنس .*Lactobacillus* spp مقوماته الخاصة للدفاع و التلاؤم في البيئة التي يعيش فيها ، فقد وجد ان *Lactobacillus bulgaricus* المستعملة في إنتاج بوادئ إنتاج اللبن الرائب يمكن ان تقضي على الأحياء الملوثة لهذا المنتج وليس بالضرورة ان تؤثر بالبكتريا المسببة للإسهال المعوي [1] كما ويمكن ان تتعرض البكتريوسينات للتلف بفعل الانزيمات الهاضمة للبروتينات [8] ، فقد وجد ان Lactocin B المنتج من بكتريا *L. acidophilus* أعلى الأنواع فعالية ولكنه حساس تجاه الأنزيمات المحللة للبروتينات proteinase K [8] ، كما أشار [23] إلى إن البكتريوسين Lactacin B

المنتج من بكتريا *L. acidophilus* حســـاس للانزيمين protease و proteinase K أما Lactacin F فهو حســـاس للانزيمين trypsin وأنواع أخرى من الـ protease .

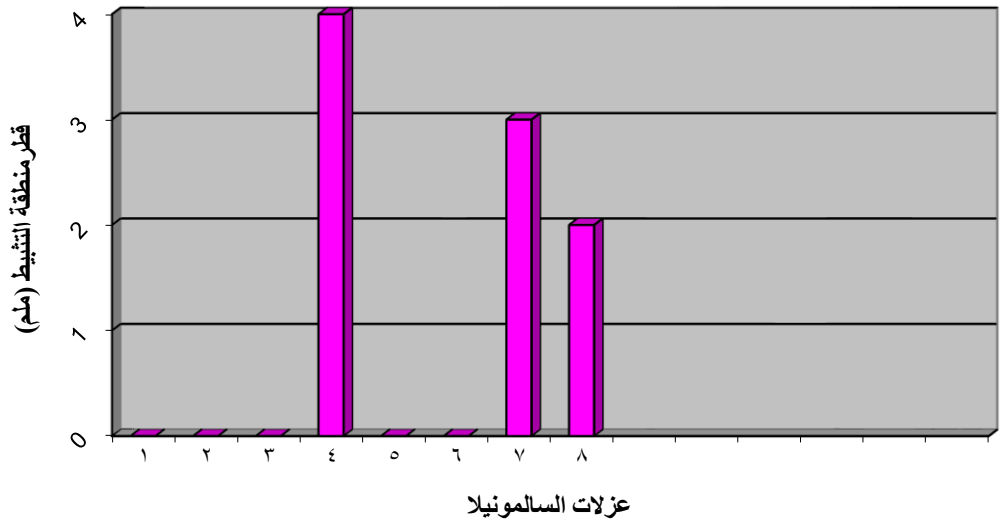
من الشـكل (5) يلاحظ ان العزلة *L. plantarum* رقم (5) كانت هي الأكفأ بين عزلات بكتريا العصـيات اللبنية في تثبيط بكتريا السالمونيلا بأقطار تراوحت بين (18-4) ملم وقد يرجع السبب في ذلك الى ان بعض هذه البكتريوسينات ذات مدى واسع في تثبيط نمو البكتيريا مثل البكتريوســين Gassericin A الذي تنتجه بكتيريا *Lactobacillus gasseri* LA39 وهو أحد أكثر البكتريوسـينات النشـطة تضـادياً التي غالباً يتم اسـتخدامها وهو قاتل للبكتيريا ولكن لا يسـبب تحللها [9] . كما ان العصـيات تمتاز بقدرتها على إنتاج بكتريوسينات متعددة مما يجعلها أكثر فاعلية في تثبيط نمو البكتريا المرضية [14 , 5].

يبين الشـــكل (2) ان العزلة *L. acidophilus* رقم (2) كانت هي الأقل تاثيراً بين العصـــيات اللبنية حيث اقتصـــر فعلها التثبيطي على عزلتين فقط من بكتريا السـالمونيلا هما *S. typhimurium* رقم (4 و 7) بقطري تثبيط (3 و 2) ملم وعلى التوالي، وقد يعود السبب في ذلك الى ان بعض انواع البكتريوسين تكون ذات طيف تثبيطي ضيق للبكتريا [3] .

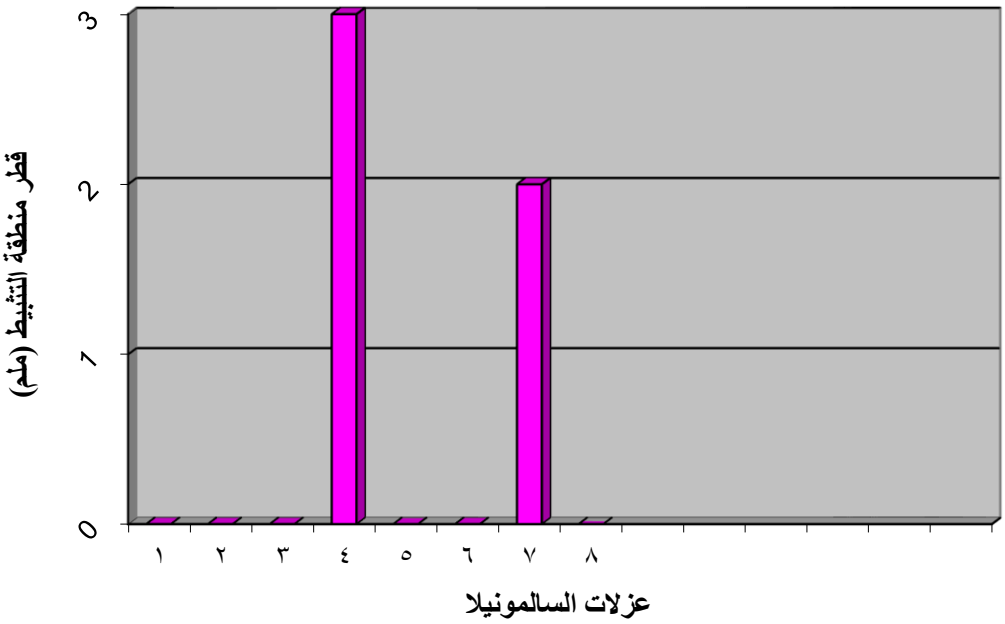
جدول (2): تأثير العصيات اللبنية في نمو بكتريا السالمونيلا المعزولة من حالات الاسهال

عزلات السالمونيلا / العصيات اللبنية	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	-	-	±	-	-	±	±
2	-	-	-	±	-	-	±	-
3	-	+	++	+	-	±	-	-
4	±	±	-	±	±	+	-	-
5	+	++	+	++	±	+++	±	-
6	±	+++	-	+++	+	+++	-	-

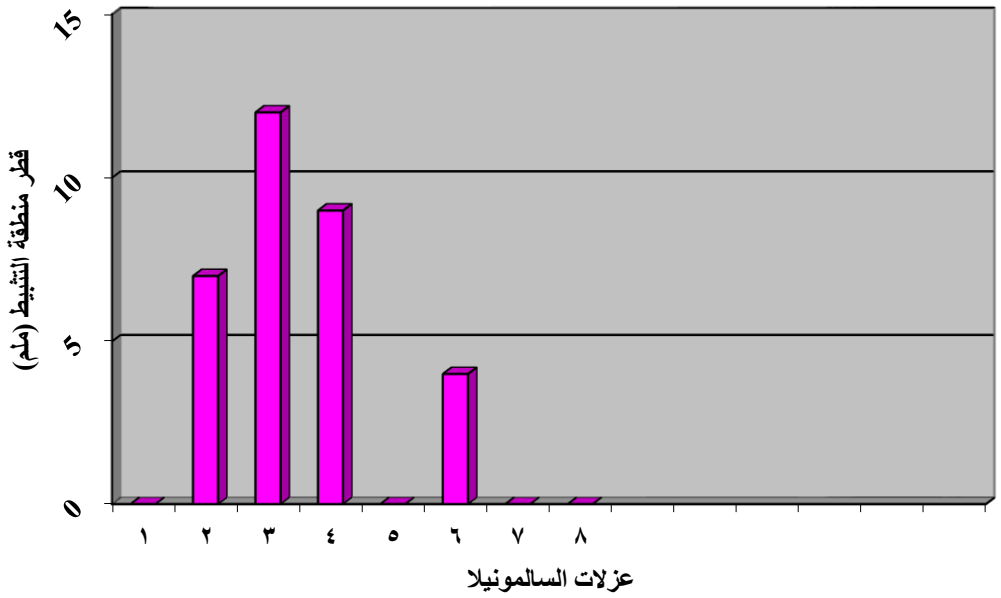
(-) لم يحصل تثبيط
(±) وجود تاثير تثبيطي ضعيف اقل أو يساوي 5 ملم
(+) وجود تاثير تثبيطي أكثر من 5 ملم
(++) وجود تاثير تثبيطي متوسط أكثر من 10 ملم
(+++) تثبيط كبير أكثر من 15 ملم



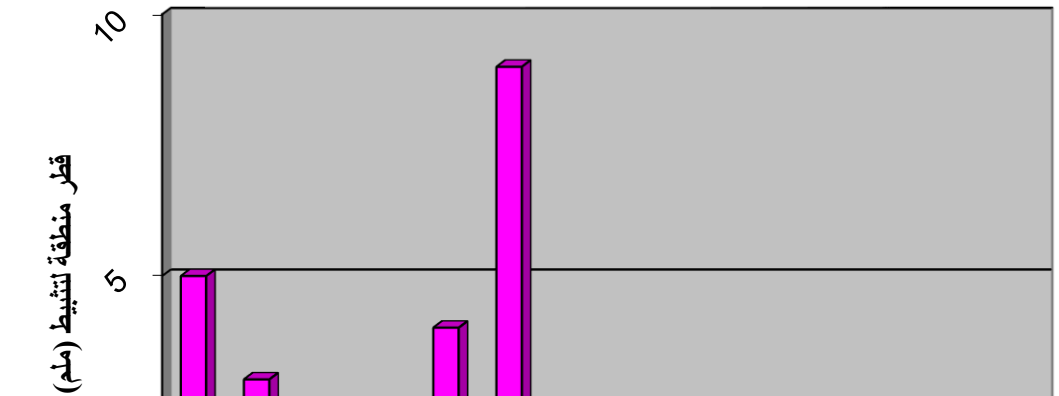
شكل (1): التأثير التثبيطي للعصيات اللبنية عزلة رقم 1



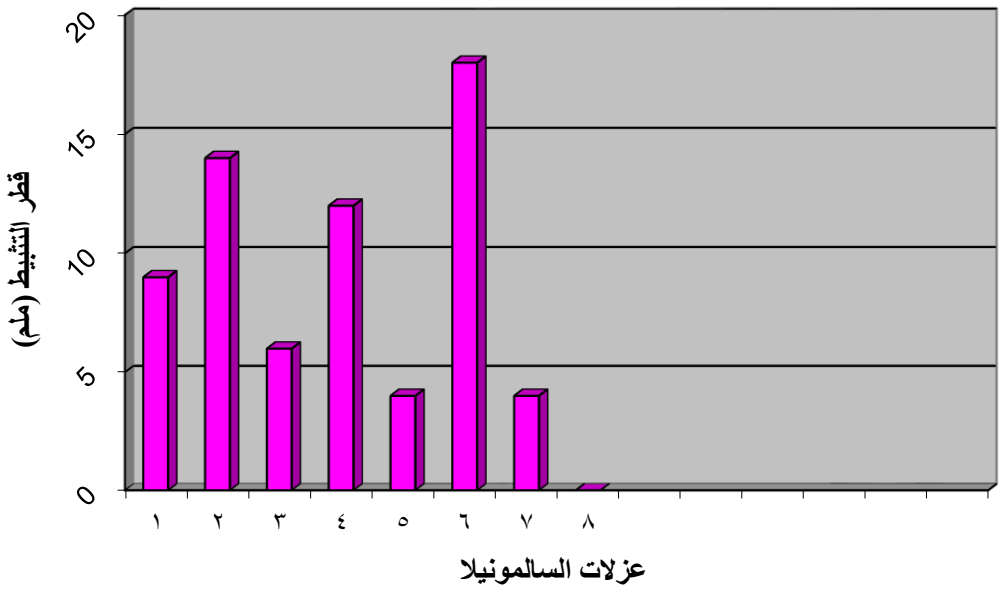
شكل (2): التأثير التثبيطي للعصيات اللبنية عزلة رقم 2



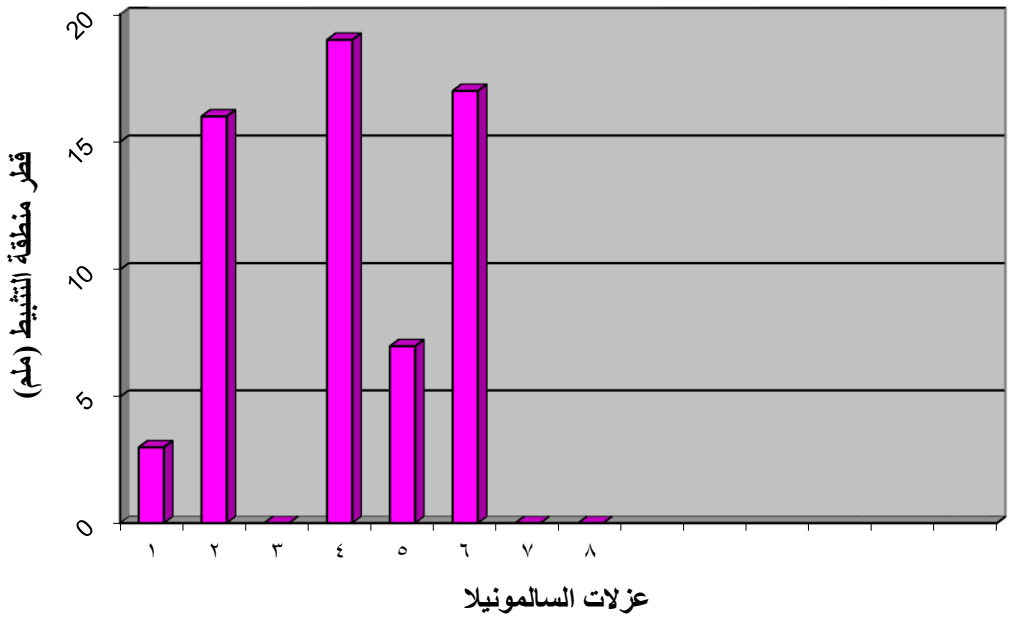
شكل (3): التأثير التثبيطي للعصيات اللبنية عزلة رقم 3



شكل (4): التأثير التثبيطي للعصيات اللبنية عزلة رقم 4



شكل (5): التأثير التثبيطي للعصيات اللبنية عزلة رقم 5



شكل (6): التأثير التثبيطي للعصيات اللبنية عزلة رقم 6

المصادر:-

1- القصاب، عبد الجبار عمر و الخفاجي، زهرة محمود. (1992). تأثير الأوساط الغذائية والنمو المشترك على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية على بكتريا الإسهال. مجلة العلوم الزراعية العراقية، المجلد (23) العدد (1): 34-40.

2- القصاب، عبد الجبار عمر قوجة. (1988). التأثير المضاد لبكتريا حامض اللاكتيك العصوية على بعض البكتريا المرضية. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

3- Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R.(1984). Purification and characterization of the *lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactocin B. Antimicrob. Agents Chemother., 26: 328-334.

4- Cruickshank, R.; Dugiud, J. P.; Marmion, B. P. and Swain, R. H. (1975). Medical Microbiology The practice of Microbiology 12th ed. Churchill living Stone. Edinburgh.

5- Eijsink. V. G.; Skeie, M.; Middelhoven, P. H.; Brurberg, M. B. and nes, I. F. (1998). Appl. and Environ. Microbiol., 64: 3275-3281.

6- Gupta, U.; Rudramma, S.; Rati, E. R. and Joseph, R. (1998). Nutritional quality of fermented lactic bitter gourd and fenugreek leaves .Int. J. Food. Sci.Nutr.49(2): 101-108.

7- Harrigan, W. F. and MacCance, M. E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press. London

8- Harris, L. D.; Daeschel, M. A.; Stiles E. and Klaenhmmer, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogens*. J. Food Prot. 52: 384-392.

9- Itoh, T.; Fujimoto, Y.; Kawai, Y.; Toba, T.; Saito, T. (1995). Lett Appl Microbiol., 3, 137-141.

10- Jack, R. W.; Tagg, B.; and Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol., Rev. 59, 171-200.

11- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria, Biochem.70: 337- 349.

12- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetic of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 63-86.

13- Kneifel, W.; Kovac, A. and Karsai, A. (1996). Inhibitory potential of probiotic cultures used for food fermentation. Antonie Van Leeuwenhock. 70: 510-515.

14- Konings, W. N.; Kok, J.; Kuipers, O. P. and poolman, B. (2000). Curr. Opin. Microbiol., 3, 276-282 .

15- Lewus, C. B.; Kaiser, A. and Montville, T. J. (1991). Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocin from LAB isolated from meat . Appl. Enviro. Microbiol.,57: 1683-1688.
16- Morgan ,S. M.; Gavin, M.; Kelly, J.; Ross, R. P. and Hill, C. (1999). J. Food Protec., 62: 011-1016 .
17- Piard, J. C.; Delmore, F.; Girrafe, G.; Commissaire, J. and Desmazeaud, M. (1990). Evidence for bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. J. Neth. Milk Dairy. 44: 143-158.
18- Rasch, M. and Knochel, S. (1998). Variations in tolerance of *Listeria moncytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and baravicin A. Lett. Appl. Microbiol, 27: 275-278.
19- Shu, O.; Qu, F.; Lin, H.; Ruther furd, K.; Zhou, J. and Gill, H. (2000). *Bifidobacterium lactis* HNO19 enhances host immunity and resistance to gastrointestinal pathogens. Personal communication.
20- Speck, M. L. (1984). Compendium of methods for the microbiology examination of blood. American public Health association.
21- Speck, M. L.; Dobrogosz, W. J. and Casas, I. A. (1993). Food Technol., 47: 9094.
22- Venema, G.; Huis, J. H. and Hugeholtz, J. (Eds). (1990). Lactic acid bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Kluwer Academic press: Dordrecht, Boston, London.
23- Walter, P.; Hammes, Weiss, N. and Holzaptel, W. (2004). The prokaryotes Lactobacillus and carnobacterium, springer-vertag. New York, Thesis. http://et:springer.ny,llc.

Study discouragement effectiveness for producer Bacteriocin from *Lactobacillus* spp. Against some isolates which belongs to *Salmonella* spp

Majid Kadhim Aboud Abbas gwad Kadhim Tha'ir Abid D'asheesh
Al-Qadisiya University / College of Education / Department of Biology

Abstract:-

The ability of six isolates which belongs to *Lactobacillus* spp. Involved four isolates to *L. plantarum* and two isolates to *L. acidophilus* Were tested to produce bacteriocin and to give a better discouragement effectiveness against eight isolates which belongs to *Salmonella* spp. Involved five isolates to *S. typhimurium* and three isolates to *S. enteritidis*, after filtering the cultures, where the well diffusion assay method was used , So the discouragement effectiveness for *Lactobacillus* spp. against *Salmonella* spp. were contracted so the results showed that effects of *Lactobacillus* spp. was very big on some *Salmonella* isolates involved *S. enteritidis* (2) and two isolates to *S. typhimurium* (4 and 6) where discouragement diameter ranged between under of 10 – 19 mm, while the influence was convergent on bacterial isolates on two isolates from *S. enteritidis* (1 and 2) and two isolates from *S. typhimurium* (5 and 6), where discouragement diameter ranged between (2 – 12) mm. But the isolate *S. typhimurium* (8) was not showed any mentioned sensitivity towards bacteriocin that was produced from the appendant isolates for *Lactobacillus* spp.The results showed that the isolate *L. plantarum* (5) was more efficiency On inhibited *Salmonella* spp. Growth where discouragement diameter ranged between (2 – 12) mlm, while *L. plantarum* (2) was less efficiency, where confine discouragement on two isolates *S. typhimurium* (4 and 7) where discouragement diameter (3 and 2) mm respectively.