التأثير ألتضادي لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* على بعض أنواع البكتريا المرضية وعفن *Aspergillus parasiticus* في إنتاج السموم والنمو

حامد صالح محمد　　صلاح عمر احمد　　عالية شفيق كامل

قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة والغابات

جامعة الموصل

الاستلام	القبول
2012 / 05 / 22	2012 / 06 / 28

ABSTRACT

Lactobacillus acidophilus isolated from newly born infant's stool, purified and identified by studding the morphological and biochemical tests then compared with Bergey's manual for the Holt et al (1994). Also studied the impact of the inhibitory to the extracted filtrate of the bacteria *Lactobacillus acidophilus* on some types of pathogenic bacteria, as found the inhibition area (inhibition zone) to the *Staphylococcus aureus* 14 mm and were the species most resistant is *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* amounting to 12 mm. Also studied the effect of bacteria *Lactobacillus acidophilus* on the growth of fungus *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxins B1, B2 and G1, G2 in the media component MRS and extract corn as the results show for high acidity and low pH due to the growth of *Lactobacillus acidophilus* which produced antibacterial activity (bacteriocine) and led to a reduction in mold growth and toxin production to 6 days of incubation and then increased in the mold growth and acidity decreased with increase in pH and the amount production of aflatoxin poison B1, G1.

الخلاصة

تم عزل بكتريا *Lactobacillus acidophilus* من براز الأطفال حديثي الولادة وتنقيتها وتشخيصها من خلال الفحوصات المظهرية والكيمياحيوية والمعتمدة من قبل Bergy's manual. كما درس تأثير المادة المثبطة لراشح بكتريا *Lb. acidophilus* على بعض أنواع

البكتريا المرضية إذ وجد قطر المنطقة الخالية من النمو (المثبطة) لبكتريا *Staphyllococcus aureus* 14ملم وكانت أكثر الأنواع مقاومةً للبكتريوسين هي *Escherichia coli* و *Salmonella typhi* إذ بلغ قطر المنطقة الخالية من النمو 12 ملم. درس تأثير بكتريا *Lb. acidophilus* على نمو الفطر *Aspergillus parasiticus* وإنتاج الأفلاتوكسين B_1،B_2،G_1،G_2 في وسط مكون من بيئة MRS ومستخلص الذرة، إذ بينت النتائج حصول ارتفاع في الحموضة وانخفاض في الأس الهيدروجيني (pH) بسبب نمو بكتريا *Lb. acidophilus* والتي أنتجت البكتريوسين (المادة المثبطة) وأدت إلى خفض نمو العفن وإنتاج سموم الأفلا ولغاية 6 أيام من التحضين وبعد ذلك أزداد أعداد العفن وإنخفضت الحموضة مع ارتفاع في الأس الهيدروجيني مع الزيادة في كمية إنتاج الأفلاتوكسين خاصةً السم B_1،G_1.

المقدمة

ازدادت مساحة المنتجات الحاوية على الأحياء العلاجية بشكل كبير في بعض دول العالم ووصلت في عام 2001م إلى حدود 10٪ من المنتجات الغذائية الأوربية وأزداد الطلب عليها ويتضح ذلك من زيادة عدد أنواع المنتجات الصحية لذلك أصبح مفهوم الأغذية الوظيفية Functional food والأغذية الصحية مثل Pharma food وTherapeutic وNutraceticals متداولاً (الخفاجي، 2008)، وإن الحليب والمنتجات المتخمرة منه تمثل النظام الغذائي الملائم لتناول الأغذية الصحية، ففي اليابان يسوق المنتج Yakult لمعالجة حالات عدم التحمل من اللاكتوز وفي أوروبا ينتج (LCI) حاوي على بكتريا *Lb.johnsonii* كمنشطة للجهاز المناعي وفي دول الخليج العربي أدخلت *Bifidobacteria* و*Lb.acidophilus* في صناعة منتجات لبنية من حليب الجمال (Abo-Tarboush وآخرون،1998). إن بكتريا حامض اللاكتيك خاصةً *Lb. acidophilus* لها القابلية في الاستيطان واستمرارية تحليلها لسكر اللاكتوز وكذلك لمعالجة حالات الإسهال خاصةً في الأطفال وتقليل مخاطر السرطان خاصةً في القولون وإنتاج البكتريوسينات المثبطة لنمو الأنواع المختلفة من البكتريا المرضية (Robinson،2002)، وخفض الكولسترول في الغذاء نفسه ولهذا تسمى بالبكتريا الصديقة (Goupta،1996).

إن سموم الأفلاتوكسين Aflatoxin هي مواد أيض ثانوية تنتج من مجموعة من الفطريات منها *Asp. flavus* و *Asp. parasiticus* وغيرها من الأعفان التي تنمو في الأغذية والأعلاف مؤدية إلى خسائر اقتصادية في الصناعات المعتمدة على المحاصيل أو منتجات الألبان إذ تسبب مشاكل صحية مثل السرطانات للإنسان والحيوان وتولد تشوهات أو مسخ Teratogenis وأهم هذه السموم B_1 وB_2 وهي تتعرض لمواد الأيض وتتحول إلى سموم M_1 وM_2 وتفرز في أنسجة وسوائل الجسم الحيوية للحيوانات الحلوبة وحليب الأم وإن إزالة السم

بواسطة البكتريا من الغذاء أو العلف قبل الاستهلاك هي أفضل وإن كانت تضيف خطوة جديدة لعمليات التصنيع، وقد وجد أن بكتريا حامض اللاكتيك وخاصةً العصوية الشكل لها القابلية على تقليل السم في الأغذية ومن هذه العصيات *Lb. acidophilus*، وإن آلية إزالة أو تخفيض السم وذلك بربطه على سطوحها الخارجية بشكل قابل للرجوع ولكن بدرجات مختلفة تعتمد على السلالة والظروف المتبعة وإن Peptidoglycan هو المسؤول عن الارتباط أو إزالته بواسطة عمليات أيضية (الخفاجي،2008).

هدفت الدراسة إلى عزل بكتريا *Lb. acidophilus* من براز الأطفال وتنقيتها وتشخيصها وتنميتها على الوسط السائل MRS ودراسة تأثيرها التثبيطي على بعض أنواع البكتريا المرضية وكذلك تأثيرها على نمو وإنتاج سموم الأفلا B_1،B_2،G_1،G_2 المنتجة من قبل العفن *Asp. parasiticus* MRRL2999 في الوسط الغذائي السائل.

مواد وطرائق العمل

عزلت بكتريا *Lb. acidophilus* من براز الأطفال حديثي الولادة وبعمر شهر والمعتمدين في تغذيتهم على حليب الأم فقط وباستخدام الوسط الغذائي السائل MRS المعقم، والتحضين على 37 °م لتنمية البكتريا حسب طريقة حسن (2007). كما أجريت الفحوصات المظهرية والكيمياحيوية حسب طريقة Harrigan وMcCance (1976) وبالاعتماد على Bergey's Holt Manuual وآخرون(1994). نميت بكتريا *Lb. acidophilus* في الوسط MRS حسب طريقة (Anjani وآخرون،1990) إذ حضر الوسط في دوارق زجاجية، واحتوى كل منها على 90 مل من الوسط MRS وضبط الأس الهيدروجيني (5,8) وعقم بالموصدة على 121 °م/15 دقيقة وزرع بالبكتريا 10مل ثم تم إنتاج البكتريوسين من العزلة المحلية بتنميتها على الوسط MRS السائل وفصلت الخلايا بالطرد المركزي 6000 دورة بالدقيقة ولمدة نصف ساعة وقدر البكتريوسين (المادة المثبطة في الراشح) حسب طريقة Karaoghlu وآخرون (2003) وبطريقة الأقراص المغمورة وباستخدام الوسط الملائم لكل نوع من البكتريا *Staph. aurius* و *Bacillus subtilis* و *Sal. typhi* و *E.coli* وبقياس المنطقة الخالية من النمو للأنواع البكتيرية السابقة وحسب طريقة Ryan وآخرون(1988).

نمي العفن *Asp. parasiticus* MRRL2999 في الوسط Potato dextrose agar لمدة اسبوع واحد بدرجة حرارة 28 °م وحضر المعلق السبوري كما ذكر Farag وآخرون (1987) بحيث احتوى المليلتر الواحد على 10^6 سبور. لقحت الدوارق الحاوية على الوسط MRS زائداً مستخلص الذرة الصفراء وبنسبة 1:1 وبإضافة 10 مل لقاح من بكتريا *Lb. acidophilus* إلى 50 مل من الوسط MRS ومستخلص الذرة الصفراء وأضيف 1 مل من المعلق السبوري للفطر *Asp. parasiticus* إلى الوسط السابق، وخلت المعاملة القياسية من اللقاح البكتيري، وحضنت الدوارق على درجة 28 °م ولمدة 15 يوماً حيث أخذ 10مل عينة كل 3 يوم لدراسة الأس

الهيدروجيني والعدد الكلي للبكتريا والعفن وسموم الأفلا B_1،B_2،G_1،G_2 في حين لوحظ النمو الظاهر لهايفات العفن في الدورق.

اعتمدت طريقة الأطباق القياسية في إجراء العدد الكلي للبكتريا والأعفان كما ذكر Anjani وآخرون(1990)، والتحضين للبكتريا على 37ْم لمدة 48 ساعة والتنمية على الوسط المناسب لكل نوع من البكتريا والعفن على 28ْم لمدة 6 أيام والتنمية على وسط PDA واتبعت طريقة Yousef وآخرون (1980) في استخلاص الأفلاتوكسين وطريقة Scott وآخرون (1970) في تقدير سموم الأفلا B_1،B_2،G_1،G_2 كما استخدم جهاز pH من نوع فليبس هولندي الصنع لقياس الأس الهيدروجيني وتقدير الحموضة حسب طريقة Ling (1963).

النتائج والمناقشة

لتشخيص بكتريا *Lb. acidophilus* أكدت الفحوصات للعزلة المحلية من براز الأطفال مطابقتها مع موسوعةBergy's manual لـ Holt وآخرون (1994) إذ وجد من الجدول(1) أن صفات العزلة هي موجبة لصبغة كرام وغير متحركة وغير مكونة للسبورات وذات شكل عصوي طويلة نهاياتها مستديرة ونظام التجمع لها بشكل منفرد أو سلاسل قصيرة وليس لها القابلية على النمو في حرارة 5ْم وفي 45ْم نمت جيداً وغير محللة للكازين والجيلاتين والنشا وغير منتجة لإنزيم الكاتاليز وسالبة لإنتاج الأمونيا من الحامض الأميني الأرجنين والاندول ومخمرة للسكريات الكلوكوز واللاكتوز والكالاكتوز والسكروز والفركتوز والرافينوز والمانوز والمالتوز والانيولين والسالسين والاسكيولين وعدم قدرتها لتخمير المانيتول والسوربيتول والزايلول والارابينوز وهذه تتفق مع Moli وآخرون (1993).

من الجدول (2) نلاحظ التأثير التثبيطي لراشح بكتريا *Lb. acidophilus* على بعض أنواع البكتريا المرضية *Staph. aurius* و *B. subtilis* و*E.coli* و *Sal. typhi* إذ بلغت أقطار المنطقة الخالية من النمو 14، 13، 12،12 ملم على التوالي.

من الجدول (3) نلاحظ أن نمو بكتريا *Lb. acidophilus* أدى إلى تغير في الأس الهيدروجيني pH إذ أنخفض من 6,42 إلى 3,86 في حين أن الحموضة ازدادت من 0,14 إلى 0,43 ٪ كحامض لاكتيك بعد 6 أيام من التحضين ثم حصل ارتفاع في pH وانخفاض في الحموضة بسبب استهلاك الحموضة من قبل العفن *Asp. parasiticus* إذ وصل إلى أعلى ارتفاع له بعد 15 يوم من التحضين إلى 5,2 في حين انخفضت الحموضة إلى 0,31٪ كحامض لاكتيك.

من الجدول (4) نجد في الأيام الأولى من التحضين حصل نمو واضح لبكتريا *Lb. acidophilus* وأزداد عددها من 4×10^3 و.ت.م/مل وأصبحت بعد 6 أيام من التحضين 30×10^4 و.ت.م/مل ثم بدأت بالانخفاض ليصل أعدادها 59×10^3 و.ت.م/مل بعد 15 يوم من

التحضين في حين أعداد العفن في بداية التحضين 2×10^5 و.ت.م/مل لتصل إلى 195×10^3 و.ت.م/مل بعد 15 يوم من التحضين.

من الجدول (5) نجد معدل سموم الأفلا B_1،G_1 المنتج بواسطة العفن *Asp. parasiticus* تأثر إنتاجه بوجود بكتريا *Lb. acidophilus* إذ لم ينتج العفن سموم الأفلا خلال 3 الأيام الأولى بسبب نشاط بكتريا *Lb. acidophilus* وإنتاجها للبكتريوسينات وبعد 6 أيام من التحضين أنتج العفن *Asp. parasiticus* 88 مايكروغرام/لتر من سم الأفلا B_1 ثم بدأت بالانخفاض لتصل إلى 32 مايكروغرام/لتر في حين G_1 كان 45 مايكروغرام/لتر بعد 6 أيام وبدأ بالانخفاض ليصبح بعد 15 يوم 15 مايكروغرام/لتر في حين كان إنتاج B_2 وG_2 من قبل الفطر 10،12 مايكروغرام/لتر على التوالي، وأصبح صفر بعد 12 يوم من التحضين، من ذلك نستدل أن إزالة السم بواسطة بكتريا *Lb. acidophilus* عن طريق تكوين معقد على سطح الخلايا وخاصةً على الجدار الخلوي وبالذات Peptidoglycan الذي يعمل على ربط السموم في الوسط ألحامضي للمعدة مما يؤدي إلى تقليل الإمتصاص في الأمعاء (Gratz وآخرون، 2004).

مما سبق نستنتج بأنه يمكن إنتاج مستخلص البكتريا (المادة المضادة) واستخدامه كمادة حافظة واستعماله مع العلف للحيوان وكذلك مع الغذاء للإنسان أيضاً.

الجدول (1): الاختبارات المظهرية والكيمياحيوية لبكتريا *Lb. acidophilus*

الصفات المظهرية	درجة الحرارة للنمو	الصفات الكيمياحيوية	تخمر السكريات	
موجبة لصبغة كرام	5ْم لا تنمو	غير مسيلة للجيلاتين	كلوكوز +	اسكيولين +
الحركة: غير متحركة	15ْم لا تنمو	غير محللة للكازين	فركتوز +	سالسين +
تكوين السبورات: غير مكونة للسبورات	25ْم نمو ضعيف	غير محللة للنشا	كالاكتوز +	مالتوز +
الشكل: عصوي طويلة	30ْم نمو جيد	سالبة لفحص الكاتاليز	سكروز +	أرابينوز –
نظام التجمع: خلايا مفردة أو بشكل سلاسل قصيرة	37ْم نمو جيد جداً	لا تكون الأمونيا من الأرجنين	لاكتوز +	سوربيتول –
			مانوز +	مانيتول –
	45ْم نمو جيد	غير منتجة للإندول من التربتوفان	رافينوز +	زايلول –
				انيولين ++

الجدول(2): التأثير التثبيطي للبكتريوسين الناتج من *Lb. acidophilus* على بعض أنواع البكتريا المرضية

البكتريا	قطر المنطقة التثبيطية (ملم)
Staph. aureus	14
B. subtilis	13
E.coli	12
Sal. typhi	12

الجدول (3): تأثير الأس الهيدروجيني (pH) والحموضة والنمو الظاهري للعفن *Asp. parasiticus* عند نموه مع بكتريا *Lb. acidophilus*

مدة التحضين/ساعة	pH	الحموضة	النمو

صفر	6,42	0,14	−
3	4,4	0,33	+
6	3,86	0,43	+++
9	4,91	0,41	+++
12	5,1	0,36	+++
15	5,2	0,31	++

❖ الأرقام في الجدول تمثل معدلا لمكررين

الجدول(4): العدد الكلي لبكتريا *Lb. acidophilus* والعفن *Asp. parasiticus* (c.f.u.)

مدة التحضين/ساعة	أعداد البكتريا *Lb. acidophilus*	أعداد العفن *Asp. parasiticus*
صفر	4×10^{3}	2×10^{5}
3	11×10^{4}	4×10^{4}
6	30×10^{4}	27×10^{3}
9	136×10^{3}	144×10^{3}
12	81×10^{3}	156×10^{3}
15	59×10^{3}	195×10^{3}

❖ الأرقام في الجدول تمثل معدلا لمكررين

الجدول(5): معدل الأفلاتوكسين B_1،B_2،G_1،G_2 (مايكروغرام/لتر) المنتج بواسطة العفن *Asp. Parasiticus* عند نموه مع بكتريا *Lb. acidophilus*

فترة التحضين بالأيام	B_1	B_2	G_1	G_2
صفر	صفر	صفر	صفر	صفر
3	صفر	صفر	صفر	صفر
6	88	12	45	10
9	80	10	37	10
12	44	صفر	20	صفر
15	32	صفر	15	صفر

* المعاملة القياسية احتوت سموم الافلا B1 , B2 و G1 , G2 بمعدلات 480 , 25 , 625, 20 مايكروغرام/لتر على التوالي.

المصادر

1) الخفاجي، زهرة محمود (2008). الأحياء العلاجية "من أجل الحياة". وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، بغداد، العراق.

2) حسن, غانم محمود (2007). تصنيع منتوج لبني متخمر باستخدام عزلات مختلفة من بكتيريا حامض اللاكتيك. أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة والغابات – جامعة الموصل.

3) Abu-Tarboush, H.M.,AD, Agaland M.A,Al-Royli (1998). Growth, Viability and Protolytic activity of *Bifidobacterium* in whole camel milk.j.Dairy Sci.81:354-361.

4) Anjani,K.E. Wezenberg and L.B.Bullerman, (1990). Inhibition of mold growth aflatoxin Production by Lactobacillus Spp.J.Food Prot.53(3).

5) Farag, R.S., M.A.El-leithy, A.E.Bayony and Z.Y.Daw, (1987). Growth and aflatoxin Production by A.Parasiticus in medium containing plant hormones hericides or insecticidies J. of Food Prot.50(12):1044-1047.

6) Gratz,S., Mykkanen,H., Ouwehand, A.Juvonen, R.Salminen,S. and El-Newzami, H.(2004). Intestinal mucus alter the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 in Nitro. Appl. Environ. Microbiol.70:6306-6308.

7) Gupta, P.K, Mital, B.K. and S.K. Garg , (1996). Characterization of *Lactobacillus acidophilu*s strains for use as dietary adjunct. International Journal of Food microbiology Vol.29,No.7.

8) Harrigan, W. F. and M. E. McCance, (1976). Laboratory methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press. London, NewYork, Sanfrancisco.

9) Holt, J.C., N.R. Kreig; J.T. Statley and S.T. Willisms, (1994). Bergey's Mannual of determinative bacteriology 9th edition. Williams and Wilkins Baltimore. Maryland, U.S.A.

10) Karaoghlu, S.A.F. Aydin, S.S. Kilic and A.O. Kilic, (2003). Antimicrobial Activity and characteristic of Bacteriocins Produced by Vaginal Lactobacilli. Turk, J.Med.Sci., 339713.

11) Ling, E. R. (1963). A Text book of dairy chemistry. Vol. 2, Chapman and Hall, Ltd, London.

12) Moli, G.; B. Jeppsson and S. Ahrne (1993). Numerical taxonomy of lactobacillus spp. Associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. J. Appli. Bacteriol, 74: 314-323.

13) Robinson, R. (2002). Dairy Microbiology. 3rd edition. wiley – Interscience. New-York.

14) Ryan, JJ., MM., Hattier, R.W. Adkinson, and R.H. Gough, (1988). Effect of disc moistening method on Bacillus stearothermophilus disc assay zone diameters. Journal of Dairy Science. 17: 2384-2387.

15) Scott, P.M., J. W.Lawrence, and W.V. Welbeek, (1970). Detection for Mycotoxin by thin –Layer chromatography.application to screening of fungus extracts. Appl Microbiology.20:839-842.

16) Yousef, A.E. S.M. Eli & Gendy and E.H.Marth, (1980).Growth and Biosynthesis of aflatoxin by Aspergillus Parasiticus in Cultures Containing nisin,2-Lebensam unters.Forsh.171:341-344.(C.F.El-Gazzar, F.E.etal., 1986 J.Food prot.49:461-466).