تأثير بعض المضادات الحياتية في نمو بكتيريا حامض اللاكتيك العلاجية

غانم محمود حسن حامد صالح محمد نزار فخري محمد
كلية الزراعة والغابات – قسم علوم الأغذية – جامعة الموصل – العراق

الخلاصة

تم دراسة تأثير بعض المضادات الحياتية المختلفة في العزلات البكتيرية المحلية والمستوردة لكل من بكتريا *Bifidobacterium sp.* و*Lactobacillus acidophilus* و*L. plantarum*، و*L.bulgaricus* و*Streptococcus thermophilus* و*L. casie* باستخدام طريقة الاقراص المغمورة (Disk assay). وجد بان جميع العزلات البكتيرية حساسة للمضاد الحيوي تتراسايكلين عند التركيزين ٠.١ و٠.٢ ppm وتراوحت أقطار المنطقة الخالية من النمو من ١٢-٣٤ ملم، على التوالي . أما المضاد الحيوي البنسلين فقد ثبط جميع العزلات البكتيرية عدا بكتريا *L. acidophilus* ٠ كما وجد بان جميع العزلات البكتيرية غير حساسة للمضاد الحيوي ستربتومايسين عدا بكتريا *L. bulgaricus* و*L. plantarum* إذ بلغت أقطار المنطقة الخالية من النمو لهما ١٥ و١٣ ملم ، على التوالي ، عند التركيز ٠.٤ ppm ، في حين كانت بكتريا *L. acidophilus* بعزلتيها المحلية والمستوردة أكثر حساسية للمضاد الحيوي ارثرومايسين ٠ لم تتأثر أي من العزلات البكتيرية بالمضاد الحيوي سيفالكسين والكلورامفينيكول عند التراكيز المستخدمة ٠ أظهرت جميع العزلات البكتيرية حساسية للمضاد الحيوي الامبسلين عند التركيز ٠.٠١ و ٠.٠٢ppm عدا بكتريا *Strep. thermophilus* و*L. bulgaricus* و *L. plantarum* التي كانت حساسة لهذا المضاد عند التركيز الأقل ٠ أظهرت جميع العزلات البكتيرية حساسية تجاه المضاد الحيوي نيومايسين عدا بكتريا *L. bulgaricus* و*L. acidophilus* بعزلتيهما المحلية والمستوردة ٠ لذلك اختلفت العزلات البكتيرية من حيث مقاومتها للمضادات الحياتية وعليه يجب الأخذ بنظر الاعتبار حساسيتها لهذه المضادات عند استخدامها كبادئات لمنتوجات الألبان المصنعة من حليب يحتوي على بقايا مضادات حياتية بتراكيز مثبطة لنموها.

المقدمة

منذ اكتشاف العالم Alexander Fleming للمضاد الحيوي البنسلين فقد شهد العالم استخدام واسع للمضادات الحيوية في معالجة مختلف الأمراض ، وحدث تطور كبير للمضادات الحيوية ، ومن ثم الوثوق بالعلاج الطبي والاعتماد عليه اعتماداً كبيراً ، ولاسيما استخدام العلاج بالمضادات الحيوية ضد مختلف البكتريا المرضية. هناك بعض المعوقات ترتبط باستخدام المضادات الحيوية كعلاج هو التخلص من فعل المضادات الحيوية التي لم تميز ما بين البكتريا المرضية والبكتريا المفيدة الموجودة في القناة الهضمية. وهكذا فان العلاج بالمضادات الحيوية تؤدي إلى تغير في توازن الأحياء المجهرية بالجهاز الهضمي مسببة العديد من التأثيرات الجانبية التي تستمر حتى بعد التوقف عن أخذ العلاج والاستخدام السريع والطارئ. كما إن الاستخدام المفرط للمضادات الحيوية أدى إلى اكساب البكتريا مقاومة للمضادات البكتيرية مثل استخدام المضاد الحيوي Vancomycin الذي يقتل البكتريا الكروية البرازية (Enterococci) واستخدام المضاد الحيوي الـMethicillinالذي يقتل البكتريا العنقودية الذهبية *Staph. aureus* كذلك السيطرة على الأحياء الأخرى المرضية باستخدام المضادات الحيوية مثل مرض الإسهال المتسبب ببكتريا *Clostridium difficile* إلا أن له تأثيراً قاتلاً للأحياء الطبيعية الموجودة في الأمعاء (Sanders ، ١٩٩٩) . إن اكتساب المناعة ضد المرض هي إحدى طرق الوقاية وأفضل من المعالجة بالأدوية الطبية ، وهذه ما أوصت به منظمة الصحة العالمية (WHO) وذلك بإتباع برامج للتقليل من استخدام المضادات الحيوية من قبل الإنسان (Stanton وآخرون ، ٢٠٠١).

وعليه فان استخدام طريقة لمعالجة المرض من دون الضرر بالأحياء المجهرية الطبيعية الموجودة في الأمعاء هو الحل الأسلم ، ويتم ذلك باستخدام البكتريا العلاجية في منتوجات الألبان كمصدر إضافي للتغذية والذي يحوي على واحدة أو أكثر من الأحياء المجهرية (بكتريا و خميرة أو عفن) وعند تناولها من قبل الإنسان يكون لها تأثيراً مفيداً عن طريق تحسين نوعية الأحياء المعوية.

خلال العقد الماضي أصبح من الممكن استخدام البكتريا الصحية في الأغذية والصيدليات وبعض المنتوجات المستخدمة في التغذية ، وعليه فقد ازداد استهلاك الأغذية الوظيفية الحاوية على البكتريا الصحية في معظم أوربا فجأة وكذلك فانه قد انتشرت الأغذية الحاوية على بكتريا *L. acidophilus* وبكتريا

تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٨/١٠/٢٨ وقبوله ٢٠٠٩/٢/١٨

Bifidobacterium sp. أو كلاهما معاً في كل من أمريكا وآسيا حيث إن أكثر من ٩٠ منتوجاً محتوياً على البكتريا أعلاه تباع بشكل أقراص أو كبسولات (Dave و Shah ، ١٩٩٨).

هدف البحث إلى استخدام أنواعاً عدة من المضادات الحيوية وبتراكيز مختلفة لمعرفة مدى مقاومة عزلات بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية المحلية والمستوردة لتلك المضادات لغرض استخدام هذه البكتريا في المنتوجات اللبنية .

مواد البحث وطرائقه

تم دراسة تأثير بعض المضادات الحياتية المختلفة في العزلات البكتيرية المحلية والمستوردة لكل من بكتريا *Bifidobacterium sp.* و*L. acidophilus* و*L. plantarum* و*L.bulgaricus* و *Strep. thermophilus* و*L. casie* باستخدام طريقة الاقراص المغمورة (Disk assay)٠ استخدمت المضادات الحيوية الآتية والتي تم الحصول عليها من معمل الأدوية في سامراء وكلية الصيدلة – جامعة الموصل وبالتراكيز أدناه (مايكروغرام /مل).

المضاد الحيوي	تركيزه	المضاد الحيوي	تركيزه
Erythromycine	٠.٠٤٠ ، ٠.٠٨٠	Neomycine	٠.١٥٠ ، ٠.٣٠٠
Cephalexine	٠.٠٧٥ ، ٠.١٥٠	Chloramphenicol	٠.٨٠٠ ، ١.٦٠٠
Ampicilline	٠.٠١٠ ، ٠.٠٢٠	Streptomycine	٠.٢٠٠ ، ٠.٤٠٠
Tetracycline	٠.١٠٠ ، ٠.٢٠٠	Penicilline	٠.٠٠٦ ، ٠.٠١٢

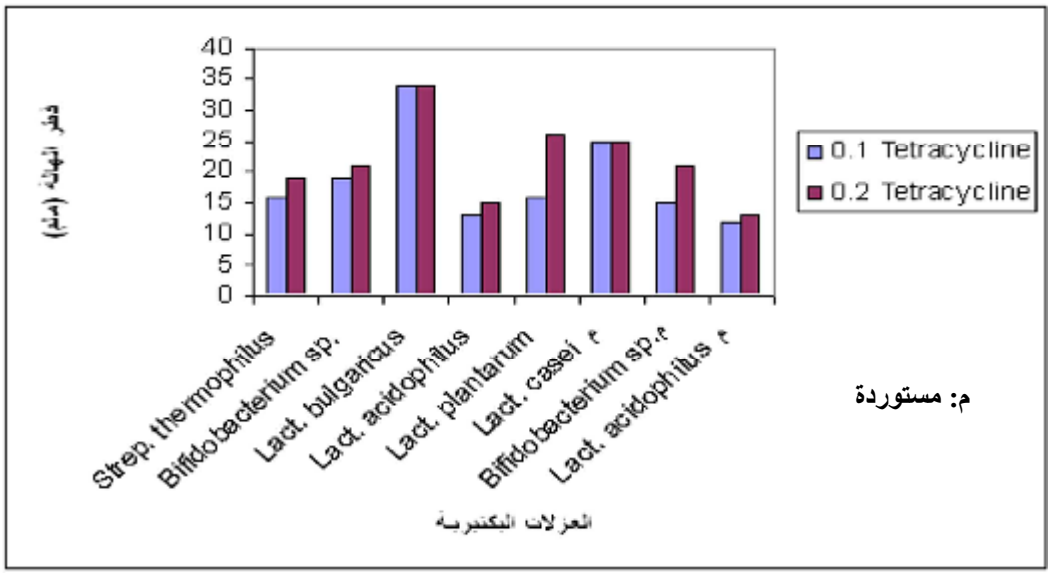
تم تحضير تراكيز مختلفة قياسية من المضادات الحيوية ثم خففت بالماء المقطر المعقم للحصول على التراكيز المطلوبة(مايكروغرام/مل) والمذكورة في الجدول (١) والمعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية WHO(Gupta وآخرون،١٩٩٥) وتباينت التخافيف تبعاً لتأثير كل مضاد حيوي والحدود الدنيا المسموح بها٠

حضر الوسط الغذائي Elliker agar حسب ما ورد في Elliker وآخرون (١٩٥٦) وMRS agar طبقا لـ Deman وآخرون (١٩٦٠) تم التعقيم في المؤصدة على ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة وبردت الاوساط الى أقل من ٥٠°م وصبت في أطباق بتري المعقمة وتركت للتصلب ثم نقل ٠.١ مل من العزلات البكتيرية المنشطة المحلية والمستوردة والمنماة على الوسط السائل المذكورة أعلاه ونشرت بطريقة النشر السطحي على سطح الاوساط الغذائية المتصلبة في أطباق بتري ٠ غمرت أقراص الترشيح ذات الأقطار ٥ملم القياسية والمعقمة والمنتجة من شركة Difco laboratories في التراكيز المختلفة من المضادات الحيوية والمحضرة أعلاه ووضعت على سطح الوسط الغذائي في الأطباق بحيث وضع في كل طبق ثلاثة اقراص وحضنت الاطباق على ٣٧°م لمدة ٢٤ساعة وفي ظروف لاهوائية بوجود ١٠% CO_2 للبكتريا العصوية وفي ظروف هوائية للبكتريا الكروية ٠ بعد ذلك تم قياس قطر منطقة التثبيط حول كل قرص (ملم) باستخدام المسطرة ٠

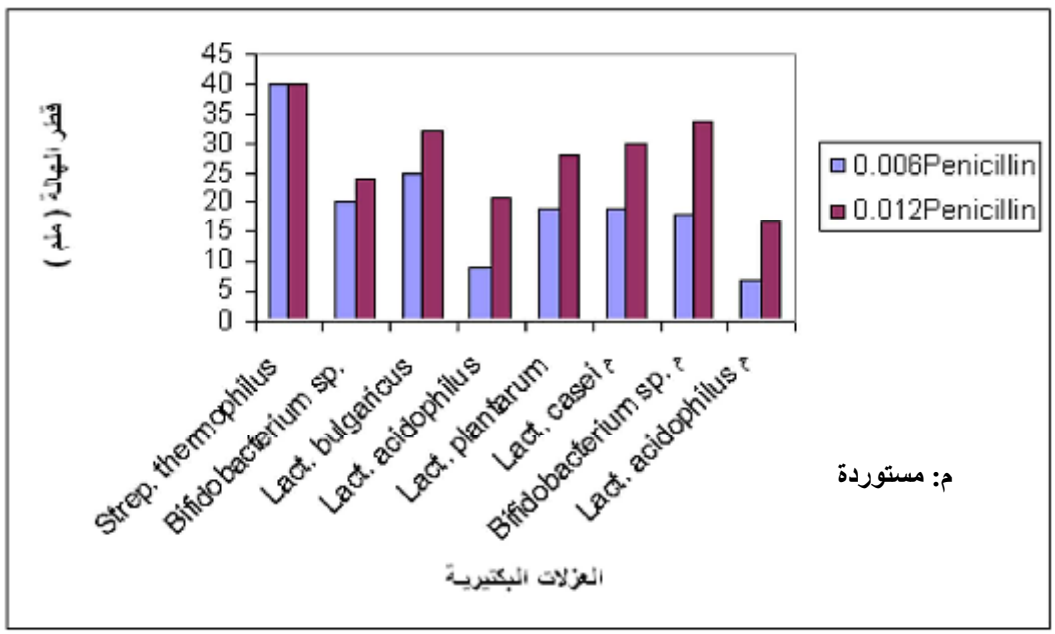
النتائج والمناقشة

أظهرت الأحياء المجهرية حساسية مختلفة تجاه المضادات الحيوية المختلفة وهذا ما وجده Gupta وآخرون (١٩٩٥) بأن بكتريا حامض اللاكتيك تختلف في حساسيتها تجاه المضادات الحيوية المختلفة. وأظهرت جميع العزلات البكتيرية حساسية تجاه المضاد الحيوي تتراسايكلين في التركيزين المستخدمين ٠.١ و٠.٢ ppm اذ تراوحت أقطار المنطقة الخالية من النمو من ١٢ ، ١٣ ملم ، على التوالي ، للعزلة المستوردة *L. acidophilus* وهي الأقل تأثراً بالمضاد الحيوي إلى ٣٤ ملم لبكتريا *L. bulgaricus* والتي كانت أكثر حساسية بهذا المضاد الحيوي كما هو واضح في الشكل (١) وهذا يتفق مع ما ذكره الدليمي (١٩٨٨) من أن المضاد الحيوي تتراسايكلين يعمل على تثبيط البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، وأنه يقتل البكتريا السالبة لصبغة كرام وذلك من خلال تأثيره المثبط لعملية تخليق الحامض النووي (RNA) أما المضاد الحيوي البنسلين ثبط جميع العزلات البكتيرية عدا بكتريا *L. acidophilus* بعزلتيها المحلية والمستوردة عند استخدام التركيز الأقل (٠.٠٠٦ ppm) اذ كان قطر المنطقة الخالية من النمو ٩ و ٧ ملم ، على التوالي ، وكما هو واضح في الشكل (٢) وهذا يتفق مع ما وجده الدليمي (١٩٨٨) حول تثبيط البكتريا الموجبة لصبغة كرام بالمضاد الحيوي البنسلين من خلال دور هذا المضاد في إيقاف تخليق الببتيدوكلايكان

المكون الرئيس للجدار الخلوي وكذلك إلى تمزق الغشاء السايتوبلازمي للخلية مسبباً تلفاً غير رجعي للجدار الداخلي للبكتريا (العاني وأمين ،١٩٩٠) .



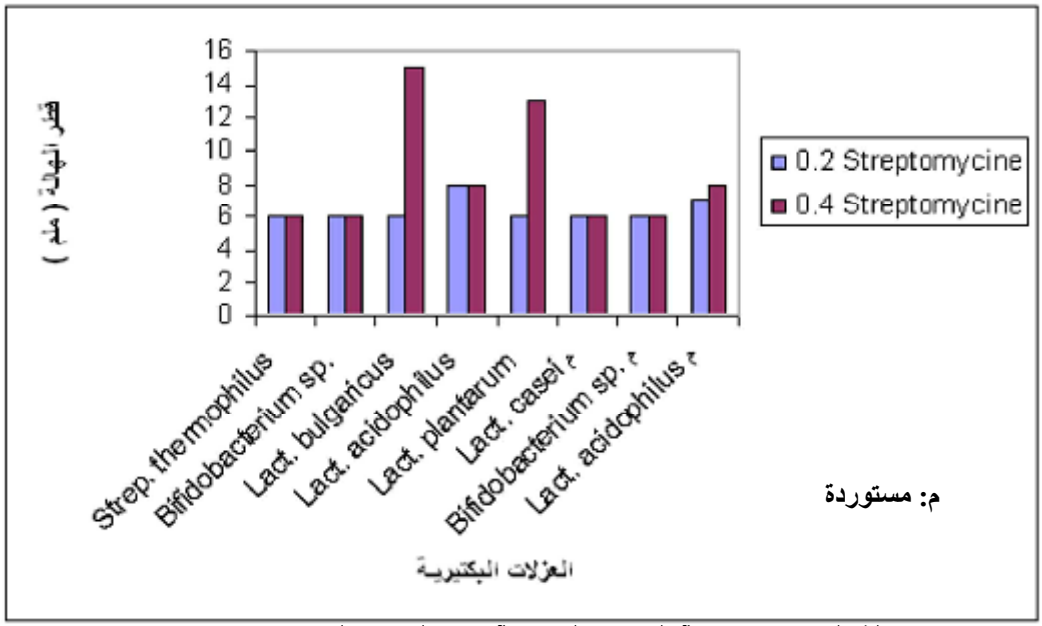
الشكل (١) حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضاد الحيوي تتراسايكلين



الشكل (٢) حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضاد الحيوي البنسلين

كما وجد بأن جميع العزلات البكتيرية المحلية والمستوردة كانت غير حساسة للمضاد الحيوي ستربتومايسين عند استخدام التركيزين ٠.٢ و ٠.٤ ppm ، إذ تراوحت أقطار المناطق الخالية من النمو من ٦ إلى ٨ ملم (بضمنها قطر القرص ٥ ملم) عدا بكتريا *L. bulgaricus* و *L. plantarum* فان هذا المضاد الحيوي كان له تأثيراً مثبطاً لهما عند استخدام التركيز العالي ٠.٤ ppm ، إذ بلغت أقطار المنطقة الخالية من النمو لهما ١٥ و١٣ ملم ، على التوالي ، كما هو واضح في الشكل (٣) وهذه النتائج تتفق مع ما وجده الدليمي (١٩٨٨) من أن هذا المضاد الحيوي لا يؤثر على البكتريا الموجبة لصبغة كرام

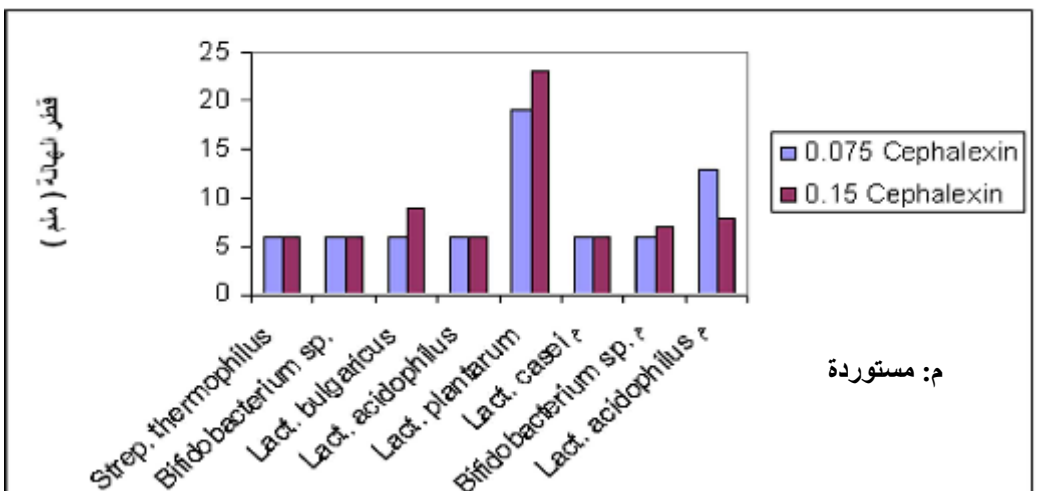
وأن تأثيره ينحصر على البكتريا السالبة لصبغة كرام ، إذ يعمل على إيقاف عملية تخليق البروتين . كذلك اتفقت هذه النتائج مع Charteris وآخرون (١٩٩٨) الذين ذكروا بأن ٤٦ سلالة من بكتريا Lactobacillus قاومت المضاد الحيوي ستربتومايسين عندما كان تركيزه ١٠ مايكروغرام/ مل وأن هذه البكتريا كانت حساسة لكل من المضادين الحيويين تتراسايكلين وكلورامفينيكول .



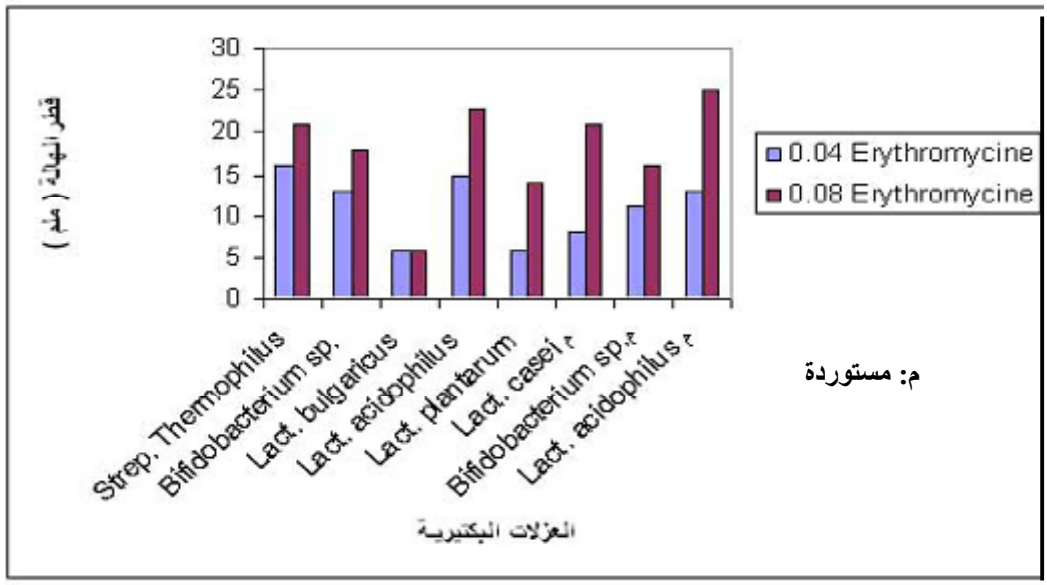
الشكل (٣) حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضاد الحيوي ستربتومايسين

ويبين الشكل (٤) حساسية العزلات البكتيرية المحلية والمستوردة تجاه المضاد الحيوي ارثرومايسين عند التركيزين المستخدمين ٠.٠٤ و ٠.٠٨ ppm وكان أكثرها حساسية تجاه هذا المضاد هي بكتريا *L. acidophilus* بعزلتيها المحلية والمستوردة ، إذ بلغ قطر المنطقة الخالية من النمو لهما ١٥ ، ٢٣ و ١٣ ، ٢٥ ملم ، على التوالي ، كما أظهرت العزلات المستوردة حساسية أقل من العزلات المحلية لكل من بكتريا *Bifidobacterium sp.* و*L. acidophilus* في حين لم تظهر بكتريا *L. bulgaricus* حساسية تجاه هذا المضاد الحيوي بتركيزيه ٠.٠٤ - ٠.٠٨ ppm اذ بلغ قطر المنطقة الخالية من النمو ٦ و٦ ملم ، على التوالي، عند التركيزين المستخدمين في حين وجد بأن بكتريا *L. plantarum* م تكن حساسة تجاه هذا المضاد الحيوي عند التركيز ٠.٠٤ ppm إذ بلغ قطر المنطقة الخالية من النمو ٦ ملم في حين كانت هذه البكتريا حساسة لهذا المضاد الحيوي عند التركيز ٠.٠٨ ppm إذ بلغ قطر المنطقة الخالية من النمو ١٤ ملم .

كما دلت النتائج على أن أي من العزلات البكتيرية لم تتأثر المضاد الحيوي سيفالكسين باستثناء بكتريا *L. plantarum* التي أظهرت حساسية تجاهه عند التركيزين المستخدمين ٠.٠٧٥ و ٠.١٥٠ ppm ، إذ بلغت أقطار المنطقة الخالية من النمو١٩ و ٢٣ ملم للتركيزين ، على التوالي، وكما هو واضح في الشكل (٥).

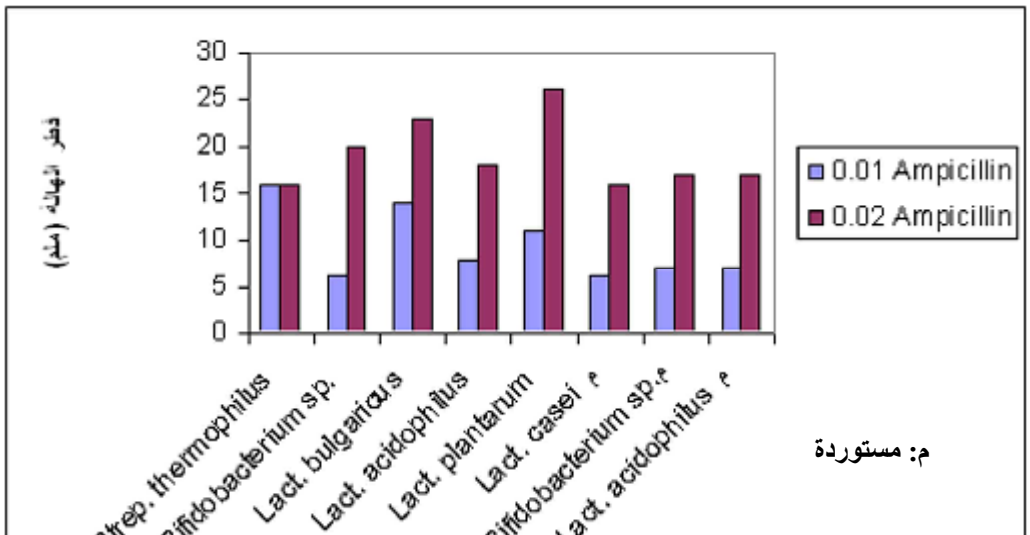


الشكل (٤) حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضاد الحيوي أرثرومايسين



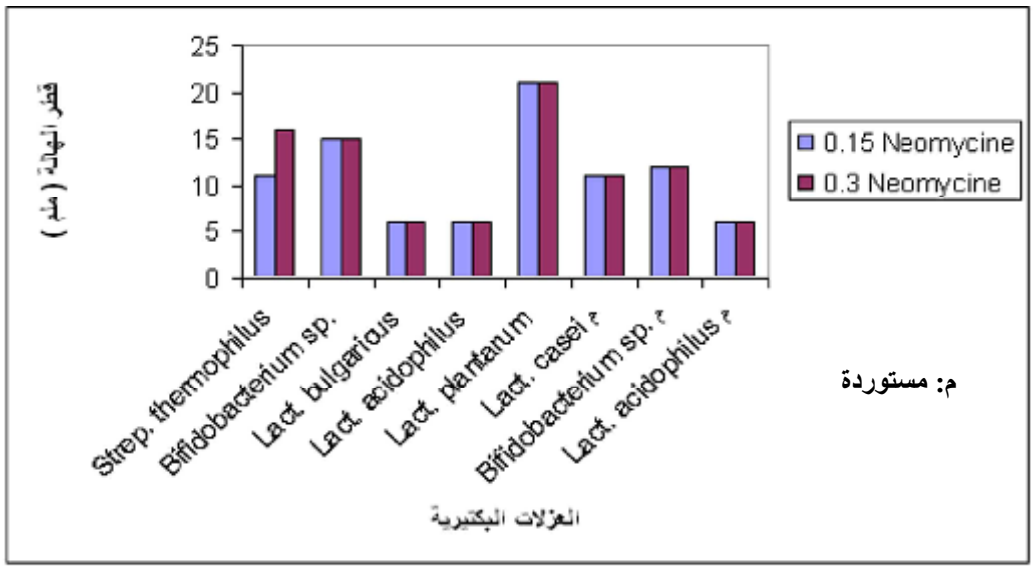
الشكل (٥) حساسيه العزلات البكتيريه تجاه المضاد الحيوي سيفالكسين

كما وجد بأن بكتريا *Strep. thermophilus* ، *L. bulgaricus* و*L. plantarum* كانت حساسة للمضاد الحيوي الأمبسلين بالتركيزين المستخدمين ٠.٠١ - ٠.٠٢ ppm حيث كانت أقطار المنطقة الخالية من النمو ١٦ و ١٦ ، ١٤ و ٢٣ ، ١١ و ٢٦ ملم ، على التوالي ، عند التركيزين المستخدمين ، أما بقية العزلات فانها لم تكن حساسة تجاه هذا المضاد الحيوي عند التركيز ٠.٠١ ppm ، في حين كانت جميعها حساسة لهذا المضاد الحيوي عند التركيز العالي٠.٠٢ ppm ، وكما هو واضح في الشكل (٦) وهذا يتفق مع ما وجده El-Shafei وآخرون (٢٠٠٢) من أن بكتريا *Strep. thermophilus* كانت حساسة لكل من الأمبسلين وكلورامفينيكول وأرثرومايسين وتتفق أيضاً مع ما وجده Abd-Elsalam وآخرون (٢٠٠٤) من حساسية بكتريا *L. acidophilus* تجاه المضادات الحيوية أمبسلين وستربتومايسين .



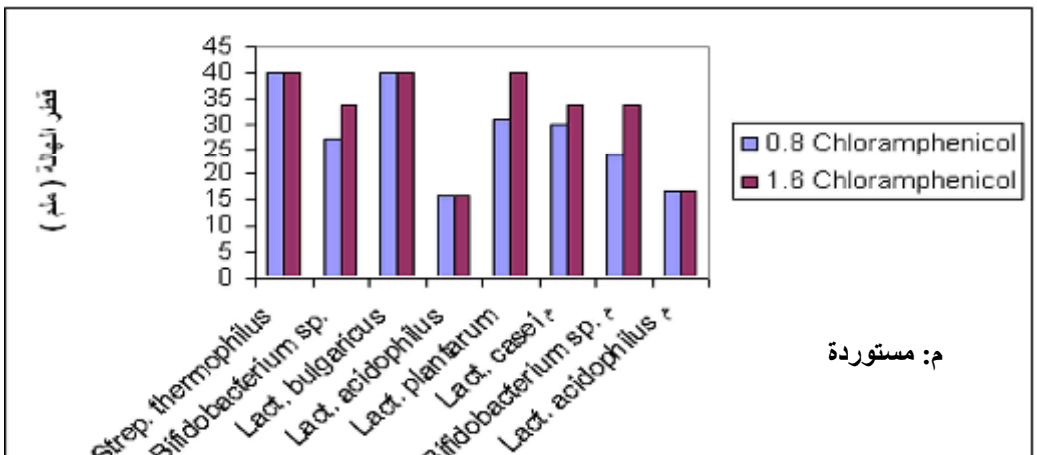
الشكل (٦) حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضاد الحيوي أمبسلين

أما المضاد الحيوي نيومايسين فقد أظهرت جميع العزلات البكتيرية حساسية تجاه هذا المضاد الحيوي بالتركيزين المستخدمين ٠.١٥٠ و ٠.٣٠٠ ppm عدا بكتريا *L. bulgaricus* وبكتريا *L. acidophilus* بعزلتيها المحلية والمستوردة اذ بلغت أقطار المنطقة الخالية من النمو لهذه العزلات ٦ و ٦ ، ٦ و ٦ ، ٦ و ٦ ملم ، على التوالي ، وأن بكتريا *L. plantarum* كانت الأكثر حساسية من بقية العزلات الأخرى تجاه هذا المضاد الحيوي ، إذ بلغت أقطار المنطقة الخالية من النمو عند كلا التركيزين ٢١ ، ٢١ ملم ، على التوالي كما هو واضح في الشكل (٧) .



الشكل (٧) حساسيه العزلات البكتيريه تجاه المضاد الحيوي نيومايسين

كما يلاحظ من الشكل (٨) بأن جميع العزلات البكتيرية كانت حساسة للمضاد الحيوي كلورامفينيكول بالتركيزين المستخدمين ٠.٨ - ١.٦ ppm وأن كل من بكتريا *Strep. thermophilus* و *L. bulgaricus* أظهرت أكثر حساسية تجاه هذا المضاد الحيوي من غيرهم ، إذ بلغت أقطار المنطقة الخالية من النمو ٤٠ و ٤٠ ، ٤٠ و ٤٠ ملم ، على التوالي . نستنتج من ذلك بأنه يمكن استخدام بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية في المنتوجات اللبنية المختلفة ومعرفة تركيز المضاد الحيوي المقاوم له عند وجود بقايا من هذه المضادات المستخدمة كعلاج للحيوانات المريضة بمرض التهاب الضرع .



الشكل (٨) حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضاد الحيوي كلورمفينيكول

EFFECT OF SOME ANTIBIOTICS ON GROWTH OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA

Hassan GH. M. H. S. Mohammed N. F. Mohammed
Food Sci. and Biotechnology Dept., College of Agric. and Forestry,
Mosul Univ., Iraq.

ABSTRACT

The effect of different antibiotics on local and imported bacteria *Bifidobacterium sp*., *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus* , *Streptococcus thermophilus*, *L. Casie* has been studied by using Disk assay . All bacteria were found to be sensitive to tetracycline at the concentrations 0.1, 0.2 ppm. The inhibition zone ranged from 12-34 mm . All bacteria except *L. acidophilus* were inhibited by ampicilline . All bacteria except *L. bulgaricus* and *L. plantarum* were found to be sensitive to streptomycine at the concentrations 0.2, 0.4 ppm . The inhibition zones were 13 and 15 mm, respectively, at concentration of 0.4 ppm . Local and imported *L. acidophilus* were found to be more sensitive to erythromycine . None of the bacteria were affected by cephalexine and chloramphenicol at the concentrations used . All bacteria showed sensitivity toward ampicilline at concentration of 0.2ppm except *Strep. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. plantarum* which were sensitive to this antibiotic at the concentration of 0.1ppm . All bacteria except *L. bulgaricus*, local and imported *L. acidophilus* showed sensitivity to neomycine at the concentrations 0.150 and 0.300 ppm . In conclusion bacteria differed in antibiotics resistance and this must be taken into consideration when using these bacteria as starters in dairy products processed from milk containing residues of antibiotics with inhibiting concentrations to their growth.

المصادر

الدليمي ، خلف صوفي داود (١٩٨٨). التسمم الغذائي ـ الطبعة الثانية ـ وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ـ العراق.

العاني، فائز عزيز ، وأمين سليمان (١٩٩٠). مبادئ الأحياء المجهرية , دار الحكمة للطباعة والنشر ، الموصل ، العراق.

حسن ، غانم محمود ، وحامد صالح محمد ، ونزار فخري محمد (٢٠٠٨) . استخدام عزلات محلية مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك في مقاومة أملاح الصفراء وخفض الكلسترول . مجلة زراعة الرافدين ، جامعة الموصل، العراق ٣٦ (٣) : ١٢٧- ١٣٦ .

Abd-Elsalam, B. A. I. ; N. E. Sultan ; O. Fayed and M. A. Zedan (2004) . Invitro studies on probiotic criteria of Lactobacilli. Egyption J. of Dairy Science. 32 : 17-29 .

Charteris, W. P. Kelly, P. M. Morelli and J. K.Collins (1998). Antibiotic susceptibility of potentially Probiotic Bifidobacterium isolated from the human gastrointestinal tract. Lett. Appl. Microbiol. 26: 333-337.

Dave, R. I. and N. P. Shah (1998) . Ingredients supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. J. Dairy Sci. 81: 2804-2816.

Deman, J. C. ; M. Rogosa and M. E. Sharp (1960) . Amidium for the cultivation of Lactobacilli . J. Applied Bacteriology, 23 : 130-135 .

Elliker, P. R. ; W. Anderson and C. Hanneson (1956) . An agriculture medium for Lactic acid streptococci and Lactobacilli . J. of Dairy Science, 39 : 1611.

El-Shafei, K. ; G. A. Ibrahim and N. F. Tawfic (2002). Benefical uses of Locally Isolated Lactic acid bacteria. Egyption. J. Dairy Sci. 30 (1) : 15-25 .

Gupta, P. K ; B. K. Mital and R. S. Gubta (1995) . Antibiotic sensitivity pattern of various *Lactobacillus acidophilus* strains . Indian J. of experimental Biology. 33 : 620-621.

Holt, J. C. and N. R. Krieg (1986) . Bergys manual of systematic Bacteriology.Vol.2 Williams and wilkins London .

Sanders, M. E. (1999). Probiotics. Food Technology, 53: 67-77.

Stanton, C ; G. Gardiner ; H. Meehan ; K. Collins ; G. Fitzgerlad ; P. Lynch and R.Ross (2001) . Market potential for probiotics. American . J. Clin Nutr. 73 (2) : 476-483.