عزل وتوصيف جراثيم *Bifidobacterium adolescentis* من حواصل فروج اللحم ودراسة إمكانية استخدامها كمعزز حيوي[1]

عمار عبد الرزاق توفيق العاني
قسم الأنبار/دائرة شؤون الأقاليم والمحافظات
وزارة العلوم والتكنولوجيا

وزياد طارق محمد الضنكي
قسم الثروة الحيوانية/كلية الزراعة
جامعة الأنبار

الاستلام 22 / 11 / 2010

القبول 12 / 04 / 2011

Abstract

The aim of this study is to isolate Bifidobacteria from broiler crops to obtain bacteria having the ability of adhesion to digestive canal and good activity; The isolated bacteria were passaged three serial passages in chicks for 6 days interval, after that, Three isolates were selected and testing for probiotic and biochemical properties on them (api 20 A test one of biochemical tests which was conducted on one isolate only). These isolates were showed same properties, they were unable to grow in aerobic conditions, they couldn't produce catalase enzyme and CO_2, they could produce acid, and analyze starch. They had high ability for adhesion on crop epithelial cells, and they were unable to grow in acid medium ($pH<4.5$) but they were able to growth in medium ($pH=6$). On other hand, the isolates were sensitive for most antibiotics. By using the api 20 A test, one of these isolates showed similar characters to *Bifidobacterium adolescentis* and possibly could be used as probiotic for broiler.

الخلاصة

استهدفت هذه الدراسة عزل وتوصيف البكتريا المنشطرة من حواصل فروج اللحم والحصول على عزلات ذات قابلية التصاق عالية ببطانة القناة الهضمية وقد مررت عزلات بكتريا حامض

(1) البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول.

اللبنيك المعزولة في البداية بين ثلاثة أجيال من الأفراخ لغرض تقويتها وقد أثبت النمو الجيد للعزلات اللاحقة الفائدة الكبيرة لعملية التمرير، وفي المرحلة الأخيرة أجريت الفحوصات الكيموحيوية على أفضل ثلاث عزلات والتي كان من أبرزها فحص api 20 A الذي أجري على عزلة واحدة. وقد أظهرت العزلات الثلاث مواصفات متشابهة فقد كانت غير قادرة على النمو في ظروف هوائية وغير منتجة لأنزيم الكتاليز وغير منتجة لغاز CO_2، ولكنها كانت منتجة للحامض من خلال نموها في وسط أكار $MRS\text{-}CaCO_3$ ومحللة للنشا وذات قدرة عالية على الالتصاق بالخلايا الطلائية لحواصل فروج اللحم وقادرة على النمو في وسط أسه الهيدروجيني 6 وغير قادرة على النمو في الأوساط التي يكون أسها الهيدروجيني أقل من 4.5، كما أن العزلات أظهرت حساسيتها لأغلب المضادات الحياتية، وأما عن العزلة التي أجري عليها فحص api 20 A فقد أظهرت نفس المواصفات القياسية للبكتريا المنشطرة *Bifidobacterium adolescentis* والتي أظهرت أيضاً أن بالإمكان استخدامها كمعزز حيوي لفروج اللحم.

المقدمة

جاءت تسمية البكتريا المنشطرة من bifid ومعناه الأشرم أو المنشطر أو المتفرع، أول اكتشاف لها كان عام 1899 من قبل العالم Tissier في معهد باستور حيث لاحظها بأعداد كبيرة وبأشكال غير منتظمة تأخذ شكل حرف Y في براز الأطفال ذوي الرضاعة الطبيعية وأدرج تصنيفها آنذاك مع بكتريا *Bacillus* وسميت ببكتريا *Bacillus bifidus* حتى عام 1924 حيث فصلت في جنس لوحده سمي بالبكتريا المنشطرة (Leahy وزملاؤه، 2005)، تعود البكتريا المنشطرة إلى مجموعة الاكتينومايسيتات Actinomycycetes ولا تعود إلى مجموعة بكتريا حامض اللبنيك ولكنها توضع معها لكونها تشغل القناة الهضمية للإنسان والحيوان بالتناصف مع بكتريا حامض اللبنيك والمجموعتان ليس لهما علاقة مع بعض من الناحية التطورية (الخفاجي، 2008). هذه البكتريا ذات شكل عصوي، غير منتظمة، موجبة لصبغة كرام، غير متحركة، غير مكونة للسبورات، لاهوائية، بعض أنواعها ينمو في الهواء المشبع بـ 10% من غاز ثاني أوكسيد الكاربون، لا تنمو في أس هيدروجيني أقل من 4.5 وأكثر من 8.5، مخمرة للكاربوهيدرات بشكل نشيط، غير منتجة لأحماض البيوتريك والبروبيونيك، غير منتجة لغاز ثاني أوكسيد الكاربون، سالبة لفحص الكتاليز، درجة الحرارة المثلى لنموها (37–41) مئوي، موجودة في فم وأمعاء الفقريات ذوات الدم الحار وفي الحشرات ومياه المجاري، وتصنف على أنها غير مرضية (Holt وزملاؤه، 1994). منتجة لحامضي الخليك واللبنيك، عصياتها قد تكون بشكل منفرد أو في تجمعات على شكل حرف V (Prescott وزملاؤه، 1999).

من المحاولات القديمة لعزل البكتريا المستخدمة كمعزز حيوي من الدواجن كانت من قبل Barnes و Impay (1970) حيث أجريا عملية العزل لعدة سلالات من البكتريا اللاهوائية

وعلى أوساط متعددة من الأعورين في الدجاج والديك الرومي، بعدها قام نفس الباحث الأول Barnes وزملاؤه (1972) بعزل عدة سلالات من البكتريا اللاهوائية من الأمعاء والأعورين لفروج اللحم المغذى على عليقتين مختلفتين في مصدر مسحوق السمك الداخل في تركيب العليقتين وذلك لمعرفة تأثير مصدري مسحوق السمك على مايكروبايوتا القناة الهضمية. كما أجرى Schneitz وزملاؤه (1981) عملية العزل لعدة أجناس من البكتريا اللاهوائية من الأعورين للطيور البالغة وشخصت الأنواع لهذه الأجناس بواسطة فحص api 20 A للبكتريا اللاهوائية المجبرة وفحص api 50 Lactobacillus لبكتريا العصيات اللبنية (على اعتبار أنها من البكتريا الهوائية الخيارية) بعد تنميتها على عدة أوساط وقد اعتمدوا في توفير الظروف اللاهوائية اللازمة لعملية العزل على ملء الحاوية اللاهوائية بـ 10% من غاز الهيدروجين، 10% من غاز ثاني أوكسيد الكاربون و 80% من غاز النتروجين.

لقد تنوعت مناطق القناة الهضمية للدواجن التي تم عزل البكتريا المستخدمة كمعزز حيوي منها، فالبعض من الباحثين فضل الأمعاء لعملية العزل كما فعل Gusils وزملاؤه (1999) الذين قاموا بعزل عدة أنواع لبكتريا العصيات اللبنية، وكذلك فعل Beasley وزملاؤه (2004) الذين تمكنوا من عزل بكتريا *Lactobacillus crispatus* من الأمعاء، أما البعض الآخر فقد استخدم الفضلات كمصدر للعزل (Gavani وزملاؤه، 2006)، وآخرون اختاروا الأعورين (Schneitz، 1993)، والكثير اختار الحوصلة وذلك لتنوع الأحياء المجهرية في الجزء السفلي للقناة الهضمية وسيادة البكتريا المستخدمة كمعزز حيوي في منطقة الحوصلة (Adami و Gavazzoni، 1993) وكذلك تعمل الحوصلة كمصدر لإمداد القناة الهضمية بالأحياء المجهرية السائدة والمفيدة. ومن الباحثين الذين أجروا عملية العزل من الحوصلة الضنكي (1999) و (2003) والموشلي (2001) اللذان قاما بعزل بكتريا العصيات اللبنية، وكذلك حال Taheri وزملائه (2009) الذين حصلوا على 332 سلالة لبكتريا حامض اللبنيك من أهمها بكتريا *Lactobacillus crispatus* من الحوصلة واللفائفي والأعورين.

المواد وطرائق العمل

اتبعت الطريقة التي وصفها الضنكي (2003) وذلك بأخذ حواصل ثلاثة طيور بعمر 49 يوم بطريقة معقمة وتنظيفها من محتوياتها ووضعها في المحلول الملحي المعقم الحاوي على كلوريد الصوديوم (Nacl) بتركيز 8% ثم تقطيع الحوصلة إلى قطع صغيرة داخل هذا المحلول بمقص معقم وسحن القطع الصغيرة بواسطة أنبوب زجاجي معقم، بعد ذلك بعد ذلك تم أخذ 1 مل من المحلول الذي وضعت فيه الحوصلة وإضافته إلى 4 مل من مرق MRS المعقم

الموضوع في أنابيب صغيرة، حضنت هذه الأنابيب في الحاضنة لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 37 مئوي.

اختيرت العزلات التي ظهر فيها نمو مترسب لونه أبيض في أسفل الأنبوبة وتم أخذ مسحات منها بواسطة الأنشوطة (Loop) وزرعها على أطباق MRS agar بطريقة التخطيط (streaking) ووضع الأطباق بطريقة مقلوبة في الحاوية اللاهوائية (Anaerobic jar) وحضنها لا هوائياً في الحاضنة لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 37 مئوي، وإن توفير البيئة اللاهوائية تم من خلال استخدام أكياس AnaeroGen (Oxoid) المجهزة من قبل شركة Oxoid الانكليزية.

أخرجت الأطباق من الحاضنة والتقطت المستعمرات الكبيرة وتم إجراء التصبيغ (staining) لها بصبغة كرام (Gram) وفحصت تحت المجهر الضوئي بالعدسة الزيتية واختيرت العزلات التي أظهرت مواصفات بكتريا حامض اللبنيك (Lactic acid bacteria) والتي ظهرت تحت المجهر بشكل عصوي، نهاياتها مستديرة، موجبة لصبغة Gram، غير مكونة للأبواغ (Holt وزملاؤه، 1994) ثم نقلت إلى مرق MRS المعقم وحضنت في الحاضنة لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 37 مئوي ثم أجريت للعزلات التي أظهرت نمواً مترسباً لونه أبيض عملية التصبيغ بصبغة كرام (Gram) فالتي أظهرت نفس المواصفات المذكورة أعلاه تم أخذ مسحة منها بواسطة الأنشوطة (Loop) وطعنها في أنابيب حاوية على حليب فرز معقم بتركيز 10% وحضنت هذه الأنابيب لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 مئوي.

أجريت ثلاث عمليات تمرير للعزلات، إذ كانت المرة الأولى بتجريع (inoculation) 2 طير بعمر 1 يوم نصف مل من الحليب الفرز ذي التركيز 10% الحاوي على البكتريا المعزولة بالطريقة التي ذكرت أعلاه على مدى ستة أيام، بعد ذلك تم ذبح هذين الطيرين وأخذ حوصلتيهما بطريقة معقمة وإجراء عملية العزل للبكتريا المنشطرة وفق الطريقة التي ذكرت مسبقاً ثم طعنها مرة أخرى في حليب فرز ذي تركيز 10% وجرعت 4 طيور بعمر 1 يوم نصف مل من هذا الحليب على مدى ستة أيام أيضاً ثم ذبحت الطيور الأربع واستخرجت حواصلها بطريقة معقمة أيضاً وإجراء عملية العزل مرة أخرى وتجريع الحليب الفرز الحاوي على البكتريا المعزولة لأربعة طيور مرة أخرى بعمر 1 يوم ولمدة ستة أيام وذبح هذه الطيور واستخراج حواصلها بطريقة معقمة وإجراء عملية العزل للمرة الأخيرة واختيار العزلات التي أظهرت نفس المواصفات المذكورة مسبقاً لإجراء الفحوصات الكيموحيوية وملائمة استعمال العزلات البكتيرية كمعزز حيوي. وقد اختيرت ثلاث عزلات لإجراء الفحوصات اللاحقة التي شملت على التوالي فحص النمو في وسط أكار $MRS\text{-}CaCO_3$ (Harrigan و McCance، 1976)، وفحص حساسية العزلات البكتيرية لاثني عشر نوعاً من المضادات الحياتية المجهزة من شركة Bioanalyse® الإسبانية

(Gapata و Mital، 1995)، والفحوصات الكيموحيوية المتضمنة فحص النمو في ظروف هوائية، وفحص الكتاليز، وفحص إنتاج غاز CO_2، وفحص تحليل النشا (Harrigan و McCance، 1976)، وفحص api 20 A (المجهز من شركة BIOMERIEUX الفرنسية حسب الدليل المرفق معه) (Schneitz وزملاؤه، 1981؛ الحمداني، 2009)، ومن ثم إجراء فحوصات ملائمة العزلات لاستخدامها كمعزز حيوي والتي شملت فحص مقاومة الحموضة (Haddain وزملاؤه، 1997) وفحص الالتصاق بالخلايا الطلائية للحوصلة (Fuller، 1975 ؛ العبيدي، 2001 ؛ الموشلي، 2001).

النتائج والمناقشة

بعد إجراء عملية العزل لبكتريا حامض اللبنيك من حواصل فروج اللحم وتنميتها في مرق MRS أظهرت 24 عزلة من مجموع 35 نمواً مترسباً ذا لون أبيض في قعر الأنبوبة وهذا يعد دليلاً غير مباشر على قدرة هذه البكتريا على الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للحوصلة كما أكد ذلك كل من Schneitz (1993) والموشلي (2001) والضنكي (2003). وبعد نقل تسعة منها إلى أطباق الوسط الزرعي MRS agar وحضنها لاهوائياً لمدة خمسة أيام ظهر في جميع الأطباق نمو لمستعمرات كريمية اللون اختبرت 52 منها تحت المجهر بعد تصبيغها بصبغة كرام، وقد أظهرت 40 منها مواصفات مورفولوجية مشابهة لبكتريا حامض اللبنيك (Lactic acid bacteria) وهي كونها عصوية الشكل موجبة لصبغة كرام وغير مكونة للأبواغ وغير متحركة، واختيرت عشر عزلات فقط من الأربعين عزلة كان نموها جيداً وأهمل الباقي نظراً لنموها الضعيف ونقلت إلى مستزرع مائي حاوي على 10% من الحليب الفرز ومررت بين ثلاثة أجيال من أفراخ عمرها يوم واحد ربيت لستة أيام وجرعت يومياً 1 مل من المستزرع المائي الحاوي على بكتريا حامض اللبنيك.

أثبتت النتائج التشخيصية لبكتريا حامض اللبنيك الفائدة الكبيرة لعملية التمرير التي أجريت لأول مرة. فنظراً لكون القناة الهضمية تعتبر معقمة عند الفقس وخالية من الأحياء المجهرية (Dibner وزملاؤه، 2008) فإن عملية التمرير هذه تعمل على شغل مواقع الارتباط في القناة الهضمية من قبل بكتريا حامض اللبنيك قبل غيرها من أنواع البكتريا وتكاثرها وسيادتها على الأنواع الأخرى كونها تعطى بجرعات كبيرة يومياً وهذا سيجعل من هذه الأفراخ مزرعة انتخابية جيدة لهذه العزلات بالإضافة إلى أن هذه الأفراخ تذبح بعمر صغير وهذا يقلل احتمال دخول أنواع أخرى من البكتريا، فبعد كل تمريرة يلاحظ أن ارتفاع الراسب الأبيض في العزلات كان أعلى فالراسب الأبيض هو عبارة عن التجمعات البكتيرية التي هي أحد الوسائل التي يستدل منها على أن البكتريا المستعملة لها قابلية التصاق قوية أم لا (Schnietz وزملائه، 1993). كما أن

نموها يكون بكثافة أكبر من العزلات التي أخذت قبل التمرير، لذلك فهي عملية جيدة لتنشيط العزلات التي أخذت في أول مرة. نميت العزلات بعد التمريرة الأخيرة على وسط أكار -MRS $CaCo_3$ لمعرفة قدرتها على إنتاج حامض اللبنيك وقد أظهرت أكثر المستعمرات هالات شفافة حول نفسها، وهذا دليل على إنتاجها للحامض الذي يعمل على تذويب كاربونات الكالسيوم وقد أكد ذلك كل من القصاب (1988) وظاهر (1999) والضنكي (1999 و 2003).

التقطت المستعمرات ذات القطر الأكبر للهالة الذي يدل على إنتاجها الكبير للحامض ونميت في مرق MRS، ثم اختيرت أفضل ثلاث عزلات نمواً تحضيراً لإجراء الفحوصات الأخرى عليها. من الجدول (1) يتبين بأن جميع العزلات تمتلك مواصفات مشابهة تقريباً حيث أظهرت جميع العزلات عدم قدرتها على النمو في ظروف هوائية وهذا يؤكد كونها من البكتريا المنشطرة التي تتميز بكونها لاهوائية مجبرة (Holt وزملاؤه، 1994)، كما أظهرت جميع العزلات عدم إفرازها لأنزيم الكتاليز الذي يدل عليه ظهور فقاعات في وسط MRS المضاف له بيروكسيد الهيدروجين، بالإضافة إلى عدم إنتاجها لغاز CO_2 (Prescott وزملاؤه، 1999) لكون أنابيب Derham ظلت على حالها ولم ترتفع إلى أعلى لعدم تكون فقاعة الغاز في أعلاها وهذه الميزة تمتاز بها البكتريا المنشطرة عن بكتريا العصيات اللبنية التي تمتاز بإنتاجها للغاز.

جدول 1: الفحوصات التشخيصية للعزلات المختبرة

الفحوصات التشخيصية	العزلات المختبرة		
	عزلة 1	عزلة 2	عزلة 3
النمو في ظروف هوائية	–	–	–
الكتاليز	–	–	–
إنتاج غاز CO_2	–	–	–
النمو في وسط $MRS\text{-}CaCo_3$	+	+	+
تحليل النشا	+	+	+
الالتصاق	+	+	+

وقد أظهرت العزلات الثلاث أيضاً قدرتها على تحليل النشا من خلال تكون هالات شفافة حول المستعمرات النامية على الوسط الزرعي MRS agar المضاف إليه النشا وتلون بقية أجزاء الطبق باللون الأزرق نتيجة لتفاعل النشا غير المتحلل مع كاشف اليود المضاف. إن صفة تحليل النشا للعزلات تؤكد على الأهمية في استخدامها كمعزز حيوي فهي توحي بأن لهذه البكتريا القدرة على تحسين معامل هضم العناصر الغذائية وزيادة توفير الكاربوهيدرات من خلال زيادة معامل هضم النشا (Schneitz وزملاؤه، 1998 ؛ الضنكي، 2003).

كذلك أظهرت العزلات الثلاث قدرتها العالية على الالتصاق بالخلايا الطلائية للحوصلة، إذ أن كل خلية طلائية قد تجمعت حولها حوالي 26 و 29 و 33 خلية بكتيرية للعزلات الثلاث على

التوالي وقد حدد Fuller (1975) التصاق عشرة خلايا بكتيرية أو أكثر كدليل على قدرة البكتريا على الالتصاق بالخلايا الطلائية، وهذا يؤكد قدرتها على البقاء داخل القناة الهضمية وقيامها بدور الإقصاء التنافسي للبكتريا المرضية على أكمل وجه. إن آلية الالتصاق بسطح الخلايا الطلائية للقناة الهضمية تتضمن مهاجمة وارتباط بكتريا المعزز الحيوي بالمستقبلات الخاصة الموجودة على سطح الخلايا الطلائية والتفاعل معها، وإن بكتريا حامض اللبنيك لها القابلية على التجمع مع خلايا نفس السلالة أو مع خلايا السلالات الأخرى وهذه الآلية تسهل الالتصاق بالخلايا الطلائية، بالإضافة إلى أن هذه الأنواع من البكتريا لها القابلية على الارتباط بالجزيئات المصفوفة خارج الخلية مثل الكولاجين الذي يمكن أن يكون مظلة تمتد من طبقة الظهارة إلى طبقة المخاط، لذلك فإن هذه البكتريا بسبب امتلاكها مستقبلاً ذا طبيعة بروتينية يسمى Surface Layer Protein (SLP) كارهاً للماء (Hydrophobic) تشكل طبقة تغطي سطوح الخلايا الطلائية أثناء النمو، والبكتريا المنشطرة واحدة من أفضل أنواع البكتريا التي تبدي مقاومة كبيرة لأملاح الصفراء وتمتلك أعداد كبيرة من المستقبل البروتيني الكاره للماء لذلك فهي من السلالات قوية الالتصاق بالخلايا الطلائية للقناة الهضمية (Ljungh و Wadstorm، 2007).

وقد أشار Lin وزملاؤه (2007) إلى أن سلالات البكتريا المعزولة من حواصل الدواجن تعد من السلالات قوية الالتصاق بالخلايا الطلائية للقناة الهضمية، كما أكدوا على أن قابلية الالتصاق على ظهارة المضيف تعتبر أحد المعايير المهمة في انتخاب سلالات البكتريا لاستخدامها كمعزز حيوي، فلكي تقدم هذه السلالات الفوائد الصحية المرجوة منها كقيامها بالإقصاء التنافسي للبكتريا المرضية من ظهارة الأمعاء وتنظيم المناعة يجب أن تكون لها القدرة العالية على الاستيطان فوق ظهارة القناة الهضمية. كما أن خصوصية المضيف تعتبر من الخواص المرغوب بها لبكتريا المعزز الحيوي واقترحت كأحد المعايير الانتخابية للمعزز الحيوي. وقد أكد Fuller وزملاؤه (1978) أن خصوصية المضيف بالنسبة لالتصاق بكتريا العصيات اللبنية ترتبط ارتباطاً مباشراً بوجود بعض الجزيئات المعينة للمستقبلات على خلايا المضيف التي من الممكن أن تميز بين أنواع الخلايا البكتيرية. بينما أعتبر Rinkinen وزملاؤه (2003) أن اعتماد عملية الالتصاق على سلالات بكتريا حامض اللبنيك أكبر من اعتمادها على المضيف. وقد أشار Szeker وزملاؤه (2005) إلى أن التصاق البكتريا المنشطرة أفضل من التصاق بكتريا العصيات اللبنية.

إن الحالة الصحية للمضيف تؤثر على قابلية التصاق بكتريا المعزز الحيوي بالقناة الهضمية فقد أوضح He وزملاؤه (2001) أن التصاق البكتريا المنشطرة المعزولة من براز الأطفال الأصحاء بالطبقة المخاطية المستخلصة من البراز كان أفضل معنويا من التصاق البكتريا المنشطرة المعزولة من براز الأطفال المرضى بالإضافة إلى أن أعدادها كانت أعلى في

الأصحاء بالمقارنة مع المرضى. وهذا ربما يفسر قوة التصاق البكتريا المنشطرة بالخلايا الطلائية للحوصلة التي لوحظت في هذه التجربة فقد كانت السلالات التي أجري عليها اختبار الالتصاق قد عزلت من أفراخ تتمتع بصحة جيدة بالإضافة إلى ذلك فإن عملية تمرير العزلات التي تم إجراؤها بين ثلاثة أجيال من الأفراخ في هذه الدراسة ربما كانت عاملاً مساعداً في زيادة مقدرة هذه السلالات على الالتصاق بالخلايا الطلائية للحوصلة.

وبالنسبة لفحص الحساسية فإن الجدول (2) يوضح أن العزلات كانت متشابهة في حساسيتها للمضادات الحياتية فقد تبين أنها شديدة الحساسية لخمسة من المضادات الحياتية ومتوسطة الحساسية لأربعة أخرى وضعيفة الحساسية لمضاد حيوي واحد ومقاومة لاثنين. وهذا ربما يدل على أن أغلب المضادات الحياتية المستخدمة في حقول الدواجن تسبب خللاً في التوازن المايكروبي للقناة الهضمية كما أشار إلى ذلك الضنكي (1999) بسبب قضائها على أغلب الأحياء المجهرية المرضية منها وغير المرضية لذلك يجب انتقاء المضاد الحيوي بدقة قبل إعطائه للدواجن.

لكن العزلات الثلاث أظهرت عدم قدرتها على النمو في بيئة حموضتها عالية جداً إذ لم يكن هناك أي نمو للعزلات في مرق MRS ذي الأس الهيدروجيني 2 و 4 كونها لا تنمو في أس هيدروجيني أقل من 4.5 (Holt وزملاؤه، 1994) إلا أن نموها كان طبيعياً في مرق MRS الذي لم تكن حامضيته عالية جداً والذي كان أسه الهيدروجيني 6 وأفضلها نمواً هي العزلة 2 لذلك تم اختيارها لفحص api 20 A، حيث كانت أعدادها 3×10^7 و 6×10^7 و 9×10^6 خلية/مل على التوالي كما يبينها الشكل (1).

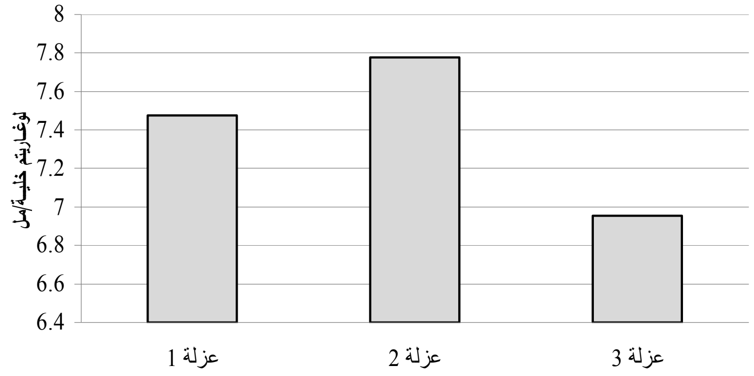
فحص api 20 A الموضحة نتائجه في الجدول (3) أظهر أن العزلة الثانية غير منتجة للاندول (Indole) من التربتوفان (Tryptophan) وغير منتجة لأنزيم اليوريز ولها القابلية على تخمير كل السكريات المتوفرة في هذا الفحص وهي (Glucose، Mannitol، Lactose، Sucrose، Maltose، Salicin، Xylose، Arabinose، Cellobiose، Mannose، Melezitose، Raffinose، Sorbitol، Rhamnose، Trehalose)، وغير محللة للجيلاتين لكنها محللة للاسكوالين – سترات الحديد (Esculin ferric citrate) وقادرة على تخمير الكليسرول.

نتائج الفحوصات التشخيصية المورفولوجية والكيموحيوية للعزلة الثانية جاءت مطابقة للمواصفات القياسية للبكتريا المنشطرة *Bifidobacterium adolescentis* كما ذكر ذلك (Salminen وزملاؤه، 2004) ومثلما جاءت مطابقة الرقم الذي تم الحصول عليه في هذا الفحص مع الدليل المرفق مع الشريط.

جدول 2: نتائج فحص حساسية العزلات المختبرة للمضادات الحياتية

المضاد الحيوي	تركيزه بالـ (mcg)	درجة حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية		
		1	2	3
Amikacin	30	++	++	++
Carbenicillin	100	+++	+++	+++
Rifampin	5	++	++	++
Nitrofurantoin	300	+++	+++	+++
Tobramycin	10	++	+	++
Ceftriaxone	30	+++	+++	+++
Cefotaxime	30	م	م	م
Cephalothin	30	+++	+++	+++
Ampicillin / cloxacillin	5/25	+	+	م
Cefodizime	30	+++	+++	+++
Fusidic acid	10	++	++	++
Nalidixic acid	30	م	م	م

م : (مقاومة) قطر هالة التثبيط بضمنها قطر قرص المضاد الحيوي أقل من 10 ملم.
+ : قطر هالة التثبيط بضمنها قطر قرص المضاد الحيوي من 11-15 ملم.
++ : قطر هالة التثبيط بضمنها قطر قرص المضاد الحيوي من 16-25 ملم.
+++ : قطر هالة التثبيط بضمنها قطر قرص المضاد الحيوي من 26-35 ملم.



شكل 1. أعداد البكتريا بعد نموها في مرق MRS رقمه الهيدروجيني 6

جدول 3: نتائج فحوصات شريط api 20 A

الفحص	النتيجة	الفحص	النتيجة	الفحص	النتيجة
Indole	−	Salicine	+	Mannose	+
Urea	−	Xylose	+	Melezitose	+
Glucose	+	Arabinose	+	Raffinose	+
Mannitole	+	Gelatine	−	Sorbitol	+

+	Rhamnose	+	Esculine	+	Lactose
+	Trehalose	+	Glycerol	+	Sucrose
		+	Cellobiose	+	Maltose

المصادر

1) **Leahy, S. C.; D. G. Higgins; G. F. Fitzgerald and D. Sinderen. 2005.** A review: Getting better with bifidobacteria. Journal of Applied Microbiology. 98:1303-1315.

2) **الخفاجي، زهرة محمود. 2008.** الأحياء العلاجية (من أجل الحياة). معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا – جامعة بغداد.

3) **Holt, J. G.; N. R. Krieg; P. H. Sneath; J. T. Staley and T. S. Williams, 1994.** Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore Maryland, U.S.A..

4) **Prescott, L. M.; J. P. Harley and D. A. Klein, 1999.** Microbiology, 4th. Ed. McGraw-Hill.

5) **Barnes, E. M. and C. S. Impey. 1970.** The isolation and properties of the predominant anaerobic bacteria in the caeca of chickens and turkeys. Br. Poult. Sci. 11:467-481.

6) **Barnes, E. M.; G. C. Mead and D. A. Barnum. 1972.** The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. Br. Poult. Sci. 13:311-326.

7) **Schneitz, C.; E. Seuna and A. Rizzo, 1981;** The anaerobically culture cecal flora of adult fowls that protects chicken from *Salmonella* infections. Acta path. Microbial scand. Sect. B, 89:109-116.

8) **Gusils, C.; A. P. Chaia; S. Gonzalez and G. Oliver. 1999.** Lactobacilli isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. Journal of Food Protection. 62(3):252-256.

9) **Beasley, S. S.; T. M. Takala; J. Reunanen; J. Apajalhti and P. E. Saris. 2004.** Characterization and Electrotransformation of *Lactobacillus crispatus* Isolated from Chicken Crop and Intestine. Poult. Sci. 83:45-48.

10) **Gavani, F.; V. Delcenserie; K. Kopeing; S. Pollinger; H. Beerens; C. Bonaparte and M. Upmann, 2006.** *Bifidobacterium* species isolated

from animal feces and from beef and pork Meat. J. of Food Protection. 69(4):871-877.

11) **Schneitz, C., 1993.** Development and evaluation of a competitive exclusion product for poultry. Ph. D. Thesis, University of Helsinki. Department of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland.

12) **Adami, A. and V. Gavazzoni. 1993.** An experimental standard pattern of assessing the cecal microflora of chicken. Ann. Microbiolo. Enzymol. 43:329.

13) **الضنكي، زياد طارق محمد. 1999.** تأثير التعرض المايكروبي المبكر على الأداء الإنتاجي والاستجابة المناعية لفروج اللحم. رسالة ماجستير - كلية الزراعة – جامعة بغداد.

14) **الضنكي، زياد طارق محمد. 2003.** إنتاج معزز حيوي محلي ودراسة تأثيره في الصفات الإنتاجية لقطعان فروج اللحم والدجاج البياض وأمهات فروج اللحم. أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

15) **الموشلي، إبراهيم بدر الدين، 2001.** تقييم الأداء الإنتاجي والاستجابة المناعية لفروج اللحم المعرض لأنواع مختلفة من البكتريا المفيدة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

16) **Taheri, H. R.; H. Moravej; F. Tabandeh; M. Zaghari and M. Shivazad. 2009.** Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. Poult. Sci. 88:1586-1593.

17) **Harrigan, W. F. and M. F. McCance. 1976.** Laboratory methods in: food and dairy microbiology. Academic press, London.

18) **Gapata, P. K. and B. K. Mital, 1995.** Antibiotic Sensitivity pattern of various *Lactobacillus acidophilus*. Indian J. Exp. Biology. 33.

19) **الحمداني، هبة الله عادل عبدالله يوسف. 2009.** دراسة دور البكتريا الهوائية واللاهوائية في إحداث المضاعفات بعد العمليات الجراحية النسائية. رسالة ماجستير – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة الأنبار.

20) **Haddadin, M. S. Y.; S. M. Abdulrahim; N. H. Odetallah and R. K. Robinson. 1997.** A proposed protocol for checking suitability of *Lactobacillus acidophilus* cultures for use during feeding trails with chickens. Tropic. Sci. 37: 16- 20.

21) **Fuller, R., 1975.** Nature of determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. J. of gen. Microbiology. 87:245-250.

22) **العبيدي، ابتسام جواد. 2001.** دراسة تجريبية للوقاية الحيوية لأفراخ اللحم. رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.

23) **Dibner, J. J.; J. D. Richards and C. D. Knight, 2008.** Microbial imprinting in gut development and health. J. Appl. Poult. Res. 17:14:188.

24) **القصاب، عبد الجبار عمر قوجة. 1988.** التأثير المضاد لبكتريا حامض اللبنيك على بعض البكتريا المرضية. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

25) **ظاهر، عامر عبد الرحمن. 1999.** عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ودراسة بعض صفاتها واستخدامها في تصنيع منتجات لبنية علاجية. أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

26) **Schneitz, C.; T. Kiiskinen; V. Toivonen and M. Nasi. 1998.** Effect of BROILACT® on the physicochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. Poult. Sci. 77:426-432.

27) **Ljungh, A. and T. Wadstorm. 2007.** Lactic acid bacteria as probiotics. Curr. Issues Intestinal Microbiol. 7:73-90.

28) **Lin, Wen-Hsin; Yu B.; Sheng-Hon Jang and Hau-Yang Tsen, 2007.** Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. Anaeroba. 13:107-113.

29) **Fuller, R.; P. A. Barrow and B. E. Brooker. 1978.** Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. Appl. Environ. Microbiol. 35(3):582-591.

30) **Rinkinen, M.; E. Westermarck; S. Salminen and A. C. Ouwehand. 2003.** Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. Vet. Microbiol. 97:55-61.

31) **Szeker, K.; J. Beczner; A. Halasaz; A. Mayer; J. M. Rezessy-Szabo and P. Galfi. 2005.** In vitro adhesion of lactic acid bacteria and bifidobacteria to Caco-2P and IEC-18 cells. Acta. Alimentaria. 34(1): 91-99 (Abstr.).

32) **He, F.; A. C. Ouwehand; E. Isolauri; H. Hashimoto; Y. Benno and S. Salminen. 2001.** Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 30:43-47.

33) **Salminen, S.; A. V. Wright and A. Ouwehand. 2004.** Lactic acid bacteria. 3rd ed. Marcel Dekker, INC. New York, Basel.