استخدام بكتيريا *Bifidobacterium spp.* كمعزز حيوى تجاة نمو بعض البكتريا المعوية

ا.م.د مهدى حسين محيل العمار
جامعة الكوفة \ كلية العلوم \قسم علوم الحياة

الخلاصة:

اختبرت قدرة البكتيريا على انتاج مركبات ايضية ثانوية *Bifidobacterium spp* ذات فعالية ضد ميكروبية واختبار فعاليتها في تثبيط نمو البكتريا *Shigella dysenteriae , Esherichia coli, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumonia Enterobacter cloacae , Salmonella typhi* .

تبين من الدراسة ان نمو البكتريا المنتجة للمركبات تتأثر بعدة عوامل مثل درجة الحرارة والاوكسجين والاس الهيدروجيني فضلاً عن الاوساط الزرعية من خلال أجراء العد البكتيري ، حيث ان افضل انتاج للمواد الفعالة عندما تكون اعداد البكتريا 1×10^9 خلية / مل .

اختبرت الفعالية التثبيطية للعزلات البكتيرية باستخدام طريقة الاقراص المقلوبة وسجلت فعالية ملحوضة مقارنة بالراشح حيث استخدمت تراكيز مختلفة من الراشح البكتيري في الدراسة التضادية . اذ وجد ان الفعالية التثبيطية تصل اقصاها عند التركيز 100 ملغم / مل و تم فية تثبيط نمو كافة انواع البكتريا بأقطار تثبيطية تراوحت بين (13-24.5) ملم , كما ظهر ان للبكتريا القدرة على الالتصاق بالخلايا الطلائية، حيث بلغت نسبة الالتصاق حوالي (60-70)%. وايضاً حددت قيمة MIC وMBC للرائق البكتيري ، حيث بلغت قيمة MIC 25ملغم / مل وقيمة MBC 50 ملغم / مل ، وايضاً تم تحديد قيمة LD_{50} حيث بلغت 1000 ملغم / كغم لذا يعتبر استخدامه اميناً من الناحية الصحية.

Summary

The ability of bacteria *Bifidobacterium spp* to produce the secondary metabolism (antimicrobial activity) were tested and to consider its activity in inhibition the growth of enteric pathogenic bacteria which is represented by (*Shigella dysenteriae, Esherichia coli Enterobacter cloacae, Salmonella typhi , Proteus mirabilis , Klebsiella pneumonia*).

The study revealed that the growth of bacteria was influenced by many factors when producing these compounds such as temperature , O_2 , and pH as well as the cultural media through the process of bacterial counting . The best production of antimicrobial agents was recorded when the count of bacteria were 1×10^9 cell / ml .

The inhibition activity of bacterial cells against tested bacteria were less than cell filtrate supernatant .We also used different compounds from CFS in the contrastive study . The activity increased to reach its maximum at the concentration 100 mg / ml which has the ability to inhibition the growth of all types of bacteria with diameters inhibition zone ranged from (24.5- 13) mm.. The bacteria also has the ability to adhesion . The rate of adhesion was (60-70) % and also the value of MIC and MBC was specified . The amount of MIC was 25 mg / ml and the mount of MBC 50 mg / ml , the LD_{50} was also specified and its percentage was 1000 mg / ml . So the use of this CFS is safe from a hygienic point of view .

المقدمة:

لعبت عصيات حامض الاكتيك دورا مهما فى المجالات العلاجية والغذائية وذلك لامتلاكها العديد من الصفات مثل نموها بوجود او عدم وجود الهواء وعدم انتاجها السموم والغالبية منها غير ممرضة تقاوم الاس الهيدروجين المنخفض و سريعة النمو (1).

بينت العديد من الابحاث والدراسات ان لهذة المركبات فعالية طبية في معالجة العديد من الأصابات المتسببة بفعل الأحياء المجهرية مثل *Escherichia coli ,Kelbsiella, , Proteus , Salmonella, Shigella , Staphylococci Clostridium perfringens, Listeria , Bacilli , Pseudomonads* . (2)

تشكل البكتريا *Bifidobacterium spp* ، 99% من محتوى الامعاء الغليضة وتستوطن بصورة رئيسيه فى بطانة الامعاء والقناة المهبلية . لها القابلية على أنتاج العديد من المركبات الايضية الثانوية التي تستخدم في علاج الإصابات الجرثومية،

والجانب الأكثر أهمية هو أستخدامها لعلاج الاضطرابات المعوية عند الاطفال واضطرابات القولون والإسهال لدى الأطفال والمسافرين ، و ارتفاع الكولسترول ،كما ان لها دوراً في تعزيز الاستجابة المناعية ، والقدرة على تنشيط الخلايا البلعمية ، داخل الجسم الحي (3) .

فضلاً عن ذلك فقد اتصفت بعض أجناس بكتريا حامض اللاكتيك بأنها علاجية ، وذلك لامتلاكها القدرة على الارتباط بمواقع معينة من الأمعاء والتنافس مع البكتريا المرضية على تلك المواقع فضلا عن وإنتاج مواد ذات تأثير مثبط ، كما لها اثر فى تقوية الجهاز المناعي لمقاومة البكتريا المعوية المرضية (4).

تلعب البكتريا دورا فى حماية القناة المعوية (5 , 6) ، او ان تنتج احد الاحياء الدقيقة موادا لها تأثير مضادا تجاه الكائنات الدقيقة الاخرى ، التي تستطيع منع نمو الاحياء الدقيقة المرضية عن طريق انتاج المواد المثبطة لنموالجراثيم مثل حامض اللاكتيك وحامض الخليك وبيروكسيد الهيدروجين H2O2 التي تسبب قتل الجراثيم المرضية ، مما يزيد الفعالية العلاجية ، فمثلا تنتج البكتريا حامض الخليك الفعال ضد البكتيريا السالبة لصبغة كرام ، وتمتلك بعض انواع ميكروبات حامض اللاكتيك المستخدمة في صنع اللبن صفات مثبطة او قاتلة للبكتريا مثل *Staphylococcus aureus* ، *Bacillus subtilis* . (7)

وتهدف الدراسة الى الكشف والتحري عن قابلية البكتريا *Bifidobacterium spp* على انتاج مواد مثبطة لنمو بعض البكتريا المرضية المعوية فضلاً عن تحديد قيمة الجرعة القاتلة للنصفLD50 و التحري عن قابلية البكتريا على الالتصاق بجدران الخلايا الظهارية.

- المواد وطرق العمل :

تم الحصول على عزلات البكتيريا *Bifidobacterium spp* من المختبر و شخصت العزلات البكتيرية اعتمادا على ماورد في (8)- وحفظت العينات لحين الاستخدام(9). تم تنشيط البكتيريا بعد ان لقحت العينات فى وسط Manne Rogosa Sharp السائل والمحضر وفق ما ذكرة (10) بنسبة 1% وحضنت بدرجة 37م لمدة 24 ساعة كررت العملية ثلاث مرات, باستخدام طريقة الصب بالاطباق, وقدرت الفعالية التضادية لعزلات البكتيريا المنماة على وسط MRSالصلب, بعدها تم قياس مناطق التثبيط لبكتيريا الاختبار , استخدم التخفيف ($10^8 \times 1$) خلية / مل للقاح البكتيريا المقارن لانبوبة رقم (5) من محاليل انابيب مكفرلاند (11).

كما قدرت الفعالية التضادية لعزلات البكتيريا المنماة على وسط MRSالسائل بعد ان حضرت رواشح المزارع السائلة للبكتيريا كما هو مذكور فى (9) واجرى الطرد المركزى باتباع طريقة (12) للحصول على المستخلص الخالى من الخلايا Cell Free Culture. استخدمت طريقة الانتشار بالحفر التى وصفها(13) للكشف عن الفعالية التضادية لراشح البكتيريا وذلك بملى كل حفرة ب (100) ماكروليتر من الراشح CFEوحضنت الاطباق بعدها تم قياس اقطار مناطق التثبيط بعد نهاية مدة الحضن لبكتيري الاختبار,وسجلت النتائج.

حللت البيانات احصائيا باستخدام برنامج SPSS-versionواختبرت معنوية الفروق بين المعاملات باستخدام الفرق المعنوى الاصغر(14).

لغرض تحديد قيمة MIC لراشح البكتريا أتبعت طريقة اختبار العكارة Turbidmetric test method التي وردت في(11).

- التحري عن التصاق البكتريا بالخلايا الظهارية

اجري الاختبار حسب طريقة (15) ، اذ تم اخذ عينات ادرار وسطي من اناث سليمات ، نبذ النموذج بسرعة 1000 دورة/ دقيقة ولمدة 5 دقائق، ثم غسل الراسب الحاوي على الخلايا الظهارية بدرائ الفوسفات الملحي المحضر مسبقا ، كررت العملية ثلاث مرات ، ثم علقت الخلايا بـ 5 مل / لترمن الدرائ نفسه، ومن ثم مزج 0.5 مل / لترمن مزروع بكتيري بعمر18 ساعة في المرق المغذي مع 0.5 مل / لتر من عالق الخلايا الظهارية المحضر آنفا ، حضن المزيج بدرجة حرارة 37 م˚ ولمدة 60 دقيقة مع التحريك كل 10 دقائق، ثم اضيف للمزيج حجم مساو من دارئ الفوسفات الملحي ونبذ مركزيا بسرعة 1000 دورة / دقيقة للتخلص من البكتريا غير الملتصقة ،واعيد تعليق الراسب بحجم الدرائ نفسه ، حضرت شرائح زجاجية نظيفة ووضع عليها قطرة من المزيج ونشرت على الشريحة ، تركت لتجف ثم صبغت بصبغة كرام ، وبعدها فحصت الشرائح تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي لملاحظة الالتصاق، ثبت النتائج بحساب 50 خلية ظهارية ثم حساب معدل البكتريا الملتصقة بها .

- دراسة العوامل المؤثرة على انتاج البكتيريوسين

تم اتباع طريقة (16) في احتساب اعداد البكتريا المنتجة (Probiotics) وذلك بتحميض الوسط الزرعي المستخدم لـ pH 3.2,4.5,5.2,6.2 تبعا للزمن 0 - 24 -48 - 72 ساعة، وحضنت في الظروف الهوائية واللاهوائية مع الاهتزاز في درجات حرارية مختلفة تتراوح بين 20-60 c ، ثم تم حساب اعداد البكتريا باستخدام شريحة العد Depth 0.1 mm، لتحديد عدد المستعمرات واختبار فعاليتها التضادية تجاه بكتريا الاختبار.

- تعين الجرعة النصف القاتلة Median lethal dose LD_{50}

لتحديد قيمة LD50 لراشح البكتريا تم اتباع طريقة (17) الورادة في (18) .

- النتائج والمناقشة:

- عزل وتشخيص بكتريا الدراسة اظهرت النتائج بأن بكتريا *Bifidobacterium ssp* المنماة على وسط MRS agar مستعمراتها ذات لون كريمي دائرية الشكل ، بينما تكون على وسط Brain Heart Infusion agar فتكون صغيرة الحجم ، وبينت الدراسة عدم قدرة البكتريا على النمو في وسط اكار الماكونكي ، لذا يعد وسطاً تفريقياً بينها والبكتريا المعوية ، وتشير الدراسات الى ان هذه البكتريا ليس لها القابلية على احداث المرض لدى الانسان والحيوان لعدم احتوائها على اليات الامراضية . (20, 19,).

اظهرت بكتريا حامض اللاكتيك نتيجة سالبة لمعظم الاختبارات الكيموحيوية كما للبكتريا القابلية على انتاج الحامض عند تخمير السكريات الاحادية ايضا تخميرها للسكريات الثنائية والسكريات الثلاثية ، فضلا عن تخميرها لسكر الدكستروز وعدم تخميرها المانيتول (21 , 22) .

كما تم عزل وتشخيص البكتريا المعوية , اعتماداً على الصفات المجهرية من حيث الصبغة وشكل الخلايا البكتيرية ، ودرست الصفات الزرعية على وسط الماكونكي ، بوصفه وسطاً تفريقياً بين البكتريا المعوية المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز ،حيث ظهرت مستعمرات *E.coli* ملساء وشفافة ،دائرية الشكل، ذات لون وردي ،في حين كانت مستعمرات *K. pneumoniae* لزجة ،وردية اللون، كبيرة الحجم، مرتفعة الحافة. وظهرت مستعمرات بكتريا *Ent.cloacae* مركزية وصغيرة الحجم وردية اللون ، اما البكتريا الغيرمخمرة لسكر اللاكتوز مثل (*S.typhi , Shi. dysenteriae*) تكون مستعمراتها باهتة ومصفرة اللون ، في حين لوحظ صعوبة نمو بكتريا *P.mirabilis* على وسط اكارالماكونكي لوجود املاح الصفراء التي تمنع ظاهرة الاكتظاظ . وتباينت البكتريا المعوية في تحللها للدم حيث لوحظت بكتريا *E.coli P. K.pneumonia , mirabilis* حالة للدم من نوع α ، اما البكتريا الاخرى فكانت حالة للدم من نوع β .

- العوامل المؤثرة في انتاج المركبات الايضية: يظهر الجدول (1) التغير الذي حدث لاعداد البكتريا تبعا للاس الهيدروجيني pH ، ولوحظ انخفاض في اعداد البكتريا وبشكل تدريجي بتغير قيمة pH.

أذ كانت اعداد المستعمرات تتروح مابين ($1\times 10^{7-9}$) خلية / مل عند (pH (4.5-5.5 ، هذا يتفق مع ماذكره (23) من كون البكتريا تستطيع تحمل الاس الهيدروجيني المنخفض ويعتقد بان الاس الحامضي يساعد على انتاج وتفعيل المركبات الايضية الثانوية.

كذلك وجد ان افراز المنتجات الايضية يتاثر بدرجة الحرارة ، أذ بينت النتائج ان هناك تغيراً في اعداد المستعمرات تبعا للزمن ، اذ بلغ تعداد البكتريا (1×10^{8}) خلية / مل بعد 48 ساعة من التحضين بدرجة حرارة تتروح مابين(30-37) م .

وبينت الدراسة ان اعداد المستعمرات تزداد فى الاوساط الزرعية السائلة مثل MRS broth وكان معدل تعداد الخلايا يقارب(1×10^{8}) خلية / مل ، ، فالاوساط السائلة تمتاز بفعالية عالية عند التحري على انتاج المركبات الايضية نظرا لاحتوائة على المواد مثل سكر الكلوكوز وخلاصة اللحم والخميرة ، فضلاً عن سكر اللاكتوز الذي له دور في تحفيز النمو وانتاج المضاد الحياتي. ووجد (24) ان النمو على وسط MRS broth الحاوي على مادة Tween 80 تحفز على انتاج بعض المركبات مع زيادة فعالية النمو .

ان للتحضين الاهتزازي دور فى زيادة الكتلة الحيوية والسماح O2 من الانتقال بالوسط ولازالة تأثيرسمية CO2 وتجهيز المزرعة بـ O2 الازم لاكسدة الكلوكوز والحصول على المركبات الايضية ، فضلا عن عدم تكتل والتصاق الخلايا مع بعضها والزيادة في سرعة انقسام الخلايا . كما تمكنها من انتاج كميات عالية من حامض اللاكتيك وبعض المنتجات الاخرى ذات الاثر الفعال والتي يكسبها فعالية تضادية عالية تجاه المسببات المايكروبية .

وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ماتوصل اليه (25 ,26)من كون ان البكتريا يمكنها النمو بمدى حرارى 37-41م واس هيدروجينى يتراوح بين 5,0- 6 تتطلب فى نموها اضافة مجموعة من الاحماض الامينية مثل Leucine,arginine Cysteine,Glutamic acid, اضافة الكاربوهيدرات والفيتامينات (27).

جدول (1) : العوامل المؤثرة في نمو البكتريا المنتجة للمركبات الايضية

العامل المؤثر في انتاج البكتيريوسين	القيمة المؤثرة في أنتاج المركبات الايضية أعتماد على أعداد المستعمرات خلية / مل		
	الاوطى	المثلى	الاعلى
قيمة pH	2.5 – 3.5	4.5-5.5	6.5-7.5
اعداد المستعمرات خلية / مل	-	$1\times10^{7-9}$	1×10^{5}
معدلات الحرارة	20-25Cْ	30-37Cْ	40-60Cْ
اعداد المستعمرات	1×10^{4}	1×10^{8}	1×10^{3}
فترة التحضين	18 – 24 h	24-48 h	72-90 h
اعداد المستعمرات	1×10^{4}	1×10^{9}	1×10^{6}

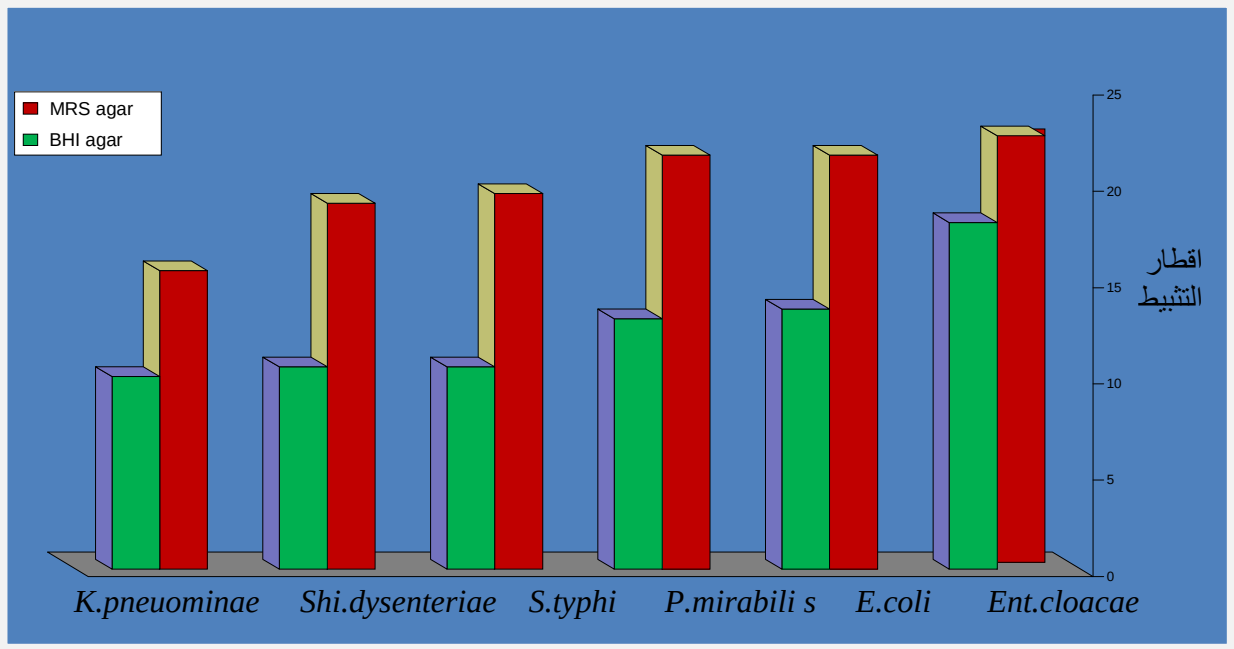
-التحري عن قدرة البكتريا التضادية وانتاج المركبات الايضية

استعملت طريقة اقراص الاكار المقلوبة والتي تعد من الطرائق ذات الكفاءة العالية في التحري عن قدرة البكتريا المحلية في انتاج المضادات ، اذ أظهرت فعالية المنتج على شكل هالة شفافة حول القرص نتيجة تثبيطها بكتريا الاختبار ، وبينت نتائج الدراسة ان 80-90 % من العزلات كانت منتجة للمركبات باقطار تثبيط متباينة. وهذا يتماشى مع (28) من كون بكتريا B.sp لها القدرة على انتاج العديد من المركبات الايضية ذات الاثر الفعال في نمو البكتريا المعوية .

اذ اوضحت نتائج الدراسة ان بكتريا B.sp المنماة على وسط MRS broth تتباين في تثبيط نمو البكتريا المرضية بمستوى احتمالية $P<0.05$ ، كما في شكل(1) ، أذ بلغت معدلات اقطار مناطق التثبيط لاقراص البكتريا في وسط MRS agar (15.5 , 19 , 19.5 , 21.5 , 21.5 , 22.5) ملم في نمو البكتريا المعوية, *E.coli, Ent.cloacae* على التوالي، في حين كانت اقطار مناطق التثبيط للبكتريا *K.pneumoniae, Shi.dysenteriae,S.typhi P.mirabilis,* , المنماة على وسط BHI agar (10 ,10.5, 10.5, 13 ,13.5, 18) ملم على التوالي تجاه المسببات المرضية، ويعزى السبب في ذلك الى ان قابلية بكتريا *B.sp* على انتاج بعض المركبات الفعالة التي لها دور اساسي في منع نمو البكتيريا الاخرى (29) .

فقد اشار (30)الى قدرة البكتريا المتعايشة فى امعاء الانسان والحيوان حماية القناة المعوية من الاصابات الجرثومية . ا ذ انها تمتلك العديد من الاليات التى تستخدمها لمنع الاصابات وتتضمن انتاج العوامل المضادة للجراثيم مثل الاحماض العضوية والبكتيريوسينات و H2O2 اضافة الى منافسة البكتيريا الغازيةعلى موقع الارتباط بالخلايا الطلائية .

، وهذا يتماشى مع ما اورده (31) من ان بكتريا *B.sp* تمتلك فعالية مضادة تجاه بعض الانواع العائدة لعائلة Enterobacteriaceae مثل *E.coli , S.typhi , Shi.spp* ، وقد اعزى الباحث السبب الى انتاج هذه البكتريا للاحماض العضوية مثل حامض الخليك واللاكتيك.

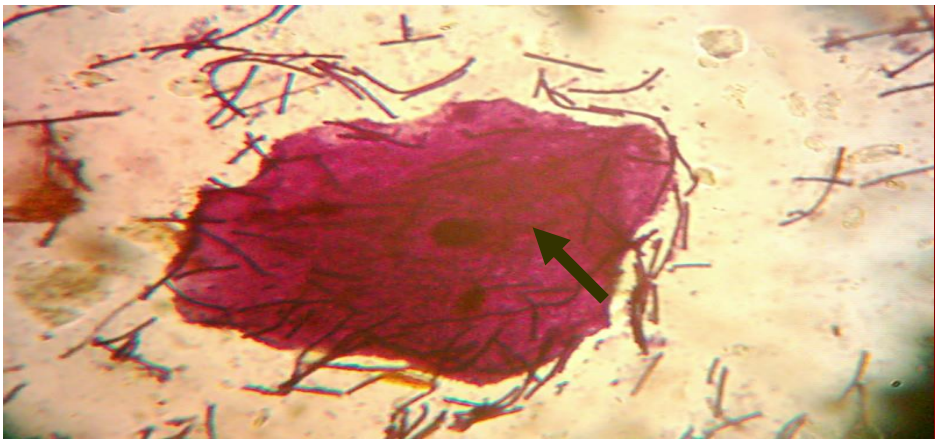


شكل (-1) : معدلات أقطار التثبيط لاقراص بكتريا *B,sp* المنماة على وسط MRS agar وBHI

- **التحري عن عوامل الالتصاق Adhesion**
-

وجد من النتائج ان لبكتريا حامض اللاكتيك القدرة على الالتصاق بسطوح الخلايا الظهارية المبطنة للانسجة المعوية شكل (2) حيث بينت الدراسة ان نسبة الالتصاق بالخلايا الظهارية بلغت 60-70 % ((32). نتيجة لامتلاك البكتريا B,*sp* للخملات التي تمكنها من الالتصاق بسطوح الخلايا الظهارية المبطنة لانسجة الانسان ، ومنع التصاق البكتريا الممرضة بالأغشية الظهارية للجهاز الهضمي والتناسلي، حيث تشترك مع باقي الجراثيم في السيطرة على التوازن الميكروبى للقناة الهضمية ومقاومتها للجراثيم المعوية الممرضة *Salmonella enteritidis ,Cl. perfringens* (33).

تعمل جراثيم B.sp كمعزز حيوى شائع الاستمال نتيجة لتواجدها في الامعاء الغليضة واستعمارها للطبقة الطلائية المبطنة مانعة بذلك البكتيريا غير الغازية بها من الالتصاق ببطانة الامعاء ومتزاحمة مها اخذة المغذيات من الجراثيم غير الصديقة والخمائر كما ان مقاومتها لاملاح الصفراء تجعل منها مستوطن ثابت في بيئة الامعا ء (34.)., كما وتقوم البكتيريا بتعديل الاستجابة المناعية للمضيف من خلال زيـادة S-IgA الذي يمنع ارتباط البكتريا بالانسجة(35).



شكل(2) : التحري عن التصاق بكتريا *LBA* بالخلايا الظهارية للانسان تحت قوة تكبير (100x)

- **دراسة الكفاءة التضادية المقارنة للرائق البكتيري في نمو بكتريا الاختبار**

اجري اختبار الكفاءة التضادية للراشح البكتري في نمو بكتريا الاختبار بطريقة الانتشار بالاكار بوساطة الحفرWells ، حيث ابدت جميعها تحسسا ملحوظا للتركيز 12.5 ملغم / مل ، حيث تراوحت معدلات اقطار التثبيط مابين (8.5-14) ملم ، وازدادت فعالية التثبيط مع زيادة التركيز ، حيث بلغ معدلات اقطار التثبيط عند تركيز 100 ملغم / مل مابين (18 -25) ملم ، جدول (2) . كذلك تتباين البكتريا المعوية في حساسيتها للرائق البكتيري حيث كانت *Ent.cloacae* و *E.coli* اكثر الجراثيم تأثراً مقارنة بالاجناس الاخرى .

وأظهرت نتائج الدراسة فعالية تثبيطية واضحة لرائق المزرعة السائلة ضد عزلات بكتريا الاختبار من خلال تكوين مناطق تثبيط حول الحفر بأقطار اقل من 7.5 ملم ومناطق تثبيط اعلى من 25 ملم ، عموما فان معدلات اقطار التثبيط تزداد تدريجياً بزيادة تركيز الرائق مقارنة بالسيطرة ، وهذا يتفق مع ماذكره ; (36) , من ان رائق البكتريا النامية على وسط MRS broth تكون ذات فعالية تثبيطية واسعة تجاه البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Staph . aureus* , *B.subtilis* والبكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *E.coli, K. pneumoniae* وبمناطق تثبيطية تتراوحت بين (13-19) ملم. وهذا يدل على ان الرائق البكتيري يمتلك فعالية عالية على الالفة والارتباط مع الكائنات الحية ، مما يزيد من الفعالية التضادية تجاه البكتريا (37) .

. جدول (-2) : تأثير تراكيز مختلفة من الرائق البكتيري الحر بطريقة الحفر تجاه بكتريا الدراسة

Bacteria / *Conc.*	*E.coli*	*S.typhi*	*K.pneuomniae*	*Shi.dysenteriae*	*P.mirabilis*	*Ent.cloacae*
3.12	0	0	0	0	0	0
6..25	**8	0	0	0	7.5	12
12.5	14	10	8.5	12	11.5	16
25	20	17	13.5	15	19	20.5
50	22	18.5	16.5	18	21	22.5
100	25	22	18	20	22	24

L.S.D. 0.05 = 0.668

* توجد فروق معنوية

** معدل لثلاث مكررات

- **تحديد قيمة التركيز المثبط الادنىMIC للبكتريا:**

-

اوضحت النتائج ان قيمة MIC بلغت 25 ملغم / مل له القدرة على تثبيط نمو البكتريا في حين ان قيمة MBC 50ملغم / مل ،جدول (-3) ويعود السبب في ذلك الى زيادة تراكيز المركبات الايضية الفعالة في الرائق البكتيري ممايؤدي الى تثبيط البكتريا بشكل كامل. وهذا يتفق مع ماوجده (38).

جدول (3) : قيمة MIC وMBC لتراكيز الرائق لبكتريا *LBA* تجاه نمو بكتريا الاختبار

3.125	6.25	12.5	25	50	100	CONC. / BACTERIA .
+	+	+	-	-	-	*S.typhi*
+	+	-	-	-	-	*Ecoli.*
+	+	-	-	-	-	*Ent. cloacae*
+	+	+	-	-	-	*S.dysenteriae*
+	+	+	-	-	-	*P .mirabilis*
+	+	+	-	-	-	*K.pneumoniae*

- حساب الجرعة النصف قاتلة LD_{50}: تم حساب الجرعة النصف قاتلة للرائق بكتريا *B.sp* من خلال اعطاء الجرعة الاولية (100-1000) ملغم / كغم حيث ظهرت الاعراض على الحيوان بعد مرور 24 ساعة من الحقن ، والمتمثلة بالخمول وفقدان الشهية مع بطئ في الحركة ، وعند زيادة الجرع المعطاة ظهرت الهلاكات ابتداءً من الجرعة (1000) ملغم / كغم لتصل اقصاها عند الجرعة (4000) ملغم / كغم التي ادت الى هلاك جميع الحيوانات بنسبة 100 % بعد 24مرور ساعة من الحقن ومن النتائج التي تم الحصول عليها انLD50 للرائق البكتيري بلغت .1666 ملغم / كغم من وزن الجسم جدول (4) ، ومن خلال الدراسة تبين انه لاتوجد اثار جانبية خطرة على صحة الانسان عند استخدامه لاغراض العلاجية مالم يؤخذ بجرعات عالية

جدول (4) : تجريع الجرعة النصف القاتلة LD50 للرائق البكتيري

رقم المجموعة	الجرعة/MG	فرق الجرع	الهلاكات	المعدل	الناتج
1	1000	0	0	0	-
2	1500	500	0	0	-
3	2000	500	1	0.5	250
4	2500	500	2	1.5	750
5	3000	500	3	2.5	1250
6	3500	500	4	3.5	2000
7	4000	500	5	4.5	2750
المجموع					7000

$$\text{الجرعة النصف القاتلة} = \text{اقل جرعة ظاهرية قاتلة} - \frac{\text{مجموع الناتج}}{\text{عدد الحيوانات بالمجموعة الواحدة}}$$

$LD50 = 4000 - 2333.33$ $LD50 = 1666.66$ ملغم / كغم من وزن الجسم

ذكر الباحث (3) ان العديد من الاطباء يوصى باستخدام جراثيم Bifido.sp كمعزز حيوى على شكل اقراص او مستحضرات مجفدة او كبسولات حاوية 10^8 خلية حية لتحسين صحة الاطفال الراقدين فى المستشفيات بتجهيزهم بالمعزز الحيوى وذلك لتقليل الاصابة البكتيرية والفيروسية.

References…

1- Poupard, J.A., Husain, I., Norris, R.F.; June 1972 Biology of Bifidobacteria. Bacteriological Review, Vol. 37, No. 2, p. 136- 165.

2- Furrie, E.; Macfarlane, S. ; Kennedy, A.; Cummings, J. H. ; Walsh, S. V. ; Oneil, D. A. and Macfarlane. G. T. (2005). Synbiotic therapy initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomized controlled pilot trial. Gut., 54:242-249.

3- Baron, J.M.; Schepper, L.D.; Domingue, G.; Everett, B.; Hughes, H.; William, H.; Mattman, L.;.; Trenev, N. and Wunderlich, K.R. (2006). Friendly *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*. The Arthritis Trust of America. , pp.2-8.

4- 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.

5- Drisko, J. A.; Giles, C. K. and Bischoff, B.J.(2003). Probiotics in health maintenance and disease prevention . Alternative Medicin Review,pp .143-151.

6- Jawetz, E. and Levinson, W. (2002). Examination and broad review of medical microbiology and immunology . 7th –ed .London. Lange Medical Book. McGraw- Hill comp.,pp.115-130.

7- Coconnier, M. H.; Lievin,L.V. and Servin, A. L.(2005).A *Lactobacillus acidophilus* strain of human Gastrointestinal microbiota origin elicits Killing of entero irulent *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* by triggering lethal bacterial membrane damage. Applied and Environmental. Microbiology. pp.6115-6118.

8- Holt, J.G.; Krieg, N .R.; Sneath, P .H. A.; Staley, J. T. and Williams, S.T .(editors) .(1994). In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. The Williams and Wikins Co., Baltimore, USA.

9- Onderdonk , A.; Lee , M.; Lieberman , E.; Delaney , M. and Tuomala , R.(2003).Journal of clinical Microbiology. Vol 41(3):1073-1079.

10- Rasic JL: (1983) The Role of Dairy Foods Containing Bifido and Acidophilus in nutrition and Health? N European Dairy J 4:1-10.

11- Collee, J.G.;Fraser , A. G.; Marminon, R,.P.and Simmon , A.(1996) Mackie and Mecarteny .Paractical medical microbiology . 14th – ed . Churchill Livingstone .New York.

12- Saxena, A. P.; Farmer , S.; Hanco, R. and Towers, G.(1995). Antimicrobial compounds from Alnus vubra. Int. J. of Pharmacognosy,pp. 33-36.

13- Percival , M. (1997). Choosing a probiotic supplement. Clin Nutr Insights , 6:1-4.

14. Al. Rawii (1980). Introduction of statics , Mosul university publishing PP:92- 105.

15- Lomberg, H.; Cedergren , B.; Leffer,H.; Nelsson, B.; Carlstrom, A. and Eden, C.(1986). Influence of blood group on the availabl ability of receptors for attachment of uropathogenic *Escrrichia coli*. Infect. Immun.,51(3):9190-9206.

16- Chr. Hansen's Laboratorium, Copenhagen, Denmark. . (1979). Gut Ecology and Health Implications. Nat Dairy Council Digest 50(3):13-17

17- Behrens, S. and Karber, J.(1953). Determination of LD_{50} . Arch. Sur.Exp.Path. Und. Pharm., 2:177-372.

18- Al-Ammar, M.H.(2001). The effect of Proplolis extract on same Pathogenic bacteria .M.S. thesis .University – Kufa .

19- Kayser, F. H .; Bienz, K. A.; Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2005). Medical Microbiology.5th ed. Thieme Stuttgart. New York, pp.274- 295.

20- Toba, T.; Samant, S. and Itoh, T.(1991). Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. Lett Appl Microbiol,13: 102-1047.

21-Anand RK, *et. al*.: (1984). Antibacterial Activity Associated with *Bifidobacterium Bifidus*. J. Cultured Dairy Prod Nov:608.

22-Kumar, R. (2007). Diagnostic microbiology5th ed. Jaypee Brothers.Kolkata- 700 004 . pp.87-126.

23- Ross, R.P.; Hill, C.; McAuliffe, O.; Ryan, M.(2001). Control of cheese microflora using bacteriocins . J. Dairy Products Research, 38:4542-4546.

24- Killic , A.O.; Pavlova , S.I. and Tao, L.M.(1996). Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phages isolated from yogurt. Appl Environ Microbiol., 62: 2111-2116.

25- Savadogo, A.; Ouattara, C. A. T.; Bassole, I. H .N.and Traore, A. S. (2004). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition, 3 (3): 174-179

26- Johnson, K. C.; Hagen, K. E.; Gordonpour, M.; Tompkins, T. A.; Sherman, P. M. (2007). Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. Cell. Microbiol., 9(2): 356-367.

27- Hansen R(1985). (1985).: Bifidobacteria Have Come to Stay. N. European Diary J 3:8

28- Kollef , M.; Joly- Guillou , M.L. and Farinotti , R. (2000). Invivo efficacies of combinations of β- lactamas , β- lactamas inhibitiors and rifambin against *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother,43: 1406-1411.

29- Alejdra ,V.; Jakbsson , T.; Ahrne , S. and Urban F.(2002).Vaginal normal flora of healthy swedish women . Clinical Journal of Microbiology, 40(8):2746-2749.

30- Babel FJ (1977) and Shahani KM (1980): Nutritional and Healthful Aspects of Cultured Dairy Foods.

31- Gilliland, S. E.(2002). Lactobacillus acidophilus as Probiotic to Control Salmonella in Swine . Porksafety.

32- Boekhorst, J.; Helmer, Q.; Kleerebezem, M. and Siezen, R. J. (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria.

33- Egorove, N. S.(1985). Antibiotics scientific approach. Mirpublishers. Moscow.

34- El-Sanoui , S.M.; El- Sarag , M.S. and Mohamed , S.E.(1987). Properties of gram negative bacteria isolated from disease hony bee apis larvae. J of General Miceobio., 133:215-220.

35- Collado, M. C.;Grzeskowiak, L.; Salminen, S.; (2007). Probiotic strains and their combination inhibit *in vitro* adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. Curr. Microbiol.,55(3):260-265.

36- Janeway, C. A. and Medzhitov. R. (2002). Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol., 20:197-216.

37- Moreno , L . A.;C. Matar, E. Farnworth, and Perdigón , G. (2006). Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. Cytokine, 34:1-8.

38- Taylor, G.R. and Williams, C. M. (1998). Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. Brit. J. Nutr., 80: 225-230.