Effect of some chemicals and antibiotics on activity of lyophilized lactic acid bacteria

تأثير بعض المواد الكيميائية والمضادات الحياتية على حيوية بكتريا حامض اللاكتيك المجفدة

م.د.كمال مظلوم فليح الخفاجي
قسم علوم الحياة - كلية العلوم- جامعة كربلاء

الخلاصة

تضمن البحث دراسة تأثير بعض المواد الكيميائية والمضادات الحياتية على البكتريا المحفوظة بالتجفيد. حيث أضيفت تراكيز مختلفة من ملح الطعام والمضادات الحياتية إلى بكتريا حامض اللاكتيك المنماة بوسط أكار الحليب وقد وجد إن بكتريا ***Streptococcus lactis*** المجفدة أكثر مقاومة من أنواع البكتريا الأخرى بينما أكثر الأنواع حساسية هي بكتريا ***Streptococcus thermophilus*** وبقية أنواع البكتريا تقع بينهما بالنسبة للتراكيز المختلفة من **NaCl** 3 و4 و5% على التوالي وكذلك لازرق المثيلين 0.01 و 0.05 و 0.1%. أما المضادات الحياتية أيضا كانت متشابهة مع تأثير ملح الطعام وازرق المثيلين(**Methylen blue**) من حيث تأثيرها على نمر البكتريا .إذ أن أكثر الأنواع مقاومة هي ***Streptococcus lactis*** وأكثرها حساسية ***Streptococcus thernmophilus*** وكذلك وجد أن البكتريا الكروية مقاومتها للبنسلين والتتراسايكلين أعلى من البكتريا العصوية.

Abstract

This research was aimed to study the effect of 3 ,4 and 5% concentration of sodium chloride and 0.01 , 0.05 and 0.1% of methylene blue on freeze _dried lactic acid bacteria that grown in milk agar media .

Results been found that *Streptococcus lactis* was more resistance than other sort in opposite to *Streptococcus thermophilus* which showed more sensitivity to different concentrations that used of both chemicals . Otherwise ,*Streptococcus thermophilus* was more sensitive to different concentration of penicillin and tetracycline in compare with others .Coccus bacteria resisted these antibiotics more than Bacillus bacteria.

المقدمـــة

استخدمت الأحياء المجهرية وبالخصوص بكتريا حامض اللاكتيك في كثير من الصناعات الغذائية (الألبان والمعجنات واللحوم والخضروات) أما لإعطاء نكهات أو للحصول على منتجات جديدة كالا جبان والألبان المختمرة المعتمدة على تطور الحموضة وإنتاج مركبات النكهة وتتوقف جودة البادئات على حيوية ونشاط محتوياتها من الأحياء ومن هنا بدا الاهتمام بطرق حفظها بالتجميد والتجفيد وإضافة بعض المواد الحافظة ولوحظ إن التجميد والتجفيد يسببان زيادة في حساسية الخلايا لعوامل الشد السطحي وبعض المواد الكيميائية والمضادات الحياتية(4) .إذ استنتج (1) إن حفظ البكتريا بطريقة التجفيد تؤدي إلى تغيير في سطح الخلايا مما تؤدي إلى زيادة النفاذية للغشاء الخلوي لبعض المثبطات إذ تتأثر الطبقة الدهنية المتعددة السكريات (**Lipopolysaccharide**) التي تحمي طبقة الببيتيدوكلايكان (**Peptidoglycan**) في الجدار الخلوي ضد الفعل المحلل لإنزيم لايسوزايم (**Lysozyme**) وضد عوامل الشد السطحي وزيادة الحساسية لملح الطعام .

أشار (2) إلى أن عديد السكريد الشحمي في البكتريا هو الذي يحمي طبقة الببتيدوكلايكان للجدار الخلوي ضد الفعل المحلل لأنزيم اللايسوزايم وطبقة البروتين الدهنية للغشاء الخلوي ضد فعل عوامل الشد السطحي .وذكر (3) أن الغشاء الخلوي يمثل حاجز المقاومة للمضادات الحياتية وهذا متعلق بطبقة عديد السكريد الشحمي والى مركب الفوسفاتدل الكليسيرول (4) , كما وجد (5) علاقة بين الفوسفوليبيدات والأحماض الدهنية في جدار الخلايا ومقاومتها للمضادات الحياتية .وقد أجريت هذه الدراسة بهدف دراسة حساسية بكتريا حامض اللاكتيك لبعض المواد الكيمياوية والمضادات الحياتية .

المواد وطرائق العمل

استخدم في هذه الدراسة جراثيم حامض اللاكتيك *Streptococcus lactis* و *Streptococcus thermophilus* و *Streptococcus diacetilactis* و *Leuconostoc dextranicum* و *Lactobacillus bulgaricus* من شركة Hansen ونشطت في حليب فرز ثم في وسط غذائي سائل معقم وجمدت المزارع على شكل طبقة رقيقة على - 20 درجة مئوية لمدة نصف ساعة وجفدت على –55 درجة مئوي .بجهاز التجفيد Virtis والمنتج من قبل الشركة المصنعه U.S.A . 12525,Y, N gardinar Company Virtis The وقفلت الأنابيب تحت التفريغ . ودرست الحساسية للمواد الكيميائية حسب الطريقة المقترحة من قبل (6).

وتم استخدام تراكيز من ملح الطعام بمقدار 3 و 4 و 5 % وازرق المثيلين 0.01 و 0.05 و 0.1 % .

ومزجت الخلايا بعد إذابتها والخلايا غير المحفوظة مع محاليل المواد الكيميائية وبنسبة 1:1 وحضنت على درجة 30 مئوية ولمدة 30 دقيقة مع ترك نموذج المقارنة بدون إضافة المواد المذكورة . ثم حسبت أعداد الخلايا البكتيرية لجميع المعاملات بطريقة الأطياف الضوئية باستخدام الآكار المغذي وآكار الحليب والتحضين على درجة 37 مئوي لمدة 18 ساعة ثم قدرت النسب المئوية لحساسية المواد المذكورة وذلك بحساب الفرق في أعداد الخلايا البكتيرية المجمدة وغير المجمدة قبل وبعد المعاملة .

و استخدم اختبار انتشار المضاد الحياتي بطريقة الأقراص (7) وكما موضحة في طريقة (8) وذلك بوضع القرص المتشرب بمضاد الحياة على سطح أكار الحليب الملقح مسبقا بالبكتريا وتظهر منطقة شفافة حول القرص بعد التحضين وكلما زادت هذه المنطقة حول القرص دل على إن البكتريا أكثر حساسية .والمضادات الحياتية المستخدمة في البحث هي البنسلين والتتراسايكلين وبتراكيز 0.01 و 0.5 % إذ أذيبت الخلايا ولقحت في أطباق بتري باستخدام طريقة **Spreader** وتركت لمدة خمس دقائق وثبت القرص المشرب بمضاد الحياة بملقط معقم وحضنت عند 30 درجة مئوية لمدة 18 ساعة وقيس قطر المنطقة الشفافة .

النتائج والمناقشة

من جدول 1 يتبين إن بكتريا ***Streptococcus lactis*** تظهر اقل حساسية من بقية أنواع بكتريا حامض اللاكتيك المستخدمة والتراكيز 3,4 و5% من ملح الطعام . بينما كانت بكتريا ***Streptococcus thermophilus*** أعلى حساسية مقارنة بالأنواع الأخرى وبصورة خاصة نجد إن البكتريا الكروية حساسيتها لملح الطعام اقل من البكتريا العصوية ولكافة التراكيز المستخدمة لذلك نجد بان التجفيد أدى إلى زيادة في حساسية الخلايا لعوامل الشد السطحي والمضادات الحياتية وعلل (2) إن زيادة حساسية بكتريا ***Staphylococcus aureus*** لملح الطعام يدل على حدوث تحطم للغشاء السايتوبلازمي وان نتائج (9) أوضحت زيادة ملحوظة في حساسية بكتريا ***Staphylococcus aureus*** لملح الطعام وهذا ما أكده (10) حول زيادة حساسية ***Lactobacillus bulgaricus*** *المجفدة لملح الطعام بتركيز 8% .*

جدول _1_ تأثير التجفيد (التجميد بالتجفيف)على حساسية بكتريا حامض اللاكتيك.

نوع البكتريا	تراكيز المادة الكيميائية % Nacl	خلايا غير مجفدة		خلايا مجفدة	
		العدد الكلي للخلايا خلية 10^6/سم^3	% الحساسية	العدد الكلي للخلايا / سم^3	% الحساسية
Str.lactis	3	95	5	40	36.2
	4	92	8	12	81.1
	5	45	55	Zero	100
Str.thermophilus	3	100	Zero	15	83.1
	4	91	9	4	96
	5	82	18	Zero	100
Str.diacetilactis	3	100	Zero	36	58.2
	4	94	6	9	90.3
	5	100	30	Zero	100
Leucomostoc dextranicum	3	86	14	10	88.2
	4	81	19	Zero	100
	5	41	57	zero	100
Lactobacillus bulgoricus	3	97	3	7	92
	4	94	6	Zero	100
	5	87	14	zero	100

من جدول 2 يتبين إن بكتريا ***Str.lactis*** أيضا اقل أنواع بكتريا حامض اللاكتيك حساسية للتراكيز المستخدمة من ازرق المثيلين بينما كانت بكتريا ***Str.thermophilus*** أكثر أو أعلى الأنواع حساسية وهذا مشابه لتأثير ملح الطعام على البكتريا وتتفق هذه النتائج مع ما وجده (11) حول ثبات بكتريا حامض اللاكتيك ***Lactobacillus acidophilus*** المحفوظة بالتجميد للمواد الكيميائية وعزي ذلك إلى تحطم الغشاء الخلوي نتيجة لتأثير التجميد.

جدول _2_ تأثير التجفيد (التجميد والتجفيف)على حساسية بكتريا حامض اللاكتيك الأزرق المثيلين.

نوع البكتريا	تراكيز المادة الكيميائية Nacl %	خلايا غير مجفدة		خلايا مجفدة	
		العدد الكلي للخلايا /سم^3 بعد المعاملة	% الحساسية	العدد الكلي للخلايا / سم^3 بعد المعاملة	% الحساسية
Str.lactis	0.01	100	Zero	24	72
	0.05	91	9	8	91
	0.1	78	22	3	96.5
Str.thermophilus	0.01	82	13	40	47.6
	0.05	79	18	20	72
	0.01	63	35.1	8	91
Str.diacetilactis	0.01	100	Zero	21	70
	0.05	89	11	7	88
	0.1	74	14	5	94
Leucomostoc	0.01	84	9.6	36	51

76 *94*	*18* *6*	*16.4* *33*	*81* *65*	*0.05* *0.1*	*dextranicum*
62 *81* *95*	*34* *16* *5*	*2* *9.6* *26*	*98* *90* *74*	*0.01* *0.05* *0.1*	*Lactobacillus bulgoricus*

إن بكتريا **Str.lactis** اقل أنواع بكتريا حامض اللاكتيك حساسية للمضادات الحياتية (البنسيلين والتتراسايكلين) بينما كانت بكتريا **Str.thermophilus** أكثر الأنواع حساسية كذلك نجد أن البكتريا الكروية **Streptococcus** بصورة عامة أكثر مقاومة للمضادات الحياتية المستخدمة من البكتريا العصوية **Lactobacillus** وعزي ذلك إلى ان حفظ البكتريا بطريقة التجفيد أدت إلى تغيير في سطح الخلايا مما يؤدي إلى نفاذية غير سامة وبالتالي زيادة النفاذية لبعض المثبطات والمضادات الحياتية (جدول *3*).

جدول *3*: تأثير التجفيد على حساسية بكتريا حامض اللاكتيك لبعض المضادات الحياتية.

نوع البكتريا	*مضادات الحياة*		*قطر المنطقة الخالية من النمو(ملم)*	
	المضاد	*التركيز %*	*خلايا غير مجفدة*	*خلايا مجفدة*
Str.lactis	*البنسلين*	*0.5*	*0.1*	*1.5*
		0.1	*0.4*	*0.1*
	التتراسايكلين	*0.5*	*Zero*	*0.2*
		0.1	*0.1*	*1.2*
Str.thermophilus	*البنسلين*	*0.5*	*0.5*	*1.9*
		0.1	*0.2*	*1.6*
	التتراسايكلين	*0.5*	*Zero*	*0.4*
		0.1	*0.2*	*1.8*
Str.diacetilactis	*البنسلين*	*0.5*	*0.2*	*1.6*
		0.1	*0.3*	*1.3*
	التتراسايكلين	*0.5*	*Zero*	*1.1*
		0.1	*0.2*	*1.6*
Leuconostoc dextranicum	*البنسلين*	*0.5*	*0.5*	*1.5*
		0.1	*0.2*	*1.0*
	التتراسايكلين	*0.5*	*1.4*	*2.0*
		0.1	*1.1*	*1.6*
Lactobacillus bulgaricus	*البنسلين*	*0.5*	*Zero*	*1.2*
		0.1	*0.3*	*1.6*
	التتراسايكلين	*0.5*	*0.5*	*1.3*
		0.1	*1.2*	*2*

المصـــادر

1-Ray,B and Speek ,M.L.(1972).Metabolic process during therepair of freeze injury in *E.coli* Applide Microbiology vol.24 (585 - 590).

2-Lee, S.K., Calcott .P.H.,and Macleod ; R.A,. (1977). Relationship of cytochrom content to the sensitivity of bacteria to NaCl on freezing and thawing .Canadian .J. Microbiol. ,23 :413 - 419.

3-Koplow ,J. and Goldfine ,H.(1974).Alteration in the outer membrane of the cell envelops of heptose deficient mutants of *E.coli* .J.Bacteriol . 117:527_543.

4-Boman ,H.G.; Nordstrom , K. & Normark. S.(1974).Penicilline resistance in *E.coli* V.12.Annal New York Academy of Science.

5-Oleary ,W.M.(1977).Studies of the utilization of C14 labeled Lactodecanoic acid by Lactobacillus arabinosa .J. of bacteriol .77 :367- 373.

6-Brennan ,M , Waismail ,B., Johnson , M.C. & Ray , B .(1986). Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*.J. food prot. 7 :49-53.

7-Kirby-Baur.1993.Disk-diffusion test:Masuring Antimicrobial Effectiveness with Zones of Inhibition .www.Sciencebuddies,org/htpp/MicroBio po14 shtml.

8-Prescott , L.M., Harky , J.P. and Klein, D.N . (1993) . Microbiology & E.D W U, C.Brown., Communication . Inc.England 1, :168 - 179.

9-Petterson ,T.E. & Jackson , H.(1979). Less of viability and metabolic injury of *Staph.aureus* Resulting from storage of 1,3,5,7Ċ .J.Applied Bacteriology .42:129.

10-Castro ,H.P.P.M.; Teixeira and R.Kiby .(1977).Evidence of membrane damage in Lactobacillus bulgaricus following freeze -drying .Journal of applied microbiology .82:87- 94.

11- Foshino,R.,Fiori,E.Galli.A.(1996).Survival and residual activeity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures underdifferent conditions.J. Dairy Res.63(2):295-303.