دراسة تأثير الحليب الاسيدوفيلي على العائلة المعوية Enterobacteriaceae في النبيت الطبيعي للفئران البيضاء

اسامة ناظم نجرس

قسم علوم الحياة ، كلية التربية سامراء ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٣١ / ٥ / ٢٠٠٩ ، تاريخ القبول: ٢٥ / ١٠ / ٢٠٠٩)

الملخص

تم الحصول على ٢٥ عزلة من بكتريا حامض اللاكتيك نوع (LA) *Lactobacillus acidophilus* بواقع (١٦ عزلة) من المخللات و(٢عزلة) من الالبان و(٧عزلات) من امعاء الفئران بعد تشخيصها بأستخدام الإختبارات الشكلية والمزرعية والكيموحيوية.

تم إختبار قدرة هذه العزلات على إنتاج البكتريوسينات وتبين بأن ٣ عزلات كانت منتجة وذلك باستخدام طريقة الإنتشار بالحفر' وان الاس الهيدروجيني الافضل للنمو وانتاج البكتريوسين للعزلة المختارة كان بين (٥ –٦) وان اعلى ثبوتية للبكتريوسين كان عند الاس الهيدروجيني (٥). كان تأثير البكتريوسين التثبيطي المنتج من *Lactobacillus acidophilus* أكبر على نمو *Staphylococcus aureus* و *Lactobacillus plantarum* مقارنة بتأثيره على *Escherichia coli*.

اثبتت هذه الدراسة للحليب الاسيدوفيلي تأثيرا واضحا في خفض اعداد الانواع البكتيرية العائدة للعائلة المعويةعند استخدامها مع مجاميع الفئران البيضاء.

كانت *Lactobacillus acidophilus* المعزولة من امعاء الفئران اكثر تأثيرا في خفض اعداد Enterobacteriaceae من تلك المعزولة من المخللات حيث انخفض من (٤,٩ cfu/ml) الى (٣cfu/ml). فيما كان للحليب الاسيدوفيلي تأثير ايجابيا في زيادة اعداد بكتريا *Lactobacillus acidophilus* في القناة الهضمية للفئران حيث زاد من (٣cfu/ml) الى (٤,٦cfu/ml). ولم يكن للحليب الاسيدوفيلي المعقم تأثيرا معنويا في زيادة اعداد *Lactobacillus acidophilus*..

المقدمة

لقد ادى استخدام المضادات الحيوية والتي تؤخذ عن طريق الفم لعلاج اصابات المسالك البولية وغيرها من الاصابات البكتيرية الى تغيير في التوزيع الطبيعي للنبيت المعوي الطبيعي enteric normal flora وذلك لان جزء من المضادات الحيوية التي تمتص عبر القناة الهضمية سوف تؤثر ضمناً على البكتريا المكونة للنبيت الطبيعي وبالتالي سوف تظهر انواع مقاومة لها والتي تنمو بكثافة على حساب الانواع الحساسة لتلك المضادات الحيوية، وهذا يعني توزيع جديد للانواع البكتيرية في القناة الهضمية وهنا قد تسود الانواع البكتيرية الضارة مثل العائلة المعوية Enterobacteriaceae وجنس Clostridium و الخمائر وهذه تؤدي الى ظهور امراض جديدة على حساب الانواع المفيدة مثل بكتريا حامض اللاكتيك Lactobacillus. (Charlotta and Carl,2000).

وتعد العائلة المعوية Enterobacteriaceae من اهم النواع البكتيرية التي تستوطن القناة الهضمية للانسان والحيوانات. وتتضمن هذه العائلة عدداً من الاجناس هي (*Shigella* ، *Escherichia* ، *Proteus* ، *Serratia* ، *Klebsiella* ، *Enterobacter* ، *Salmonella*) واجناساً أخرى (Jawetz *et al.*, 1998).

كما تتواجد افراد العائلة المعوية على النباتات والتربة والماء وفي أمعاء الانسان والحيوانات وتسبب عدد من الاصابات للأنسان والتي تتضمن الخراجات Abscesses وذات الرئة Pneumonia والتهاب السحايا Meningitis وانتان الدم Septicemia والتهاب الامعاء Intestinal Infection والتهاب المجاري البولية Urinary Tract Infection وإخماج الجروح Wound Infections (Lennette et al., 1985 ; Henry, 2001).

استخدمت بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria (LAB) في الأغذية بوصفها بادئات تخمير (Ross et al., 2002). وفي نهاية هذا القرن بدأت دراسة آلية التصنيع فضلاً عن دراسة تاثير الحفظ ببكتريا حامض اللاكتيك وهي المسؤولة عن التخمير والفعالية الحيوية للحفظ في معظم عمليات تصنيع الأغذية البشرية والحيوانية التي اشارت الدراسات إليها بصدد إطالة عمر حفظ الأغذية وحمايتها باستخدام الأحياء المجهرية المكونة للنبيت الطبيعي (Normal Micro flora) ، إذ توجد بكتريا حامض اللاكتيك في انواع عديدة من الأغذية ويظهر الحامض فيها بشكل طبيعي في مختلف منتجات الأغذية مثل الألبان ومنتجات اللحوم والخضروات (Carr *et al.*,2002). وتنتج بكتريا حامض اللاكتيك مواداً ممكن ان تستعمل لحفظ الاغذية، وذلك من خلال خفض الحموضة عن طريق إنتاج هذه المركبات فضلاً عن دور البكتريا نفسها، إذ أن مختلف هذه المركبات مضادة لنمو الأحياء المجهرية (Lindgren and Dobrogoz, 1990).

وقد اشار ميتشنكوف إلى أهمية إضافة بعض الأحياء المجهرية للأغذية لجعلها صحية، وإفترض أن إستهلاك منتجات لبنية متخمرة حاوية على بكتريا حامض اللاكتيك قادرة على الأستقرار في القناة الهضمية وباستطاعتها أن تحل بديلاً عن بعض الانواع الضارة من البكتريا المعوية غير المرغوب فيها في الأمعاء (Gilliland, 1989)، كما وجد (Mark, P.,1997) ان بكتريا *Lactobacillus acidophilus* من افضل الانواع التي تستطيع ان تعيش وتنموا بوجود المادة الصفراء وحموضة المعدة وتستطيع الالتصاق بالاغشية المخاطية ، كما اشار (Quan Shu,1999) الى ان ليس هنالك اي تأثيرات ضارة للـ Probiotic bacteria على

الفئران خصوصا بكتريا *Lactobacillus acidophilus* حتى اذا جرعت بشكل مباشر.

و بكتريا حامض اللاكتيك العصوية تسمى بعصيات الحليب وهي عصيات كبيرة يترواح طولها بين ١–٥ مايكروميتر وسمكها مايكروميتر واحد، وغير ملونة، ذات متطلبات غذائية معقدة لذلك تنمى على الأوساط الغذائية الخاصة مثل De Man Rogosa Sharp broth (MRS) ، وتحصل على الطاقة بوساطة الأفعال الأيضية التخميرية إذ أنها تفتقد إلى إنزيمات Cytochrome المؤكسدة، وهي غير مختزلة للنتريت وغير مسيلة الجلاتين وغير منتجة لإنزيم الكاتاليز ودرجة الحرارة المثلى لنموها تترواح مابين ٣٠–٤٠°م (Robbinson, R.K. 1990). إن بكتريا حامض اللاكتيك واسعة الإنتشار في الطبيعة خاصة في الحيوانات والخضروات ومنتجاتها توجد في القناة الهضمية للطيور والحيوانات اللبونة وقلما تكون ممرضة. وتعد هذه البكتريا ذات اهمية طبية كبيرة لكونها تشكل نسبة مهمة من الأحياء المجهرية الطبيعية للإنسان وتكثر في براز الاطفال في الأيام الأولى من الولادة حيث تستعمر الأمعاء ووجودها يقي الطفل من حالات الأسهال. ويزداد عددها عند تناول الأغذية الحاوية على كميات عالية من السكريات ومن أهم أنواعها *Lactobacillus acidophilus*. تكون هذه العصيات على شكل سلاسل قصيرة ذات شكل مغزلي Club-shaped منتفخة أو بيضوية وغير منتظمة أو حبيبية وخاصة في المزارع القديمة ومنتفخة في المزارع الحديثة وغير متحركة وموجبة لصبغة كرام وغير مكونة للسبورات ويعد وسط MRS أفضل الأوساط لنمو هذه البكتريا وتكون مستعمرات هذه البكتريا بعد التحضين مدة ٤٨ ساعة صغيرة إذ يبلغ قطرها ٠,٥ ملم وتكون حافاتها غير منتظمة وتنمو بشكل جيد في الأس الهيدروجيني ٥,٨ و تعيش وتنقسم ببطء في ٣ و ٤، وتستخدم صفة محبتها للحموضة لتحضير أوساط زرعية إنتخابية لعزلها من اللعاب والبراز ومن النماذج التي تحوي على مزيج من هذه البكتريا ومن هذه الأوساط الزرعية الحامضية وسط tomato juice agar ذو الأس الهيدروجيني pH ٥ . وتحتاج هذه العصيات إلى متطلبات غذائية معينة وخاصة الأحماض الأمينية والفيتامينات (الجبوري ، Robbinson, R.K. 1990:1990).

طرائق العمل:

استخدمت نماذج من الالبان والمخللات و معي الفئران (المعدة والامعاء الدقيقة) في عزل بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ،وضعت هذه النماذج في انابيب إختبار حاوية على الوسط الغذائي MRS السائل (De Man Rogosa Sharp broth) والمعقم، ثم وضعت الأنابيب في الثلاجة لحين نقلها إلى المختبر.

تم الحصول على نماذج بكترية اخضعت لأختبار فحص انتاج البكتريوسين وهم: *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Lactobacillus plantarum*.

الأوساط الغذائية المستخدمة:

الوسط الغذائي MRS السائل (De Man Rogosa Sharp broth)

حضر حسب ما جاء في Speck (1984) وأستخدم في تنشيط وتنمية بكتريا حامض اللاكتيك.

حضر الوسط الصلب منه بإضافة ١,٥% من الآكار إلى وسط الذي أستخدم لعمليات النشر وتنقية المستعمرات النامية.

الوسط الغذائي MRS المتصلب و الحاوي على ٠,٠٢% ازيد الصوديوم Sodium azide

حضر هذا الوسط بإضافة ٠,٠٢% أزيد الصوديوم إلى الوسط الغذائي MRS المتصلب وذلك لمنع نمو البكتيريا السالبة لصبغة كرام.

الوسط الغذائي $MRS\text{-}CaCO_3$ المتصلب

حضر الوسط وفق الطريقة التي ذكرها القصاب (1988) للحصول على مستعمرات تنتج حامض يستدل عليه من خلال تكوين هالات رائقة حول المستعمرة وذلك لإذابتها كاربونات الكالسيوم.

الوسط الغذائي Rogosa agar

أستخدم هذا الوسط في المراحل الأولى من عملية العزل وتشخيص البكتريا Lactobacilli المعزولة من نماذج معي الفئران والالبان والمخللات (Speck, 1984).

وسط ماء الببتون Peptone Water Medium

حضر هذا الوسط حسب الطريقة الواردة في. (Cruickshank *et al.*,1975)

كما استخدمت اوساط اخرى مثل وسط آكار الماكونكي (Oxoid) MacConkey Agar Medium و وسط آكار ايوسين المثيلين الأزرق Eosin Methylene Blue Agar Medium (EMB) (Oxoid) و وسط المرق المغذي Nutrient Broth Medium (Oxoid) و وسط الآكار المغذي Nutrient Agar Medium (Oxoid) وقد حضرت حسب التعليمات الواردة من الشركة المصنعة.

التشخيص المختبري Laboratory Diagnosis

بعد جمع العينات وإيصالها الى المختبر أجريت عليها الاختبارات الآتية:–

الصفات الزرعية Cultural Characters

استخدمت طريقة التخطيط Streaking لتلقيح النماذج البكتيرية على الاوساط الانتقائية لها ثم حضنت الأطباق عند درجة ٣٧مْ لمدة (١٨ – ٢٤) ساعة.

الفحص المجهري Microscopic Examination

لدراسة الخصائص الشكلية للعزلات البكتيرية، تم عمل مسحات منها وصبغها بصبغة كرام Gram Stain ثم فحصت بالمجهر.

فحص الكاتليز

نميت العزلات في وسط MRS السائل ثم نقل ١ مل منها إلى أنبوبة إختبار معقمة وأضيف ١ مل من بيروكسيد الهيدروجين H2O2 (١٠% ح/ح) ولوحظ ظهور الفقاعات.

فحص تكوين الأمونيا من الآرجنين

أضيف ٠,٣% من Argenine – monohydrochloride إلى وسط MRS السائل وعقم بالموصدة في درجة حرارة١٢١م لمدة٢٠ دقيقة ثم لقح بالعزلات وحضن لمدة ٧ أيام في درجة حرارة ٣٧م ثم اخذ ١ مل من الوسط الملقح ووضع في أنبوبة إختبار وأضيف إليه ١مل من كاشف نسلر ولوحظ تغير اللون.

فحص تخمر الكاربوهيدرات

أجريت فحوصات تحديد قابلية العزلات على تخمر الكاربوهيدرات على وفق ما ذكره Harrigan and McCance (1976) و تتلخص باستخدام وسط MRS السائل الأساس الخالي من الكلوكوز ، والحاوي على مستخلص لحم البقر Beef extract والمضاف إليه كاشف محلول أحمر – كلوروفينول (Chlorophenol – red) بنسبة ٢% (والمحضر بإذابة ٠,٢غم من الكاشف و٢ مل من الايثانول ثم أكمل الحجم الى ١٠٠ مل ماء مقطرفي دورق حجمي سعة ١٠٠مل) ثم أضيف اللاكتوز ، والسكروز ، والرافينوز ، والأرابينوز والكلوكوز بصورة منفردة وبتركيز ٢% إلى الوسط المذكور وضبط الأس الهيدروجيني بحدود ٦,٢–٦,٥ ثم عقم بالموصدة في درجة حرارة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة ثم لقح بالبكتريا وحضن في درجة حرارة ٣٧ م لمدة ٣–٥ أيام ثم لوحظ لون الوسط ودرجة التغيير الحاصل فيه من اللون الأحمر إلى الأصفروانتاج الغاز في أنبوبة درهام Durham tube (Holt *et al.*, 1986).

إختبار قابلية العزلات لإنتاج البكترسيوسين بطريقة الانتشار في الاكار

تم تنمية العزلات العصوية المنتخبة في وسط MRS السائل في أنابيب إختبار بنسبة ١% من المزروع المنشط لكل عزلة إذ حضنت في درجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٤٨ ساعة وفي ظروف لاهوائية بعد ضبط الأس الهيدروجيني للوسط عند ٥,٨. كما تم تنمية بكتريا الإختبار في أوساط سائلة بنسبة ١% من المزروع المنشط لكل بكتريا وحضنت في الدرجة الحرارية المناسبة لها ولمدة كافية. وقد استخدمت طريقة الانتشار في الحفر لأختبار قابلية العزلات لإنتاج البكتريوسين، وقد تم تقدير الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنتج من بكتريا *L. acidophilus* بطريقة الانتشار في الحفر (Well diffusion method) حسب الطريقة التي إتبعها Barefoot and Klaenhammer, (1983) وذلك للكشف عن الفعالية التثبيطية للبكتريوسين في رواشح مزارع العزلات المختلفة وذلك بنشر ٠,١ مل من بكتريا الإختبار المنشطة في وسط MRS السائل ولمدة ١٨ إلى ٢٤ ساعة بوساطة ناشر زجاجي معقم وذلك على وسط Nutrient Agar ثم حفر أربعة حفر في كل طبق وبقطر ٥ ملم بوساطة ثاقب الفلين المعقم cork-borer ثم وضع داخل كل حفرة قطرة من الآكار وبعد ذلك وضع في الحفر راشح مزارع حامض اللاكتيك بعد فصل الخلايا بالطرد المركزي ٦٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ١٥ دقيقة وبكمية ١٠٠ مايكروليتر ثم حضنت الأطباق في درجة الحرارة المثلى لبكتريا الإختبار ولمدة ٢٤ ساعة، ثم قيست منطقة التثبيط المحيطة بالحفرالخالية من النمو بوساطة المسطرة.

تحضير الحليب الاسيدوفيلي

حضر حسب الطريقة الواردة في (جندل،٢٠٠٧) والتي تتضمن اخذ لتر واحد من الحليب الطازج وترشيحه بالمرشحات الغشائية بدرجة حرارة الغرفة ثم تعقيمه بالموصدة بدرجة ١٢١ْم وضغط ١ جو لمدة ١٥—٢٠ دقيقة ثم اضافة ١٪ عسل او سكر الكلوكوز بعد ذلك اضافة ٣–٥ ٪ من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ويحضن لمدة ١٢ ساعة ويعبأ في اواني ثم يخزن بدرجة ٥ْم لحين الاستعمال.

تأثير الأس الهيدروجيني في نمو بكتريا *Lactobacillus acidophilus* وإنتاج البكتريوسينات

حضر ١٠٠ مل من وسط MRS السائل في دورق زجاجي ووزع في أنابيب إختبار بكميات متساوية ٥ مل لكل أنبوبة وضبط الأس الهيدروجيني لها بواقع ٣– ٤ – ٥ – ٦ – ٧ –٨ ثم تم تعقيمها، بعدها لقحت بمزارع منشطة من العزلات الممنتجة للبكتريوسين ' بعد ذلك قدرت فعالية البكتريوسين في الراشح بطريقة الانتشار بالحفر المذكورة آنفاً لبكتريا الإختبار.

ثباتية البكتريوسينات المنتجة تجاه الأس الهيدروجيني

تم تنمية البكتريا المعزولة في وسط MRS السائل ثم الطرد المركزي (٦٠٠٠ دورة بالدقيقة) ولمدة ١٥ دقائق للحصول على رواشح هذه المزارع ثم ضبط الأس الهيدروجيني لهذه الرواشح على قيم من ١– ١٠ وبفارق درجة واحدة وتم قياس فعالية البكتريوسينات بطريقة الحفر باستخدام البكتريا *Escherichia coli*.

مجاميع الفئران المعاملة

قد استخدمت في الدراسة الحالية الفئران البيضاء نوع *Mus musculus* سلالة BALB/C و قسمت الى اربع مجاميع تضم كل منها ١٢ فأراً والتي تم الحصول عليها من الشركة العامة لصناعة الادوية في سامراء ، زودت الحيوانات بالعليقة الغذائية المكونة من ١٥% بروتين حيواني و ٥٠% طحين حنطة و ٢٥% نخالة طحين و ٦% فول صويا و ٢% دهن نباتي و ٢% حليب مجفف و ١ غم/كغم/وزن الجسم خليط معادن وفيتامينات (AL-Fosteri,2004) ، وتم خلط هذه المواد مع الماء لتكوين عجينة متجانسة قطعت الى قطع صغيرة ووضعت في فرن بدرجة حرارة ٤٠ مئوية لتجف او تترك ٢٤ ساعة لتجف ذاتيا وقد اعطت العليقة بنسب متساوية لكل المجاميع وقد استحدمت هذه المجاميع لدراسة تأثير الحليب الاسيدوفيلي على العائلة المعوية بحساب عدد المستعمرات بوساطة عداد المستعمرات Colony counter وهذه المجاميع هي:

١– **المجموعة الاولى** : عوملت هذه المجموعة بالحليب الاسيدوفيلي المحضر بأستخدام عزلة *Lactobacillus acidophilus* الغير منتجة للبكتريوسين وكان مصدرها معي الفئران.

٢– **المجموعة الثانية** : عوملت هذه المجموعة بالحليب الاسيدوفيلي المحضر بواسطة عزلة *Lactobacillus acidophilus* المنتجة للبكتريوسين وكان مصدرها المخللات.

٣– **المجموعة الثالثة** : عوملت بحليب اسيدوفيلي معقم (خالي من بكتريا *Lactobacillus acidophilus*).

٤– **المجموعة الرابعة** : اعطيت فئران هذه المجموعة الغذاء الطبيعي من العليقة المذكورة اعلاه (مجموعة السيطرة).

لقد تم اعطاء الحليب الاسيدوفيلي بواسطة حقنة اعدت لهذا الغرض عن طريق الفم بواقع واحد مللتر نهارا وواحد مللتر ليلا.اجري التحليل الاحصائي لنتائج هذه الدراسة بأستخدام اختبار F، حيث تم حساب المعدل الحسابي والانحراف المعياري لمقارنة النتائج بين مجاميع الفئران المعاملة ومجموعة السيطرة (الفئران غيرالمعاملة).

النتائج والمناقشة

تم عزل (٢٥) عزلة عائدة لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* بواقع (١٦) من المخللات و(٢) من الالبان و(٧) من معي الفئران' وقد اشار (Zaho, *et.al*.,1998) الى امكانية عزل هذه البكتريا من البراز والانسجة المعوية، وكانت العزلات عصوية مستقيمة وموجبة لصبغة كرام وغير متحركة وغير مكونة للأبواغ و سالبة لفحص الكاتاليز وفحص ازالة مجموعة الامين من الحامض الأميني الآرجينين،الذي اجري للتأكد من عدم وجود بكتريا *L. reureri* السالبة له والتي تعد من الأنواع الموجودة في التجويف المعوي والمرافقة لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* كما كان شكل المستعمرة البكتيرية محدباً وكريمي اللون ولماعا والجدول (١) يبين الاختبارات الشكلية والزرعية والكيميوحيوية ، كمابين اختبار تخمير السكريات قدرتهما على إستهلاك الكلوكوز والسكروز واللاكتوز وعدم قدرتهما على إستهلاك الارابينوز والرافينوز وهذا يتفق مع ما جاء به وهذا ما يثبت عائديتها إلى مجموعة بكتريا *Lactobacillus acidophilus* وكما جاء في (Holt *et al* ., 1986 ، Harrigan and McCance , 1976).

جدول (١) : نتائج الاختبارات لبكتريا عزلات *L. acidophilus*

الفحص	عزلات *L. acidophilus*
شكل الخلية	**عصوية مستقيمة ذات نهايات مستديرة**
شكل المستعمرة	**محدبة الشكل وكريمية اللون ولماعة**
الحركة	–
تكوين الأبواغ	–
صبغة كرام	+
الكاتاليز	–
ازالة مجموعة الامين	–
الكلوكوز	+
السكروز	+
اللاكتوز	+
الارابينوز	–
الرافينوز	–

التحري عن انتاج البكتريوسين

كما تم التحري عن قابلية العزلات على إنتاج البكتريوسين و بطريقة الإنتشار بالحفر باستخدام ثلاث انواع بكتيرية قياسية غير منتجة للبكتريوسين *Lactobacillus plantarum* و *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* وبعد إجراء الفحص تبين بأن ثلاث عزلات فقط من *Lactobacillus acidophilus* منتجة للبكتروسينات كلها كانت ممن عزلت من منتجات المخللات وهذا يتفق مع Chen Y. et.al, (1992). وكان تأثير البكتريوسين التثبيطي المنتج من *Lactobacillus acidophilus* أكبر في نمو البكتريا *Staphylococcus aureus* و *Lactobacillus plantarum* مقارنة بتأثيره ببكتريا *Escherichia coli* وهذا يتفق مع ما جاء به (العبدلي،٢٠٠٥) حيث وجد ان البكتريوسين المنتج من *Lactobacillus plantarum* و*Lactobacillus acidophilus* كان اكثر تأثيرا في البكتريا الموجبة لصبغة غرام. كما أظهرت العزلات قدرتهما على إنتاج الحامض و خفض الأس الهيدروجيني للحليب حيث كان بحدود (٥) ، وقد كان النمو البكتيري وانتاج البكتريوسين عند الاس الهيدروجيني (٥–٦) في افضل مستوياته كما كان فعالية البكتريوسين التثبيطية ثابتة عند هاتين الدرجتين ولكنها قلت في مستويات الاس الهايدروجيني الواطئة والعالية جدا (٢، ٨) وهذا يتفق مع (العبدلي ،٢٠٠٥) و قد اشار Ryan et al. (1996) الى أن البكتريوسين المنتجة من قبل *Lactobacillus acidophilus* ذات فعالية تثبيطية عالية في الأس الهيدروجيني (٥) وتقل في الأس الهيدروجيني (٧).

تأثير الحليب الاسيدوفيلي على العائلة المعوية في النبيت الطبيعي للفئران

يتبين من خلال جدول (٢) وبعد التحليل الاحصائي للنتائج ان للحليب الاسيدوفيلي تأثير واضحاً في اعداد البكتريا المعوية Enterobacteriaceae في المجاميع المعاملة الثلاثة فقد تناقصت اعدادها بشكل كبير خصوصا في المجموعة الاولى التي عوملت بالحليب الاسيدوفيلي المخمر من قبل بكتريا *Lactobacillus acidophilus* غيرالمنتجة للبكتريوسين خاصة في الاسبوع الاول والثاني (٤،٣،٥) بالمقارنة مع المنتجة للبكتريوسين (٤،٥،٤)، في حين كانت نتائج المجموعة المعاملة بالبكتريا المنتجة للبكتريوسين في هذين الاسبوعين مقاربة للنتائج المجموعة التي عوملت بالحليب الاسيدوفيلي الخالي من البكتريا *Lactobacillus acidophilus* (٤،٥،٤،١) لترجع في الاسبوعين الثالث والرابع لينخفض معدل اعداد العائلة المعوية في المجموعة الثانية (٣،٣،٣) مقتربة من نتائج المجموعة الاولى حيث كانت (٣،٤،٣،٢) (شكل رقم ١) ، وقد يعود السبب في كون البكتريا غيرالمنتجة للبكتريوسين والتي عزلت من معدة فئران لها القدرة على استعمار معي الفئران بشكل اسرع في المجموعة الاولى على عكس عزلات المجموعة الثانية التي عزلت من المخللات وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (Rene´ L. *et.al*.,2001) حيث ان اعداد Enterobacteriaceae في

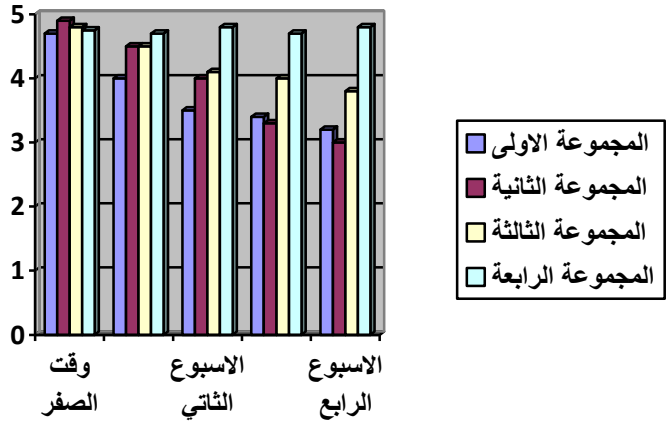
معي الخنازير التي اعطيت فواكه مخمرة ببكتريا Lactobacilli قد انخفض عن الخنازير التي اعطيت طعام جاف غير متخمر وقد اوعز ذلك الى ان الاغذية المتخمرة تحتوي على تركيز عالي من lactic acid و butyric acid و Propionic acid و اعداد كبيرة من Lactobacilli وانخفاض في الاس الهايدروجيني pH في المعدة حيث يتراوح بين (٣,٧) و(٣,٢) وهذه كلها تؤثر منفردة او مجتمعة على البيئة الاحيائية للنبيت الطبيعي في القناة الهضمية Gastrointestinal وخاصة Enterobacteriaceae وبالذات Salmonella (Prohaszka, L., 1990 et.al.,. Van Schie, F. W. 1987،)، وفي دراسات اخرى اشارت الى قدرة Lactobacillus على تثبيط التصاق *E. coli* في القناة المعوية (Herias, M. ، Spencer, R. J., and A. Chesson. 1994 V.1999)، فيما لم يكن للبكتريوسين المنتج من العزلة المستخدمة في المجموعة الثانية تأثير واضح في خفض اعداد العائلة المعوية بوصفه احد انواع المركبات المضادة للاحياء المجهرية وقد يعود ذلك الى انخفاض الاس الهايدروجيني pH في المعدة الى اقل من (٤) في حين ان فعالية البكتريوسين المنتج من هذه العزلة كان فعال ومستقرا عند pH (٥) وانخفضت فعاليته الى حد توقف نشاطه دون ذلك. في حين ازدادت اعداد *Lactobacillus acidophilus* في المجموعة الاولى والثانية في حين لم تكن الزيادة معنوية في المجموعة الثالثة التي عوملت بالحليب الاسيدوفيلي الخالي من *Lactobacillus acidophilus* (شكل رقم ٢)، ويمكن تفسير هذه الزيادة اعداد البكتيرية الاخيرة من خلال احلالها محل الانواع البكتيرية العئدة للعائلة المعوية بسبب قدرتها على المنافسة على المكان من خلال الالتصاق بالاغشية المخاطية المعوية Intestinal mucosa و كذلك تزيد من نفاذية الاغشية المعوية وتحفز الوظائف المناعية (Holzapfel, W. H. *et.al.*,1998، Ogawa, M., K. *et.al.*,2001)،كما اشارت دراسات سابقة الى قابلية الانواع العائدة لجنس Lactobacillus على الالتصاق بالخلايا الطلائية المعوية حتى وان زرعت في المزارع النسيجية (Greene, J. D., and T. R. Klaenhammer. 1994)، وقد وجد (Marie-Helene Coconnier, *et.al.*,1998) الى قدرة *Lactobacillus acidophilus* على خفض تواجد بكتريا *Helicobacter* عند اعطاء مرضى مصابين بها لغذاء يحتوي *Lactobacillus acidophilus* او بشكل مباشر ولم يلاحظ اصابات معوية بهذه البكتريا بعد ذلك.

جدول (٢) معدلات النتائج لمجاميع الفئران المعاملة بالحليب الاسيدوفيلي

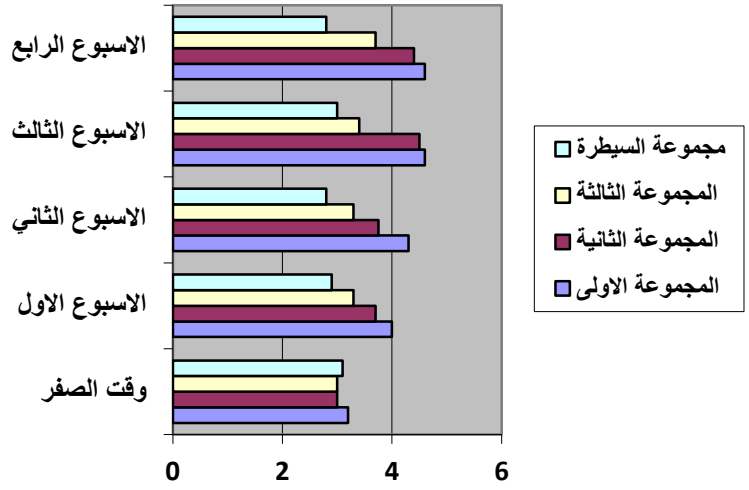
اسابيع المعاملة	وقت الصفر		الاسبوع الاول		الاسبوع الثاني		الاسبوع الثالث		الاسبوع الرابع	
المجاميع	LA	E	LA	E	LA	E	LA	E	LA	E
المجموعة الاولى LA	٣,٢	٤,٧	*٤	*٤	*٤,٣	*٣,٥	*٤,٦	*٣,٤	*٤,٦	*٣,٢
المجموعة الثانية LAB	٣	٤,٩	*٣,٧	٤,٥	*٣,٧٥	*٤	*٤,٥	*٣,٣	*٤,٤	*٣
المجموعة الثالثة M	٣	٤,٨	٣,٣	٤,٥	٣,٣	*٤,١	٣,٤	*٤	٣,٧	*٣,٨
المجموعة الرابعة السيطرة	٣,١	٤,٧٥	٢,٩	٤,٧	٢,٨	٤,٨	٣	٤,٧	٢,٨	٤,٩

LA.: ***Lactobacillus acidophilus*****, E. : Enterobacteriaceae**

- تعني تأثيرا معنويا ، الاعداد في الجدول هي log10 cfu/ml



شكل رقم (١) يبين تأثير الحليب الاسيدوفيلي على العائلة المعوية



شكل رقم (٢) يبين تأثير الحليب الاسيدوفيلي على بكتريا *Lactobacillus acidophilus* في النبيت الطبيعي للفئران

المصادر

- الجبوري ، محميد قد الله (١٩٩٠): علم البكتريا الطبية ، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.
- القصاب ، عبد الجبار عمر قوجه (١٩٨٨). التاثير المضاد لبكتريا حامض اللبنيك العصوية على بعض البكتريا المرضية ، رسالة ماجستير ، قسم الصناعات الغذائية ،كلية الزراعة ، جامعة بغداد .
- العبدلي ،معزز عبد الرضا مجيد (٢٠٠٥). فعالية البكتريوسين المنتج من عزلتين من جنس Lactobacillus في تثبيط النمو المايكروبي في الأوساط الزرعية وبعض الاغذية، اطروحة دكتوراه، قسم الصناعات الغذائية ، كلية الزراعة والغابات في جامعة الموصل.
- جندل ، جاسم محمد (٢٠٠٧). مبادئ الالبان. المكتبة الوطنية.
- Al_Fosteri, K. K. (2004).Physiology studies of the effect of benzene in laboratory mice and human. Ph. D, thesis. Educ.coll., Basrah Unv.
- Barefoot S. F. and Klaenhammer T.R. (1983). Detection and activity of lactopcin B,and Bacteriocin produced by lactobacillus . Appl. Environ. Microbiol. 45, 1808 -1815 .
- Carr, F.J.; Chill, and Maida, N. (2002).The Lactic acid bacteria: a literature survey. Critical Reviews in Microbiol., 28, 281-370.
- Chen,Y.; Barefoot, S.F.; Hughes, Microbiol, T.A. (1992). The agent from gram-positive cell that enhances lactacin B production by *Lactobacillus acidophillus* in associative culture. In program and Abstract of the Annual meeting, Institute of food technology ists, New Orbans, LA. June 20-24.
- Charlotta E. and Carl E. N.(2000). Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections.J. of Antimicro. Chemother. 46, suppl. S1:41-48.
- Gilliland, S.E.(1989). Acidophilus milk Products . A review of potential benefits to consumers .J. Dairy sci., 72(10).
- Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. and Swain, R. H. A. (1975). Medical Microbiology. Vol. 2, The Practice of Medical Microbiology. 12th ed., Churchill, Livingstone, Edinburgh.
- Greene, J. D., and T. R. Klaenhammer. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. Appl. Environ. Microbiol. 60:4487-4494
- Harrigan, W.E. and Mc Cance, M.E. (1976). Laboratory methods in food and dairy Microbiology. Academic press: London.
- Henry, J. B. (2001). Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 20th ed., W. B. Saunders Company, U.S.A.
- Herias, M. V., C. Hessle, E. Telemo, T. Midtvedt, L. A. Hanson, and A. E. Wold. 1999. Immunomodulatory effects of Lactobacillus plantarum colonizing the intestine of gnotobiotic rats. Clin. Exp. Immunol. 116:283–290.
- Holt, H.G.; Sharpe, M.E.; Mair, N.S. and Sneath, P.H.A. (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2 Williams and Wilkins. Baltmore. London . Los Angles . Sydney.
- Holzapfel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, and J. H. J. Huis in't Veld. (1998). Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol.41:85–101
- Jawetz, E.; Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (1998). Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 21st ed., Appleton and Lange, California, U.S.A.

- Lennette, E. H.; Balows, A.; Hausler, W. J. and Shadomy, H. J. (1985). Manual of Clinical Microbiology. 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. FEMS Microbiology Reviews, 87, 149-164.
- Marie-Helene Coconnier, Vanessa Lievin,Elisabeth Hemery, and Alain L. Servin (1998). Antagonistic Activity against *Helicobacter* Infection In Vitro and In Vivo by the Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. Appli. and Enviro. Microbio., Vol. 64, No. 11,Nov, p. 4573-4580.
- Mark Percival (1997). Choosing aprobiotic supplement. clin, nutrit. Insights. Vol.6 no.1p;1-3.
- Ogawa, M., K. Shimizu, K. Nomoto, M. Takahashi, M. Watanuki, R. Tanaka, T. Tanaka, T. Hamabata, S. Yamasaki, and Y. Takeda. 2001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. Infect. Immun. 69:1101-1108.
- Prohaszka, L., B. M. Jayarao, A. Fabian, and S. Kovacs. (1990). The role of intestinal volatile fatty acids in the Salmonella shedding of pigs. Zentbl.Vetmed. Reihe B 37:570–574.
- Quan Shu, Joseph S. Zhou, Kay J. Rutherfurd, Mervyn J. Birtles, Jaya Prasad, Pramod K. Gopal and Harsharnjit S. Gill (1999). Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. Inter. Dairy J. Vol. 9, Issue 11, Nov., P: 831-836
- Rene´ L. Van Winsen, Bert A. P. Urlings, Len J. A. Lipman, Jos M. A. Snijders,(2001), Effect of Fermented Feed on the Microbial Population of the Gastrointestinal Tracts of Pigs. Appl. and Enviro. Microbio., July, p. 3071–3076
- Robbinson, R.K.(1990)V2. Dairy microbiology . Vol.2. The Microbiology of milk products. Elsevier applied science. London and New York .
- Ross, P.R.; Morgans, S. and Hill, C. (2002). Preservation and Fermentation past, present and future.Int.J. of food Microbiology, 79,3-16.
- Ryan , MP. Rea, MC., Hill, C. and Ross, PP. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of Lactococcus lactis producing a novel broad-spectrum bacteriocin , lacticin 3147.Appl. Environ. Microbiol., 62,612-619.
- Speck, M.L.(1984). Compendium of methods for the microbiology examination of blood. American public Health association .
- Spencer, R. J., and A. Chesson. 1994. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. J. Appl. Bacteriol. 77:215–220.
- Stamer. A. and Stoyal, B. Pilli.(1984). Microbial., Compendium of methods for the microbiology examination of foods, 2nd edition, 15,1025.
- Van Schie, F. W. (1987). Some epidemiological and nutrional aspects of asymptomatic Salmonella infection in pigs. Ph.D. thesis. Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands. 29. Snel, J., M. E. Van Den Brink, M. H. Bakker, F. G. J. Poelma, and P. J.
- Zhao, T.,M. P. Doyle, B.G. Harmon,C. ABrown, P O. Mueller, and A. H. Parks.(1998). Reduction of carriage of nterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. J. Clin. Microbiol. 36(3):641–647

The Study of the Effect of Acidophilic Milk on Enterobacteriaceae in Normal Flora of White Mice

(Received 31 / 5 / 2009 , Accepted 25 / 10 / 2009)

Absract

Twenty five isolates of *Lactobacillus acidophilus* (LA) were obtained from pickled vegetables (16) , dairy (2) and from mice gastrointestinal (7), which were by using morphological, cultural and biochemical tests.

All the Strians of isolates had been tested for bacteriocin production. three of them were positive for this test done by well diffusion methods. The best activity of bacteriocin was at pH (5 -6) and the highest stability was at the 5 pH. The inhibitory activity of bacteriocin produced from *Lactobacillus acidophilus* was greater than *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus plantarum*, as compared to the effect on *Escherichia coli*.

This study proves that acidophilic milk has a clear effected on decreasing the number of Enterobacteriaceae in mice gastrointestinal from (4.9 cfu/ml) to (3 cfu/ml). The *Lactobacillus acidophilus* which isolated from mice gastrointestinal is beter than those isolated from pickeld vegetables to decrease the number of Enterobacteriaceae. There was a positive effect for acidophilic milk on increasing the number of *Lactobacillus acidophilus* in mice gastrointestinal from (3 cfu/ml) to (4.6 cfu/ml). There was no significant effect for sterilized acidophilic milk (no bacterial growth) on *Lactobacillus acidophilus* number.