تأثير بعض أنواع بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية على بعض الأمراض المعوية المحدثه بجرثومة السالمونيلا *Salmonella enterica serovar typhimurium* في إناث الجرذان

صلاح صديم صالح الدوري

فرع الإحياء المجهرية ، كلية الطب البيطري ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: 2012/12/10 ---- تاريخ القبول: 2013 /6/9)

الملخص

تضمن هذا البحث عزل وتشخيص بعض أنواع بكتريا حامض اللاكتيك (Lactic acid bacteria) من منتجات الألبان واستعمالها كمعززات حيوية وتحديد تأثير تجريبها الفموي لمدة سبعة أيام لتحدي الإصابة بجرثومة السالمونيلا *Salmonella enterica serovar typhimurium* (STM) ، ومقارنة ذلك بالمضاد الحيوي السبروفلوكساسين (ciprofloxacin) لعلاج الاصابه نفسها . تم عزل وتشخيص 10 عزلات من بكتريا حامض اللاكتيك تعود لجنس *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* . استعمل نوعان (*L.delbrueckii*, *L.bulgaricus*) كمعززات غذائية إذ جرعت بشكل منفرد بجرعة يومية مقدارها 1.3×10^8 خلية/مل وهي مساوية للعزلة الممرضة STM ، تمت المقارنة مع المضاد الحيوي بمقدار 0.5 و 1.0 ملغم / مل . أظهرت النتائج بعد اليوم الأول من التجريب التأثير الايجابي الفعال للنوعين الجرثوميين في علاج الإصابة بالسالمونيلا من خلال تماثل الحيوانات للشفاء في وقت قياسي بعد أفضل من وقت تأثير المضاد الحيوي ، فضلاً عن ذلك فقد أثبتت الدراسة كفاءة استخدام هذه الأنواع كمعززات حيوية .

المقدمة

وقد جاءت الإصابة بالسالمونيلا واحدة من الأسباب الأولية لالتهاب المعدة والأمعاء في الإنسان ، وهي المسببة لحالات التسمم الغذائي ، مما يدعو إلى معالجتها والتخلص منها في أقل وقت ممكن ومن الأفضل العلاجات البيولوجية للابتعاد عن استعمال المضادات الحيوية (9) .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات : جمعت 50 عينة من منتجات الألبان المتخمرة المصنعة في البيوت أو المعامل وعلى مدار ثلاثة أشهر متواصلة شملت (آذار ، نيسان ، مايس) 2010 في قناني معقمة ، بعدها نقلت العينات إلى المختبر في حاوية مبردة .

العزل الجرثومي

زرعت عينات الألبان مباشرة في وسط MRS broth السائل لغرض عزل وتشخيص بكتريا حامض اللاكتيك حضنت عند 37°C لمدة 24-48 ساعة عند ظروف لاهوائية (10 ، 11). عزلت وشخصت البكتيرية بإتباع طريقة التخفيف (Dilution method) ، وذلك بنقل 10 غم من كل من نموذج الى 90 مل من المحلول الملحي (Normal saline) (12,13) . تم تشخيص العزلات البكتيرية بإتباع طريقة كل من (8,10,12) بنقل 1 مل من النموذج الزرعي المنشط على وسط MRS السائل ونشره في طبق وسط MRS الصلب ، حضن عند 37°C لمدة 24 ساعة عند ظروف لاهوائية ، ثم دُرست المواصفات الشكلية للمزارع النامية وأجريت عليها الفحوصات الكيموحيوية لغرض أكمل تشخيصها.

تم الحصول على بكتريا *Salmonella enterica serovar typhimurium* لإحداث الإصابة ، من مختبرات قسم علوم الحياة - كلية التربية - جامعة تكريت ، وأجريت عليها الفحوصات التشخيصية للتأكد منها (15) .

المعززات الحيوية (Probiotics) هي أحياء مجهرية مفيدة وذات دور فعال في الحماية الطبيعية من ضرر الأحياء المجهرية المرضية ، تستعمل في دعم الأغذية لتوفير تأثيرات مفيدة لصحة الإنسان من خلال إعادة التوازن الطبيعي للنبيت المعوي (Normal flora) والحد من الأمراض ، لا سيما المتعلقة بالجهاز الهضمي (1) . تعد بكتريا حامض اللاكتيك (LAB) (Lactic acid bacteria) من أهم المعززات الحيوية ، كونها غير مرضية وغير منتجة للسموم ، فضلاً عن إنتاجها للعديد من الإنزيمات والفيتامينات وإفرازها مواد مثبطة للأحياء المجهرية المرضية وقدرتها على الالتصاق بجدران الأمعاء ، وبقائها طبيعياً في الفم والأمعاء والمسالك البولية وإسهامها في التوازن الطبيعي للنبيت الصحي لهذه المناطق (2) .

وتعد الأنواع العائدة للأجناس *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* من أهم المعززات الحيوية لما لقدرتها العالية على تحمل ظروف الخزن وتصنيع منتجات الحليب المختمر (3) ، وإن أهم الأنواع لهذه الأجناس هي *L.reuteri* ، *L.casei* ، *L.bulgaricus* ، *L.delbrueckii* ، *L.acidophilus* ، أكثر الأنواع السائدة في النبيت الطبيعي للأمعاء الدقيقة والغليظة لجسم الإنسان السليم في مختلف الفئات العمرية (4) .

أشارت الدراسات العلمية إلى استعمال بكتريا حامض اللاكتيك بصورة عامة في الحماية والعلاج من العديد من الممرضات ودعمها للعمليات الأيضية للمضيف ، فضلاً عن استعمالها كعلاج للأشخاص الذين يعانون من التحسس لسكر الكلوكوز، وكذا قابليتها في علاج حالات الإسهال المختلفة (5,6,7) لذا يفضل استعمالها بديلاً للمضادات الحيوية (Antibiotics) والمواد الكيمياوية الأخرى ذات التأثيرات الجانبية الضارة (8) .

ساعات لوحظ حدوث الإصابة ومن ثم تم تجريعها بعوالق بكتريا حامض اللاكتيك أما المجموعتين الخامسة والسادسة فقد جرعتا بعد جرثومة السالمونيلا بجرعة المضاد الحيوي بتريزيم 0.5 و 1.0 ملغم/مل على التوالي .

التحليل الإحصائي

حللت النتائج وفق تجربة التصميم العشوائي الكامل (CRD) باستخدام برنامج الإحصاء الجاهز (SAS) وجرى عليها اختبار دنكن لتحديد معنوية الفروق عند مستوى احتمالية (P≤0.01) (18 , 19)

النتائج

عزلت وتشخيصت (10) عزلات تعود لجنسين من بكتريا حامض اللاكتيك هما *Bifidobacterium & Lactobacillus* ، استعمل نوعان يعودان لجنس *Lactobacillus* هما *L.bulgaricus* & *L.delbrueckii* ، والتي تم تشخيصهما اعتمادا على ، أشكال المستعمرات ، أحجامها ، ألوانها على الأوساط الزرعية المستعملة ، فضلا عن تفاعلها مع ملون كرام وبعض الفحوصات البايوكيميائية وتخمر السكريات (14) ، ويوضح الجدول (1) نتائج الاختبارات البايوكيميائية وتخمر السكريات لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك حسب النوع .

تحضير العوالق البكتيرية

حضرت العوالق البكتيرية لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك وبكتريا السالمونيلا بتريزيم 1.3×10^8 خلية/مل وذلك بمقارنتها مع الانبوب الاول من انابيب ماكفرلاند القياسية (Mcfarland tubes) (16) .

Ciprofloxacin

حضرت تراكيز المضاد الحيوي بإذابة 0.05 و 0.1 غم على التوالي في 90 مل ماء مقطر معقم ثم أكمل الحجم إلى 100 مل للحصول على تركيزي 0.5 و 1.0 ملغم/مل (17) .

تصميم التجربة

استعملت في هذه الدراسة 36 من إناث الجرذان البيض المختبرية بأعمار تراوحت بين 2-3 أشهر ومتوسط وزن 200 غم ، تم الحصول عليها من مختبرات كلية الطب - جامعة الموصل، قسمت عشوائيا الى ستة مجاميع بمعدل 6 جرد لكل مجموعة.

تركت المجموعة الأولى دون معاملة وعدت مجموعة سيطرة سالبة (Control-ve) بينما جرعت المجموعة الثانية فمياً بجرثومة السالمونيلا لغرض إحداث الإصابة وعدت مجموعة سيطرة موجبة (Control+ve) وسميت مجموعة الخمج ، في حين جرعت المجموعتان الثالثة والرابعة بجرثومة السالمونيلا أولاً وبعد (6-8)

الجدول (1) : نتائج الاختبارات البايوكيميائية وتخمر السكريات لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك حسب النوع

تخمير السكريات						كاتاليز	اوكسيديز	تكوين الأبواغ	صبغة كرام	الاختبار	نوع البكتريا
Galactose	sucrose	Xylose	Manose	Fructose	Lactose						
-	+	-	+	+	+	-	-	-	+		<i>L. bulgaricus</i>
-	-	-	-	+	-	-	-	-	+		<i>L. delbrueckii</i>

كما يبين الجدول (2) النتائج التأكديفة للفحوصات الاختبارية لبكتريا السالمونيلا (15) .

أمكن الحصول على 10 عزلات بكتيرية ، ضمت 7 عزلات *L.bulgaricus* ، 3 عزلات *L.delbrueckii* ، من خلال ذلك أظهرت النتائج وجود تفاوت في نسبه النمو بالاعتماد على أفراد العزلات البكتيرية .

الجدول (2) :نتائج الفحوصات التأكديفة لعزلة بكتريا *Salmonella enterica serovar typhimurium*

Lactose	Manitol	Glucose	Citrate	H2S	KNC	V-p	Urease	Motility	صبغة كرام	الاختبار	نوع البكتريا
-	+	+	+	+	-	-	-	+	-		<i>Salmonella enterica serovar typhimurium</i>

شملت مجموعته الخمج والمجاميع المعالجة، إذ ظهرت العلامات السريرية واضحة جدا في مجموعة الخمج المجرعة بجرثومة

أظهرت نتائج التجريب الفموي لعوالق بكتريا السالمونيلا حدوث الإصابة وظهور علامات سريرية واضحة على كافة المجاميع الحيوانية ، والتي

في طبيعة الجلد ، مما يدل على فقدان السوائل الجسمية ، في حين احتفظت المجاميع الأخرى بالمعالجة بطبيعة البراز والجلد والشعر .
قيست درجات حرارة الجسم باستعمال محرار طبي صغير الحجم من خلال فتحة المخرج إذ لوحظ في اليوم الأول من التجربة ارتفاعاً طفيفاً في معدلات درجات الحرارة للمجاميع كافة إذ تراوحت بين 37.36-37.52 م° .
أما في اليوم الثالث فقد لوحظ انخفاضاً معنوياً واضحاً في معدلات درجات الحرارة للمجموعتين الثالثة والرابعة المعاملة بالعوالق البكتيرية إذ بلغت 36.97 و 37.10 م° على التوالي ، كما لوحظ الانخفاض في معدلات درجات الحرارة بالنسبة للمجموعتين الأخيرتين المعاملة بتركيزي المضاد الحيوي مقارنة مع معدلاتها التي سجلتها مجموعة الخمج في اليوم الثالث ولنفس الفترات إذ وصلت إلى 39.10 م° .

السالمونيلا بمقدار 1 مل بتركيز 1.3×10^8 خلية/مل ، فقد لوحظ خمولها وبطيء حركتها ونفوق (4) منها أي حوالي 11% ، في حين كان التحسن واضحاً عند مجاميع المعالجة المجرعة بعوالق بكتيريا حامض اللاكتيك والمضاد الحيوي .

كما وأظهرت نتائج مراقبة شهية المجاميع الحيوانية في اليوم الأول مؤشرات ايجابية ، إذ كانت كافة الحيوانات طبيعية في شهيتها ، ثم تباينت شهيتها ، في حين انخفضت شهية مجموعة حيوانات الخمج وتدهورت حالتها صحياً .

بينت نتائج الملاحظة بالعين المجردة لفحص طبيعة البراز لمجموعة الخمج في الأيام الأولى تغيير حالته من الصلبة إلى أكثر ليونة وسيولة ، مما يدل على حدوث الإسهال ، وهذا يشير إلى شدة ضراوة عزلة السالمونيلا STM ، وكذلك لوحظ فقدان الشعر لمرونته وتغيير

الجدول (3) معدل قراءة درجات الحرارة لليوم الأول والثالث لكافة المجاميع

معدل قراءات اليوم الثالث		معدل قراءات اليوم الأول		درجة الحرارة / نوع المعاملة	
المتوسط ± الخطأ القياسي		المتوسط ± الخطأ القياسي			
b 0.23±	37.30	a 0.24±	37.22	1	مجموعة السيطرة (control - ve)
a 0.09±	39.10	a 0.02±	37.57	2	مجموعة الخمج (control + ve)
c 0.24±	36.97	a 0.12±	37.36	3	<i>L. bulgaricus</i>
c 0.23±	37.10	a 0.07±	37.37	4	<i>L. delbrueckii</i>
b 0.04±	37.42	a 0.17±	37.50	5	Ciprofloxacin 0.5 ملغم/مل
b 0.02±	37.47	a 0.08±	37.52	6	Ciprofloxacin 1.0 ملغم/مل

* النتائج تمثل معدل ستة مكررات .

** الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى احتمالية (P<0.01) .

الحيوي في تثبيط نمو جرثومة السالمونيلا ، وقد يعود السبب في ذلك إلى عملية معادلة السموم الجرثومية من قبل عزلتي بكتريا حامض اللاكتيك أو من خلال تحفيزها للجهاز المناعي (23 ، 24) . وقابلتها على إنتاج المواد المثبطة للممرضات مثل البكتريوسينات و الاحماض العضوية و H2O2 بالإضافة إلى قيامها بغلق موقع الارتباط لأنواع المايكروبات المرضية وسمومها مع الخلايا الطلائية فضلاً عن فاعليتها في تعديل الاستجابة المناعية للمضيف (25،26).

لذا نوصي باستعمال عوالق بكتريا حامض اللاكتيك كبكتريا علاجية لوحدها أو بشكل مختلط مع إحياء مجهرية أخرى ومعرفة تأثيرها تجاه ممرضات أخرى ، سواء كانت بكتيرية أو فطرية أو فيروسية .

المناقشة

إن سبب الارتفاع في درجات الحرارة قد يعود إلى فعل سموم جرثومة STM إذ يعتقد بأن لها القابلية على إحداث استجابات جسمية حرارية من خلال تأثيرها على مراكز تنظيم الحرارة تحت المهاد (Hypothalamus) في الدماغ (20) .

إن الخمول والهدوء في حركة حيوانات مجموعة الخمج يعد علامة مرضية (21) ، بينما غياب الخمول في حيوانات مجاميع المعالجة بنوعي بكتريا LAB يعد مؤشراً على فعالية الجرعات العلاجية ضد الإصابة بجرثومة السالمونيلا ، وكذلك الحال بالنسبة لمجموعتي المضاد الحيوي (22) . هذا ويعد تماثل حيوانات مجاميع المعالجة للشفاء بعد تجريعها بالمعززات الحيويه معياراً لنجاح نوعي المعزز

المصادر

- probiotic for therapeutic use .Ph D. the. College of medicine Tikrit University.
- 14- J.G. Holt, N.R. Kring, J.J. Staley, and S.T. Williams, (1994). Berge's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Ed Williams and Wilkins. Baltimore Maryland, USA.
- 15- J.G. Holt, N.R. Kring, P.H.A. Sneath, J.J. Staley, and S.T. Williams, (2005). Regular, Non-sporing Gram-negative rods, Bergys manual of systematic bacteriology. Vol.2.
- 16- E.J. Baron, L.R. Peterson, and S.M. Fingold, (1994) Baily and Scott's diagnostic microbiology.9th ed. Mosby. St. Louis.
- 17- J. Sambrook , E.F. Fritsch , and T.Maniatis, (1989) . Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring Harbour laboratory, Network.
- 18- SAS , 2005 . SAS user guide : statistics (version 6) . SAS Inst.Inc. Cary, USA.
- 19-Duncan,D.B, 1955. Multiple range and multiple F test.Biometrics.11:1-42.
- 20-O.M. Radostits , C. C. Gay, K.W. Hinchciff, and P.D. Constable,(2007). Veterinary medicine. 10th ed. W.B. Saunders. Co. USA.
- 21-C.J. Apanavicius, B.M. Powell, L.K. Vester, L.L. Lilienthal, N.D.Pope , M.A. Fastinger, M.A.; Tappenden K.A. and K.S. Swanson, (2007). Fructose supplementation and infection after food intake, fever and epithelial sloughing from Salmonella challenge in warning puppies. AJ. Nutr. 137:1923-1930.
- 22- D. Galazzi, A. Giardini, M.G. Mangiangalli , S. Marelli, V. Ferrazzi, and C.Orsi, (2008). Effect of Lactobacillus acidophilus D2/CSL on laying hen performance. Ital. J. Anim. Sci.; 7:27.
- 23- L.Z. Jin, Y.W. Ho, N. Abdullah and S. Jalaludin, (1996) .Probiotics in poultry: modes of action. Worlds Poult. Sci. J.53:351-368.
- 24- C.M. Galdeano, A.D. deleblance, G. Vinderola, M.E. Bibes, and G. Perdigon (2007).P-reposed model: Mechanisms of Immunomodulation induced by probiotic Bacteria. Clin. Vaccine Immunology. 14(5):485-49.
- 25 - Juśkiewicz J, Zduńczyk Z, Wróblewska M, Oszmiański J, Hernandez T(2002). The response of rats to feeding with diets containing grapefruit flavonoid extract. Food Res Int 35: 201-205
- 26- Denisa Čokášová1, Alojz Bombal, Ladislav Strojný1, Beata Pramuková1, The activities in rats exposed to effect of new probiotic strain *Lactobacillus plantarum* on counts of coliforms, lactobacilli and bacterial enzyme N, N-dimethylhydrazine (chemicalcarcinogen).(2011),World Poultry, Vol. 27, No. 9.
- 1- العواد ، نرمين جمال؛ حامد رباح وجدادين، مالك صالح(2004). تأثير إضافة نوعين من المحفزات الحيائية المعزولة محليا والمحفزات الأولية الداعمة لها إلى غذاء الجرذان لبيدات الدم ، المجلة العربية للغذاء والتغذية . السنة الخامسة، العدد الحادي عشر .
- 2- M.M. Brashears, D.Jaroni, and J.Trimble, (2003). Isolation Selection and characterization of Lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of E. coliO157:H7 in cattle's. Food protection... 66 (3):355-363.
- 3- S.G. Wynn, (2006). Probiotics in veterinary practice. J. of American Veterinary Association. 235:5606-613.
- 4- E.L. Marth, j.l. Steele, (2001) Aaalied dairy microbiology, 2nd Ed..
- 5- M.P.Conte, S.Schippa, I.Zamboni, M. Penta, M.Chiarini, F.Seganti, L.Osborn, P.J.falconieri, (2006). Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patient with inflammatory bowel disease. BMJ Journals.55 (12):1760-7.
- 6-J. Z. Xiao, S. Kondo, N. Takahashi, K. Miyaji, K. Oshidaf, A. Hiramatsu, K. "Effects of Milk Products Fermented by Bifidobacterium Longum on Blood Lipids in Rats and Healthy Adult Male Volunteers,(2003)" Journal of Dairy Science, Vol. 86, No. 7, pp. 2452-2461.
- 7- A. Ali, A. Metwally, A. Mahmoud and H. Attia, "Effect of Feeding Probiotics on Rats' Immunity and Health Conditions during Pregnan(2011). Food and Nutrition Sciences, Vol. 2 No. 2, pp. 96-104.
- 8-C.W.Tannok,(2004).Aspecial foodness for Lactobacilli, Appl. Environ. Microbial. 70 (6):3189-3194.
- 9- Z.S.Habeeb, A.M. AL-Shawi, and M.M. Fathi, (2004) Diagnostic study of *Salmonella typhimurium* in patient and cattle. Iraqi, J. vet. Med. 28(1):4-14.
- 10- R.M .Atlas , L.C. Parks, and A.E. brown, (1995). Lab rotary manual of experimental Microbiology. 1st ed . Msby-year book. Inc. use.
- 11-J.P. Harrelt, and L. M. Prescott, (1996). Laboratory Excuse Microbiology 3rded. Mc Grow-Hill, Boston. Pp:484.
- 12- الشيخ، ظاهر عامر عبد الرحمن.(1999). دراسة مقارنة الصفات الكيموحيوية لعزله محلية وسلالة مستوردة من بكتريا *Lactococcus acidophilus* واستخدامها في تصنيع منتجات علاجية، أطروحة دكتوراه، قسم الصناعات الغذائية-كلية الزراعة-جامعة بغداد.
- 13- A. F. Hassoon, (2005) . Isolation characterization and mass production of Lactobacillus acidophilus as a

The Effect of Therapeutic Lactic Acid Bacteria on Some Intestinal Diseases induced by *Salmonella enterica serovar typhimurium* in Female Rats

Salah Sadaim Salih AI- Doori

Department of Microbiology , College of Vet. Medicine , Tikrit university , Tikrit , Iraq

(Received: 10/12 /2012 ---- Accepted: 9/6/2013)

Abstract

The study was conducted to isolate and identify Lactic acid bacteria from dairy products, which were later used as probiotic and determination its oral administration with isolated bacteria for 7 days as a challenge to *Salmonella enterica serovar typhimurium* (STM) infection and comparing that with ciprofloxacin as an antibiotic . Ten isolate were isolated which belongs to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*.

Two species of isolated *Lactobacillus* *L. bulgaricus* and *L. delbrueckii* were used as a probiotics , feeding single oral dose of one daily numbers of 1.3×10^8 cells / ml, while rat pathogenic isolates bacteria (STM) and the same numbers, and compared with antibiotic with two concentration 0.5 and 1.0 mg / ml.

The results showed after first day from feeding the positive impact of the two types of bacteria effective in the treatment of *Salmonella* infection, better than the antibiotic suggestion the efficiency of the using of these types as probiotic.