عزل وتشخيص بعض انواع بكتريا حامض اللاكتيك من اللبن الرائب المحلي واختبار قابليتها كمعززات حيوية*

عماش عطية سعيد

جامعة الموصل / كلية الزراعة والغابات

(قدم للنشر في ٢٠١٨/١١/١٧ ، قبل للنشر في ٢٠١٨/١٢/٤)

ملخص البحث: أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة– جامعة تكريت للمدة من بداية شهر اب ٢٠١٧ لغاية اذار ٢٠١٨ بهدف عزل وتشخيص بعض انواع بكتريا حامض اللاكتيك (LAB) من عينات اللبن الرائب (Yogurt) المحلي واختبار فاعلية تلك الانواع البكتيرية في كونها معززات حيوية (Probiotics) تبين من نتائج الدراسة امكانية تشخيص اربعة انواع من عزلات بكتريا حامض اللاكتيك هي *Lactobacillus plantarum ,Lactobacillus acidophilus ,Lactobacillus rhamnosus ,Lactobacillus crispatus* كما تبين كفاءتها في إمكانية استعمالها كمعززات حيوية وذلك لقابليتها في تحملها الأس الهيدروجيني الواطئ في مستوى2 ،3 ،4 ,5 ,6 , 7 ,8 و 9 على التوالي لكل منها والمستوى المرتفع من تراكيز املاح الصفراء عند 0.05 ,0.1 ,0.2 ,0.3 ,0.4 ,0.5 ملغم/ مل على التوالي. كما تبين من النتائج قدرة المركزات من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك في أعلاه في تثبيط بكتريا *Salmomella typhimurium* بمعدلات اقطار بين ٢١ الى ٢٤ ملم، ولم يكن الكولاجين ذا قدرة تثبيطية.

Identifying and Isolation some of the Species of the Lactobacillus from Specimens of the Local Yoghurt

Abstract: This study was conducted in the laboratories of the Department of Nutrition Sciences, College of Agriculture, University of Tikrit, from early August 2017 to late March 2018. The study aimed at identifying and isolating some of the species of the Lactobacillus (LAB) from specimens of the local yoghurt. The results of the study show that it is possible to identify four species of Lactobacillus. They are: Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, and Lactobacillus crispatus. Also, the results show that they can be effectively used as probiotics on the basis of their endurance to the low PH in the level 2,3,4,5,6,7,8 and 9, respectively for each of them, and the high level of the concentrations of the bile salts at 0.05,0.1,0.2,0.3,0.4 and 0.5 mg/ml., respectively. Moreover, the results show that the concentrated doses of these species have the ability of inhibiting the Salmonella typhimurium within diametric averages ranging from 21-24 ml., and that the collagen had no inhibiting ability.

* بحث مستل من اطروحة الدكتوراه الموسومة تقييم التغيرات الحيوية والمناعية في الجرذان المعطاة فمويا من بعض انواع بكتريا حامض اللاكتيك والكولاجين للطالب عماش عطية سعيد باشراف أ.د. محمود اسعد عائد و أ.د. كركز محمد ثلج

المقدمة:

تمتلك بكتريا حامض اللاكتيك صفة التاثير التثبيطي ضد العديد من الاحياء المجهرية ويعود استخدام هذه البكتريا في تحسين حفظ الاغذية في قابليتهاعلى تثبيط نمو الاحياء المجهرية المرضية او تلك المسببة لتلف الاغذية ويعد هذا الاستخدام احد الوسائل الطبيعية للحد من نمو الكائنات غير المرغوب فيها وقد اطلق على هذا النوع من الحفظ بالحفظ الحيوي (Thomas *et al*,1997).

تخضع المعززات الحيوية لقانون سلامة الغذاء العام، ولكي تصنف الاحياء المجهرية في انها امنة لاستعمالها في الاستهلاك البشري في الولايات المتحدة فانه يجب ان تمتلك ترخيص من Generally Regarded As Safe (GRAS) التي تعد بانها من اكثر المنظمات ذات العلاقة في اصدار التصريحات الخاصة في إمكانية الاستخدام الامن للمواد الغذائية او مضافاتها، وتندرج هذه المنظمة ضمن هيئة إدارة الاغذية والعقاقير Food and Drog Administration (FDA). اما في اوروبا فان الهيئة المسماة EFSA وضع مصطلح Qualified Presumption of safety(QPS) حيث QPS تعد الأكثر في تقييم بعض المعايير للمواد المضافة الى الأغذية وكذلك في تقييم سلامة البكتريا كمضافات غذائية او مكملات Supplements بما ذلك تاريخ سلامتها او امانها للاستخدام وعدم وجود خطر اكتسابها المقاومة للمضادات الحيوية (Shinde,2012) .

مواد البحث وطرائقه

جمعت ٢٤ عينة عشوائية من اللبن الرائب المتداول استهلاكه في الأسواق المحلية لمحافظة صلاح الدين في مناطق تكريت، والحجاج والشرقاط للمدة بين شهري تشرين الثاني وكانون الأول ٢٠١٧ . وضعت العينات في اوعية نظيفة ومعقمة وبعد تعليمها نقلت إلى المختبر وتم حفظها في حرارة الثلاجة لحين اجراء عمليات العزل الميكروبي منها وكما في (Roberts and Greenwood, 2003) . تم عزل انواع بكتريا حامض اللاكتيك إعتماداً على طريقة(Cruirhshank *et al.*, 1975). وحُفظت عزلات بكتريا حامض اللاكتيك للعمل اليومي وفق (Contreras *et al*,1997) . كما تم حفظ عزلات بكتريا حامض اللاكتيك لمدة طويلة وفق (Lewus et al,1991) .

تم اجراء الفحص المزرعي لتشخيص بكتريا حامض اللاكتيك ، إذ شُخّصت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية وفق ما ذكر (Baily *et al.*,1994). وتم إعداد وفحص الشرائح

المجهرية للعزلات حسب ما جاء في(Holt *et al.*,1994) . ثم تم اجراء الاختبارات المزرعية والتي اشتملت على النمو بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl إعتماداً على (Teuber,1995) .و تم تنمية العزلات البكتيرية على درجات حرارية مختلفة حسب ما جاء في(Gilliland,1994) .

تم اجراء مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية والتي تضمنت الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الكاتاليز وفق (Collee *et al.*,1996) . والكشف عن إنتاج إنزيم الأوكسديز من قبل العزلات البكتيرية وفق (Bensons,2005) . ثم تم اختبار قابلية العزلات البكتيرية على تخمير بعض انواع السكريات وحسب طريقة (Cowan,1985) .وقدرتها على إسالة الجلاتين بحسب (Baron andFinegold,1994) . و تحلل الأرجنين وإنتاج الأمونيا وفق (Carr et al.,2002) .ودراسة قدرتها على الحركة وإنتاج كبريتيد الهيدروجين وفق (Teuber,1995) .

تم إختبار قابلية العزلات على النمو في قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني (Holt *et. al.*,1994) وتم إختبار قابليتها على النمو في تراكيز مختلفة من املاح الصفراء (Brashars *et. al.*,1998) تم الحصول على بكتريا *Salmonella typhimurium* المرضية من مركز ميديا الطبي في اربيل لدراسة الفعالية التضادية مع البكتريا قيد الدراسة وتم اجراء بعض الفحوصات التأكيدية للتأكد من صحة تشخيص العزلة وكما في (Holt *et al*,2005) . ثم إختبار الفعالية المضادة للعزلات المستخدمة تجاه بكتريا *Salmonella typhimurium* بواسطة تقنية الانتشار في الحفر بموجب ما وصفه (Vignolo *et al.*, 2000)

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص أنواع بكتريا حامض اللاكتيك

تم الحصول على ٤ عزلات نامية متشابهة في صفاتها المظهرية، وقد شخصت العزلات مبدئياً بالاعتماد على تكوينها هالة شفافة حول مستعمراتها النامية على وسط MRS–agar الحاوي على كاربونات الكالسيوم $CaCo_3$ بنسبة0.5%. تعمل هذه البكتريا بفعل ما تنتجه من حوامض عضوية مثل حامض اللاكتيك على تحلل مادة كربونات الكالسيوم مكونة الهالات الشفافة المحيطة بالمستعمرات النامية على هذا الوسط (Teusink and Molenaar ,2017) لكنه لايسمح للتمييز بين انواع بكتريا

حامض اللاكتيك العصوية والكروية وهذا يتفق مع ما أشار إليه (De Man *et al*,1990) .

التشخيص الى مستوى الجنس

أظهر الفحص المجهري للمستعمرات النامية على وسط MRS–agar بأن العزلات الأربعة موجبة لصبغة كرام وغير مكونة للأبواغ (non– spore forming) جميعها عصوية الشكل , وتعود مثل هذه الصفات غالباً إلى جنس العصيات اللبنية Lactobacillus . أن هذه النتيجة قد اتفقت مع ما ذكره (Ahirwar *et al* ,2017;Hugenholtz ,1998)، لهذا تم استبعاد أن تكون إحداها تابعة لجنس Bifidobacterium لعدم ملاحظة أشكال الخلايا المميزة لأنواع هذا الجنس والتي أشار اليها (Willey *et al*, 2008) بكونها عصوية متغايرة ذات شكل منحني منتفخ من المركز, وتنتظم سلاسلها بشكل حرف Y . لذا فأن الأربع عزلات مبدئياً تقع ضمن جنس Lactobacillus وهذا أتفق مع ما ذكره (Salminen *et al.*,2004) .

لغرض تاكيد التشخيص مبدئياً لهذه العزلات تم زرعها بطريقة التخطيط على وسط SL–agar الذي يعد وسطاً اختيارياً لنمو الأنواع التابعة لجنس العصيات اللبنية Lactobacillus فقط (Hassan *et al*, 2010) . أظهرت نتائج الزرع قدرة العزلات في النمو على هذا الوسط (SL–agar) . وقد بدت المستعمرات النامية بالوان بيضاء مائلة إلى الصفرة ومحدبة ولزجة قليلاً وذات حافات ملساء متموجة وان هذا الوصف قد اتفق مع ما ذكره (Johnsson *et al.*,1995) وكذلك اتفق مع ما ذكره (الجنابي ,٢٠١٢) . ان اشكال مستعمرات العزلات النامية اعلاه ظهرت على وسط MRS–agar بعد مرور (48) ساعة تحت الظروف اللاهوائية أشكالاً مختلفة بعض منها دائرية والاخرى بيضوية اومغزلية وبلون أبيض مائل إلى الصفرة وحافاتها ملساء وغالبية هذه المستعمرات غير لماعة ناعمة الملمس ولزجة، بعضها محدب قليلاً والبعض الأخر مسطح نسبياً . ان الصفات المشار اليها قد اتفقت مع صفات انواع جنس بكتريا حامض اللاكتيك من الجنس Lactobacillus كما ذكر ذلك (Wang *et al*,2014) .

التشخيص الى مستوى النوع

بعد تشخيص العزلات إلى مستوى الجنس، تم إجراء بعض الاختبارات الزرعية والكيموحيوية التأكيدية لغرض استكمال التشخيص إلى مستوى النوع والتي تضمنت الاختبارات التالية:

الاختبارات الزرعـــية

أظهرت نتائج الاختبارات المزرعية للعزلات التي تبين انها انواع من جنس بكتريا Lactobacillus الجدول (١). تبين أن العزلات العصوية كان لها القدرة على النمو عند حرارة 37 مْ و 45 مْ ولم يكن لها القدرة على النمو عند حرارة 10 مْ. إن العزلات التي تمتلك تلك المواصفات تكون تابعة للأنواع العصوية المحبة للحرارة التي تستعمل ضمن مزارع البادئات المحبة للحرارة Thermophilic starter culture. وبما إن هذه العزلات ليس جميعها متجانسة التخمر لذلك فانها تكون ضمن مجموعة Thermobacterium حسب (Maqsood *et al*,2013; Kovalenko *et al*, 1989).

أما فيما يتعلق بقدرة العزلات البكتيرية على تحمل مستويات مختلفة من الملوحة فقد أظهرت النتائج بأن جميع العزلات قد استطاعت من النمو عند تركيزي 2 و 4% من كلوريد الصوديوم NaCl ، غير أنها لم تستطع تحمل تركيز 6.5 % من كلوريد الصوديوم. ان هذه النتيجة قد اتفقت مع ما ذكره (Wassie and Wassie , 2016).

جدول (١) الاختبارات الزرعية لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك.

نوع الفحص / نوع العزلات	تفاعل كرام	تكوين الابواغ	النمو على وسط MRS	النمو في درجات حرارة مختلفة (م°)				النمو في تراكيز NaCl مختلفة (%)			
				١٠	٣٧	٤٥	٢	٤	٦.٥	فحص الكاتليز
العزلة ١	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−
العزلة ٢	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−
العزلة ٣	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−
العزلة ٤	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−

أظهرت النتائج بأن جميع العزلات التابعة لبكتيريا حامض اللاكتيك كانت غير متحركة (Non-motile) . ان هذه النتيجة قد أتفقت مع ما ذكره (Wassie and Wassie , 2016)، كذلك تطابقت مع ماوجده (Salminen *et al.*,2004) عن صفات الجنس Lactobacillus التابعة لها انواع العزلات قيد الدراسة.

الاختبارات الكيموحيوية

أظهرت نتائج الأختبارات الكيموحيوية بأن جميع العزلات العصوية كانت سالبة لأختبار الأوكسيديز والكتاليز وهذه النتيجة قد أتفقت مع صفات بكتيريا حامض اللاكتيك التي أشار اليها (Thakur et al ,2017; Tserovska *et al*, 2004) . كذلك اتفقت مع ما توصل إليه (الدوري، ٢٠١٠) . يعزى كون بكتيريا حامض اللاكتيك سالبة لاختبار الكتاليز ذلك لعدم إمتلاكها لإنزيم البيروكسديز (Peroxidase) الذي يعمل على تحلل مادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى ماء وغاز الأوكسجين O_2 الذي يعد المسؤول عن تكون الفقاعات إثناء الاختبار (Mithun *et al,* 2015; Bhardwaj *et al*, 2012) . كما أظهرت النتائج بأن جميع العزلات غير قادرة على إسالة الجيلاتين ويعزى سبب ذلك إلى عدم إمتلاكها لأنزيم الجيلاتينيز (Gelatinase) (Chakraborty and Bhowal, 2015) .ان هذه النتيجة جاءت متفقة مع ماذكره (Hassan *et al* ,2010) .

أما بالنسبة لأختبار إنتاج غاز الأمونيا NH_3 من تحلل الحامض الأميني الأرجنين فقد أظهرت النتائج بأن العزلات غير منتجة لغاز الأمونيا(Thakur *et al*, 2017) .

كذلك فيما يتعلق بأختبار إنتاج غاز ثاني أُوكسيد الكاربون CO_2 من تخمر سكر الكلوكوز فقد أظهرت النتائج بأن جميع عزلات بكتيريا حامض اللاكتيك العصوية الشكل التابعة لجنس Lactobacillus كانت غير منتجة لغاز ثاني أُوكسيد الكاربون مما يدل على إن جميع هذه العزلات هي من الانواع متجانسة التخمر وهذه النتيجة كانت متفقه مع ماوجدته (السعدي ,٢٠١٠) . كما اتفقت نتيجة الاختبار السالبة لتحلل الأرجنين من العزلات قيد التشخيص مع ما اشار اليه (Makete ,2015) .

أما عن حالة أختبار الحركة وقابليتها في إنتاج غاز ثاني كبريتيد الهيدروجين (H_2S) فقد أظهرت النتائج بأن جميع العزلات كانت غير منتجة لغاز H_2S وغير متحركة وهذه النتيجة متفقة مع صفات الأجناس التابعة لها العزلات إذ أشارا (Chakraborty and Bhowal, 2015) إلى أنَّ العزلات التابعة لجنس

Lactobacillus قد امتازت بكونها غير منتجة لغاز ثاني كبريتيد الهيدروجين H_2S على وسط (SIM) Sulfide– Indol–Motility الشبة الصلب.

يعد اختبار تخمر السكريات من الاختبارات المهمة في تشخيص انواع بكتريا حامض اللاكتيك LAB إلى مستوى الأنواع والتفرقة بين انواعها المختلفة. وقد أمكن الاستدلال على ايجابية الفحص او سلبيته من التغير في لون وسط التخمر من الاحمر الارجواني الى الاصفر اذا كان الاختبار ايجابياً. وان ذلك التغير في اللون يعزى إلى إنتاج الحوامض العضوية من تخمر السكريات بفعل بكتيريا حامض اللاكتيك التي تعمل على خفض الأُس الهيدروجيني للوسط الحاوي على دليل الفينول الأحمر Phenol Red الذي يكون ذو لون أحمر في الوسط القاعدي وذو لون أصفر في الوسط الحامضي (Makete ,2015). لذا فقد تم استعمال (٩) أنواع من السكريات لاختبار قدرة العزلات على استهلاكها كمصدر للكربون وإنتاج الطاقة. فقد أظهرت العزلات الأربعة تبايناً واضحاً في قدرتها على تخمير السكريات وكما مبين في جدول (٢) اذ كانت العزلة تعود للنوع *L.Acidophilus* التي تبين انها مخمرة لكل من الكلوكوز و السكروز و اللاكتوز والرافينوز والمانيتول والمالتوز وغير مخمرة للسكريات الاخرى. ان هذه النتائج قد اتفقت مع ماذكره كل من (Pyar and Peh, 2014; Mithun *et al*, 2015).

اما العزلة رقم ٢ فقد تبين اعتمادا الى الصفات التي ظهرت بها بانها تعود الى النوع *L.plantarum* فقد كانت مخمرة لكل من الكلوكوز والكالكتوز والسكروز واللاكتوز والفركتوز والمانيتول والمالتوز والزايلوز وليس لها القدرة في تخمير الرافينوز. ان النتائج اعلاه قد اتفقت مع نتائج تخمر السكريات لسلالة بكتريا *L.plantarum* المعزولة من قبل (Emanuel *et al*, 2005) من المصادر الطبيعية واستخدمها بهدف الحفاظ وتحسين جودة الأعلاف في صوامع بوخارست. اما العزلة رقم ٣ فقد ظهرت بانها تعود الى النوع *L.crispatus* التي تبين انها مخمرة لكل من الكلوكوز والكالكتوز والسكروز واللاكتوز والرافينوز والمانيتول والمالتوز وغير مخمرة للفركتوز والزايلوز. وقد كانت هذه النتائج متفقه مع ماوجده (Kovalenko *et al*, 1989). كما ان العزلة رقم ٤ فقد ظهرت من الاختبارات التي اجريت عليها بانها تعود الى النوع البكتيري *L.rhamnosus* فقد أظهرت نتائج تخمير ايجابية لكل من الكلوكوز والكالكتوز والسكروز واللاكتوز والفركتوز والمالتوز ونتيجة سلبية لتخمير السكريات

الأخرى قيد الدراسة. وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره (Erkus ,2007; Ahirwar *et al*,2017) .

تشخيص البكتريا المستخدمة في الاختبار:

بعد ان تم الحصول على بكتريا *Salmonella typhimurium* المرضية من مركز ميديا الطبي في اربيل ، تم تأكيد التشخيص بإجراء الاختبارات الكيموحيوية الكافية للوقوف على النوع البكتيري التي تضمنها جدول(٣) . ان النتائج التاكيدية التي تم الحصول عليها قد اتفقت مع ماذكره (Winn, *et al.*, 2006) .

جدول (٢) اختبار تخمر السكريات لانواع بكتريا حامض اللاكتيك قيد الدراسة

نوع العزلات	نوع السكريات المستعملة في الاختبار								
	كلوك وز	كالك توز	سكر وز	لاكتو ز	رافينو ز	مانيـ تول	فركتو ز	زايلو ز	مالتو ز
L. acidophilus	+	−	+	+	+	−	−	−	−
L. Plantarum	+	+	+	+	−	+	+		+
L. Crispatus	+	+	+	+	+	+	−	−	+
L.rhamnosus	+	+	+	+	−	−	+	−	+

(+) نتيجة موجبة , (−) نتيجة سالبة

الاختبارات الخاصة بالمعزز الحيوي:-

خضعت عزلات انواع بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة لمجموعة من الاختبارات التي من خلالها يحكم على اعتبار هذه الانواع البكتيرية معززات حيوية. ان الاختبارات المشار اليها تكون ناتجة عن بعض الصفات التي يتميز بها النوع البكتيري دون الاخر، ومن اهمها هي قدرتها على تحمل الظروف البيئية داخل القناة الهضمية كحموضة المعدة او مقاومة أملاح الصفراء وتثبيط او المنافسة مع مسببات الأمراض في الأمعاء.

اختبار تحمل مستويات مختلفة من الأس الهيدروجيني

أظهرت نتائج اختبار تحمل الأُس الهيدروجيني pH- tolerance كما في الجدول (٤) بأن جميع أنواع بكتيريا حامض اللاكتيك المدروسة استطاعت النمو عند أُس هيدروجيني تراوح مابين (3-8) لكنها لم تستطيع النمو في البيئة الحامضية عند أُس هيدروجيني (2) وكذلك لم تستطيع النمو في البيئة القاعدية عند أُس هيدروجيني (9) بعد التحضين . بينما تباينت قدرة الأنواع على النمو عند الأسس الهيدروجينية (3 ,4 و8) , حيث أظهرت النتائج قدرة بكتيريا *L.acidophilus* على النمو عند أُس هيدروجيني (3-7) وعدم قدرتها على النمو عند أُس هيدروجيني (8) وهذه النتيجة قد أتفقت مع ما ذكره (Dixit *et al* ,2013;Soliman *et al* ,2015) عن قدرة هذه البكتيريا على تحمل الظروف الحامضية حيث أشارا إلى إن هذه البكتريا تقاوم الأس الهيدروجيني ٢.٥ لمدة ٤ ساعات, كذلك اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره (السعدي, ٢٠١٠ والجبوري,٢٠١٥).

جدول (٣) الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية لعزلة بكتريا *S. Typhimurium*

الاختبارات التاكيدية لتشخيص العزلة *S.Typhimurium*

نوع العزلة	Gram stain	Motility	Urease	proska -	Indol	H2S	Citrate	Glucose	Mannit	Lactos
S. typhimurium	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−

(+) نتيجة موجبة , (−) نتيجة سالبة

كذلك أظهرت النتائج قدرة بكتيريا *L. plantarum* على النمو عند أُس هيدروجيني (5−7) ولم تستطيع النمو في الوسط القاعدي عند أُس هيدروجيني (8) وهذه النتيجة أتفقت مع ما ذكره (Emanuel, 2005) عن قدرة هذه البكتيريا المعزولة على تحمل المستويات المنخفضة من الأس الهيدروجيني التي استخدمها في حفظ الأعلاف من التلف, في حين ذكر Melgar−Lalanne وآخرون (2014) ان بكتريا*L.plantarum* تنمو ضمن مدى (4−8) من الأس الهيدروجيني وتحت (2) أو(9) فما فوق فانه يعتبر قاتل لهذه البكتريا . كذلك أتفقت مع ما ذكره (Balasingham *et al*, 2017) بان *L.acidophilus* و *L.plantarum* المعزولة من أمعاء الخنزير استطاعت تحمل مدى واسع من الاس الهيدروجيني (2−9) والتي وجد أنها تمتلك خصائص جيدة كمعززات حيوية.

أما فيما يتعلق ببكتريا *L.crispatus* فقد أظهرت النتائج قدرتها على النمو ضمن مدى من الأس الهيدروجيني (4 − 7) ولم تستطع النمو على الأس 3.5 و7.5 اتفقت هذه النتيجة مع ما حصل عليه (Chang *et al*, 2001) الذي أشار إلى إن الأس الأمثل لنموها هو 5.5.

كما أظهرت النتائج قدرة بكتيريا *L.rhamnosus* على النمو ضمن مدى من الأس الهيدروجيني الذي تراوح بين (3−8) وهذه النتيجة أتفقت مع (Ashraf and Smith, 2016) اللذان اذكرا ان الـpH الامثل لها (5.4−6.4) ولكنها لم تستطيع

النمو عند الأس الهيدروجيني (9.6) وهذه النتيجة اتفقت مع ما أشار إليه كل من (Bayane *et al*,2006) يمكن ان يُعزى سبب تحمل بكتيريا حامض اللاكتيك للظروف الحامضية إلى وجود حامض Lipoteichoic acid والعديد من الأحماض الأمينية الكارهة للماء Hydrophobic في بروتين الطبقة (S–layer proteins) للجدار الخلوي لهذه البكتريا حيث انه يعمل كحاجز وقائي ميكانيكي يحمي البكتريا من الظروف والبيئات غير الملائمة وكذلك يعمل على التصاق البكتريا على مختلف الركائز والأسطح (Gerbino *et al*, 2015) .

جدول (٤) نمو بكتريا حامض اللاكتيك في قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني.

انواع العزلات	مستوى الاس الهيدروجيني المستعمل						
	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩
L.acidophilus	−	+	+	+	+	+	−	−
L.plantarum	−	−	−	+	+	+	−	−
L.crispatus	−	−	+	+	+	+	−	−
L.rhamnosus	−	+	+	+	+	+	+	−

(+) نتيجة موجبة , (–) نتيجة سالب

اختبار النمو في تراكيز من املاح الصفراء

اشترطت العديد من المراجع العلمية لكي تعتبر اي سلالة ميكروبية سلالة داعمة للحيوية لا يكفي أنها تحدث الأثر الحيوي، لكن المهم هو وصول نسبة كبيرة من هذه الأحياء إلى أماكن تواجدها في الأمعاء حتى يمكنها إحداث التوازن الحيوي, لذلك يعد اختبار قدرة الأنواع البكتيرية على النمو في تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء من الاختبارات المهمة واللازم إجراءها عند اختبار الأنواع البكتيرية المراد استعمالها كمعزز حيوي. فقد أشار (Passariello *et*

al,2014) إلى ضرورة إجراء هذا الاختبار للأنواع البكتيرية المراد إعطائها فموياً كجرع من المعزز الحيوي للتأكد من ضمان بقائها حية بوجود تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء Bile salts في الأمعاء .

أظهرت نتائج الأختبارات كما في الجدول (٥) بأن جميع أنواع بكتيريا حامض اللاكتيك قيد الدراسة كانت غير قادرة على النمو عند التركيزين 0.4 و 0.5% من أملاح الصفراء بينما أستطاعت هذه الأنواع النمو في التراكيز 0.05 و 0.1 , 0.2 و0.3 % من أملاح الصفراء , بهذا نجد بأن جميع انواع العزلات من بكتريا حامض اللاكتيك قد استطاعت من النمو عند مدى يتراوح بين0.05–0.3 % من املاح الصفراء .

جدول(٥) قدرة انواع بكتريا حامض اللاكتيك من النمو بتراكيز من أملاح الصفراء .

قابلية النمو للانواع البكتيرية لحامض اللاكتيك في تراكيز من املاح الصفراء (%)

انواع العزلات	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
L.acidophilus	+	+	+	+	–	–
L.plantarum	+	+	+	+	–	–
L.crispatus	+	+	+	+	–	–
L.rhamnosus	+	+	+	+	–	–

(+) نتيجة موجبة , (–) نتيجة سالبة

اتفقت هذه النتيجة مع العديد من الدراسات حيث ذكر (Balasingham *et al*, 2017Sahadeva *et al*, 2011;) أن سلالات المعززات الحيوية الشائعة الاستخدام تجارياً لها القدرة على النمو بوجود أملاح الصفراء لحد تركيز 0.3% ولم تستطع النمو على الأعلى منه. واتفقت مع (Kabore *et al*, 2012;Hassanzadazar *et al*, 2012; والجبوري ,٢٠١٥) , كما اتفقت مع (Soliman *et al*,2015) الذي ذكر بان بكتريا *L.acidophilus* أظهرت نمو أفضل من بكتريا *L.plantarum* عند تركيز 0.3% من أملاح الصفراء بعد مرور ٢٤ ساعة من التحضين.

أشار (Boke *et al*.,2010) إلى أنَّ جميع أنواع بكتيريا حامض اللاكتيك التي تستطيع النمو بوجود أملاح الصفراء بتركيز يتراوح مابين 0.15 %– 0.3% تكون مناسبة لاستعمالها كمعزز حيوي يؤخذ من خلال الفم. بهذا أتضح بأن جميع الأنواع المستعملة قيد الدراسة كانت مناسبة لاستعمالها كمعزز حيوي .

تمتاز بكتيريا حامض اللاكتيك التي تستطيع النمو بوجود أملاح الصفراء بامتلاكها لإنزيم Bile salt hydrolase (BSH) الذي يعمل على تحفيز عملية تحلل أملاح الصفراء المقترنة مع الحامض الاميني Glycine أو Taurine لتكوين أملاح الصفراء غير المقترنة مع الحامض الأميني والتي تكون أقل ذوباناً لذلك تطرح خارج الجسم مع البراز Feces وتعوض هذه الأملاح بأخرى جديدة عن طريق تصنيعها داخل الكبد من الكوليسترول لذا تعتبر عملية طرح أملاح الصفراء إلى خارج الجسم من أحدى الآليات للتخلص من الكوليسترول الزائد في الجسم (Vasiee *et al*, 2014).

إن التأثير القاتل للبكتريا يحدث نتيجة تعرضها لأملاح الصفراء ومن ثم يحدث خلل في التوازن الخلوي بسبب تفكك وانحلال طبقة الدهون الثنائية والبروتين المكونة لأغشية الخلية بشكل كامل مما يودي إلى تسرب المحتوى البكتيري وبالتالي موت الخلية (Sahadeva *et al*, 2011 ; Hassanzadazar *et al*, 2012).

اختبار القابلية التثبيطية لبكتريا المعززات الحيوية ضد بكتريا السالمونيلا

ان القدرة التثبيطية لمركزات خلايا بكتريا حامض اللاكتيك ضد *S.typhimurium* قد وضحها الجدول (٦) . تبين من النتائج ان مركزات خلايا المعززات الحيوية من انواع بكتريا حامض اللاكتيك قد ثبطت جميعها النمو لبكتريا *S.typhimurium* . كان اكثرها قدرة تثبيطية هما النوعان *L.rhamnosus* و

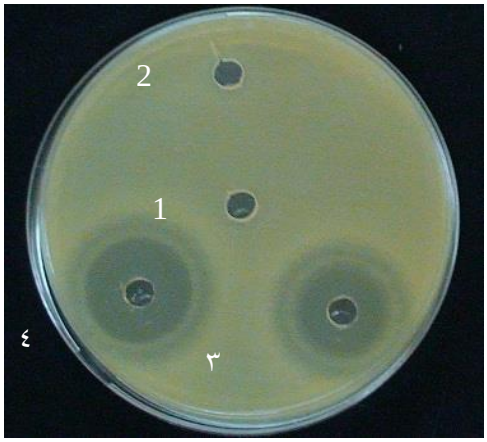
L.plantrum حيث كان قطر منطقة التثبيط لكل منهما عند ٢٤ و ٢٣ ملم على التوالي. تبعها في القابلية التثبيطية النوع *L. acidophilus* عند قطر تثبيط ٢٢ ملم وكانت الاخيرة في القدرة التثبيطية للنوع *L.crispatus* عند ٢١ ملم. كانت الانواع من المعززات الحيوية عند قدرة تثبيطية متوسطة لكل منها ضد بكتريا *S.typhimurium* شكل (١). اما قدرة الكولاجين التثبيطية فقد كانت معدومة اذ ان قطر التثبيط لم يتجاوز ١ ملم شكل (٢). إتفقت النتائج مع (Radulovic *et al*, 2010) ومع ماذكره (Hassoon, 2005) الذي أثبت فعالية العصيات المحبة للحموضة تجاه عشرة أجناس جرثومية من ضمنها *Salmonella typhi* .

يمكن إن يعود التأثير التثبيطي لانواع المعززات الحيوية من انواع بكتريا حامض اللاكتيك الى عوامل متعددة منها الوسط الحامضي الناتج عن فعاليات البكتريا التخميرية اضافة الى قابلية الانواع من المعززات في انتاج المركبات الايضية المثبطة للبكتريا المرضية منها H_2O_2 و البكتيريوسينات والجزيئات الفعالة الاخرى (Servin, 2004, Monsulla, 2008).

جدول (٦) القدرة التثبيطية لانواع مكونات المعاملات ضد بكتريا Salmonella

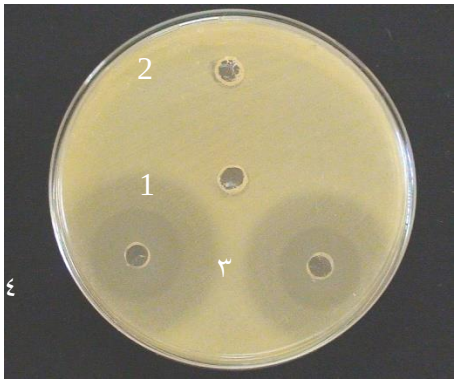
انواع بكتريا حامض اللاكتيك والكولاجين	قدرة التثبيط ضد *S. typhimurium*	
	قطر التثبيط (ملم)	القدرة التثبيطية
L. acidophilus	22^{b}	متوسطة
L.rhamnosus	24^{a}	متوسطة
L. plantrum	23^{a}	متوسطة
L. crispatus	21^{b}	متوسطة
الكولاجين (٢٥٠ ملغم/لتر)	1^{c}	غير مثبطة

الاحرف المختلفة على المعدلات في العمود الواحد تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية عند مستوى معنوية ٠.٠٥



شكل (١) الفعالية التثبيطية للكولاجين وعزلتي *L. acidophilus* و ***L.rhamnosus* ضد *S.typhimurium* .**

الحفرة ١ : الوسط الزرعي للتنمية ، الحفرة ٢ : الكولاجين ٢٥٠ملغم/لتر ، الحفرة ٣ : مركز العزلة ***L.acidophilus* ، الحفرة ٤ : مركز العزلة ***L.rhamnosus*** .**



شكل (٢) نتائج الفعالية التثبيطية للكولاجين وعزلتي *L. plantrum* و *L. crispatus* ضد *S.typhimurium* .

الحفرة ١ : السيطرة ،الحفرة ٢ : الكولاجين ، الحفرة ٣: مركز العزلة *L. crispatus* ، الحفرة ٤: مركز العزلة *L. plantrum* .

الاستنتاجات:-

١- امكانية أن تكون العزلات من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك من اللبن الرائب معززات حيوية.

٢- وجميع العزلات من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك ظهرت إنها ذو قابلية تحمل للأس الهيدروجيني الواطئ, والتراكيز المرتفعة من املاح الصفراء الذي يجعل منها بمواصفات المعززات الحيوية.

٣- امتلكت العزلات من المعززات الحيوية قدرة تثبيطية واضحة تجاه بكتريا *S.typhimurium* المسببة لالتهاب الامعاء داخل وخارج جسم الكائن الحي.

التوصيات:-

١- اجراء دراسات حول أهمية استخدام المعززات الحيوية غير التابعة لبكتريا حامض اللاكتيك ومعرفة تأثيراتها تجاه ممرضات أخُرى مثل *Listeria,Shigella,H.pylori*

٢- اجراء دراسات حول المعززات الحيوية الجاهزة ذات العلامات التجارية المتوفرة في الأسواق وتاكيد تشخيصها ودراسة تاثيراتها.

٣- اجراء تجارب حيوية لمعرفة التأثيرات الوقائية للمعززات الحيوية على حالات مختلفة من الامراض كنسوس الاسنان وأمراض الكلى والجهاز البولي والتناسلي في الانسان.

المصادر

الجبوري, محمد جميل محمد سعدون (٢٠١٥), تقدير نسب المضافات والملوثات الغذائية في بعض الأغذية ودور المعزز الحيوي في التقليل من آثارها البايولوجية. (اطروحة دكتوراه) كلية الزراعة – جامعة تكريت.

الجنابي,احمد حسين ضايع فهد (٢٠١٢), دراسة فاعلية بعض أنواع بكتريا حامض اللاكتيك في تخمر حليب فول الصويا (رسالة ماجستير), كلية التربية – جامعة تكريت.

الدوري, صلاح صديم صالح (٢٠١٠), عزل وتشخيص بعض انواع بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية ودراسة تاثيرها على بعض المتغيرات الفسلجية والكيموحيوية في الجرذان نوع Albino (اطروحة دكتوراه), كلية التربية – جامعة تكريت.

السعدي، زينب نشأت شكر(2010) " دراسة قابلية بكتريا *Bifidobacterium Lb. acidophilus bifidum* في الوقاية والعلاج من إلتهاب الأمعاء الحدث

باك *Salmonella typhimurium* في الجرذان" أطروحة دكتوراه , جامعة تكريت .

Ahirwar S.S., Gupta M.K., Gupta G and Singh V (2017). screening isolation and identification of lactobacillus species from Dental caries of children. Int. J. Curr. Microbiol, 6(1): 497-503.

Ashraf R and Smith S.C (2016). Commerical lactic acid bacteria and probiotic strains- tolerance to bile, pepsin and antibiotics. Int. Food. Res. J. 23(2): 777-789.

Baily, S.; Baron, E. and Finegold, S. (1994). "Diagnostic Microbiology" 9th ed., The C. V. Mosby Co., London.

Balasingham, K. Valli, C, Radhkrishnan, L and Balasuramanyam, D (2017). probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from Swine intestine, Veterinary World, 10(7) : 825-829.

Baron, E. J. and Finegold, S. M. (1994)." Diagnostic Microbiology" 9th ed., The C. V., Mosby Company, U.S.A.

Bayane A., Roblain D., Dauphin R.D., Destain J., Diawaru B and Thonant P (2006). Assessment of the physiological and biochemical characterization of a lactic acid bacterium isolated from chicken faeces in sahelian region. Afr. J. Biotechnol, 5(8):629-634.

Bensons, A.E.B.(2005)." Laboraty Manual in general microbiologyapplications"9thed., New York.

Bhardwaj A., Puniya M., Sangu K.P.S., Kumar S and Dhewa T(2012): Isolation and biochemical characterization of lactobacillus species isolated from Dahi. J. Dairy Sci. Techn. 2(2):1-14.

Boke, H. ; Aslim, B. and Gulcin, A. (2010). " The role of resistance to

Chang, C.E, Kim, S., So, J. and Yun, H.S (2001). cultivation of lactobacillus crispatus KLB46 Isolated from Human vagina. Biotechnol Eng. 6:128-132.

Collee, J.G.; Marmion, B.P.; Fraser, A.G. and Simmons, A. (1996)."Practical Medical Microbiology " 14th ed. Churchill Living stone, New York.

Contreras, B. G. L. ; Vuyst, L. ; Devreese, B. ; Busanyova, K.Raymaeckers, J.;Bosman, F.; Sablon, E. and Vandamme,E.J.(1997)."Isolation, Purification, and amino acid sequence of Lactobin A, one of the two bacteriocine produced by *Lactobacillusamylovorus* LMGP.13130" Journal ofApplied Environmental Microbiology, Vol.63,No.1, p.13-20.

Cowan, S. T. (1985)."Manual for the identification of medical bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides produced by Yogurt starter bacteria " Journal of Biological Science Belgrade. Vol.62,No.2, p.323-328

Brashears, M. M.; Gilliland, S. E. and Buck, L. M. (1998)." Bile salts deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei* "Journal of Dairy Sciencce, Vol.41,No.81 p.2103-2109.

Carr, F. J. ; Chill, D. and Maida, N. (2002)."The Lactic Acid Bacteria" A Literature Survey, Critical Reviews in Microbiology, Vol.28,No.4, p.281-370.

Chakraborty.A, and Bhowal. J (2015). Isolation, Identification and analysis of probiotic properties of Lactobacillus spp. From selected Regional Dairy product. Int. J. curr. Microbiol. App. Sci,4(6) :621-628.

bacteriology" 2nd ed., Cambridge University press London p.113 – 127.

Cruickshanke, R. ; Duguid, J. P. ; Marmion, B. P. and Swain, R. H. (1975)." Medical microbiology :A guide to the laboratory diagnosis control of infection" 12th ed., The English Language book society (E. L. B. S.), Vol.1, p.327-333.

De Man, J. C.; Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1990). A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 32, 130-135.

Dixit.G, D. Samarth, V. Tale and R. Bhadekar. (2013). comparative studies on potential probiotic characteristics of lactobacillus acidophilus strains. EurAsian Journal of BioSciences, 7: 1-9

Emanuel, V., V. Adrian, P. Ovidiu, and Gheorghe, C. (2005). Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *Afr. J. Biot.*, 4: 403- 408.

Erkus, O.(2007). "Isolation Phenotypic and Genotypic characterization of Yogurt starter bacteria " Izmir institute of technology, master thesis, p.22

Gerbino. E, Mobili.P, Serradell. M.A Carasi.P, and Gomez-zavaglia,A (2015). Role of S-layer proteins in bacteria. World J Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s 11274-015-1952-9.

Gilliland S.E (1994). Bacterial starter culture for foods. CRS press. Inc. Boca Raton Florida. USA.

Hassan D. Nandita D. Yada SI, Umaru AD. (2010). Lactobacillus bulgaricus and *Streptococcus thermophilus* as Probiotics on Some Clinical Pathogens. Researcher; 2(11):38-41.

Hassanzadazar, H. Ehsani, A. Mardani, K and Hesari, J (2012). investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolate from Koozeh cheese. Veterinary research forum. 3(3) :181-185.

Hassoon, A.F. (2005). Isolation characterization and mass production of Lactobacillus acidophilus as a probiotic for therapeutic use.Ph.D.th.college of medicine, Tikrit University.

Holt, G.; Noel, R.; James, W.; Peter, H. & James, T. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2.

Holt, J. G.; Kring, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. J. & Williams, S. T. (1994). Group 17 gram-positive cocci. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. W. R. and Forlifer, L. E. pp. 527-543.

Hugenholtz P (1998). The Genera of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic & Professional, London, UK.

Johnsson, T. ; Nikkila, P. ; Toivonen, L. ; Rosengvist, H. and Laakso, S.(1995)."Cellular fatty acid profile of Lactobacillus and Lactococcus strain in relation to the oleic acid content of the cultivation medium" Journal of Applied Enviromental Microbiology, Vol.61, No.12, p.4497-4499.

Kabore, D. Sawadogo-Lingani, H. Dicko,M.H. Diawara, B and Jakobsen, M (2012). Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional "maari" baobab seeds fermented condiment. Afr. J. Biotechnol vol. 11(5) pp. 1197-1206.

Kovalenko,N.K, T.N. Golavach and E.I. Kvasniko (1989). lactic acid bacteria in the digestive tract of poultry. Mikrobiol,58:137-143.

Lewus, C. B. ; Kaiser, A. & Montville, T. J. (1991). Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., 57 :1683-1688.

Makete, Goitsemang (2015). Isolation, Identification and screening of potential probiotic bacteria in milk from south African saanen goats. (M.Sc.Thesis) University of Pretoria, South Africa.

Maqsood.S, H. F and Masud.T (2013). characterization of lactic acid bacteria isolated from indigenous dahi samples for potential source of starter culture. Afri Jour of Biotech, Vol. 12(33),pp. 5226-5231.

Melgar-Lalanne,G., Rivera-Espinoza, Y.,Farrera-Rebollo, R and Hernandez-Sanchez, H. (2014). survival under stress of halotolerant lactobacillus with probiotic properties. Revista Maxicona de Ingenieria Guimica 13:323-335.

Mithun, S., V. Dipak, and Sheela, S. (2015). Isolation and identification of lactobacilli from raw milk samples obtained from Aarey milk colony. *Int. J. Scientific and Res. Publications,* 5(4): 1-5.

Monsulla, R.T. (2008). Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborn pathogens and spoilage microorganisms' infresh fruits and vegetables.Ph.D.th.de Girona University.

Passariello, A. Agricole, P and Malfertheiner, P (2014). A critical appraisal of probiotics (as drugs or food supplements) in

gastrointestinal diseases. Curr Med Res Opin : 1-10.

Pyar. H and Peh. K.k (2014). characterization and identification of *Lactobacillus Acidophilus* using biolog rapid identification system. Int J pharm pharm Sci, vol 6, Issue 1, 189-193.

Radulovic Z., Petrovic T., Nedovic V., Dimitrijevic S., Mirkovic N., Petrusic M and Paunovic D (2010). characterization of autochthonous lactobacillus paracasei strains potential probiotic ability. Mljekarstvo, 60(2): 86-93.

Roberts, D. and Greenwood, M. (2003). Practical Food Microbiology. 3 rd ed. Blackwell Publishing Ltd, Osney Mead, Oxford OX2OEL, UK.. p:296.

Sahadeva, R. P. K, Leong., S.F.,Chua, K. H., Tan, C. H., Chan, H. Y., Tong E.V., Wong, S.y.w and Chan, H.K (2011). survival of commercial probiotic strain to be pH and bile. Int. food. Res. J 18(4): 18(4) : 1515-1522.

Salminen,S. ; Wright,A. ; Ouwehand,A. (2004). " Lactic Acid Bacteria, microbiological and functional aspect " third ed., Marcel Dekker, Inc., New York.

Servin,A.L.(2004)."Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens" FEMS Microbiol. Rev., No.28, p.405-440, www.fems-microbiology.org

Shinde P.B (2012). Probiotic : An overview for selection and evaluation. Int J pharm pharm Sci, 4(2): 14-21.

Soliman A.H.S, Sharoba A.M, Bahalh.E.M, Soliman A.S. and Radi O.M.M, (2015). Evaluation of lactobacillus acidophilus, lactobacillus casi and lactobacillus

system, aterritory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin producing lactic acid bacterium. J. Microbiology. 143: 2575-2582.

Tserovska L, Steno S, Yordaufa T, (2004). Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Katyk Goat milk and Cheese. J. Cult collection, Bank IndustriMic Cell Cult: 13: 48-52.

Vasiee, A.R., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A. and Edalation, M.R. (2014). Isolation, Identification and characterization of probiotic lactobacilli spp. From Tarkhineh. Int. food. Res. J 21(6): 2487-2492.

Vignolo, G.M.; Suriani, F.; Holgado, A.P.R. and Oliver, G. (2000). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented Sausages.J. Appl. Bacteriol., 75: 344-349.

plantarum for probiotic characteristics. Meddle East. J. Agric. Res, 5(1): 10-18.

Teuber, M. (1995). "The genus Lactococcus in the genera of lactic acid bacteria". Edited by wood, B. J. and Holzapfel, W. H., p.783-799.

Teusink, Bas and Molenaar, Douwe. (2017). systems biology of lactic acid bacteria : for food and thought. Current opinion in systems biology, 6:7-13.

Thakur. M, Deshpande.H.W. and Bhate.M.A (2017). Isolation and Identification of lactic acid bacteria and their Exploration in non-Dairy probiotic Drink. *Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(4) :1023-1030.

Thomas, L. V. ; Wimpenny, J. W. T. & Baker, G. C. (1997). Spatial interaction between subsurface bacterial colonies in a model

Wang L., Fang M., Hu Y., Yang Y., Yang M and Chen Y (2014). Characterization of most abundant lactobacillus species in chicken gastrointestinal tract and potential use as probiotics for genetic engineering. Acta Biochim Biophys Sin 46(7):612-619.

Wassie M and Wassie T (2016). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Raw Cow milk. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 3(8):44-49.

Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. Prescott, Harley. (2008). Klein's microbiology. 7th.Ed. In: Mouni, F., Aissi, E., Hernandez, J., Gorocica, P., Bouquelet, S., lenteno, E., Lascurain, R., Garfias, Y (2009). "Effect of Bifidobacterium bifidum DSM 20082 cytoplasmic traction on human immune cells". Immunological Investigations. 2009. Vol. 38. p. 104-115.

Winn, J. W. ; Allen, S. ; Janda, W. ; Koneman, E. ; Procop, G. ;Schreckenberger, P. and Woods, G. (2006). "Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology" 6th ed., Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A.