مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد الثالث والعشرون - المجلد التاسع - علوم الحياة - آب 2024 م
doi.org/10.52866/esj.2023.09.23.01

تقييم الفعالية التثبيطية للنواتج الايضية لبعض سلالات *Lactobacillus acidophilus* تجاه النمط المصلي *Salmonella* Typhimurium المسبب للإسهال وتقييم استعمالها كمعزز حيوي

م. د. هيفاء رجب علوان[1] ، م. م. ريهام فراس فارس[2]
[1] قسم علوم الحياة \ كلية التربية للعلوم الصرفة \ جامعة تكريت
[2] قسم علوم الحياة \ كلية العلوم \ جامعة تكريت
hyafaass@tu.edu.iq [1] , Reham.f.faris@tu.edu.iq[2]

مستخلص

هدفت هذه الدراسة الى عزل وتشخيص سلالات من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* من اللبن الرائب المحلي، وتقييم الفعالية التثبيطية للنواتج الايضية لهذه السلالات تجاه النمط المصلي *Salmonella* Typhimurium المسبب للإسهال، كذلك تقييم خصائص هذه السلالات كمعزز حيوي. أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة والمختبرات المركزية في جامعة تكريت للفترة من 1\4\2024 ولغاية 1\7\2023. في هذ الدراسة تم الحصول على ثمان سلالات من *Lactobacillus acidophilus* بنسبة عزل 20 من مجموع عزلات بكتريا حامض اللاكتيك البالغ عددها 40 عزلة. أظهرت النتائج أنَّ النواتج الايضية لهذ السلالات تمتلك فعالية جيد في تثبيط النمط المصلي *Salmonella* Typhimurium المسبب للإسهال، أذ أظهرت السلالتان Lb2 و Lb4 اعلى فعالية تثبيطية بقطر تثبيط 21 ملم، هذه الفعالية التثبيطية كانت أفضل من فعالية المضادات Tetracycline وCeftazidime تجاه Salmonella Typhimurium. فيما يتعلق باختبارات المعزز الحيوي، أظهرت النتائج أنَّ جميع السلالات كانت متحملة للظروف الحامضية المتطرفة ومقاومة لأملاح الصفراء، الا انَّ السلالتين Lb2 وLb4 كانتا الأفضل. كما أظهرت النتائج أنَّ كل السلالات لها القدرة على الالتصاق بالخلايا الطلائية، لكن السلالة Lb2 كانت بالمرتبة الأولى بقدرة التصاق جيدة، إذ بلغ مؤشر الالتصاق الخاص بها 42.5.

الكلمات المفتاحية: *Lactobacillus acidophilus*، المعزز الحيوي، الفعالية التثبيطية، *Salmonella* Typhimurium، الالتصاق، Ceftazidime، Tetracycline

Evaluation of the Inhibitory Effectiveness of Metabolic Products from Lactobacillus acidophilus Strains Against the Diarrhea-Causing Salmonella Typhimurium Serotype and Their Potential Use as Probiotics

Hayfaa Rajab Alwan[1] , Reham Firas Faris[2]
[1]Dept. of Biology, College of Education for pure science, Tikrit University, Tikrit, Iraq
[1]hyafaass@tu.edu.iq
[2]Dept. of Biology, College of science, Tikrit University, Tikrit, Iraq
Reham.f.faris@tu.edu.iq[2]

Abstract :

this study aimed to isolate and identify strains of Lactobacillus acidophilus from local yogurt, and evaluate the inhibitory effectiveness of the metabolic products of these strains against serotype Salmonella Typhimurium that causes diarrhea, as well as evaluate the properties of these strains as a probiotic. This study was conducted in the laboratories of biology department and central laboratories at University of Tikrit from 1/4/2024 to 1/7/2023. In this study, eight strains of Lactobacillus acidophilus were obtained, with an isolation rate of 20% of the total lactic acid bacteria isolates. The results showed that the metabolites of these strains have good activity to inhibit serotype Salmonella Typhimurium that causes diarrhea, as the strains Lb2 and Lb4 showed highest inhibitory effectiveness with an inhibition diameter of 21 mm, this inhibitory effectiveness was better than the activity of Tetracycline and Ceftazidime against Salmonella Typhimurium. Regarding probiotic tests, the results showed that all strains were tolerant to extreme acidic conditions and resistant to bile salts, but strains Lb2 and Lb4 were the best. The results also showed that all strains had the ability to adhere to epithelial cells, but strain Lb2 ranked first with good adhesion ability, as its adhesion index reached 42.5 .

Keywords: Lactobacillus acidophilus, probiotic, inhibitory activity, Salmonella Typhimurium, adhesion, Ceftazidime ،Tetracycline.

المقدمة

حظيت بكتيريا حامض اللاكتيك Lactic acid bac-teria (LAB) باهتمام كبير في مجالات عدة، أذ شغلت مساحة واسعة في دائرة البحوث الطبية والصيدلانية والزراعية لحل العديد من المشاكل الصحية وذلك لما تتمتع به من صفات علاجية ساعدت في حل العديد من المشاكل الصحية. تمتاز بكتيريا حامض اللاكتيك بعدم إنتاجها للمسموم ومقاومتها للحموضة، فضلاً عن انتاجها للعديد من الانزيمات والفيتامينات، ولها القدرة على الالتصاق بجدران الامعاء، وافرازها للعديد من المواد الأيضية ذات التأثير التثبيطي للاحياء المجهرية المرضية، وهي تتواجد طبيعياً في الامعاء والفم والمسالك البولية، اذ تسهم في التوازن الطبيعي الصحي لهذه المناطق (Amelia *et al*., 2021). تنتج هذه البكتريا بيروكسيد الهيدروجين بوجود الاوكسجين ليعطي تاثيراً مثبطا ضد الكثير من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة گرام مسبباً مسخا لعدد من انزيمات هذه البكتريا. اشارت الدراسات الى ان اهم ما تنتجه بكتريا حامض اللاكتيك هي البكتريوسينات Bacteriocins ، وهي مواد مضادة للمايكروبات تنتج من عدة سلالات وهي ذات طبيعة بروتينية تمتلك تاثيراً قاتلاً اكثر من كونها مثبطة، كما تمتاز بقدرتها على الارتباط بمواقع محددة على جدار الخلية البكتيرية (Anjana and Tiwari, 2022). تضم بكتريا حامض اللاكتيك الكثير من الأنواع مثل، النوع *Lactobacillus acidophilus* ، أذ ينتمي هذا النوع إلى جنس عصيات حامض اللاكتيك. اشتق إسم هذا النوع من كلمتين الأولى Lactobacillus وتعني العصيات اللبنية أما الكلمة الثانية Acidophilus وتعني محبة للحموضة لهذا فأنَ اسم هذا النوع من البكتيريا يعني العُصيات اللبنية المحبة للحموضة *Lactobacil-lus acidophilus* (Gao *et al*., 2022). لا ينتج هذا النوع غاز الامونيا NH_3 من الحامض الأميني الأرجنين أ وسالب لاختبار النايتريت Nitrat وليس له القد رة على إسالة الجيلاتين كذلك لا يستطيع إنتاج الإندول من الحامض الأميني التربتوفان وكذلك ليس له القد رة على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S (Paco et al.,2003) . يستطيع هذا النوع العيش في بيئة حامضية، كما يستطيع النمو بمدى حراري واسع يتراوح ما بين 53-25 مº ولكن درجة الحرارة المثالية لنموه تتراوح ما بين 40-30 مْ وهذه النوع لا ينمو بدرجة حرارة 15 مْ (Śliżewska et al., 2020). لقد برزت أهمية هذا النوع في استعماله كمعزز حيوي Probiotics، إذ يمتاز بقدرته على تحسين المناعة وتحسين عملية امتصاص المواد كما يوفر الحماية ضد التسمم الغذائي ويعمل على تعزيز امتصاص المعادن والفيتامينات فضلاً عن ذلك يعمل على تحطيم الكثير من الذيفانات Toxins المضرة (Sungsoo and Finocchiaro, 2010). تنتج بعض سلالات *Lactobacillus acidophilus* بكتريوسين يسمى Acidophilin ، وهو من البكتريوسينات الواطئة الوزن الجزيئي اذ يصل وزنه الى 6.5 كيلو دالتون ، ويقاوم الحرارة، وينتج في طور Log Phase ويقل بعد ذلك (Zamfir et al., 2000) . هدفت هذه الدراسة الى:- عزل وتشخيص النوع *Lactobacillus acidoph-ilus* من اللبن الرائب، تحديد أي من عزلات بكتريا *Lactobacillus acidophilus* تتمتع بصفات المعزز الحيوي، تقييم الفعالية التثبيطية للنواتج الايضية للنوع *Lactobacillus acidophilus* على تثبيط بعض أنواع البكتريا الممرضة.

المواد وطرائق العمل

عزل بكتريا *Lactobacillus acidophilus*

تم عزل بكتريا *Lactobacillus acidophilus* من مصادر مختلفة شملت وبشكل رئيس منتجات الالبان

المتخمرة، وضعت العينات في حاويات معقمة ثم نقلت الى المختبر. لعزل البكتريا وتم تلقيح الانابيب الحاوية على وسط De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) السائل بنسبة 1 ٪ من العينات، وحضنت بدرجة حرارة 37°م، لمدة 24 ساعة، بعدها تم تخطيط العينات على وسط MRS الصلب الحاوي على 1 ٪ كاربونات الكالسيوم، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة بعدها تم انتخاب المستعمرات التي ظهر حولها هالة شفافة، حيث نقلت الى وسط MRS الصلب لتنقيتها من خلال إعادة زرعها بطريقة التخطيط Streak-ing method، ثم حضنت تحت الظروف نفسها أعلاه للحصول على مزارع نقية.

تشخيص بكتريا *Lactobacillus acidophilus*

اعتمد لفحص المجهري والصفات المظهرية للعزلات على وسط العزل الاولي MRS لتشخيص العزلات الى مستوى الجنس (Carr *et. al*., 2002). كما استعملت مجموعة من الاختبارات لتشخيص العزلات لمستوى النوع مثل، اختبار الأوكسيديز Oxidase Test، اختبار الكاتاليز Catalase test، والاختبارات التالية:

اختبار تخمر الكربوهيدرات

زرعت العزلات في انابيب الاختبار الحاوية على وسط الفينول الأحمر Phenol Red Medium الحاوي على أحد السكريات وبنسبة 1٪، تم إضافة السكر بعد تعقيم الوسط بالمؤصدة وتعقيم السكريات باستخدام أوراق الترشيح Millipore بقطر 0.22 مايكرومتر. حضّنت انابيب الاختبار بظروف لاهوائية لمدة 24- 48 ساعة. إنَّ تغير لون الوسط إلى الأصفر يعد دليلا على ايجابية الاختبار (Sagar,2020).

اختبار إنتاج غاز CO2

اجري هذا الاختبار بزرع العزلات في وسط أساس السكريات Sugar Basal Medium الحاوي على 2٪ من سكر الكلوكوز في أنبوبة اختبار تحتوي على أنبوبة درهام، حضنت الانابيب لمدة 48 ساعة، إن طفو الأنبوبة إلى الأعلى يدل على إنتاج غاز CO_2 من تخمر الكلوكوز (Prastujati *et al*., 2022).

اختبار إنتاج الأمونيا من الأرجينين

اجري هذا الاختبار بتلقيح الأنابيب الحاوية على وسط MRS-arginine السائل بنسبة 1٪ لقاح من المزرعة السائلة للعزلة البكتيرية المراد اختبارها بعمر 24 ساعة، ثم حضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37مْ تحت ظروف لاهوائية لمدة 7 أيام، بعدها أ خذ 1مل من المزرعة السائلة وأضيف له حجم مماثل من كاشف نسلر Nissler's reagent. أشار تغير اللون من البرتقالي إلى البني إلى قدرة العزلات على تحلل الأرجينين وانتاج الأمونيا (Khushboo *et al*., 2023).

النمو عند حرارة 45 مْ

تم اختبار النمو عند حرارة 45 مْ بتلقيح الانابيب الحاوية على وسط MRS السائل بنسبة 1 ٪ من العزلة البكتيرية المراد اختبارها، حضنت بحرارة 45°م لمدة 24 ساعة، عدت النتيجة موجبة عند تكون العكرة (Śliżewska, 2020)

النمو بتركيز 4 ٪ كلوريد الصوديوم

لقح وسط MRS السائل الحاوي على 4 ٪ من كلوريد الصوديوم بالعزلة المراد اختبارها، ثم حضنت بحرارة 37°م لمدة 24 ساعة، لوحظ النمو مع وجود العكارة والمقارنة مع السيطرة (Teuberm, 1995).

النمو عند الاس الهيدروجيني pH3

تم دراسة تأثير الاس الهيدروجيني على نمو العزلات البكتيرية المدروسة ونشاطها من خلال استعمال وسط MRS الصلب ذي الاس الهيدروجيني pH3، حيث صب في اطباق وبمكررين وزرعت بالعالق البكتيري وحضنت بحرارة 37°م، لمدة 48 ساعة، بعدها تم قراءة النتائج (Śliżewska, 2020).

اختبارات المعزز الحيوي

تحمل الظروف الحامضية

تم زرع كل عزلة من بكتريا *Lactobacillus aci-dophilus* في أنبوب حاوي على وسط MRS السائل بظروف لاهوائية عند درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، بعدها تم نبذ الانابيب عند سرعة 6000 دورة\ دقيقة لمد 10 دقائق للحصول على الراسب البكتيري، بعدها تم تعليق الراسب بمحلول الملح الفسلجي (NaCl 0.9% w\v) لحين الحصول عل عالق بكتيري بكثافة مساوية لمحلول ماكفرلاند القياسي (0.5). تم تحضير أربعة انابيب اختبار كل واحد يحتوي على 2 مل من محلول الملح الفسلجي، تم اضافة حامض HCl بتركيز 0.1N الى ثلاث انابيب وبكميات مختلفة للحصول على مديات مختلفة من الاس الهيدروجيني وهي (pH2، pH3، pH4) اما الانبوب الرابع لم يضاف له الحامض ويمثل عينة السيطرة، بعدها اضيف 0.5 مل من العالق البكتيري الى كل أنبوب من الانابيب الأربعة. تم حضن الانابيب وبواقع ثلاث مكررات لكل أنبوب عند درجة حرارة 37مْ لمدة ساعة واحدة، ثم كررت التجربة عند زمنين ساعة ونصف وثلاث ساعات. تم الحصول على عدد الخلايا الحية في جميع العينات المدروسة باستعمال طريقة التخافيف العشرية والزرع بطريقة النشر على وسط MRS الصلب (Wang *et al*., 2018). تم تحديد النسبة المئوية للخلايا الحية وفقاً للمعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للخلايا الحية} = \frac{\text{عدد الخلايا الحية في العينة}}{\text{عدد الخلايا الحية في عينة السيطرة}} \times 100$$

تحمل املاح الصفراء

تم زرع كل عزلة من بكتريا *Lactobacillus aci-dophilus* في أنبوب حاوي على وسط MRS السائل بظروف لاهوائية عند درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، بعدها تم نبذ الانابيب عند سرعة 6000 دورة/ دقيقة لمد 10 دقائق للحصول على الراسب البكتيري لكل عزلة، بعدها تم تعليق الراسب بمحلول الملح الفسلجي (NaCl 0.9% w\v) لحين الحصول عل عالق بكتيري بكثافة مساوية لمحلول ماكفرلاند القياسي (0.5). تم تحضير ست انابيب اختبار كل واحد يحتوي على 5 مل من وسط MRS السائل المعقم، بعدها تم إضافة املاح الصفراء Bile salt الى خمس انابيب وبكميات مختلفة للحصول على خمسة تراكيز لأملاح الصفراء وهي ٪0.1، ٪0.3، ٪0.5، ٪0.7 و٪0.9 اما الانبوب السادس لم يضاف اليه أي كمية من الاملاح ويمثل عينة السيطرة، بعدها تم تعديل الاس الهيدروجيني للأنابيب الست الى pH6.5، ثم اضيف 100 مايكرولتر من العالق البكتيري الى كل الانابيب. تم حضن الانابيب عند درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة. تم قياس الكثافة الضوئية Optic densi-ty (OD) للعينات عند طول موجي 600nm. تم تكرار التجربة لكل عزلة. تم حساب النسبة المئوية للمقاومة املاح الصفراء وفقاً للمعادلة الاتية وكما ذكر في (Safi *et al*., 2023).

$$\text{مقاومة املاح الصفراء}(\%) = \frac{\text{الكثافة الضوئية للعينات}}{\text{الكثافة الضوئية لعينة السيطرة}} \times 100$$

اختبار الالتصاق

تم تحضير عالق الخلايا الظهارية بكشط الخلايا الظهارية من البلعوم بمسحة قطنية وعلقت في محلول الفوسفات الدارئ phosphate-buffered saline (pH 7.2) (PBS)، بعدها غسلت ثلاث مرات، وفي كل مرة يستعمل جهاز الطرد المركزي لفصل الخلايا عن محلول الغسل، ثم أعيد تعليقها في نفس المحلول. تم اجراء اختبار الالتصاق بإضافة 0.5 مل من عالق الخلايا في انبوبة اختبار، ثم اضيف اليه 0.5 مل من عالق العزلات البكتيرية كلاً على حدة، بعدها حضنت

عند 37 مْ لمدة ساعة واحدة. من أجل إزالة البكتيريا غير الملتصقة تم نبذ الانابيب عند سرعة 800 دورة\ دقيقة لمدة 10 دقائق. تم تثبيت الخلايا الظهارية بالميثانول لمدة 15 دقيقة، وصبغت باستعمال صبغة گمزا Giemsa بنسبة 30٪ لمدة 20 دقيقة، بعدها تم الفحص بوساطة المجهر الضوئي تحت العدسة المغمورة بالزيت. تم التعبير عن النتائج باستعمال مؤشر الالتصاق Ad-hesion index بتقسيم العدد الإجمالي للبكتيريا الملتصقة بالخلايا على عدد الخلايا التي تلتصق بها البكتيريا (Tourneau *et al*., 2011).

بكتريا الاختبار

استعملت في هذه الدراسة العزلة القياسية Sal-monella Typhimurium (NCTC 73) لغرض تقييم الفعالية التثبيطية للنواتج الايضية لعزلات بكتريا *Lac-tobacillus acidophilus* تجاه هذه العزلة. تم الحصول على هذه العزلات المرضية المعزولة من الانسان والمسببة للإسهال من المجموعة الوطنية للمزارع النوعية The National Collection of Type Cultures (NCTC) في المملكة المتحدة.

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

Antibiotic Sensitivity test

اجري الاختبار بإتباع طريقة Kirby-Bauer المعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية (Jan, 2009)، حيث تم تحضير العالق البكتيري بأخذ عروة مملوءة loopful من المزرعة البكتيرية النقية ثم نقلها إلى أنبوب اختبار حاوي على محلول فسلجي. بعدها رج أنبوب للحصول على عالق بكتيري متجانس. ثم أخذ أنبوب اختبار اخر ووضع فيه محلول ماكفرلاند. قورنت عكورة العالق البكتيري مع محلول ماكفرلاند رقم 0.5 (تفاعل 0.05 مل من 1٪ $BaCl_2$ مع 0.95 مل من 1٪ H_2SO_4)، إذا كانت كثافة العالق البكتيري أكثر من محلول ماكفرلاند يتم اضافة المزيد من المحلول الملحي الفسلجي مع المزج لحين الحصول على عكورة أخذت أخذ مسحة قطنية وغمرت في العالق البكتيري ولقح بها سطح الوسط بالكامل. ثم تركت الاطباق عند درجة حرارة الغرفة لمدة 5-3 دقائق لكي يجف العالق، يجب ان لا تتجاوز هذه المدة 15 دقيقة. وضعت 5 أقراص على سطح الوسط الصلب باستعمال ملقط معقم وضغط بخفة بالملقط على القرص. ثم حضنت الاطباق لمدة 18 ساعة (لا تزيد عن 24 ساعة) عند درجة حرارة 37 مْ. بعدها تم قراءة مناطق التثبيط حول كل قرص بضمنها قطر القرص بالملم وسجلت النتائج. قسمت العزلات إلى حساسة Sensitive ومقاومة Resistant اعتماداً على القياسات العالمية للـ (CLSI ,2011).

تحضير النواتج الايضية لبكتريا

Lactobacillus acidophilus

استعمل دورق سعة 250 مل وحضر فيه 50 مل من الوسط الزرعي Skim milk broth وضبط الاس الهيدروجيني عند 6.5، بعدها اضيف 5 مل من مزرعة سائلة لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* وبعمر 24 ساعة الى الدورق الحاوي على الوسط الزرعي Skim milk broth السائل وحضن عند درجة 35°م، لمدة 18 – 24 ساعة، بعدها تم اجراء عملية النبذ المركزي للعالق البكتيري على سرعة 5000 دورة دقيقة ولمدة 15 دقيقة، تم الاحتفاظ بالراشح لكل العينات في قناني معتمة ومحكمة الغلق لحين الاستعمال (Mehdi, 2017) .

النتائج والمناقشة

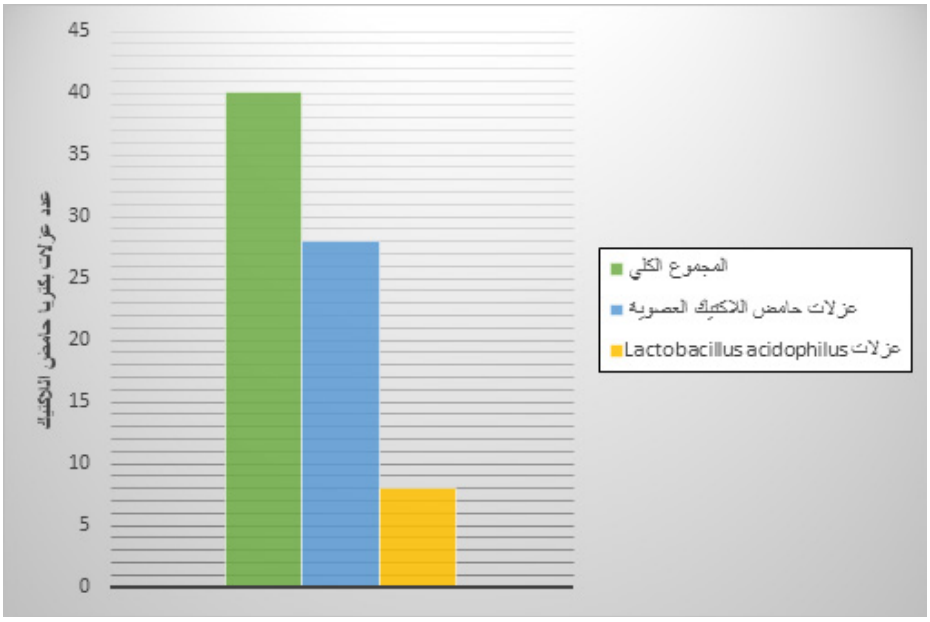
عزل أنواع بكتريا حامض اللاكتيك

تم الحصول على 40 عزلة من بكتريا حامض اللاكتيك من عينات اللبن الرائب المحلي، شخصت هذه العزلات اعتماداً على صفاتها المظهرية على وسط العزل MRS agar الحاوي على كاربونات الكالسيوم بنسبة 10٪ وكذلك على الصفات الزرعية والبايوكيمياوية

والمجهرية الخاصة بها.

التشخيص

أظهرت النتائج أن 28 عزلة من بكتريا حامض اللاكتيك كانت عصوية طويلة في الغالب وعصوية قصيرة في بعض الأحيان كما في الشكل (1)، تترتب خلاياها بشكل سلاسل، وظهرت في بعض الأحيان مفردة واحياناً أخرى ثنائية، كما اتخذت مستعمراتها المعزولة على وسط MRS الصلب أشكالا مختلفة، دائرية، بيضوية ومغزلية بيضاء اللون مائلة للصفرة، محدبة واحياناً مسطحة ذات حافات ملساء كما في الشكل (2)، تعود مثل هذه الصفات غالباً إلى جنس عصيات اللاكتيك Lactobacillus. لغرض تشخيص العزلات الى مستوى النوع، فقد أجريت عليها بعض ألاختبارات التأكيدية، مثل الاختبارات الكيموحيوية التي شملت اختبار الكاتاليز Catalase test، اختبار الاوكسيديز Oxidase test، وتخمر الكاربوهيدرات fermentation Carbohydrate وإنتاج غاز CO_2 من تخمر سكر الكلوكوز وبعض الاختبارات المزرعية مثل النمو عند حرارة 45 ْم والنمو عند تركيز 4٪ من كلوريد الصوديوم والنمو عند اس هيدروجيني pH3 . أظهرت نتائج التشخيص الى مستوى النوع ان 8 عزلات من بكتريا حامض اللاكتيك العصوية تعود الى النوع *Lactobacillus acidophilus* أي بنسبة 20٪ من المجموع الكلي للعزلات كما في الشكل (1)، اذ أظهرت نتائج الاختبارات كما في الجدول (1) إنَّ هذه العزلات سالبة لاختبار الاوكسديز وسالبة لاختبار الكاتاليز وغير منتجة لغاز ثاني أوكسيد الكاربون من تخمر سكر الكلوكوزاً كما انها كانت مخمرة لكل من سكر المانوز والمالتوز والسكروز الكلوكوز، كما أظهرت النتائج ان عزلات هذا النوع لها القدرة على النمو في المزارع السائلة الحاوية على تركيز 4٪ من كلوريد الصوديوم كما ان لها القدرة على النمو بدرجة حرارة 45م فضلا عن ذلك لها القدرة على النمو في المزارع السائلة التي يكون اسها الهيدروجيني pH3 اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره Salminen وجماعته (2004). كما تم تأكيد تشخيص عزلات بكتريا *Lactobacillus acidophilus* باستعمال نظام التشخيص الالي VITEK 2 COMPACT.



شكل (1) النسب المئوية لعزل بكتريا حامض اللاكتيك

شكل (2) مستعمرات بكتريا *Lactobacillus acidophilus* على وسط $MRS\text{-}CaCO_3$ الصلب

جدول (1) الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Lactobacillus acidophilus*

الاختبارات	اختبار الاوكسيديز	اختبار الكتاليز	انتاج CO_2 من تخمر الكلوكوز	انتاج الامونيا من تحلل الارجنين	النمو بتركيز 4% NaCl	النمو عند حرارة 45 م°	النمو عند pH3	تخمر السكريات						
								المالتوز	المانوز	السكروز	الفركتوز	رايبوز	سوربيتول	رافينوز	لاكتوز
النتيجة	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+

حساسية بكتريا الاختبار للمضادات الحيوية

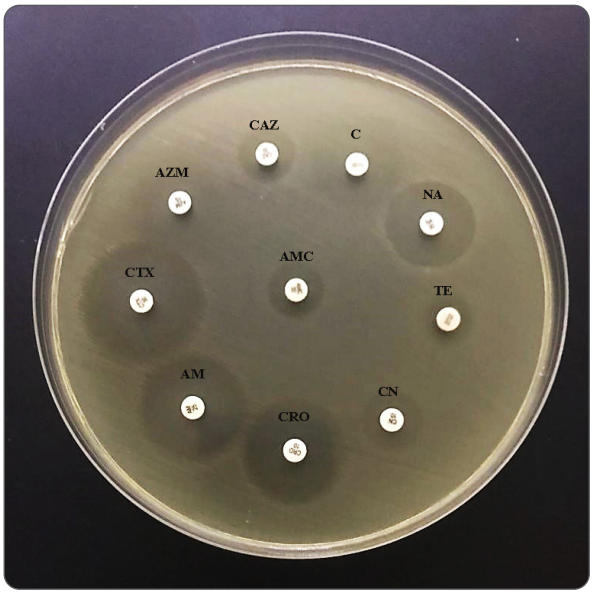
تم اجراء اختبار حساسية النمط المصلي *Salmonella* Typhimurium (NCTC 73) تجاه 10 أنواع من المضادات الحيوية باستعمال طريقة الانتشار بالأقراص Disc diffusion method كما في الشكل (3). تم قياس قطر مناطق التثبيط ومقارنتها مع الأقطار القياسية لتحديد حساسيتها ومقاومتها لكل مضاد. أظهرت النتائج ان النمط المصلي *Salmonella* Typhimurium (NCTC 73) كان مقاوم للمضادات Ceftazidime، Tetracycline كما في الجدول (2). اتفقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج Al-obaidy وجماعته (2014)، إذ ورد في نتائجهم أنَّ اغلب عزلات السالمونيلا التي حصلوا عليها مقاومة للمضاد الحيوي Tetracycline، كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي اجراها Njum وجماعته (2019) في مدينة السماوة إذ بينت نتائجهم أنَّ عزلات السالمونيلا كانت مقاومة لمضاد Tetracycline بنسبة 100٪. اختلفت نتائج الدراسة الحالية عن نتائج Mandomando وجماعته (2009) إذ اظهرت نتائجهم أنَّ 70٪ من عزلات السالمونيلا التي حصلوا عليها كانت مقاومة للتتراسايكلين. بينما كان

النمط المصلي *Salmonella* Typhimurium (NCTC 73) حساس لكل من المضادات الحيوية Ampicil-lin، Azithromycin، Cefotaxime، Ceftriaxone، Chloramphenicol، Nalidixic acid. فيما يخص المضاد الحيوي Chloramphenicol اتفقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج Hussain (2018)، إذ أشار الى أنَّ جميع سلالات السالمونيلا التي حصل عليها كانت حساسة للمضاد الحيوي Chloramphenicol، كما اختلفت عن نتائج Tallal وYoussef (2010) التي اظهرت أنَّ جميع عزلات السالمونيلا كانت مقاومة لهذا المضاد بنسبة ٪100 . اما بالنسبة للمضاد الحيوي Azithro-mycin اتفقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج Hussain وجماعته (2019) في الناصرية إذ بينوا أنَّ جميع عزلات السالمونيلا التي عزلوها من الأطفال الذين يعانون من الاسهال كانت حساسة لهذا المضاد بنسبة ٪100، كذلك بالنسبة للمضادين Ceftriaxone، Cefotaxime فقد اتفقت نتائج الدراسة مع نتائج Njum وجماعته (2019) إذ بينت نتائجهم أنَّ عزلات السالمونيلا التي عزلوها حساسة للمضاد Ceftriaxone بنسبة ٪100.

كما اتفقت مع نتائج Aljanaby وMedhat (2017) في النجف إذ أظهرت نتائجهم أنَّ عزلات السالمونيلا كانت حساسة للمضاد Cefotaxime بنسبة ٪97.44. كما أظهرت النتائج ان النمط المصلي Salmonella Ty-phimurium كان متوسط الحساسية لكل من Aug-mentin وGentamicin. بالنسبة للمضاد الحيوي Gen-tamicin اختلفت النتائج عن نتائج Salman وجماعته (2021) التي بينت أنَّ جميع عزلات السالمونيلا كانت مقاومة لهذا المضاد، كما اختلفت النتائج عن نتائج Al Obaidi (2019) التي بينت أنَّ جميع العزلات حساسة لهذا المضاد.

جدول (2) حساسية بكتريا الاختبار للمضادات الحيوية

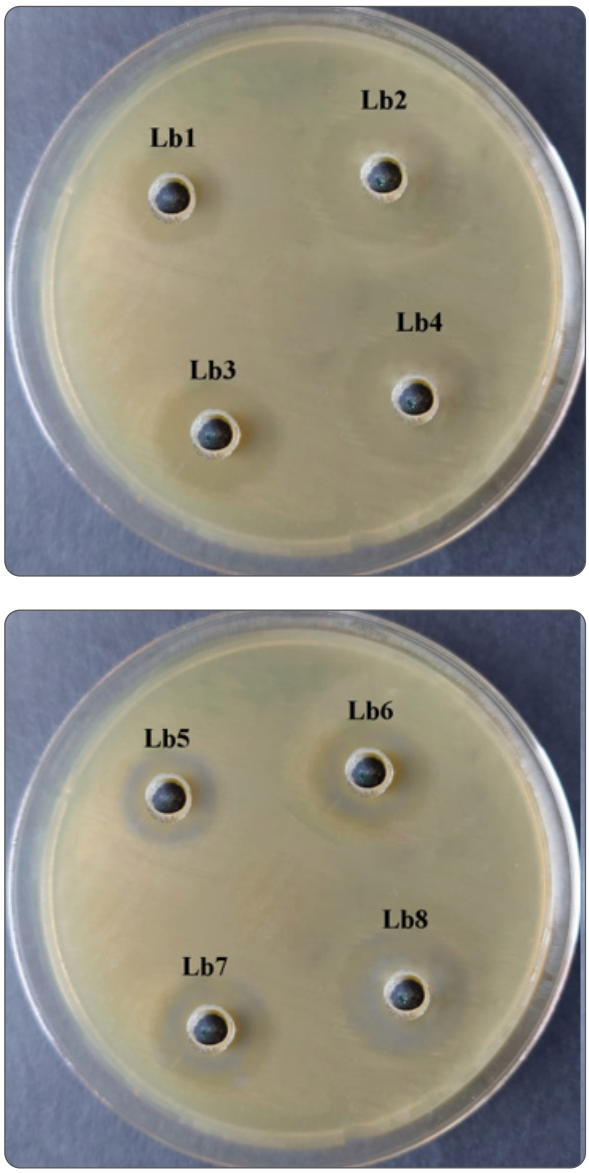
المضاد الحيوي	الرمز	التركيز µg/ disk	قطر منطقة التثبيط\mm	*Salmonella* Typhimurium
Ampicillin	AM	25	30	S
Azithromycin	AZM	15	20	S
Ceftazidime	CAZ	30	14	R
Cefotaxime	CTX	30	35	S
Ceftriaxone	CRO	10	27	S
Chloramphenicol	C	10	23	S
Augmentin	AMC	30	15	I
Gentamicin	CN	10	15	I
Nalidixic acid	NA	30	25	S
Tetracycline	TE	10	12	R



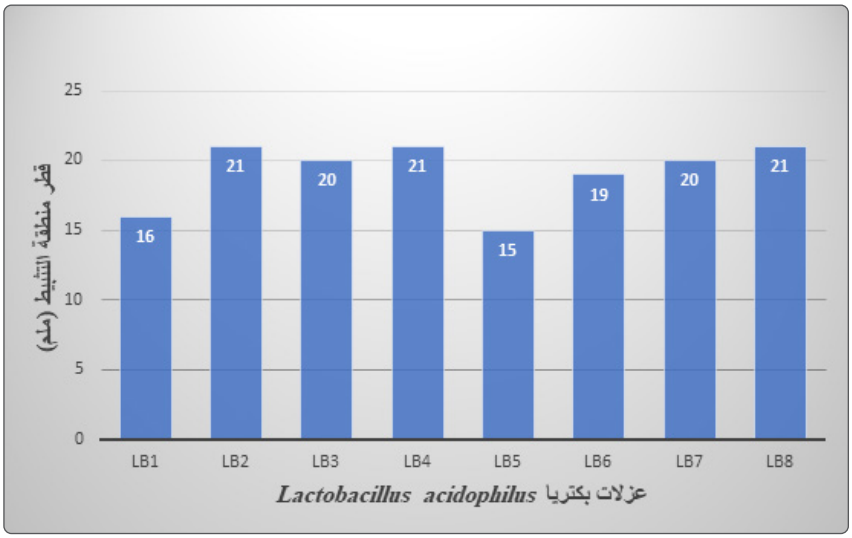
الشكل (3)
اختبار حساسية بكتريا الاختبار للمضادات الحيوي

تقييم الفعالية التثبيطية للنواتج الأيضية لبكتيريا *Lactobacillus acidophilus*

تم اختبار الفعالية التثبيطية للنواتج الأيضية لعزلات بكتريا *Lactobacillus acidophilus* باستعمال طريقة الانتشار بالحفر كما في الشكل (4). أظهرت النتائج وجود تفاوت في الفعالية التثبيطية للنواتج الأيضية لعزلات بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* المدروسة. أظهرت النتائج أنَّ النواتج الايضية للعزلات Lb2، Lb4، Lb8 تمتلك اعلى فعالية تثبيطية تجاه النمط المصلي *Salmonella* Typhimurium كما في الشكل (5) وبقطر تثبيط 21 ملم، كذلك أظهرت النواتج الايضية للعزلات Lb3، Lb6، Lb7 فعالية جيدة ولكن اقل من فعالية العزلات أعلاه، إذ بلغت اقطار مناطق التثبيط (20، 19، 20) ملم على التوالي. بينما النواتج الايضية للعزلتين Lb1 وLb5 فقد أظهرت أقل فعالية تثبيطية، إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 16 ملم 15 ملم على التوالي. اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره Monadi وجماعته (2010)، إذ أشار إلى الانخفاض الكبير في أعداد بكتريا *Salmonella* عند تنميتها في الحليب مع بكتريا *Lactobacillus acidophilus*. كما اتفقت هذه النتائج مع النتائج التي توصل اليها Ka-mali وجماعته (2024)، إذ بينت نتائجهم أنَّ المنتجات الايضية المجفدة لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* لها فعالية جيدة في تثبيط بكتريا السالمونيلا.



الشكل (4) الفعالية التثبيطية للنواتج الايضية لعزلات *Lb. acidophilus* تجاه بكتريا *Salmonella* Typhimurium



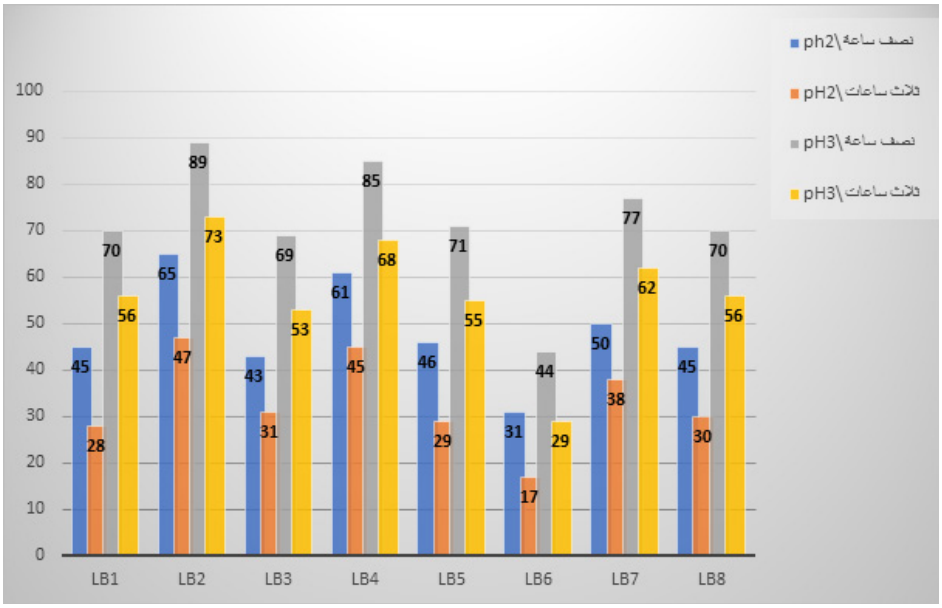
الشكل (5) الفعالية التثبيطية للنواتج الايضية لعزلات *Lb. acidophilus* تجاه بكتريا *Salmonella* Typhimurium

نتائج المعزز الحيوي

تحمل الظروف الحامضية

تم اختبار تحمل عزلات بكتريا *Lactobacillus acidophilus* للظروف الحامضية عند اس هيدروجيني pH2 وpH3 التي تحاكي الظروف الحامضية في المعدة وذلك لتقييم استعمال هذه العزلات كمعزز حيوي Probiotic يأخذ عن طريق الفم. أظهرت النتائج أنَّ العزلات Lb2 وLb4 تمتلك أعلى قابلية على تحمل الظروف الحامضية، إذ أظهرت العزلتان Lb2 وLb4 أقل انخفاض في عدد الخلايا الحية Viable cells، فعند تعرضهما لدرجة حموضة pH2 لمدة ساعة ونصف كان عدد الخلايا الحية ٪65 و٪61 على التوالي من المجموع الكلي للخلايا الحية قبل تعرضهما للحموضة كما في الشكل (6)، بينما عدد الخلايا الحية للعزلتين عند نفس الاس الهيدروجيني ولمدة ثلاث ساعات كان ٪47 و٪45 على التوالي من المجموع الكلي. أما عند pH3 فكانت قدرتهما على البقاء أفضل، إذ كان عدد الخلايا الحية لهما ٪89 و٪85 على التوالي عند مدة تعرض ساعة ونصف، ولكن انخفض هذا العدد الى ٪73 ٪68 على التوالي عند مدة تعرض ثلاث ساعات. كما أظهرت النتائج أنَّ العزلة Lb6 تمتلك اقل قدرة على تحمل الظروف الحامضية، إذ بلغ عدد الخلايا الحية ٪31 من مجموع الخلايا عند pH2 ولمدة تعرض ساعة ونصف، لكن هذا العدد انخفض الى ٪17 خلال مدة تعرض ثلاث ساعات عند نفس الاس الهيدروجيني، اما عند pH3 فكانت قدرتها على البقاء أفضل، إذ كان عدد الخلايا الحية ٪44 عند مدة تعرض ساعة ونصف، بينما عدد الخلايا الحية عند مدة تعرض ثلاث ساعات كان ٪29 من المجموع الكلي. عموماً أظهرت النتائج أنَّ جميع العزلات لها القدرة على تحمل الظروف الحامضي المتطرفة، ولكن بنسب متفاوتة. اتفقت هذ النتائج مع نتائج الدراسة التي اجراها Soomro وMasud (2012) في باكستان، إذ بينت نتائجهم أنَّ جميع عزلات *Lac-tobacillus acidophilus* كانت متحملة للحموضة المتطرفة pH3 ولكن بنسب متفاوتة. كما اتفقت هذه النتائج مع نتائج Malilay وجماعته (2019)، إذ استطاعوا من الحصول على عزلات متحملة للحموضة بحيوية مقداره ٪31 عند pH2. اتفقت هذ النتائج مع نتائج Nyabako وجماعته (2020). اختلفت نتائج هذه الدراسة عن نتائج Xiaodong وجماعته (2009)، إذ

أظهرت نتائجهم أنَّ عزلات بكتريا لم تستطيع البقاء على قيد الحياة عند تعرضها للحموضة عند اس هيدروجيني pH2 ولمدة ساعتين. يلعب F1F0-ATPase دوراً مهمًا في الاستجابة لتحمل انخفاض الاس الهيدروجيني. يلعب هذا الإنزيم دورًا مهمًا في الكائنات الحية الدقيقة التي لها سلسلة تنفسية لتخليق ATP باستخدام تدرج البروتون Proton gradient. في البكتيريا يزداد نشاط F1F0-ATPase مع انخفاض الاس الهيدروجيني لوسط النمو، إذ يتم طرد البروتونات عند درجة حموضة منخفضة للحفاظ على درجة حموضة مناسبة داخل الخلايا (Deshmukh *et al*., 2021).



شكل (6) تحمل عزلات *Lactobacillus acidophilus* للظروف الحامضية

تحمل املاح الصفراء

اختبرت درة عزلات *Lactobacillus acidophilus* على تحمل أملاح الصفراء وذلك لغرض تقييم استعمالها كمعزز حيوي. أظهرت النتائج أنَّ نسبة المقاومة لجميع العزلات عند أي تركيز كانت متقاربة، لذا تم حساب معدل نسبة المقاومة لجميع العزلات عند كل تركيز. جميع العزلات تمتلك مقاومة كبيرة على تحمل املاح الصفراء عند التركيزين ٪0.1 و٪0.2 وبمعدل مقاومة ٪94.1 و٪90 على التوالي كما في الجدول (3). بينما انخفضت معدل نسبة المقاومة الى النصف تقريباً عند التركيز ٪0.5، إذ بلغ ٪46.3. كما أظهرت النتائج أنَّ جميع العزلات قد أبدت نسبة مقاومة منخفضة عند التركيزين ٪0.7 و٪0.9، إذ بلغ معدل نسبة المقاومة ٪15.6 و٪9.76 على التوالي. اتفقت هذه النتائج مع نتائج Castorena-Alba وجماعته (2017)، إذ بينت نتائجهم أنَّ عزلات بكتريا *Lactobacillus acidoph-ilus* كانت مقاومة لأملاح الصفراء بنسبة كبيرة عند التركيز ٪0.3، إذ بلغت ٪97. كما اتفقت هذه النتائج مع نتائج الدراسة التي اجراها Malilay وجماعته (2019) في الفلبين. كما اتفقت هذه النتائج مع نتائج Safi وجماعته (2023). تُعزى مقاومة الكائنات الحية الدقيقة للصفراء إلى آليات مختلفة بما في ذلك التدفق النشط للأحماض أو الأملاح الصفراوية، والتحلل المائي للملح الصفراوي، والتغيرات في بنية وتكوين غشاء

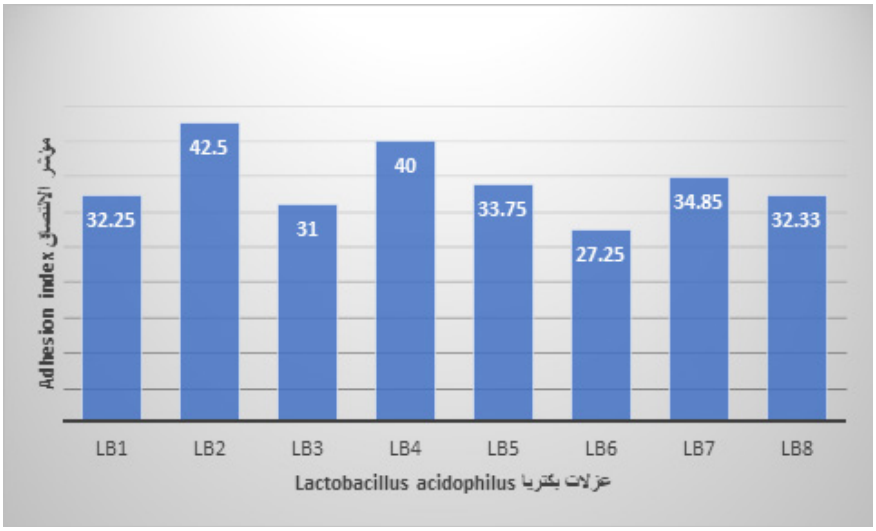
الخلية وجدار الخلية (Malilay et al., 2019). وتمتاز بكتيريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus acidophilus* التي تستطيع النمو بوجود أملاح الصفراء بامتلاكها لإنزيم Bile salt hydrolase (BSH)(Horackova *et al*., 2020). يعمل هذا الانزيم على تحفيز عملية تحلل أملاح الصفراء المقترنة مع الاحماض الأمينية لتكوين أملاح الصفراء غير المقترنة مع الاحماض الأمينية والتي تكون أقل ذوباناً لذلك تطرح خارج الجسم مع البراز، تعوض هذه الأملاح بأخرى جديدة عن طريق تصنيعها داخل الكبد من الكوليسترول لذا تُعد عملية طرح أملاح الصفراء إلى خارج الجسم إحدى الآليات للتخلص من الكوليسترول الزائد في الجسم (Bourgin et al., 2021).

تركيز املاح الصفراء %	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
النسبة المئوية للمقاومة	94.1 ± 0.20	90.00 ± 0.20	46.3 ± 0.12	15.6 ± 0.30	9.76 ± 0.14

جدول (3) معدل مقاومة عزلات *Lactobacillus acidophilus* لتراكيز مختلفة من املاح الصفراء

الالتصاق

إنَّ قدرة الكائن المجهري على الالتصاق تعد من المتطلبات الرئيسة التي تساعدهُ على الاستيطان على السطوح المخاطية للمضيف، لذا يجب أن تتمتع الأحياء المجهرية المستعملة كمعزز حيوي بهذه الخاصية. أظهرت نتائج اختبار قدرة الالتصاق تفاوتاً في قدرة عزلات *Lactobacillus acidophilus* على الالتصاق بالخلايا الطلائية. فكانت أكبر قدرة التصاق للعزلات Lb2 و Lb4، بلغ مؤشر الالتصاق 42.5 و40 على التوالي، بينما أظهرت العزلة Lb6 اقل قدرة على الالتصاق بمؤشر التصاق 27.25، كما أظهرت العزلات الأخرى قدرة التصاق جيدة كما موضح في الشكل (7). إنَّ قدرة الالتصاق تعزى إلى وجود طبقة البروتين S المتداخلة مع الجدار الخلوي والمحيطة به بالكامل. توجد بروتينات الطبقة السطحية S في الغلاف الخلوي الخارجي للعديد من العتائق والبكتيريا، بما في ذلك جنس Lactobacillus الذي مضم أنواع بكتيرية موجودة في أمعاء الإنسان. تنظيم بروتينات الطبقة S في صفوف مرتبطة بشكل غير تساهمي بسطح الخلية البكتيرية، ويُعتقد أنها تعمل كطبقات واقية في الحفاظ على شكل الخلية، في تبادل الأيونات في جدار الخلية وفي الالتصاق بالأسطح الحيوية وغير الحيوية (Acosta *et al*., 2019). فضلا عن طبقة البروتين تفرز بكتريا حامض اللاكتيك طبقة من السكريات المتعددة الخارج خلوية Exopolysaccharides (EPSs) التي تحيط بكامل الخلية من الخارج وتعمل على توفير الحماية ضد المؤثرات الخارجية كالنواتج الايضية للميكروبات، فضلا عن دورها المهم في مساعدة هذه البكتريا على الالتصاق بالأغشية الحيوية. تعد عملية الالتصاق من الخطوات الأولى للكائنات المجهرية الممرضة لأحداث الأصالة لهذا السبب تكمن أهمية الدور التنافسي لبكتريا حامض اللاكتيك في الالتصاق للتقليل من خطر المسببات المرضية (Ruas-Madiedo *et al*., 2006).



الشكل (7) قدرة التصاق عزلات *Lb. acidophilus* بالخلايا الطلائية

Purwati E, Characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from dadiah sampled in West Sumatra, Food Sci. Technol, Campinas, (2021); 41(2): 746-752, DOI: https://doi.org/10.1590/fst.30020

- Anjana and Tiwari SK, Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. Front. Cell. Infect. Microbiol. (2022); 12:851140. doi: 10.3389/fcimb.2022.851140.
- Bourgin M, Kriaa A, Mkaouar H, Mariaule V, Jablaoui A, Maguin E and Rhimi M, Bile Salt Hydrolases: At the Crossroads of Microbiota and Human Health. Microorganisms, (2021); 9(6):1122. doi: 10.3390/microorganisms9061122.
- Carr FJ, Chill D. and Maida N, The Lactic Acid Bacteria, A Literature Survey, Reviews in Microbiology, (2002); 28(4):281-370.

Reference

- Acosta MP, Geoghegan EM, Lepenies B, Ruzal S, Kielian M and Martinez MG, Surface (S) Layer Proteins of Lactobacillus acidophilus Block Virus Infection via DC-SIGN Interaction, Front. Microbiol. (2019); 10:810. doi: 10.3389/fmicb.2019.00810
- Aljanaby, AAJ and Medhat AR, Prevalence of Some Antimicrobials Resistance Associated-genes in Salmonella typhi Isolated from Patients Infected with Typhoid Fever. Journal of Biological Sciences,(2017); 17 (4): 171-184, DOI: 10.3923/jbs.2017.171.184.
- Al-obaidy HM, Abd-Alredha Z, and Abbas E, Isolation of Salmonella from Chicken Cleaning Machines in Al-Najaff and Al-Hilla Provinces. Journal of Al-Kufa University for Biology, (2014); 6(2): 154-160.
- Amelia R, Philip K, EY, Pratama and

and antimicrobial efficacy of Lactobacillus acidophilus supernatant on Salmonella enteritidis in milk, (2024); Food Science & Nutrition journal 12(3), https://doi.org/10.1002/fsn3.3883

- Khushboo, Karnwal A, Malik T. Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria from different dietary sources for development of functional foods. Front Microbiol. 2023 May 5;14:1170725. doi: 10.3389/fmicb.2023.1170725.
- Malilay Jk, Oliveros MC, Bautista JA and Katherine A T, Functional, Safety and Technological Properties of Lactobacillus acidophilus BIOTECH 1900, Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences (2019); 45(1)
- Mandomando I, Jaintilal D, Pons MJ, Valle`s X, Espasa M, Mensa L, Sigau´que B, Sanz S, Sacarlal J, Macete E, Abacassamo F, Pedro L, Alonso PL and Joaquim R, Antimicrobial Susceptibility and Mechanisms of Resistance in Shigella and Salmonella Isolates from Children under Five Years of Age with Diarrhea in Rural Mozambique. (2009); Antimicrobial agents and chemotherapy Journal 53(6): 2450-2454.
- Mehdi LY, The Antimicrobial Activity of Lactobacillus Acidophilus Against Intestinal and Foodborne Pathogens, Iraqi Journal of Science, (2017); 58(3A): pp. 1189-1197 DOI: 10.24996/ijs.2017.58.3A.2
- Monadi A, Mirzaei H, Javadi A, Hosseinzade N. and Amjadiy "Effect of some probiotics on Salmonella typhi during associated growth in milk" (2010);
- Castorena-Alba MM, Vázquez-Rodríguez JA, López-Cabanillas M, & González-Martínez BE, Cholesterol assimilation, acid and bile survival of probiotic bacteria isolated from food and reference strains. CyTA - Journal of Food, (2017); 16(1), 36–41. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1335347
- Deshmukh RS, Bhosale HJ, Teerth SR and Chahal KS, Frontiers in Life Science (2021); (Volume III) (ISBN: 978-81-953600-3-1
- Gao H, Li X, Chen X, Hai D, Wei C, Zhang L, Li P. The Functional Roles of Lactobacillus acidophilus in Different Physiological and Pathological Processes. J Microbiol Biotechnol. 2022 Oct 28;32(10):1226-1233. doi: 10.4014/jmb.2205.05041.
- Horackova S, Vesela K, Klojdova I, Bercikova M and Plockova M, Bile salt hydrolase activity, growth characteristics and surface properties in Lactobacillus acidophilus. (2020); Eur Food Res Technol 246, 1627–1636. https://doi.org/10.1007/s00217-020-03518-8
- Hussain SS, Molecular Characterization of Shigella spp. and Salmonella enterica Isolated from Diarrheal Children in Al-Nasiriyah City. (2018); University of Thi Qar, Science College, Master thesis.
- Jan H, Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol, (2009); American Society for Microbiology.
- Kamali A, Hosseini H, Mahmoudi R, Pakbin B, Gheibi N, Mortazavian AM and Shojaei S, The sensory evaluation

acterization of Potential Probiotic Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Camel Colostrum by Biochemical and Molecular Methods, (2023); Veterinary Medicine International Volume 2023, Article ID 8334152, 12 pages, https://doi.org/10.1155/2023/8334152

- Sagar, A. (2020). Online Microbiology and Biology Notes, https://microbenotes.com.
- Salman, HA, Abdulmohsen AM, Falih MN and Romi ZM, Detection of multidrug-resistant Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi isolated from Iraqi subjects. Veterinary World, (2021); EISSN: 2231-0916. Available at www.veterinaryworld.org/Vol.14/July-2021/28.pdf.
- Salminen S, Wright A. and Ouwehand A, Lactic Acid Bacteria, microbiological and functional aspect" (2004); 3rd ed., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Śliżewska K, Chlebicz-Wójcik A. Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. Biology (Basel). 2020 Nov;9(12):423. doi: 10.3390/biology9120423. PMID: 33260858; PMCID: PMC7760101.
- Śliżewska K, Chlebicz-Wójcik A. Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. Biology (Basel). 2020 Nov 27;9(12):423. doi: 10.3390/biology9120423.
- Soomro AH and Masud T, Probiotic Characteristics of Lactobacillus spp. Isolated from Camel Milk, (2002); African Journal of Microbiology Research,4(24):2708-2711.
- Njum AA, Hassan, RN, and Alwan JA, Identification of Antibiotic-Resistant Genes in Salmonella Typhi Isolated from Typhoid Patient in Samawa City. Iraqi Journal of Science (2019); 60(5): 980-984 DOI: 10.24996/ijs.2019.60.5.6.
- Nyabako BA, Fang H, Cui F, Liu K, Tao T, Zan X, Sun W, Enhanced Acid Tolerance in Lactobacillus acidophilus by Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) Coupled with Adaptive Laboratory Evolution (ALE). (2020); Appl Biochem Biotechnol.191(4):1499-1514. doi: 10.1007/s12010-020-03264-3.
- Paco RS, Leme IL, Battino JA and Ferreira AJP "Identification of Lactobcillus spp. from broiler litter in Brazil" (2003); Brazilian Journal of Microbiology ,34(3):320-324.
- Prastujati AU, Hilmi M, Khusna A, Arief I, Makmur and Maulida M, Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria of Bekamal (Banyuwangi Traditional Fermented Meat), (2022); IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 1020 012026, doi:10.1088/1755-1315/1020/1/012026
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, Reyes-Gavilan C and Salminen S "Exopolysaccharides produced by-probiotics strains modify the adhesion of probiotics andenteropathogens of human intestinal mucus" 92006); Journal of Food Protection ,8:2011-2015.
- Safi E, Haddad M, Hasan M, Al-Dalain SY, Proestos Ch and Siddiqui SA, Char-

Vuyst L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus IBB 801. FEMS Microbiol Lett. 2000 Sep 15;190(2):305-8. doi: 10.1111/j.1574-6968. 2000.tb09303. x. PMID: 11034296. Holt, J.G. ; Krieg, N.R. ; Sneath, P.H.A. ; Staley, J.T. and Williams.

lated from Fermented Milk Product Dahi, (2012); Food Sci. Technol. Res., 18 (1), 91 – 98, DOI:10.3136/fstr.18.91

- Sungsoo S and Finocchiaro E, "Hand book of prebiotic andprobiotic ingredients: health and benefits and food application" (2010); 3rded., Taylor and Francis group LLC., printed in U.S.A.
- Tallal, AK and Youssef AA, Effect of some antibiotic on Salmonella and Shigella isolated from stool of children. (2010); Anbar Journal for pure science 4(1).
- Teuberm M "The genus Lactococcus in the genera of lactic acid bacteria" (1995); Edited by Wood, B. J. and Holzapfel, W. H. ,783-799
- Tourneau J, Levesque C, Berthiaume F, Jacques M, Mourez M, In Vitro Assay of Bacterial Adhesion onto Mammalian Epithelial Cells, Journal of Visualized Experiments (2011); 51(51) DOI: 10.3791/2783 Source PubMed
- Wang R., Li N., Zheng K., and Hao, J. (2018). Enhancing acid tolerance of the probiotic bacterium Lactobacillus acidophilus NCFM with trehalose, FEMS Microbiology Letters, Volume 365, Issue 19, https://doi.org/10.1093/femsle/fny217
- Xiaodong P, Fenqin Ch, Tianxing W, Honggang T and Zhanyu Z, The acid bile tolerance and antimicrobial property of Lactobacillus acidophilus NIT, Food Control, (2009); 20(6) pp: 598-602, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.019.
- Zamfir M, Callewaert R, Cornea PC, De