تأثير بكتريا ***Lactobacillus***  المعزولة من مصادر مختلفة على بعض انواع البكتريا الممرضة للانسان

**رباب عمران زهراء محمد عبد علي**

كلية العلوم- جامعة بابل

**الخلاصة**

تم عزل وتشخيص 62 عزلة من بكتريا  *Lactobacillus* من مصادر مختلفة شملت (منتجات الالبان و الفم و المهبل) وذلك بالاعتماد على الاختبارات الزرعية و المجهرية والكيموحيوية و تخمر السكريات , وقد تم الحصول على 7 أنواع بكتيرية , كانت بكتريا *L*. *acidophilus* و *L. casei* مشتركة بين مناطق العزل المختلفة في حين كانت الانواع *L. fermentum* و *L. bulgaricus* و  
 *L*. *plantarum* موجودة في العزلات المأخوذة من الالبان ومن المهبل, أما *L*. *lactis* فقد ظهرت في عـزلات الفم والمهبل وكانت *L. salivarius* موجودة في عزلات الفم حصرا.

اظهرت جميع العزلات مقاومة متعددة للمضادات الحياتية المستخدمة في الدراسة,كانت معظم عزلات البكتريا مقاومة بنسب متباينة شملت مضاد الامبسلين (%67.8 ) و خليط حامض الكلافيولونك والاموكسلين (%74.2) والجنتامايسين (%59.7) والدوكسيسايكلين (%63) والسبروفلوكساسين (%54.8) والكنامايسين (%59.7) والستربتومايسين (%76) والارثرومايسين (%46.8) و البستراسين (%79.1) والنيومايسين (%53.3) والسيفودايزم (%71) وحامض النالدكسك (%87.1) والنايتروفيورانتين (%43.5) و الريفامبسين (%61.3) والكلورامفينيكول (%48.4) والتتراسايكلين(%74.2), وقد اظهرت ثمان عزلات مقاومة %100 للمضادات المستعملة في الدراسة شـملت العزلات *L.casei 49* , *L. plantarum* 9, 52 , *L.fermentum* 50, *L.bulgaricus 47* و *L.acidophilus 54* المعزولة من الالبان .و *L.acidophilus 60 و L*. *lactis* 59 المعزولة من المهبل.

تم اختبار قابلية راشح مزارع عزلات *Lactobacillus* غير المعامل و المعامل بالحرارة على تثبيط نمو بعض اجناس البكتريا الممرضة للانسان مثل  *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*,  *Staphylococcus aureus*,  *Streptococcus pyogens*, *Vibrio cholera*,  *Helicobacter pylori* . اظهرت النتائج ان كلا الراشحين يثبطان نمو البكتريا الممرضة بنسب متباينة اذ كانت النسب المئوية لتثبيط البكتريا الممرضة بالراشح غير المعامل 82.25 و 0 و 53.55 و56.45 و 62.9 و 80.64 و 61.29 و 16.12% على التوالي , في حين كانت النسب المئوية لتثبيط البكتريا الممرضة بالراشح المعامل بالحرارة هي 53.22 و 1.61 و 32.25 و 32.25 و 25.8 و50 و 12.9 و 32.25 % على التوالي.

**Abstract**

62 isolates of *Lactobacillus* were isolated and identified from different sources (dairy products, mouth and vaginal swabs), depending on cultural, microbiological and sugar fermentation tests , it had been collect 7 different species of *Lactobacillus* , *L*. *acidophilus* and *L. casei*  were isolated from dairy products, mouth and vagina ,while *L. fermentum* , *L. bulgaricus* and *L*. *plantarum* were isolated from dairy products and vaginawhereas *L*. *lactis* were isolated from mouth and vaginal swabs and *L. salivarius* were isolated only from mouth swabs . Most isolates showed multiple resistant to antibiotics. These isolates appeared variable percentage of resistances to ampicillin (67.8%), mixture of clavulanic acid and amoxicillin(74.2%), gentamycine (59.7%), deoxycyclin (54.8%), ciprofloxacin (63%), kanamycin (59.7%), streptomycin (76%), azithromycin (46.8%), bacitracin (79.15%), neomycin (53.3%), cefodiazem (71%), naldixic acid (87.1%), nitrofurantiun (43.5%), rifampicin (61.3%), chloramphenicol (48.4% )and tetracycline (74.2%) . Also the results appeared that only eight isolates resist to all antibiotics including *L. plantarum* 9, 52, *L.casei 49*, *L.fermentum* 50, *L.bulgaricus 47* and  *L.acidophilus 54* that isolated from dairy products as well as *L.acidophilus* 60 and *L*. *lactis* 59 that isolated from vaginal swabs.

Growth inhibition ability of *Lactobacillus* isolates using cultures bacterial filtrate and the heat treated filtrate were studied on some pathogenic bacteria including *Pseudomonas aeruginosa, Proteus, Bacillus cereus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogens, Vibrio cholera*. All pathogenic bacteria were affected by both filtrate ,the untreated filtrates inhibit the pathogenic bacteria at a percentage 82.25, 0, 53.55, 56.45, 62.9, 80.64, 61.29, 16.12% respectively. Whereas the inhibition of heat treated culture filtrates were 53.22, 1.61, 32.25, 32.25, 25.8, 50, 12.9, 32.25% respectively .

Key word: *Lactobacillus*, effects , human pathogenic bacteria

**المقدمة**

تعد الـ *Lactobacillus* احدى الاجناس التابعة لبكتريا حامض اللاكتيك , التي تقوم بتحويل سكر اللاكتوز وعدد من السكريات الاخرى الى حامض اللاكتيك, ومن هنا جاءت تسميتها بالـLactic acid bacteria و ينتشر جنس*Lactobacillus*  في اماكن متعددة من ضمنها النبيت الطبيعي Normal flora) ) للانسان اذ تتواجد في عدة اماكن منها الفم والامعاء والمهبل و تؤثر تأثيراً اساسياً في المحافظة على التوازن البكتيري الطبيعي لهذه الاجزاء, كما توجد في القناة الهضمية للعديد من الحيوانات , وكذلك تنتشر في الفواكه والخضر المتخمرة (Lungh and Wadstrom. 2009). يعود جنس الـ  *Lactobacillus*الى عائلة Lactobacillaceae رتبة Lactobacillales صنف Bacilli الذي يقع ضمن شعبة Firmicutes, يضم جنس  *Lactobacillus* 120 نوعاً تم تصنيفها بالاعتماد على نسبة السايتوسين/ الكوانين اذ وجد انها تتراوح بين (32-53 %), وان اهم انواع هـذا الجنس هي *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp .*bulgaricus* , *L.fermentum* , *gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. sakei* (Holt *et al* ., 1994)  .

تميزت بكتريا *Lactobacillus* بأهميتها الطبية اذ وجد انها تسهم في تعزيز صحة الانسان, فقد اجريت العديد من البحوث في هذا المجال ودًرٌس تأثير انواعها المختلفة البالغة 120نوعاًﱟعلى العـديد من الاخماج التي تسببها البكتريا و الطفيليات فضلاﱟ عن تأثيرها على الاورام السرطانية وتحفيزها للمناعة و استعملت في علاج المرضى المصابين بسوء الهضم و اضطرابات الجهاز الهضمي والمصابين بقرحة المعدة Francavilla *et al*. 2008)). ونظرا لاهمية هذه البكتريا التي تعمل معززاً حيوياً وما تنتجه من الانزيمات والبكتيريوسينات ومتعدد السكريد ,فقد قام العديد من الباحثين بدارسة تأثير *Lactobacillus* على عدد كبير من الانواع البكتيرية الممرضة مثل *Escherichia coli* و*Vibrio cholera*  و *Pseudomonas* و *Streptococcus*  و *Staphylococcus*, ومن هؤلاء الباحثين Liu وجماعته الذين درسوا تأثير السكريدات المتعددة المنتجة من بكتريا *Lactobacillus* على بكتريا *E. coli* المسببة للاسهال في الخنازير المفطومة حديثا اذ ان مرحلة الفطام هي مرحلة حرجة نتيجة التغيرات السريعة التي تحدث في الامعاء وتطور الاستجابة المناعية وقد استنتج الباحثون أنه يمكن استعمال البكتريا بديلاً فعالاً للمضادات الحياتية ضد الـ *E. coli* من خلال تعزيز نمو البكتريا الجيدة في الامعاء الدقيقة ومنع الاسهال (Liu *et al*, 2008) . كذلك وجد الباحث Turner وجماعته ان منتجات بكتريا *L. reuteri* مثل البكتريوسينات وحامض اللاكتيك وبيروكسيد الهيدروجين المثبطة لنمو بكتريا  *Staphylococcus aureus* (Turner *et al* ,2006).

يمكن استعمال بكتريا *L. casei* المقتولة بالحرارة معززاً مناعياً ضد اخماج بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* التي تسبب التهابات حادة وانخفاضاً في المناعة عند الانسان, اذ وجد Miake وجماعته (1985) أن الفئران المعاملة بالبكتريا المقتولة بالحرارة مدة خمسة ايام اصبحت لها القدرة على البقاء و مقاومة البكتريا الممرضة مقارنة مع الفئران غير المعاملة بالعصيات اللبنية المقتولة . يعمل الجهاز المناعي على افراز السايتوكينات ضد الاجسام الغريبة ومنها البكتريا لكن ما وجده Veckman وجماعته (2004) أن مشتقات الخلايا اللمفاوية الاحادية (Monocyte-derived CDs) يمكن ان تميز البكتريا الممرضة وغير الممرضة, اذ ان تحفيز CDs المنتج من الخلايا اللمفاوية ضد *L. rhamnosus* يؤدي الى ارتفاع بسيط في التعبير عن الجزيئات المساعدة لسطوح الخلايا واستجابة ضعيفة للسايتوكين والكيموكين في حين يكون التحفيز ضد البكتريا الممرضة عالياً جداً. يهدف هذا البحث الى دراسة تأثير راشح المزرعة لعدة عزلات من بكتريا *Lactobacillus*  المعامل بالحرارة وبدون معاملة على بعض انواع البكتريا الممرضة للانسان.

**المواد وطرائق العمل**

- **جمع العينات وعزل البكتريا**

تم جمع 100 عينة من مصادر مختلفة تمثلت بمنتجات الالبان ( حليب, لبن, جبن, منتجات غذائية حاوية على الحليب مثل دانيت) كذلك جمعت عينات من الانسان من منطقة الفم والمهبل وذلك بأخذ العينات بواسطة Disposable Cotton Swabs ونقلت الى المختبر بواسطة الـ Transporting medium وزرعت هذه العينات على وسط الـ MRS agar و Nutrient agar بطريقة الصب وحضنت الاطباق في ظروف قليلة التهوية لمدة 48 ساعة .

تم اجراء اختبارات التشخيص حسب مصنف بركي (Holt et al.,1994 )

* **التشخيص المجهري**

تم تحضير مسحات على الشرائح الزجاجية وتلوينها بصبغة غرام (Gram stain ) للتعرف على شكل الخلايا البكتيرية وطبيعة تفاعلها مع مكونات الصبغة وملاحظة وجود الابواغ .

* **فحص الكاتليز Catalase test**

أُجري هذا لاختبار بوضع نقلة من العزلة البكتيرية على شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيف لها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين و ايجابية الفحص هو ملاحظة تكون الفقاعات .

* **فحص الجيلاتينيز Gelatin test**

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الجيلاتينيز بالبكتريا وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة ثم وضعت الانابيب في الثلج لمدة نصف ساعة لغرض الكشف عن تميع الوسط بفعل انزيم الجيلاتينيز (الشيخلي .1999).

* **النمو في وسط حليب اللتموس**

لقحت الانابيب الحاوية على وسط حليب اللتموس بمستعمرة من بكتريا الـ *Lactobacillus*  بعمر 18 ساعة و لوحظ النمو وملاحظة التغيرات التي تحصل في الوسط.

* **فحص الحركة Motility test**

تم اجراء فحص الشريحة لملاحظة الحركة في البكتريا ,وتم اجراء فحص الحركة بالوسط شبة الصلب وذلك بتلقيح البكتريا في الوسط شبه الصلب بطريقة الطعن , و ايجابية الفحص تكون بانتشار نمو البكتريا في الوسط اما بقائها في موضع الطعن فهو دليل على عدم امكانية البكتريا على الحركة .

* **النمو في درجات حرارة ( 10م - 45م)**

زرعت البكتريا على وسط MRS وحضنت بدرجة حرارة 10 م و 45 م لمدة 24 ساعة في ظروف قليلة التهوية ولوحظ النمو.

* **النمو في درجة ملوحة (4% و 6.5% )**

زرعت البكتريا على وسط MRS الحاوي على NaCl بتركيز 4% و وسط MRS الحاوي على NaCl بتركيز 6.5% وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة في ظروف قليلة التهوية وتم ملاحظة النمو.

* **فحص تخمر السكريات Sugar fermented test**

لقحت الانابيب الحاوية على اوساط تخمر السكريات بمستعمرات بكتريا الـ *Lactobacillus* بعمر 18 ساعة, وحضنت الانابيب الحاوية على البكتريا مع انابيب السيطرة الموجبة الحاوية على وسط تخمر السكريات وغير ملقحة بالبكتريا , وانابيب السيطرة السالبة الحاوية على وسط MRS السائل غير الملقح بدرجة حرارة 37˚م في ظروف قليلة التهوية لمدة 24 ساعة, وتم ملاحظة التغير اللوني لكاشف الفينول الاحمر من اللون الارجواني الى اللون الاصفر نتيجة تخمر السكر.

* **اختبار انتشار القرص Disc diffusion test**

استعمل وسط MRS الصلب المعقم لإجراء هذا الاختبار اذ صُبَ في اطباق بتري معقمة تركت لتتصلب بعدها وضعت بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة , تم زرع البكتريا على الوسط بطريقة النشر ثم تركت لمدة 10-15 دقيقة لغرض انتشار البكتريا في الوسط بعدها وضعت اقراص المضادات الحياتية , وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة ثم تم قياس اقطار منطقة التثبيط حول القرص (الصفار.2005) .

* **التضاد بين بكتريا العصيات اللبنية الحية والبكتريا الممرضة**

تم استعمال البكتريا الممرضة للانسان والمبينة بالجدول (1) الذي يوضح مصدر عزلها ومصدر الحصول عليها .

**جدول (1) البكتريا الممرضة المستعملة في الدراسة و مصادرها**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ت | البكتريا | مصدر العزل | المصدر |
| 1 | *Vibrio cholera* | الاسهال | مختبر الصحة العامة / صحة بابل |
| 2 | *Helicobacter pylori* | قرحة المعدة | تم عزلها في هذه الدراسة |
| 3 | *Pseudomonas aeruginosa* | الحروق | مختبر التقانة الحياتية المتقدم/ كلية العلوم – جامعة بابل |
| 4 | *Escherichia coli* | الاسهال | مختبر التقانة الحياتية المتقدم/ كلية العلوم – جامعة بابل |
| 5 | *Proteus* | التهاب المجاري البولية | مختبر الصحة العامة/ صحة بابل |
| 6 | *Staphylococcus aureus* | الحليب | مختبر التقانة الحياتية المتقدم/ كلية العلوم – جامعة بابل |
| 7 | *Bacillus cereus* | التربة | مختبر التقانة الحياتية المتقدم/ كلية العلوم – جامعة بابل |
| 8 | *Streptococcus pyogenes* | التهاب اللوزتين | مختبر التقانة الحياتية المتقدم/ كلية العلوم – جامعة بابل |

اجري التضاد بين بكتريا العصويات اللبنية الحية الفتية وبين ثمانية انواع من البكتريا الممرضة للانسان (جدول1) حسب ما يلي

* **التضاد بين راشح العصيات اللبنية غير المعاملة بالحرارة والبكتريا الممرضة**

1. زرعت بكتريا العصيات اللبنية في وسط الـ MRS السائل وحضنت لمدة 18 ساعة بدرجة 37 م .
2. زرعت بكتريا الاختبار على وسط الاكار المغذي (Nutrient agar) بواسطة الـ Cotton swab وتركت الاطباق لمدة 30 دقيقة .
3. تم عمل حفر بواسطة الثاقب الفليني (قطر الحفرة 5ملم) .
4. وضع 50μl من راشح بكتريا العصيات اللبنية في الحفر.
5. حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ,بعدها تم ملاحظة وجود او عدم وجود مناطق خالية من نمو البكتريا الممرضة حول الحفر الحاوية على راشح بكتريا العصيات اللبنية. .(الشيخلي ,1999).

* **التضاد بين راشح بكتريا العصيات اللبنية المعاملة بالحرارة و البكتريا الممرضة**

تم اجراء هذه التجربة حسب الخطوات آنفة الذكر بعد معاملة العصيات اللبنية الفتية المزروعة في الوسط MRS السائل (لمدة 18 ساعة بدرجة 37 م) بالحرارة (80˚م) لمدة ساعة ,ثم اجري لها طرد مركزي بسرعة (6000 دورة/ الدقيقة) ثم اخذ الراشح (الشيخلي ,1999).

**النتائج والمناقشة**

**العزل والتشخيص**

جُمعت 100 عينة من مصادر مختلفة شملت منتجات الالبان( حليب, لبن, جبن, منتجات غذائية حاوية على الحليب مثل دانيت) فضلا عن عينات من الفم والمهبل في الانسان ومنها تم الحصول على 62 عزلة شخصت بالاعتماد على الصفات المجهرية والزرعية و الكيموحيوية على انها بكتريا الـ *Lactobacillus* , اظهرت نتائج الدراسة أن الـ  *Lactobacillus* موجبة لصبغة غرام عصوية منتجة للحوامض وسالبة لفحص الكتليز وغير منتجة لانزيم الجيلاتينيز وقد تباينت في نموها بدرجة حرارة 10م و 45 م و نموها في الاوساط الزرعية الحاوية على 4% و 6.5% من ملح الطعام (NaCl) كما مبين في جدول (2) الذي يوضح قابلية البكتريا على النمو في درجات حرارة وملوحة مختلفة, وهذا النتائج تتوافق مع ما وجده الباحثان Ahmed و Kanwal(2004) ومع مصنف بركي (Holt *et al* , 1994) .

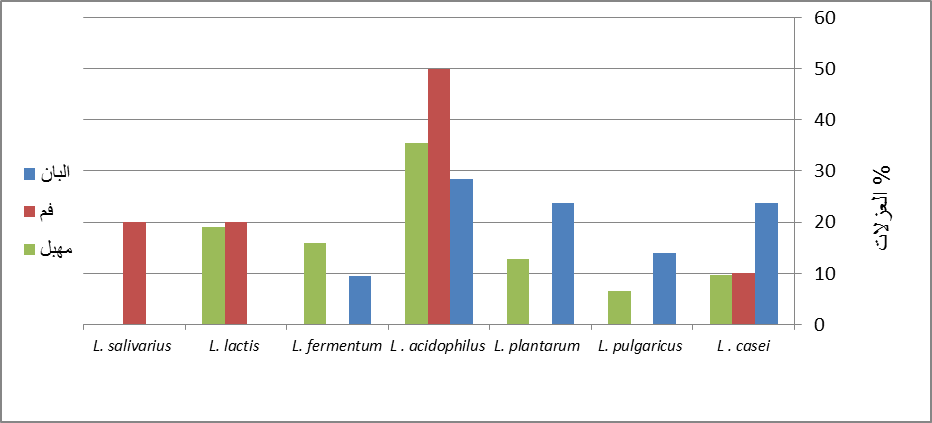
اظهرت العزلات كافة تباينا في قابليتها لتخمر السكريات المختلفة التي تعد صفات تشخيصية للانواع البكتيرية العائدة الى الـ *Lactobacillus* . فقد تم الحصول على خمسة انواع عزلت من 30 عينة من منتجات الالبان , شملت *L . casei*  بنسبة 23.8% و *L. bulgaricus*  بنسبة 14% و  *L. plantarum*  (23.8%) و *L . acidophilus* (28.5%) و  *L. fermentum*  (9.5% ) كما موضح في شكل (1) وهذه النتائج تتوافق مع الشيخلي (1999) الذي اشار الى أن هذه الانواع توجد في منتجات الالبان و لها اهمية في التعزيز الحيوي للنبيت الطبيعي في الجهاز الهضمي اذ وجد انها تحسن صحة الامعاء وتعزز النظام المناعي وتختزل اعراض متلازمة عدم احتمال وجود اللاكتوز و تخفض انتشار الحساسية فضلا عن انها تقلل خطر انتشار انواع محددة من السرطانات مثل سرطان المعدة والامعاء (Parvez *et al* .,2006)

في حين تم عزل وتشخيص اربعة انواع بكتيرية من العينات المأخوذه من الفم البالغة 30 عينة وهي *L . acidophilus* بنسبة 50% و  *L. lactis* بنسبة 20% و *L. salivarius* ( 20% ) و *L . casei*  (10%) ان وجود هذه البكتريا في الفم يعد احد الاسباب المهمة للاصابة بتسوس الاسنان بسبب انتاجها للاحماض (Badet and Thebaud.,2008) ,اما انواع البكتريا المعزولة من عينات المهبل فكانت على النحو الاتي *L . acidophilus* بنسبة 35.5 % و *L. lactis*  بنسبة 19 % و كانت نسبة *L. fermentum*  16% و *L. plantarum*  ( 12.9%) و *L . casei*  ( 9.6%) و *L. bulgaricus*  (6.5% ) اذ تعد الـ *Lactobacillus* من البكتريا الطبيعية الموجودة في المهبل التي لها اهمية كبيرة في المحافظة على التوازن الطبيعي للنبيت الطبيعي و تقلل من خطر الاصابة بفايروس الـ HIV. تسهم بكتريا *Lactobacillus* في الحد من الاصابة بالالتهابات الناتجة عن وجود الـ *Candida* اذ بينت احدى الدراسات بأن لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة من مهبل النساء السليمات لها القدرة على تثبيط نوعين من الخمائر المسببة لالتهابات المهبل هي ( *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*) من خلال اختزال عملية التصاق الخمائر على سطوح الخلايا الطلائية المبطنة للمهبل واعادة النظام البكتيري الطبيعي ( Kaewsrichan *et al* ., 2006) . فضلا عن ذلك اشار كل من Zarate و Nader (2006) الى ان وجود البكتريا في المهبل لها اثر في تثبيط بكتريا الـ *Staphylococcus aureus* التي تسبب اخماجاً في الجهاز البولي التناسلي نتيجة لمنع البكتريا الممرضة من الالتصاق على جدران الخلايا الطلائية المبطنة للمهبل.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| نوع البكتريا | مصدر العزل | رقم العزلة | النمو في درجة حرارة  45 م 10 م | | النمو بوجود NaCl %  4.5 6.5 | |
| ***L. fermentum*** | البان  المهبل | 50 , 55  16, 19, 26, 30, 34 | + | ± | + | + |
| ***L. acidophilus*** | البان  الفم  المهبل | 1 , 2, 4, 10, 11, 12  24, 42, 43, 44, 45  15, 18, 25, 29, 32,33, 35, 37, 54, 60, 61 | + | - | + | + |
| ***L. casei*** | البان  الفم  المهبل | 3, 7, 49, 57, 6  46  20, 21, 56 | + | - | ± | + |
| ***L. bulgaricus*** | البان  المهبل | 5, 47 , 48  28, 36 | ± | - | - | - |
| ***L. plantarum*** | البان  المهبل | 8, 9, 51, 52, 53  13, 17, 58, 62 | + | - | + | + |
| ***L. lactis*** | الفم  المهبل | 22, 40  59, 14, 38, 39, 27, 31 | + | - | + | + |
| ***L. salivarius*** | الفم | 23, 41 | - | - | + | - |

**جدول (2) قابلية بكتريا *Lactobacillus* على النمو في درجات حرارة وملوحة مختلفة ومصادر عزلها**

**(+): وجود النمو بعد 24 ساعة . (-) : عدم وجود نمو . (±) : نمو ضعيف ( ظهور النمو بعد 48 ساعة)**

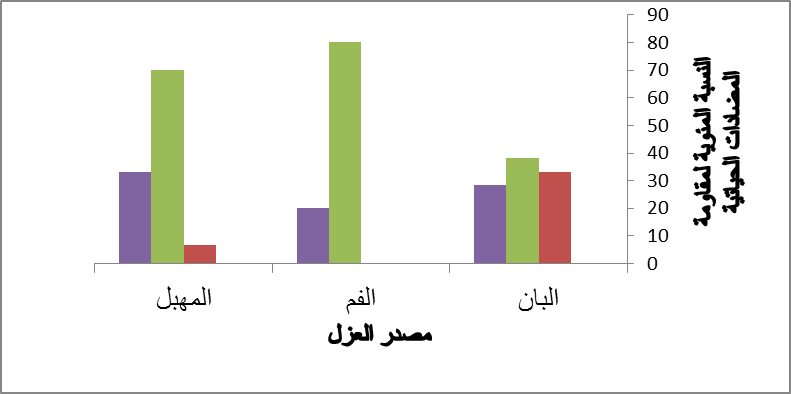


**شكل (1) توزيع انواع بكتريا *Lactobacillus* حسب مصادر العزل .**

**العزلات المـأخوذة من الالبان. العزلات المأخوذة من المهبل العزلات المأخوذة من الفم .**

**حساسية عزلات بكتريا *Lactobacillus*  للمضادات الحياتية**

اظهرت نتائج فحص الحساسية الموضحة في الشكل (2) لبكتريا الـ *Lactobacillus* المعزولة من المصادر المختلفة تباينا كبيرا لستة عشر مضادا (الامبسلين وخليط حامض الكلافيولونك والاموكسلين والسيفوكستين والدوكسي سايكلين و السبروفلوكساسين و الكنامايسين و الستربتومايسين و الازثرومايسن و البستراسين والنيومايسين او السيفودايزم و حامض النالدكسك و النايتروفيورانتين و الريفامبسين و الكلورامفينيكول و التتراسايكلين), اذ يوضح الشكل (2) ان اغلب العزلات تميزت بمقاومة اكثر من 50% من المضادات الحياتية المستعملة في التجربة كذلك يظهر من الشكل نفسه وجود عزلات مقاومة لكافة المضادات الحياتية ( مقاومة 100 % من المضادات المستعملة ) اما العزلات المقاومة لاقل من 50 % من المضادات كانت نسبتها أقل من العزلات الاخرى . تكمن اهمية فحص مقاومة عزلات الـ *Lactobacillus* لمضادات حياتية مختلفة ( تستعمل لعلاج عدد من الاخماج البكتيرية) كون هذه البكتريا تستعمل كمعززات حياتية تساعد على تسريع عملية الشفاء من الامراض المختلفة لذا لابد ان تمتاز هذه البكتريا بمقاومة واسعة لعدد كبير من المضادات الحياتية الشائعة وهذا ما ظهر من الدراسة . وهذه النتائج تتوافق مع نتائج دراسة الباحث Hummel وجماعته (2006) من ان بكتريا العصيات اللبنية تمتاز بأمتلاكها مقاومة ضد التتراسايكلين والسبروفلوكساسين و الكلورامفينيكول ومضادات مجموعة الـ β-Lactam , كما ان نتائج العزلات المأخوذة من المهبل التي اظهرت مقاومة عالية لاكثر من 50% من المضادات و هذه النتائج تتوافق مع نتائج دراسة الباحث Ocana وجماعته (2006).



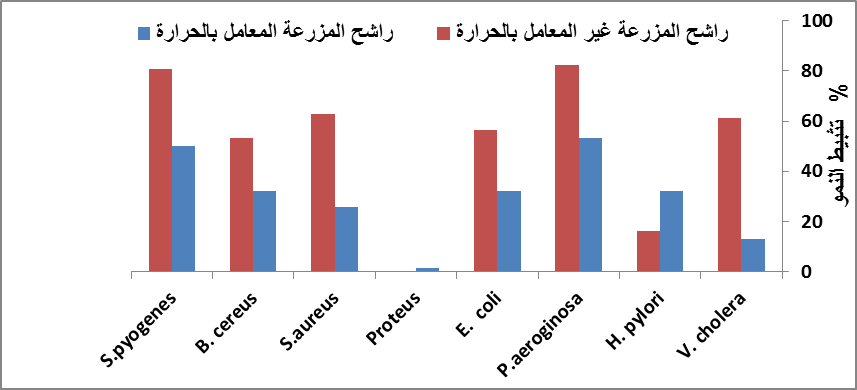
**شكل ( 2) النسب المئوية لمقاومة المضادات الحياتية**

العزلات المقاومة لـ100% من المضادات الحياتية

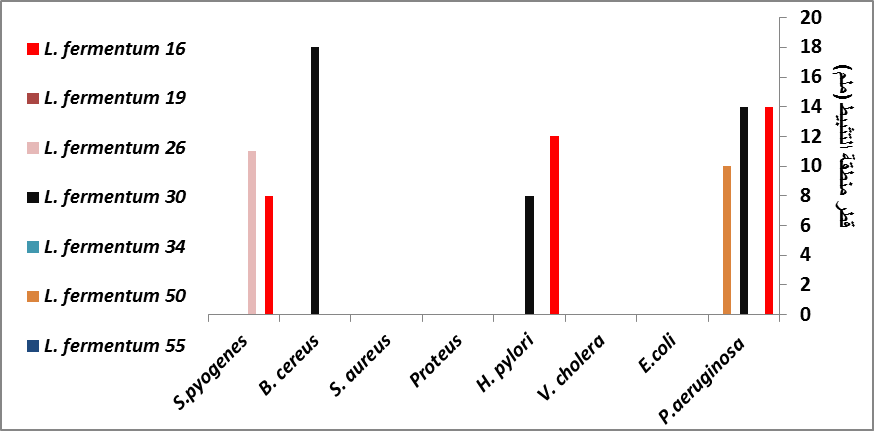
العزلات المقاومة لأكثر من 50 % من المضادات الحياتية

العزلات المقاومة لأقل من 50 % من المضادات الحياتية

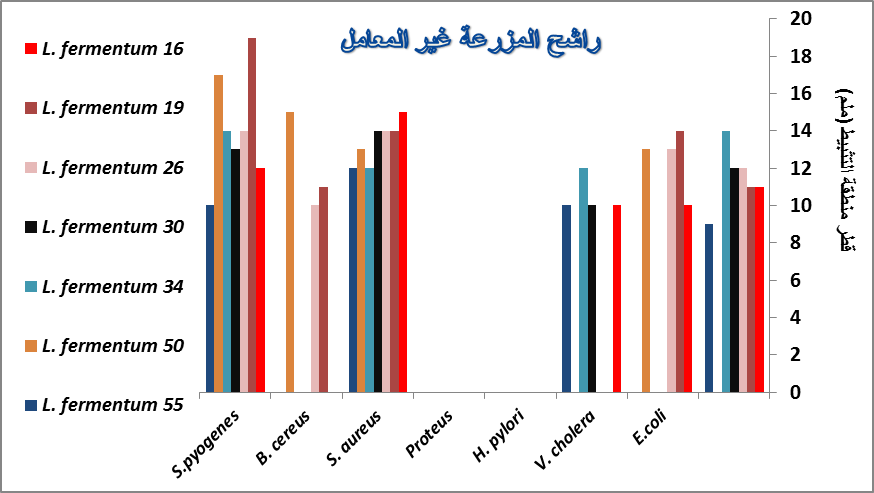
تم اختبار تأثير 62 عزلة من بكتريا *Lactobacillus* المعزولة من المصادر المختلفة على عدد من البكتريا الممرضة تضمنت *Bacillus cereus , Pseudomonas aeurginosa, Staphylococcus auerus, Streptococcus pyogenes, E. coli , Helicobacter pylori, Vibrio cholerae, Proteus*. اظهرت النتائج بأن راشح البكتريا غير المعامل بالحرارة والراشح المعامل بالحرارة بدرجة 80 م لمدة ساعة الحاوي على منتجات البكتريا مثل البكتريوسينات ومواد الايض الثانوي المتحملة للحرارة تمتلك القدرة على تثبيط نمو البكتريا الممرضة المستعملة في التجربة, تباينت البكتريا الممرضة في استجابتها لراشح *Lactobacillus* غير المعامل بالحرارة و راشح البكتريا المعاملة بالحرارة كما موضح في الشكل (3) , اذ كانت بكتريا الـ*Proteus* الاقل تأثرا سواء براشح الـ *Lactobacillus* المعامل بالحرارة و غير المعامل بالحرارة في حين اظهرت النتائج أن راشح الـ *Lactobacillus* غير المعامل بالحرارة يثبط الـ *Pseudomonas* *auergenosa* و ان الراشح المعامل بالحرارة له القدرة على تثبيط بكتريا *Streptococcus pyogen* بنسبة اكبر من اجناس البكتريا الاخرى وقد تباينت الاجناس الاخرى في نسب تثبيطها بالراشح المعامل وغير المعامل بالحرارة وهذا يتوافق مع ما توصل اليه الباحثان (Todorov and Leon.,2006) من ان المواد المنتجة من البكتريا لا سيما البكتريوسينات تثبط نمو العديد من البكتريا منها *E.coli وP.* *arogenosa و Enterococcus faecalis و Klebsiella pneumoniae* .كذلك تطابقت النتائج التي تم الحصول عليها مع ماتوصل اليه Anas وجماعته (2008) و Amin وجماعته (2009) من ان الراشح المعامل وغير المعامل بالحرارة يثبط نمو الـ *S. aureus*. اما بالنسبة لبكتريا *V. cholera* فقد لاحظوا أن راشح الـ  *Lactobacillus*غير المعامل بالحرارة يؤثر على بكتريا الكوليرا مما يقلل من خطر الاصابة بالاسهال المائي الناتج عنه مما ينصح بتناول الالبان اثناء الاصابة بالاسهال (Tejada-Simon *et al.*, 1998) . وجد كل من Veckman وجماعته (2004) أن راشح بكتريا حامض اللاكتيك غير المعامل بالحرارة يثبط نمو بكتريا *S. pyogens* . وتظهر النتائج الموضحة في الاشكال من(4) الى (9) تاثير عزلات كل نوع من البكتريا *Lactobacillus* المعزولة من المصادر المختلفة على البكتريا الممرضة . اذ يظهر الشكل (4) تاثير راشح مزارع البكتريا *L. fermentum* المعامل بالحرارة وغير المعامل على البكتريا الممرضة ومنه يظهر بان العزلتين *L. fermentum 16 & 30* المعزولة من المهبل لها تاثير على معظم البكتريا الممرضة قيد الدراسة باستثناء بكتريا *Proteus*  التي لم تظهر تأثيرا في كلا الراشحين المعامل وغير المعامل بالحرارة في حين اظهرت بكتريا *H. pylori* تأثرا براشح المزرعة المعامل بالحرارة فقط وكذلك لم تتأثر كل من بكتريا *E. coli , S. aureus , V. cholera* بالراشح المعامل بالحرارة في حين انه تم تثبيط نموها بالراشح غير المعامل بالحرارةوهذا قد يشير الى تأثرها بالمركبات الايضية الحساسة للحرارة. وهذا يشابه النتائج في الشكل (5) الذي يبين تاثير راشح مزارع البكتريا *L. bulgaricus* و  
 *L. salivarius* المعامل بالحرارة وغير المعامل على البكتريا الممرضة ومنه يظهر بان العزلتين 28& 5 *L. bulgaricus* المعزولتين من الالبان والمهبل والعزلة *L. salivarius 2*3 معزولة من الفم التي لها تاثير على معظم البكتريا الممرضة قيد الدراسة باستثناء بكتريا *Proteus*  و *H .pylori* التي لم تظهر تأثيرا في كلا الراشحين المعامل وغير المعامل بالحرارة في حين لم تتأثر كل من بكتريا *E. coli , S. aureus , V. cholera* بالراشح المعامل بالحرارة في حين انه تم تثبيط نموها بالراشح غير المعامل بالحرارةوهذا قد يشير الى تأثرها بالمركبات الايضية الحساسة للحرارة. في حين كانت كل من عزلات البكتريا (8, 9,13&17*) L. plantarum* المعزولة من الالبان والمهـبل (الشكل 6) لها تأثيرا كبيرا على البكتريا الممرضة ومن ضمنها *H. pylori* وبكتريا الكوليرا سواء الراشح المعامل وغير المعامل بالحرارة باستثناء بكتريا *Proteus* التي لم تظهر اي تاثير اتجاه الراشحين المعامل وغير المعامل بالحرارة وعزلات البكتريا *L. casei* (3, 20, 56 &57*)*والمعزولة من البان والمهبل التي اظهرت بان راشح المزرعة غير المعامل للعزلتين 3 و20 تأثيرا اكثر من غيرها من العزلات في حين كان راشح المزرعة المعامل بالحرارة للعزلتين 56 و 57 تأثيره افضل على البكتريا الممرضة . وكان تاثير راشح المزرعة المعامل بالحرارة للعزلة 46 المعزولة من الفم على البكتريا الممرضة قيد الدراسة في حين لم يظهر الراشح غير المعامل بالحرارة أي تاثير (الشكل 7) , لكن هذه العزلات شابهت تاثير بكتريا *L. plantarum* على كل من بكتريا *Proteus* وبكتريا الكوليرا . وتبين  *L. acidophilus*لها تأثيرا كبيرا على البكتريا الممرضة ومن ضمنها *H. pylori* وبكتريا الكوليرا سواء الراشح المعامل وغير المعامل بالحرارة باستثناء بكتريا *Proteus* التي لم تظهر اي تاثير اتجاه الراشحين المعامل وغير المعامل بالحرارة (الشكل 8). واظهرت بكتريا   
*L.**lactis* تأثيرا مشابها ضد البكتريا الممرضة وقد تميزت العزلة*. lactis 38* *L* المعزولة من المهبل بتأثيرها على بكتريا *Proteus* بعد معاملة راشح مزرعتها بالحرارة (الشكل 9).



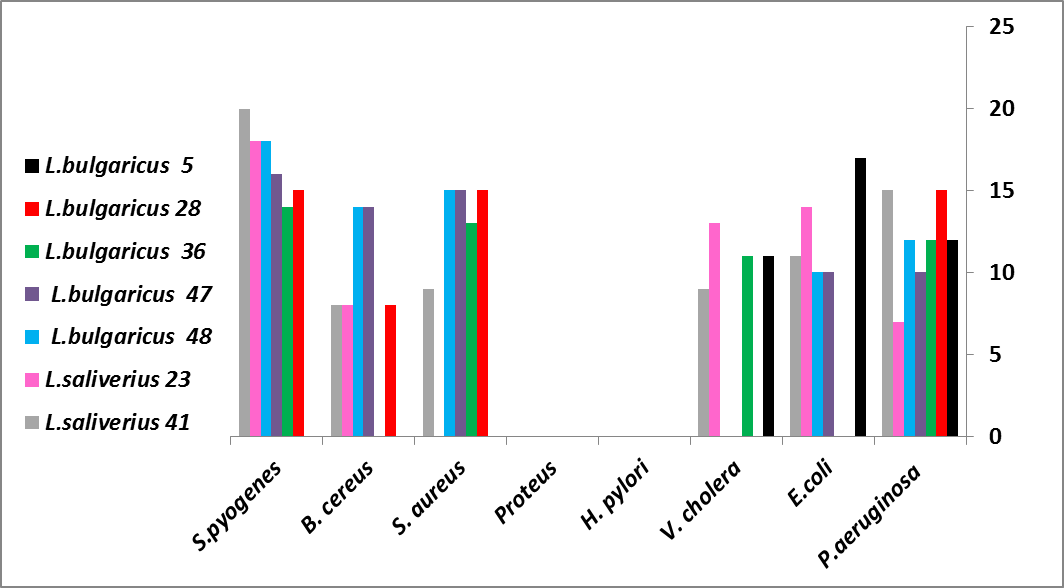
**شكل (3) النسب المئوية لتثبيط البكتريا الممرضة براشح بكتريا الـ *Lactobacillus* المعامل وغير المعامل بالحرارة**



**راشح المزرعة المعامل بالحرارة**

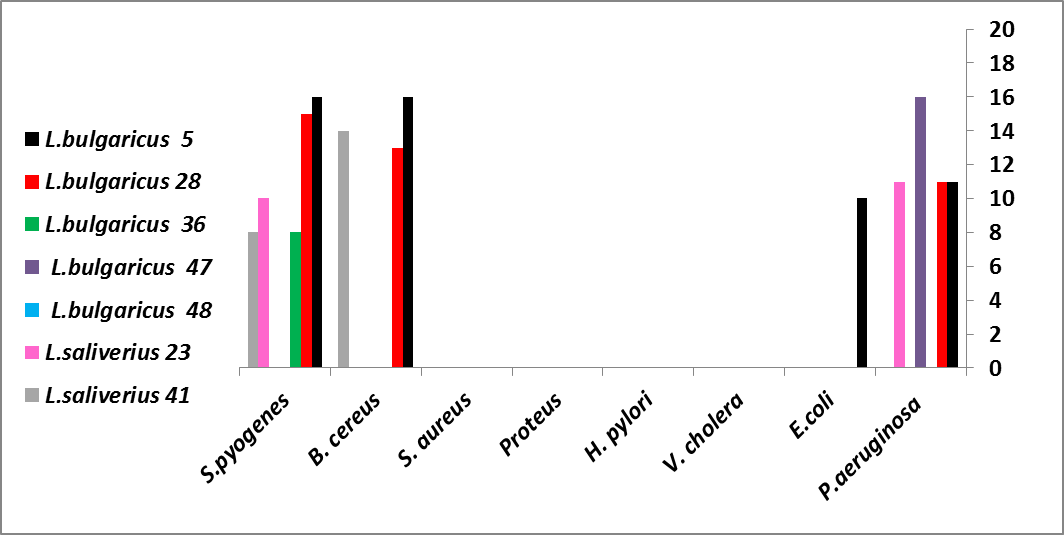


**شكل ( 4) تأثير راشح المزارع لعزلات البكتريا *L. fermentum* غير المعامل بالحرارة والمعامل على تثبيط البكتريا الممرضة**



**قطر منطقة التثبيط (ملم)**

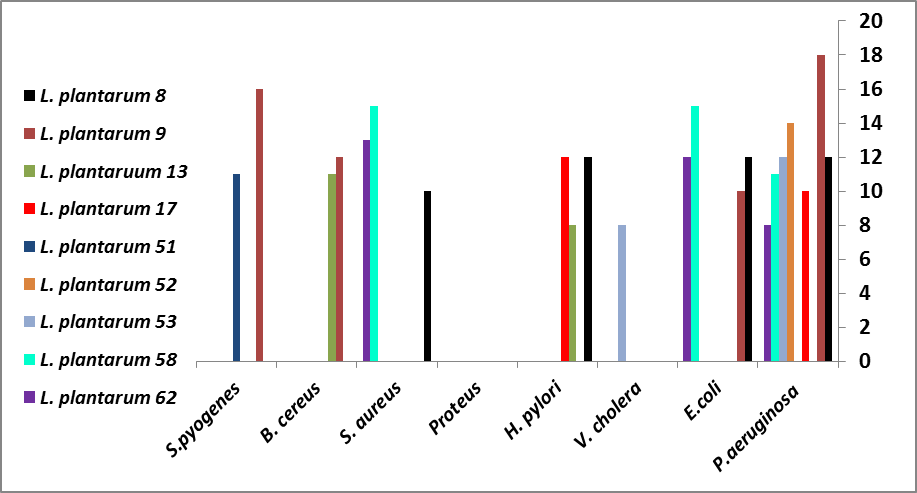
**راشح المزرعة غير المعامل بالحرارة**



**قطر منطقة التثبيط (ملم)**

**راشح المزرعة المعامل بالحرارة**

**شكل (5) تأثير راشح المزارع لعزلات البكتريا *L. bulgaricus* و *L. salivarius* غير المعامل بالحرارة والمعامل على تثبيط البكتريا الممرضة .**



**راشح المزرعة المعامل بالحرارة**

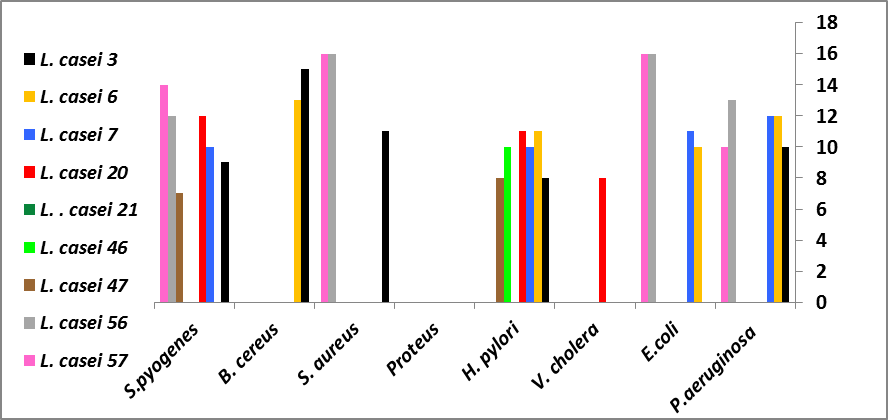
**قطر منطقة التثبيط (ملم)**



**راشح المزرعة غير المعامل بالحرارة**

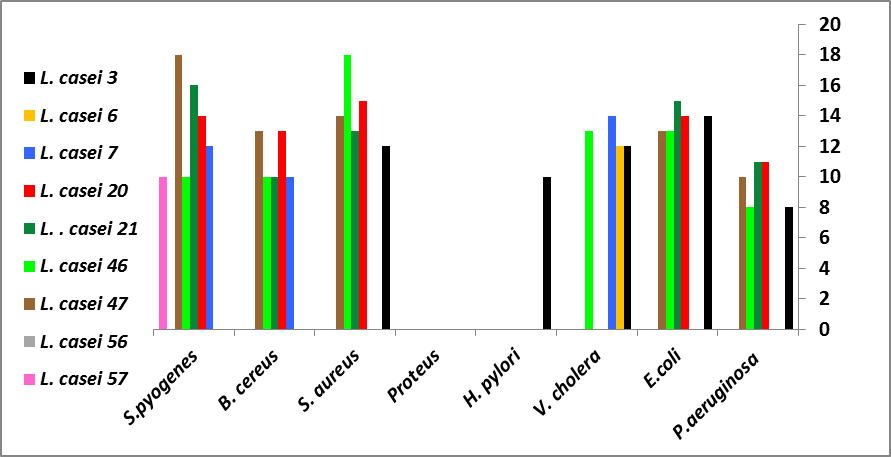
**قطر منطقة التثبيط (ملم)**

**شكل ( 6) تأثير راشح المزارع لعزلات البكتريا *L. plantarum* غير المعامل بالحرارة والمعامل على تثبيط البكتريا الممرضة**



**قطر منطقة التثبيط (ملم)**

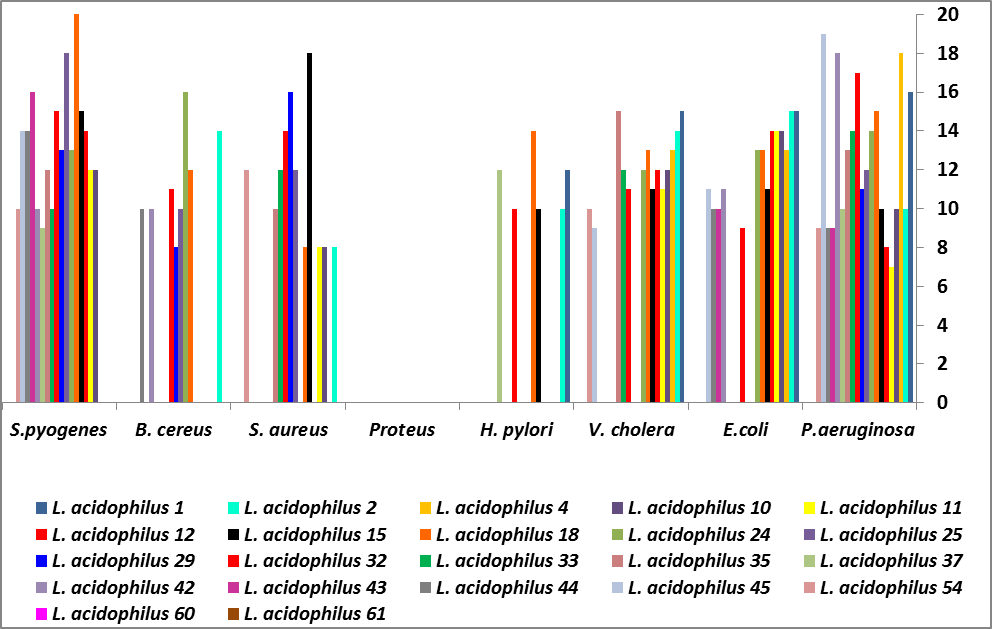
**راشح المزرعة المعامل بالحرارة**



**قطر منطقة التثبيط (ملم)**

**راشح المزرعة غير المعامل بالحرارة**

**شكل ( 7) تأثير راشح المزارع لعزلات البكتريا *L. casei* غير المعامل بالحرارة والمعامل على تثبيط البكتريا الممرضة**

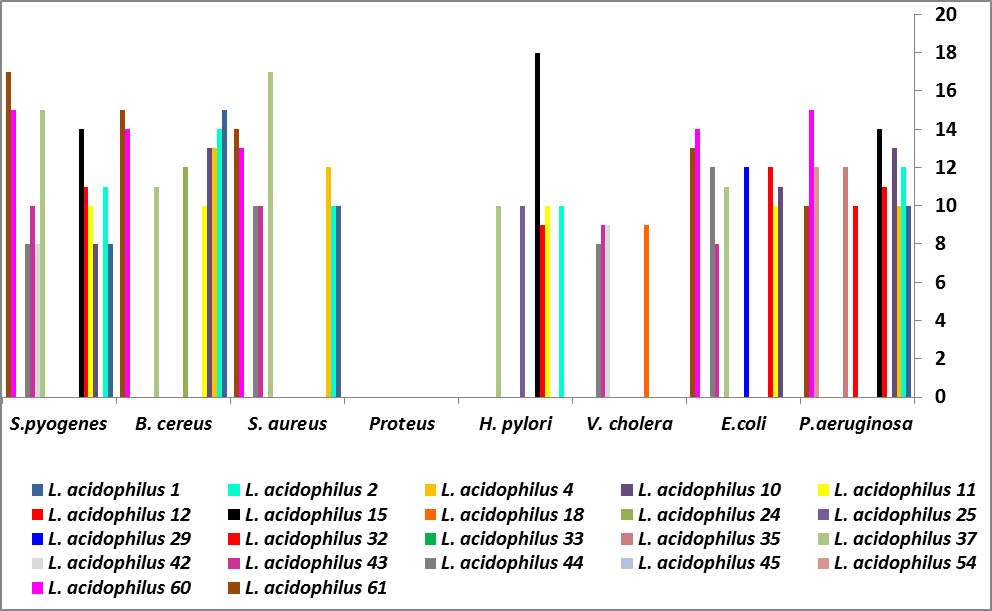


**راشح المزرعة غير المعامل بالحرارة**

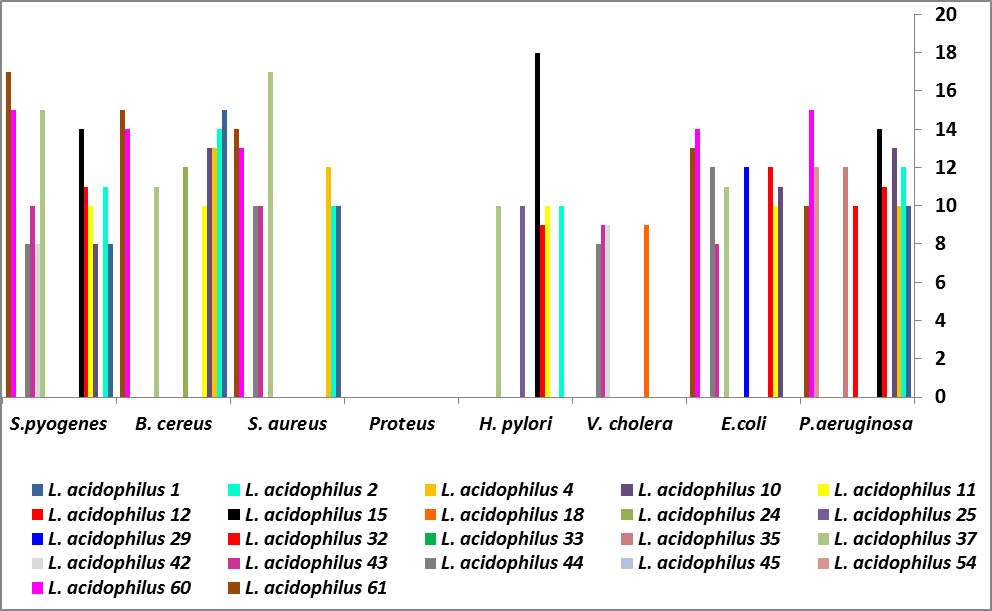
**قطر منطقة التثبيط (ملم)**

**قطر منطقة التثبيط (ملم)**

**راشح المزرعة المعامل بالحرارة**



**شكل (8) تأثير راشح المزارع لعزلات البكتريا *L. acidophilus* غير المعامل بالحرارة والمعامل على تثبيط البكتريا الممرضة**



من هذا نستنتج أن تناول الالبان او الاغذية الحاوية على البكتريا المعززه للصحة (probiotic) له اهمية

في تقليل خطر الالتهابات والاخماج الناتجة عن هذه الاجناس البكتيرية الممرضة, كذلك نستنتج أن الراشح غير المعامل بالحرارة كان اكثر كفاءة في تثبيط البكتريا الممرضة مقارنة مع الراشح غير المعامل وذلك قد يعود الى احتمال تأثر البكتريوسينات على انواع البكتريا الممرضة .

**الشكل ( 9) تأثير راشح المزارع لعزلات البكتريا *L. lactis* غير المعامل بالحرارة والمعامل على تثبيط البكتريا الممرضة**

من هذا نستنتج أن تناول الالبان او الاغذية الحاوية على البكتريا المعززة للصحة (probiotic) له اهمية في تقليل خطر الالتهابات والاخماج الناتجة عن هذه الاجناس البكتيرية الممرضة, كذلك نستنتج أن الراشح غير المعامل بالحرارة كان اكثر كفاءة في تثبيط البكتريا الممرضة مقارنة مع الراشح غير المعامل وذلك قد يعود الى احتمال تأثر البكتريوسينات على انواع البكتريا الممرضة والبكتريا المعزولة من المهبل والالبان لها تأثيرا على البكتريا الممرضة وان تباين قدرة البكتريا المعاملة او غير المعاملة على قتل البكتريا الممرضة يعتمد على نوع وسلالة بكتريا Lactobacillus ونوع البكتريا الممرضة.

**المصادر**

* الشيخلي , ظمياء محمود. (1999) . دراسة البكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا حامض اللاكتيك. اطروحة دكتوراه. الجامعة المستنصرية – كلية العلوم .

الصفار , انوار كاظم .(2005) .دراسة وراثية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المسببة لاخماج الحروق و الجروح في محافظة بابل . رسالة ماجستير . الجامعة المستنصرية – كلية العلوم.

Ahmed, T. and Kanwal, R. (2004). Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture .*Pakistan Vet. J* . 24(2): 87- 91.

Amin, M.; Jorfi, M.; Khosravi, A.D.; Samarbafzadeh, A.R. and Sheikh, F. (2009). Isolation and identification of *Lactobacillus casei* and  *Lactobacillus plantarum* from plants by PCR and detection of their antibacterial activity. *J. Bio. Sci .* 9(8): 810- 814.

Anas, M.; Eddine, H.J. and Mebrouk, K. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw Goat's milk against *Staphylococcus aureus .* *world J. Dairy food Sci* . 3(2): 39- 49.

Badet, C. and Thebaud, N.B. (2008). Ecology of *Lactobacilli* in the oral cavity. *The Open Microbiol. J*., 2: 38- 48.

Liu, P.; Piao, X.S.; Kim, S.W.; Wang, L.; Shen, Y.B.; Lee, H.S. and Li, S.Y. (2008) . Effects of chito- oligosaccharide supplementation on the growth performance , nutrient digestibility intestinal morphology , and fecal shedding if *Escherichia coli* and  *Lactobacillus* in weaning pigs . J. Anim. Sci. 86: 2609-2618.

Miake, S.; Nomoto, Ko.; Yokokura, T.; Yoshikai, Y.; Mutai, M. and Nomoto, Ki. (1985). Protective effect of *Lactobacillus casei*  on  *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Infec. and Imm*. 48(2): 480-485.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams &Wilkins – USA.

Hummel, A.S.; Hertel, C.; Holzapfel, W.H. and Franz, C.M.A.P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Enviro. Microbiol*. 73(3): 730- 739.

Kaewsrichan, J.; Peeyananjarassri, K. and Kongprasertkit, J. (2006). Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *Immunol*. Med. *Microbiol* . 48: 75- 83.

Lungh, A. and Wadstorm, T. (2009). *Lactobacillus* Molecular Biology :From Genomics to Probiotics . Caister Academic Press.USA.

Ocana, V.; Silva, C. and Nader-Macias, M.E. (2006) . Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal Lactobacilli. *Infect. Dis. Obst. Gynecol*.10: 1-6.

Parvez, S.; Malik, K.A.; Kang, A.S. and Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100 (6) :1171-1185.

Zarate , G. and Nader – Macias. (2006). Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Soci. Appl. Microbiol* . 43: 174- 180.

Tejada –Simon, M.V.; Lee, J. H.; Ustunol, Z. and Pestka,J.J. (1999). Ingestion of yogurt containing  *Lactobacillus acidophilus*  and  *Bifidobacterium*  to potentiate Immunoglobulin A responses to Cholera toxin in mice. *J. Dairy sci* . 82: 649 – 660

Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolate from boza. *Brazil. J. Microbiol*. 38: 166-172.

Turner, M. S.; Lo, R. and Giffard, P.M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth on Tellurite-Containing media by *Lactobacillus reuteri* is dependent on CyuC and Thiol Production . *Appl. Enviro. Microbiol* . 73(3): 1005- 1009.

Veckman, V.; Miettinen, M.; Pirhonen, J.; Siren, J.; Matikainen, S. and Julkunen, I. (2004). *Streptococcus pyogenes*  and  *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukocyte Biology*. 75: 1-8.