اختبار فعالية *Lactobacillus acidophilus* المحلية في تثبيط نمو بكتريا *Listeria monocytogenes*

أ. م.انغام جاسم محمد على الرماحى   د. حقي عبد العباس عيسى   ميسون خضير عبد العباس

المعهد التقنى /الكوفة

الخلاصة:

تضمنت الدراسة الكشف والتحري عن قابلية بكتريا *Lactobacillus acidophilus* في تثبيط نمو *Listeria monocytogenes* . حيث استخدمت تراكيز مختلفة من الرائق البكتيري في الدراسة التضادية فازدادت فعالية الرائق البكتيري لتصل اقصاها عند التركيز 100 ملغم / مل خلال قدرته على تثبيط بكتريا *Listeria monocytogenes* بأقطار تثبيطية تراوحت مابين(23-24) ملم . وايضاً حددت قيمة MIC وMBC للرائق البكتيري ، كما وبلغت قيمة MIC 25ملغم / مل وقيمة MBC 50 ملغم / مل ، وايضاً تم تحديد قيمة LD_{50} حيث بلغت 1000 ملغم / كغم لذا يعتبر استخدامه اميناً من الناحية الصحية.

المقدمة :

تعود بكتريا *Listeria monocytogenes* الى مجموعة العصيات الايجابية لصبغة غرام، ومن مميزات خلاياها أنها متحركة عند درجة حرارة (25) درجة مئوية وغير مكونه للابواغ ، وتحتاج في تغذيتها أوساطا غنية حاوية على دم أنسان بنسبة 5% وعموما" تسبب حل خلايا الدم الحمر (Mahmood *et al* .,2003 ; Quinn.,2005) ، و تنتشر بشكل واسع في البيئة بسبب مقاومتها للظروف البيئية الصعبة مثل التراكيز العالية من Naclومدى واسع من الاس الهيدروجيني وبأمكانها أن تتضاعف في درجة حرارة الثلاجة ، لذا تدعى البكتريا الصارمة (Todar,2003). تعد بكتريا *Listeria monocytogenes* من البكتريا الممرضةعالية الفوعة غير الشائعة في الانسان ، الا أنها مسؤولة عن بعض الامراض الخطرة التي تصيب الانسان في كل أنحاء العالم منها التهاب السحايا (Meningitis) ، وانتان الدم (Septicemia) في الاطفال حديثي الولادة فضلا" عن الاجهاض المتكرر عند النساء الحوامل ، وتتمثل أصابة الاصحاء بالتهابات معوية بشكل اسهال وتقيؤ (Schuchat *et al* .,1991) . وتنتقل بكتريا الليستريا بشكل رئيس عن طريق الغذاء الملوث بها الى جانب العدوى من الانسان والحيوان (Beuchat and Ryu .,1997; Rocourt and Bill.,1997) .

تملك بكتريا *L.monocytogenes* العديد من الخصائص المهمة التي جذبت انتباه الباحثين منذ أكتشاف البكتريا ولحد الان ومنها الطريقة التي تستخدمها البكتريا للانتقال داخل خلايا المضيف والانتشار في الجسم فضلا" عن عوامل الضراوة العديدة التي تملكها والتي مكنتها من تحليل غشاء خلية المضيف والتكاثر داخلها (Pamer,2004 ; Kaeck and Ahmed,2001) . أما بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria فأنها تضم أنواعا عديدة من البكتريا التي لها أثر طبي في معالجة العديد من الأمراض المتسببة بفعل الأحياء المجـــهرية مثل *Salmonella, Bacilli , Escherichia coli ,Kelbsiella, Pseudomonas , Proteus , Shigella , Staphylococcus , Vibrio* ، *Clostridium perfringens,* (Furrie *et al* ., 2005) ،ومن أهم الأنــواع وأكثرها شيـــوعا بكتريا *L. acidophilus* ، التي لها القابلية على أنتاج عدد من المركبات الايضية التي تستخدم في علاج الإصابات الجرثومية، والجانب الأكثر أهمية هو أستخدامها لعلاج التهابات المجاري البولية والتناسلية و الايدز والإسهال لدى الأطفال والمسافرين فضلا عن تهيج القولون والربو وارتفاع الكولسترول ،كما ان لها دوراً في تعزيز الاستجابة المناعية ، والقدرة على تنشيط الخلايا البلعمية ، داخل الجسم الحي (Baron *et al* ., 2006) .

فضلا عن ذلك فقد اتصفت بعض أجناس (LAB) بأنها علاجية ، وذلك لامتلاكها القدرة على الالتصاق بمواقع معينة من الأمعاء والتنافس مع البكتريا المرضية وإنتاج مواد ذات تأثير قاتل ، وأنها تعمل على تقوية الجهاز المناعي لمقاومة البكتريا المعوية المرضية (Shu *et al* ., 2000) .وايضا لها القابلية على أنتاج ألانزيم المحلل للبروتين (البروتيز) ، والانزيم الحـــال للدهـون (اللايبيز) وانتاج السيدروفور Sidrophors ،بالاضافة الى انتاج المضادات الحيوية (Jawetz *et al*., 2007) ، وتستطيع منع نمو الاحياء الدقيقة المرضية عن طريق انتـــاج حامض اللاكـتيك وحامض الخليــك وبيــروكسيد الهيدروجيــن وبعض المضادات الحيوية التي تسبب قتل الجراثيم المرضية ، مما يزيد الفعالية العلاجية لبكتريا حامض اللاكتيك ، فمثلا تنتج بكتريا *L.bulgariace* مضادا حيوياً يسمى Bulgaricans الذي يمنع نمو جراثيم *E. coli* المسببة للاسهال ، وتمتلك بعض انواع ميكروبات حامض اللاكتيك المستخدمة في صنع اللبن صفات مثبطة او قاتـــــلة للبكتريا *Staphylococcus aureus* ، *B. subtilis*

وان *LBA* تنتج عدد من المضادات الحيوية مثل Lactocidin , Acidolin, Acidophilin ،كما وان بكتريا *L.plantarum* تقوم بانتاج المضاد الحيوي Lactolin (Coconnier *et al*.,2005) .

تهدف الدراسة الى الكشف والتحري عن قابلية البكتريا *L.acidophilus* في التضاد وتثبيط نمو *L. monocytogenes* المرضية بعد عزلها من عربات بيع الاسماك وأحواض تربيتها.كذلك تم أجراء تشخيص دقيق للبكتريا LBA من عينات مختلفة مع فصل وتنقية الرائق البكتيري Cell free supernatant (CFS) الحاوي على المضادات الحيوية واختبارفعاليتة التضادية تجاه *L. monocytogenes* فضلاً عن تحديد قيمة LD50 .

المواد وطرائق العمل :

- وسط Mann rogosa sharp medium (MRS)

حضر هذا الوسط بحسب ماجاء في (Sharpe *et al* ., 1960) ، ثم عقم وبرد وصب في اطباق معقمة لحين الاستعمال . استعمل لتنمية بكتريا *LBA* .

- الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتنقية بكتريا *L. monocytogenes*

1- أغار تربتون الصويا وخلاصة الخميرة Tryptic Soy –yeast extract agar

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة مع اضافة (0.6)% غرام خلاصة الخميرة في (100) مليلتر من الماء المقطر ثم ضبط الاس الهيدروجيني إلى (7.3) وعقم بالموصدة ثم أضيف دم بشري بنسبة (5%) للوسط بعد تبريده إلى درجة حرارة (45م°) وصب في إطباق معقمة حفظ بدرجة حرارة (4) م° ،أستخدم الوسط لعزل وتشخيص البكتريا .

2- أغار الدم الأساس Blood Agar Base : حضر الوسط وفق تعليمات الشركة المجهزة (Oxoid) . برد الوسط إلى درجة حرارة (45 م°) وأضيف اليه دم بشري تالف بنسبة (5%) ثم صب الوسط في إطباق معقمة حفظ بدرجة حرارة (4) م° ، واستخدم لعزل وتنمية البكتريا والكشف عن قابليتها لإفراز الانظيم الحال للدم .

- **التشخيص المختبري** : شخصت العزلات البكتيرية لبكتريا الاختباراعتمادا على ماورد في (Holt *et al.*, 1994**)**

- **فصل وتنقية الرائق :** حضر حسب الطريقة المتبعة في (Savadogo *et al* ., 2004) وذلك بتلقيح وسط MRS broth بـ 1 مل من مزروع بكتريا *LBA* النامية على وسط MRS agar خلال 24 ساعة ، ومن ثم اضافة 0.1% من الكلوكوز ،0.5 % من Tween 80 ،2%خلاصة الخميرة ، 2% .NaCl التي لها دور في تنشيط نمو البكتريا ، وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24-48 ساعة ، ضبط pH 4.5-5.5 نبذ العالق بوساطة النبذ المركزي المبرد بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة بدرجة٤ م°،تم فصل الراشح عن الراسب ، ورشح بوساطة Millipore 0.22 ، واهمل الراسب ، وركز الراشح باضافة هيدروكسيد الامونيوم و عملت التراكيز من (100, 50, 25, 12.5, 6.25.3.12,1.56) ملغم / مل ، وحفظت لحين الاستخدام .

- اختبار الكفاءة التثبيطية لرائق بكتيريا *LBA* في نمو *L. monocytogenes*

- طريقة الانتشار بالا كار Agar diffusion method

اتبعت طريقة الانتشار في الاكار بوساطة الحفر (Egorove , 1985) في اختبار حساسية بكتريا الاختبار للرائق البكتيري وتتضمن الطريقة عمل (4) حفر بابعاد متساوية في وسط Muller Hinton agar بقطر 5 ملم بوساطة الثاقب الفليني وأضيف 0.2 مل من الرائق لكل حفرة ، بعد نشر 0.1 مل من العالق البكتيري على الوسط وتركت في الثلاجة لمدة 24 ساعة لانتشار الرائق ، حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة ، قرأت النتيجة على اساس قياس قطر منطقة التثبيط بوساطة المسطرة (Saxena *et al* ., 1995) .

- قياس التركيز المثبط الادنىMinimal inhibitory concentration MIC

لغرض تحديد قيمة MIC لرائق البكتريا أتبعت طريقة اختبار العكارة (Turbidity method) التي وردت في (Collee *et al* ., (1996**).**

- تعين الجرعة النصف القاتلة LD_{50} Median lethal dose LD_{50}:- لتحديد قيمة LD50 لرائق بكتريا *LBA* تم اتباع طريقة Behrens and Karber, (1953) الورادة في Al-Ammar,(2001) . .

النتائج والمناقشة:

- **عزل وتشخيص بكتريا الدراسة**: اظهرت النتائج بأن بكتريا حامض اللاكتيك المنماة على وسط MRS agar ذات لون كريمي ودائرية الشكل ،كما ظهرت البكتريا بأنها عصيات موجبة لصبغة كرام ذات مستعمرات كبيرة وطويلة ، تنتظم بشكل أزواج ، والخلية ذات شكل متغير حسب ظروف النمو ، وتكون على شكل سلاسل قصيرة و شكل مغزلي club-shaped منتفخة او بيضوية كما تم عزل بكتريا الـ *Listeria monocytogenes* من عربات بيع الاسمـــاك وأحواض تربيتها (2007 ، المحمد) جدول (1).

جدول (1) الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا الدراسة

Bacteria test	*L. monocytogenes*	*L . acidophilus*
Indole	-	-
Arabinose	+	+
Phospholipase C	+	-
Oxidase	-	-
Catalase	+	-
M.R	+	-
V.p	+	-
Urease	-	-
Motility	+	-
Hemolysis	B	-
H_2S	-	-
Nitrate reduction	-	-
Sucrose	-	+
Xylose	-	+
Mannitol	-	-

M.R:Methyl red V.P: Voges proskour + : Positive - : Negative β : Hemolysis-

وتم تشخيص المستعمرات *L. monocytogenes* بصورة اوليةً بتنميتها على أوساط زرعية مثل (TS-YE agar) الحاوي على 5% دم بشري حيث ظهرت المستعمرات بلون أسود محاطة بهالة سوداء ذات قطر (1mm) محدبة وذات أرتفاع قليل عن سطح الاغار بعد مرور (24) ساعة من الحضن ، إن هذه الدراسة

تتطابق مع دراسات عالمية عديدة عند أستخدام وسط TS-YE agar لعــزل بكــتريا لليستـــريا (Capita *et al* ., 2001) كما أظهر الفحص المجهري للشرائح المصبغة بملون غرام بكتريا ايجابية لملون غرام ، ذات أشكال عصوية كروية (Coccobacilli) أو عصوية مفردة ،أو بشكل سلاسل قصيرة منتظمة بزوايا أشبه بالحرفV أو L، وهذا عائد لظاهرة تعدد الاشكال (Polymorphism) التي تتميز بها البكتريا (Axelsson and Sorin ., 1998) .

ـ دراسة الكفاءة التضادية المقارنة للرائق البكتيري في نمو بكتريا الاختبار

طريقة الانتشار بالاكار: اجري اختبار الكفاءة التضادية لتراكيز مختلفة من الرائق البكتري في نمو بكتريا الاختبار بطريقة الانتشار بالاكار بوساطة الحفر ، حيث ابدت بكتريا الاختبار تأثرا ملحوظا للتركيز 6.5 ملغم / مل ، فتراوح معدل قطر التثبيط (8.5) ملم ، وازدادت فعالية التثبيط مع زيادة التركيز ، حيث كان معدل قطر التثبيط عند تركيز 100 ملغم / مل (23) ملم (جدول٢). ذكر Percival (1997) ان الرائق البكتيري لبكتريا *LBA* الحاوي على المنتجات الايضية ذو فعالية تثبيطية عاليه ضد العديد من البكتريا المرضيه المسببه لتلف الاغذيه .وفي الدراسه الحاليه يعزى سبب التثبيط الحاصل لرائق المزراع السائله الى عدد من النواتج الايضيه ذات الفعالية التثبيطية الواسعه ضد العديد من البكتريا المرضيه ، وهذا يتماشى مع ماذكره (Drisko *et al* ., 2003) من كون بكتريا حامض اللاكتيك تمتلك القدرة على انتاج مواد بروتينيه متخصصه تدعى Probiotics ولها فعل تثبيطي تجاه انواع اخرى من البكتريا لاتشمل البكتريا المسببة لتلف الاغذية فقط بل وتشمل انواع كثيرة من البكتريا المرضيه مثل *Salmonella* spp , *Shigella* spp . وهذا يدل على ان الرائق البكتيري يمتلك قابلية عالية على الالفة والارتباط مع الكائنات الحية ، مما يزيد من الفعالية التضادية تجاه البكــتريا عند استخدامـــه لعـــلاج العديد من الحـــالات المرضـــية وهذا ما اكــــــده (Moreno *et al* ., 2006) .

جدول (٢) : تأثير تراكيز مختلفة من الرائق البكتيري(LAB) الحر بطريقة الحفر تجاه بكتريا *L. monocytogenes*

CFS CONC.	156 ملغم /مل	3.12 ملغم /مل	6..25 ملغم /مل	١٢.٥ ملغم /مل	٢٥ ملغم /مل	٥٠ ملغم /مل	١٠٠ ملغم /مل
Inhibition zoon (mm)	٠	٠	8.5	12	11.5	١٤	٢٣
Control	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

تحديد قيمة التركيز المثبط الادنىMIC لبكتريا *L. acidophilus* :

أوضحت النتائج أن قيمة MIC بلغت 25 ملغم / مل وله القدرة على تثبيط نمو البكتريا في حين قيمة MBC 50ملغم / مل ، ويعود السبب في ذلك الى زيادة تراكيز المركبات الايضية الفعـــــالة في الرائق البكتيري ممايؤدي الى ابادة البكتريا بشكل كامل (جدول ٣). وهذا يتفق مع ماوجده , Taylor and Williams (1998).

جدول (3) : قيمة MIC وMBC لتراكيز الرائق البكتيري CFS اتجاه نمو بكتريا الاختبار

1.562	3.125	6.25	12.5	25	50	100	Conc.CFS

Bacteria							
. L. monocytogenes	-	-**	-*	+	+	+	+
Control.	+	+	+	+	+	+	+

+ عدم وجود تثبيط * MIC

- وجود تثبيط ** MBC

- حساب الجرعة النصف قاتلة LD_{50}: تم حساب الجرعة النصف قاتلة للرائق بكتريا *LBA* من خلال اعطاء الجرعة الاولية (100-1000) ملغم / كغم حيث لوحظت الاعراض الظاهرة على الحيوان بعد مرور 24 ساعة من الحقن ، والمتمثلة بالخمول وفقدان الشهية مع بطئ في الحركة ، وعند زيادة الجرع المعطاة ظهرت الهلاكات ابتداءً من الجرعة (1000) ملغم / كغم لتصل اقصاها عند الجرعة (4000) ملغم / كغم التي ادت الى هلاك جميع الحيوانات بنسبة 100 % بعد 24 ساعة من الحقن ومن النتائج التي تم الحصول عليها ان LD50 للرائق البكتيري بلغت 1666.66 ملغم / كغم من وزن الجسم (جدول 4). ومن خلال الدراسة تبين انه لاتوجد اثار جانبية خطرة عند استخدامه لاغراض العلاجية مالم يؤخذ بجرعات عالية.

جدول (٤) : تجريع الجرعة النصف القاتلة LD50 للرائق البكتيري

رقم المجموعة	الجرعة	فرق الجرع	الهلاكات	المعدل	الناتج
1	1000	0	0	0	-
2	1500	500	0	0	-
3	2000	500	1	0.5	250
4	2500	500	2	1.5	750
5	3000	500	3	2.5	1250
6	3500	500	4	3.5	2000
7	4000	500	5	4.5	2750
المجموع					7000

$$\text{الجرعة النصف القاتلة} = \text{اقل جرعة ظاهرية قاتلة} - \frac{\text{مجموع الناتج}}{\text{عدد الحيوانات بالمجموعة الواحدة}}$$

$LD50 = 4000 - 2333.33$ $LD50 = 1666.66$ ملغم / كغم من وزن الجسم

References :

Al-Ammar, M.H.(2001). The effect of Proplolis extract on same Pathogenic bacteria .M.S. thesis .University – Kufa .

Axelsson , F. and Sorin ,M. L. (1998) :Transia Listeria .Technical handbook .www. diffchamb .com .

Baron, J.M.; Schepper, L.D.; Domingue, G.; Everett, B.; Hughes, H.; William, H.; Mattman, L.; McCabe, E.; Trenev, N. and Wunderlich, K.R. (2006). Friendly Bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*. The Arthritis Trust of America., pp.2-8.

Beuchat , L. and Ryu , J.(1997): Produce handling and processing practices. Emerg. Infec . Dis .3:459-465.

Capita ,R. ;Alonsa-Calleja ,C. ; Moreno , B.and Garcia-Fernandez ,M.C. (2001) :occurance of Listeria species in retial poultry meat comparsion of a culture /immunoassay for their detection . Int .J.Food Micro .Vol(65) :75-82.

Coconnier, M. H.; Lievin,L.V. and Servin, A. L.(2005).A *Lactobacillus acidophilus* strain of human Gastrointestinal microbiota origin elicits Killing of enterovirulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium by triggering lethal bacterial membrane damage. Applied and nvironmental Microbiology.pp.6115-6118.

Collee, J.G.;Fraser , A. G.; Marminon, R,.P.and Simmon , A.(1996) Mackie and Mecarteny .Paractical medical microbiology.14th–ed .Churchill Livingstone .New York.

Drisko, J. A.; Giles, C. K. and Bischoff, B.J.(2003). Probiotics in health maintenance and disease prevention . Alternative Medicin Review,pp .143-151.

Egorove, N. S.(1985). Antibiotics scientific approach. Mirpublishers. Moscow.

Furrie, E.; Macfarlane, S. ; Kennedy, A.; Cummings, J. H. ; Walsh, S. V. ; Oneil, D. A.and Macfarlane. G. T. (2005). Synbiotic therapy initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomized controlled pilot trial. Gut., 54:242-249.

Holt, J.G.; Krieg, N .R.; Sneath, P .H. A.; Staley, J. T. and Williams, S.T .(editors) .(1994). In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. The Williams and Wikins Co., Baltimore, USA.

Jawetz, E. and Levinson, W. (2007). Examination and broad review of medical microbiology and immunology . 7th –ed .London. Lange Medical Book. McGraw-Hill comp.,pp.115-130.

Kaeck , S.M. and Ahmed , R.(2001) :Memory CD8 T-cell differentiation :initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells . Nature Immunol. 2 :415-422.

Kayser, F. H .; Bienz, K. A.; Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2005). Medical Microbiology.5th ed. Thieme Stuttgart. New York, pp.274- 295.

Mahmood , M. ; Ahmed, A. and Hussain , I (2003) : prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat products and other related in animates of Faisalabad . Pakistan J.of Nutra.2 :346-349.

Moreno , L . A.;C. Matar, E. Farnworth, and Perdigón , G. (2006). Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. Cytokine, 34:1-8.

Pamer ,E.G. (2004) : Immune responses to *Listeria monocytogenes* . nature , Oct.(4) :812

Percival , M. (1997). Choosing a probioticm supplement. Clin Nutr Insights , 6:1-4.

Quinn ,P.J.; Carter ,M.E.; Markey ,B.K.;and Carter ,G.R.(2005) :Vet. Microbiology and microbial disease.73-74

Rocourt , J. and Bill , J. (1997) : Listeriosis . Wid . Hith . Statis. Quart . 50 :67-73.

Savadogo, A.; Ouattara, C. A. T.; Bassole, I. H .N.and Traore, A. S. (2004). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition, 3 (3): 174-179

Saxena, A. P.; Farmer , S.; Hanco, R. and Towers, G.(1995). Antimicrobial compounds from Alnus vubra. Int. J. of Pharmacognosy,pp. 33-36.

Schuchat , A .; Swaminthan , B. and Broome , C.V. (1991) : Epidemiology of human listeriosis ,Clinical microbiology ,4(6) :211-213.

Sharpe, M.E.(1960). Selective media for the isolation and enumeration of lactobacilliLab. Practice, 9: 223-227 .

Shu, O.; Qu, F.; Lin, H.; Ruther furd, K.; Zhou, J. and Gill, H. (2000). Bifidobacterium lactis HNO19 enhances host immunity and resistance to gastrointestinal pathogens.

Taylor, G.R. and Williams, C. M. (1998). Effects of probiotics and Prebiotics on blood lipids. Brit. J. Nutr., 80: 225-230.

Todar , K. (2003) : Mechanisms bacterial pathogenicity : Endotoxins . Todarś Online textbook of bacteriology . University of Wisconsin-Madison department of Bacteriology .

المحمد ، تغريد خضر (٢٠٠٧) : استخلاص وتنقية listeriolysine-O من جرثومة *Listeria monocytogenes* ودراسة بعض خصائصة ودوره في الامراضية . اطروحة دكتوراة . كلية العلوم / جامعة بغداد .

Testing effect of *Lactobacillus acidophilu*s inhibition growth of bacteria *Listeria monocytogenes*

Angam J. AL-Ramahy **Abd Al Abbas H.** **Maison Kodair**

Technical institute / Kufa

Abstract :

The study concluded the discovery and investigation of the ability of bacteria *Lactobacillus acidophilus* in dampening the growth of *Listeria monocytogenes*.We also used different concentration from *Lactobacillus acidophilus*(LBA) in the contrastive study . The activity increased to reach its maximum at the concentration off 100 mg / ml which has the ability to dampen of *L. monocytogenes* isolate by diameters dampening which ranged from (24 - 23) mm. The value of MIC and MBC was specified . The amount of MIC was 25 mg / ml and the amount of MBC 50 mg / ml , the LD_{50} was also specified and its percentage was 1000 mg / ml . So the use of this CFS is safe from a hygienic point of view .