J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 34 (4): 2883 - 2893, 2009

COMPARATIVE STUDY OF BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF A LOCAL ISOLATE AND IMPORTED STRAIN OF *Lactobacillus acidophilus*

Al-Sheikh Taher, A. A.; A. K. Al-Darwash and A. Salim
Department of Food Science and Biotechnology, College of Agriculture, University of Baghdad,

دراسة مقارنة الصفات الكيمو حيوية لعزلة محلية وسلالة مستوردة من بكتريا *Lactobacillus acidophilus*

عامر عبد الرحمن الشيخ ظاهر ، عامر خلف الدروش و عامر سليم
قسم علوم الأغذية والتقانات – الاحيائية - كلية الزراعة - جامعة بغداد

الملخص

اشتملت المرحلة الأولى للدراسة الحالية الحصول على ١٤٣ عزلة من بكتريا *Lactobacillus* من براز الأطفال الرضع طبيعياً بعمر تراوح بين١٢ – ٢٦ يوم وعلى وسط MRS السائل. أجريت غربلة فتم الحصول على ٩ عزلات شخصت عبر الاختبارات الكيموحيوية والمجهرية و تبين أنها *Lactobacillus acidophilus* . و قد تم اختيار عزلة واحدة من بينها الأغزر إنتاجا لحامض اللاكتيك لإكمال الدراسة واستخدمت سلالة قياسية لغرض المقارنة .

اشتملت المرحلة الثانية على دراسة خواص العزلة المحلية والسلالة القياسية وامتازت العزلة المحلية بمقاومتها للحموضة حيث احتفظت بحيوية عالية عند الأس الهيدروجيني ٤ ولمدة ثلاث ساعات وقد انخفضت حيويتها عند حفظها على أس هيدروجيني ٣ وقد كان الانخفاض اكبر بزيادة مدة الحفظ بين ١ – ٣ ساعات، كذلك كان الانخفاض أكثر وضوحاً بخفض الأس الهيدروجيني إلى ٢ خلال مدة الحفظ. وقد حافظت السلالة القياسية على حيوية عالية عند حفظها على أس هيدروجيني ٤، ولكن خفض الأس الهيدروجيني إلى ٣ و٢ قد أثر على حيويتها أكثر مما أثر على العزلة المحلية وبزيادة مدة الحفظ.

و لقد تفوقت العزلة المحلية على السلالة المستوردة في مقاومتها لتركيزات أملاح الصفراء التي أستخدمت بتركيزات ١، ١,٥ ، ٢,٠ % ولمدة حفظ ١ ، ٢ ، ٣ ساعات .

كما أظهرت الدراسة أن المضادات الحيوية Erythromycin و Rifadin و Tetracycline قد ثبطت العزلة المحلية.

أما السلالة القياسية فقد ثبطت بنفس المضادات المذكورة علاوة على المضادين الحيويين Ampicillin و Cephalexin.

الكلمات الدالة: صفات كيموحيوية ، عزلة محلية و سلالة مستوردة *Lactobacillus acidophilus* ، مقاومة الحموضة وأملاح الصفراء والمضادات الحيوية .

المقدمة

وصفت بكتريا *Lactobacillus acidophilus* (LBA) بحسب التصنيف (Holt and Krieg 1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

الجزء الثاني ضمن مملكة بدائية النواة الشعبة الثانية II ثخينة وقوية الجدار الخلوي وضمن عائلة Lactobacillaceae جنس *Lactobacillus* ونوع *acidophilus* .

لقد أوجز Buchanan and Gibbons (1974) صفات بكتيريا LBA الفسيولوجية بكونها عصوية في الغالب مستديرة النهايتين أبعادها تتراوح بين ٠,٦ – ٠,٩ عرضاً × ١,٥ – ٦ mm طولاً.

توجد بشكل عصويات منفردة أو على شكل أزواج أو سلاسل قصيرة غير متحركة عديمة الأسواط وتكون مستعمرات خشنة . أما المستعمرات النامية في داخل الوسط فتكون غير منتظمة شعاعية أو متشعبة وغير ملونة ، ولبعض هذه البكتيريا القدرة على تخمير الجليكو جين ولكن ببطء، وللبعض الأخر القدرة على تخمير سكر Melibiose و Rafinose وكلاهما متجانسة التخمر وتنتج D-L-Lactic acid غير منتجة

للأمونيا من الحامض الأميني الأرجنين , منتجة للحموضة ومخثرة للحليب , والحموضة الكلية التي تنتجها في الحليب تتراوح بين ٠,٣ – ١,٩ % . و تحتوي ال Peptidoglycan في جدارها الخلوي على D-Aspartate و L-Lysine ويخلو من حامض التيكويك وان كان لبعض سلالاتها كميات ضئيلة من معقد جليسرول وحامض التيكويك.

تحتاج البكتيريا في نموها إلى حامض الفورميك والنياسين والبنثانويت و الكالسيوم والريبوفلافين والخلات ولا تحتاج إلى فيتامين B_{12} وهي تفرز البيروكسول والثيميدين وقد تحتاج بعض سلالاتها المطفرة إلى دي اوكسي رايبوز وهي لا تنمو في ١٥^0 م وربما حتى ٢٥ ^{0} م ولكنها تنمو في ٤٥^{0}م وقد تصل إلى ٤٨^{0}م ، لكن درجة الحرارة المثلى لنموها في مدى ٣٥ – ٣٨^{0}م . وتنمو في أس هيدروجيني ٥ – ٧ وأفضل أس هيدروجيني لنموها يتراوح بين ٥,٥ – ٦,٠ . وتبلغ نسبة القواعد النيتروجينية السيتوزين والجوانين (C&G) في Deoxy ribonucleic acid البكتيريا ٣٦,٧ +- ٠,٧ % .

تعزل البكتيريا عادةً من براز الأطفال الرضع ومن فم البالغين واليافعين، كذلك من الدواجن ومن فم وأمعاء الفئران .

وقد أشير إلى أن الأس الهيدروجيني لبراز الأطفال الرضع الذين يعتمدون على حليب الأم بشكل كامل يكون أكثر انخفاضاً مما هو عليه في الرضاعة الصناعية وأن البكتيريا السائدة للفئة الأولى هي *Lactobacillus* bacteria و .Spp *Bifidobacterium*. (1983,Nelson) في حين تكون بكتيريا القولون هي السائدة عند الفئة الثانية . وهناك سعي للباحثين لتوطين البكتيريا المفيدة في الجهاز الهضمي للبالغين ، وقد أوجز Robinson (1991) و Vinderola and Reinheimer (2003) ميزات البكتيريا التي تستخدم للأغراض العلاجية بقابليتها على مقاومة الانخفاض في الأس الهيدروجيني في المعدة وعلى مقاومة تركيزات أملاح الصفراء في الأمعاء وقابليتها على الاستيطان مع إنتاجها بكميات وفيرة Mass production .

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus acidophilus* محلية معزولة من مصدر بشري ودراسة صفاتها المهمة.

الأسلوب البحثى

تم الحصول على ١٤٣ عزلة من بكتيريا *Lacbacillus* من براز الأطفال الرضع حيث عزلت العينات على وفق ما ذكره Buck and Gilliland (1995) ، من براز ثمانية أطفال يعتمدون في رضاعتهم على حليب الأم وبشكل كامل ويتمتعون بصحة جيدة وبعمر ١٢- ٢٦ يوم وذلك بنقل ١ جم من البراز إلى ٩ سم^3 من مرق MRS بطريقة معقمة ، ووضعت العينات في الثلاجة لحين نقلها إلى المختبر وبمدة لا تتجاوز ٨ ساعات.

استخدم MRS في جمع العينات في عملية التنشيط وحضر على وفق ما ذكره Harrigan and McCance (1966) وباستخدام Beef Extract بدلا عن Meat Extract على وفق ما ذكره Lankaputhra and Shah (1996) وقد ضبط الأس الهيدروجيني على ٦,٠ – ٦,٥ (IDF،١٩٩٥) . وقد حضر وسط MRS – $CaCO_3$ وفق ما ذكره القصاب (١٩٩٨) وحضر وسط اجار Aesculine Cellibiose حسب طريقة IDF (١٩٩٥) وقد حضر وسط اجار MRS – Raffinose باستخدام وسط MRS مع استخدام سكر Raffinose بديلا عن سكر الجلوكوز.

اجريت الفحوصات الكيموحيوية بحسب ما جاء في Harrigan and McCance (1966) والتي شملت فحوصات الكاتاليز وتكوين الأمونيا من الأرجنين وتحلل الجلاتين وتحلل الكازين وانتاج الأندول من التربتو فان وتحليل النشأ . كما درس النمو في درجات حرارة مختلفة باتباع الطريقة المذكورة من قبل Buck and Gilliland (1995) . اجريت فحوصات تحديد قابلية العزلات على تخمير المركبات الكربوهيدراتية على وفق ما ذكره Cowan (1974) وقدرت الحموضة الكلية وتم قياس الأس الهيدروجيني بحسب الطرق التي ذكرها Elmer (1978) وقد استخدم pH- meter مجهز من شركة Pye Unicam. واستخدمت سلالة قياسية من بكتيريا LBA مجهزة من Chr.Hansen's الدنماركية.

استخدمت طريقة Lankaputhra and Shah (1995) لغرض حفظ العزلات لمدة اسبوع أو أكثر وطرق Gilliland (1985) و Holt and Krieg (1986) في تنشيط العزلات كل اسبوعين إلى شهر وفي حفظ العينات بالتجميد لمدة سنة أو أكثر .

درست بعض صفات LBA ذات العلاقة بقدرتها على المرور والأستيطان في الجهاز الهضمي ، كما تم دراسة مقاومة البكتيريا للحموضة حسب طريقة Lankaputhra and Shah (1995) وتأثير أملاح

الصفراء في نموها بموجب طريقة Gupta et al(1996) ومقاومة البكيريا لتركيزات عالية من أملاح الصفراء حسب طريقة Lankaputhra and Shah (1995) واستدل على صفة التصاق البكتيريا حسب طريقة Schentiz *et al.*(1993)، كما درست طريقة النمو على مرق MRS ودرس تأثير المضادات الحيوية في بكتيريا LBA حسب طريقة Gupta et al. (1995) .

النتائج والمناقشة

لقد اعتمدت طريقة العزل والتشخيص على تحضين مرق MRS الملقح ب ١ جم من البراز على درجة حرارة ٣٧^{0}م لمدة ٢٤ ساعة وقد كررت هذه العملية ثلاث مرات لغرض التنشيط، وعمل تخفيفات بماء الببتون ١:١٠ وسحب ١سم^3 منه وصبت في اطباق بتري وتم تنميتها على أجار MRS – $CaCO_3$ وحضنت في ٣٧^{0}م ولمدة ٤٨ ساعة تحت ظروف لا هوائية مع ضخ CO_2 لمدة ١٠-١٥ ثانية . وقد تم انتقاء المستعمرات المحاطة بهالة شفافة وذات لون كريمي والمحدبة والمغزلية وملاحظتها تحت المجهر واختيار المستعمرات العصوية المفردة أو ذات السلاسل القصيرة بنهايات مدورة غيرالمكونة للأبواغ إيجابية التفاعل تجاه صبغة جرام .

نشرت المستعمرات المنتقاة على أجار Aesculine Cellobiose في اطباق بتري وحضنت تحت ظروف لا هوائية بوجود CO_2 في ٤٠ ^{0}م لمدة ٤٨ ساعة . التقطت المستعمرات داكنة اللون خضراء زيتونية وفحصت صفاتها المظهرية تحت المجهر . نشرت المستعمرات المنتقاة على وسط MRS – Raffinose وحضنت الأطباق تحت نفس الظروف وتم إلتقاط المستعمرات النامية والتي نمت على مرق MRS فيما بعد وأجريت عليها الفحوصات الكيموحيوية و تم فحص تخمرات الكربوهيدرات ومقارنتها مع ما ورد في كتاب Bergey's manual . وقد تم اختيار العزلة المحلية الأكثر انتاجاً للحموضة .

لقد أعتمدت طريقة العزل على مبدأ الحذف والمرحلية لحصرهذه البكتيريا ويلاحظ من الجدول (١) الخطوات الأربعة التي اتبعت في عملية العزل . ففي الخطوة الاولى نميت على مرق MRS بعد تلقيحه بالبراز وتنشيطه لثلاث مرات لزيادة أعداد بكتيريا *Lactobacillus* لوجود acetate في الوسط المذكور لكونه عامل انتقاء للبكتيريا (Harrigan and McCance, 1966) من ثم نميت على أجار (MRS – $CaCO_3$) والتقاط المستعمرات التي تنتج حامضاً يستدل عليه من تكوينه لهالات رائقة حول المستعمرات وذلك لأذابته كربونات الكالسيوم ، أن تكوين حامض فضلاً عن الصفات المظهرية للمستعمرات كونها ذات لون كريمي محدبة أو مغزلية في حالة إنغمارها في الوسط ، علاوة على الفحوصات التي اجريت عليها تحت المجهر فقد كانت موجبة لصبغة جرام وعصوية الشكل مكونة للسلاسل القصيرة أو على شكل منفردة وغير مكونة للأبواق.

كما لوحظ أن لوسط MRS – $CaCO_3$ القدرة على التمييز بين أنواع عديدة من جنس *Lactobacillus* وعدم قدرة *Bifidobacterium* على تحليل Aesculine ومن ثم عدم تكوين اللون الأخضر الزيتوني الداكن بعد تحليله مع ايونات الحديديك الموجودة ضمن الوسط بخلاف بكتيريا LBA و *L. plantarum* و *L. casei-rhumnosus* التي تملك هذه القدره ، ففي هذه المرحلة أمكن حذف أغلب أنواع جنس *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* من خلال الشكل المظهري للون المستعمرات وهذا يتفق مع Hunger (1986) ولا سيما عدم قدرة *L. fermentum* المعوية على تحليل مادة Asculine بعدها أحد أنواع *Lactobacillus* المعوية (Gilliland , 1979) . و ان هذا الوسط قد استبعد أكثر من نصف المستعمرات المفترض وجود LBA فيها مع تأكيد قابلية LBA في كلا الخطوتين . وفي الخطوة الثالثة حيث أدخل سكر Raffinose بدلاً من سكر Glucose كمصدر للكربون والهدف من هذا التحوير هو استبعاد انواع اخرى من *Lactobacillus* مع الأبقاء على بكتيريا LBA . وبالرجوع إلى جدول التخمرات (Holt and Krieg, 1986) يلاحظ عدم قدرة نوعي بكتيريا *L. salivarus* و *L. casei* على النمو فى وجود سكر Raffinose . كذلك فأن بكتيريا *L. lactis* لا تتمكن من النمو فى وجود سكر Raffinose. ويبين الجدول ٢ نتائج فحص تخمر الكربوهيدرات ، كما يبين الجدول ٣ ان جميع العزلات المحلية والسلالة القياسية لبكتيريا LBA قد أعطت فحصاً سالباً للكاتاليز وان خاصية عدم إنتاج البيروكسيديز تشترك بها جميع الأنواع التابعة لجنس *Lactobacillus* وان وجدت فأنه يتواجد على شكل أنزيم شبيه يسمى Pseudoperoxidase (Robinson,1990 and Holt and Kriege, 1986) .

كما لوحظ أن جميع العزلات المحلية والسلالة القياسية قد أعطت فحصاً سالباً لتكوين الأمونيا من الحامض الأميني الأرجنين ويتفق ذلك مع ما ذكره (Holt and Kriege, 1986) وهذا الفحص مفيد لتأكيد

أبعاد بكتيريا *L. reuteri* ذات التخمر غير المتجانس الإجباري Obligated hetero fermentative اذ ذكر (Bozoglu and Ray, 1996) على أنها من الأنواع المعوية المصاحبة لبكتيريا LBA . كذلك أظهر الجدول ٣ ان عدم قدرة العزلات على اسالة الجيلاتين أو تحليل الكازين أو إنتاج الأندول من الحامض الأميني التربتوفان بينما أظهرت النتائج قابلية جميع العزلات على تحليل النشأ . و اتضح ان هذه النتائج تتفق مع ما ورد في دراسات سابقة (Buchanan and Gibbons ,1974 ; Holt and Krieg, 1986 ; Robinson, 1990) . كما أظهرت كافة العزلات عدم قدرتها على النمو في درجات حرارة ٥ و ١٥م وأظهرت نمواً ضعيفاً في ٢٥م فيما كانت قدرتها جيدة في درجتي حرارة ٣٥ و ٤٥م وعلى هذا الاساس أدخل (Gilliland, 1985) بكتيريا LBA ضمن بكتيريا حامض اللاكتيك التي أطلق عليها أسم Thermobacteria .

لقد تم اعتماد كفاية العزلة على انتاج حامض اللاكتيك وخفض الأس الهيدروجيني في الحليب لاختيار عزلة محلية واحدة لاعتمادها في تخمر الحليب حيث ان هذه القابلية تعكس حيوية ونشاط الخلايا الأيضية العالية وترتبط عادة بقدرتها على النمو والتكاثر (Norris and Richmond ,1978) .

لقد تم اختيار العزلة المحلية الأولى لكونها خفضت الأس الهيدروجيني للحليب من ٦,٤ إلى ٤,٤ خلال ٢٤ ساعة (كما في الجدول ٤) ورفعت الحموضة الكلية للحليب من ٠,١٤ إلى ٠,٧١ وكانت أفضل العزلات المحلية الثمانية وقد أطلق على هذه العزلة Local *Lactobacillus acidophilus* (LLBA) فيما أطلق على السلالة القياسية Standard *Lactobacillus acidophilus* و التى يرمز لها بـ (SLBA) . يظهر الشكل 1 أن أعداد بكتيريا LLBA و SLBA قد انخفضت انخفاضا بسيطاً عند خفض الأس الهيدروجيني إلى ٤ وظلت محافظة على أعداد عالية خلال مدة ٣ ساعات من التجربة, إلا أن خفض الأس الهيدروجيني إلى ٣ و ٢ قد خفض الأعداد البكتيرية بشكل كبير. وقد لوحظ ان LLBA كانت أكثر تحملاً للحموضة من SLBA وإذا ما قورنت بكتيريا LLBA و SLBA مع السلالات التي استخدمها Lankaputhra and Shah (1995) والتي خضعت لظروف مماثلة لغرض قياس حيويتها عند خفض الأس الهيدروجيني للوسط فأن بكتيريا LLBA كانت أفضل من السلالات SCIRO التي تحمل الأرقام ٢٤٠٥ ، ٢٤٠٢ ، ٢٤٠٠ وقريبة من السلالة التي تحمل الرقم ٢٤٠١ ولكن السلالات ٢٤١٥ و ٢٤٠٩ أظهرت حيوية أفضل منها . كما أن ظروف التجربة المستخدمة في الدراسة الحالية كانت مشابهة لما هو مستخدم عالمياً ومن ظروف جسم الإنسان مما أتاح سهولة المقارنة وسهولة اختبار السلالة المناسبة لجسم الإنسان التي تقوم بهضم منتجات الألبان فيه خلال ساعة إلى ساعتين .

يبين الشكل 2 ان أعداد البكتيريا LLBA و SLBA الحية تقل بزيادة تركيز أملاح الصفراء وبزيادة مدة المعاملة ، وقد أظهرت LLBA حيوية أفضل من SLBA وعند مختلف تركيزات أملاح الصفراء المستخدمة ، في حين أظهرت SLBA حيوية أفضل من سلالة LBA و CSIROالتي درسها Lankaputhra and Shah (1995) وذات الرقم ٢٤١٠ ، ٢٤٦٥ ، ٢٤٠٩ ، ٢٤٠٠ ولكن السلالات ذات الرقم ٢٤١٥ ، ٢٤٠٤ كانت أفضل منها . في حين أظهرت بكتيريا SLBA حيوية أفضل من السلالات ذات الرقم ٢٤٠٠ ، ٢٤٠٩ ، ٢٤٠٥ وهي قريبة من السلالة ٢٤٠١ ولكن السلالات ٢٤١٥ ، ٢٤٠٤ كانت أفضل من ناحية تحملها لتركيزات أملاح الصفراء . استخدمت في هذه الطريقة ظروف قريبة مما هو موجود داخل جسم الإنسان من حيث تركيز أملاح الصفراء التي تفرز بمعدل ٠,٥-٢,٠ % اعتماداً على كمية الدهون اللازمة لإستحلابها وعادة ما يكون ذلك خلال الساعة الأولى فقط من عملية الهضم وبعدها تبدأ بالانخفاض Lankaputhra and Shah (1995) .

لقد كان يلاحظ وبشكل مستمر نمو البكتيريا LLBA و SLBA في وسط MRS السائل مكونة ترسبات في قاع أنابيب التنمية مع ظهور العكارة بعد عدد قليل من النقل على وسط MRS السائل . أن ظهور هذه الترسبات يعد دليلاً على قابلية التصاق هذه البكتيريا بالأمعاء وهذا موافق لما ذكره Schentiz (1993) وان فقدان قابلية تكون الترسبات وحدوث النمو بشكل طافي Plankontic يعطي مؤشراً على عدم إمتلاك البكتيريا لهذه الخاصية أو أو فقدانها بالنقل السريع . كذلك أظهرت هذه البكتيريا نموات لمستعمراتها على اجار selection *Lactobacillus* بشكل خشن وهذه الصفة أيضاً تعطي دليلاً على قابلية التصاق البكتيريا بالامعاء والتي تتحول إلى مستعمرات ناعمة عند استمرار النقل السريع وذلك يتفق مع ما ذكره Shentiz *et al* (1993) . وتعزى خاصية الالتصاق إلى وجود طبقة سطحية من البروتين (Surface Layer Protein) في الجدار الخلوي لبكتيريا LBA والذي يكون عادة ذات طبيعة كارهة للماء ويعتقد أن النقل السريع يفقد هذه الطبقة طبيعتها الكارهة للماء مما يفقدها قابلية الالتصاق (Bohwmik *et al*. (1985) .

يلاحظ من الشكل3 أن بكتيريا LLBA و SLBA قد أظهرت حساسية تجاه المضادات الحيوية Erythromycin و Rifadin و Tetracycline ، ولم تظهر بكتيريا LLBA حساسية تجاه الأنواع

الأخرى من المضادات الحيوية فيما أظهرت SLBA حساسية تجاه أنواع إضافية من المضادات الحيوية هي Ampicillin و Cephlexin ، كما يلاحظ ان كلا نوعي البكتيريا لم تظهران حساسية تجاه المضادين الحيويين Garamicin و Trimoxazole ، وان اكثر المضادات الحيوية تأثيراً في تثبيط البكتيريا هو Rifadin وان أقلها تأثيراً هو Tetracycline وتتوافق هذه النتائج مع Johanson (1987) و Gupta *et al*. (1995) من ان سلالات LBA لا تتماثل في حساسيتها تجاه المضادات الحيوية المختلفة .

إن النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة تتفق مع ما وجده Vinderola and Reinheimer (2003) بكون بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* قد أظهرت قابلية عالية لمقاومة العصارة الهضمية وأملاح الصفراء ومقاومتها لأنزيم B-galactosidase وقد أعد Savadogo *et al.*(2004) ما تنتجه بكتيريا حامض اللاكتيك من بكتيريوسينات بأنها مواد حافظة حيوية صديقة للمستهلك كونها الأقل سمية والأقل مواد مسرطنة من بقية مضادات الأحياء المجهرية المستخدمة وهذا ما يجعل من منتجات الألبان المحتوية على LBA أكثر فعالية ومرونة في استخدامات مختلفة .

جدول (١) يبين خطوات العزل و أعداد العزلات الملتقطة و النسبة المئوية للتخفيض في كل مرحلة.

رمز العينات	عدد العزلات الملتقطة من وسط* $MRS\text{-}CaCo_3$	عدد العزلات الملتقطة من وسط* Asculine - cellibiose	عدد العزلات التي التقطت من الوسط المحور* MRS- Raffinose	عدد العزلات التي تطابقت مع فحص تخمر الكاربوهيدرات وما جاء في Bergey's
A	٢٠	٨	٤	١
B	١٨	٨	٣	٢
C	١٨	٥	٤	٢
D	١٧	٦	٢	١
E	١٩	٥	١	–
F	١٥	٥	١	–
G	١٧	٨	٣	١
H	١٩	٧	٣	٢
مجموع العزلات	١٤٣	٥٢	٢١	٩
%لتخفيض العزلات قياساً للعدد الأولي	١٠٠	٥٨,٧٤	٨٥,٣١	٩٣,٧
%لتخفيض العزلات قياساً للمرحلة التي سبقتها	١٠٠	٥٨,٧٤	٦٤,٤	٥٧,١

*** التقطت المستعمرات ذات الصفات المظهرية الآتية : كريمية اللون محدبة أو مغزلية وتظهر عند الفحص تحت المجهر ، عصويات طويلة ، تجمعاتها مفردة أو ثنائية أو على شكل سلاسل من ٣-٦، غير مكونة للأبواق، إيجابية التفاعل لصبغة جرام.**

لقد نجحت الطريقة المعتمدة في الدراسة الحالية لعزل بكتيريا LBA من براز الأطفال الرضع طبيعياً ولعمر شهر وقد كانت العزلة المحلية مشابهة للسلالة القياسية في حملها للعديد من الصفات بل وتفوقت عليها في بعض الصفات .

جدول (٢): نتائج فحص تخمر الكربوهيدرات للعزلات المحلية التسعة والسلالة القياسية من بكتيريا LBA ومقارنتها مع كتاب Bergey's (1986, Holt & Kriege)

الكربوهيدرات المستخدمة	نتيجة الفحص بسبب ما ورد في كتاب Bergey's*	العزلات المحلية التسعة	السلالة القياسية
Arbinose	–	–	–
Cellibose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galatose	+	+	+
Glucose (aciad)	+	+	+
Glucose (gas)	–	–	–
Gluconat	–	–	–
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Manutol	+	+	+
Mannose	–	–	–
Melezitose	+	+	+

Melibiose	d	¨	–
Raffinose	d	+	–
Rhmanose	–	–	–
Ribose	–	–	–
Salicin	+	+	+
Sorbitol	–	–	–
Sucrose	+	+	+
Terhalose	+	+	+
Xylose	–	–	–
Esculine	+	+	+

+ = ٩٠ % من السـلالات أو أكثر تعطي فحصاً موجباً ،
– : ٩٠ % من السـلالات أو أكثر تعطي فحصاً سـالباً ،
d : ١١ – ٨٩ % من السـلالات تعطي فحصاً موجباً .

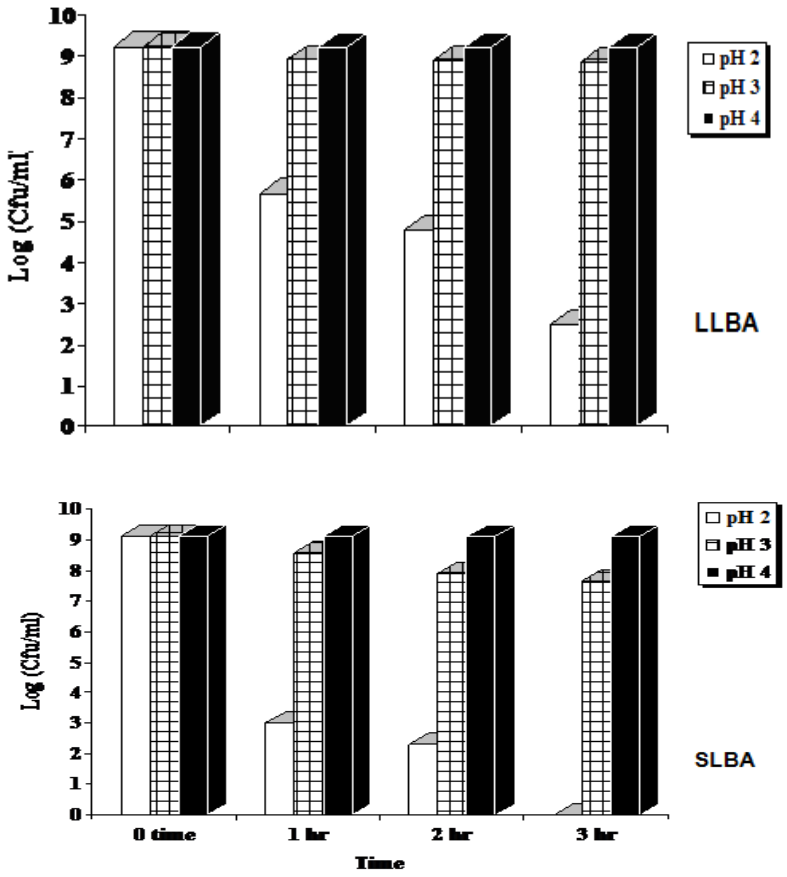
جدول (٣): نتـائج بعض الإختبـارات الكيموحيويـة التـي أجريـت علـى العزلات المحليـة التسـعة والسـلالة القياسـية لبكتيريا *LBA* .

الفحص	العزلات المحلية التسـعة	السـلالة القياسـية
فحص الكاتاليز	–	–
فحص تكوين الأمونيا من الأرجنين	–	–
فحص تحليل الجيلاتين	–	–
فحص تحليل الكازين	–	–
فحص إنتاج الأندول من التربتوفان	–	–
فحص تحليل النشأ	+	+
النمو في درجة حرارة ٥ و ١٥ ^{0}م	–	–
النمو في درجة حرارة ٢٥ ^{0}م	+	+
النمو في درجة حرارة ٣٥ ^{0}م	++	++
النمو في درجة حرارة ٤٥ ^{0}م	+++	+++

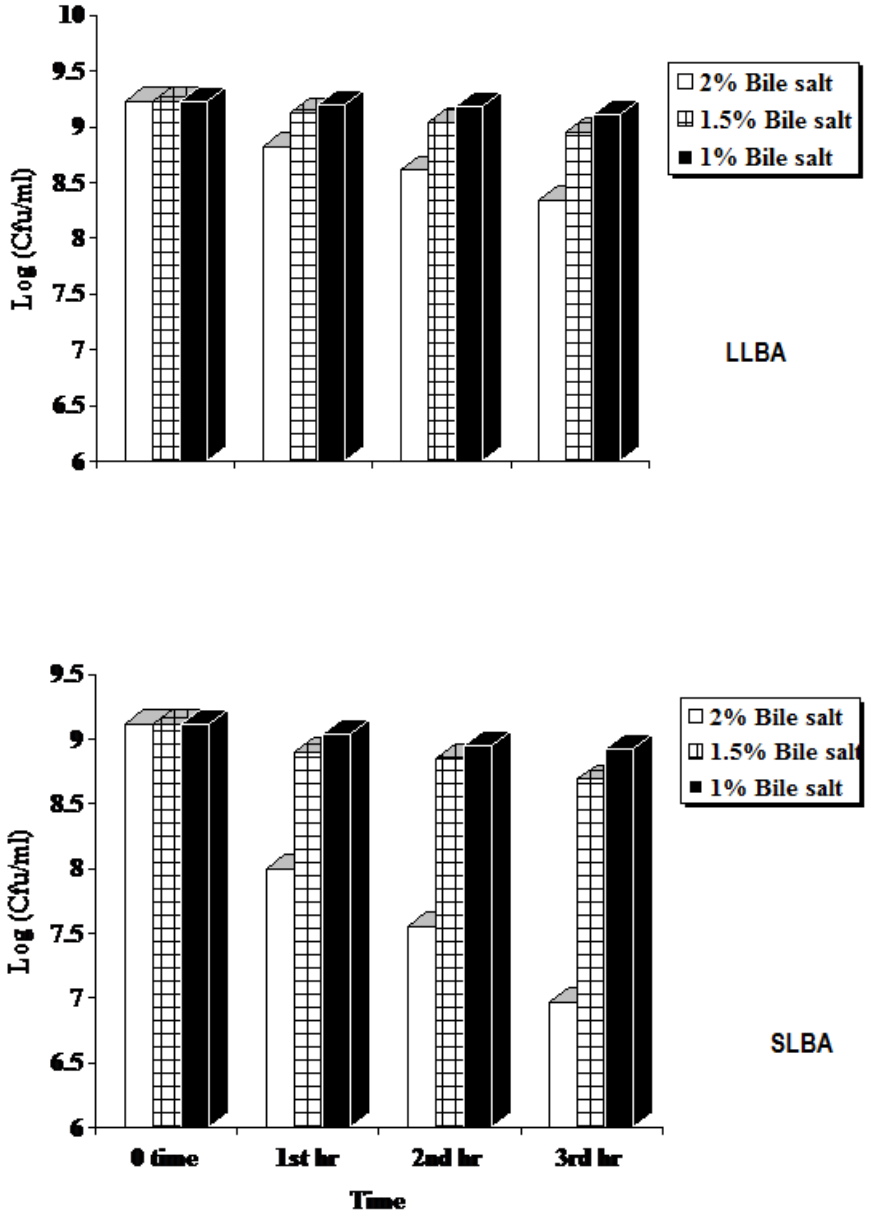
– : عدم ظهور عكارة ،
+ : ظهور عكارة ضعيفة بعد ٧ أيام ،
++ : ظهور العطارة بعد ٣ أيام ،
+++ : ظهور العكارة بصورة واضحة جداً بعد ٤٨ ساعة مع حدوث ترسبات في النمو

جدول (٤): الحموضـة الكليـة والأس الهيدروجـيني للحليـب المنمـى فيـه العـزلات المحلـية التسـعة والسـلالة القياسـية لبكتيريا *LBA*

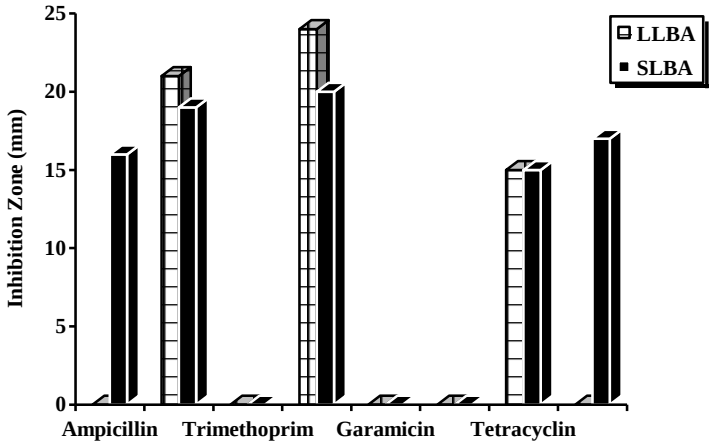
رقم العزلة	رقم الأس الهيدروجيني	% الحموضة الكلية
١"*LLBA* "	4.4	0.17 العزلة المنتخبة
2	5.3	0.58
٣	5.6	0.51
٤	4.6	0.64
٥	5.0	0.61
٦	5.3	0.58
٧	4.7	0.69
٨	5.1	0.59
٩	5.7	0.45
السلالة القياسية *SLBA*	4.6	0.65



شـكل (١): يبين لـوغـاريتم الأعداد الحـية المتبقـية من بكتيـريا LLBA و SLBA
عند أس هيدروجيني ٢ و ٣ و ٤ خلال ٣ سـاعات .



شـــكل (٢): يبـين حيويـة بكتيـــريا LLBA و SLBA عنـد تـــركيزات ١ و ١,٥ و ٢ % مـن أمـلاح صـفراء لـمدة ٣ ســاعات.



شـكل (٣): يبين حسـاسـية بكتيريا LLBA و SLBA تجاه بعض المضـادات الحيـوية.

المراجع

القصـاب، عبد الجبـار عمـر. (١٩٨٨) . التأثيـر المضـاد لبكتيريـا حـامض اللبنـيك علـى بعـض أنـواع البكتيريا المرضية، رسالة ماجستير، كلية الزراعة – جامعة بغداد.

Bhowmik, T; Johnson, M.C. and Ray, B. (1985). Isolation and partial characterization of surface protein of Lactobacillus acidophilus. International Journal of Food Microbiology. Vol. 12 P. 311-321.

Bozoglu, T. F. and Ray, B. (1996). Lactic acid bacteria: Current advance in metabolism, Genetics and application. Springer verlag. Berlin, Germany.

Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology. eight edition. The Williams and Wilkin company Baltimore.

Buck, L. M and Gilliland, S. E. (1995). Comparisons of freshly isolated strains of Lactobacillus. acidophilus of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. Journal of Dairy Sci. Vol. 77 P.2925-2933.

Cowan, S. T. (1974). Manual for Identification of medical bacteria. Cambridge University Press, U.K.

Elmer, H. M. (1978). Standard methods for the examination of dairy products. Interdisciplinary books and periodicals for the professional and Layman.

Gilliland, S.E. (1979). Beneficial interrelationships between certain microorganisms and human. Candidate microorganisms for use as a dietary Adjuncts. Journal of food protection Vol. 42 No. 2.

Gilliland, S. E. (1985).Bacterial starter Culture for foods. CRS press. Inc. Boca Raton Florida. U.S.A.

Gupta, P. K; Mital, B. K. and Gupta, R. S. (1995). Antibiotic sensitivity pattern of various Lactobacillus acidophilus strains. Indian Journal of experimental Biology Vol. 33 P. 620-621.

Gupta, P. K; Mital, B. K and Garg, S. K. (1996). Characterization of Lactobacillus acidophilic strains for use as dietary adjunct. International Journal of food microbiology Vol. 29, No. 7.

Harrigan, W. F and McCance, M. E. (1966). Laboratory methods in microbiology. Academic Press. London. U.K.

Holt, J. C and Krieg, N. R. (1986).Bergey's manual of systematic Bacteriology. Vol. 2, Williams and Wilkins, London.

IDF. Bulletin. 306. (1995). Fermented and non fermented milk products detection and enumeration of Lactobacillus acidophilus culture media, P.23-33.

Johnson, M. C; Ray, B and Bhowmik, T. (1987). Selection of Lactobacillus acidophilus strains for use in acidophilus products. Antonine Van Leeuwehoek. Vol. 53, P. 215-217.

Lankaputhra, W. E. V and Shah, N. P. (1995). Simple method for selective enumerat5ion of Lactobacillus acidophilus in yoghurt supplemented with L. acidophilus and Bifidobacter spp. Milchwissenschaft vol. 51, No. 8.

Nelson, W. E. (1983). Nelson Text book of pediatrics, twelfth edition W.B. Saunder Company.

Norris, J. R and Richmond, M. H. (1978). Essays in microbiology. John Wiley & Sons. New York.

Robinson, R. K. (1990). Dairy microbiology. Vol. 1. The microbiology of milk. Elsevier applied Sci. London & New York.

Savadogo, A.; Ouattara, C.A.T.; Bassole, I.H.N; 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.

Schentiz, C; Nuotio, L and Loumatma, S. (1993). Adhesion of Lactobacillus acidophilus in avian intestinal epithelial cell mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). Journal of applied bacteriology. Vol. 74, P.290-294.

Vinderola C.G.; Reinheimer, J.A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria; a comparative "In vitro" Study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. Food research International 36, 895-904.

J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 34 (4), April, 2009

COMPARATIVE STUDY OF BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF A LOCAL ISOLATE AND IMPORTED STRAIN OF *Lactobacillus acidophilus*

Al-Sheikh Thahir, A. A.; A. K. Al-Darwash and A. Salim
Department of Food Science and Biotechnology, College of Agriculture, University of Baghdad,

ABSTRACT

This study consisted of two stages , the first included isolation of 143 isolates of *Lactobacillus* species which were recovered on MRS media from stools of breastfed children aged 12 -26 days. Nine isolates were chosen and identified by microscopical and biochemical as local *Lactobacillus acidophilus* (LLBA) among which one was chosen for far their studies as being the highest in production of lactic acid compared to others. A standard strain of the same bacteria was used for comparison throughout the study.

In the second stage of the study, characteristics of local and imported strains were studied . The LLBA was superior in acidity resistance . It retains high viability in pH 4 for 3 hours , but it's viability at pH 3 was reduced during storage for 1 – 3 hours. This reduction in viability was more pronounced when pH reduced to 2 and with increasing storage period. Standard *lactobacillus* acidophilus (SLBA) also retained high viability at pH 4 but ,reduction in pH 3 and 2 and increasing the time of treatments reduced its viability more severe than LLBA .

The LLBA retained higher viability in bile salts concentrations of 1, 1.5 and 2% for 1, 2 and 3 hours . Results showed that erythromycin , rifadin and tetracycline antibiotics inhibited the growth of LLBA, also, SLBA was inhibited by the same antibiotics and by Ampicillin and Cephalexin .

Keywords: Biochemical characteristics , Lactobacillus acidophilus (local + imported) , Resistance of acidity and bile salts .

***College of Veterinary Medicine, University of Baghdad.**