Journal of Environmental Studies [JES] 2013. 10: 1- 4
Original Paper

تحضير انواع مختلفة من المعزز الحيوي Probiotics البكتيري من بكتريا *Lactobacillus* المحلية

سعد حسين خضير، إيمان هندي كاطع، أمل عبد النبي حالوب، نبال خليل موسى.
دائرة بحوث البيئة والمياه، وزارة العلوم والتكنولوجيا_بغداد، العراق.

استلام: ٧ أكتوبر، ٢٠١٢ قبول: ١٢ نوفمبر ٢٠١٢

الخلاصة

أجريت الدراسة لتحضير معزز حيوي من بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus sp.* والمعزولة سابقا, والتي اختيرت من بين ٢٦ عزلة بكتيرية معزولة من مصادر مختلفة لمنتجات اللبن المحلية والأجنبية، أظهرت النتائج أن جميع أنواع المعززات الحيوية المحضرة من تلك الألبان أعطت قابلية على النمو في الأوساط الحامضية ولكن بدرجات متفاوتة، وخاصة المعزز الحيوي (٣)، والذي تم تحضيره من خلط عزلات البن المحلي مع عزلات اللبن التركي، احتفظ بأعلى نسبة نمو للخلايا في جميع الظروف المختبرة، حيث احتفظ بنسبة ٩٩.١% خلية حية في الرقم الهيدروجيني ٥ بعد ٣ ساعات من المعاملة، فيما أظهرت العزلات للمعززات الأخرى قابلية اقل وبدرجات متفاوتة، كما بينت النتائج أن عزلات المعزز الحيوي(٣) أعطت المقاومة الأعلى تجاه أملاح الصفراء ،إذ احتفظت بنسبة ٨٨.٤ و٦٦.٣ و ٥.٦ % من نمو الخلايا بتراكيز ٠.١ و٠.٢ و٠.٣% من أملاح الصفراء على التوالي. لذلك فان المعزز الحيوي رقم ٣ ممكن أن يستخدم كأحد المضافات الغذائية الأمينة القادرة على تقوية الفعاليات الايضية للجهاز الهضمي وزيادة كفاءة الجهاز المناعي.

الكلمات الدالة: بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus sp.*، معزز حيوي

المقدمة:

المعززات الحيوية أو البروبيوتيك هي الكائنات الحية المجهرية (في معظم الحالات (البكتيريا في معظم الاحيان) والتي تشبه الكائنات الحية الدقيقة المفيدة الموجودة في أمعاء الإنسان. فهي تسمى أيضا "البكتيريا الصديقة" أو "البكتيريا الجيدة." تكون عادة المعززات الحيوية متاحة للمستهلكين أساسا في شكل لمكملات غذائية وأطعمة والتي يمكن أن تستخدم كطب تكميلي أو بديل Alternative medicine CAM (Neeser and Corthesy, 2003).

تتوفر المعززات الحيوية في الأطعمة والمكملات الغذائية بصورة (كبسولات، وأقراص، والمساحيق) وفي بعض الأشكال الأخرى كذلك. ومن الأمثلة للأطعمة التي تحتوي على البروبيوتيك هي اللبن، الحليب المخمر وغير مخمر وبعض العصائر والمشروبات كفول الصويا. والمكملات بروبيوتيك، والبكتيريا قد تكون موجودة في الأطعمة أصلا أويتم إضافتها خلال التحضير– (Alvarez Olmos and Oberhelman,2001). بكتريا حمض اللبن (العصيات اللبنية) هي النمط الأكثر استخداما وقد استخدمت في صناعة الغذاء لسنوات عديدة بسبب قدرتها على تحويل السكاكر بما فيها اللاكتوز والكربوهيدرات إلى حمض اللبن. وهذا يعطي بالإضافة للطعم المعروف لمنتجات الألبان المخمرة كاللبن ألرائب فهو بخفض درجة الحموضة (الباهاء pH (تقلل من فرص نمو الكائنات المفسدة للطعام وبالتالي تعطي إمكانية فائدة صحية عبر منع الالتهابات المعوية المعدية. وأكثر أنواع الجراثيم البروبيوتيك استعمالاً هي سلالات من الجنس اللاكتوباسيلوس والبفيدوباكتريوم Lactobacillus and Bifidobacterium ويقصدبها المستعمرات البكترية البيروبيوتيك المساعدة للفلورا الطبيعية للجسم وتساعد توازن بيئة الميكروبات على الاستقرار ثانية. ويوصي بهذه العلاجات بعض الأطباء وغالباً ما يوصي بها اختصاصيو التغذية بعد تناول دورة من العلاج بالمضادات ألحيوية أو كجزء من معالجة للأمعاء في الإصابة بعدوى الفطريات البيض candidacies، وفي هذه الحالات قد يقل عدد البكتيريا التي تعمل بتلاؤم مع أجسامنا وهذه حالة تسمح بالمنافسات المضرة للتزايد وبالتالي تؤذي ألصحة. وهنالك بعض الدلائل بأن البروبيوتيك تقوي جهاز المناعة ليقلل من أنواع التحسس ومن الإفراط بتناول ألخمر ومن التوتر النفسي (الكرب) ومن التعرض للمواد السامة وأنواع الأمراض الأخر (Hubner and Surawicz, 2006). (Ezendom and van-Loveren, 2006).

استخدمت منتجات المعزز الحيوي كالطب البديل CAM لمنع وعلاج بعض الأمراض منها: مرض التهاب الأمعاء (Hubner and Surawicz, 2006). التهاب القولون التقرحي (Doran and Gorbach, 2006)، أنواع التهاب المعدة المزمن،تسوس الأسنان، أمراض الثة، الالتهابات المهبلية، الالتهابات الجلدية، التهابات الجهاز التنفسي، وفي علاج الإسهال ومنع وعلاج التهابات المسالك البولية،الحد من تكرا الإصابة بسرطان المثانة والاكزيما وغيرها(Cabana *et al*; 2006). نتيجة لتوجه العلماء بالآونة الأخيرة إلى استخدام المواد ذات المصادر الطبيعية والحيوية في مجال تصنيع الأغذية (Hammerman, 2006) وغيرها فالبحث يهدف إلى تصنيع مضافات غذائية تكون غير ضارة للجهاز الهضمي مقاومة للإفرازات المعدية والمعوية وتعمل على تقوية عمله وعمل الجهاز المناعي من خلال التأكد من خلو المعزز من الإضرار الجانبية على الصحة العامة .

المـواد وطـرائق العـمل:

١ ـ تنشيط العزلات البكتيرية:

تم تنشيط العزلات المعزولة سابقا لبكتريا حامض اللاكتيك على الوسط الزرعي MRS-Agar (Man Rogosa&shape Agar, (Rogos and Sharpe, 1960). عقم الوسط بالموصدة وصب بالأطباق، حضنت الأطباق الملقحة بظروف لاهوائية بوجود غاز ثاني اوكسيد الكربون بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ٤٨ ساعة حيث يتكون الوسط(غم/لتر) من :

* Corresponding author:
Dr. Saad H. Khudair
✉ Saad22004@yahoo.com

- Peptone	10 gm
- Meat extract	10gm
- Yeast extract	5gm
- Sodium acetate trihydrate	5gm
- D-glucose	20gm
- Tween 80	1ml
- Triammonium citrate	2gm
- MgSo4.7H2o	0.2gm
- MnS04.4H2o	0.05gm
- CaCo3	1gm
- Agar	15gm

ولغرض تنشيط العزلات البكتيرية قيد الدراسة استخدم وسط (Nutrient GlucoseYeast xtract Cystein) NGYC المتكون من:

١- حليب فرز مجفف ١٢%
٢- كلوكوز ٢%
٣- مستخلص الخميرة ١%
٤- L-Cystein-Hcl ٠.٠٥%

لقح الوسط بلقاح عزلات بكتريا حامض اللاكتيك ٣% وتم الحضن في درجة حرارة ٣٧C° م لمدة ٢٤ ساعة، تحفظ النماذج في الثلاجة مع مراعاة التنشيط أسبوعيا (Reid and Hammond, 2005).

٢- تحضير خلطات المعزز الحيوي:

استخدمت طريقة Vander hoof and Young, (2004) لتحضير أربعة أنواع مختلفة من المعززات الحيوية وهي:

١- المعزز الحيوي(١) وقد حضر من خلط عزلات الألبان المحلية.
٢- المعزز الحيوي(٢) وقد حضر من خلط عزلات الألبان الأجنبية.
٣- المعزز الحيوي(٣) وقد حضر من خلط عزلات البن المحلي رقم ١ مع عزلات اللبن التركي.
٤- المعزز الحيوي(٤) وقد حضر من خلط عزلات البن المحلي رقم ٢ مع عزلات اللبن الإيراني.

حيث استعمل حليب الفرز(١٢%) لتلقح العزلات المختلفة بنسبة ٣% وحضن الحليب في درجة حرارة ٤٢ م لمدة ٣ ساعات، بعد تمام عملية تخثر الحليب نقل الحليب المتخثر إلى صواني مسطحة وجفف بالفرن الهوائي بدرجة حرارة ٤٠ م، تبع ذلك إجراء طحنه ثم أضيفت أملاح الصوديوم كمواد منظمة للحموضة بنسبة ٢٠% لضبط الرقم الهيدروجيني عند6.5.

دراسة صفة مقاومة الحموضة:

لقح وسط NGYC بلقاح العزلات البكتيرية وبنسبة ١% من البادئ المنشط وحضن في درجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة، ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط بعد تلقيح العزلات ليصبح ٢،٣،٤،٥ باستخدام حامض الهيدروكلوريك تركيز ٥ عياري، بعده أجريت التخافيف للنماذج المسحوبة وبأوقات ١،٢،٣ ساعة.

نقل ١ مل من كل تخفيف إلى أطباق بتري وصب عليها وسط MRS-Cystrinr Agar ،بعدها حضنت الأطباق بظروف لاهوائية بوجود غاز ثاني اوكسيد الكاربون بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ٤٨ ساعة، حسبت أعداد البكتريا الحية باستخدام جهاز عد المستعمرات(Kiss,1983).

دراسة صفة المقاومة لأملاح الصفراء:

أجريت التجربة حسب طريقة (Lankaputhra and Shah, 1996)، حيث لقح وسط NGYC بلقاح العزلات البكتيرية وبنسبة ١% من البادئ المنشط وحضنت في درجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة، ضبط الرقم الهيدروجيني للمعاملات كافة عند 4.5 ،حضر محلول أملاح الصفراء بإذابة ٣٠ غم من أملاح الصفراء في ١٠٠ مل ماء مقطر وعقم المحلول بدرجة حرارة ١٢١ م لمدة ١٥ دقيقة، أضيف محلول أملاح الصفراء إلى وسط NGYC ليصبح التركيز النهائي 0.3,0.2,0.1 %، حسبت الأعداد الحية للبكتريا بعد مرور ٣ ساعات من الحضن.

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج دراسة الصفات المظهرية وبعض الصفات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية قيد البحث بان جميع العزلات تعود للجنس *Lactobacillus sp.* .

لغرض تحديد أفضل معزز حيوي فقد درست صفة مقاومة الحموضة للأنواع الأربعة المحضرة، إذ يظهر جول (١) أن العزلات البكتيرية للمعزز الحيوي(٣) احتفظت بأعلى عيوشية للخلايا ولجميع ظروف وأوقات التجربة،حيث احتفظت بنسبة ٩٩.١% خلية حية في الرقم الهيدروجيني ٥ بعد ٣ ساعات من المعاملة، فيما أظهرت العزلات الأخرى للمعززات قيد الدراسة على قابلية اقل وبدرجات متفاوتة . وقد أشار (Yoo *et. al*, 1996 ; Salminen *et al*., 2005) إن العزلات البكترية حتى يكون لها تأثير مفيد فيجب أن تكون مقاومة للعصير المعدي ،وان المدة الزمنية التي يبقى فيها المنتوج اللبني في المعدة لاتتجاوز الساعتين.

توصل كل من (Lankaputhra and Shah.1996; Vanderhoof and Young, 2004) عند دراستهم لعيوشية عدد من سلالات حامض اللاكتيك المنماة في وسط NGYC وعند قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني الحامضي، ان هذه السلالات تختلف في مقدرتها على البقاء حية في الظروف الحامضية واعتماداً على أنواع البروتينات المكونة لجدرانها الخلوية وعلى المصدر الذي عزلة منة.

أما نتائج دراسة صفة المقاومة لأملاح الصفراء فتشير وكما يوضح الجدول (٢) إلى تأثر نمو الخلايا لجميع العزلات وللأنواع الأربعة من المعزز، إلا أن عزلات المعزز الحيوي (٣) أظهرت القابلية الأعلى على الاحتفاظ بأعلى نسبة للنمو ولجميع تراكيز الصفراء قيد الدراسة ،حيث احتفظت بنسبة ٨٨.٤ و٦٦.٣ و ٥.٦ % من نموها بصورة جيدة ا بتراكيز ٠.١ و٠.٢ و٠.٣% من أملاح الصفراء على التوالي. وقد علل (Robinson,1991; Walker and Buckly, 2005) قدرة بكتريا حامض اللاكتيك على مقاومة تراكيز معينة من أملاح الصفراء إلى طبيعة البروتين الموجود في جدار الخلية إذ وجد أن ٣٠% من الأحماض الامينية لهذا أبروتين هي من النوع الكاره للماء، وان تلف أو إضرار هذه الطبقة يؤدي إلى زيادة حساسية البكتريا لكثير من ظروف القناة الهضمية ومن ضمنها أملاح الصفراء. ونتيجة لما تقدم يظهر أن المعزز الحيوي(٣) أعطى أفضل نتائج من حيث مقاومة عزلاته للظروف الحامضية وكذلك لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء مما يجعله مناسباً للاستخدام.

نوع المعززات	مدى الرقم الهيدروجيني	الخلايا الحية(%) وقت الحضن(ساعة) ١	٢	٣
معزز(١)	٢	٠.٣	٠.١	٠.٠
	٣	٧.٨	٣.٩	3.1
	٤	٧٥	٥٤	٣٩.٩
	٥	٩٨.١	٩٢.٥	٨٩.٩
معزز(٢)	٢	٠.٦	٠.٣	٠.٠
	٣	٩.٨	٤.٧	١.٨
	٤	٦٥	٤١	٣٠.٩
	٥	٩٥.١	٩١.١	٨٨.٥
معزز(٣)	٢	١.٢	٠.٨	٠.٣
	٣	١١.٥	٧.٩	٣.٣
	٤	٨٥	٦٧	٥١
	٥	١٠٠	٩٩.٧	٩٩.١
معزز(٤)	٢	٠.٦	٠.٤	٠.٠
	٣	٩.٧	٦.٢	١.٩
	٤	٧٨	٥٦	٣٨
	٥	٩٨.٨	٩٥.١	٩٢.٢

جدول(١). دراسة صفة مقاومة الحموضة لعزلات المعززات الحيوية الأربعة قيد الدراسة.

نوع المعزز	تركيز أملاح الصفراء(%)	الخلايا الحية(%)
معزز(١)	٠.١	٧٠.١
	٠.٢	٤٩.٩
	٠.٣	١.٨
معزز(٢)	٠.١	٦٦
	٠.٢	٤١.٢
	٠.٣	١.٩
معزز(٣)	٠.١	٨٨.٤
	٠.٢	٦٦.٣
	٠.٣	٥.٦
معزز(٤)	٠.١	٧٢.١
	٠.٢	٥١.٢
	٠.٣	٢.٢

جدول(٢). دراسة صفة مقاومة تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء لعزلات المعززات الحيوية الأربعة قيد الدراسة

الاستنتاجات:

المعزز الحيوي رقم ٣ الذي حضر من خلط عزلات اللبن المحلي رقم ١ مع عزلات اللبن التركي أعطى أفضل نتائج وممكن استخدامه كمضافات غذائية مقوية للعمليات الايضية للجهاز الهضمي تجاه الحموضة ومقاومة أملاح الصفراء مما يعطي تأثير قوي لزيادة كفاءة الجهاز المناعي.

تعطي تجارب كشف فوائد العلاجات بالبروبيوتيك مجالاً من الاستعمالات الطبية النافعة المهمة، ولكن هنالك محدودية في الأبحاث التي أجريت لكثير من الفوائد المحتملة ولا تتوفر إلا نتائج أولية، ومن المهم أن ننبه إلى أن التأثيرات الموصوفة ليست تأثيرات عامة للبروبيوتيك، فالبحث الحديث على البيولوجيا الجزيئية وعلم المورثات للكتوباسيلوس (العصيات اللبنية) قد ركز على التفاعل مع جهاز المناعة، وإمكانية مضادة السرطان، وإمكانية المعالجة الحيوية في حالات الإسهال المرتبط بالصادات الحيوية، وإسهال المسافرين، وإسهال الأطفال، ومرض الكولون الالتهابي، وتناذر الكولون الهيوج. وكل التأثيرات يمكن عزوها إلى السلالات المختبرة وليس إلى الأنواع وليس إلى كل مجموعة العصيات اللبنية (أو أنواع البروبيوتيك الأخرى).

ونظراً لأن بكتريا حمض اللبن تحول بشكل فعال اللاكتوز إلى حمض اللبن، فإن تناول بعض السلالات المعينة النشطة قد يساعد في عدم تحمل اللاكتوز ويجعل الأفراد أكثر تحملاً للاكتوز مقارنة بحالة عدم تناول هذه السلالات. وفي الممارسة العملية لا تستعمل البروبيوتيك لهذا الغرض بالذات، لأن معظمها قليلة المحتوى من خميرة الاكتاز مقارنة بالبكتريا الطبيعية في اللبن الرائب.

References:

de Man, J.D., Rogosa, M.. Sharpe, M.E. (1960). "A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*". *J Appl Bact* 23 (130–135).

Kiss, I. (1983). Testing method in food microbiology. Elsevier Amsterdam, Oxford.

Robinson, R.K. (1991). Therapeutic properties of fermented milk .Elsevler Applied Sci. London and New York.

Lankaputhra, W.E. and Shah, N.P. (1995). Simple method for selective enumeration of *Lact. acidophilus* in yoghurt supplemented with *Lact. acidophilus* and *Bifidobacter sp.* Milchwissenschaft, 51, 8.

Lankaputhra, W.E. and Shah, N.P. (1996) Survival of *Lact. acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* In presence of acid and bile salt. Cultured dairy products J. 30, 5.

Yoo, I.K., Chang, H., Lee, E., Chang, Y. and Moon, S. (1996). Effect of pH on the

Walker, R. and Buckley, M. (2005). *Probiotic Microbes: The Scientific Basis*. *Report of an American Society for Microbiology colloquium.*

Doron, S. and Gorbach, S.L. (2006). Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.*, 4 (2): 261-275.

Ezendam, J. and van Loveren, H. (2006). Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutrition Reviews*. 64(1):1-14.

Cabana, M.D., Shane, A.L. and Chao, C. (2006). Probiotics in primary care pediatrics. *Clinical Pediatrics*. 45 (5): 405-410.

Hammerman, C., Bin-Nun, A. and Kaplan, M. (2006) Safety of probiotics: comparison of two popular strains, *B.M.J*., 333(7576): 1006-1008.

Huebner, E.S. and Surawicz, C.M. (2006). Probiotics in the prevention and treatment of gastrointestinal infections. *Gastroenterology Clinics of North America*.; 35 (2): 355-365.

production of lactic acid and secondary products in batch cultures of *Lact. casei*. J. Microbiol.Biotechnol., 6:484 .

Alvarez-Olmos, M.I. and Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*.; 32(11):1567-1576.

Neeser, S. and Corthesy, I. (2003). Nutrition, Health and well being-probiotics. P. 21-23.

Vanderhoof. J.A. and Young, R.J. (2004). Current and potential uses of probiotics. *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology*. 93 (5 suppl 3): S33-S37

Reid, G. and Hammond, J.A. (2005). Probiotics: some evidence of their effectiveness. *Canadian Family Physician*.; 51: 1487-1493.

Salminen, S.J., Gueimonde. M. and Isolauri, E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *Journal of Nutrition*. 135(5): 1294-1298.

Preparing of bacterial probiotic from *Lactobacillus sp.*

Saad H. Khudair, Iman H. Qatia, Amal Ab. Halub and Nibal Kh. Mousa

Environment and Water Research Directorate. Ministry of Science and Technology.Baghdad, Iraq.

Abstract:

Four types of probiotics were prepared from local isolates to study some factors effected which one was more resistance to acidity and bile salts. The ability of probiotics were tested for acidity resistance. Results indicate that the probiotic (3) was gave the highest survival rate 99.1% at pH 5 after 3 hour of incubation 37C°. Results also showed that the probiotic (3) was more resistance to bile salts at all concentration and resulted in 88.4, 66.3 and 5.6% survival rate at 0.1, 0.2 and 0.3 bile salts respectively, finally, probiotic (3) was selected as the best and safe probiotic, so it can use to support immune system .The goal of project is to preparate and test local probiotics resistant for some concentration of bile salt and acidity.