استخدام عزلات محليه مختلفة من بكتيريا حامض اللاكتيك في مقاومة املاح الصفراء وخفض الكوليسترول

غانم محمود حسن حامد صالح محمد نزار فخري محمد
كلية الزراعة والغابات – قسم علوم الاغذية – جامعة الموصل – العراق

الخلاصة

عزلت بكتريا *Bifidobacterium sp.* و*Lactobacillus acidophilus* من براز أطفال حديثي الولادة ، وبكتريا *Lact. plantarum* من المخللات ، أما بكتريا *Lact. bulgaricus* و *Strep. thermophilus* عزلت من لبن غنم محلي وشخصت عن طريق دراسة الفحوصات المظهرية ، والكيميوحيوية لها ، ومقارنتها مع ما جاء بموسوعة Bergey's Manual (١٩٨٦) للتأكد من نقاوتها . هذا بالاضافة للحصول على عزلات مستوردة من بكتيريا *Lact. acidophilus* و*Bifidobacterium sp.* و*Lact. casei*. كما درست مقاومة أنواع البكتريا أعلاه لأملاح الصفراء عند تركيزين ١ و٢٪ وتأثيرها في نموها ، اذ وجد أن التركيز ٢٪ أدى إلى انخفاض سريع في أعداد البكتريا مع زيادة وقت التعرض ، وكانت العزلة المستوردة *Bifidobacterium sp.* أكثر أنواع البكتريا مقاومة لأملاح الصفراء عند تركيز ١٪ ثم العزلة المستوردة *Lact. acidophilus* مع تفوقها على العزلة المحلية ،وكان كل من بكتريا*Lact. bulgaricus* و *Strep. thermophilus* الأقل مقاومة لأملاح الصفراء. أظهرت جميع العزلات قدرتها على خفض الكولسترول خارج الجسم الحي (*in vitro*) بعد مرور ٢٤ ساعة من التحضين وازداد الانخفاض مع زيادة مدة التحضين إلى ٤٨ ساعة وكان أكثرها خفضاً للكولسترول هي العزلة المحلية لبكتريا *Bifidobacterium sp.* ، في حين كانت أدنى نسبة انخفاض في الكولسترول من قبل بكتريا *Lact. bulgaricus* و *Strep. thermophilus* .

المقدمة

حظيت بكتريا حامض اللاكتيك اهتماماً كبيراً في مجال صناعة الألبان والصناعات الغذائية ، وشغلت مساحة واسعة في دائرة البحوث الطبية والصيدلانية والزراعية ، وكذلك في مجال البحوث والدراسات التي تتناول شتى جواند الاستفادة من هذه البكتريا ومحاولة استخدامها في أغذية طبية لحل العديد من المشاكل الصحية ذات العلاقة بالمستهلك ، فهي تخمر السكريات وتستخدمها كمصدر للطاقة وتنتج حامض اللاكتيك بشكل رئيس (التخمير المتجانس) أو إلى حامض اللاكتيك ومركبات أخرى مثل حامض الخليك والايثانول وثاني أوكسيد الكاربون وحامض الفورميك والسكسنيك (التخمر غير المتجانس). استخدمت هذه البكتريا في إنتاج الألبان المتخمرة منذ القدم وكان اكتشافها عن طريق الصدفة. أما في الوقت الحاضر فانها تستخدم وفقاً لقابليتها على تحسين الحالة الصحية ومعالجة الأمراض ، إذ سمي قسم من هذه الأحياء بكتريا العوامل الحيوية الساندة (Probiotic) فهي غير ضارة وليس لها تأثيرات جانبية ، ولهذا السبد فقد ازدادت شعبية استخدام بكتريا العوامل الحيوية الساندة في مختلف أنحاء العالم لما لهذه الأحياء من فوائد في القناة الهضمية للإنسان مثل إعاقة نمو الأحياء المرضية (Havenaar و Huis In't Veld ،١٩٩٢) ، وبناء مقاومة ضد الأمراض التي تصيد الجهاز الهضمي ، ومقاومتها لأملاح الصفراء وخفضها للكولسترول (Abd-Elsalam وآخرون ٢٠٠٤) ، وفي بعض الحالات فان تناول مثل هذه الألبان يكون مؤثراً في الأطفال ، وفي التخفيف من حالات سوء هضم سكر اللاكتوز عند البالغين ، ولمقاومتها الظروف غير الطبيعية للجهاز الهضمي عند مرورها خلاله من حموضة المعدة المرتفعة والتراكيز العالية لأملاح الصفراء لتستقر في القناة الهضمية (الأمعاء) (Kullen و Klaenhammer ١٩٩٩).

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص بكتريا حامض اللاكتيك والتي قسم منها قد تمتلك العوامل الحيوية الساندة من المصادر الطبيعية لها (براز الأطفال والمخللات وبكتريا بادئ اليوغرت من اللبن المحلي) ودراسة الصفات الكيميوحيوية والفسلجية والمزرعية لها ، ومقارنتها مع بعض العزلات المستوردة. ودراسة مقاومتها لأملاح الصفراء ودراسة الفعل التضادي لهذه البكتريا تجاه بعض البكتريا المرضية وقابليتها على خفض الكولسترول .

مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول
تاريخ تسلم البحث ٢٧ / ١١ /٢٠٠٧ وقبوله ٢٠٠٨/٢/٢١

مواد البحث وطرائقه

عينات مصادر البكتريا :

عزل بكتريا *Bifidobacterium sp.* و*Lact. acidophilus* من البراز : جمعت ستة عينات من براز أطفال حديثي الولادة بعمر ٨ ـ ٢٠ يوماً والمعتمدون في تغذيتهمعلى حليب الأم فقط والذين يتمتعون بصحة جيدة وغير مصابين بالأمراض . حيث اخذ ١غم من براز الاطفال مع ٩ مل وسط غذائي معقم MRS وحضنت على ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة وكررت هذه العملية ثلاث مرات ونميت البكتيريا في الوسط الغذائي MRS. $CaCO_3$ Agar وحضنت على ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة بوجود ١٠% CO_2 ثم نميت المستعمرات التي ظهرت باطباق بتري المعقمة على الوسط MRS. $CaCO_3$ Agar وتم انتقاء المستعمرات بعد فحصها بالمجهر وزراعتها بطريقة التخطيط على وسط المائل MRS. $CaCO_3$ Agarوبعدها اخذت عقدة من النموات بواسطة اللو ونميت في الوسط السائل MRS وحفظت في الثلاجة .

عزل بكتريا *Strep. Thermophilus* و *Lact. bulgaricus* من اللبن المحلي : استخدم لبن غنم محلي من الأسواق المحلية لعزل بكتريا *Strep. thermophilus* **و** حفظت في الثلاجة لدراسة خصائصها وصفاتها وقورنت مع موسوعة Bergey's Manual (١٩٨٦) بعد دراسة الصفات الكيميوحيوية لها **.**

عزلت بكتريا *Lact. plantarum* وذلك بأخذ خمسة نماذج من المخللات جمعت من محلات بيع المخللات في مناطق مختلفة لمدينة الموصل وأتبعت الخطوات ذاتها في عزل البكتيريا من البراز .

أجريت الفحوصات الكيميوحيوية حسب ما جاء في Harrigan و McCance (١٩٧٦) .

دراسة مقاومة البكتريا لأملاح الصفراء: استخدمت الطريقة التي ذكرهاLankaputhra وShah (١٩٩٥) **قابلية البكتريا على استهلاك الكولسترول :**قدرت نسبة الكولسترول في صفار البيض وفي الوسط MRS-Egg-Yolk (MRS-E-Y)حسب الطريقة التي ذكرها Francey و Elias (١٩٦٨) .وباستخدم صفار البيض المعقم بمرشح Seitz و المضاف للوسط الغذائي MRS لتحضير الوسط الغذائي بنسبة ١:١ لقح الوسط أعلاه بـ ١٪ من العزلات المنشطةوحضنت الأنابيب على ٣٧ْم لمدة ٤٨ ساعة. وذلك بأخذ ٠ مل من كل من العزلات المنماة على وسط MRS-E-Y ووضعت في أنبوبة اختبار وأضيف لها ١ مل إيثانول تركيزه ٩٥٪ ورجت الأنابيب بشكل جيد ثم أجري لها طرد مركزي باستخدام جهاز الطرد المركزي من نوع Table Top Low Speed Centrifuge 80-1 Trip up International Corp. ولمدة ثلاثة دقائق بسرعة ٢٠٠٠ دورة / دقيقة.

نقل ٠ مل من الراشح وأضيف له ٢ مل من كلوريد الحديديك المحضر بإذابة ١٠٠ ملغم من كلوريد الحديديك في ١٠٠ مل من خلات الأثيل ووضع في قنينة معتمة.

أضيف ٢مل من حامض الكبريتيك المركز إلى كل أنبوبة من الأنابيب أعلاه ورجت بشكل جيد ، وتركت الأنابيب لتبرد قبل قياسها في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer المجهز من شركة JENWAY 6300 على طول موجي مقداره ٥٨٠ نانوميتر. حضر محلول قياسي (Blank) بأخذ ٠ مل من الماء المقطر بدل من العزلات البكتيرية مع إجراء نفس الإضافات السابقة.

حضر محلول قياسي من الكولسترول وذلك بإذابة ٢٠٠ ملغم من الكولسترول النقي في ١٠٠ مل إيثانول تركيزه ٩٥٪ وأخذ ١ مل منه ، وأكمل إلى ٢٠ مل بالكحول نفسه ثم أخذ ٠ مل من المحلول الأخير وأضيف له نفس الإضافات الأخرى.

استخرجت نسبة الكولسترول في صفار البيض والوسط المستخدم كما ياتي :

$$\text{ملغم كولسترول/مل مصل} = \frac{\text{قراءة النموذج} - \text{قراءة Blank}}{\text{قراءة المحلول القياسي} - \text{قراءة Blank}}$$

النتائج والمناقشة

مصادر العزل : من خلال التشخيص وبعد إجراء الفحوصات التأكيدية لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك ومطابقتها مع موسوعة Bergey's Manual(١٩٨٦) يبين الجدول (١) الفحوصات الظاهرية والمزرعية للعزلات البكتيرية .

الـ ١) : الفحوصات الظاهرية والمزرعية للعزلات البكتيرية المحلية والمستوردة مقارنة مع ما جاء بموسوعة Bergey's Manual

العزلات البكتيرية / الفحص	*Strep. thermophilus* العزلة (١)	*Bifidobacterium sp.* العزلة (٢)	*Lact. bulgaricus* العزلة (٣)	*Lact. acidophilus* العزلة (٤)	*Lact. plantarum* العزلة (٥)	عزلات مستوردة		
						Lact. casei	*Bifidobacterium sp.*	*Lact. acidophilus*
شكل الخلية	كروية إلى بيضوية نظام التجمع لها ثنائية أو على شكل سلاسل	عصوية قصيرة وبعضها منحني تشبه مضرب الكرة وقسم منها بشكل حرف Y (نظام التجمع لها مفردة أو ثنائية)	عصوية ذات نهايات مستديرة نظام التجمع لها منفردة أو على شكل سلاسل قصيرة	عصوية مستقيمة ذات نهايات مستديرة (مغزلية الشكل منفردة وبعضها زوجي)	عصوية مستقيمة ذات نهايات مستديرة مغزلية الشكل منفردة	عصوية ذات سلاسل قصيرة مفردة أو ثنائية ذات نهاية مستديرة	عصوية قصيرة وبعضها منحني تشبه مضرب الكرة وقسم منها بشكل حرف Y نظام التجمع لها مفردة أ، ثنائية	عصوية مستقيمة ذات نهايات مستديرة مغزلية الشكل منفردة بعضها زوجية
شكل الخلية حسب Bergey's Manual	مطابقة	مطابقة	مطابقة	مطابقة	مطابقة	مطابقة	مطابقة	مطابقة
صبغة كرام	+	+	+	+	+	+	+	+
الحركة	-	-	-	-	-	-	-	-
تكوين السبورات	-	-	-	-	-	-	-	-
الاختبارات المزرعية								
النمو في درجة حرارة ٥°م	-	-	-	-	+++	-	-	-
النمو في درجة حرارة ١٥°م	±	-	-	-	+	±	-	-
النمو في درجة حرارة ٢٥°م	±	±	±	±	+++	+++	±	±
النمو في درجة حرارة ٣٥°م	+++	+++	+++	+++	±	+++	+++	+++
النمو في درجة حرارة ٤٥°م	+++	+++	+++	+++	-	±	+++	+++

– لا يوجد نمو + يوجد نمو ± يوجد نمو ضعيف

الاختبارات الكيموحيوية : يظهر الجدول (٢) الاختبارات الكيموحيوية التي اجريت على العزلات البكتيرية ؛ إذ يتبين أن جميع العزلات كانت غير مسيلة للجيلاتين لعدم امتلاكها القابلية على إفراز إنزيم الجيلاتينيز حسب ما جاء به Buchanan و Gibsons (١٩٧٤) في اشتراك جنس Lactobacillus في هذه الخاصية.

تخمير السكريات : يظهر الجدول (٣) نتائج اختبار تخمير السكريات بفعل العزلات البكتيرية.

الجدول (٢) : الاختبارات الكيميوحيوية للعزلات البكتيرية المحلية والمستوردة

العزلات البكتيرية / الفحص	*Strep. thermophilus*	*Bifidobacterium sp.*	*Lact. bulgaricus*	*Lact. acidophilus*	*Lact. plantarum*	*Lact. casei* عزلة مستوردة	*Bifidobacterium sp.* عزلة مستوردة	*Lact. acidophilus* عزلة مستوردة
إسالة الجيلاتين	-	-	-	-	-	-	-	-
تحلل الكازين	±	-	-	-	-	+	-	-
تحلل النشأ	+	-	-	-	-	-	-	-
فحص الكاتاليز	-	-	-	-	-	-	-	-
تكوين الأمونيا من الأرجنين	-	-	-	-	-	-	-	-
إنتاج الأندول من التربتوفان	-	-	-	-	-	-	-	-

- غير محللة ،+ محللة ، ± ضعيفة.

تم مطابقتها مع ما جاء بموسوعة Bergey's Manual

الجدول (٣) : تخمير السكريات من قبل العزلات البكتيرية المحلية والمستوردة

السكريات / العزلات البكتيرية	*Strep. thermophilus*	*Bifidobacterium sp.*	*Lact. bulgaricus*	*Lact. acidophilus*	*Lact. plantarum*	*Lact. casei* عزلة مستوردة	*Bifidobacterium sp.* عزلة مستوردة	*Lact. acidophilus* عزلة مستوردة
كلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+
فركتوز	+	+	+	+	+	+	+	+
كالاكتوز	-	±	±	+	+	+	+	+
سكروز	+	±	-	+	+	+	±	+
لاكتوز	+	+	+	+	+	+	+	+
مانوز	-	-	-	+	+	+	-	+
رافينوز	±	±	-	±	+	-	+	+
أسكيولين	-	+	-	+	+	+	+	+
سالسين	-	-	-	+	+	+	-	+
مالتوز	-	+	-	+	+	+	+	+
أرابينوز	-	-	-	-	-	-	-	-
سوربيتول	-	-	-	-	+	+	-	-
مانيتول	-	-	-	-	+	+	-	-
زايلول	±	-	-	-	+	-	-	-

+ تخمر السكريات، - غير مخمرة للسكريات ،± تخمر السكريات بشكل ضعيف .

مقاومة البكتريا لأملاح الصفراء : يبين الجدول (٤) حيوية العزلات المحلية والمستوردة لبكتريا حامض اللاكتيك في تراكيز ١ و٢٪ من أملاح الصفراء لفترات من صفر إلى ١ و ٢ و ٣ ساعة وبتخفيف ١٠$^{-5}$ اذ يلاحظ عموماً انخفاض في أعداد البكتريا بزيادة وقت تعرضها لأملاح الصفراء وكان الانخفاض سريعاً عند التركيز ٢٪ من أملاح الصفراء مما هو عليه في التركيز ١٪ ، إذ وجد بأن العزلة المستوردة لبكتريا *Bifidobacterium sp.* هي أكثر أنواع البكتريا مقاومة لأملاح الصفراء عند تركيز ١٪ اذ انخفض هذا العدد من ٢١٥ (CFU / مل) عند الوقت صفر أي قبل إضافة أملاح الصفراء إلى ١٠٥ (CFU /مل) بعد مرور ٣ ساعات على وجود هذه البكتريا في الوسط الغذائي الحاوي على ١٪ أملاح صفراء وبنسبة اختزال لأعداد الخلايا بلغت ٥١٪ وهي أقل نسبة لاختزال الخلايا من بقية أنواع البكتريا يليها العزلة المحلية للبكتريا نفسها والتي انخفضت أعدادها من ٢٠٠ (CFU/مل) عند الوقت صفر إلى ٩٤ (CFU/مل) بعد مرور ثلاث ساعات وبنسبة اختزال بلغت ٥٣٪ أما بكتريا *Lact. acidophilus* فلقد تلتها من حيث مقاومتها لأملاح الصفراء فقد تفوقت العزلة المستوردة على المحلية من اذ مقاومتها لتركيز ١٪ أملاح صفراء اذ بلغت النسبة المئوية للاختزال بعد مرور ثلاث ساعات على التحضين بوجود أملاح الصفراء ٥٨ و٥٩٪ على التوالي وهذا يتفق مع ما ذكره Tanaka وآخرون(١٩٩٩) بأن نشاط إنزيم Bile salt hydrolase كان عالياً في بكتريا *Bifidobacterium sp.* عند مقارنته مع بكتريا Lactobacillus وأن هذا النشاط كان مفقوداً في بكتريا *Strep. thermophilus* ومن خلال الجدول نفسه نلاحظ أن مقاومة كل من بكتريا *Strep. thermophilus* و *Lact. bulgaricus* كانت ضعيفة عند هذا التركيز من أملاح الصفراء إذ انخفضت أعداد بكتريا *Strep. thermophilus* من ٤٨٠ (CFU / مل) عند الوقت صفر إلى ٢٥ (CFU / مل) بعد مرور ثلاث ساعات من التحضين وبنسبة اختزال بلغت ٩٤٪ في حين انخفضت أعداد بكتريا *Lact. bulgaricus* من ٢٢٠ (CFU / مل) عند الوقت صفر إلى ١٦ (CFU / مل) بعد مرور ساعة واحدة فقط من التحضين في وسط MRS الحاوي على ١٪ وكانت نسبة اختزال الخلايا ٩٢٪ ولم تظهر أي نموات بعد مرور ٢ و ٣ ساعات وكانت نسبة الاختزال ١٠٠٪ عند الوقتين. أما بكتريا *Lact. casei* و *Lact. plantarum* فكانت أكثر مقاومة لأملاح الصفراء من كل من بكتريا *Strep. thermophilus* و *Lact. bulgaricus* وبنسب اختزال بلغت ٧٥ و٩١ و٩٢٪ بعد مرور ٣ ساعات على التوالي .وعموماً فعند استخدام تركيز ٢٪ أملاح صفراء فان الانخفاض في أعداد البكتريا كان أسرع مما هو عليه عند استخدام تركيز ١٪ ووجد بأن كل من بكتريا *Strep. thermophilus* و *Lact. bulgaricus* عانت من انخفاض كلي في الأعداد خلال الساعة الأولى من تعريضها لتركيز ٢٪ أملاح صفراء كما هو واضح من الجدول (٤) إذ كانت النسبة المئوية للانخفاض في أعداد الخلايا ١٠٠٪ بعد مرور الساعة الأولى من التحضين وهذا يعني عدم مقدرتها على مقاومة الظروف الحامضية للجهاز الهضمي وبالتالي عدم وصولها بالأعداد المطلوبة إلى الأمعاء وأظهرت العزلات المستوردة من كل من بكتريا *Bifidobacterium sp.* و *Lact. acidophilus* أكثر مقاومة لتركيز ٢ ٪ أملاح صفراء من العزلات المحلية لكلا النوعين اذ بلغت النسبة المئوية لاختزال الخلايا للأنواع المستوردة بعد مرور ٣ ساعات من التحضين ٩٢ و٩٣ ٩٢٪ على التوالي في حين بلغت هذه النسب للعزلات المحلية ٩٥ و٩٦٪ على التوالي أما العزلة المحلية لبكتريا *Lact. plantarum* والعزلة المستوردة من بكتريا *Lact. casei* فكانت مشابهة تقريباً للعزلات المحلية لبكتريا *Bifidobacteriumsp.* و*Lact. acidophilus* من حيث مقاومتها لتركيز ٢٪ أملاح صفراء ويلاحظ بأن العزلات البكتيرية المحلية والمستوردة كانت أكثر مقاومة لأملاح الصفراء ٢٪ بعد الساعة الأولى ثم حصل انخفاض سريع في هذه الأعداد بعد الساعة الثانية والثالثة من التحضين وهذا يتفق مع ما وجده Abd-Elsalam وآخرون (٢٠٠٤) من أن أعداد بكتريا *Lactobacillus* تحت الدراسة انخفضت قليلاً بعد مرور ثلاث ساعات من التحضين على أس هيدروجيني ٥ في حين عند أس هيدروجيني ٣ فان أعداد البكتريا انخفضت خلال الساعات الأولى ثم حصل انخفاض مفاجئ لهذه الأعداد بعد مرور ٢ ـ ٣ ساعات من التحضين وهذا يتفق أيضاً مع Shah و Jelen (١٩٩٠) إذ وجدا بأن أعداد بكتريا *Lactobacillus* تقل بانخفاض الأس الهيدروجيني للوسط إلى ٣.

الجدول (٤) : حيوية العزلات المحلية والمستوردة لبكتريا حامض اللاكتيك في تراكيز عالية من أملاح الصفراء

العزلات المحلية والمستوردة	١٪ أملاح صفراء			٢٪ أملاح صفراء		
	الوقت (ساعة)	CFU/ml تخفيف ١٠^٥	٪ للاختزال في عدد الخلايا	الوقت (ساعة)	CFU/ml تخفيف ١٠^٥	٪ للاختزال في عدد الخلايا
Strep. thermophilus	صفر	٤٨٠	صفر	صفر	٤٨٠	صفر
	١	٩٤	٨٠ ٤٠	١	-	١٠٠
	٢	٧٠	٨٥ ٤٢	٢	-	١٠٠
	٣	٢٥	٩٤ ٧٩	٣	-	١٠٠
Bifidobacterium sp.	صفر	٢٠٠	صفر	صفر	٢٠٠	صفر
	١	١٧٠	١٥ ٠٠	١	٩١	٥٤ ٥٠
	٢	١٣٥	٣٢ ٥٠	٢	١٢	٩٤ ٠٠
	٣	٩٤	٥٣ ٠٠	٣	٩	٩٥ ٥٠
Lact. bulgaricus	صفر	٢٢٠	صفر	صفر	٢٢٠	صفر
	١	١٦	٩٢ ٠٠	١	-	١٠٠
	٢	-	١٠٠	٢	-	١٠٠
	٣	-	١٠٠	٣	-	١٠٠
Lact. acidophilus	صفر	٢٥٠	صفر	صفر	٢٥٠	صفر
	١	١٨٢	٢٧ ٢٠	١	١٠٧	٥٧ ٢٠
	٢	١٤٠	٤٤ ٠٠	٢	٤٥	٨٢ ٠٠
	٣	١٠١	٥٩ ٦٠	٣	٨	٩٦ ٨٠

يتبع

تكملة الجدول (٤)

العزلات المحلية والمستوردة	١٪ أملاح صفراء			٢٪ أملاح صفراء		
	الوقت (ساعة)	CFU/ml تخفيف ١٠^٥	١٪ للاختزال في عدد الخلايا	الوقت (ساعة)	CFU/ml تخفيف ١٠^٥	١٪ للاختزال في عدد الخلايا
Lact. plantarum	صفر	٤٧٠	صفر	صفر	٤٧٠	صفر
	١	١٩٠	٥٧ ٥٩	١	٩٤	٠٠ ٨٠
	٢	٨١	٧٦ ٨٢	٢	٢٨	٠٤ ٩٤
	٣	٣٣	٩٧ ٩٢	٣	٥	٩٣ ٩٨
*Lact. casei*م	صفر	٣٠٠	صفر	صفر	٣٠٠	صفر
	١	١٨٠	٠٠ ٤٠	١	٩١	٦٦ ٦٩
	٢	١٤٤	٠٠ ٥٢	٢	٩	٠٠ ٩٧
	٣	٧٥	٠٠ ٧٥	٣	٣	٠٠ ٩٩
*Bifidobacterium sp.*م	صفر	٢١٥	صفر	صفر	٢١٥	صفر
	١	١٦٨	٨ ٢١	١	٨٥	٤٠ ٦٠
	٢	١٢١	٧٠ ٤٣	٢	٤٥	٧٠ ٧٩
	٣	١٠٥	٢٠ ٥١	٣	١٧	١٠ ٩٢
*Lact. acidophilus*م	صفر	٢٢٣	صفر	صفر	٢٢٣	صفر
	١	١٩١	٣٠ ١٤	١	١١٢	٧٠ ٤٩
	٢	١٢٩	١٠ ٤٢	٢	٣٥	٣٠ ٨٤
	٣	٩٢	٧٠ ٥٨	٣	١٧	٣٠ ٩٢

م = عزلة مستوردة . - لايوجد نمو

قدرة العزلات البكتيرية على خفض الكولسترول : أظهرت جميع العزلات البكتيرية قدرتها على خفض الكولسترول خارج جسم الكائن الحي بعد مرور ٢٤ ساعة من التحضين في مرق MRS-EY وأن هذا الانخفاض ازداد مع زيادة مدة التحضين إلى ٤٨ ساعة إلا أن مقدار هذا الانخفاض اختلف باختلاف العزلات البكتيرية ويلاحظ من الجدول (٥) بأن العزلة المحلية *Bifidobacterium sp.* وحققت أعلى خفض للكولسترول بعد مرور ٢٤ ساعة من التحضين ؛ إذ انخفضت كمية لكولسترول من ٨ ملغم / مل إلى ٣ ملغم / مل وكانت النسبة المئوية للانخفاض ٥٤٪ وكذلك العزلة المستوردة من البكتريا نفسها ، والتي خفضت كمية الكولسترول من ٨ ملغم / مل إلى ٣ ملغم / مل وبنسبة اختزال ٥٤٪ يلي ذلك بكتريا *Lact. acidophilus* العزلة المحلية التي خفضت كمية الكولسترول من ٨ ملغم / مل إلى ٤ ملغم / مل وبنسبة انخفاض ٤٦٪ وحققت بكتريا *Lact. acidophilus* العزلة المستوردة انخفاضاً أقل في كمية الكولسترول بعد مرور ٢٤ساعة وبنسبة انخفاض بلغت ٣٢٪ وبلغت نسبة الانخفاض في الكولسترول لكل من بكتريا *Strep. thermophilus* و*Lact. bulgaricus* أدنى نسبة وهي ٢١ و ١٦٪ على التوالي وبعد مرور ٤٨ ساعة على التحضين في وسط MRS-EY زادت نسبة الانخفاض في الكولسترول نتيجة استهلاكه من قبل العزلات البكتيرية فقد استمر تفوق

العزلة المحلية والمستوردة من بكتريا *Bifidobacterium sp.* في خفض كمية الكولسترول على بقية العزلات فخفضته من ٨ ملغم / مل في الوقت صفر إلى ٢ ملغم /مل وبنسبة انخفاض ٧٣ و ٧٢٪ على التوالي وجاءت العزلة المحلية والمستوردة لبكتريا *Lact. acidophilus* . بالمرتبة الثانية ؛ إذ خفضت كمية الكولسترول من ٨ ملغم / مل في الوقت صفر إلى ٢ و ٣ ملغم /مل على التوالي وبنسبة اختزال بلغت ٧١ و ٦٢٪ على التوالي .

الجدول (٥) : الانخفاض الحاصل في الكولسترول خارج جسم الكائن الحي (*in vitro*) والنسبة المئوية للانخفاض الذي أحدثته العزلات البكتيرية المحلية والمستوردة في وسط MRS-EY.

العزلات المحلية والمستوردة	كمية الكولسترول في صفار البيض ملغم/مل	الوقت (ساعة)				
		صفر	٢٤		٤٨	
		كمية الكولسترول في وسط MRS-EY ملغم/مل	كمية الكولسترول في وسط MRS-EY ملغم/مل	٪ للانخفاض في الكولسترول	كمية الكولسترول في وسط MRS-EY ملغم/مل	٪ للانخفاض في الكولسترول
Strep. thermophilus	١٧	٨.٥	٦.٧٠	٢١.٨١	٤.٧٢	٤٤.٤٧
Bifidobacterium sp.	١٧	٨.٥	٣.٨٧	٥٤.٤٧	٢.٢٨	٧٣.١٨
Lact. bulgaricus	١٧	٨.٥	٧.١١	١٦.٣٥	٥.٤٥	٣٥.٨٨
Lact. acidophilus	١٧	٨.٥	٤.٥٥	٤٦.٤٧	٢.٤٢	٧١.٥٣
Lact. plantarum	١٧	٨.٥	٥.٩٥	٣٠.٠٠	٣.٥٨	٥٨.١١
م *Lact. casei*	١٧	٨.٥	٦.٢٧	٢٦.٢٠	٣.٧٥	٥٥.٥٠
م *Bifidobacterium sp.*	١٧	٨.٥	٣.٩١	٥٤.٠٠	٢.٢٧	٧٣.٢٩
م *Lact. acidophilus*	١٧	٨.٥	٥.٧٠	٣٢.٩٢	٣.٢٠	٦٢.٣٥

م = مستوردة.

وخفضت بكتريا *Lact. plantarum* و *Lact. casei* كمية الكولسترول من ٨ ملغم / مل في الوقت صفر إلى ٣ و ٣ ملغم / مل بعد مرور ٤٨ ساعة من التحضين وبنسبة انخفاض ٥٨ و ٥٥٪ في حين كان استهلاك الكولسترول من بكتريا *Strep. thermophilus* و *Lact. bulgaricus* الأقل إذ استهلكت الكولسترول من ٨ ملغم / مل إلى ٤ و ٥ ملغم / مل بعد مرور ٤٨ساعة من التحضين وبنسبة انخفاض ٤٤ و ٣٥٪ وهذا يتفق مع محمد وآخرون (٢٠٠٠) من أن مقدار الانخفاض في كل من بكتريا *Lact. bulgaricus* و *Strep. thermophilus* كان قليلاً مقارنة ببقية الأحياء المجهرية الأخرى ، وعزى هذا الانخفاض في الكولسترول إلى قابلية هذه الأحياء المجهرية في إنتاج بعض الإنزيمات التي تقوم بتحليل الدهن ويقوم بعضها بهدم الكولسترول للاستفادة منه كمصدر للكاربون ويتفق أيضاً مع ما وجده كل من Buck و Gilliland (١٩٩٤) و Lankaputhra و Shah (١٩٩٥) و Brashears وآخرون (١٩٩٨) والشيخ (١٩٩٩) من أن العديد من سلالات بكتريا *Lact. acidophilus* التي

مصدرها الإنسان لها القابلية على إزالة الكولسترول من الوسط الغذائي خلال النمو بوجود أملاح الصفراء ، وهذا طبقاً لقابلية البكتريا على نزع الارتباط لأملاح الصفراء والتي تساعد على ترسيب الكولسترول ، وكذلك اتفقت مع Abd-Elsalam وآخرون (٢٠٠٤) والذين قدروا النسبة المئوية للانخفاض في الكولسترول على أساس المادة الجافة فوجد أن بكتريا *Lact. Casei* و *Lact. bulgaricus* خفضت الكولسترول بنسبة قليلة مقارنة بكل من بكتريا *Lact. acidophilus* و *Lact. Johnsonii* .

USING DIFFERENT LOCAL ISOLATED LACTIC ACID BACTERIA TO RESIST BILE SALTS AND REDUCING ACHOLESTEROL

Ghanim M. H. H.S.Mohammed N.F.Mohammed
Food Sci. and Biotechnology Dept ., Collage of Agric . and Foresty , Mosul Univ., Iraq.

ABSTRACT

Bifidobacterium sp. and *Lact. acidophilus* bacteria were isolated from newly born infant's stool while *Lact. plantarum* bacteria were isolated from pickles . As for *Lact, bulgaricus* and *Strep. thermophilus* bacteria , they were isolated from local sheep yoghurt and identified by studying the morphological and biochemical tests . Then they were compared with Bergey's Manual (1986) informations .The resistance of the above-mentioned bacteria to bile salt at aconcentration of 1 and 2% and the effect of these salts on the growth of bacteria were all studied . At the concentration of 2% , there was a reduction in the number of bacteria with the increase in exposing time to bile salt . At the concentration of 1% , the imported *Bifidobacterium sp.* was the most resistant to bile salt . On the other hand , *Lact, bulgaricus* and *Strep. thermophilus* were the least one . All bacteria showed ability in reducing cholesterol outside invitro after a 24-hour incubation . The reduction increased with the increase incubation period up to 48 hours The highest cholesterol reducing bacteria were *Bifidobacterium sp.* However the least reduction was caused by *Lact. bulgaricus* and *Strep thermophilus.*

المصادر

الشيخ عامر عبد الرحمن ظاهر (١٩٩٩) . دراسة مقارنة الصفات الكيموحيوية لعزلة محلية وسلالة مستوردة من بكتريا L. acidophilus واستخدامها في تصنيع منتوجات علاجية. أطروحة دكتوراه - قسم الصناعات الغذائية - كلية الزراعة - جامعة بغداد.

محمد ، فيصل عمر و حامد صالح محمد و سمية خلف بدوي (٢٠٠٠) . تأثير بعض أنواع البكتريا المحللة على مستوى الكولسترول في الحليب . مجلة زراعة الرافدين ، مجلد ٣٢ (٣) : ٣٩ - ٤٢.

Abd-Elsalam, B. A., I; Nagwa, E, Sultan. O. Fayed and M. A. Zedan (2004). *In vitro* studies on probiotic criteria of Lactobacilli. Egyption J.of Dairy Sci. 32 : 17-29.

Berge's Manual of Systematic Bacteriology volume 2. Peter, H. A. Sneath. Nicholas, S. Mair, M. Elisabeth Sharpe. John G. Holt (1986).

Brashears, M. M; S. E. Gilliland, and L. M. Buck (1998). Bile salt de conjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei.* J. Dairy Sci. 81: 2103.

Buchanan, R. E. and N. E. Gibson's (1974). Bergey's Manual of determinative bacteriology. Eight editions. The William and Wilkin Baltimore.

Buck, L. M. and S. E. Gilliland (1994). Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilated cholesterol during growth. J. Dairy Sci. 77: 2925-2933.

Francey , R. J. and A. Elias (1968) Serum cholesterol measurement based on ethanol and ferric chloride , sulfuric acid , Cli-Chim , Acta. 21: 225-263 .

Harrigan, W. F. and M. E. Mc Cance (1976). Laboratory method in food and dairy microbiology Academic press. London. New York. San-Francisco.

Havenaar, R. and M. J. H Huis In't Veld, (1992) . Probiotic a general view In lactic Acid bacteria in Health and Disease. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers.

Kullen. M. J; and T. R. Klaenhammer (1999) Genetic modification of intestinal Lactobacilli and Bifidobacteria, In: Probiotics: A critical Review, G. W. Tannock (Ed.), Horizon Scientific Press, Wymondham (1999), pp. 65-83.

Lankaputhra. W. E. V. and N. P. Shah (1995). Survival of Lactobacillus *acidophilus* and Bifidobacterium spp in the presence of acid and bile salts: Cult. Dairy Prod. J. 30:2-7.

Shah, N. P. and P. Jelen (1990). Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. J. Food Sci. 55: 506-509.

Tanaka, H; K; Doesburg. T; Iwasaki. and I. Mieraul (1999).Screening of Lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. J. Dairy Sci. 82(12):2530-2535.