# دراسة تأثير راشح بكتريا *Lactobacillus gasserri* في نمو بعض الفطريات المرضية

**محمد فرج المرجاني , زينب حكمت عبود و محمد خماس عبد الكريم**
**قسم علوم الحياة, كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية**
**وزارة العلوم و التكنولوجيا,**
**المعهد الطبي الفني / المنصور**

## الخلاصة

أختبرت الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus gasseri* المركز تجاه خميرة *Candida albicans* وفطريات *Trichophyton mentagrophytes* و *T. rubrum* و *Aspergillus flavus* المعزولة من حالات مرضية عند الانسان بطريقتي الأنتشار في الحفر والخلط في الوسط الزراعي الصلب .

أظهرت النتائج ان للراشح المركز فعالية جيدة ضد خميرة *Candida albicans* , وذلك عندما بلغ قطر منطقة التثبيط لهذا الراشح 13 ملم , كذلك ادى الراشح المركز لبكتريا *Lb.gasseri* الى خفض معدل نمو الفطريات في الاطباق المعاملة بالراشح البكتيري من خلال مقارنة اقطار مستعمرات الفطريات في هذه الاطباق مع أقطارها في أطباق السيطرة , وبلغت نسبة التثبيط 57.6 % لفطر *T. mentagrophytes* و 41.2% للفطر *T. rubrum* و66.6% للفطر *A.flavus* .

من جانب اخر , تم تقدير فعالية راشح بكتريا *Lb.gasseri* تجاه أنبات كونيدات الفطر *T. mentagrophytes* بطريقة خلط الراشح مع الوسط الصلب , وقد أدى الراشح المركز لبكتريا Lb.gasseri الى خفض نسبة أنبات كونيدات الفطر T. mentagrophytesn الى 79.45% .

## المقدمة

تضم الفطريات المرضية مجموعة كبيرة تصيب الانسان والحيوان والنبات , وتعد الامراض الجلدية المتسببة عن الفطريات التي تصيب الجلد والشعر والأظافر في الانسان و الحيوان من أهم هذه الامراض وأكثرها شيوعا في أنحاء العالم (1).

شهدت السنوات الاخيرة توجها واسعا نحو استعمال الاحياء المجهرية لتعزيز صحة الانسان وحمايته من الامراض, اذ استعملت العديد منها التي تصنف ضمن مصطلح المعززات الحيوية (Probiotics) في مجالات واسعة وعلى المستوى السريري , وتأتي بكتريا حامض اللاكتيك (*Lactobacillus*) في مقدمة المعززات الحيوية المستعملة واكثرها شيوعا في المجالات الغذائية والصيدلانية, ويعود ذلك الى استعمالها الامن ومنذ زمن طويل في مجال الاغذية فضلا عن تواجدها كنبيت طبيعي في الطبقة الطلائية للامعاء وبعض اجزاء القناة الهضمية للانسان (2) و(3).

تنتج بكتريا *Lactobacillus* العديد من المواد المثبطة التي تبدي تأثيرا تثبيطيا تجاه العديد من الممرضات, ويعود الفعل التثبيطي الى تجمع او تراكم المواد الايضية الرئيسة, مثل:(حامض اللاكتيك, وحامض الخليك, والكحول الاثيلي و$CO_2$) فضلا عن انتاج المواد المثبطة الاخرى, مثل: بيروكسيد الهيدروجين, والداي استيل, والبكتريوسينات (4). يعد حامض اللاكتيك المنتج من هذه البكتريا ذا فعالية ضد العديد من الفطريات وقد أعتمد أحد العوامل ضد الميكروبية من منضمة الغذاء والدواء العالمية لقدرته على تثبيط العديد من الميكروبات(5) , فقد وجد [6] ان 0.75 % من الحامض اللاكتيك يختزل نمو فطر *Aspergillus* فضلا عن ذلك لاحظ (7) ان بكتريا *L. plantarum* تنتج مركبات ذا أوزان جزيئية واطئة, مثل مركب 3-phenyllactic acid لها فعالية تثبيطية ضد الخيوط الفطرية, وهذا لاحظه ايضا (8) , اذ استطاع عزل هذه المركبات من بكتريا *Lactobacillus sakei* ووجد ان لها فعالية عالية ضد الخمائر والفطريات , ووجد(9) ان ال Nisin المنتج من البكتريا *Lactobacillus casi* كان له تأثير مثبط ضد انواع الفطريات من جنس *Aspergillus* , *Penicillium* , ولوحظ ان تناول المرضى للاغذية المزودة ببكتريا *Lactobacillus acidophilus* يعمل على تثبيط نمو الفطريات وقد عزى سبب التثبيط هذا الى ان البكتريا تمنع التصاق الفطريات بجدار الامعاء.

كانت هناك العديد من الدراسات المحلية حول دور بكتريا حامض اللاكتيك في تثبيط نمو البكتريا والفطريات المرضية (10) ,لكن فيما يخص النوع *Lb.gasseri* فتعد الدراسات حوله نادرة ولاسيما فيما يتعلق بتأثيره التثبيطي تجاه الفطريات المرضية , لذا فقد جاءت هذه الدراسة بهدف معرفة التأثير التثبيطي لبكتريا *Lb.gasserei* المحلية تجاه عدد من الفطريات المسببة للامراض عند الانسان ودراسة تأثير رواشح هذه البكتريا في انبات كونيدات الفطر *T. mentagrophytes*

## المواد وطرائق العمل

**-عزلات الدراسة:**

***عزلة بكتريا *Lb.gasseri*** : تم الحصول على عزلة بكتريا *Lb.gasseri* من مختبرات قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية .

***عزلات الفطريات المرضية** :عزلت فطريات *Trichophyton mentagrophytes* و*T. rubrum* من حالات اصابات جلدية من مرضى مراجعين لمدينة الطب , وتم الحصول على عزلة للفطر *Aspergillus flavus* وخميرة *Candida albicans* من دم مرضى يعانون من امراض خبيثة , وقد شخصت عزلات الفطريات اعلاه اعتمادا على الصفات المجهرية و الزرعية والفحوصات الكيمو حيوية وكما ورد في (11) و (12) . نمت الفطريات في وسط اكار السابروويد الحاوي على مضادي الكلورمفنيكول والسايكلوهكسامايد, ثم حضنت بدرجة حرارة 25 م مدة (7-14) يوما (عدا خميرة *Candida albicans* التي حضنت بدرجة حرارة 30 م مدة 24 ساعة).

**- تحضير راشح بكتريا *Lb.gasseri* :**

حضر راشح المزرعة السائلة بتنمية عزلة *Lb.gasseri* في انابيب اختبار حاوية على وسط De-Man-Regosa sharpe (DMRS) السائل ذي اس هيدروجيني (6) وبنسبة لقاح 2% ($10^8$ خلية/مل), ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة (37) م مدة (24) ساعة وتحت ظروف لاهوائية (13) .بعدها عرضت الى الطرد المركزي (6000 دورة/دقيقة) مدة(10) دقائق للحصول على سائل الخلايا الحرة للمزروع , ثم رشح السائل هذا من

خلال مرشحات دقيقة (Millipore filter Papers) بقطر (0.22) مايكروميتر. بعدها تم تركيز الراشح لمرتين حسب طريقة [14] للحصول على فعالية تثبيطية افضل.

**- دراسة تأثير راشح بكتريا *Lb.gasseri* في نمو الفطريات :**

***تأثير الراشح في نمو خميرة *Candida albicans* بطريقة الانتشار في الحفر:**

أعتمدت الطريقة الموصوفة من (15) بنقل 0.1 مل من لقاح مزرعة خميرة *Candida albicans* بمعدل $10^6$ خلية/مل على وسط Peptone Agar Glucose Yeast Extract , واستعمل ثاقب الفلين بقطر 5 ملم لعمل ثقوب , ثم ملئت الحفر بمقدار 100 مايكروليتر من راشح المزرعة السائلة المركز لبكتريا *Lb.gasseri* ,حضنت الاطباق (تم عمل ثلاثة مكررات) بدرجة 30 م مدة 24 ساعة , قيست بعدها منطقة التثبيط حول الحفر بالمليميتر وقورنت مع معاملة السيطرة (وسط DMRS السائل من دون لقاح بكتيري ).

***تأثير الراشح في نمو الفطريات بطريقة الخلط مع الوسط الزراعي:**

أضيف راشح بكتريا *Lb.gasseri* المركز بنسبة 10% الى وسط أكار الدكستروز السابرويدي (Sabouraud dextrose agar) المعقم والمبرد , مزج جيدا ثم صب الوسط في أطباق معقمة ( تم عمل ثلاثة مكررات ) , بعدها لقح مركز كل طبق بقرص دائري (قطر 15مليميتر )الذي قطع من مزرعة الفطريات *Trichophyton mentagrophytes* و *T. rubrum* و *Aspergillus flavus* كلا على أنفراد , وأضيف وسط DMRS الخالي من البكتريا الى وسط اكار الدكستروز السابرويدي معاملة سيطرة . حضنت الاطباق وبضمنها معاملة السيطرة بدرجة حرارة 25م مدة 14 يوما وقيست أقطار المستعمرات الفطرية في مدد منتظمة (كل ثلاثة أيام ) خلال مدة الحضن (7-14 يوما) (16) . حسبت نسبة التثبيط حسب المعادلة الذكورة في (17) .

**-تقدير فعالية راشح بكتريا *Lb.gasseri* في أنبات كونيدات الفطر *T.mentagrophytes.***

***تحضير العالق الكونيدي** :حضر العالق الكونيدي(كونيديات صغيرة) بأضافة 10 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم الى طبق الفطر *T. mentagrophytes* النامي مدة 6 أيام, مسح سطح المستعمرة بوساطة مسحة (Swab) , رشح المزيج من خلال شاش معقم ونقل الراشح الى انبوبة معقمة , عدل العدد الى $10^5$ كونيديا /مل (18) .

*تقدير فعالية الراشح في أنبات الكونيدات :

خلط الراشح المركز لبكتريا *Lb.gasseri* بنسبة 10% مع وسط اكار الدكستروز السابرويدي المعقم والمبرد وصب في اطباق معقمة , نشر بعدها 0.1 مل من العالق البوغي للفطر *T. mentagrophytes* بأستخدام ناشر معقم , حضنت الاطباق (تم عمل ثلاثة مكررات ) في درجة حرارة 25 م مدة 5-7 أيام (19) . تم بعدها حساب عدد الابواغ النابتة بوساطة جهاز عد المستعمرات (Colony Counter) وقورنت مع معاملة السيطرة, ثم حسبت نسبة نسبة التثبيط .

## النتائج والمناقشة

اختبرت فعالية راشح المزرعة السائلة لبكتريا *Lb.gasseri* بعد تنميتها في وسط DMRS السائل في تثبيط الفطريات المستعملة في هذه الدراسة , ويعد وسط DMRS السائل ملائما لإنتاج المواد المثبطة من عزلات بكتريا حامض اللاكتيك لدوره في تجهيز الخلايا البكتيرية بالعديد من المواد الغذائية السهلة الاستهلاك . بينت النتائج ان للراشح المركز فعالية جيدة ضد خميرة *Candida albicans* , وذلك عندما بلغ قطر منطقة التثبيط لهذا الراشح 13 ملم , وهذا يتفق مع ما وجده (20) من فعالية لبكتريا حامض اللاكتيك ضد خميرة *Candida albicans* , وذكر (21) أن الحوامض العضوية المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك تساعد في جعل البيئة غير ملائمة لنمو الخميرة .

من جانب اخر , أختيرت فعالية الراشح المركز ضد فطريات *Trichophyton mentagrophytes* و *T.rubrum* و *Aspergillus flavus* بأستعمال طريقة خلط الراشح مع وسط اكار الدكستروز السابرويدي , وقدرت بعدها الفاعلية التضادية للراشح عن طريق قياس اقطار مستعمرات الفطريات المزروعة في مراكز الاطباق الحاوية على الراشح والوسط الصلب , ثم حسبت النسبة المئوية للتثبيط التي اظهرها الراشح ضد الفطريات تحت الدراسة .

بينت النتائج شكل (1) أنخفاض معدل نمو الاعفان في الاطباق المعاملة بالراشح البكتيري من خلال مقارنة اقطار مستعمرات الاعفان في هذه الاطباق مع أقطارها في

أطباق السيطرة , اذ كان الفرق واضحا بين هذه الاقطار عندما بلغت (36 و 47 و30 ) ملم بالنسبة الى الاعفان وعلى التوالي *Trichophyton mentagrophytes* و *T. rubrum* و *Aspergillus flavus* مقارنة بالاقطار في معاملة السيطرة (85 و80 و90 ) ملم وعلى التوالي للاعفان أعلاه .

تباينت الاراء حول طبيعة المواد المثبطة لنمو الفطريات التي تنتجها بكتريا *Lactobacillus* فقد يكون هناك فعلا تأزريا للمواد المثبطة المختلفة الموجودة في الراشح , مثل الاحماض العضوية : الخليك , والفورميك , والبيوتريك , والبروبيونيك او قد يعود الفعل التثبيطي الى الطبيعة البروتينية للراشح , فقد وجد (20) ان رواشح بكتريا حامض اللاكتيك تفقد فعاليتها المضادة لنمو الفطريات عند معاملتها بالانزيمات الهاضمه للبروتين , مثل Trypsin وPepsin مما يدل على ان المواد المثبطة التي تنتجها البكتريا هذة تكون ذا طبيعة بروتينية , وهذا أكده أيضا (22).

يمكن ان تؤدي بكتريا *Lactobacillus* الى تغيير الرقم الهيدروجيني للوسط مما يقود الى أنتاج وتحول البكتريوسين من الشكل غير الفعال الى الشكل الفعال , أوضح (23) الى ان انخفاض قيمة الرقم الهيدروجيني الناتج عن تأثير الاحماض العضوية التي تنتجها بكتريا *Lactobacillus* داخل الخلية يؤدي الى تعطيل العمليات الايضية , مثل عمليات الاكسدة على مستوى المادة الاساس , وعمليات نقل المواد من والى الخلية .

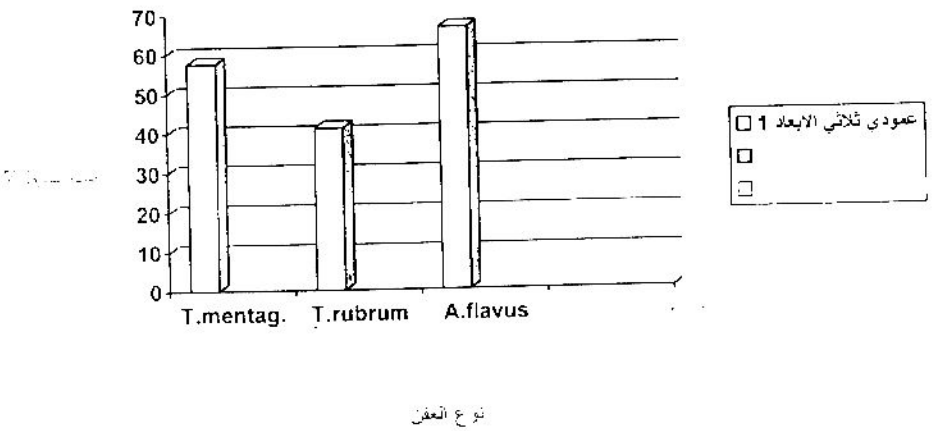
من جانب اخر , في دراستنا الحالية أدى الراشح المركز لبكتريا *Lb. gasseri* الى خفض نسبة أنبات الكونيدات الصغيرة للفطر *T. mentagrophytes* الى 79.45 % , قد تعود الفاعلية التثبيطية هذه الى تأثير المواد المثبطة التي تمنع نمو وأنبات الابواغ كما أشار لذلك (24) .

ظهر مما تقدم من نتائجها الحالية ان لراشح بكتريا *Lb.gasseri* فعالية تثبيطية واضحة تجاه بعض الفطريات الممرضة للإنسان مما يشجع لإجراء المزيد من الدراسات المستقبلية حول هذا الموضوع ومحاولة استخدام النواتج الأيضية لهذه البكتريا في التطبيقات العلاجية وأمكانية ايجاد عزلات كفؤة ضد الفطريات المرضية الاخرى .

## المصادر


1. السماك , مهدي(1983). التقنية المختبرية في الجراثيم المرضية. المؤسسة للتعليم والتدريب الصحي . بغداد العراق.
2. Holzapfel, W. H. and Schillinger , U. (2002). *Food Research Intern* , 35: 109-116.
3. Chukeatirote , E. (2003). *J. Sci . Technol* ,25 (2 ): 275- 282.
4. Delgado, A. ; Brito , D. ;Fevereiro , P.; Peres , C. and Marques, J.F. (2001). *INRA. EDP . Science . Lait* , 81 :203-215.
5. Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extacellular Polysaccharide produced by lactic acid bacteria, structure and properties, Ph.D.thesis.Department of food technology. Cranfield University .
6. Rees, J.T. (1997). The development of a novel antifungal silage inoculate. Ph.D. thesis. Cranfield University Biotechnology Center, UK.
7. Lavermicocca, P.; Valerio, F.; Evidente, A.; Silvia, L. and Gobbetti, M. (2000). *Microbiol* , 66 (9): 4084-4090.
8. Mathiesen, G.; Huehne, K.; Kroeckel , L.; Axelsson , L. and Vincent G. H. (2005). *J. Appl. Environ. Microbiol* , 71 (7): 3565-3574 .
9. Gourama , H. (1997). *j.Food. Protect* ,24 : 52-57.
10. علي , ولاء شوكت (2002). تأثير بكتريا حامض اللاكتيك في نمو وتكوين ابواغ بعض الفطريات الطبية . رسالة ماجستير , كلية العلوم , الجامعة المستنصرية .
11. Baron, E.J. and Finegold, S. M. (1998). *Baily and Scott,s Diagnostic Microbiology* , (10th ed.). Mosby, Company, U.S.A., 687-691.
12. Ellis, D.H (1994). *Clinical ,Mycology* : The Human Opportunistic Mycoses, Gillingham, Australia , 532-549.
13. Lewus , C.B. ; Kaiser , A. and Montville , T.J. (1991). *J.Appl Environ . Microbiol* , 57 : 1683-1688.
14. Sreekumar, O. and Hosono, A. (2000). *J.Dairy Sci* , 83,: 931-939.
15. Gupta, U.; Radramma, E.; Rati, E.R. and Joseph, R. (1998). *International J. of Food Science and Nutrition* , 49 (2): 101-108.
16. سرحان , عبد الرضا طه والشلبي , ماجد كاظم (2000) مجلة العلوم الزراعية العراقية, 5 (6) :30- 39.

17. Suskovic, J.; Brkic, B.; Matosic, S. and Maric, V. (1997). *Milchwissenscaft*, 52 (8 ): 430-435.
18. Chitarra, G.; Abee,T.; Rombout,F.; Posthumus, M. and Dijksterhuis, M. (2004). *J.Appl. Environ. Microbiol,* 70 (5): 2823-2829.
19. Chao, S. C. ;Young, D. G. and Oberg, C. J. (2000). *J.Food. Microbiol,* 34: 1-16.
20. Sookkhee, S.; Chulasiri, M. and Prachybrued, W. (2001). *J.Appl. Microbiol*, 90 (2): 172-179.
21. Moore, C. W. (1998). health nemesis or myth. *Natural Life magazine.WWW.Life.ca.*
22. Christine, C. (2004). New weapons against disease.*http// occawlon line.*
23. Smulder, F. ; Barendsen, P.; Logting, J. and Marell, J. (2004). *J.Food. Tech*, 21 : 419-436.
24. Gourama, H. and Bullerman, L. B. (1995). *J.Food. Protect*, 58: 1249-1256.




**شكل (1) نسبة تثبيط الفطريات تحت الدراسة بتأثير الراشح المركز لبكتريا *Lb.gasseri* .**

# Study of Effect of *Lactobacillus gasseri* Filtrate on Growth of Some Pathogenic Fungi

**M. F. Al-Marjani, Z. H. Abbod and M. K. Abdalkarim**
**Department of Biology ,College of Science , University AL- Mustansiriya.**
**Ministiry of Scintific and Tachnology.**
**Ass.Lecturer.**

## Abstract

The inhibitory effect concentrated filtrate of local *Lactobacillus gasseri against Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes* , *T. rubrum* and *Aspergillus flavus* which were isolated from infected cases in human beings, tested using two methods : well diffusion and Mixed with the mold medium (Sabouraud agar).

The results showed that the concentrated filtrate of *L. gasseri* have inhibitory effect against *Candida albicans,* the inhibition zone was 13 mm. As well as, the concentrated filtrate inhibited, considerably *Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum and Aspergillus flavus* growth when the filtrate was mixed with Sabouraud agar, the inhibition activity was (57.6 , 41.2 , 66.6 )% against *Trichophyton mentagrophytes* , *T.rubrum* and *Aspergillus flavus respectively.*

Results showed that concentrated filtrate of *L.gasseri* showed strong activity against *T. mentagrophytest* spores germination (the inhibition was 79.45%) by Mixing the filtrate with the mold medium (Sabouraud agar).