



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة القادسية  
كلية العلوم  
قسم علوم الحياة

دراسة لبعض الخصائص الحيوية لبكتريا *E coli*

المعزولة من المعززات الحيوية

بحث تقدمت به

الطالبة غدير عبد الكاظم خلخال

كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم  
الحياة

باشراف

م.م.ضحى مهدي

٢٠١٨

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

﴿ وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا ﴾ (٨٥) وَلَئِنْ شِئْنَا لَنَذْهَبَنَّ بِالَّذِي أَوْحَيْنَا إِلَيْكَ ثُمَّ لَا تَجِدُ لَكَ بِهِ عَلَيْنَا وَكِيلًا ﴿ (٨٦) ﴾

صدق الله العلي العظيم

(الاسراء)

قال رسول الله

(من سلك طريقا يلتمس فيه علما سهل الله له طريقا الى الجنة)

صدق رسول الله (ص)

# الشكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خاتم الانبياء والمرسلين  
وعلى اله وصحبه وسلم اجمعين وبعد:

فلا يسعني الا ان اتوجه بخالص شكري وعرفاني الى استاذ  
المشرف م.م **ضحى مهدي** لما استدته الي من مساعدة ومشورة  
اقالت عثرتي الى الصواب مما زل الصواب به قدمي مخزاها الله عني  
خير الجزاء

## الإهداء

اهدي بحشي هذا الى الذي قال الله فيهما

(وَخَفِضْ لَهُمَا جَنَاحَ الذُّلِّ مِنَ الرَّحْمَةِ وَقُلْ رَبِّ ارْحَمْهُمَا كَمَا رَبَّيَانِي صَغِيرًا)

يا من احمل اسمك بكل فخر  
يا من يرتعش قلبي لذكرك  
يا من اهديتك منذ الصغر  
يا من اودعتني لله اهديك هذا البحث  
إلى . . . الذي أتمنى أن تغيب عنه كل مظاهر العنف ويسوده الأمن والاستقرار بلدي الجريح **العراق**  
الماس الذي لا يكسر . . . نبع العطاء الذي نزرع الاخلاق في داخلي وعلمي طرق الامرتقاء . . .

" الى أبي " رحمه الله

الزهرة التي لا تذبل . . . نبع الحنان التي ساندتني ووقفت الى جانبي حتى وصلت الى هذه المرحلة من التقدم والنجاح الى  
من تعجز الكلمات عن وصفها وتسكن امواج البحر لسماع اسمها .

" الى أمي "

ملائكة الامرض . . . شقائق النعمان الذين احتضنوني ونررعو الورود في طريقي . . .

الى اشقائي

مرفاق الدرب . . . بناء المستقبل . . . الى امروع واصدق وانيل البشر الى

اصدقائي المخلصين

الذين مرفعو مريات العلم والتعليم واخمدو مريات الجهل والتجهيل . .

الى استاذتي الافاضل

أهدي هذا الجهد المتواضع الى كل من قال

لا إله الا الله ~ محمد رسول الله ~ علي ولي الله

دراسة لبعض الخصائص الحيوية لبكتيريا *E coli* المعزولة من  
المعزلات الحيوية

# الخلاصة

تم اجراء الدراسة الحالية لغرض الكشف عن وجود بكتيريا *E coli* الموجودة في عينات غذائية تحتوي على المعززات الحيوية ،والتي تمتاز بانها تعزز مناعة الجسم وتزيد من مقاومته للأمراض من خلال الحفاظ على النسب الطبيعية لبكتيريا القولون داخل القناة الهضمية ،ولهذا الغرض اخذت قيد الدراسة عينتين غذائيتين هما لبن اكتيفيا بواقع خمسة علب وسيريلاك بواقع ثلاث علب ، وبعد تحضير محلول متجانس من العينات انفة الذكر تم زرع الاخيرة على اوساط الاكار المغذي ،الماكونكي، خلاصة الخميرة ووسط لوريا السائل ، وقد اظهرت النتائج وجود نموا ملحوظا لعينات السيريلاك في جميع الاوساط الزرعية اما عينات اكتيفيا فقد اظهرت نموا على اكار مستخلص الخميرة فقط ،وفيما يتعلق ببكتيريا القولون المعزولة من الاغذية فلم تظهر اي فرق معنوي وملحوظ عن تلك المعزولة من عينات سريرية في ماعدا عدم نمو العينات السريرية على وسط لوريا السائل. ومن هنا يمكن القول ان لبكتيريا القولون الموجودة في الاغذية كموكن بروبيوتيك القابلية على التحول الى بكتيريا ممرضة ،على الرغم من ذلك فان اضافتها الى الاغذية كمعززا حيويا هو امر شائع جدا في هذه الايام

# المقدمة



تعرف البروبيوتيك او المعززات الحيوية بأنها الكائنات الحية الدقيقة التي يعتقد أنها توفر فوائد صحية عند استهلاكها. [1,2]، مصطلح بروبيوتيك يستخدم حاليا لتسمية الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة بفوائد للبشر والحيوانات. [3]. ويعزى إدخال هذا المفهوم (وليس المصطلح) إلى الحائز على جائزة نوبل إيلي ميتشنيكوف، الذي افترض أن الفلاحين البلغاريين المستهلكين للبن عاشوا حياة أطول بسبب هذا العرف. [4] واقترح في عام ١٩٠٧ أن "اعتماد الميكروبات المعوية على الطعام يجعل من الممكن اتخاذ تدابير لتعديل النباتات في أجسامنا واستبدال الميكروبات الضارة من الميكروبات المفيدة". [5] وقد أدى توسع كبير في السوق المحتملة للبروبيوتيك إلى متطلبات أعلى للدليل العلمي للفوائد المفترضة التي تمنحها الكائنات الحية الدقيقة. [2]، وتلعب الجراثيم المعوية البشرية دورا هاما في الحفاظ على صحة الإنسان عن طريق منافسة مسببات الأمراض، وتدهور النظم الغذائية وإنتاجها لبعض المركبات ، وتشكيل وحماية الطبقة المخاطية العادية والنظامية. وفي الآونة الأخيرة، ظهرت وظائف مهمة أخرى تقوم بها الميكروبيوتا كومنزلة تصبح بما في ذلك تأثير على التمثيل الغذائي للدهون المضيف والجمع مع السمنة وكذلك المشاركة في والتوازن الأمعاء، وإصلاح الأوعية الدموية. وتعد البكتيريا المعوية *Ecoli* واحدة من اهم المعززات الحيوية المعروفة. وقد اجريت بحوث عديدة في محاولة معرفة اهمية بكتيريا القولون في المحافظة على التوازن داخل الامعاء والية عملها وعلى الرغم من التاريخ طويل من استخدام البروبيوتيك، إلا انه في الآونة الأخيرة أصبحت آليات بعض البروبيوتيك واضحة [6] ومن بينها تحويل وظائف الخلايا المضيفة والتنافس مع بعض مسببات الأمراض، اضافة الى انتاج مواد ذات تاثير مبيد للجراثيم الممرضة. مثال على ذلك انتاج الكوليسينات والسيدوفورات *collicins and siderofores* التي تنتج من قبل *Ecoli* وتتنافس مع الانواع الممرضة المختلفة الموجودة في الامعاء. [7]

في هذه الدراسة الحالية تم التعرف على الصفات الزرعية لبكتيريا *E coli* المعزولة من اغذية حاوية على المعززات الحيوية ومقارنتها مع الصفات المزرعية لبكتيريا *E coli* المعزولة من عينات سريرية مختلفة

# نبذه تاريخية

يعود اكتشاف دور بكتريا E.coli كمعززات حيوية الى الحرب العالمية الاولى ١٩١٧ حيث تم عزل السلالة اساساً في جندي هرب من تفشي حاد للاسهال بين الجنود مما اثر على فوجه بعد ذلك تبين ان ذلك الجندي (Nissle) كان تملك مجموعة الخصائص المعوية ذات التأثير المقيد في مضاعفة الامراض . [8]

استخدمت هذه البكتريا فيما بعد كعلاج الاضطرابات الامعاء في بلدان اوروبا من ١٩٢٠ . ان هذا بعد اهم وافضل اكتشاف كعلامة E.coli وبالعودة الى بدايات اكتشاف المعززات الحيوية فإن تعود الى ٧٦٨٠ حيث بدايات استخدام الميكروسكوب من قبل Vanlee.wwenhoec حيث لاحظ الخلايا المخمرة للكحول ولكن ذهبت هذه الملاحظات سداً لأنه لم يعر لها اي اهمية لاحقاً في سنة Louasier,1700 اثبتا كيفية تحول السكر الى كحول وثنائي اوكسيد الكربون وقد وصف هذا العملية باسم التخمر fermentation الا انه لم يذكر اهمية الخمائر والاحياء الدقيقة في تلك العملية . [9]

أن الاكتشاف الحقيقي لدور المعززات الحيوية حصل على يد العالم (الكيميائي الفرنسي Louis poster) والذي اثبت دور الاحياء المجهرية في عملية التخمر وقد عرف التخمر على انه ( التنفس في غياب الهواء) . [10]

وتوالى الاكتشافات في هذا المجال على يد مجموعة في العلماء في مختلف الارمان . الى يومنا الحالي حيث تستخدم مصطلح Probiotic على انها ميكروبات حيه يمكن اضافتها للغذاء من شأنها تعزيز الميكروبات النافعة الموجودة في الامعاء وهو ما اقترح من قبل Roy fuller سنة ١٩٨٩ اما التعريف الحالي والمقترح FAO/WHO في سنة ٢٠٠١ والذي سينص على انها احياء مجهرية عند استخدامها بكميات كافية يمكن الحصول على منافع صحية لتضيف لاحقاً في عام ٢٠٠٢ FAO/WHO اقترحت الخطوات المتعلقة باستخدام المعززات الحيوية في منتجات غذائية مختلفة او اعطى التعريف التالي (المعززات الحيوية هي عوامل غذائية غير مهضومة من شأنها ان تعزز نمو تكاثر الاحياء المجهرية الموجودة في الامعاء . [11])

# الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

\*المواد

١-اطباق بتري

٢-انابيب تخفيف

٣-كمادات

٤-قفازات

٥-قطن

٦-سلايد

٧-كفر سلايد

\*الاجهزة

Auto clove-1

2- مصباح بنزن ،

3 -لوب Loap

4-،shaker،

5- الحاضنة Incubater

6-كابينه العزل Hood

7- ميزان حساس sensitive balance

اولا- الاوساط الزرعية

١- Blood agar C: يتم تحضير وسط Blood agar بإذابة (39.g) من agar في ١ لتر من الماء المقطر وبعد وضعة في جهاز المؤجدة لمدة ساعة ثم نترك الوسط ليبرد قليلاً ثم نضيف الية ٢٠مل من الدم

٢- Mackongy تم اذابه ٢٣غم من الوسط في ١ لتر من الماء

لتحضير لتر واحد من الوسط يتم اضافة المواد التالية :

1- (luria-Bertani LB)

Reagoun	Amount
H2O	950 ML
Tryptone	10gm
NaCl	10gm
Yeast	5gm

واذيبت في لتر ماء مقطر ويتم تعقيمها باستخدام جهاز المؤصدة

٣- Yeast extract agar: تم اذابة ٣٠ غم في لتر من الماء المقطر المعقم

يتم وضع الاوساط الزرعية اعلاه جهاز Shake ليتم مزجها جيداً بعد ذلك توضع الاوساط الزرعية المحظرة في جهاز المؤصدة (Auto clave) لمدة ساعة ليتم تعقيمها

٤- العينات :يتم استحصال ٢٠ عينة سيريلاك ، اكتيفيا بواقع ١٠ لكل عينة .

تحضير محلول متجانس من عينات الدراسه

أ. عينات السيرلايك / تم اذابة ١ غم من عينة سيريلاك في ٩مل Normal Saline

وتم مزج المحلول باستخدام جهاز Shaker

ب. عينات اكتيفيا/ تم مزج ١مل من عينة اكتيفيا مع ٩مل Normal Saline

تحضيراً لزرع

ثانياً-صبغه كرام Gram Stain

تتكون هذه الصبغه من

Crystal Violat

Iodin

alcohol

safranin

-نأخذ عينه من المستعمرات البكتيرية بواسطة loop ونفرشها على سلايد بواسطة الماء ثم نثبتها بواسطة اللهب وبعد ذلك نضيف البنفسج البلوري ومن ثم اليود. ثم القصر بالكحول ثم نضيف صبغه السفرانين للبكتريا السالبة لصبغه كرام

## \* طريقة العمل

- 1-نأخذ الوسط الزراعي المحضر بعد تعقيمه ثم نتركه ليبرد قليلاً
  - 2-نصب الوسط الزراعي في طباق بترى وننتظره ليتصلب الوسط ثم نقوم بوضع عينة السيريلاك بأخذ عدة تخافيف مختلفة او عينة الاكتيفيا وتزرع على الوسط وتدعمها هذه الطريقة بالنشر
- او بطريقة اخرى حيث يتم وضع العينات (سيريلاك المخففة ، الاكتيفيا ) في الاطباق تم نصب الوسط الزراعي في الاطباق على العينات وبعدها نترك الاطباق لتتصلب وتدعى هذا بطريقة بصب الاطباق .
- ويتم زرع العينات داخل جهاز Hood لتجنب حصول تلوث للعينات والاطباق
- 3-تغلف الاطباق بالنايلون الحراري تم تعلم الاطباق لتمييز عينات السيريلاك والاكثيفيا وطريقة الزرع المستخدمة .
  - 4-توضع العينات في الحاضنة بشكل مقلوب لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حراري 37C°

النتائج المناقشة



اجريت الدراسة الحالية على مجموعة اغذية مثار على انهي غنية بالمعززات الحيوية مثل البن اكتيفيا والسيريلاك . وكان الهدف من لدراسة هو معرفة خصائص بكتريا E.coli النامية في العينات قيد الدراسة لمعرفة دورها في تعزيز صحة ومناعة الجسم

وقد زرعت العينات على وسط Macckony agar. Nutrient agar Luriabroth وكانت النتائج كالتالي:

جدول رقم ١ نتائج نمو البكتيريا المعزولة من عينات المعززات الحيوية

يتضح من الجدول اعلاه ان عينات السيريلاك اظهرت نمو في جميع الاوساط الزرعية

الوسط الزراعي	عينات لبن اكتيفيا	عينات سيريلاك
Nutrient agar	No growth	growth
MaCconkey agar	No growth	growth
Luria broth	No growth	growth
Yeast extract agar	Growth	growth

المستخدمة . اما عينات اكتيفيا فلم تظهر اي نمو لاي بكتريا الا انها اظهرت نتيجة موجبة لنمو الفطريات. وقد اشارت دراسات عديدة الى دور الخمائر في حفظ صحة الانسان (شكلة)

وعلى الرغم من ذلك فأن المعززات من الخمائر لا تمكنها ان تدعم العدد الطبيعي لبكتريا القولون في الامعاء والتي سبق وتم الإشارة الى دورها في التوازن داخل القناة الهضمية

وايضاً من خلال بعض الفحوصات الكيميائية مثل اختبار Catalase [12].

وفي الدراسة الحالية ايضاً جرى معرفة الفرق بين *E.coli* المعزولة من عينات الاغذية باعتبارها معزراً حيوياً وتلك المعزولة من عينات سريرية اخذت مباشرة من المستشفى

ولم يتم اكتشاف اي فرق ظاهري من المستعمرات او عملية تخمر سكر اللاكتوز او النمو في وسط ماكونكي باعتبار الاخير وسطاً اختيارياً لنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام لأنه يحتوي على املاح الصفراء والبنفسج البلوري التي تمنع نمو البكتريا الموجبة لصبغة . [13]

علاوة على ذلك فان اكار الماكونكي يعتبر وسطاً تفريقياً يمكن من خلاله التمييز بين الانواع المخمرة لسكر اللاكتوز والتي تظهر بلون وردي عن تلك التي لا تنمو اللاكتوز والتي تظهر بلون شاحب ان استخدام وسط Nutrient كان لتشجيع نمو اي بكتريا ممكن ان تكون موجودة في العينة قيد الدراسة . اما استخدام وسط MaCconky فكان الهدف منه التحري عن انواع السالبة لصبغة كرام فقط دون الانواع الموجبة. [14]

للعينات النامية اما فيما يخص النمو على وسط Luria broth فقط جرت محاولة لتنمية البكتريا المعزولة في العينات السريرية على وسط Luria broth وكانت النتيجة عدم ظهور نمو واضح مشابه لنمو العينات الغذائية . [16]

ان وسط Luria broth هو وسط زرعى لمادة ما تستخدم في تنمية البكتريا لغرض الدراسات الجزئية والدراسة لان يتألف من مكونات بسيطة وبالإمكان تحضيره بسهولة . وبالنسبة لبكتريا ال- *E.coli* فلو حظ انه يستخدم في تنمية الانواع التي تفقد القابلية على انتاج فيتامين B من جراء طفرة او ما شابه ذلك [17].

مما سبق يمكن القول بان المعززات الحيوية اغذية مهمة ولها دور مهم في تعزيز مناعة الجسم ولا يوجد فرق معنوي زرعى ملحوظ بين بكتيريا *E coli* المعزولة من عينات غذائية غنية بالمعززات الحيوية وتلك المعزولة من عينات سريرية.

وتشير بعض المصادر الى خطورة اضافة *E coli* في الاغذية كمكون بروبيوتيك بعد اجراء العديد من التجارب السريرية والتحقيقات للكشف عن آليات أعمالها الحيوية التي مهدت الطريق إلى القبول بهذه البكتيريا . وأصبحت الدراسات والابحاث التي تتحرى عن خصائصها باستخدام نماذج في المختبر وفي الجسم الحي (الفأر) ، في حين كشفت متواليات الجينوم الكاملة عن وجود جينات معروفة باسم جينات الفوعة . كلما توفرت المعلومات ، أصبح الأمر أكثر وضوحاً حتى أنه حتى البكتيريا الحميدة يمكن أن تشترك في الكثير من الخصائص مع مسببات الأمراض ، لدرجة أنه حتى جينات الفوعة الحقيقية يمكن أن تكون موجودة . ومع ذلك

، فإن حقيقة أن *E. coli* أصبحت واحدة من السلالات البكتيرية القياسية التي تستخدم الآن كوسيلة تحكم غير مسببة للأمراض في مجموعة متنوعة من المنشورات توضح أن هذه السلالة تعتبر أخيراً آمنة. [18].

## المصادر

## References

[1] M. Wilson, “Microbial inhabitants of humans. Their ecology and role in health and disease”, *In: Cambridge University Press. Cambridge. United*

[2] A. Pepoyan and A. Trchounian, “Biophysics, molecular and cellular biology of probiotic activity by bacteria”, *In: Bacterial Membranes. Ultrastructure, Bioelectrochemistry, Biophysics and Bioenergetics*. Ed. A. Trchounian. Kerala (India): Research Signpost, 2009.

[3] E. Cario, *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, vol. 24, pp. 725-732.

[4] S.Doron, S.L. Gorbach, *Expert Rev. Anti-infective*, 2006, vol. 4, no. 2, pp. 261-275.

[5] M. Schultz, A.L. Lindström, *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol*, 2008, vol. 2, pp. 337-355.

[6] Marteau P., Seksik P., Jian R, *Br. J. Nutr*, 2002, vol. 88. (suppl 1): pp. 51–57.

[7] H.S. Gill, G. F. *Postgrad, Med. J*, 2004, vol. 80, pp. 516-526.

[8] I Wollowski, G Rechkemmer, BL Pool-Zobel, *Am. J. Clin. Nutr*, 2001, vol. 73, pp. 451–455.

[9] Y. Aso, H. Akazan, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai, S. Naito, *Eur. Urology*, 1995, vol. 27, pp. 104-109.

[10] D. Haller, S. Blum, C. Bode, W.P. Hammes, E.J. Schiffrin, *Infection and Immunity*, 2000, vol. 68, pp. 752–759.

[11] B. Corthesy, H.R. Gaskins, A. Mercenier, *J. Nutr.* 2007, vol. 137, pp. 781–790.

[12] K. Madsen, A. Cornish, P. Soper, C. McKaigney, H. Jijon, C. Yachimec, J. Doyle, L. Jewell, C. De Simone, *Gastroenterology*, 2001, vol. 121, pp. 580–591.

[13] G.W. Elmer, *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2001, vol. 58, pp. 1101–1109.

[14] D. Damaskos, G. Kolios, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2008, vol. 65, no. 4, pp. 453-67.

[15] M.L. Marco, S. Pavan, M. Kleerebezem, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006, vol. 17, no. 2, pp. 204–210.

[16] S.I. Patzer, M.R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno, K. Hantke, *Microbiology*, 2003, vol. 149, pp. 2557-2570.

[17] M. Valdebenito, A.L. Crumbliss, G. Winkelmann, K. Hantke, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006, vol. 296, pp. 513-520.

[18] Claudia Beimfohr A Review of Research Conducted with Probiotic E. coli Marketed as Symbioflor *Int J Bacteriol.* 2016; 2016: 3535621. Published online 2016 Nov 22. doi: 10.1155/2016/3535621.