مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (5) 2016
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus bulgaricus* ضد بعض أنواع الفطريات المرضية والمنتجة للسموم المعزولة من التربة

لؤي برهان مصطفى[1] ، كركز محمد ثلج[2]

[1]قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة تكريت . تكريت ، العراق

[2]قسم علوم الاغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

أجريت الدراسة بهدف عزل وتشخيص نوع البكتريا *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* واختبار قابلية المعلق البكتيري عند مستويات مختلفة من درجة الحرارة أو الأس الهيدروجيني أو النواتج الأيضية منها في القابلية التثبيطية لبعض أنواع الفطريات المرضية أو المنتجة للسموم. أشارت النتائج إلى امكانية عزل *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* من منتجات الالبان وكذلك أربعة أنواع من الفطريات من التربة هي *Mycrosporium canis* ، *Trichophyton mentagrophytes* ، *Aspergillus fumigatus* و *Rhizopus stolinfer*. بينت القابلية التثبيطية لبكتريا *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* ضد أنواع الفطريات قيد الدراسة إن أقطار مناطق التثبيط كانت الأكفأ معنويا عند مستوى اس هيدروجيني 6.5 ضد انواع الفطريات اعلاه حيث كانت 22 ، 24 ، 26 و 24 ملم على التوالي مقارنة مع مستويات الاس الهيدروجيني الاخرى، اما أفضل درجة حرارة لحصول أكفأ قدرة تثبيطية فقد كان عند 30°م وكانت أقطار مناطق التثبيط 22 ، 24 ، 26 و 24 ملم على التوالي ضد أنواع الفطريات المذكورة. وضحت النتائج أيضا تأثير النواتج الأيضية من *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* عند التراكيز 10 ، 20 و 40 ملغم / مل من الوسط الزرعي في القابلية التثبيطية لأنواع الفطريات المدروسة قد ازدادت معنويا مع زيادة التراكيز المستخدمة إذ كان التركيز 40 ملغم / مل هو الاكفأ وكانت عنده أقطار منطقة التثبيط 32 ، 30 ، 28 و 18 ملم على التوالي ضد أنواع الفطريات المدروسة.

المقدمة

تعد بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria (LAB) بانها أبرز الأحياء المجهرية التي تتميز في أنها الأكثر استخداماً في التطبيقات العلاجية [1]. ازدادت أهمية بكتريا حامض اللاكتيك في السنوات الأخيرة وذلك لثبوت مقدرتها في إنتاج المواد المضادة للأحياء المجهرية سواء المرضية منها أو التي تسبب تلوث المواد الغذائية لاسيما من انواع البكتريا والفطريات المرضية والمنتجة للسموم [2].

يتصف نوع بكتريا حامض اللاكتيك اعلاه بأنه من الأنواع العصوية ، الموجبة لصبغة كرام ، غير مكونة للسبورات، غير متحركة، غير منتجة لإنزيم الكاتاليز، ولاتنتج الاندول، غير مختزلة للنترات، تحتاج إلى كميات قليلة من الهواء ، متحملة للحموضة ، متجانسة التخمر [3].

يمتلك نوع بكتريا *Lactobacillus bulgaricus* العديد من الآليات التي تظهر تأثيراتها المفيدة من خلال قابليتها في إنتاج عدد من المركبات ذات الفعالية التضادية للفطريات مثل حامض اللاكتيك والاستيك فضلا عن أنتاج مواد أخرى مثل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) ، حامض الفورميك أسيد (Formic acid) ، حامض البروبيونك (Propionic acid) ، الأسيتون (Aceton) والداي استيايل (Diacytyl)، وان مستويات الإنتاج من هذه المواد يعتمد كثيرا على نوعية السلالة والعوامل البيئية النامية فيها وطبيعة الوسط [4, 5 , 6].

إن للنوع *L. bulgaricus* فعالية تثبيطية شديدة ضد إنتاج السموم الفطرية من أنواع الفطر *Aspergillus* والتي تعزى إلى مقدرتها في إنتاج البكتريوسينات [7 , 8 , 9]. إضافة إلى قابليتها على الالتصاق مع العديد من أنواع السموم الفطرية محدثة التثبيط من خلال حدوث تغيرات أيضية حيوية ومظهرية مؤدية في النهاية إلى تثبيط فعالية السموم من خلال تكوين معقدات معها [10, 11]. كما يتميز في قابليتها في إنتاج مركب الاستلديهايد Acetaldehyde في بعض منتجات الألبان لاسيما اللبن الرائب Yoghurt والذي اضافة الى دوره في اعطاء النكهة والرائحة المميزة، فان انتاج هذا المركب ياتي من امتلاكها لإنزيم Threonine aldolase الذي يعمل على شطر الحامض الاميني Threonine إلى Glycine و Acetaldehyde إذ يتجمع المركب الأخير في المنتج الغذائي لعدم قدرة البكتريا على استهلاكه، وان وصول تركيزه إلى أكثر من 15 جزء بالمليون يجعله مثبطاً لنمو أنواع عديدة من البكتريا منها *Staph. aureus* و *E. coli* و *Salmonella typhimurium* [8 , 12].

لذلك فان هدف الدراسة هو عزل وتشخيص نوع بكتريا حامض اللاكتيك *L. bulgaricus* و الفطريات المرضية والمنتجة للسموم ودراسة قابلية الأنواع البكتيرية ومتايضاتها ، فضلاً عن دراسة تأثير مستوى الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة المثلى المؤثرة في قابليتها التثبيطية ضد أنواع الفطريات المعزولة.

مواد وطرائق العمل

جمعت عشرة نماذج من الألبان المتخمرة من مناطق بغداد ، كركوك ، تكريت ، العلم ، الدور التي وضعت في دوارق معقمة حجم 250 مل وحفظت في الثلاجة لحين إستخدامها في عزل بكتريا *L. delubricii*

bulgaricus subsp. الذي تم من خلال التنمية عند درجة 35°م على وسط De Man Regosa Sharpe - $CaCO_3$ (MRS).

بعدها تم إجراء الفحوصات المظهرية التي شملت التصبيغ بصبغة كرام والحركة وكذلك اختبار امتلاك السبورات من قبل كل من العزلات البكتيرية. وكذلك الفحوصات المزرعية التي شملت التنمية عند درجات حرارية مختلفة ومستوى من 4% و 6,5% من كلوريد الصوديوم والفحوصات الكيموحيوية التي شملت اختبار الكاتاليز، اختبار تخمر الكاربوهيدرات، اختبار إنتاج الامونيا من الارجنين، واختبار قابلية انتاج غاز CO2 .

حُفظت العزلات لفترة طويلة بعد تنميتها في وسط MRS الصلب الذي أضيف إليه 20% من الكليسرول عند – 20°م وكمزرعة عمل بعد التنمية على نفس الوسط عند 4°م وأعيد التنشيط لها كل أربعة أسابيع [13].

اما الفطريات فقد شخصت من خلال صفاتها المزرعية بعد تنميتها على الاوساط الزرعية الغذائية Malt Extract Dextrose Agar و Potato Dextrose Agar و Saboroued Dextrose Agar و Rose Bengal Agar وكذلك من خلال الشكل الخارجي للمستعمرات باستخدام طريقة الفحص المجهري المباشر بعد أن تم عمل شرائح زجاجية من كل منها والتي وضع فيها أجزاء الفطر من المايسيليوم أو الكونيديا واستخدمت المفاتيح التصنيفية المذكورة في [14].

أنتاج المواد الايضية من بكتريا حامض اللاكتيك :

تم تنمية نوع البكتريا *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* في دورق مخروطي حجم 250 مل باستخدام الوسط الزرعي لنقيع الدماغ والقلب السائل (Brain heart infusion broth) بعد التحضين عند 30°م لمدة 24 ساعة ، ركزت المواد الأيضية للبكتريا باستخدام جهاز الطرد المركزي نوع Kubota (ياباني المنشأ) عند سرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة. قدرت نسبة الرطوبة في النماذج كما جاء في [15] وحفظت النماذج عند – 20°م لحين الاستعمال.

تقدير نسبة الرطوبة:

تم تقدير نسبة الرطوبة في النماذج كما جاء في [16] باستخدام الفرن الحراري على درجة 110 م وبعد ثبات الوزن للمواد الايضية تم احتساب نسبة الرطوبة من الفرق بين القراءتين مضروباً في 100 وحفظت النماذج عند – 20°م لحين الاستعمال في الاختبارات اللاحقة.

تحضير معلق الفطريات: بعد أن تم تنمية أنواع الفطريات على الأوساط المناسبة لنمو كل منها لفترة 7 أيام تم الحصول منها على المعلق الفطري الكامل باستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي وأضيف إلى المعلق قطرات من مادة Tween 20 ، وكان التحضير آنيا عند الاستعمال .

قياس الفعالية التثبيطية لأنواع بكتريا حامض اللاكتيك ضد الفطريات: استعملت أربعة أنواع من الفطريات اثنتان منها منتجة للسموم والأخرى مرضية لبيان مدى فعالية بكتريا *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* التثبيطية ضدها وكما جاء في الطريقة الموصوفة في [17] التي استعملت فيها الحفر Wells وبقطر 6 ملم وكما يلي :

استخدام خلايا البكتريا الحية: استخدمت الخلايا الحية من النوع *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* بعد أن تم عمل الحفر في الأطباق بقطر 6 ملم وأضيف فيها 50 مايكروليتر من معلق خلايا النوع البكتيري اعلاه وبأعداد 1.5×10^8 خلية / مللتر ، نشرت أنواع الفطريات على سطح وسط Mueller Hinton Agar في أطباق بتري معقمة وتركت الأطباق عند درجة حرارة المختبر لمدة ساعة للتخلص من الرطوبة الزائدة على سطح الوسط وتم التحضين عند 30 °م لمدة 5 أيام.

استخدام المنتجات الايضية للبكتريا: استخدمت النواتج الايضية من بكتريا *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* بطريقة مشابهة لطريقة استخدام الخلايا الحية ماعدا استبدال المعلق البكتيري بتراكيز من النواتج الايضية لنفس النوع البكتري وبتراكيز 10 ، 20 و 40 ملغم / مل، تم تقدير القابلية التثبيطية للخلايا البكتيرية والنواتج الايضية ضد الفطريات من خلال قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر حول كل حفرة وكانت التنمية بمعدل طبقين من كل فطر.

التحليل الإحصائي: تم تنفيذ التجربة بموجب التصميم العشوائي الكامل (Complete Randomized Design) ، واجري تحليل التباين باستخدام النموذج الخطي العام (General Linear Model) ، ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز SAS ، (2001) [18]. وفي حالة وجود فروقات معنوية استخدم اختبار دنكن Duncan ، (1955) [19] لتحديد معنوية الفروقات مابين المتوسطات المختلفة عند مستوى احتمالية 0.05 .

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص بكتريا *L. delubricii* subsp. *bulgaricus*: بعد أن تم جمع نماذج الألبان المختلفة من الأسواق المحلية وإجراء تحضيرات العزل من العينات تم الحصول على عزلات نامية متشابهة في الصفات المظهرية على أطباق وسط MRS الذي يعد الوسط الملائم لعزل انواع بكتريا حامض اللاكتيك *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* الجدول (1).

بينت نتائج الفحص المظهري للعزلات النقية بأن النوع البكتيري كان إيجابيا للتفاعل مع صبغة كرام وان أشكالها كانت عصوية متطاولة. أما صفاتها المزرعية التي كانت في تنمية العزلات عند 25، 37 ، 45 و 60 °م ومستوى 4 و 6.5% من NaCl في الوسط فقد أكدت أنها ضمن جنس *Lactobacillus*. عندما استعملت الاختبارات البايوكيميائية تم فرز العزلات إلى مرحلة النوع لها والتي تبين بأنها *L. delubricii* subsp. *bulgaricus* بعد المقارنة مع ماجاء في جدول الفحوصات التفريقية لأنواع البكتريا [20].

تبين من النتائج المتعلقة بعزل وتشخيص *Lb. delubricii* subsp. *bulgaricus* بالإضافة لما ذكر في نتائج الفحص المظهري فقد

تميزت عزلات أنواع الجنس *Lactobacillus* بانها كانت منفردة فضلا عن إنها غير مكونة للأبواغ وقد اتفق ذلك مع ما أكده [21]. أما الصفات المزرعية للعزلات فقد اظهرت قدرتها في النمو على وسط MRS – agar الذي يعد الأمثل لنمو تلك الأنواع وكما ذكر [23 , 22] وكذلك من خلال تنميتها على أوساط تحتوي تراكيز ملحية مختلفة والتنمية عند درجات حرارية مختلفة وبيان قابليتها في إنتاج غاز CO_2 أو الارجنين بعد تنميتها على الأوساط التي تحتويها، وقد تم إكمال التعرف على النوع البكتيري من خلال الاختبارات الكيموحيوية التي اجريت على مستعمراتها والتي تطابقت مع ماأكدته الصفات المظهرية والمزرعية وجاءت النتائج متفقة مع ما وجده [24 , 25] حول قابلية الأنواع التي تم الحصول عليها في تخمر السكريات والاختبارات الأخرى.

الجدول(1): الصفات الظاهرية والمزرعية والكيموحيوية لعزلات النوع *Lactobacillus bulgaricus*

Characterization, biochemical and cultural strain		*Lactobacillus delubricii* subsp. *Bulgaricus*
التفاعل مع صبغة كرام		+
أشكال الخلايا		قضبان، مستقيمة عادة، طويلة
درجة حرارة النمو	15	_
	37	+
	45	_
	60	_
النمو في الوسط بوجود NaCl %	4	+
	6.5	+
انتاج الكاتليز	_	_
انتاج CO_2 من الكلوكوز	_	_
انتاج الامونيا من الارجنين	_	_
تخمر السكريات	ارابينوز	_
	رايبوز	_
	زايلوز	_
	كالاكتوز	_
	فركتوز	+
	مانتول	_
	سوربيتول	_
	سيلوبيوز	_
	مالتوز	_
	لاكتوز	+
	ميليبيوز	_
	سكروز	+
	تريهالوز	_

عزل وتشخيص أنواع الفطريات: تبين من العزلات الفطرية بانها كل من *Mycrosporium canis*، *Trichophyton mentagrophytes*، *Aspergillus fumigatus* و *Rhizopus stolinfer* وذلك من خلال الصفات الظاهرية التي تبينت منها عند تنميتها على الأوساط الزرعية الخاصة بها وهي Malt Extract Agar، Potato Dextrose Agar، Sabouraud`S Dextrose Agar و Rose Bengal Agar بعد إتباع الخطوات المثبتة في المفتاح التصنيفي في [14] وكذلك بعد المقارنة مع نماذجها في [26].

تأثير التغير في مستوى الاس الهيدروجيني ودرجة الحرارة في التداخل بين بكتريا *Lb. delubricii* subsp. *bulgaricus* والفطريات: إن تأثير التغير في مستوى الاس الهيدروجيني عند 5,5 ، 6,5 و 7,5 في مستوى التداخل بين نوع البكتريا *Lb. bulgaricus* subsp. *delubricii* والأنواع المرضية أو المنتجة للسموم من الفطريات قد تم توضيحها في الجدول (2). بينت النتائج إن النوع البكتيري اعلاه قد كان في افضل حالة من التثبيط عند مستوى من pH 6,5 ضد أنواع الفطريات *M. canis*، *T. mentagrophytes*، *A. fumigtus* و *R. stolonifer* حيث كانت أقطار مناطق التثبيط عند 22 ، 24 ، 26 و 24 ملم على التوالي. وقد انخفض مستوى التثبيط عند المستوى من الـpH 5,5 او 7,5. اما تأثير التغير في درجة حرارة التنمية عند 25 ، 30 و 35°م في مستوى التداخل بين أنواع بكتريا حامض اللاكتيك وبعض أنواع الفطريات المرضية أو المنتجة للسموم. فقد تبين إن التنمية عند درجة 30°م لنوع البكتريا

أو المنتجة للسموم من الأنـواع *M. canis* ، *mentagrophytes* في قدرته التثبيطية ضد أنواع الفطريات سواء المرضية (P < 0.05) قد كـان الأكفأ معنويـا عند *Lb. delubricii* subsp. *bulgaricus* و *A. fumigtus* ، *T.* و *R. stolonifer* حيث تراوحت أقطار مناطق التثبيط لها عند 22 ، 24 ، 26 و 24 ملم على التوالي وقد تلتها في حالة التنمية عند درجات الحرارة الاخرى .

الجدول (2) التأثير التثبيطي لبكتريا *Lb. delubricii* subsp. *bulgaricus* ضد بعض أنواع الفطريات بعد تنميتها عند درجات حرارية ومستويات من الـpH مختلفة

Rhizopus stolinfer	*Aspergillus fumigates*	*Trichophyton -mentagrophytes*	*-Mycrosporium canis*	*Rhizopus stolinfer*	*Aspergillus fumigates*	*Trichophyton -mentagrophytes*	*-Mycrosporium canis*	*Rhizopus stolinfer*	*Aspergillus fumigates*	*Trichophyton -mentagrophytes*	*-Mycrosporiumcanis*
قطر منطقة التثبيط (ملم)											
مستوى 7.5 pH				**مستوى 6.5 pH**				**مستوى 5.5 pH**			
14 ±0.8 g	20 ±0.6 d	16 ±0.4 f	18 ±0.2 e	24 ±3.1 b	26 ±1.4 a	24 ±0.6 b	22 ±1.0 c	16 ±2.1 f	20 ±0.4 d	22 ±1.0 c	18 ±0.2 e
درجة حرارة 35 م°				**درجة حرارة 30 م°**				**درجة حرارة 25 م°**			
24 ±1.0 b	24 ±0.9 b	22 ±0.6 c	24 ±1.4 b	24 ±3.1 b	26 ±1.4 a	24 ±0.6 b	22 ±1.0 c	8 ±0.1 e	12 ±0.1 d	12 ±0.6 d	8 ±0.1 e

a – g : الأحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى الاحتمالية 0.05 .

تـأثير تراكيز النـواتج الايضـية مـن بكتريا *delubricii* subsp. *Lb.bulgaricus* في تثبيط انواع الفطريات: بينت النتائج امتلاك النـواتج الايضـية مـن نـوع البكتريا *Lb. delubricii* subsp. *bulgaricus* عند التركيز 10 ، 20 و 40 ملغم/غم من الوسط الغذائي فاعلية تثبيطـية معنوية عنـد (P<0.05) عنـد إضـافتها فـي الحفر ضد أنواع الفطريات المرضية أو المنتجة للسموم الجدول (3). تبين أن النواتج الايضية من نـوع البكتريا *Lb. bulgaricus* وعند التراكيز 10 ملغم/مل من الوسط تأثيرا تثبيطيا أعلى معنويا ضد النوع *A. fumigtus* التـي كـان قطر منطقـة التثبيط 18 ملم ، تلاها النوعين *R. stolonifer* و *T. mentagrophytes* التي كانت 14 و 12 ملم على التوالي ، ولم يكن لها تأثيراً ضد النـوع *M. canis* ، ولكن ازداد تأثير النواتج الايضية مع زيادة تركيزها التي كانت 26 ملم لكل من نوعي الفطريات *T. mentagrophytes* و *A. fumigtus* تلاها في كفاءة التثبيط ضد الفطر *R. stolonifer* ثم *M. canis* إذ كانت 22 و 16 ملم على التوالي.

الجدول(3). الفاعلية التثبيطية للنواتج الايضية لبكتريا *Lb. delubricii subsp. bulgaricus* ضد بعض أنواع الفطريات بعد تنميتها عند 30°م لمدة 72 ساعة و pH 6.5 .

تراكيز النواتج الايضية لنوع البكتريا *L. bulgaricus* (ملغم/مل من الوسط الغذائي)			مستوى تركيز النواتج الايضية / أنواع الفطريات
40	**20**	**10**	
قطر منطقة التثبيط (ملم)			
18 ±1.1 d	16 ±0.2 c	0 ±0.0 d	***Mycrosporium canis***
32 ±0.2 a	26 ±0.1 a	12 ±0.7 c	***Trichophyton mentagrophytes***
30 ±0.5 b	26 ±0.9 a	18 ±1.1 a	***Aspergillus fumigatus***
28 ±0.6 c	22 ±0.8 b	14 ±0.4 b	***Rhizopus stolinfer***

a – d : الأحرف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى الاحتمالية 0.05 .

أما عندما ازداد التركيز من النواتج الايضية إلى 40 ملغم فان التأثير التثبيطي ازداد في كفاءته ضد الأنواع *T. mentagrophytes* ، *A. fumigtus*، *R. stolonifer* و *M. canis* حيث كان 32 ، 30 ، 28 و 18 ملم على التوالي.

يعتقد إن الفاعلية التثبيطية لهذا النوع يمكن أن تعود إلى قدرته في التنوع في إنتاج المواد الأيضية المثبطة لأنواع الفطريات مقارنه مع الأنواع الأخرى من بكتريا حامض اللاكتيك ، ومن أهم النواتج الأيضية هو مركب بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الذي ينتج بتراكيز عالية من هذا النوع البكتيري [14]. فضلا عن قابليته في انتاج الحوامض العضوية ذات الفعالية التثبيطية التي يعد منها حامض اللاكتيك بأنه الناتج الرئيس الذي يتمحور فعله التثبيطي في تغيير الأس الهيدروجيني للوسط وبالتالي زيادة مستوى الحامضية داخل سايتوبلازم الخلية مما يسبب مسخ البروتينات والأنزيمات الخلوية وبالتالي موت الخلية [12 , 27].

فضلا عن امتلاكة لصفتين يكون فعلهما تثبيطيا الأولى هي امتلاك حامض اللاكتيك شكلين متأينين في المحاليل المائية أحدهما متفكك (Dissociation) والأخر غير متفكك (Undissociation) وان الشكل غير المتفكك للحوامض الضعيفة ينتشر وبصورة حرة خلال الغشاء الخلوي إلى السايتوبلازم اعتمادا على مستوى الأس الهيدروجيني الداخل خلوي فإنه ينتقل إلى الشكل المتفكك داخل الخلية مطلقا أيونات H^+ الحرة التي ستؤدي في زيادة حامضية السايتوبلازم [28]. وان الشكل غير المتفكك للجزيئة سيؤدي إلى تأثير تضادي أخر إضافة إلى تأثيره على حامضية الوسط وذلك من خلال تحطيم الآلية الكيموكهربائية لانتقال البروتونات مسببا تغير في نفاذية غشاء الخلية وتحطيم نظام انتقال البروتونات وبالتالي تغير نفاذية غشاء الخلية وتحطيم نظام انتقال المواد عبر الغشاء [29].

وقد لاحظ Helander وآخرون، (1997) [30] إن الحامض بشكله غير المتفكك يملك تأثيرا يفوق (10– 100) مرة الشكل الأخر غير المتفكك من حامض اللاكتيك وذلك لقدرته في اختراق الغشاء السايتوبلازمي للخلية بفعل الخاصية الألفة للدهون (Lipophilic)

ومن خلالها فإن حامض اللاكتيك يعد المنتج الحامضي الأبرز والأكثر فعالية ضد العديد من الكائنات الأخرى. وقد اعتمد كأحد العوامل ضد ميكروبية من قبل منظمة الغذاء والدواء العالمية لقدرته في تثبيط العديد من الميكروبات [31].

تنتج الانواع التابعة لجنس بكتريا حامض اللاكتيك الانزيمات الحالة (Lytic enzymes) والتي لها دور مهم في تحطيم جدران الفطر ومنها Glucanase, Chitinase, Cellulase و Proteinase، كما ان لهذا النوع من البكتريا المقدرة على انتاج انزيم Phytase المحطم لمادة Phytic acid والتي تتواجد في جدران العديد من الفطريات[32] و [33].

كما تعمل هذه البكتريا على منافسة الاحياء المجهرية الاخرى على بعض العناصر الغذائية المهمة كالحديد والمغنيسيوم والفسفور والصوديوم اذ انها تفرز مواد تعمل على الارتباط بالحديد وتجعله غير متاح للكائنات المجهرية الاخرى وبالتالي لا تستطيع النمو في الوسط الذي تعيش فيه هذه البكتريا[34].

إن حامض البروبيونك والاستيك من نواتج هذه البكتريا أيضا واللذان ينتجان بكميات قليلة جدا ونادرة ويساعد انخفاض الأس الهيدروجيني في تحفيز عمل كل من البروبيونك والاستيك ليقوما بنفس العمل وهو إطلاق ايونات H^+ بعد انتشارهما عبر الغشاء إلى داخل الخلية وبذلك تزداد الحامضية أكثر [4].

إن التأثير التضادي والفعالية التثبيطية لحامض البروبيونك ضد النمو الفطري وكما ذكر [35] تبدأ عند انخفاض مستوى الأس الهيدروجيني للوسط وتكمن تلك الفعالية في أمرين أولهما في تأثيره على أغشية الفطر عند

انخفاض مستوى الأس الهيدروجيني و الثاني هو اشتراكه مع حامض الاستيك في تثبيط تصنيع الأحماض الامينية للعزلات الفطرية. إن كل من حامض اللاكتيك والاستيك و البروبيونك مجتمعة تمتلك مدى تثبيطي واسع لأنواع الخمائر والفطريات بصورة فعالة مقارنة عما لو استخدم كل حامض بمفرده [27].

المصادر

1- Jawetz, M. and Adelberg, S. (2007). Medical. Microbiology.24th ed, Internation Edal. McGraw-Hill companies, Inc.pp199-207.

2- Ross, P.R; Morgan, S. and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology. 79:3-16.

3- Kandler, O. and Weiss, N. Weiss. (2005). Regular, nonsporing gram-positive rods, p.1208-1234. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and Holt J.G. (ed.), Bergy's Manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, M.D.

4- Heyman, M. (2000). Effect of lactic acid bacteria on fungi .J. Am. Coll. Nytr., 19(2) :137_146.

5- Pinchuk, L.V.; Bressollier, P.; Veneuil, B.; Fenet, B.; Megraud, F. and Urdaci, M.C. (2001). In Vitro Anti- *Helicobacter pyloci* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3in due to secretion of antibiotics. Antimicrob. Agent Chemother 45(11): 3156-3161.

6- Delgado, A.; Brito, D.; Fevereior, P.; Peres, G. and Marques, J.F. (2001). Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from atraditional lactic acid fermentation of table olives. Lait.,81:203_215.

7- Bullerman, L.B. (2004). Incidence and Control of Mycotoxins producing molds in domestic and imported cheeses. International Jornal of food Microbiology. 31,435-446.

8- Desmazeaud, M. (1996). Lactic acid bacteria in food :use and safety. J. Cahiers Agricultures, 5(5): 331-342.

9- Gourama, H.and Bullerman, L.B. (1995). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *lactobacillus species*. J. Food. Protect., 58: 1249-1256.

10- Haskord, C.A., El-Nezami, H.S.; Kankaanpaa, P.E.; Salmine S. and Ahokas ,J.T. (2001). Surface binbing of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria App. Environ. Micron. Microbiol 67:3086-3091.

11- El-Nezami, H.; Polychronaki, N.; Salmine, S. and Mykkanen, H. (2002). Binding other than metabolism may explain the interaction of two food grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivatve alpha-zearalenal. App. Environ. Micron. Microbiol., 68,3345-3549.

12- Piard, J.C. and Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors Produced by lactic acid bacteria: 1.Oxygen metabolites and end Products from catabolism. Hait, 71: 525-541. (cited from Piard and Desmazeaud, 1992).

13- Baron, E.J. and Fingold, S.E. (1994). Diagnostic Microbiology .9th . Ed. the C.V. Mosby Company. Baltimore. U.S.A.

14- Samson, R.A. and Reenen-Hoekstra, E. S. (1988). Introduction to food borne. Fungi. Clinical Microbiolog. Reviews, April. (1999). P.310-350, Vol. 12, NO.2. American Society for Microbiology; 12: 310-350.

15- Association of Official Analytical Chemists. (2002). Official methods of analysis. 4th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Virginia. USA.

16- Association of Official Analytical Chemists. (2002). Official methods of analysis. 4th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Virginia. USA.

17- Winn, J. W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. and Woods, G. (2006). Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins. U.S.A.

18- SAS Version, Statistical Analysis System (2001). SAS Institute Inc., Cary, NC. 27512-8000, U.S.A.

19- Duncun, D. B. (1955). Multiple Range and F. test. Biometric. 11:42.

20- Holt, J.G.; Krieg , N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley. J.T. and Williams, S. T. (eds). (2005). Bergey`s manual of determinative bacteriology 9th ed .Williams and Willkins Baltimore Maryland U.S.A. pp: 527-541.

21- Willey, J.M.; Sherwood, L.M.; Woolverton, C.J. Prescott, Harley. (2008). Klein's Microbiology. 7th. Ed . In : Mouni, F.; Lascurain, R.; Garfias, Y. (2009). Effect of *Bifidobacterium bifidum* DSM cytoplasmic interaction on human immune cells . Immunological Investigation. Vol. 38, pp. 104-115.

22- Paco, R.S.; Leme, I.L.; Battino, J.A. and Ferreira, A.J.P. (2003). Identification of *Lactobacillus* spp. From broiler litter in Brazil. Braz. J. Microbiol; 34(3): 320-324.

23- Chen, H. and Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food application comprehensive reviews in food science and food safety. Vol. 2.

24- Ouwehand, A.C.; Salminen, S.; Tolkko, S.; Roberts P.; Ovaska, J. and Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. Clin. Diag. Lab. Immunol. 9(1): 184-186.

25- Lee, D.K.; Jang, Seak; Baek, E.H.; Kim, M.J. and Lee, K.S.(2009). Lactic acid bacteria affect Serum cholesterol levels , Health and Disease. (8): p 447-491.

26- Maza, L.M.; Pezzlo, M.T. and Baron, E. (1997). Color Atlas of Diagnostic Microbiology, Mosby-Year Book. Inc. St. Louis. Missouri 63146, pp. 119-150.

27- Naidu, A.S.; Bidlack, W.R. and Clemens, R.A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit. Rev. Food Sci, Nutr., 38(1): 13-126.

28- Axelsson, L.T. (1998). Lactic acid bacteria: classification and Physiology. in: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, 2nd ed. Salminen, S. and A. Von Wright eds. Marcel Dekker Inc., New York, PP:1-72.

29- Adams, M.R. and Nicolaides, L. (1997). Review of the Sensitivity of different food borne Pathogens of fermentation. J. Food conrrel, 8(516):227-239.

30- Helander, I.M.; Von Wright, A. and Mattila-sandholm, T.M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gramnegative bacteria. Trends Food Sci Technol.

31- Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular Polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. Department of food Technology , University of Helsinki.

32- Komoto, A.; Hanaki, K.; Maenosono, S.; Wakano, J.Y.; Yamaguchi, Y. and Yamamoto, W. (2003). Growth dynamics of Bacillus circulans colony. J. Theor. Biology, 225:91-97.

33- Idriss, E.E.; Oliwia, M.; Farouk, A.; Kristin, R. (2002). Extracellular phytase activity of Bacillus mylolique faciens FZB45 contributes to its plant-growth- promoting effect. Microbial. 148:2097-2109.

34- Neilands, J. B. (1993). Perspectives in biochemistry and biophysics siderophores. Archives of biochemistry of biophysics. 302:1-3.

35- Meydani, S.N. and Ha, W. (2000). Immunological effects of yoghart Am. J. Clin. Nutr. 71**:**861-872.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)
مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (5) 2016

The inhibitory Effect of *Lactobacillus bulgaricus* against some Pathogenic and Toxin Producing Fungi which isolated from soil

Luay B. Mustafa[1] , Karkaz M. Thalij[2]

[1] *Department of Biology , College of Education for Pure Science , Tikrit University, Tikrit, Iraq*
[2] *Food Science Department , College of Agriculture , Tikrit University, Tikrit, Iraq*

Abstract

This study was aimed to isolation and identification of *Lactobacillus delubricii* subsp. *bulgaricus* species and to study the effect of bacterial cells at different degrees of temperature and pH levels or its metabolite products on Inhibition effects against some pathogenic and toxin produced fungi species that's isolated in laboratory. The results was found to identify *Lb. delubricii* subsp. *bulgaricus* species were isolated from dairy products and this identification was depended on morphological, cultural and biochemical characters, also were identified four species from fungi were isolated from soil *Mycrosporium canis, Trichophyton mentagrophytes , Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus stolinfer*. The results also was explored the effects of *Lb. delubricii* subsp. *bulgaricus* when cultivated on different pH level and temperature degree and were found the best pH level for inhibition of fungi species growth was at 6.5 and the inhibition zone diameter was 22, 24, 26 and 24 mm respectively, while the 30 C° was get the best inhibition degree for the best inhibition and the inhibition zone diameter against the fungi species was became 22, 24, 26 and 24 mm respectively. The results showed that the best pH levels to and the zone inhibition diameter against the fungi species in this study. The results was also illustrated the effects of the metabolites produced from the *Lb. delubricii* subsp. *bulgaricus* at 10 , 20 and 40 mg / ml from cultural media on the Inhibition ability to fungi , and that's appears as significantly increased with the metabolite concentration increased and became at the 40 mg, the inhibition zone diameter was found as 32, 30, 28 and 18mm respectively.