دراسة صفة السطح الكاره والتجمع الذاتي لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* المعزولة من المهبل

Study of Hydrophobicity and Autoaggregation of *Lactobacillus acidophilus* Isolated from vagina

وسن عبود اليس كريكور

قسم التقنيات الأحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد

Wasan Abbood **Alice Krekor**

Biotechnology Dept./ College of science / Baghdad University

المستخلص

تم التحري عن صفة السطح الكاره للماء لعزلات *Lactobacillus acidophilus* بطريقة الألتصاق على المواد الهيدروكاربونية باستعمال الزايلين ، وقد تراوحت النسبة المئوية للألتصاق بين 28-88% وكانت الفروق معنوية (P<0.05) وظهرت ثلاثة عزلات أكثر كرها للماء . وتم التحري عن قدرة العزلات الكارهة للماءعلى التجمع الذاتي باستعمال الرائق المزرعي لمرق MRS ومرق LAPTg المنماة فية البكتريا لمدة 24 ساعة وقد بينت النتائج أن هذه العزلات كانت أكثر قدرة على التجمع الذاتي في مرق LAPTg حيث تراوحت النسبة بين 70-83.3% . من جهه أخرى كانت هذه العزلات قادرة على التجمع الذاتي في الرائق المزرعي لمرق MRS بنسبة 30-70%. كذلك تم الكشف عن طبيعة العوامل المسؤولة عن التجمع الذاتي المفرزة في الوسط الزرعي السائل ، ونوع العوامل السطحية الموجودة على سطح الخلايا البكتيرية العائدة للعزلات عن طريق معاملة الخلايا والرائق المزرعي لمرق LAPTg بأنزيمات proteinase K و Lipase ومادة Sodium periodate وقد بينت النتائج أن هذه العوامل بنوعيها هي عوامل بروتينية وذلك لأنخفاض نسبة التجمع الذاتي بعد المعاملة بأنزيم proteinase K .

Abstract

The Hydrophobicity of the seven isolates of *L.acidophilus* were detected by applying BATH test (Bacterial Adherence To Hydrocarbons) using xylene. The percentage of Hydrophobicity of the isolates ranged between 28-88% and the differences between the rates were significant (P<0.05). There was three hydrophobic isolates. The autoaggregation ability of the three isolates was tested by using the supernatant of MRS and LAPTg media in which the bacteria was cultivated for 24 hr. The results revealed that the three isolates were more aggregative in LAPTg supernatant. The percentage of the aggregation ranged between 70- 83.3% .On the other hand the percentage of the autoaggregation using MRS supernatant ranged between 30-70%. The nature of the surface and secreted factors which are responsible for the autoaggregation were determined by treatment of the bacterial cells and their LAPTg supernatants by proteinase K, lipase and sodium periodate. Results obtained indicated that the two types of these factors were proteins because of the inhibition of the aggregation after either the treatment of cells or the supernatants by proteinase K, and it's resistance to treatment with lipase or sodium periodate.

المقدمة :

توجد بكتريا *L.acidophilus* في الطبيعة في الأغذية المتخمرة ومنتجات الألبان وكذلك في القناة الهضمية ,والفم , والسبيل التناسلي في الإنسان والحيوان و تعد بكتريا *Lactobacillus spp* جزءاً من النبيت الطبيعي الذي يستوطن المهبل منذ البلوغ وحتى سن اليأس [1] . تعد مجموعة *L.acidophilus* التي تشمل الأنواع: *L.crispatus* ،و *L.acidophilus*, و *L.gasseri* الأكثر وجوداً بين أنواع Lactobacilli الموجودة في المهبل [2] . إن صفة السطح الكاره للماء للسطح الخارجي للبكتريا تؤثر بشكل مباشر في التصاقها على السطوح ، فكلما كانت صفة السطح الكاره للماء عالية كلما كان التصاق البكتريا أفضل [3] . وهي تمثل القوة التي تدفع بالخلايا البكتيرية الى التفاعل مع سطح المضيف عن طريق إزالة جزيئات الماء حول الخلية والأرتباط بالسطح[4] .ومن الطرق المستخدمة في قياس هذه الصفة هي التصاق البكتريا على المركبات الهيدروكاربونية [5] . تمتلك بكتريا *Lactobacillus* العديد من الآليات في حماية البيئة الداخلية للقناة الهضمية والسبيل التناسلي ، ومن أهم هذه الآليات التي تساعد البكتريا في عملها بوصفها معززًا حيوياً (probiotic) هي صفة التجمع (aggregation) [6] . اذ يساعد التجمع في حماية السبيل البولي والتناسلي بكونه يساعد البكتريا على الألتصاق بأعداد كبيرة منتجة الغشاء الحيوي (biofilm) على الخلايا الظهارية مانعة الممرضات من الألتصاق ، وكذلك يساعد البكتريا على التجمع مع الممرضات مثل: *Candida albicans* و *Gardnerella vaginalis* ومنعها من الألتصاق[7] . تنتج *Lactobacillus acidophilus* نوعاً واحداً من العوامل وهو APF ، ويشابه في تركيبه العامل الثاني APF2 المنتج من النوع *Lactobacillus gasseri* [8] . إن لبروتينات الطبقة السطحية (S-Layer Proteins) دوراً كبيراً في عملية التجمع الذاتي في بكتريا *L.acidophilus* فعند أزالة هذه الطبقة بالمعاملة بأنزيمات البروتيزات (proteases) أو بالاستخلاص بوساطة كلوريد الليثيوم يثبط عامل التجمع وذلك لأحتواء الطبقة السطحية على المستقبلات (receptors) التي يرتبط معها عامل التجمع المفرز في الوسط[6] .

المواد وطرق العمل

عزل بكتريا *L.acidophilus*

جمعت العينات بأخذ مسحات مهبلية من المراجعات في مستشفى الكاظمية الجامعي وزرعت في مرق MRS [9] . نميت البكتريا في الظروف المثلى المستخدمة في التنمية بدرجة 37م وبوجود غاز CO_2 (3-5)% وشخصت باستعمال عدد من الأختبارات الكيموحيوية [10] .

الكشف عن صفة السطح الكاره للماء لبكتريا *L.acidophilus*

أجري اختبار التصاق البكتريا على الزايلين [11] حيث نميت البكتريا في مرق MRS لمدة 18 ساعة وفصلت وغسلت البكتريا بمحلول داريء الفوسفات الملحي باستعمال جهاز الطرد المركزي وضبطت الكثافة الضوئية للعالق البكتيري الى1 وعلى الطول الموجي 540 نانومتر ، ثم أضيف الزايلين الى العالق ومزجت باستعمال المازج وحسبت النسبة المئوية للألتصاق باستخدام المعادلة الأتية:

$$\text{النسبة المئوية \%} = \frac{\text{الكثافة الضوئية للعالق البكتيري قبل المزج مع الزايلين-الكثافة الضوئية للطبقة المائية}}{\text{الكثافة الضوئية للعالق البكتيري قبل المزج مع الزايلين}} \times 100$$

اختبار قدرة بكتريا *L.acidophilus* على التجمع الذاتي

أجري الأختبار حسب الطريقة المستخدمة [12] . اذ نميت البكتريا باستخدام مرق MRS ومرقLAPTg بدرجة 37م وبوجود 3-5% غاز CO_2 [13] . فصلت وغسلت البكتريا بمحلول داريء الفوسفات الملحي وضبطت الكثافة الضوئية للبكتريا الى 0.6 عند الطول الموجي 600نانومتر بعد أعادة تعليق البكتريا في الرائق المزرعي لمرقLAPTg أوMRS وكذلك تعليق البكتريا في مرق LAPTg ومرق MRS المعقمين ومحلول داريء الفوسفات الملحي (أنابيب سيطرة) . أخذت القراءات بمعدل قراءة لكل ساعة ولمدة ثلاث ساعات . وحسبت النسبة المئوية للتجمع الذاتي للساعة الواحدة[14] :

$$\text{النسبة المئوية للتجمع الذاتي \%} = \frac{\text{الكثافة الضوئية للعالق البكتيري عندالوقت صفر- الكثافة الضوئية للعالق البكتيري بعد مرورثلاث ساعات}}{\text{الكثافة الضوئية للعالق البكتيري _ عند وقت الصفر}} \times 100$$

تشخيص العوامل المسؤولة عن التجمع الذاتي

شمل الأختبار معاملة البكتريا والرائق المزرعي[6،14] :

■ **معاملة الخلايا البكتيرية بأنزيمات البروتيناز K واللايباز ومادة Sodium periodate**

نميت البكتريا في مرق LAPTg بدرجة37م ولمدة 18 ساعة . فصلت وغسلت الخلايا البكتيرية باستعمال الطرد المركزي وأعيد تعليقها بالداريء الملائم لكل معاملة وضبطت الكثافة الضوئية للعالق البكتيري الى 0.6 عند الطول الموجي 600 نانومتر بواقع أربعة مكررات حيث أضيف اللايباز الى الخلايا المعلقة بداريء الفوسفات الملحي(pH=7.2) بتركيزنهائي 0.5ملغم/مليلتر وأضيف البروتيناز بتركيز نهائي0.5ملغم/مليلترالى الخلايا المعلقة بداريء phosphate citrate (pH=2.8) وأضيف Sodium periodate بتركيز نهائي 10 ملغم/مليلترالى الخلايا المعلقة بداريءالأستيت (pH=4.5) وحسبت النسبة المئوية لتثبيط المعاملة الأنزيمية والكيميائية للتجمع الذاتي كما يأتي:

نسبة تثبيط التجمع الذاتي %

$$= \frac{\text{النسبة المئوية للتجمع الذاتي بعد مرور ثلاث ساعات -النسبة المئوية للتجمع بعد مرورثلاث ساعات و بعد معاملة البكتريا}}{\text{النسبة المئوية للتجمع الذاتي بعد مرور ثلاث ساعات}} \times 100$$

■ **معاملة الرائق المزرعي بأنزيمات البروتيناز K واللايباز ومادة Sodium periodate**

نميت البكتريا في مرق LAPTg بدرجة37م ولمدة 18 ساعة . فصلت وغسلت الخلايا البكتيرية باستعمال الطرد المركزي وأعيد تعليقها بالرائق المزرعي المعامل بأنزيم البروتيناز والايباز ومادة sodium periodate بنفس التراكيز المذكورة في الفقرة السابقة وضبطت الكثافة الضوئية للعالق البكتيري الى 0.6 عند الطول الموجي 600 نانومتر وحسبت النسبة المئوية لتثبيط المعاملة الأنزيمية والكيميائية للتجمع الذاتي كما يأتي:

نسبة تثبيط التجمع الذاتي %

$$= \frac{\text{النسبة المئوية للتجمع بعد مرور ثلاث ساعات -النسبة المئوية للتجمع بعد مرور ثلاث ساعات بعد معاملة الرائق}}{\text{النسبة المئوية للتجمع بعد مرور ثلاث ساعات}} \times 100$$

■ **التحليل الأحصائي**

حللت نتائج أختبار الصفة الكارهة للماء لعزلات البكتريا أحصائيا باستخدام معادلة الأنحراف القياسي (standard deviation) [15] .

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus acidophilus*

تم الكشف عن وجود بكتريا *L.acidophilus* في 70 عينة (مسحة مهبلية)جمعت خلال المدة من شباط الى أيلول 2005، وأمكن الحصول على 7 عزلات(La7-La1) تعود الى هذا النوع من مجموع 25 عزلة تعود لجنس *Lactobacillus* . امتازت المستعمرات العائدة لبكتريا *Lactobacillus* على وسط MRS الصلب بكونها مستعمرات محدبة و بيضاء اللون ، صغيرة الحجم بقطر 2 مليمتر ونامية تحت سطح الوسط الزرعي ، أما خلايا بكتريا *Lactobacillus* ظهرت عند فحصها مجهريا عصوية مترتبة بشكل سلاسل قصيرة أو طويلة و موجبة لصبغة غرام [10] . كذلك أجريت الفحوصات الكيموحيوية وكما مبين في الجدول (1) . إن أنخفاض نسبة عزل البكتريا قد يعود الى الحالة الصحية للنساء من ناحية الأصابة بأي من الالتهابات البكتيرية أو الفطرية و كذلك خضوع النساء للعلاج بالمضادات الحيوية سواء عن طريق الفم أو موضعياً مما يساعد في القضاء على هذه البكتريا [16] .

الجدول(1): الأختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا *L.acidophilus*

العزلة / الاختبارات	*L.acidophilus* La1	*L.acidophilus* La2	*L.acidophilus* La3	*L.acidophilus* La4	*L.acidophilus* La5	*L.acidophilus* La6	*L.acidophilus* La7
الكتالاز	-	-	-	-	-	-	-
الأوكسيداز	-	-	-	-	-	-	-
تحلل الجلاتين	-	-	-	-	-	-	-
أنتاج الأندول	-	-	-	-	-	-	-
نوع تحلل الدم	α	α	α	α	α	α	*α*
تحلل الأرجنين	-	-	-	-	-	-	-
النمو في درجة 15م°	-	-	-	-	-	-	-
النمو في درجة 45م°	+	+	+	+	+	+	+
تحلل الاسكيولين	+	+	+	+	+	+	+
تحلل النشأ	+	+	+	+	+	+	+
تخمر السكروز	+	+	+	+	+	+	+
تخمر المانتول	-	-	-	-	-	-	-
تخمر المانوز	-	-	-	-	-	-	-
تخمر اللاكتوز	+	+	+	+	+	+	+
تخمر الكالاكتوز	+	+	+	+	+	+	+
تخمر الزايلوز	-	-	-	-	-	-	-
تخمر الأرابينوز	-	-	-	-	-	-	-
تخمر الرافينوز	+	+	-	-	+	-	-
النمو في 3.5% كلوريد الصوديوم	-	-	-	-	-	-	-
النمو في 4.5% كلوريد الصوديوم	-	-	-	-	-	-	-
النمو في 5.5% كلوريد الصوديوم	-	-	-	-	-	-	-

(-): النتيجة السالبة (+): النتيجة الموجبة(α):تحلل الدم من نوع α

الكشف عن صفة السطح الكاره للماء لبكتريا *L.acidophilus*

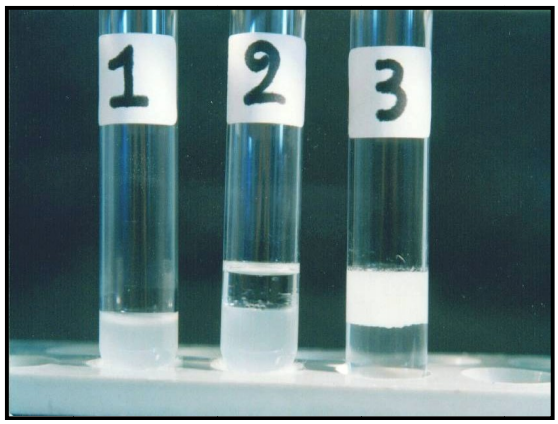
تبين عن طريق أتباع طريقة للكشف عن صفة السطح الكاره للماء من خلال التصاق العزلات البكتيرية بالزايلين (xylene) [11] . إن النسبة المئوية لصفة السطح الكاره للماء للعزلات La7,La6,La5,La4,La3,La2,La1 تراوحت بين 28 -88% وكانت الفروق معنوية ($P<0.05$) وكما مبين في الجدول (2) والشكل (1) . وبالاستناد الى ما ذكر يتضح أن هنالك ثلاث عزلات كارهة للماء (hydrophobic) وذلك لكون النسبة المئوية لالتصاقها على

الزايلين تجاوزت 40% . [17] وهذه العزلات هي: La7 ، La6 ، La4 . إن عدم الحصول على نسبة أعلى من العزلات البكتيرية الكارهة للماء ممكن أن يعود الى صعوبة الحصول عليها بطرائق العزل التقليدي ؛ لكونها شديدة الأرتباط بالسطوح التي توجد عليها[18] . لوحظ عن طريق دراسة 68 عزلة تعود لبكتريا *Lactobacillus* ، إن 57 عزلة من هذه العزلات كانت محبة للماء ، في حين كانت 6 عزلات كارهة للماء ، و5 عزلات متوسطة ، وإن 75% من هذه العزلات كانت غير قادرة على الالتصاق على الخلايا الظهارية للسبيل التناسلي مما يدل على وجود علاقة وثيقة بين الالتصاق والطبيعة الكارهة للماء[19] . إن بكتريا *L.acidophilus* قد تكون كارهة للماء [20] . وإن هذه الطبيعة تعود الى وجود البروتينات السطحية أو أحماض دهنية سطحية (Surface exposed fatty acids) مثل palmitic acid الذي يعد المستضد الرئيس السطحي الذي يحدد الطبيعة الكارهة للماء والموجود في أحماض التايكويك الدهنية والتي لها القدرة على التحرر الى خارج الخلية البكتيرية [21] . إن اختلاف سلالات بكتريا *L.acidophilus* في الطبيعة الكارهة للماء قد تمت الأشارة إليه في بعض الدراسات [20،22] . إن هذا التباين الحاصل في النتائج قد فسر الى وجود اختلاف في تركيب وسط MRS المستخدم في تنمية البكتريا [23] . وقد أشار الباحثون الى وجود اختلاف ولو قليل لاسيما في محتوى الوسط من الببتون يؤدي الى الحصول على نتائج متباينة وخاصة مع وسط MRS المجهز تجاريا . كذلك أشير الى أن تقليل أو حذف الببتون من الوسط الزرعي يؤدي الى حصول تغيرات في الصفات السطحية لبكتريا *L.acidophilus* بما فيها صفة السطح الكاره للماء [24] .

الجدول(2): النسب المئوية لصفة السطح الكاره للماء لعزلات *L.acidophilus* مقاساً بالكثافة الضوئية بطول موجي 540 نانومتر

العزلة	الكثافة الضوئية للعالق البكتيري قبل المزج مع الزايلين	الكثافة الضوئية للطبقة المائية بعد المزج مع الزايلين	النسبة المئوية لصفة السطح الكاره*%
La1	1	0.72	28
La2	1	0.67	33
La3	1	0.71	29
La4	1	0.27	73
La5	1	0.65	35
La6	1	0.56	44
La7	1	0.12	88

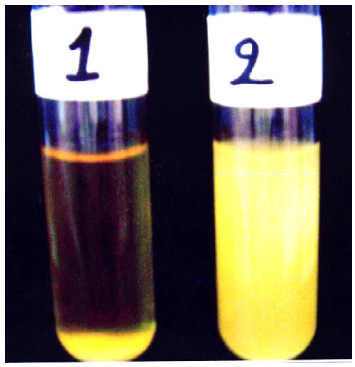
*النسبة المئوية لصفة السطح الكاره للماء= (الكثافة الضوئية قبل المزج – الكثافة الضوئية للطبقة المائية بعد المزج) / الكثافة الضوئية قبل المزج ×100



الشكل (1): اختبار الكشف عن صفة السطح الكاره للماء
1-العالق البكتيري 2-العالق البكتيري والزايلين قبل المزج
3-العالق البكتيري والزايلين بعد المزج

أختبار التجمع الذاتي لبكتريا *L.acidophilus*

لوحظ عن طريق إجراء أختبار التجمع الذاتي أن العزلات الثلاثة La7, La6, La4 العالية النسبة للسطح الكاره للماء كانت لها القدرة على التجمع الذاتي (autoaggregation) عند تنميتها في مرق MRS ومرق LAPTg لمدة 18 ساعة وبدرجة حرارة 37م الشكل (2) . أن قدرة بكتريا *Lactobacillus* على الترسب في قعر الأنبوبة بعد تنميتها في الوسط الزرعي يعد مؤشراً على قدرتها على التجمع الذاتي [8] . تبين أن العزلات La7, La6, La4 لا تمتلك القدرة على التجمع عند تعليقها بداريء الفوسفات الملحي (PBS) الجدول(3) ، وكذلك عند تعليقها في مرق MRS ومرقLAPTg المعقمان بدرجة 121م لمدة 15 دقيقة والمستعملان سيطرة (Control) الجدول (4) و الجدول (5) .



الشكل (2): اختبار قدرة بكتريا *L. acidophilus* على التجمع الذاتي داخل الأنابيب الزجاجية الحاوية على مرق LAPTg المنماة فيه البكتريا بدرجة 37م لمدة 18 ساعة بوجود 3-5% غاز CO_2
1- عزلة بكتيرية لها القدرة على التجمع الذاتي .
2 - عزلة بكتيرية ليس لها القدرة على التجمع الذاتي .

الجدول (3): النسب المئوية للتجمع الذاتي لعزلات بكتريا *L.acidophilus* في محلول داريء الفوسفات الملحي(pH=7.2)

العزلة	الكثافة الضوئية* في وقت الصفر	الكثافة الضوئية بعد ساعة	الكثافة الضوئية بعد ساعتين	الكثافة الضوئية بعد ثلاث ساعات	النسبة المئوية للتجمع الذاتي بعد مرور ثلاث ساعات%
La4	0.6	0.57	0.54	0.53	11.7
La6	0.6	0.59	0.56	0.56	6.7
La7	0.6	0.56	0.53	0.52	13.3

***الكثافة الضوئية مقاسه على طول موجي 600 نانومتر**

الجدول (4): النسب المئوية للتجمع الذاتي لعزلات بكتريا *L.acidophilus* في مرق MRS المعقم

العزلة	الكثافة الضوئية* في وقت الصفر	الكثافة الضوئية بعد ساعة	الكثافة الضوئية بعد ساعتين	الكثافة الضوئية بعد ثلاث ساعات	النسبة المئوية للتجمع الذاتي بعد مرور ثلاث ساعات%
La4	0.6	0.56	0.54	0.54	10
La6	0.6	0.58	0.58	0.57	5
La7	0.6	0.56	0.54	0.53	11.6

***الكثافة الضوئية مقاسه على طول موجي 600 نانومتر**

الجدول (5): النسب المئوية للتجمع الذاتي لعزلات بكتريا *L.acidophilus* في مرق LAPTg المعقم

العزلة	الكثافة الضوئية* في وقت الصفر	الكثافة الضوئية بعد ساعة	الكثافة الضوئية بعد ساعتين	الكثافة الضوئية بعد ثلاث ساعات	النسبة المئوية للتجمع الذاتي بعد مرور ثلاث ساعات %
La4	0.6	0.59	0.59	0.59	1.7
La6	0.6	0.6	0.59	0.57	5
La7	0.6	0.58	0.58	0.56	6.7

***الكثافة الضوئية مقاسه على طول موجي 600 نانومتر**

في حين كانت هذه العزلات قادرة على التجمع الذاتي عند تعليقها في مرق MRS ومرق LAPTg المنماة فيه البكتريا لمدة 18 ساعة ، وهو يمثل الرائق المزرعي (culture supernatant) . وهذا يتفق مع ما أشار إليه الباحثون الى أن بكتريا *L.acidophilus* لا تمتلك القدرة على التجمع الذاتي الا عند تعليقها في الرائق المزرعي الخالي من الخلايا البكتيرية لمعاملته بمرشحات بقطر 0.45 مايكرومتر ، وهذا يعود الى قدرة البكتريا على أنتاج عامل خارج خلوي (extracellular factor) ، وهو ما يعرف بعامل التجمع (APF) وكذلك أشار الباحثون الى دور بروتينات الطبقة السطحية (SLP) وذلك عن طريق احتوائها على المستقبلات الخاصة لعامل التجمع الذاتي [6،12] . إن النسبة المئوية للتجمع الذاتي تراوحت بين (30-70)% في الرائق المزرعي لمرق MRS وتراوحت بين(70-83.3)% في الرائق المزرعي لمرق LAPTg خلال ثلاث ساعات وكما مبين في الجدول(6 ،7) .

الجدول (6): النسب المئوية للتجمع الذاتي لعزلات بكتريا *L.acidophilus* في الرائق المزرعي لمرق MRS

العزلة	الكثافة الضوئية* في t=0	الكثافة الضوئية في t=1	الكثافة الضوئية في t=2	الكثافة الضوئية في t=3	النسبة المئوية للتجمع الذاتي بعد مرور ثلاث ساعات%
La4	**0.6**	**0.58**	**0.50**	**0.42**	**30**
La6	**0.6**	**0.59**	**0.42**	**0.39**	**35**
La7	**0.6**	**0.33**	**0.25**	**0.18**	**70**

***الكثافة الضوئية مقاسه على طول موجي 600 نانومتر**

الجدول (7): النسب المئوية للتجمع الذاتي لعزلات بكتريا *L.acidophilus* في الرائق المزرعي لمرق LAPTg

العزلة	الكثافة الضوئية* في t=0	الكثافة الضوئية في t=1	الكثافة الضوئية في t=2	الكثافة الضوئية في t=3	النسبة المئوية للتجمع الذاتي بعد مرور ثلاث ساعات %
La4	**0.6**	**0.29**	**0.15**	**0.13**	**78.3**
La6	**0.6**	**0.27**	**0.19**	**0.18**	**70**
La7	**0.6**	**0.18**	**0.12**	**0.10**	**83.3**

***الكثافة الضوئية مقاسه على طول موجي 600 نانومتر**

وقد حددت مدة ثلاث ساعات لملاحظة قدرة العزلة البكتيرية على التجمع الذاتي ، حيث ذكر أن البكتريا القادرة على التجمع الذاتي خلال ساعة تقيم (+++) ، في حين القادرة على التجمع خلال ساعتين (++) ، وخلال ساعة (+) ومن الدراسة نلاحظ ازدياد نسبة التجمع الذاتي بمرور الوقت ، ونرى أن أعلى نسبة للتجمع الذاتي للعزلات الثلاثة تكون في مرق LAPTg منها في مرق MRS [25] . أن سبب ذلك يعود الى احتواء وسط MRS على العديد من الأملاح والمعادن التي تعمل على حث البكتريا على النمو بسرعة عالية دون أنتاجها لعامل التجمع الذاتي ، في حين أن وسط LAPTg يفتقر الى هذه الأملاح ومن ثم يعمل على تشجيع البكتريا على أنتاج العوامل الخارج خلوية المسؤولة عن التجمع الذاتي [7] . إن العزلات الثلاثة La4, La6, La7 كانت كارهه للماء (hydrophobic) وقد أشيرالى وجود علاقة بين صفة السطح الكاره للماء و صفة التجمع (aggregation) في بكتريا *L.acidophilus* ، حيث وجد الباحثون أن السلالات البكتيرية الكارهة للماء تتجمع ذاتيا في الظروف الأعتيادية[6] . إن صفة التجمع الذاتي (autoaggregation) تعد من الصفات الواجب توافرها في بكتريا *Lactobacillus* المستعملة معززاً حيوياً

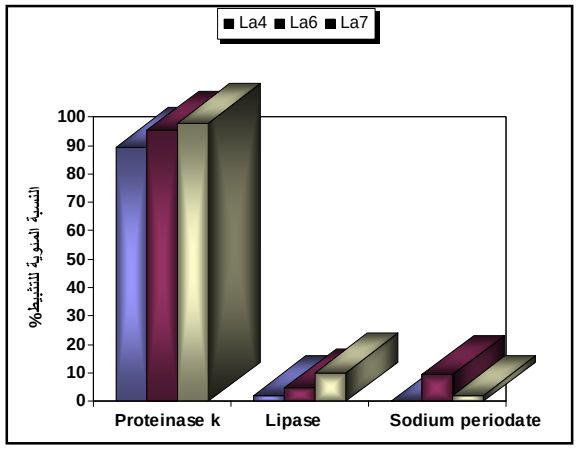
(probiotic) ؛ وذلك لكونها تساعد البكتريا على استيطان السبيل التناسلي مكونة غشاء حيوي (Biofilm) مانعة الأحياء المجهرية الأخرى من الالتصاق [7] .

تشخيص العوامل المسؤولة عن التجمع الذاتي

تعمل بكتريا *L.acidophilus* على أنتاج عوامل خارج خلوية تعرف بعامل التجمع (APF) ، وكذلك عوامل سطحية تعمل مستقبلات يرتبط عن طريقها عامل التجمع مع الخلايا البكتيرية عاملا على ربطها مع بعضها [17] . وقد أجريت الأختبارات الخاصة للكشف على هذه العوامل على الخلايا البكتيرية المنماة في مرق LAPTg وكذلك على الرائق المزرعي لأعطائه أعلى نسبة للتجمع الذاتي .

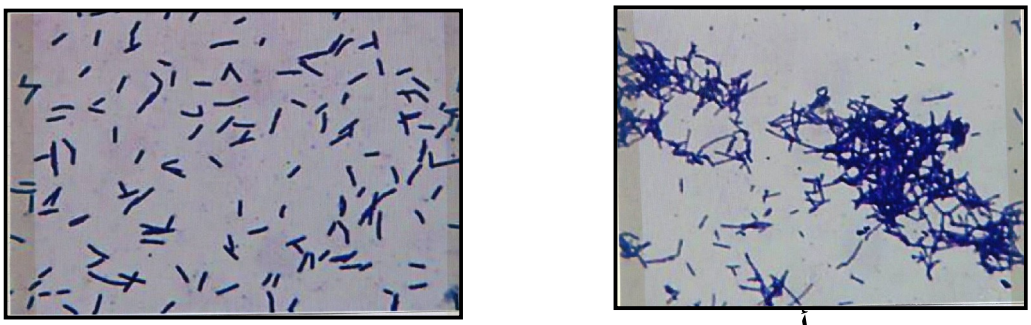
معاملة الخلايا البكتيرية بأنزيمات البروتيناز واللايباز ومادة Sodium periodate

تمت معاملة خلايا بكتريا *L.acidophilus* بأنزيمات اللايباز (lipase) والبروتيناز (proteinase K) وكذلك بمادة sodium periodate الشكل(3) التي تعمل على أكسدة المركبات الكاربوهيدراتية وتحويلها الى شكلها غير الفعال (inactive).



الشكل (3): النسب المئوية لتثبيط التجمع الذاتي لبكتريا *L. acidophilus* بعد معاملة الخلايا بـ proteinase k و lipase و sodium periodate

وقد تبين عن طريق معاملة خلايا العزلات الثلاثة La7, La6, La4 بأنزيم البروتيناز K أنه قد ثبط التجمع الذاتي لهذه الخلايا الجدول(8) والشكل (4) ، حيث تراوحت نسبة تثبيط التجمع بين 89.3 – 98% . في حين لم تتأثر نسبة التجمع الذاتي بعد معاملة الخلايا البكتيرية بأنزيم اللايباز بصورة كبيرة حيث تراوحت نسبة التثبيط بين 2-10% الجدول (9) . أما عند معاملة الخلايا بمادة sodium periodate قد تراوحت بين التأثير أو التثبيط بين 2-9.5% الجدول (10) .



أ ب

الشكل (4): دور انزيم البروتيناز (proteinase k) في تثبيط التجمع الذاتي للبكتريا *L. acidophilus*(100×)
أ-خلايا بكتريا *L. acidophilus* غير المعاملة بأنزيم proteinase k
ب- خلايا بكتريا *L. acidophilus* المعاملة بأنزيم proteinase k

الجدول (8): النسب المئوية للتجمع الذاتي ونسب تثبيط التجمع الذاتي لعزلات بكتريا *L.acidophilus* بعد معاملة الخلايا بأنزيم proteinase K

العزلة	O.D°	O.Dp	النسبة المئوية للتجمع للخلايا المعاملة %	النسبة المئوية للتجمع للخلايا غير المعاملة %	نسبة التثبيط%
La4	0.6	0.55	8.3	78.3	89.3
La6	0.6	0.58	3.3	70	95.3
La7	0.6	0.59	1.7	83.3	98

O.D°: الكثافة الضوئية للعالق البكتيري عند البدأ بالاختبار مقاسه بطول موجي 600نانومتر

O.Dp: الكثافة الضوئية للعالق البكتيري المعامل بأنزيم proteinase K بعد مرور3 ساعات مقاسه بطول موجي 600 نانومتر

الجدول (9): النسب المئوية للتجمع الذاتي ونسب تثبيط التجمع الذاتي لعزلات بكتريا *L.acidophilus* بعد معاملة الخلايا بأنزيم lipase

العزلة	O.D°	O.DL	النسبة المئوية للتجمع للخلايا المعاملة %	النسبة المئوية للتجمع للخلايا غير المعاملة %	نسبة التثبيط%
La4	0.6	0.14	76.7	78.3	2
La6	0.6	0.2	66.7	70	4.7
La7	0.6	0.15	75	83.3	10

O.D L: **الكثافة الضوئية للعالق البكتيري المعامل بأنزيم lipase بعد مرور ثلاث ساعات مقاسه بطول موجي 600 نانومتر**

الجدول (10): النسب المئوية للتجمع الذاتي ونسب تثبيط التجمع الذاتي لعزلات بكتريا *L.acidophilus* بعد معاملة الخلايا بمادة sodium periodate

العزلة	O.D°	O.Ds	النسبة المئوية للتجمع للخلايا المعاملة %	النسبة المئوية للتجمع للخلايا غير المعاملة %	نسبة التثبيط%
La4	0.6	0.13	78.3	78.3	0
La6	0.6	0.22	63.3	70	9.5
La7	0.6	0.11	81.7	83.3	2

O.Ds: **الكثافة الضوئية للعالق البكتيري المعامل بمادة sodium periodate بعد مرور ثلاث ساعات مقاسه بطول موجي 600 نانومتر**

أن البكتريا المعاملة بالأنزيمات الهاضمة للبروتينات تعمل على تثبيط التجمع الذاتي لبكتريا *Lactobacillus* وهذا يعود الى أزالة بروتينات الطبقة السطحية (SLP) والحاوية على مستقبلات التجمع الذاتي [6،17] . و بالرغم من تعليق السلالة غير المنتجة لعامل التجمع (APF) في الرائق المزرعي الحاوي على هذا العامل لاتستطيع البكتريا من التجمع ؛ وهذا يشير الى أن ظاهرة التجمع التي تمتلكها السلالات البكتيرية لايعود الى أفراز عامل التجمع الموجود في الوسط الزرعي فحسب وإنما يعود أيضا الى وجود مركبات سطحية (مستقبلات) مسؤولة عن هذه الصفة ، وإنه لصعوبة الحصول على سلالة طافرة للجدار الخلوي وخاصة المستقبلات ولقلة المعلومات الوراثية عن هذه المستقبلات فإنه لايزال دورها غير معروف [8].

معاملة الرائق المزرعي لبكتريا *L.acidophilus*

عن طريق معاملة الرائق المزرعي للعزلات البكتيرية [6، 14] ودراسة مدى تأثيره في التجمع الذاتي ، لوحظ أن التجمع الذاتي قد ثبط لعزلات *L.acidophilus* الثلاثة La7, La6, La4 بعد معاملة الرائق المزرعي للبكتريا بأنزيم proteinase K الجدول(11) و الشكل(5) . في حين لم يتأثر التجمع الذاتي للعزلات البكتيرية بعد تعليقها في الرائق المزرعي المعامل بالـ lipase الجدول (12) ومادة sodium periodate الجدول(13) .

يستدل مما ذكر أن بكتريا *L.acidophilus* تعمل على أنتاج عامل خارج خلوي ذي طبيعة بروتينية تدخل في عملية التجمع الذاتي . أن بكتريا *Lactobacillus* تنتج عوامل التجمع في الوسط الزرعي والتي تكون مسؤولة عن التجمع الحاصل بين خلايا البكتريا ، وهذه العوامل عبارة عن بروتينات بوزن جزيئي 32 كيلو دالتون تقريبا [14] .

الجدول (11): النسب المئوية للتجمع الذاتي ونسب تثبيط التجمع الذاتي لبكتريا *L.acidophilus* بعد معاملة الرائق المزرعي لمرق LAPTg بأنزيم proteinase K

العزلة	O.D°	O.Dp	النسبة المئوية للتجمع بعد معاملة الرائق المزرعي%	النسبة المئوية للتجمع الذاتي%	نسبة التثبيط%
La4	0.6	0.59	1.7	78.3	98
La6	0.6	0.57	5	70	93
La7	0.6	0.55	8.3	83.3	90

O.D°: الكثافة الضوئية للعالق البكتيري قبل إجراء الأختبار مقاسه بطول موجي 600 نانومتر

O.Dp: الكثافة الضوئية للعالق البكتيري بعد مرور ثلاث ساعات مقاسه بطول موجي 600 نانومتر بعد معاملة الرائق المزرعي بأنزيم proteinase K

الجدول (12): النسب المئوية للتجمع الذاتي ونسب تثبيط التجمع الذاتي لبكتريا *L.acidophilus* بعد معاملة الرائق المزرعي لمرق LAPTg بأنزيم lipase

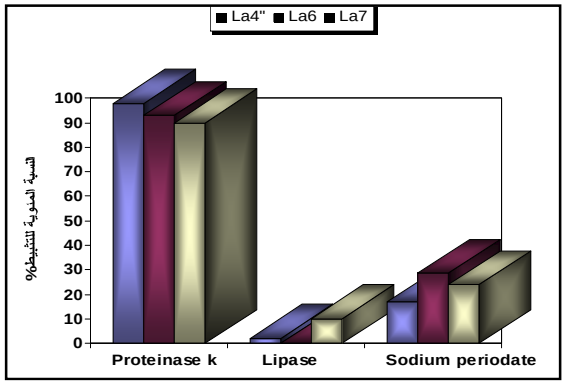
العزلة	O.D°	O.DL	النسبة المئوية للتجمع بعد معاملة الرائق المزرعي%	النسبة المئوية للتجمع الذاتي%	نسبة التثبيط%
La4	0.6	0.14	76.7	78.3	2
La6	0.6	0.18	70	70	0
La7	0.6	0.15	75	83.3	10

O.DL: **الكثافة الضوئية للعالق البكتيري بعد مرور ثلاث ساعات مقاسه بطول موجي 600نانومتر بعد معاملة الرائق المزرعي بأنزيم lipase**

الجدول(13): النسب المئوية للتجمع الذاتي ونسب تثبيط التجمع الذاتي لبكتريا *L.acidophilus* بعد معاملة الرائق المزرعي لمرق LAPTg بمادة sodium periodate

العزلة	O.D°	O.Ds	النسبة المئوية للتجمع بعد معاملة الرائق المزرعي%	النسبة المئوية للتجمع الذاتي%	نسبة التثبيط%
La4	0.6	0.21	65	78.3	17
La6	0.6	0.30	50	70	28.6
La7	0.6	0.22	63.3	83.3	24

O.Ds: الكثافة الضوئية للعالق البكتيري بعد مرور ثلاث ساعات مقاسه بطول موجي 600نانومتر بعد معاملة الرائق المزرعي بمادة sodium periodate



الشكل (5): النسب المئوية لتثبيط التجمع الذاتي لبكتريا *L. acidophilus* معاملة الرائق المزرعي بانزيمات proteinase k و lipase و مادة sodium periodate

المصادر

1. Morishita,T. ; Deguchi,Y. ; Yajima,M. ; Saskurai,T. ; and Yura,T.(1981). Multiple nutritional requirement of Lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways.J.Bacteriol.,148:64-71.
2. Vasquez,A. ; Jakobsson,T. ; Ahrn□,S. ; Forsum,U. ; and Molin,G.(2002).Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy swedish women . J.Clin.Microbiol., 40 (8):2746-2749.
3. Dickson,J.S. ;and Koohmaraie,M.(1989). Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces .Appl.Environ.Microbiol.,55 (4):832-836.
4. Lachica,R.V. ; and Zink,D.L.(1984).Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitis*.Infect.Immun.,44(2):540-543.
5. Sweet, S.P .;Macfarlane,T.W.;andSamaranayake,L.P.(1987).Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method .FEMS Microbiol.Lett.,48:159-163
6. Kos,B. ; Suskovic,J. ; Vukovic,S. ; Simpraga,M. ; Frece,J. ; and Matosic, S.(2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* m92.J.Appl.Microbiol.,94 (6):981-987.
7. Juarez-Tomas,M. ; Wiese,B. ; and Nader-Macias,M.(2005).Effects of culture conditions on the growth and autoaggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL1294.J.Appl.Microbiol.,99(6):1383-1391.
8. Jankovic,I. ; Ventura,M. ; Meylan,V. ; Rouvet,M. ; Elli,M. ; and Zink, R. (2003). Contribution of aggregation – promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2.J.Bacteriol.,185(11):3288-3296.
9. DeMan,J.C.;Rogosa, M.; and Sharpe,M.E.(1960).A medium for the cultivation of Lactobacilli.J.Appl.Bacteriol.,23:130135.Citedby|Boris,S.;Suarez,J.E.;andBarbes,C.(19 97).Characterization of the aggregation promoting Factor from *Lactobacillus gasseri* a vaginal isolate.J.Appl.Microbiol.,83:413-420.
10. Holt,J.C. ;and Krieg , N.R.(1984).Bergeys' manual of systemic bacteriology .4th (ed.).Williams and Wilkins,Baltimore.London.
11. Marin,M.L. ; Benito,Y. ; Pin,C. ; Fernandez,M.F. ; Garcia,M.L. ; Selgas,M.D. ; and Casas,C.(1997).Lactic acid bacteria hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces . Lett.Appl.Microbiol., 24: 14-18.
12. Boris,S.;Suarez,J.E.;and Barbes,C.(1997).Characterization of the aggregation promoting Factor from *Lactobacillus gasseri* avaginal isolate. J.Appl. Microbiol. ,83: 413-420.
13. Raibuad,P. ;Caulet,M. ;Galpin,J.V. ; and Mocquot,G.(1961).Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs streptococci: selective enumeration and differentiation of dominant group .J. Appl.Bacteriol.,24:285-306. Cited by: Boris, S.;Suarez,J.E.;and Barbes,C.(1997).Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri* a vaginal isolate. J.Appl. Microbiol. ,83 : 413-420.
14. Vandevoorde,L. ;Christiaens,H. ;and Verstraete,W.(1992).Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli.J.Appl.Bacteriol.,72:214-219.
15. Baily,N.(1972).Statistical methods in biology. holder and Stoughton,London

16. Ringdahl,E.N.(2000).Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis .Am. Fam.Phys. ,61(11):3306-3312.
17. Boris,S.;Suarez,J.E.; Vasquez,F.;and Barbes,C.(1998).Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogenes. Infect. Immun. ,66 (5):1985-1989.
18. Loosdrech,M.C.M. ; Lyklema,J. ; Norde,W. ; Schraa,G. ; and Zehnder, A.J.B.(1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion.Appl.Environ.Microbiol.,
19. Andreu, A.; Sapleton, A.E. ; Fennell, C.L.; Hillier, S.L.; and Stamm, W.E.; (1995).Hemagglutination, adherence and surface properties of vaginal lactobacilli species.J.Infect.Dis., 171: 1237-1243.
20. Reid,G. ;Cuperus,P.L. ; Bruce,A.W. ; Van de Mei,H.C. ; Tomeczek,L. ; Khoury,A.H. ; and Busscher,H.J.(1992).Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital ,dairy, and poultry lactobacilli :effect of serial culture passages,Appl.Environ.Microbiol.,58(5):1549-1553.
21. Wadstrom,T. ; Andersson,K. ; Sydow,M. ; Axelsson,L. ; Lindgren,S. ; and Gullmar, B.(1987).Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs.J.Appl.Bacteriol.,62:513-520.
22. Millsap,K.W. ; Reid,G. ; Van de Mei,H.C. ; and Busscher,H.J.(1997).Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physico-chemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane. Can. J.Microbiol.,43: 284-291.
23. Millsap,K.W. ; Van de Mei,H.C. ; and Busscher,H.J.(1996).Physico-chemical and adhesive cell surface properties of *Lactobacillus* strains grown in old formula and new ,standardized MRS medium.J.Micrbiol.Methods,27:239-242.
24. Schar-Zammaretti,P. ; Dillmann,M.L. ;D'Amico,N. ; Affolter, M. ;and Ubbink,J .(2005).Influence of fermentation medium composition on physiochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus* .Appl.Environ.Microbiol.,71(12):8165-8173.
25. Bujnakova,D.;and Kemt,V.(2002).Aggregation of animal lactobacilli with O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* .J.Vet.Med.,49:152-154.