DOI: http://dx.doi.org/10.21123/bsj.2016.13.2.0218

التحري عن إلتهاب اللوزتين المتسبب عن بكتريا *Streptococcus spp* في الأطفال وتأثير بعض عزلات بكتريا حامض اللبن فيها

ندى صباح رزوقي   رند ثائر عبد اللطيف

قسم علوم الحياة، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد

استلام البحث 2015/3/8
قبول النشر 2015 /5/25

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Licens

الخلاصة:

تناولت هذه الدراسة جمع (100) عينة من اطفال مصابين بإلتهاب اللوزتين الحاد والمزمن ممن راجعوا مستشفى اليرموك التعليمي (أستشارية الأنف والأذن والحنجرة) للمدة من 2013/12/5 ولغاية 2014/3/1 . كانت نتيجة الزرع المختبري موجبة ل(67) عينة وبالإعتماد على تشخيص الصفات الزرعية للمستعمرات والفحص المايكروسكوبي للخلايا البكترية والصفات الكيموحياتية ، أمكن تشخيص العزلات التي تم الحصول عليها وبواقع (37.31%) تعود لبكتريا *S.pyogenes* وتم تأكيد التشخيص بأستعمال أداة من نوع Remel Rapid STR system و(34.32%) تعود لبكتريا *S.parasanguinis* و(11.94%) *S.mitis* و (11.94%) *S.oralis* و (4.47%) *S.thoraltensis*.. أظهرت النتائج أن طريقة الأقراص لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك أعطت مناطق تثبيط عالية مقارنة بطريقة الحفر بأستعمال عالق بكتريا *L.acidophilus* أعطت أعلى منطقة تثبيط بعد مدة (48) ساعة من الحضن بينما أعطى عالق بكتريا *L.fermentum* مناطق تثبيط عالية بعد مدة (24) ساعة من الحضن.كما تضمنت هذه الدراسة قياس الفاعلية التثبيطية للبكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا *L.acidophilus* ضد بكتريا الأختبار على الاغار المغذي بطريقة الحفر إذ بينت النتائج ثباتية البكتريوسينات المنتجة تجاه قيم الرقم الهيدروجيني الحامضية أذ احتفظت بفاعليتها عند القيم (4-6) ولمدة 24 ساعة وقد كانت أعلى ثباتية عند الرقم الهيدروجيني 4، الا أنها فقدت الكثير من الفاعلية عند قيم الرقم الهيدروجيني الحامضية (أقل من 2) والقاعدية (أكثر من 8). أما عند معاملة البكتريوسينات في الأملاح مثل كلوريد الصوديوم فقد أظهر تأثيراً قليلاً في الفاعلية التثبيطية وبتراكيز 1 و 2% أما ملح كبريتات المغنيسيوم وملح كلوريد البوتاسيوم فقد أظهرا خفضاً للفاعلية التثبيطية في التراكيز الواطئة الا أن التراكيز الأعلى للأملاح قد سببت خفضاً كبيرا وتسبب التركيز 5 % بفقدان الفاعلية التثبيطية للبكتريوسينات بصورة كلية.

الكلمات المفتاحية:التهاب اللوزتين، الفعالية التثبيطية، *S.pyogenes*، *L.acidophilus*.

المقدمة:

يعد إلتهاب اللوزتين من أكثر ا أمراض الأنف والأذن والحنجرة شيوعاً في أعمار الأطفال المختلفة مابين (5-12) سنة والذي يعتمد في علاجه بصورة رئيسة على تناول المضادات الحياتية أو بإستئصال اللوزتين [4,3,2,1] ويظهر المرض بحالتيه الحادة Acute التي تحدث عند الإصابة الأولية بالبكتريا الممرضة والحالة المزمنة Chronic أو المتكررة التي تحدث عند فشل المعالجة وتكرار الإصابات الحادة لأكثر من ست مرات بالسنة [7,6,5]. وتعد بكتريا ***Streptococcus pyogenes*** أحد المسببات الشائعة لأحداثه في الانسان وهي المسوؤلة عن مالايقل عن 616 مليون حالة من إصابات إلتهاب اللوزتين والبلعوم في السنة الواحدة في العالم و111 مليون حالة من الإلتهابات في الاطفال في الدول النامية فضلا عن تسببها في العديد من الامراض ومنها التهاب النسيج الخلوي والاصابات الجلدية و متلازمة الصدمة السمية [9,8].

المعززات الحياتية Probiotic عرفت على أنها متممات غذائية جرثومية حية تعود بالفائدة على الإنسان المضيف والتي أستعملت علاجاً حيوياً للعديد من الأمراض بعدما لوحظ تدني الفاعلية العلاجية لعدد كبير من المضادات الحياتية Antibiotics و حصول مقاومة الجراثيم لها [10] ومنها بكتريا حامض اللاكتيك التي تعد أكثر الأنواع شيوعاً في المجالات العلاجية و الغذائية لأمتلاكها العديد من الصفات التي تميزها كنموها بوجود أو عدم وجود الهواء وعدم إنتاجها للسموم ومقاومتها للرقم الهيدروجيني المنخفض فضلأعن كونها من الاحياء

غير الممرضة [11] .كما تستعمل هذه الأحياء لحفظ الأغذية لقابليتها على تثبيط نمو الأحياء المجهرية الأخرى[12]، فقد أشار [13] إلى إنَّ بكتريوسين الريوترين Reuterin الذي تنتجه بكتريا *L .reuteri* يمتلك تأثيراً تثبيطياً تجاه البكتريا السالبة لصبغة غرام مثل *Salmonella* و *Shigella* والبكتريا الموجبة لصبغة غرام مثل *Clostridia* و *Listeria*. وتعد الأحياء المجهرية العلاجية من الدفاعات المهمة ضد الكثير من المسببات المرضية المستعمرة للكثير من أجزاء الجسم وكذلك الأغشية المخاطية في تجويف الفم[14]. تعد بكتريا حامض اللاكتيك ولاسيمًا مجموعة *Lactobacillus* من المجاميع المهمة التي تستعمل في صناعة الأغذية المخمرة بسبب فوائدها الصحية وقابليتها على تثبيط نمو البكتريا المرضية لإنتاجها الكثير من المواد التضادية مثل الحوامض العضوية وبيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسينات[15]. ولذا فقد هدفت الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص بكتريا المسبحيات من الأطفال المصابين بإلتهاب اللوزتين ودراسة التأثيرات المضادة لبكتريا حامض اللاكتيك ضد هذه العزلات البكترية الممرضة قيد الدراسة.

المواد وطرائق العمل:

مصدر العزلات البكترية

- تم عزل 25 عزلة بكترية من اطفال مصابين بإلتهاب اللوزتين شخصت على انها بكتريا *S.pyogenes* بالإعتماد على الفحوصات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيموحياتية الواردة في [19,18,17,16].وتم بعد ذلك تأكيد التشخيص بأستعمال نظام Remel Rapid STR system والذي هو عبارة عن فحص يتضمن 14 إختبار كيموحياتي ومن خلال النتائج التي يظهرها يمكن عن طريقه تشخيص معظم الأحياء المجهرية الشائع وجودها مثل أنواع المسبحيات والبكتريا العائدة لجنس المعويات.

- تم الحصول على عزلتين لبكتريا حامض اللبن من الفم واللتين شخصتا على انهما بكتريا *L.acidophilus* و بكتريا *L.fermentum* بالإعتماد على الفحوصات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيموحياتية الواردة في [23,22,21,20].

إختبارالفاعلية التثبيطية لبكتريا *L.acidophilus* وبكتريا *L.fermentum* ضد بكتريا *S.pyogenes* خارج الجسم الحي

1/ بطريقة أقراص الأكار:

أتبعت الطريقة المذكورة من لدن [24] وكالآتي : زرعت العزلة البكتيرية *L.acidophilus* المُنماة مسبقاً في وسط مرق MRS وبعمر 24 ساعة و بتركيز 1×10^8 خلية /مل بطريقة التخطيط المتعامد على وسط MRS الصلب وحُضنت الأطباق بظروف لاهوائية عند درجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة ، ثم عُملت أقراص بقطر5 ملم من هذا الوسط بوساطة ثاقب الفلين المعقم مع اقراص سيطرة عملت من وسط MRS الصلب الخالي من أي نمو بكتيري (ثلاثة مكررات لكل قرص) ووضعت على سطح الأكار المغذي المنشور عليه عالق العزلة البكتيرية *S.pyogenes* الممرضة والمعزولة في هذه الدراسة والتي كانت مقاومة لأكبر عدد من المضادت الحياتية بعد مقارنة نموها بأنبوبة ماكفرلاند (0.5)، ثم حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 37مْ لمدة 24ساعة، بعدها قيست اقطار مناطق التثبيط وسجلت النتائج.

2/ بطريقة الانتشار في الحفر:

- تقدير الفاعلية التثبيطية لراشح بكتريا *L. acidophillus* وبكتريا *L.fermentum* ضد بكتريا *S.pyogenes*:

أستعملت طريقة الانتشار في الحفر (Well diffusion method) للكشف عن الفاعلية التثبيطية لراشح بكتيريا*L.acidophilus* الذي حُضّر بتنمية عزلات بكتريا *L. acidophilus* بتركيز 1×10^8 خلية / مل في أنابيب إختبار حاوية على وسط مرق MRS ذي رقم هيدروجيني (5.5) ، ثم حُضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة تحت ظروف لا هوائية . بعدها نُبذت مركزياً بسرعة 4000 دورة /دقيقة لمدة 10دقائق للحصول على السائل الخالي من البكتريا والذي رُشح بوساطة مرشحات دقيقة بقطر 0.22 مايكروميترومن ثم اضيف 50 مايكروليتر منه الى الحفر في وسط الأكار المغذي الذي تم مسبقا نشر عالق العزلة البكتيرية *S.pyogenes* عليه بتركيز 1×10^8 خلية/مل، وقد أستعمل ثاقب الفلين المعقم لعمل هذه الحُفر بقطر5 مليمترات على سطح الوسط بواقع 4 حفر في كل طبق ، حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة و بعد مدة الحضن قيست مناطق التثبيط حول الحفر وسجلت النتائج وقُورنت بمعاملة السيطرة الحاوية على وسط مرق MRS دون ايّ لقاح بكتيري [25].

- تقدير الفاعلية التثبيطية لعالق بكتريا *L.acidophilus* وبكتريا *L.fermentum* ضد بكتريا *S.pyogenes*:

كما أستعملت طريقة الانتشار في الحفر (Well diffusion method) للكشف عن الفاعلية التثبيطية لعالق بكتيريا*L.acidophilus* الذي حُضّر بتنمية عزلات بكتريا *Lactobacillus* بتركيز1×10^8 خلية/مل في أنابيب إختبار حاوية على وسط مرق MRS ذي رقم هيدروجيني (5.5) ، ثم حُضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة تحت ظروف لاهوائية .وفي اثناء ذلك تم نشر عالق العزلة البكتيرية *S.pyogenes* الممرضة بتركيز 1×10^8 خلية/مل على وسط الأكار المغذي

وبأستعمال ثاقب الفلين المعقم عملت ثقوب قطرها 5مليمترات على سطح الوسط بواقع 4 حفر في كل طبق ، ثم ملئت كل حفرة بـ 50 مايكروليتر من عالق المزرعة السائلة لعزلات بكتريا *L.acidophilus* ، حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، بعدها قيست اقطار مناطق التثبيط حول الحفر وسُجلت النتائج وقُورنت بمعاملة السيطرة الحاوية على وسط مرق MRS دون اي لقاح بكتيري [25].

- ثباتية البكتريوسينات لراشح بكتريا *L. acidophillus* تجاه الرقم الهيدروجيني

تمت تنمية بكتريا *L.acidophilus* في وسط MRS السائل ثم طردت مركزيا (6000 دورة/دقيقة) لمدة 15 دقيقة للحصول على راشح البكتريا ثم ضبط الرقم الهيدروجيني لهذا الراشح عند القيم (1-10) ، وتم تعقيم الراشح بمرشحات دقيقة بقطر 0.22 مايكروميتر. تم قياس فاعلية البكتريوسينات المنتجة من قبل البكتريا في الراشح بطريقة الأنتشار بالحفر بعد ما نشر عالق البكتريا المرضية على وسط الأغار المغذي وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعدها قيست اقطار مناطق التثبيط حول الحفر وسجلت النتائج وقورنت بمعاملة السيطرة الحاوية راشح البكتريا برقم هيدروجيني 4 [26].

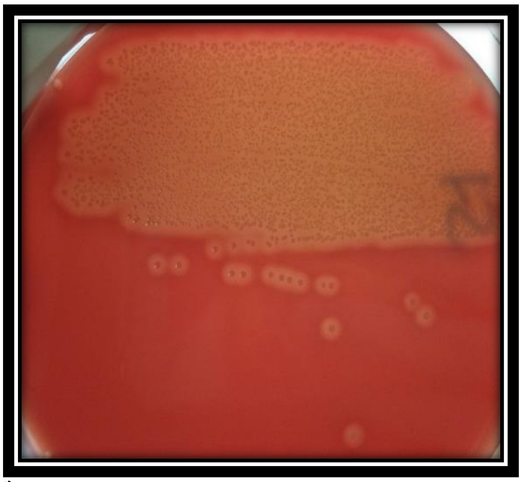
- حساسية البكتريوسينات لراشح بكتريا *L. acidophillus* تجاه بعض الاملاح

تم تحضير عدد من المحاليل الملحية وهي Nacl و Kcl و$MgSo_4$ وبتراكيز(5,4,3,2,1)% وعقمت بالمؤصدة عند درجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند/أنج^2 لمدة 15 دقيقة ، تمت تنمية بكتريا *L.acidophilus* في وسط MRS السائل ثم طردت مركزيا (6000 دورة/دقيقة) لمدة 15 دقيقة للحصول على راشح البكتريا بعدها عومل 1 مل من البكتريوسين المنتج من قبل البكتريا مع1 مل من المحاليل الملحية المذكورة وحضن المزيج عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 3 ساعات ثم أختبرت فاعلية البكتريوسين المتبقية وذلك بأستعمال طريقة الأنتشار بالحفر وبأستعمال 100 مايكروليتر من البكتريوسين المعامل في وسط الأغار المغذي المنشور عليه عالق البكتريا الممرضة وحضنت عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعدها قيست اقطار مناطق التثبيط حول الحفر وسجلت النتائج وقورنت بمعاملة السيطرة الحاوية على راشح البكتريا من دون اي من المحاليل الملحية المذكورة [27] .

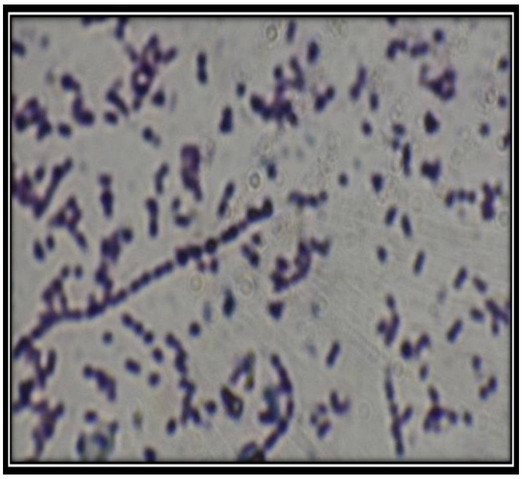
النتائج والمناقشة:

تشخيص العزلات البكترية الممرضة:

شّخصت العزلات البكترية النامية إعتماداً على الخواص الزرعية المختلفة والشكل المظهري للخلايا النامية والمصبوغة بصبغة غرام إعتمادا على أنظمة التشخيص المعتمدة ، إذ أتصفت مستعمرات بكتريا المسبحيات النامية بكونها صغيرة الحجم و دائرية و بيضاء اللون الى شفافة و ملساء و محاطة بمناطق تحلل من نوع بيتا عند تنميتها على وسط أغار الدم الصلب وقد ظهر النمو البكتري لها خلال (24-48) ساعة عند درجة حرارة 37 مْ مع وجود نحو 5% ثاني أوكسيد الكاربون وعند عمل شرائح مجهرية للمستعمرات النامية لملاحظة شكل الخلايا البكترية النامية وتجمعها وتقبلها لصبغة غرام بينت النتائج إن الخلايا البكترية ظهرت كروية الشكل بهيئة سلاسل مسبحية موجبة لصبغة غرام[19,16]. وكما موضح في الشكل (1)و شكل (2).



شكل(1): بكتريا *Streptococcus pyogenes* النامية على وسط أغار الدم الصلب



شكل (2): يوضح بكتريا *Streptococcus* تحت المجهر مصبغة بصبغة غرام بقوة تكبير (1000x)

كما شخصت البكتريا المعزولة بالإعتماد على نتائج الإختبارات الكيموحياتية والموضحة في جدول (1) وقد بينت الإختبارات الكيموحياتية التي أجريت على العزلات البكترية عائديتها الى *Streptococcus Pyogenes* لكونها سالبة لإختبار أنتاج أنزيم الكاتليز و أنتاج أنزيم الأوكسديز ، وكانت غير قادرة

على إنتاج أنزيم اليوريز وغير قادرة على الحركة و مخمرة لسكر التريهالوز وسالبة لإختبار الاوبتوكين و موجبة لأختبار تحلل الدم وموجبة لأختبار الباستراسين.

جدول (1) يوضح نتائج الإختبارات الكيموحياتية المستعملة في تشخيص البكتريا المسببة لإلتهاب اللوزتين.

الإختبار	*Streptococcus pyogenes*
فحص اليوريز	-
القدرة على الحركة	-
الباستراسين	+
الاوبتوكين	-
الكاتليز	-
الأوكسيديز	-
تخمر سكر تريهالوز	+

وعند إجراء الفحص بنظام Remel Rapid STR بوصفها خطوة تكميلية لتأكيد تشخيص الإختبارات الكيموحياتية للعزلات البكترية المشخصة على أنها *S.pyogenes* جاءت النتائج متوافقة مع التشخيص الأولي لتأكيد تشخيصها على أنها تعود الى بكتريا *Streptococcus pyogenes* كما في جدول (2).

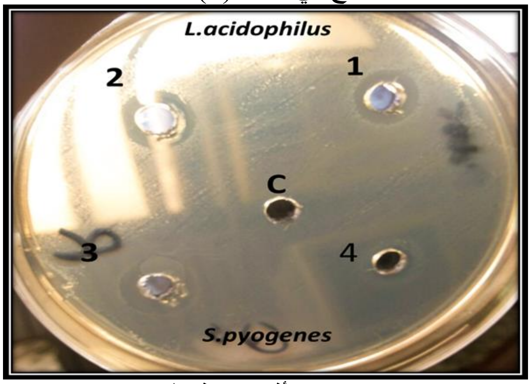
جدول (2) نتائج الإختبارات التشخيصية لنظام Remel Rapid STR Kit المستعمل في تشخيص عزلات بكتريا *S.pyogenes* قيد الدراسة والمعزولة من إلتهاب اللوزتين.

Test	Principle	*S.pyogenes*
L-Arginine	Arginine hydrolysis	+
Esculin	Esculin hydrolysis	-
Mannitol	Mannitol utilization	-
Sorbitol	Sorbitol utilization	-
Raffinose	Raffinose utilization	-
Inulin	Inulin utilization	-
P-nitrophenyl-α,D-galactoside	P-nitrophenyl hydrolysis	-
P-nitrophenly-α,D-glucoside		+
P-nitrophenyl-n-acetyl-β,D-glucosaminide		-
P-nitrophenyl phosphate		+
Tyrosine-β-naphthylamide	Arylamide hydrolysis	+
Hydroxyproline β-naphthylamide		-
Lysine β-naphthylamide		+
Pyrrolidine β-naphthylamide		+

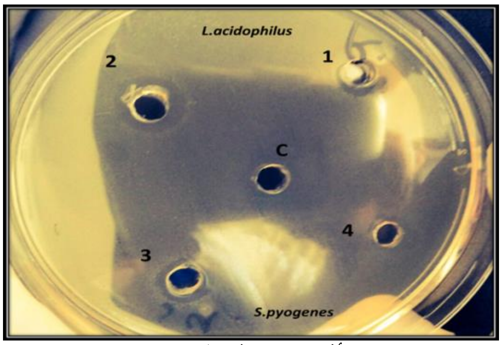
*(+) = نتيجة موجبة
*(-) = نتيجة سالبة

دراسة الفاعلية التثبيطية لبكتريا *L.acidophilus* و بكتريا *L.fermentum* ضد المسببات المرضية البكترية المعزولة

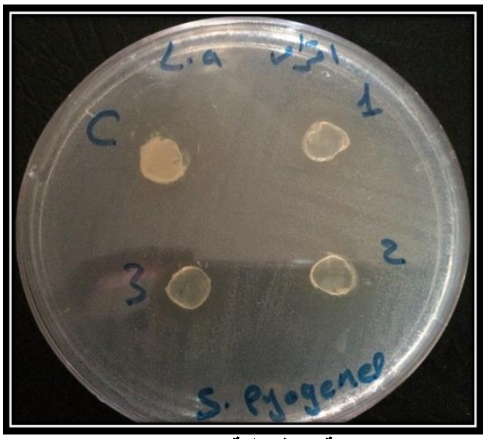
استعملت عزلتي *L.acidophilus* و *L.fermentum* التي تم الحصول عليهما من الفم لإختبار فعاليتهما التثبيطية ضد نمو عزلة بكتريا *S.pyogenes* الممرضة التي أظهرت أعلى مقاومة للمضادات الحياتية والتي تم الحصول عليها في هذه الدراسة على وسط الأغار المغذي الصلب بعد مدة حضن (24-48) ساعة . وقد أظهرت النتائج بأن عالق العزلة *L.acidophilus* امتلك اعلى فاعلية تثبيطية ضد بكتريا *S.pyogenes* إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 7.25 ملم ، بينما بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 6.25 ملم على وسط الأغار المغذي الصلب بوصفه فاعلية تثبيطية لراشح بكتريا *L.acidophilus* ضد بكتريا *S.pyogenes* عند أستعمال طريقة الحفر كما موضح في الشكلين (3 و4)، أما طريقة الأقراص فأعطت نتائجها منطقة تثبيط أعلى من العالق والراشح حيث بلغ معدل أقطار منطقة التثبيط 11.3 ملم على وسط الأغار المغذي الصلب، كما موضح في شكل (5).



شكل (3): يوضح التأثير التثبيطي لعالق بكتريا *L.acidophilus* ضد بكتريا *S.pyogenes* بعد مدة حضن (48) ساعة عند درجة حرارة (37)°م .
***3,2,1 = مكررات عزلة بكتريا L.acidophilus ، C = سيطرة**

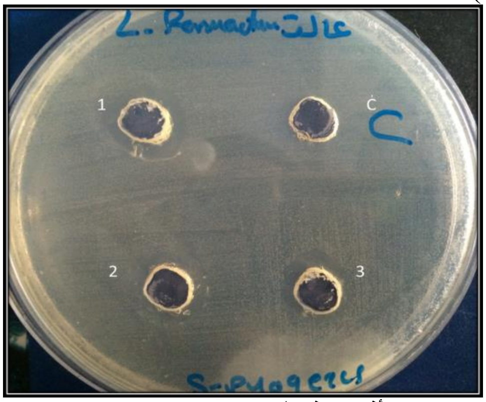


شكل(4): التأثير التثبيطي لراشح بكتريا *L.acidophilus* ضد بكتريا *S.pyogenes* بعد مدة حضن (48) ساعة عند درجة حرارة (37)°م .
***3,2,1 = مكررات عزلة بكتريا L.acidophilus ، C = سيطرة**



شكل (5) :الفاعلية التثبيطية لبكتريا *L.acidophilus* في الوسط الصلب ضد نمو بكتريا *S.pyogenes* بعد مدة حضن 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م. 3,2,1 = مكررات عزلة بكتريا *L.acidophilus* C = سيطرة

أما بالنسبة لعزلة بكتريا *L.fermentum* فقد أظهرت النتائج ان لعالقها فعلاً تثبيطياً ضد عزلة بكتريا *S.pyogenes* بحيث بلغ قطر منطقة التثبيط 10 ملم مقارنة بأقراص وراشح العزلة البكترية *L.fermentum* الذين لم يظهرا اي فعل تثبيطي ضد عزلة بكتريا *S.pyogenes* وكما موضح في الشكل (6) .



شكل (6): التأثير التثبيطي لعالق بكتريا *L.fermentum* ضد بكتريا *S.pyogenes* بعد مدة حضن (24) ساعة عند درجة حرارة (37)م .

*** 3,2,1 = مكررات بكتريا *L.fermentum* ، C = سيطرة**

تأثير الرقم الهيدروجيني في الفاعلية التثبيطية لبكتريوسينات راشح بكتريا *L. acidophillus*

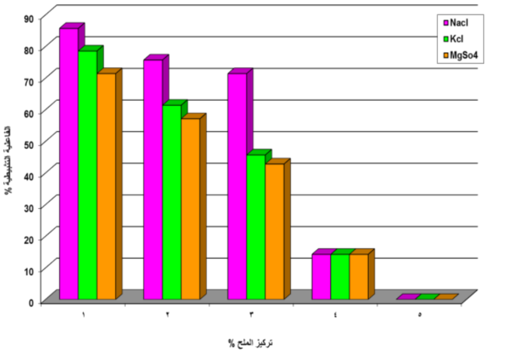
كما تضمن هذه الدراسة أيضاً تأثير قيم الرقم الهيدروجيني التي تراوحت مابين(1-10) في الفاعلية التثبيطية للبكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا حامض اللاكتيك تجاه عزلات بكتريا *S.pyogenes* عند درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة كما موضح في الجدول (3) ويلاحظ من خلال النتائج إن ثباتية بكتريوسينات راشح بكتريا *L. acidophillus* بفاعليتها التثبيطية عند قيم الرقم الهيدروجيني الحامضية (4-6) إذ سجلت أعلى قيمة تثبيطية عند الرقم الهيدروجيني 4، الا أنها فقدت الكثير من الفاعلية التثبيطية عند قيم الرقم الهيدروجيني الحامضية الأقل من ذلك وتراوحت بين(1-2) والأعلى من ذلك القاعدية وتراوحت بين (7-10) حيث يدل ذلك على إن الفعل التثبيطي للبكتريوسين يكون مرتبطاً بمجموعة الكاربوكسيل الموجودة في جزيئة البكتريوسين والتي يزداد تأينها عند الرقم الهيدروجيني المرتفع[28].

جدول (3) يوضح ثباتية البكتريوسينات لراشح بكتريا *L. acidophillus* تجاه التغير بالرقم الهيدروجيني لمدة (42) ساعة من خلال قياس النسبة المئوية للفاعلية التثبيطية لنمو البكتريا الممرضة قيد الدراسة.

	النسبة المئوية للفاعلية التثبيطية للبكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا *L.acidophilus* تجاه التغاير في قيم الرقم الهيدروجيني- PH									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
24 ساعة	-	-	30	100	60	50	-	-	-	-

تأثير الأملاح في فاعلية البكتريوسينات لراشح بكتريا *L. acidophillus*

يوضح الشكل رقم (7) تأثير كل من أملاح Nacl وKcl و$MgSo_4$ وبتراكيز 1-5 % في فاعلية البكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا *L.acidophilus* وذلك من خلال قياس منطقة التثبيط للبكتريا الممرضة *S.pyogenes* . إن أملاح Nacl وKcl كان لها تأثيراً قليلاً في فاعلية البكتريوسينات خصوصاً في التراكيز الواطئة. أما ملح $MgSo_4$ فقد كان له تأثيراً كبيراً في خفض فاعلية البكتريوسينات المنتجة حتى في التراكيز الواطئة. عموماً فأن الأملاح المستعملة وبتراكيز 1و2 % Kcl كان لها تأثيراً أقل في خفض الفاعلية التثبيطية ولكن التراكيز الأعلى قد سببت خفضاً كبيراً في الفاعلية التثبيطية ، مما سببت في فقدان كبير في فاعلية البكتريوسينات بصورة كلية أما الملح المستعمل وبتركيز 1و2 و3 % Nacl فكان له تأثير أقل في خفض الفاعلية التثبيطية ولكن التراكيز الأعلى سببت فقدان فاعلية البكتريوسينات . بينما الملح المستعمل بتراكيز 1و2 و3 % $MgSo_4$ كان له تأثيراً أقل في خفض الفاعلية التثبيطية ولكن تركيز4 % و 5% $MgSo_4$ تسببت في فقدان كبير للفاعلية التثبيطية للبكتريوسينات المنتجة. الشكل (6) يوضح تأثير الأملاح في الفاعلية التثبيطية للبكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا *L.acidophilus* ضد نمو بكتريا *S.pyogenes* .



شكل (7) : يوضح تأثير الاملاح في الفاعلية التثبيطية للبكتريوسينات المنتجة من قبل *L.acidophilus* من خلال قياس النسبة المئوية لفاعلية البكتريوسينات ضد نمو بكتريا *S.pyogenes*

هدفت الدراسة الى معرفة تأثير بكتريا حامض اللبن المعزولة من الفم في بكتريا *S.pyogenes*، إذ اظهرت النتائج بأن عالق بكتريا *L.acidophilus* سجل أعلى فاعلية تثبيطية ضد بكتريا *S.pyogenes* بمعدل اقطار منطقة التثبيط إذ بلغت 7.25 ملم، بينما أظهر راشح بكتريا *L.acidophilus* فاعلية تثبيطية أقل بمعدل اقطار منطقة التثبيط بلغت 6.25 ملم. أما طريقة الأقراص فقد أعطت نتائجها منطقة تثبيط أعلى من العالق والراشح إذ بلغ معدل أقطار منطقة التثبيط 11.3 ملم على وسط الأغار المغذي الصلب. أثبت [29] في دراسته بأن بكتريا *Lactobacilli* لها القدرة على إعاقة أصابة الخلايا البلعومية بالمسبحيات مجموعة A إذ إن بكتريا المسبحيات لها القدرة على تلف خلايا المضيف ومن ثم موت الخلايا ممايسهل دخولها وأنتشارها مابين الانسجة بصورة عميقة [31,30]. إذ أن سلالات بكتريا *Lactobaillus* تقلل من سمية الخلايا البكترية خلال الإصابة والتصاقها في الخلايا الظهارية ممايؤدي الى تثبيط نمو البكتريا. أشار [32]الى أنه لاتوجد علاقة مابين عدد مستعمرات بكتريا *S.pyogenes* عند نموها لوحدها وعند خلطها مع بكتريا *Lactobacillus* ولكنه لاحظ أن زيادة تركيز بكتريا *Lactobacillus* يثبط نمو بكتريا *S.pyogenes* .

أما عزلة بكتريا *L.fermentum* فقد أعطى عالقها فاعلية تثبيطية ضد بكتريا *S.pyogenes* بمعدل أقطار منطقة التثبيط بلغ 10 ملم بينما لم يعط راشحها اي منطقة تثبيط وكذلك بالنسبة لأستعمال طريقة الاقراص في الوسط الصلب التي لم تعط اي منطقة تثبيط وهذالا يتفق مع ماجاء به [33] الذي أثبت في دراسته لتأثير بكتريا حامض اللاكتيك في بكتريا *S.pyogenes* ان بكتريا *L.fermentum* اعطت تأثيراً تثبيطياً بمعدل أقطار منطقة التثبيط بلغ (10-15) ملم بطريقة الاقراص في الوسط الصلب فيما لم تعط بكتريا *L.gasseri* أي تأثير تثبيطي يذكر في البكتريا، ان السبب في ذلك غير واضح ولكن بالامكان ان يعزى الى تاثر صفة انتاج المواد المثبطة والتي هي خاصة بالعزلة نفسها [34] والذي يتفق أيضاً مع ماوجده [35] في أن هناك تبايناً في مدى تأثير عزلات بكتريا حامض اللاكتيك في الاحياء المجهرية الأخرى. كما ان لبكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من الأطعمة المتخمرة تأثيراً في نمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام [36]. كما ذكرت بعض المصادر ان لمختلف أنواع بكتريا حامض اللاكتيك صفة التأثير التثبيطي ضد العديد من الاحياء المجهرية إذ تقوم بتثبيط نموها من خلال القدرة على أنتاج الحوامض والتنافس على المغذيات فضلاً عن أنتاج المواد المثبطة كالمضادات الحياتية والمواد السمية.وأتفقت النتائج أيضاً مع ماجاء به [37] بأن استعمال طريقة وسط أكار MRS الصلب لدراسة قابلية عزلات عصيات حامض اللاكتيك على إنتاج مواد مثبطة لنمو عزلات الاختبار، تعد من الطرائق الجيدة التي تعطي نتائج واضحة ،وملموسة من ناحية الفعل التثبيطي لعزلات بكتيريا *Lactobacillus* ضد بعض العزلات الممرضة.

أظهرت النتائج أيضاً إن لبكتريوسينات راشح بكتريا *L. acidophillus* مقاومة عالية تجاه قيم الرقم الهيدروجيني الحامضية، إذ أحتفظت بفاعليتها التثبيطية عند القيم (4-6) و كانت أعلى ثباتية للبكتريوسينات عند الرقم الهيدروجيني 4. لقد أثبت [38] في دراسته أن معدل PH الملائم لنمو بكتريا *Lactobacillus* هو (6.0-6.5) الا أنها فقدت الكثير من الفاعلية التثبيطية عند قيم الرقم الهيدروجيني الحامضية (1-2) والقاعدية (7-10) وهذا يتفق مع ماجاء به [39] إذ إن ذلك يدل على إن الفعل التثبيطي للبكتريوسين يكون مرتبطاً بمجموعة الكاربوكسيل الموجودة في جزيئة البكتريوسين والتي يزداد تأينها عند الرقم الهيدروجيني المرتفع وكذلك يتفق مع مأشار اليه [40] حول آلية عمل البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا *L.acidophilus* في تثبيط الأحياء المجهرية، في كون الفعل التثبيطي له مرتبط بمجموعة الكاربوكسيل والتي تعد جزءاً من تركيب جزيئة البكتريوسين ولها القابلية على التأين عند أرتفاع قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط الذي توجد فيه. فقد ذكر [41] أن التأثير التثبيطي لبكتريا حامض اللاكتيك يعزى الى ثلاثة عوامل رئيسة هي الرقم الهيدروجيني ودرجة تفكك الحامض والتأثير السمي للحامض نفسه.

أظهرت النتائج أيضا إن أملاح Nacl وKcl كان لها تأثيراً قليلاً في فاعلية البكتريوسينات لراشح بكتريا *L. acidophillus* خصوصاً عند التراكيز الواطئة. أما ملح $MgSo_4$ فقد كان له تأثيراً كبيراً في خفض فاعلية البكتريوسينات المنتجة حتى في التراكيز الواطئة. وعلى نحو عام فأن الأملاح المستعملة وبتراكيز 1و2 % Kcl كان لها تأثيراً أقل

في خفض الفاعلية التثبيطية ولكن التراكيز الأعلى قد سببت خفضاً كبيراً في الفاعلية التثبيطية ، مما سبب فقدان كبير في فاعلية البكتريوسينات بصورة كلية أما الملح المستعمل وبتركيز 1و2 و3 % Nacl وكان له تأثير أقل في خفض الفاعلية التثبيطية ولكن التراكيز الأعلى سببت فقدان فاعلية البكتريوسينات . بينما الملح المستعمل بتراكيز 1و2 و3 % $MgSo_4$ كان له تأثيراً أقل في خفض الفاعلية التثبيطية ولكن تركيز4 % و 5% $MgSo_4$ تسبب في فقدان كبير للفاعلية التثبيطية للبكتريوسينات المنتجة وهذا يتفق مع ماجاء به [36]. إتفقت النتائج أيضاً مع ماأشار اليه[42] من أن البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا *L.acidophilus* له فاعلية أفضل في تركيز 1 % من Nacl إلا أنها قلت بزيادة التركيز. ويرجع السبب في تأثر فاعلية البكتريوسينات بالأملاح الى إمتلاك هذه المواد الحيوية لبعض الصفات وهي بوصفها ايونات موجبة الشحنة (Cationic) وغير محبة للماء (hydrophobic)لذلك فإن معظم البكتريوسينات ذات الجزيئات الصغيرة تكون فعالة في مدى واسع من الاس الهيدروجيني(3-9). إن التفاعل بين الجزء غير المحب للماء في البكتريوسين مع غشاء خلايا بكتريا الاختبار يولد قنوات أيونية غير متخصصة وإن عملية تكوين هذه القنوات تقل عند وجود الايونات الموجبة ثنائية التكافؤ مثل Ca^{+2} أو Mg^{+2} وذلك لمعادلة الشحنات السالبة في فوسفولبيدات غشاء الخلايا واختزال نفاذية الغشاء الخلوي، أي أن وجود الأملاح بتراكيز معينة يمكن ان يعيق عمل البكتريوسينات بتفاعلها أو تداخلها مع المجاميع الأيونية لجزيئات البروتين وبهذا تقلل من التداخلات التي قد تحصل بين جزيئات البروتين نفسها ممايقلل من الفعاليات الحيوية لهذه المواد [43].

المصادر:

[1] Brodsky, L. and Poje, C. 2001. Tonsillitis, Tonsillectomy, and Adenodectomy, in Head and Neck Surgery-Otolaryngology. Bailey BJ editor. Philadeelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Pp.979 -991.

[2] Brook, I. and Gober, A. 2006. Increased recovery of *Moraxella catarrhalis* and *Hemophilus influenza* in association with group A haemolytic streptococci in healthy children and those with pharyngotonsillitis. Journal of Medical Microbiology, 55: 989-992.

[3] Robb, P.J. and Little, P. 2007. Recurrent pharyngotonsillitis. BMJ., 334: 909.

[4] Omer, N. D.; Havva, D. I.; Hrisi, B.; Gunay, C.; Mehmet, K. and Gokhan, A. 2014. Bacteriological evaluation of tonsillar microbial flora according to age and tonsillar size in recurrent tonsillitis. Eur Arch otohinolaryngol. 271:1661-1665.

[5] Milford, C.; Infirmary, R.; Oxford, S. and Anuku, S. 2003. Tonsillectomy and Adenotoctomy, British Association of Otorhingologists Head & Neck Surgeons.

[6] Bisno, A. L., Gerber, M. A. Gwaltney J. M,. Kaplan E. L,and Schwartz .R. H. 2002. Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis:practice guidelines for streptococcal pharyngitis. Clin. Infect. Dis. 35:113–125.

[7] Ciftci, E.; Dogru, U.and Guriz H.2003. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from throat cultures of children with tonsillopharyngitis. J Ankara MedSch.,25:15-20.

[8] Bauman, R. W.; Machunis-Masuoka ,E. and Tizard ,I. 2007.Micro-biology with Diseases by Taxonomy. Pearson Education, San Francisco, USA.

[9] Carapetis, J. R.; Steer, A. C.; Mulholland, E.K. and Weber, M. 2005.The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet Infect Dis.5:685-94.

[10] Roberfroid, M. B. 2000. Prebiotics and Probiotics:are they functional foods?. Am. Clin. Nutr., 71 (suppl.6): 1682S-1690S.

[11] Roberfroid, M.B.1998. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properities. Br J Nutr., 80: S197-S220.

[12]Thomas, L.V.; Wimpenny, J. W. T. and Baker, G. C. 1997. Spatial interaction between subsurface bacterial colonies in a model system: aterritory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin producing lactic acid

[22] Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 1987. Microbiology: A laboratory manual. The Benjamin cummings publishing company. inc .ISBN,0-8053-7646-1.

[23] Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. In:Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S. and Hold, J.G. ed vol.2 William and Wilkins co., Baltimore. M. D. USA.

[24] Paluszak, Z.; Kaszewska, J. E. and Szala, B. 2007. Inhibitory effect of lactic acid bacteria of genus *lactobacillus* on the survival of *proteus* and *Shigella* Rods in Mixed Culture. Bull. Vet. Inst .Pulawy., 50: 335-340 .

[25] Lin, C. K.; Tsai, H. C.; Lin, P. P.; Tsen, H. Y. and Tsai, C. C. 2008. *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. Anaerobe, 14:251-255.

[26] Larsen, A.G.; Vogensen, F.K. and Josephen, J. 1993. Antimacrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: Purification and characterization of bavaricin A, abacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. J. Appl. Bacteriol., 75(2):113-122.

[27] Karaoghlu, S. A.; Aydin, F.; Kilic, S. S. and Kilic, A. O. 2003. Antimicrobial activity and characteristic of bacteriocins produced by Vaginal lactobacilli. Tark.J.Med.Sci.33:7-13.

[28]Jack, R. W.; Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocin of gram- positive bacteria. Microbiology Review, 59(2):171-200.

[29] Maudsdotter, L.; Jonsson, H.; Roos, S. and Jonsson, A. B. 2011. Lactobacilli reduce cell cytotoxicity caused by *Streptococcus pyogenes* producing Lactic acid that degrades the toxic component agent and lipoteichoic acid. Antimicrobial agent bacterium. J. microbiology. 143: 2575-2582.

[13]Gibson, G. R.; Saavedra, J. M.; Macfarlane, S. and Macfarlane, G. T. 1997. Probiotics and intestinal infections. In: Probiotics 2: Applications and practical aspects, fuller, R. Ed. chapman and Hall, New york. (cited from Naidu *et al* ., 1999).

[14]Badet, C. and Thebaud, N. B. 2008. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. Open Microbiol. J. ,2:38- 48.

[15]Reid, G.; Beuerman, D.; Heinemann, C. and Bruce, A.W. 2001. Probiotic dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 32: 37–41.

[16] Forbes, B.A.; Saham, S. F. and Weissfeld, A. S. 2007 Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby. Inc . USA.

[17] Morello, J. A. and Mizer, H. E. 2006. Labrotory manual working in microbiology (application to patient care). 8th ed . USA.

[18] Baron, A.; Peterson, L. R. and Finegold, S. M. 1994. Conventiona and rapid microbiological methods for identification of bacteria and fungi. Bailey and Scotts diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby years book. Sant Louis.

[19] Mahon, C. R. and Manuselis, G. J.1995.Textbook of Diagnositic Microbiology. W. B. saunders company. Philadelphia. USA.

[20] Boukhemis, M.; Djeghri-Hocine, B.; Tahar, A. and Amrane, A.2009. Phenotypic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from different biotopes. African Journal of Biotechnology, 8 (19): 5011-5020.

[21] Collee, J. G.; Fraser, A. G., Marmion, B.P. and Simmons, A. 1996. Practical Medical Microbiology. 14th ed. New York. USA.

and Chemotherapy. 55 (4):1622-1628.

[30] Andreadis, S. T.; Hamoen, K. E.; Yarmush, M. L. and Morgan, J. R. 2001. Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system. FASEB J. 15:898-906.

[31] Cywes, B.; Hakansson, C., A; Christianson, J. and Wessels, M. R. 2005. Extracellular group A *Streptococcus* induces keratinocyte apoptosis by dysregulating calcium signalling. Cell Microbiol. 7:945-955.

[32]Westbroek, M. L.; Davis, C. L.; Fawson, L. and Price, T. M. 2010. Interactions of Lactobacilli with pathogenic *Streptococcus pyogenes.* Infection Diseases in obstetrics and Gynecology. vol 2010 (4)USA.

[33] التميمي، نهاية نعمة .2007. تأثير خميرة *Candida albicans* في بكتريا *Streptococcus pyogenes* لإلتهاب اللوزتين واستعمال بعض المستخلصات النباتية في معالجتها. أطروحة دكتوراه . كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. بغداد. العراق.

[34] الدليمي، جيهان عبد الستار سلمان .2000. استخدام الكحول الاثيلي لعزل بكتريا حامض اللاكتيك ودراسة تأثيرها التأزري مع خميرة الخبز ضد بعض أنواع البكتريا. رسالة ماجستير، جامعة بغداد – كلية الزراعة.

[35] الشيخلي، ضمياء محمود ابراهيم .1999. دراسة البكتريوسنيات المنتجة من قبل بكتريا حامض اللاكتيك. رسالة دكتوراه - الجامعة المستنصرية – كلية العلوم.

[36] Nigatu, A. and Gashe, B. A. 1994. Survival and growth of selected Pathogens in fermented kocho (snsete ventricosm). East African Medical J., 71 (1): 514 – 518.

[37]السامرائي، فرح قحطان 2013. دراسة تأثير خميرة *Saccharomyces boulardi* وبكتريا *Lactobacillus acidophilus* على بعض المسببات المرضية البكترية المرافقة لاصابات الجهاز البولي المتكررة لدى عينة من النساء. رسالة ماجستير - كلية العلوم للبنات -جامعة بغداد.

[38] Westbroek, M. L.; Davis, C. L.; Fawson, L. and Price, T. M. 2010. Interactions of Lactobacilli with pathogenic *Streptococcus pyogenes*. Infection Diseases in obstetrics and Gynecology.vol 2010 (4)USA.

[38] احمد، موفق محمود و مجيد، معزز عبد الرضا. 2013. دراسة بعض خواص البكتريوسينات المنتجة من قبل نوعي بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus plantarum* و بكتريا *L.acidophilus* المعزولة محلياً. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية ، 1646-1813 .

[40] Jack, R. W.; Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocin of gram- positive bacteria. Microbiology Review, 59(2):171-200.

[41] Mishra, C. and Lambert, J. 1996. Production of anti- microbial substances by Probiotics. Asia Pacific. J. Clin. Nutr., 5: 20 – 24.

[42] Karaoghlu, S.A.; Aydin, F.; Kilic, S. S. and Kilic, A. O. 2003. Antimicrobial activity and characteristic of bacteriocins produced by Vaginal *lactobacilli*, Tark. J. Med. Sci.33:7-13.

[43] Leer, R. J.; Van der Vossen, J. M. B. M.; Van Giezen, M. and Van Noort, J. M. 1995.Genetic analysis of acidin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiol. 141:1629-1635.

Prevalence of Tonsillitis caused by *Streptococcus spp*. Among children and the effect of some Lactic acid bacterial (LAB) strain on it

Nada Sabah Razouqi ***Rand Thair Abdulateef***

Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad

Received 8/3/ 2015
Accepted 25/5/ 2015

Abstract:

In this study 100 samples were collected from infected children with acute and chronic tonsillitis who attended to Al-Yarmook Teaching Hospital (ENT consultation clinic) from 5/12/2013 to 1/3/2014. The result of laboratory culture was positive in 67 samples. Depending on their cultural, morphological and biochemical characterization of bacterial isolate of them were identified as (37.31%) belonged to *Streptococcus pyogenes* and the diagnosis is confirmed by the use of Remel Rapid STR System, (34.32%) belonged to *S.parasanguinis*, (11.94%) *S.mitis*, (11.94%) *S.oralis* and (4.47%) *S.thoraltensis* .

Results confirmed that cup assay gave highest inhibition zone after 24 hrs compare with well diffusion methods for suspension of *L.acidophilus* gave highest inhibition zone after 48 hrs for incubation, while ahigh inhibition zone revealed for suspension of *L.fermentum* after 24 hrs incubation.

the study included also the measurement of the inhibition activity for bacteriocins produced by *L.acidophilus* bacteria against pathogenic bacteria on nutrient agar by well diffusion method in which results revealed stability of the bacteriocins produced towards PH which kept its activity with PH 4-6 for 24 hrs, and the highest stability was with PH 4, however it lost a lot of its activity with acidic PH less than 2 and alkaline PH as 8. The treatment of bacteriocins with salts such as Nacl it revealed little effect in inhibition zone within 1 & 2% concetrations. The salt $MgSo_4$ & Kcl showed reduction in the inhibitory activity in the low concentration, however the higher concentration of salt caused great reduction and 5% concentration led to loss of inhibitory activity for bacteriocins completely.

Key words: Tonsillitis, inhibition activity, *S. pyogenes*, *L.acidophilus*.