دراسات على التأثير التضادي لبعض أنواع البكتيريا المعزولة من لبن نساء مرضعات ضد بكتيريا *Staphylococcus aureus*

إعداد

المعيدة / عفراء بنت محمد عبد القادر عبدالوهاب بغدادي

بكالوريوس نبات تخصص أحياء دقيقة

بحث مقدم لنيل درجة الماجستير في العلوم

(أحياء نبات / تخصص أحياء دقيقة)

إشراف

د. صالحة حسن مستور الزهراني

أستاذ الأحياء الدقيقة المشارك

دعم البحث من مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

برقم *1*ط – *16-138*

كلية العلوم للبنات

جامعة الملك عبد العزيز

جدة – المملكة العربية السعودية

صفر *1431*هـ – يناير *2010*م

Studies on the antagonistic effect of some bacteria isolated from human milk against Staphylococcus aureus

Thesis
Submitted to biology Department for the Master Degree in Microbiology

By
Afraa bint Mohammed Abdel Qader Abdel Wahab Baghdadi

Supervised by

Dr. Salha Hassan Mastoor Alzahrani
Associate Professor of Microbiology

Supported research from King Abdulaziz City for Science and Technology by grant number / AT - 16-138

Science College-Girles
King Abdul Aziz University.
2010 AD – 1431H

قائمة المحتويات

نموذج إجازة البحث ..... أ

الإهداء ..... ب

الشكر والتقدير ..... ج

شكر وتقدير المدينة ..... د

الملخص ..... ه

قائمة المحتويات ..... ز

قائمة الأشكال ..... ل

قائمة الجداول ..... ن

قائمة الصور ..... ف

الفصل الأول: المقـــــدمة و الدراسات السابقة *1*

1. المقدمة *2*

2. الهدف من الدراسة *4*

3. الدراسات السابقة *5*

3-1- المواد المضادة للبكتيريا في لبن الأم *5*

3-2- مصادر البكتيريا في ألبان الأمهات *6*

3-3- دور البكتيريا النافعة في لبن الأم في تثبيط نمو البكتيريا الممرضة *9*

3-4- البكتريوسينات *12*

3-5- تأثير البكتريوسينات على الخلايا البكتيرية *16*

3-6- بعض العوامل المؤثرة على إنتاج البكتريوسينات معملياً *17*

الفصل الثاني المواد وطرق البحث *22*

1. المواد وطرق البحث *23*

1-1 - البكتيريا الإختبارية *23*

1-2 - عينات الألبان *24*

1-3 - البيئات 24

2.الطرق 27

2-1- عزل البكتريا من عينات الألبان 27

2-2- دراسات على التأثير التثبيطيللبكتيريا المعزولة ضد بكتيريا

Staphylococcus aureus 27

2-2-1 دراسة التأثير التثبيطيلعزلات البكتيريا بطريقة التبقيع على البيئة

الصلبة 28

2 2 2 - تأثير استخدام بيئة CM على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة عزلات البكتيريا المختارة 28
2 2 3 - دراسات على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة عزلات البكتيريا المختارة في بيئة MRS السائلة 29
2 2 4 - تأثير استخدام المزارع المهتزة على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة البكتيريا المختارة 30
2 2 5 - تأثير مدة التحضين على التأثير التثبيطي لنمو*Staphylococcus aureus* بواسطة العزلات المختارة في بيئة MRS السائلة 30
2-3- دراسات على تأثير استخدام أنواع مختلفة من دبس التمر على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* 31
2-3-1- تأثير استخدام أنواع مختلفة من دبس التمر كمصدر للكربون على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* على بيئة MRS الصلبة بواسطة العزلات المختارة 31
2-3-2- تأثير استخدام بيئة دبس التمر على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة العزلات المختارة بطريقة التبقيع 32
2-3-3- تأثير استخدام التركيزات المختلفة من الدبس على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة العزلات المختارة 33
2-3-4- دراسة تأثير إضافة توين-80 ومستخلص الخميرة على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة العزلات المختارة في بيئات الدبس السائلة 33
2-4- دراسة تأثير درجة حرارة الغلي على التأثير التثبيطي لراشح العزلات المختارة ضد *Staphylococcus aureus* 34

الفصل الثالث النتائج *36*
3 - النتائج *37*
3-1- عزل البكتريا من عينات الألبان 37
3-2- دراسات على التأثير التثبيطي للبكتيريا المعزولة ضد بكتيريا *Staphylococcus aureus* 44
3-2-1 دراسة التأثير التثبيطي لعزلات البكتيريا بطريقة التبقيع على البيئة الصلبة 44
3 2 2 - تأثير استخدام بيئة CM على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة عزلات البكتيريا المختارة 58
3 2 3 - دراسات على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة عزلات البكتيريا المختارة في بيئة MRS السائلة 58
3 2 4 - تأثير استخدام المزارع المهتزة و الثابتة على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة البكتيريا المختارة 61
3 2 5 - تأثير مدة التحضين على التأثير التثبيطي لنمو*Staphylococcus aureus* بواسطة العزلات المختارة في بيئة MRS السائلة 67
3 3 - دراسات على تأثير استخدام أنواع مختلفة من دبس التمر لإنتاج المواد

3-3-1- تأثير استخدام أنواع مختلفة من دبس التمر كمصدر للكربون على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* على بيئة MRS الصلبة بواسطة العزلات المختارة 70

2-3-2- تأثير استخدام بيئة دبس التمر على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة العزلات المختارة بطريقة التبقيع 75

2-3-3- تأثير استخدام التركيزات المختلفة من الدبس على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة العزلات المختارة 80

2-3-4- دراسة تأثير إضافة توين-80 ومستخلص الخميرة على التأثير التثبيطي لنمو *Staphylococcus aureus* بواسطة العزلات المختارة في بيئات الدبس السائلة 103

2-4- دراسة تأثير درجة حرارة الغلي على التأثير التثبيطي لراشح العزلات المختارة ضد *Staphylococcus aureus* 106

الفصل الرابع: المناقشة 109

المناقشة..... 110

الإعجاز العلمي في السنة 118

التوصيات.....120

الفصل الخامس: المراجع 121

المراجع العربية 122

المراجع الأجنبية 123

المستخلص

يهدف هذا البحث إلى الحصول على بكتيريا تنتج مواد مثبطة لنمو البكتيريا الممرضة والملوثة للأغذية مثل البكتريوسينات وذلك من مصادر طبيعية تتمثل في ألبان نساء مرضعات من خلال عزل البكتيريا المنتجة للمواد المثبطة لنمو بكتريا *Staphylococcus aureus* ومقارنة نشاطها التضادي بالنشاط التضادي لبعض الأنواع البكتيرية المعزولة من ألبان الأغنام, تم الحصول على 4414 عزلة من ثلاثة وأربعين عينة من ألبان الأمهات و162 عزلة من 14 عينه من ألبان الماعز من منطقة الباحة وذلك في فترات مختلفة من إنتاج الألبان و أظهرت معظم عزلات البكتيريا قدرة على تثبيط نمو البكتيريا الإختبارية *S. aureus* بطريقة التبقيع على البيئة الصلبة وتم اختيار اثنتا عشرة عزلة من بكتيريا حمض اللاكتيك منها سبع عزلات تم الحصول عليها من ألبان الأمهات وخمس عزلات *من ألبان الماعز للدراسات التالية*, وجد أن راشح عزلات البكتيريا المختارة يثبط *نمو S. aureus* بعد استبعاد تأثير بيروكسيد الهيدروجين و الحموضة من الراشح, ووجد أن أعلى تثبيط لنمو *S. aureus* في الوسط السائل بعد 168ساعة من التحضين عند 35°م في بيئة MRS , عند إضافة 2٪ من أحد أنواع الدبس التالية وهي دبس خليط من التمور ودبس تمر رزيز السكري , دبس تمر القصيم والتمر المهروس كمصدر للسكريات في بيئة MRS زاد إنتاج معظم العزلات من المواد المثبطة لنمو البكتيريا الإختبارية وباستخدام البيئة المكونة من 2٪ من الدبس أو التمر المهروس كبيئة وحيدة لإنتاج مواد مثبطة لنمو*S. aureus* البكتيريا الإختبارية بواسطة عزلات البكتيريا المختارة تمكنت جميع العزلات من تثبيط *S. aureus* مقارنة بقدرتها التثبيطية عند تنميتها على بيئة MRS, وكانت أكثر قدرة على تثبيط نمو البكتيريا المختبرة عند إضافة 2٪ من أنواع الدبس والتمر المهروس لنمو البكتيريا المختبرة بواسطة عزلات البكتيريا المختارة وانخفضت القدرة التثبيطية لجميع العزلات عند إضافة توين-80 , مستخلص الخميرة وتوين-80 معا كذلك عند إضافة ببتون وتوين- 80 معا إلى البيئة وكانت قدرة العزلات بتثبيط نمو *S.aureus* عند إضافة هذه المواد مجتمعة إلى بيئات التمر مماثلة لقدرتها التثبيطية عند استخدام بيئة MRS فقط كما وجد أن تثبيط نمو بكتيريا *S. aureus* ينخفض عند التاثير التثبيطي براشح وسط نمو العزلات المختارة ينخفض عند تعريضه لدرجة حرارة الغليان لمدة 3 دقائق مقارنة بالعينة الضابطة.

التوصيات

Recommendations

يقول الله تعالى في كتابه العزيز:(وَالْوَالِدَاتُ يُرْضِعْنَ أَوْلاَدَهُنَّ حَوْلَيْنِ كَامِلَيْنِ لِمَنْ أَرَادَ أَن يُتِمَّ الرَّضَاعَةَ)[البقرة : 233].

ثبت علمياً وطبياً أن الرضاعة الطبيعية ذات أهمية بالغة وفائدة كبيرة لصحة الطفل والأم المرضعة على حد سواء (بدنياً ونفسياً ووقائياً)

1. حث الأمهات على تغذية الرضع بالرضاعة الطبيعية لما يحويه لبن الأم من الخلايا المناعية الحية والأجسام المضادة للجراثيم والسموم كالخلايا اللمفاوية نوع (ب) والحبيبية والبلعمية والجلوبيولين IgA & IgG واللاكتوفيرين والليزوزيم وعامل Bifidus وبعض المكملات Complements وغيرها والتي تكسب جميعها وبشكل متكامل ومتناسق (تعاوني) الطفل مناعة وتجعله مقاوما للعدوى من الأمراض الانتقالية والمعدية خاصة التي تصيب الجهاز التنفسي والهضمي.
2. تجنب الإفراط في استخدام المضادات الحيوية في معالجة الأطفال لتجنب القضاء على بكتيريا حمض اللاكتيك التي يكتسبها الأطفال من الرضاعة الطبيعية.
3. عند الضرورة لاستخدام المضادات الحيوية مراعات تعويض ما يفقده الأطفال من هذه البكتيريا.
4. استخدام بكتيريا حمض اللاكتيك في إنتاج المواد النافعة لحفظ ألبان الأطفال و الأغذية بدلا من المواد الصناعية الخطيرة على الصحة.

Studies on the antagonistic effect of some bacteria isolated from human milk against *Staphylococcus aureus*

Afraa Mohammad Bagdadi

Abstract

This research aims at finding bacteria, Which produce materials, that inhibit growth of disease causing and food poisoning bacteria, such as bacteriocins, from natural resources as nursing women, through isolating bacteria producing materials that inhibit growth of *Staphylococcus aureus* bacteria and comparing their counter activity with counter activity of some of bacteria types isolated from goats' milk, 4.414 types were obtained from 43 samples from women milk and 162 types from goats' milk from Baha Region during different periods of milk production. Most of the isolated bacterial types showed ability to inhibit growth of the tested bacteria, *S. aureus* by the method of patching solid medium. Twelve isolated bacteria were chosen from the lactic acid bacteria, seven from women milk and five from goats' milk from subsequent studies. The filtrate of the selected isolated bacteria was found to inhibit growth of *S. aureus* after removing the effect of hydrogen peroxide and acidity from the filtrate. While the highest antibacterial activity against *S. aureus* in the liquid medium after 168 hours of incubation at 35°C in an MRS medium. When the dextrose in the MRS medim was substituted, with one of the following molasses types: a mixture of dates and sukkari dates molasses, Qassim dates and crush dates with a concentration of 2% as a source of sugars, the production of most of the isolated bacteria of the materials that inhibit growth of the tested bacteria; while use of a medium of 2% of molasses or crushed dates as a single medium for on the antibacterial activity against of *S. aureus* test bacteria (bacteriocins) by the selected isolates bacteria types, all isolated bacteria types were able to inhibit growth of *S. aureus* with quantities comparable with their ability to produce bacteriocins in an MRS medium. The best concentration of molasses types and crushed dates form getting the highest antibacterial activity that inhibit growth of the selected bacteria was 2%. However, antibacterial activity growth of the test bacteria was reduced aftar addition of twin -80 only, with a concentrate of yeast and twin-80 added together and when adding peptone and twain – 80. Moreover, the antibacterial activity of isolated bacteria inhibity growth of *S. aureus* when adding all those materials together to the dates media is equivalent to its production of the inhibiting materials when using the MRS medium alone. It was also found that the antibacterial activity inhibit growth of *S. aureus* in filtrate is reduced when subjected to the boiling point temperature for 3 minutes compared to the control.

Summary

Due to the increasing need for natural and non-harmful materials to counter the growth of bacteria-contaminating food and pathogens for the conservation of foods, including baby milk and food, so the aim of this study is to obtain isolates of bacteria that produce inhibitors of growth of pathogenic bacteria and food contaminants such as bacteriocines (natural materials, and their degradation in the digestive tract are harmless to human and animal health) from natural sources such as milk lactating women as well as dairy goats Therefore experiments have been conducted as follows:

I: isolation of bacteria producing inhibitory substances of the growth of bacteria S. aureus and comparing its antibacterial activity with some bacterial species isolated from dairy goats

II: Studies on the antibacterial activity of bacteria isolated against Staphylococcus aureus bacterium.

Then many methods have been taken :

A) study of antibacterial activity of the bacteria isolates in a solid media

b) Effect of CM media on the inhibitory effect of the growth of S. aureus isolates by selected bacteria:

C) Studies on the of inhibitory effect of the growth of S. aureus isolates by the selected bacteria in liquid media of MRS:

d) Study of the impact of using static and shaking cultures on the inhibitory effect of the growth of S. aureus by selected bacteria:

e) The effect of the incubation period on the inhibitory effect of inhibitory of the growth of S. aureus by selected isolates were tested in the liquid MRS media:

III: A Study of the effect of using different types of dates molasses for the inhibitory effect of the growth of S. aureus.

This was done as follows:

A) Effect of using different types of dates molasses as a carbon source in the MRS solid medium on the inhibitory effect of S. aureus growth by selected isolates:

b) The impact of using different types of dates molasses on the inhibitory effect for the growth of S. aureus by selected isolates by spotting manner:

C) Effect of using different concentrations of molasses on the inhibitory effect of S. aureus growth by selected isolates:

D) study the effect of adding Twain -80 and yeast extract and peptones on the inhibitory effect of S. aureus growth by selected isolates in liquid media of dates molasses

E) The effect of boiling on the inhibitory effect of free – cell filtrate of selected isolates against S. aureus growth in selected bacteria extract.

The results were as follows:

4414 has been obtained for the isolation of forty-three samples of breast milk without sterilization of the mothers skin have emerged bacterial colonies after 48 hours of incubation at 35 º C. There were no relationship between the number of isolates and the duration of breastfeeding was observed. In addition, 162 were obtained from samples isolated from goat milk in Al-Baha, without sterilization of goats breast, in which different periods of milk production and bacterial colonies appeared after 120 hours of incubation. No bacterial isolates were obtained after skin sterilization. Most isolates of bacteria showed abilities to inhibit the growth of bacteria S. aureus in MRS solid media using spotted way and the largest diameter of bacterial growth inhibition in tested bacteria was 16 mm.

• MRS media was found to be better than CM media in the inhibitory effect of S. aureus growth by the selected bacteria.

• It was also found that all tested isolates have inhibitory effect against S. aureus geowth in liquid MRS media and it was noticed that at the end of the incubation

period, the degree of acidity increased in the liquid media, pH decreased from of 6,5 to. 4,5, 5,5 and 6.

• When using liquid nutrient medium for the development of selected bacterial isolates, the largest diameter of the inhibition of bacterial growth were 9 and 11 mm . After excluding the effect of hydrogen peroxide, and acidity from the extract by modifying pH to 6,5, diameter of the growth of bacteria decreased while increasing the capacity of inhibiting the growth of bacteria tested by other isolates and there was no impact on the effect of the inhibitory effect when adjusting the pH of the extract of other isolates.

• There was no increase or decrease in the innibitory effect of selected isolates of S. aureus growth when incubated in shaking incubator.

•Incubation for 168 hours is the best period of incubation increasing the inhibitory effect of tested bacteria Staphylococcus aureus growth.

• When dextrose was replaced in the MRS media with one type of dates molasses, mixture of dates and molasses with sugary Rziz, molasses, (dates from Al-Qassim as source of sugar production, most isolates of the inhibitory effect increased.

• When a media consisting of 2% of molasses or mashed dates on the inhibitory effect of bacteria, (bacteriocine) by selected isolates of bacteria found that, all isolates were had inhibitory effect of S. aureus growth compared with its inhibitory effect when grown in MRS medium.

•It was found that 2% of all types of molasses, mashed dates the optimal concentration for the best ability of inhibitory effect of tested bacteria by the selected bacteria.

•It was found that, the addition of yeast extract and Tween -80 and peptones to the molasses media, decreased of inhibitory effect of all selected isolates as well as when Tween -80, yeast extract and Tween -80 were added. However, there was an improvement in the inhibitory when all these materials were added into the media of molasses, but in less than when MRS medium was used.

it was found that, the addition of yeast extract and Tween -80 and peptones to Dibs media separately, lead to reduced production and animal of inhibitory effect of S. aureus S. aureus bacteria by all the selected isolates, but an improvement was of the inhibitory effect of S. aureus growth when all these substances were added into the molasses medium but ower than the inhilitory effect when MRS medium was used.

The inhibitory effect of free – cell filtrate of selected isolates from the mother's milk and dairy goat were decreased when exposed to boiling degree for three minutes.

(لايوجد ملخص عربي)