جامعة الفيوم
كلية الزراعة

دراسات على إنتاج بعض المواد الحيوية من البكتريا المعزولة من التربة

رسالة مقدمة من

ليلى رمضان عبدالحليم بيومى
بكالوريوس العلوم الزراعية (علوم وتكنولوجيا الأغذية) – كلية الزراعة- جامعة الفيوم ٢٠١٠

كجزء من متطلبات الحصول على
درجة الماجستير في العلوم الزراعية
(الميكروبيولوجيا الزراعية)

قسم الميكروبيولوجيا الزراعية
كلية الزراعة
جامعة الفيوم

٢٠١٥

الملخص العربى

بالرغم من وجود أنواع عديدة من المضادات الحيوية إلا أن مشكلة مقاومة الميكروبات لعديد من المضادات الحيوية مازالت قائمة ولذلك مازال البحث عن مضادات حيوية ذات تأثير قوى قاتل أو مثبط على هذه المجموعات البكتيرية وتكون آمنة على الإنسان هدف هذه الدراسة.

الجزء الاول : حصر لبعض العزلات البكتيرية التى لها القدرة على إنتاج مواد مضادة للميكروبات:-

و فى هذه الدراسة تم عمل حصر لبعض العزلات البكتيرية التى لها تأثير مضاد للميكروبات واختبارها على المجموعات البكتيرية المختلفة السالبة والموجبة لجرام والمتجرثمة وبعض الخمائر والفطريات و ذلك بتقدير المجال الرائق حول القرص المشبع بالمستخلص الخالى من الخلايا للعزلات البكتيرية .

وكان عدد ٧٠ عزلة لها القدرة على تثبيط نمو واحدة أو أكثر من السلالات البكتيرية الممرضة ثم تم اختبار تأثير هذه العزلات الميكروبية على بعض الفطريات والخمائر الآتية:-

-*Staphylococcus aureus* ATCC 8095.

-*Escherichia coli* ATCC 25922.

-*Bacillus cereus* ATCC 13753.

-*Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

- *Micrococcus luteus*

-*Salmonella typhimurium*.

- *Candida albicans*

- *Alternaria alternata*

- *Asperagillus niger*

- *Fusarium semitectum*

- *Penicillium roqueforti*

و تم اختبار تأثير الإنزيمات المحللة للبروتين و كذلك تأثير المعاملات الحرارية على المواد المضادة للميكروبات المتواجدة فى المستخلص الخالى من الخلايا للعزلات الميكروبية وأظهرت نتائج هذا الاختبار أن هذه الإنزيمات كان لها تأثير جزئى مثبط لبعض العزلات بينما لم تؤثر على البعض الأخر مما يعنى أن هذه المواد ليست ذات طبيعة بروتينية كلية ولكنها قد تكون فسفوليبيدات

تم اختبار تأثير اختلاف تركيب بيئة الإنتاج ودرجة حرارة ومدة التعقيم على إنتاج المواد المضادة للميكروبات وأوضحت النتائج أن أفضل بيئة للإنتاج كانت البويون المغذى و أفضل درجة حرارة ومدة تخمير هى ٣٠ و ٣٧ °م ومدة التخمير ٢٤ و ٤٨ ساعة .

كذلك تم اختبار تأثير قدرة المواد المستخلصة المضادة للميكروبات من كل عزلة على العزلات الأخرى وأوضحت نتيجة هذا الاختبار أنه لا يوجد تأثير يذكر لهذه المواد على العزلات الأخرى.

تم اختبار قدرة هذه المواد المضادة للميكروبات المنتجة من خمس العزلات البكتيرية على بعض السلالات الممرضة مقارنة ب ١١ مضاد حيوى و أظهرت نتائج هذا الاختبار أن هذه المواد تفوقت على المضادات الحيوية المختلفة بينما اقتربت نتائجها من المضاد الحيوى tarivid .

تم اختبار تأثير النواتج الثانوية للتمثيل الغذائى للعزلات الخمس المختبرة كمواد مضادة للتورمات فى النبات .

الجزء الثانى : تصنيف وتعريف أقوى العزلات البكتيرية:-

ثم تم تصنيف خمس عزلات بكتيرية باستخدام نظام API 50 CHB و أوضحت نتيجة هذا الاختبار أن هذه العزلات هى

Bacillus licheniformis و *Bacillus amyloliquefaciens* و *Bacillus subtilis*

استخدم نظام srRNA ١٦فى تعريف أفضل عزلتين والذى أوضحت نتائجه أن العزلتين *Bacillus sonorensis* و *Bacillus methylotrophicus*

الجزء الثالث : التقدير الكمي لقوة المستخلصات البكتيرية على مختلف انواع الميكروبات المختبرة :-

تم تحديد أقل تركيز مثبط وقاتل من هذه المواد المضادة للميكروبات المنتجة من العزلات البكتيرية على السلالات البكتيرية الممرضة ولتقدير MIC(اقل تركيز مثبط) يوضع ١ مل من معلق اللقاح البكتيري يحتوي على عدد ثابت من الميكروبات المختبرة (١٠^{٦}- ١٠^{٨}خلية حية/مل) على ١ مل من البيئة المحضرة بتركيز متضاعف تحتوي علي المادة المضادة للميكروبات المنتجة من العزلات البكتيرية بتركيزات ١٢٨،٦٤،٣٢،١٦،٨ ميكروجرام/مل وبعد فترة التحضين المناسبة لكل ميكروب يؤخذ اقل تركيز لا يعطي عكارة ظاهرة ويسمى(اقل تركيز متثبط). ويؤخذ جزء من هذا التركيز ويتم تقدير أعداد الميكروبات به ويعتبر هذا التركيز أقل تركيز قاتل اذا كانت أعداد الميكروبات أقل من ٠,١% من العدد الابتدائي لهذا التخفيف.وكانت نتيجة هذا الاختبار تشير إلى أن أقل تركيز قاتل للميكروبات للخمس عزلات البكتيرية مع السلالات البكتيرية الممرضة يتراوح بين ٠,١ – ٠,٤ مجم/مل .

الجزء الرابع :الاختبارات البيولوجية :-

تم اختبار المواد الحيوية المنتجة من العزلات البكتيرية بإستخدام حيوانات التجارب (الفئران) لتحديد مدى أمان استخدام الإنسان لها . وقد استخدم في هذه الدراسة عدد ٣٠ فأر ابيض في نفس العمر والجنس والوزن الحي تقريباً . قسمت الفئران الى ٦ مجموعات متساوية في العدد ومتوسط الوزن و تضم كل مجموعة ٥ فئران . ثم تم توزيع المجموعات عشوائيا على المعاملات التجريبية المختلفة التي تم إختبار تأثيرها لمدة ٥ اسابيع . حيث كانت توجد مجموعة ضابطة غذيت على العليقة الأساسية فقط وباقى المجوعات الخمس غذيت على العليقة الأساسية بالإضافة إلى ٥% من الخلايا البكتيرية والمواد الحيوية التى أنتجتها .

أوضحت دراسة تأثير تغذية الفئران على المواد المضادة للميكروبات المنتجة من الميكروبات المذكورة ما يلي:-

في نهاية التجربة سجلت الفئران تناقص طفيف فى متوسط الوزن باستثناء المجموعة رقم ٦ التى سجلت زيادة طفيفة فى وزن الفئران .

أظهرت نتائج القياسات الحيوية للدم أن الفئران التي غذيت على المعاملات التجريبية لا توجد فروق معنوية بينها وبين العليقه الاساسية (الكنترول) فى قياس اليوريا وإنزيم ALT بينما وجد اختلاف بين المجموعة الضابطة وباقى المجموعات فى قياس الكرياتينين وإنزيم AST . كذلك اختلفت نسبة الهيموجلوبين وكرات الدم الحمراء والبيضاء بين المجموعات المعاملة بالمواد المضادة للميكروبات والمجموعة الضابطة حيث زادت نسبة الهيموجلوبين وعدد كرات الدم الحمراء بالمعاملة بالمواد المضادة للميكروبات . بينما سجلت بعض المجموعات زيادة فى كرات الدم البيضاء وسجلت مجموعات أخرى نقص فى عدد كرات الدم البيضاء عن المجموعة الضابطة .

التوصيات

- عمل تعريف للتركيب الكيميائى للمواد المضادة للميكروبات المنتجة من السلالات البكتيرية الخمس .
- استخدام المواد المضادة للميكروبات المنتجة من السلالات البكتيرية الخمس فى المكافحة البيولوجية فى النبات .
- استخدام المواد المضادة للميكروبات المنتجة من السلالات البكتيرية الخمس فى حفظ الأغذية .