المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (12) العدد (2)
لسنة 2020

DOI: http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc12.2.2020.(4)

دراسة الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنقى من العزلة المحلية *Lactococcuslactis* ssp. *Lactis* تجاه بعض البكتريا الممرضة المعزولة من عينات سريرية

علاء حسين هامل[1]، جيهان عبد الستار سلمان[2]، رغد أكرم عزيز[3]*
[1]باحث، قسم العلوم، كلية التربية الأساسية، الجامعة المستنصرية، العراق aliredaalaa79@gmail.com
[2]أستاذ دكتوره، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، العراق dr.jehan@uomustansiriyah.edu.iq
[3]أستاذ دكتوره، قسم العلوم، كلية التربية الأساسية، الجامعة المستنصرية، العراق regaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

الاستلام 20/ 11/ 2019، القبول 9/ 1/ 2020، النشر 30/ 12/ 2020

هذا العمل تحت سياسية ترخيص من نوع CCBY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

الخلاصة

هدفت البحث الى دراسة الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنقى من العزلة المحلية ***Lactococcuslactis* ssp. *lactis*** تجاه أنواع البكتريا المسببة للأمراض المعزولة من عينات سريرية في بعض مستشفيات بغداد، اذ اجريت غربلة للعزلات العائدة لبكتريا ***Lactococcuslactis* ssp. *lactis*** والمعزولة من امعاء الاسماك والحليب الخام بطريقة الانتشار بالحفر، وبينت النتائج أن العزلة ***L. lactis* ssp. *lactis*** (Lc4) هي الاكفأ في إنتاج البكتريوسين كما لوحظ زيادة فعاليتها التثبيطية بزيادة تركيزه وأن تركيز الراشح لمرتين كان الأفضل في الحصول على اقطار تثبيط أعلى مقارنة مع المركز لمرة واحدة، وشملت خطوة تنقية البكتريوسين تركيز الراشح الخام، ثم اجراء التنافذ الغشائي والترشيح الهلامي باستعمال Sephacryl S-200، وأظهرت النتائج عند دراسة مرحلة التنقية ارتفاع الفعالية التثبيطية للبكتريوسين بعد التنقية تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام قيد الدراسة مقارنة مع الراشح المركز لمرة واحدة ولمرتين قبل التنقية، أذ بلغت اقطار مناطق التثبيط بعد اجراء الترشيح الهلامي للبكتريوسين المنقى 23و 25 و26 و20 و22 و28 ملم تجاه كلاً من بكتريا ***S. aureus*** ،***S. epidermidis*** و***P. aeruginosa*** و***E. coli*** و***E. clocae*** و***S. Marcescens***على التوالي، وبلغ المحتوى الكربوهيدراتي للبكتريوسين المنقى 6.02% فيما بلغ الوزن الجزيئي لها 6310 دالتون، وبينت النتائج ان البكتريوسين المنقى قد احتفظ بفعاليته التثبيطية عند الأرقام الهيدروجينة من 2 الى10 وظهر أعلى تثبيط له عند الرقم الهيدروجيني من 4 الى6 فيما فقد فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 12، فيما تميز البكتريوسين المنقى بالثبات الحراري، إذ احتفظ بفعاليته عند تعريضه لدرجات حرارة مختلفة 40 و60 و80 و100م ولمدد زمنية مختلفة 5 و10و30 دقيقة ولدرجة حرارة 120م لمدة 5 و15 دقيقة وفقد 50% من فعاليته عند تعريضه لدرجة حرارة 120م لمدة 30 دقيقة، كما اوضحت النتائج ان البكتريوسين المنقى احتفظ بفعاليته عند معاملته بأنزيم الببسين والتربسين بدرجة حرارة 37م لمدة ساعة واحدة وعند رقم هيدروجيني7.

الكلمات المفتاحية: بكتريوسين، *Lactococcuslactis* ssp. *lactis*، البكتريا المرضية.

DOI: http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc12.2.2020.(4)

STUDY THE INHIBITION ACTIVITY OF PURIFIED BACTERIOCIN FROM LOCAL ISOLATION *Lactococcuslactis* ssp. *lactis*against SOME PATHOGENIC BACTERIAL SPECIES ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

Alaa Hussein Hamel[1],Jehan Abdul Sattar Salman[2], RaghadAkram Aziz[3],
[1]Researcher, College of Basic Education- Mustansiriyah University- Baghdad, Iraq aliredaalaa79@gmail.com
[2]Prof. PhD., College of Science -Mustansiriyah University- Baghdad, Iraq dr.jehan@uomustansiriyah.edu.iq
[32]Prof. PhD.,College of Basic Education -Mustansiriyah University- Baghdad, Iraq regaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

Received 20/ 11/ 2019, Accepted 9/ 1/ 2020, Published 30/ 12/ 2020

This work is licensed under a CCBY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

ABSTRACT

This study aimed to study the inhibition activity of purified bacteriocin produced from the local isolation *Lactococcuslactis ssp. lactis* against pathogenic bacteria species isolated from clinical samples in some hospitals Baghdad city. Screening of *L. lactis ssp. Lactis* and isolated from the intestines fish and raw milk was performed in well diffusion method. The results showed that *L. lactis ssp. lactis (Lc4)* was the most efficient isolate in producing the bacteriocin as well observed inhibitory activity the increased that companied with the concentration, the concentration of the twice filtrate was better in obtaining higher inhibition diameters compared to the one-fold concentration. The concentrated bacteriocin was purified using the gel filtration column and Sephacryl S-200. The results showed the high inhibitory activity of the purified bacteriocin after the purification against the positive and negative bacteria of the Gram stain under study compared to the one-fold concentration and two-fold before purification , The diameters of the inhibition zones after gel-filtering of the purified bacteriocin reached *S. aureus, S. epidermidis, P. aeruginosa, E. coli, E. clocae* and *S. marcescens* (23, 25, 26, 20, 22 and 28) Mm respectively. The carbohydrate content of purified bacteriocin from *L. lactis ssp. lactis (Lc4)* isolate was 6.02% with a molecular weight of 6310 Dalton. The results showed that purified bacteriocin retained its inhibitory activity at pH 2-10 and showed the highest inhibition at pH 4-6 and lost at pH 12. The purified bacteriocin was characterized by thermal stability. It retained its effectiveness when exposed to 40, 60, 80, 100°C for 30, 15, 5 minutes and 120°C for 15.5 minutes and lost 50% of its effectiveness when exposed to 120°C for 30 minutes. Results The purified bacteriocin was effectively retained when treated with enzyme pepsin and trypsin of 37°C for one hour and at pH 7.

Keywords: Bacteriocin, *Lactococcuslactis ssp. lactis*, pathogenic bacteria.

المقدمة Introduction

استعمل مصطلح بكتيريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria (LAB) في مطلع القرن العشرين للأشارة الى الكائنات الحية التي تؤدي الى زيادة حموضة منتجات الألبان، شكلت المعايير المستعملة في تصنيف هذه البكتريا من قبل Orla-Jensen في العام 1919 والتي شملت (الشكل المظهري للخلية ونمط تجمع الخلايا ونمط تخمر الكلوكوز ودرجة حرارة النمو وأنماط استهلاك السكر) أساساً للتصنيف في الوقت الحاضر، على الرغم من ظهور أدوات تصنيفية أكثر حداثة فأن هذه المعايير مهمة للغاية في تصنيف هذه البكتريا **(Zhang & Cai 2014)**. ويعد جنس *Lactococcus* أحد الاجناس العائدة لبكتريا حامض اللاكتيك ومن اهمها واكثرها شيوعاً في تصنيع منتجات الألبان، ويمتاز هذا الجنس بأن لها آليات عديدة للتنافس مع الاحياء الاخرى منها انتاج بعض المواد العضوية التي لها تأثير قاتل لعدد من الاحياء المجهرية مثل ثنائي الاستيل والاستيالديهايد **(Loh *et al.*, 2017)** وانتاج حامض اللاكتيك وتغيير جهد الاكسدة والاختزال في البيئة المحيطية، وكذلك انتاج البكتريوسينات ومن اهمها النايسين Nisin وغيرها من الآليات **(Alkhafaji 2008)**، كما يمتاز ايضاً كما هو الحال مع باقي اجناس بكتريا حامض اللاكتيك باحتياجه الى متطلبات غذائية معقدة **(Gaudu *et al.*, 2002)**، وتعرف البكتريوسينات على انها مواد مثبطة بروتينية تنتج من قبل مدى واسع من الاحياء المجهرية ومن ضمنها بكتريا حامض اللاكتيك وقد أثارت ظاهرة التضاد Antagonism بين الاحياء المجهرية أهتمام الباحثين، فقد لاحظ كل من pasture وJoutbert في عام1877أن بعض السلالات البكتيرية لها القابلية على إفراز إنزيمات محللة أو مواد سامة أو مواد مثبطة لنمو البكتريا **(Otles *et al.*, 2003)**، وفي عام1929 أكتشفت أول البكتريوسينات من قبل العالم Andre وGratia عندما لاحظ أن الراشح المنتج من بكتريا *E. coli* V تمكن من تثبيط بكتريا *E. coli* S وأطلق عليه حينها أسم principle V **(Yusuf *et al.*, 2015)**.

المواد وطرائق العمل Materials and methods

عزلات البكتريا Lactococcus bacterial isolates

استعملت خلال هذه الدراسة ثمانية عزلات مشخصة والتي تعود الى تحت النوع لبكتيريا *Lactococcus lactis*ssp. *lactis* المعزولة من امعاء الاسماك والحليب الخام التي تم الحصول عليها من مختبر الدراسات العليا في كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية، تم التأكد من تشخيصها بالاعتماد على الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية وحسب ماجاء به **Goldman & Green (2015)** فضلا عن التأكد من تشخيصها باستعمال نظام Vitek 2 لغرض استعمالها في إنتاج البكتريوسينات.

عزلات البكتريا المرضية Pathological bacterial isolates

جمعت ثلاثة عزلات من البكتريا المرضية المشخصة لحالات سريرية مختلفة من الجروح و الدم والحروق من بعض مستشفيات بغداد (مستشفيات مدينة الطب ومستشفى الطفل المركزي) شملت على التوالي كلاً من بكتريا *Staphylococcus epidermidis* و*Staphylococcus aureus* و*Pseudomonase aeruginosa*، فيما تم الحصول على ثلاثة عزلات من البكتريا المرضية المعزولة من اصابات المجاري البولية من مختبرات كلية العلوم في الجامعة المستنصرية تضمنت كلا من *Enterobacter clocae* و*Escherichia coli* و*Serratia marcescens* والتي تم التأكد من تشخيصها فيما بعد باعتماد الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية وحسب ماجاء به **Goldman & Green (2015)** فضلاً عن التشخيص بنظام Vitek 2.

التحري عن انتاج البكتريوسين Investigatigation of bacteriocin production

تحضير الراشح Filtrate preparation

حضر راشح عزلات *Lactococcuslactis* ssp. *lactis* بالاعتماد على ما جاء به كل من **Loh *et al.* (2017)** و**Garsa *et al.* (2014)**

تقدير الفعالية التضادية لراشح عزلات بكتريا *L. lactis*ssp.*lactis* المنماة في وسط MRS broth Estimated of antibacterial activity

أستعملت طريقة الانتشار بالحفر well diffusion method للتحري عن الفعالية التضادية لرواشح العزلات بكتريا *Lactococcus lactis*ssp. *lactis* وكما وصفها **Aziz *et al.* (2014a)**.

تقدير البروتين Protein estimation

اتبعت طريقة التي وصفها **Bardford (1976)** لتقدير تركيز البروتين.

استخلاص البكتريوسين المنتج من عزلات بكتريا *Lactococcus lactis*ssp. *Lactis* Bactrianocin extraction

تركيز الراشح Concentration

ركز راشح العزلة الأكثر إنتاجا للبكتريوسين لمرة واحدة ولمرتين باستعمال التبخير وقدر تركيز البروتين الكمي للراشح (غير المركز،المركز لمرة واحدة، المركز لمرتين) ثم أستعملت طريقة الانتشار في الحفر للتحري عن الفعالية التثبيطية للرواشح المركزة لمرة واحدة ومرتين ومقارنتها مع الفعالية التثبيطية للراشح بعد التنقية.

تنقية البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* بإستعمال المرشح الهلامي Sephacryl S-200 Bacteriocin purification

تم تحضير عمود الترشيح الهلامي حسب تعليمات شركة Pharmeacia Fine chemical السويدية، غسل المرشح الهلامي لمحلول الموازنة بدارئ الفوسفات، ثم عبأ الهلام بالعمود بعد عملية إزالة الهواء Degassing ليعطي هلاما بابعاد (1.5×60) سم بهدوء لتفادي تكوين الفقاعات الهوائية، وعند الوصول إلى الأبعاد المطلوبة، أجريت عملية موازنة للعمود لمدة 24 ساعة للتأكد من الانضغاط المطلوب لمادة الفصل، وبعد حساب سرعة الجريان المطلوبة وتهيئة العمود، وضع الانموذج، ثم جمعت الاجزاء المنفصلة بواقع 3مللتر /جزء وكانت سرعة الجريان 18مللتر /ساعة، بعدها قيست امتصاصية لاجزاء المنفصلة بجهاز المطياف الضوئي على موجة ضوئية طولها 280 نانومتر، وتم تقدير تركيز البروتين الكمي للقمم المنفصلة وقدرت الفعالية التثبيطية وفقا للطريقة الموصوفة من قبل **Aziz *et al.* (2014b).**

توصيف البكتريوسين المنقي Characterization of bacteriocin

الترحيل الكهربائي Electrophoresis

أستعملت طريقة **Laemmli (1970)** لمتابعة عمليات التنقية وبوجود العوامل الماسخة (SDS-PAGE) للتاكد من نقاوة البكتريوسين.

تقدير الوزن الجزيئي للقمم المفصولة باستعمال الترشيح الهلامي Molecular weight estimation

تم استعمال عمود هلام Sephacryl S-200 بأبعاد 1.5×60 سم المهيأ لتنقية البروتينات المثبطة في تقدير الوزن الجزيئي، اذ تم موازنة العمود بمحلول دارئ الفوسفات ثم تم تعيين حجم الفراغ (Vo) للعمود بإمرار محلول الدكستران الأزرق و حساب مجموع حجوم الاجزاء المنفصلة من بداية امرار محلول الدكستران الى قمة امتصاصه على موجة ضوئية طولها 600 نانومتر، اما حجم الاسترداد (Ve) للبروتينات القياسية والبروتينات المفصولة تم تقديرها بقياس الامتصاص الضوئي على موجة ضوئية طولها 280 نانومتر ولكل بروتين بشكل مستقل، وتم استخراج الوزن الجزيئي للبروتينات المفصولة من المنحنى القياسي للعلاقة بين لوغارتم الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية ونسبة حجوم الاسترداد الى حجم الفراغ وفقا للطريقة الموصوفة من قبل **Al-Soufi (2016)**.

دراسة المحتوى الكربوهيدراتي في البكتريوسين المنقى Carbohydrate content

الكشف النوعي عن وجود الكربوهيدرات في البكتريوسين المنقى Qualitative detection

أستعمل المرشح لهلامي Sephacryl S-200 والمحضر مسبقا مع اضافة كلوريد الصوديوم بتركيز0.3 لزيادة القوة الايونية لمحلول الاستخلاص لفك الارتباطات غير التساهمية، وبعد جمع الاجزاء المنفصلة بواقع 3 مللتر/جزء بسرعة جريان مقدارها 18 مللتر/ ساعة أنهيت عملية الفصل وقياس الامتصاصية الضوئية للاجزاء المنفصلة بجهاز المطياف الضوئي على موجة ضوئية طولها 280 نانومتر للكشف النوعي عن وجود البروتين، بينما أستعملت موجة ضوئية طولها 490 نانومتر لاثبات وجود الارتباط التساهمي بين البروتين والكربوهيدرات في البروتينات السكريه وفقا للطريقة التي قام بوصفها **Al-Soufi *et al.* (2016)**.

تقدير الكربوهيدرات Estimate of carbohydrates

تم استعمال الطريقة التي وصفها **Dubois *et al.* (1956)** والمذكورة من قبل **Al-Soufi (2001)** لتقدير نسبة الكربوهيدرات في البكتريوسين المنقى.

تاثير الرقم الهيدروجيني Effect of pH

درس تأثير الرقم الهيدروجيني على البكتريوسين المنقى بالاعتماد على ما جاء به **Larsen *et al.* (1993).**

تاثير المعاملة الحرارية Effect of heat treatment

قدر الثبات الحراري للبكتريوسين المنقى بالاعتماد على ما جاء به **Rodriguez *et al*. (2002).**

تأثير الانزيمات Effect of enzymes

درس تأثير الانزيمات على البكتريوسين المنقى بالاعتماد على ما جاء به **Karaoghlu *et al.* (2003).**

النتائج والمناقشة Results and discussion

جمع عزلات بكتريا *Lactococcus lactis*ssp. *lactis* وتشخيصها

***Lactococcus lactisssp. lactis* isolates**

أمكن الحصول على ثمانية عزلات تعود لجنس بكتريا *Lactococcus*، تم عزل سبعة منها من امعاء الاسماك (Lc1 وLc2 وLc3 وLc4 وLc5 وLc6 وLc7)، فيما عزلت الثامنة (Lc8) من الحليب الخام، وبينت نتائج الفحوصات الزرعية للمستعمرات النامية على وسط Deman regosa sharpe (MRS) الصلب بكونها ذات لون ابيض مائل الى الأصفر أو الكريمي، ذات حافات محدبة، ملساء لماعة وتشابهت هذه الصفات مع ماذكره **Willey *et al.* (2008)** وبينت نتائج الفحص المجهري من خلال المجهر الضوئي بأن الخلايا البكتيرية قيد الدراسة والمصبوغة بصبغة كرام خلايا كروية، بيضوية الشكل متجمعة بصورة منفردة، ثنائية، أو بهيأة سلاسل قصيرة، وهي موجبة لصبغة كرام، وبينت نتائج الفحوصات الكيموحيوية التي اعتمدت في تشخيص بكتريا *L. lactis*ssp. *Lactis* ان جميع عزلات هذه البكتريا سالبة لفحص الكاتاليز و الاوكسديزووأتفقت هذه النتيجة مع ماذكره كل من**Zhang & Cai (2014)**، وأكد التشخيص بنظام الفايتك ان جميع العزلات قيد الدراسة تعود الى تحت النوع *L. lactis*ssp. *Lactis*.

جمع عزلات البكتريا المرضية وتشخيصها Pathological bacterial isolates

أمكن الحصول على ستة عزلات من البكتريا المرضية المشخصة لحالات سريرية مختلفة و لفئات عمرية متفاوتة من بعض مستشفيات بغداد ومختبرات كلية العلوم في الجامعة المستنصرية، وقد تم التشخيص الأولي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة اعتماداً على صفات المستعمرات المظهرية، وذلك عند تنميتها على الأوساط الزرعية الاختيارية والتفريقية، إذ ظهرت مستعمرات بكتريا *S. aureus* على وسط المانيتول الملحي Mannitol salt agar (MSA) الصلب دائرية صغيرة ذات لون اصفر ذهبي **(Brooks *et al*., 2013)**، فيما ظهرت مستعمرات بكتريا *S. epidermidis*النامية على هذا الوسط بيضاء، فيما تميزت مستعمرات كلاً من بكتريا *S. aureus* و*S. epidermidis* النامية على وسط الدم الاساس الصلب بكونها بيضاء اللون، توافقت هذه الصفات مع ما ذكره **Levinson (2016)**، وتميزت مستعمرات بكتريا *E. coli* النامية على وسط الدم الاساس الصلب بكونها ذات لون ابيض مائل الى الحليبي، فيما تميزت مستعمراتها على وسط الماكونكي

الصلب بكونها ذات لون وردي لماع، وتوافقت هذه الصفات مع ما ذكره **Levinson (2016)**، فيما تميزت المستعمرات البكتيرية النامية لبكتريا *E. coli* على وسط الأيوسين المثيل الازرق Eosin methylene blue (EMB) والذي يعد من الاوساط التفريقية بظهور مستعمرات بلون ازرق مسود ذات بريق معدني اخضر Green metallic sheene، اما بكتريا *P. aeruginosa* فتميزت بأنها ذات لون أخضر مزرق غامق مع تكوين طبقة لماعة على سطح المستعمرات عند تنميتها على وسط الدم الاساس، وتميزت على وسط المكونكي الصلب بأنها شاحبة اللون **(Brooks *et al.*, 2013)**، وعلى وسط Cetremide agar بأنها كبيرة الحجم، لزجة، لماعة ذات لون اصفر مخضر وتظهر هذه الصبغة واضحة أيضا عند تنمية هذه البكتريا على الوسط المغذي الصلب **(Bachoon & Wendy, 2008)**، فيما تميزت مستعمرات بكتريا *S. marcescens* على وسط الدم الاساس الصلب بكونها ذات لون برتقالي، فيما ظهرت هذه البكتريا باللون الاحمرعند تنميتها على وسط المغذي الصلب ووسط الماكونكي الصلب بدرجة حرارة الغرفة وهذا يعود إلى امتلاك هذا النوع البكتيري صبغة Prodigiosin الحمراء **(Mendoza *et al.*, 2019)**، فيما كانت مستعمرات بكتريا *E. clocae* على وسط الدم الاساس الصلب رمادية اللون، فيما تميزت بكونها ذات لون وردي على وسط الماكونكي الصلب تشابهت هذه الصفات مع ما ذكره **Levinson (2016)**، وأظهرت نتائج الفحص المجهري بأستعمال المجهر الضوئي بأن الخلايا البكتيرية المصبوغة بصبغة كرام لكلاً من بكتريا *S. aureus* و*S. epidermidis* بكونها ذات خلايا كروية، عنقودية الترتيب متجمعة بصورة ثنائية أو رباعية أو على هيأة سلاسل قصيرة، فيما تميزت مستعمرات كلاً من بكتريا *E.coli* و*P. aeruginosa* و*E. clocae* و *S. marcescens* بكونها عصوية سالبة لصبغة كرام، وتوافقت هذه الصفات مع ماذكره كل من **Brown & Smith (2014)**، وقد أجريت سلسلة من الفحوصات الكيموحيوية التاكيدية لتشخيص عزلات البكتريا المسببة للأمراض، أن جميع الانواع البكتيرية المرضية قيد الدراسة قادرة على أنتاج أنزيم الكاتاليز اي أنها موجبة لهذا الاختبار توافقت هذه النتيجة مع ماذكره **Thille (2016)**، فيما أظهرت جميع العزلات الاختبارية نتيجة سالبة لأختبار الاوكسيديز بأستثناء *P. aeruginosa* التي كانت موجبة لهذا الاختبار الذي يعد صفة تشخيصية مهمة لهذا النوع تطابقت هذه النتيجة مع ما ذكره **Garcia (2010)**، كما أظهرت خلايا كلاً من بكتريا *S. aureus* و*S. Epidermidis* و*P. Aeruginosa* و *E. clocae* نتيجة سالبة لفحص الأندول، فيما أظهرت كلاً من بكتريا *E. coli* و*S. marcescens* ايجابية لهذا الأختبار، كما أظهرت النتائج أن كلاً من بكتريا *S. marcescens* و*P. aeruginosa* كانت سالبة لأختبار المثيل الأحمر، فيما أظهرت كلاً من بكتريا *E. clocae* و*S. aureus* و*E. coli* و*S. epidermidis* النتيجة الموجبة لهذا الاختبار، كما أظهرت النتائج أيضا بأن كلاً من بكتريا *S. aureus* و*E. coli* و*S. Epidermidis* كانت سالبة لأختبار أستهلاك السترات فيما كانت كلاً من بكتريا *S. marcescens* و*P. aeruginosa* و*E. clocae* موجبة لهذا الاختبار، فيما أظهرت النتائج بأن كلاً من بكتريا *S. aureus* و*E. coli* و*P. aeruginosa* سالبة لأختبار فوكس بروسكاور فيما أظهرت كلاً من بكتريا *S. Epidermidis* و*S. aureus* نتيجة موجبة لهذا الاختبار، وان جميع العزلات قيد الدراسة بأستثناء *P. aeruginosa* أظهرت النتيجة نفسها عند تنميتها على وسط كليكلر-الحديد الصلب KIA ووسط السكر الثلاثي الحديدي الصلب Triple sugar iron agar (TSIA)، إذ أن لها القابلية على تخمير سكر االلاكتوز والكلوكوز الموجودة في وسط kligler iron agar (KIA) وسكر االلاكتوز والكلوكوز والسكروز َالموجودة في وسط (TSIA) بوصفها مصدراً للطاقة **(Hemraj *et al.*, 2013)**، فيما أظهرت القابلية على أنتاج الغاز من خلال الفقاعات التي لوحظت في انبوبة الاختبار، و لتبيان الطريقة التي يتم فيها أيض السكريات أستعمل لهذا الغرض وسط الأكسدة-بالتخمر Oxidation-Fermentation (OF)، إذ أظهرت البكتريا الاختبارية مقدرتها على التخمر، إذ تحول لون الوسط في أنبوبة الأكسدة (منماة بظروف هوائية) وأنبوبة التخمر (منماة بظروف لاهوائية) الى اللون الاصفر بسبب أنتاج الحامض الذي إدي الى خفض الرقم الهيدروجيني للوسط وتغير لون الكاشف البروموثايمول القرمزي الى اللون الاصفر **(Hemraj *et al.*, 2013)**، فيما أظهرت بكتريا *P. aeruginosa* القابلية على ايض السكريات بعملية الاكسدة، وأظهرت كلاً من بكتريا *S. epidermidis* و *S. aureus* نتيجة سالبة لأختبار الحركة وكانت نتيجة هذا الاختبار موجبة لكلاً من بكتريا *S. marcescens* و*P. aeruginosa* و*E. coli* و *E. clocae*، فيما يعد اختبار أنزيم التجلط Coagulase واحد من اهم الاختبارات التشخيصية لتمييز أنواع المكورات العنقودية، إذ أظهرت نتائج هذا الاختبار أن بكتريا *S. aureus* كانت موجبة لهذا الاختبار اما بكتريا *S. epidermidis* فقد كانت سالبة، وتوافقت هذه النتيجة مع ماذكره **Talaiekhozani et al. (2015)**، ومن الجدير بالذكر أن Coagulase يعد بروتين يتفاعل مع البروثرومبين Prothrombin الموجود في الدم والمعقد الناتج من هذا التفاعل يسمى Staphylothrombin الذي يؤدي بدوره الى تخثر الدم وبذلك يتحول الفايبرينوجين الى فايبرين الذي يرتبط احيأنا بسطح البكتريا ويغيطها بالليفين مما يجعل البكتريا مقاومة للبلعمة **(Becker *et al.*, 2014)**.

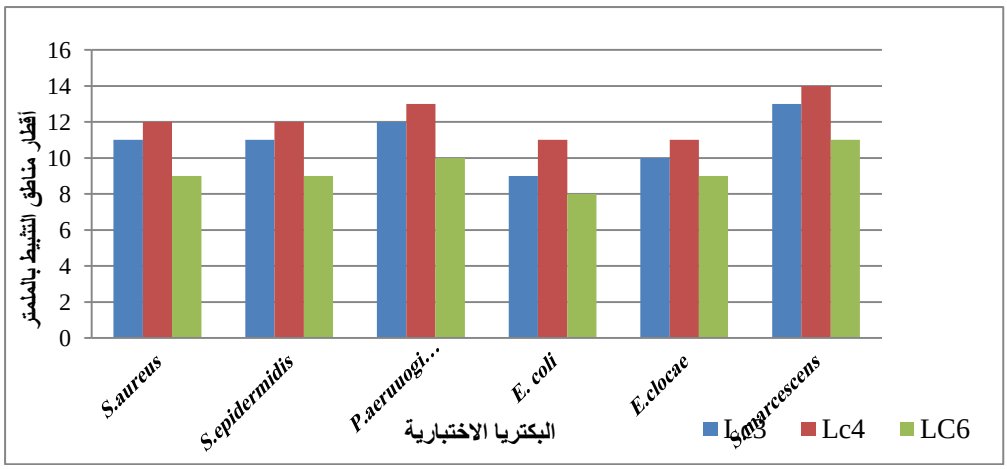
التشخيص بجهاز VITEK 2

تمثل الاختبارات الكيموحيوية المدخل الاساسي في تشخيص البكتريا فيما أن الحاجة قد تكون ملحة في بعض الاحيان للاستعانة بأنظمة تشخيص متطورة تعطي نتائج عالية الدقة ،لذا جاءت خطوة التشخيص بجهاز VITEK 2 لتأكيد تشخيص العزلات، وبينت نتائج التشخيص ان العزلات تعود

الى *E. clocae* و*E. coli* و*S. marcescens* و*S.epidermidis* و*S.aureus* و*P. Aeruginosa* نظراً لما يتمتع به هذا الجهاز من سهولة وسرعة في الأستعمال والتحضير والتشخيص الدقيق للأنواع البكتيرية، إذ يوفر هذا الجهاز 64 اختباراً كيموحيوياً فضلاً عن اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للعزلات المراد تشخيصها وبنسبة تشخيص عالية تتراوح بين 95 الى99٪ وبوقت يتراوح من 5 الى 8 ساعات ،فيما أكد **Mulla Khalil (2012)** أن تشخيص العزلات البكتيرية بوساطة جهاز الفايتك يؤكد نتائج التشخيص الأولي وبنسبة تشخيص عالية تصل إلى 98% إذ أستعمل جهاز الفايتك في تشخيص البكتريا المعزولة من المصادر السريرية.

غربلة عزلات بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* المستعملة في الدراسة Screening of bacterial isolates

اختبرت قابلية ثمانية عزلات بكتيرية عائدة الى تحت النوع لبكتريا *L. lactis*ssp. *Lactis* على انتاج البكتريوسين بعد تنميتها على وسط MRS السائل وتحت ظروف لاهوائية ومن ثم التحري عن فعالية الراشح في تثبيط بعض البكتريا المرضية (الشكل، 1).



شكل (1):غربلة عزلات بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* لأختيار العزلة الاكفأ في أنتاج البكتريوسين من خلال مقارنة اقطار التثبيط التي تحدثها رواشحها المركزة لمرة واحدة في البكتريا المرضية.

أظهرت النتائج الموضحة في (الشكل، 1) أن العزلة (Lc4) *L. lactis*ssp. *lactis* هي الاكفأ في أنتاج البكتريوسين، إذ امتلك راشحها المركز لمرة واحدة أعلى قطر تثبيط تجاه *E. coli* و*E. clocae* و *S. marcescens* و*S.aureus* و*S.epidermidis* و *P. Aeruginosa* والتي بلغت 12 و12 و13 و11 و11 و14 ملم على التوالي، فيما تلاها العزلة (Lc3) *L. lactis*ssp. *lactis* التي أعطت اقطار تثبيط 12 و9 و10 و13 و11 و11 ملم على التوالي، فيما أظهرت العزلة (Lc6) *L. lactis*ssp. *Lactis* فعالية تثبيطية بأقطار بلغت 10 و8 و9 و11 و9 و9 ملم على التوالي، فيما أعطت باقي العزلات فعالية تثبيطية قليلة تجاه البكتريا الاختبارية، ويعزى سبب تباين عزلات بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* في فعاليتها التثبيطية الى اختلاف الفعالية الفسلجية لكل عزلة وهذا يعود الى الاختلاف في تركيب الجينات والذي ينعكس بدوره على نشاط الأنزيمات والفعاليات الأيضية، إذ أن أنواع السلالات التابعة لبكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* يمكن أن تنتج أنواع مختلفة من النايسين وبتراكيز مختلفة والذي ينعكس بدوره على الفعالية التثبيطية التي يمكن أن تحدثها رواشح عزلات هذه البكتريا في البكتريا الاختبارية، وأختلفت الدراسات السابقة حول حساسية ومقاومة البكتريا للبكتريوسينات المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك، إذ أن آلية المقاومة للبكتريوسين لم تفسر بصورة كاملة ولكن بصورة عامة يعتقد أن سبب مقاومة البكتريا للبكتريوسين قد يعزى الى التغييرات الحاصلة في الغشاء الحيوي والتي قد تتضمن توقف الجينات المسؤولة عن تشفير أنزيم Phophotranferase الذي يعمل على أنتاج ATP كمصدر للطاقة او تغيير في تركيب الأحماض الدهنية المكونة الغشاء.

تأثير تركيز راشح بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* في الفعالية التثبيطية

The effect of bacterial filtrate concentration on the inhibition activity

اوضحت النتائج أن الراشح المنتج من بكتريا *L. lactis*ssp. *Lactis* أثر في تثبيط العزلات البكتيرية الاختبارية بعد أن تم تركيزه كماهو موضح في (الجدول، 1).

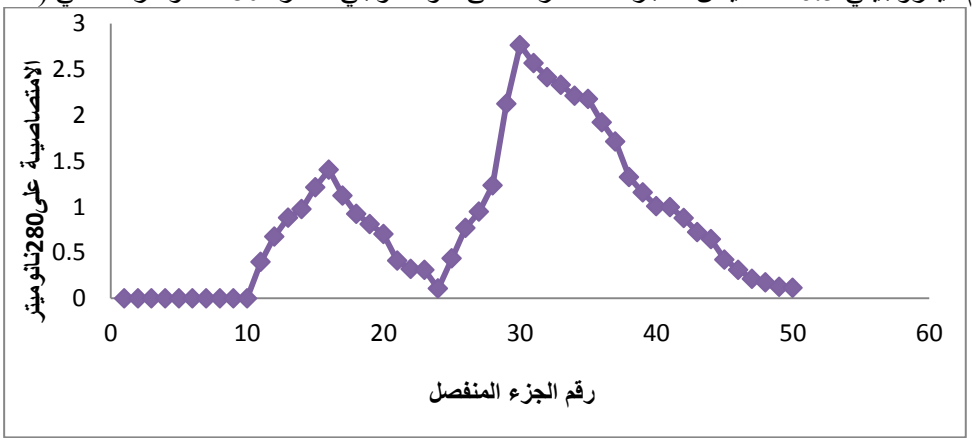
جدول (1): التأثير التثبيطي للراشح المركز لمرة ولمرتين المنتج من بكتريا *L. lactis*ssp. *Lactis* تجاه البكتريا المرضية.

عزلات البكتريا المرضية	قطر مناطق التثبيط (ملم)	
	الراشح المركز لمرة واحدة للعزلة (Lc4) بتركيز 0.106 ملغم/مل	الراشح المركز لمرتين للعزلة (Lc4) 0.343 ملغم/مل
S. aureus	12	18
S. epidermidis	12	19
P. aeruoginosa	13	20
E. coli	11	16
S. marcescens	14	21
E. clocae	11	17

يتضح من خلال الجدول أن الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *L. lactis*ssp. *Lactis* ازدادت بزيادة تركيزه وأن تركيز الراشح لمرتين كان الأفضل في الحصول على أعلى اقطار تثبيط تجاه البكتريا المرضية مقارنة مع المركز لمرة واحدة، اذ اشار **Brashear *et al.* (2003)** أن البكتريوسينات تنتج من قبل العديد من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك ولكن بكميات ضئيلة، لذا فمن الضروري تركيز الراشح الخام المنتج من السلالات والذي يحتوي على عوامل مثبطة للميكروبات في خطوات متعددة للحصول على أعلى فعالية، كما أظهرت النتائج بأن العزلات البكتيرية المرضية قيد الدراسة أبدت تفاوتاً في مدى استجابتها لراشح بكتريا *L. lactis*ssp. *Lactis* المركز لمرتين، إذ بلغ أعلى تاثير له على بكتريا *S. marcescens* 21 ملم ثم تدرج في التأثير، وقد يعزى ذلك الى ألية عمل البكتريوسين في التأثير على العزلات الحساسة له الذي يرجع الى امتلاك البكتريا المستهدفة مستقبلات متخصصه للبكتريوسين او حدوث تغير في غشاء الخلية وجدرانها، أظهرت الدراسات السابقة التي اجريت على النايسين المنتج من بكتريا *L. lactis* بأنه يمنع التخليق الحيوي للببتيدوكلايكون **(Hansen *et al.*, 2009)**، وتعتمد ألية ادخال النايسين على وجود الفوسفوليبد في طبقة الدهون الاحادية والثنائية وهذا ما يفسر لنا سبب الاختلافات الواضحة في الأنواع والسلالات البكتيرية الحساسة للنايسين، إذ لاتحدث النفاذية الا في حالة ادخال النايسين في طبقه الدهن وهذا لايحدث إلا في حالة وجود الفوسفوليبد **(Wiedemann *et al.*, 2001)**، وعموماً فأن النايسين وجميع البكتريوسينات المنتجة من الصنف الأول المسمى Lantibiotics تحتوي على أحماض امينية موجبة الشحنة غير محبة للماء تحتاج إلى مركبات سالبة الشحنة للتجاذب معها في حالة غياب الفوسفوليبد لابد من وجود النايسين بتراكيز عالية جداً لتشكيل الثقوب في السياتوبلازم وبالتالي اظهار الفعالية التثبيطية **(Ennahar *et al.*, 2000).**

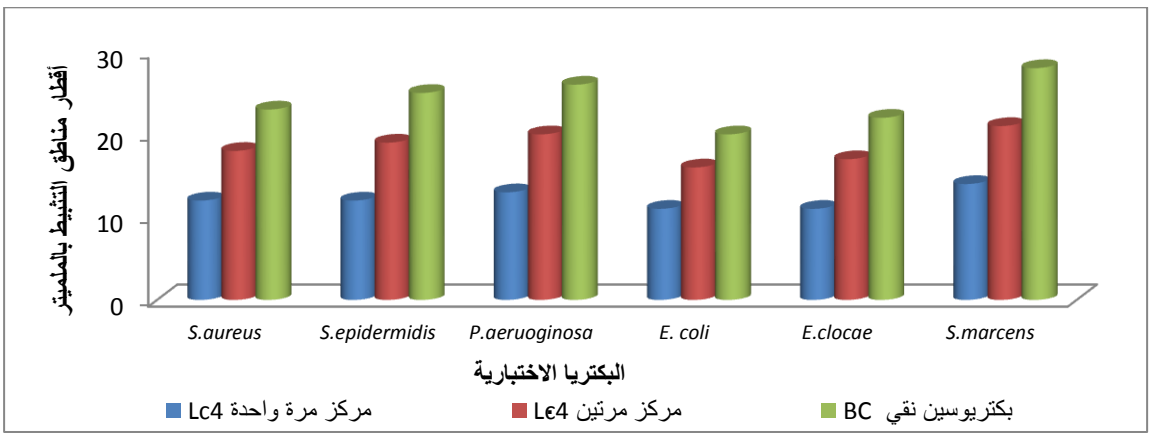
تنقية البكتريوسين بوساطة الترشيح الهلامي Bacteriocin purification

للحصول على بروتين يحقق درجة عالية من النقاوة أستعمل لأجل ذلك هلام السيفاكريل Sephacryl S-200 في تنقية البكتريوسين المنتج من بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis*، لما يمتاز به من خواص جيدة، إذ يحتوي على الأكريلاميد فضلاً عن الدكستران، مما يعطيه صلابة جيدة ومقاومة عالية للأنضغاط فضلا عن الفصل الجيد وسرعة الجريان وسهولة التحضير وامتلاكها ثباتية لمدة طويلة، كما يمكن من خلاله تقدير الوزن الجزيئي للبروتين بغض النظر عن الشحنة التي يحملها **(Janson & Ryden 1998)**، وجاءت خطوة الترشيح الهلامي بعد عملية تركيز الراشح المستحصل عليه من بكتريا *L. lactis*ssp. *Lactis* (Lc4) لمرتين، إذ أضيف الأنموذج الى عمود الترشيح الهلامي ذو أبعاد (1.5× 60) سم، وأظهرت النتائج ظهور قمتين للبروتين من الاجزاء المستردة من الهلام بوساطة محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم الملحي بتركيز 0.5 مولاري ورقم هيدروجيني 6.5 عند قياس الاجزاء المستردة على طول موجي مقداره 280 نانومتر كما في (الشكل، 2).

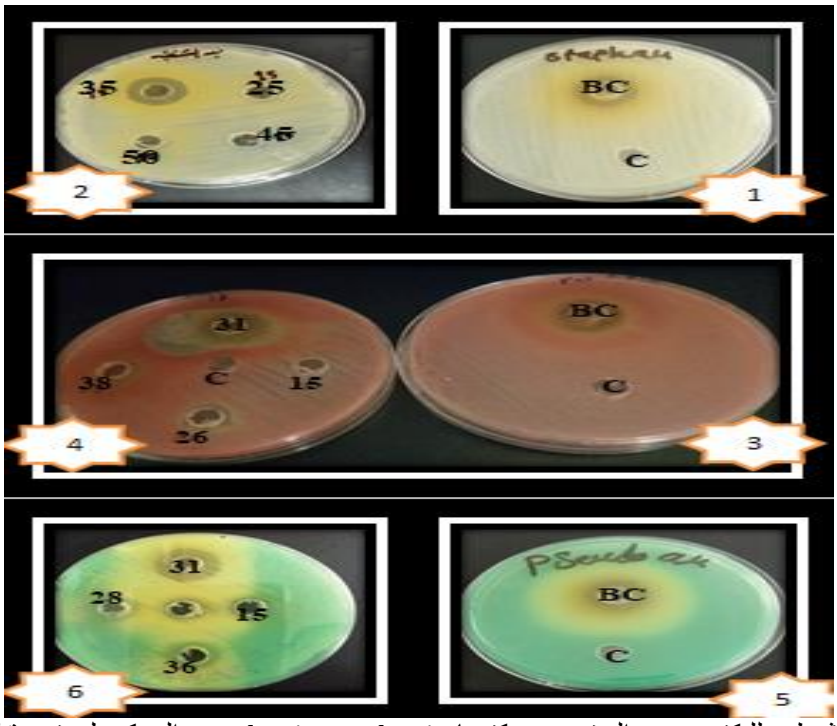


شكل (2): تنقية البكتريوسين من العزلة *L. lactis*ssp. *lactis* على عمود كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 وبابعاد 1.5×60 وبسرعة جريان مقدراها 18مللتر/ ساعة وبواقع 3مللتر/ جزء،وتم الاسترداد بوساطة محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم وبتركيز 0.5 مولاري.

قيست بعدها الفعالية التثبيطية للقمم المفصولة بطريقة الأنتشار في الحفر، إذ كانت الفعالية التثبيطية متمركزة في القمة الثانية، اما القمة الأولى فكانت خالية تقريبا من الفعالية تجاه البكتريا الاختبارية، وجمعت أجزاء القمة الثانية وركزت مرة أخرى ثم اعيد اضافتها الى عمود الترشيح الهلامي نفسه في خطوة ثانية وتحت ظروف مماثلة للفصل الأول، تم من خلال هذه الخطوة الحصول على قمة واحدة تطابقت مع القمة الثانية المتحصل علها في الخطوة الأولى، مما يدل على نقاوة البروتين وأن المواد البروتينية المثبطة قد رشحت خلال الاجزاء النافذة، فيما اختلف تركيز البروتين في الأجزاء المستردة من الترشيح الهلامي تبعاً لاختلاف تركيز المواد المثبطة، إذ أعطت فعالية تثبيطية عالية وبأقطار تثبيط متفاوتة تجاه البكتريا الاختبارية، وجرى أستعمال الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الأكريلامايد وبوجود العوامل الماسخة للتأكد من دقة عملية التنقية للبروتينات المفصولة، اذ اوضحت النتائج المستحصل عليها أن استمرار عملية التنقية للراشح يؤدي إلى تناقص في مقدار الحزم البروتينية، مما يؤكد نجاح عملية التنقية في الحصول على بروتين وبأعلى درجة من درجات النقاوة ليتم توصيف ذلك البروتين وتقدير فعاليته التثبيطية بصورة دقيقة بالرجوع الى قياس الفعالية التثبيطية للاجزاء المستردة من هلام ephacryl S-200 ويلاحظ من خلال (الشكل، 3 و4) أزدياد اقطار مناطق التثبيط *S.aureus* و*S.epidermidis* و *P. Aeruginosa* و*E. coli* و*E. Clocae* و*S. Marcescens*، إذ بلغت 23 و25 و26 و20 و22 و28 ملم على التوالي ،مما يعني زيادة فعالية البكتريوسين النقي مقارنة مع البكتريوسين المركز لمرة واحدة ومرتين، كما يلاحظ من (الجدول، 2) أن تركيز البروتين يبدأ بالأزدياد خلال مراحل التنقية مع ازدياد اقطار مناطق التثبيط، مما يدل على أنه خلال مراحل التنقية قد تم التخلص من المركبات والمواد الأخرى المرافقة للبروتين وتحريره، وهذا ما يؤكد كفاءة الطريقة المتبعة في تنقية البكتريوسينات وفصلها.



شكل (3): تأثير الفعالية التثبيطية للبكتريوسن المنتج من بكتريا *L. lactis* ssp. *lactis* تجاه البكتريا المرضية خلال مراحل التنقية.



شكل(4): التأثير التثبيطي للبكتريوسين المنتج من بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* والمركز لمرتين قبل وبعد التنقية تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام:

* الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المركز لمرتين قبل التنقية على (1) *S. aureus* و(4) *S .marcescens* و(1) *P. aeruginosa*

* (C) أنموذج سيطرة و(BC) بكتريوسين مركز مرتين.

* الفعالية التثبيطية للبكتريوسين بعد التنقية على عمود الترشيح الهلامي على (2) *S. aureus* و(4) *S. marcescens* و *P .aeruginosa* (6)

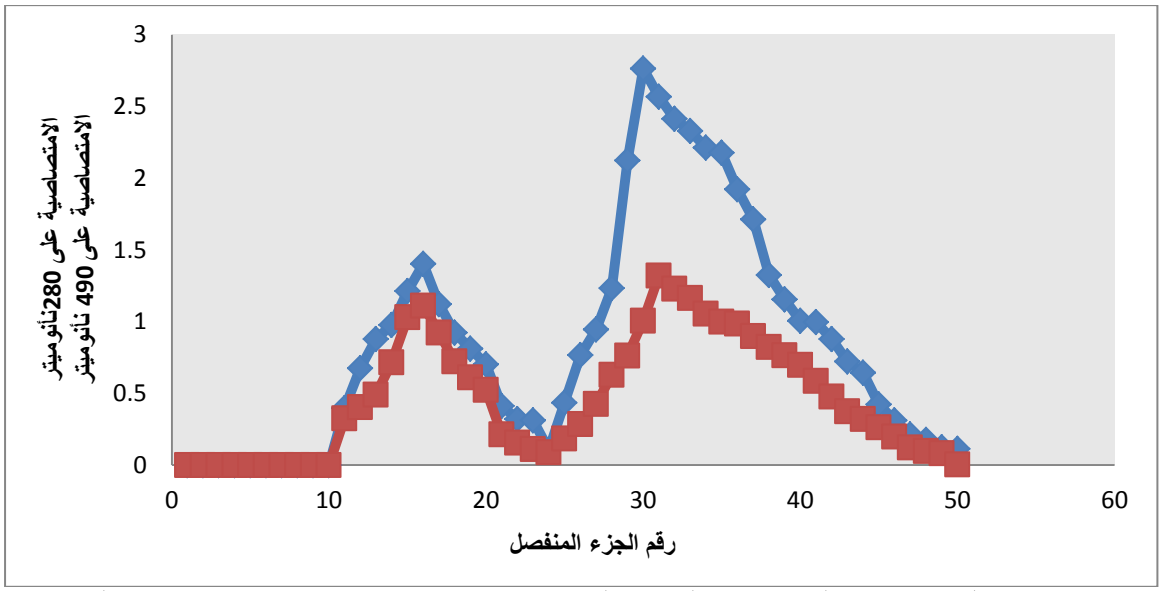
جدول(2): تركيز البروتين خلال مراحل التنقية.

خطوات التنقية	الحجم(مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	البروتين الكلي (ملغم/مل)	الحصيلة (%)
الراشح الخام	80	0. 32	25.6	100
الراشح المركز مرة واحدة	40	0.106	4.24	16.56
الراشح مركز مرتين	20	0.343	6.86	26.79
الترشيح الهلامي	18	0.653	11.75	45.89

توصيف البكتريوسين المنقى بوساطة الترشح الهلامي Characterization of bacteriocin

دراسة المحتوى الكربوهيدراتي للقمم المفصولة من البكتريوسين المنقى Carbohydrate content

اشارت النتائج التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة أن المحتوى الكربوهيدراتي للبكتريوسين المنقى قد بلغ 6.02%، مما يدل على أن البكتريوسين المنتج من العزلة *L. Lactis*ssp. *Lctis* (Lc4) هو من نوع البروتينات السكرية، كما أشارت النتائج الى وجود ارتباط تساهمي بين البروتينات المنفصلة والكربوهيدرات نتيجة لتطابق قيمة الامتصاصية لقمة الفصل عند قياسها على طول موجي 280 نانومتر و490 نانومتر على الرغم من أستعمال محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم الملحي ذي قوة ايونية عالية الغرض منها فك الارتباطات اللاتساهمية في حالة وجودها، وكانت الغاية من دراسة المحتوى الكربوهيدراتي هو التحري عن كون البكتريوسين المنقى هو من نوع البروتينات السكري (الشكل، 5).



شكل (5): الارتباط التساهمي بين البكتريوسين المنقى والمنتج من بكتريا *L. lctis*ssp. *lctis* (Lc4) والكربوهيدرات بأستعمال كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود بإبعاد 1.5×60سم وبسرعة جريان 3 مللتر/جزء وجرت موازنة العمود والاسترداد باستعمال محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم الملحي بتركيز 0.5مولاري وبرقم هيدروجيني 6.5.

تقدير الوزن الجزيئي للبكتريوسين المنقى بطريقة الترشيح الهلامي

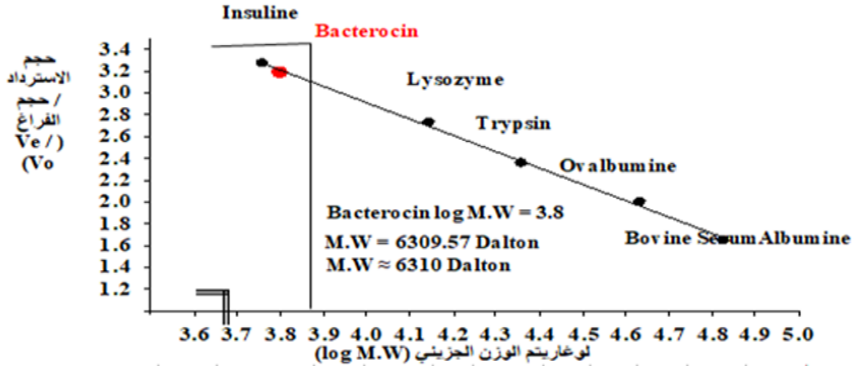
قدر الوزن الجزيئي للبكتريوسين المنقى بطريقة الترشيح الهلامي على Sephacryl S-200 بأستعمال البروتينات القياسية المتمثلة بـ (Trypsine، pepsin، bovine SerumAlbumin، Ovalbumin، Riboflavin) كما هو موضح في (الجدول، 3)، فيما تم حساب حجم الفراغ (Vo) لعمود الترشيح الهلامي بأستعمال صبغة Blue dextran والتي يبلغ وزنها الجزيئي 2000000 دالتون، بعدها قيست الامتصاصية الضوئية للاجزاء المنفصلة عند طول موجي 600 نانومتر فضلاً عن حساب حجم الاسترداد (Ve) للبروتينات القياسية و البكتريوسين المنقى والتي قيست بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 280 نأنومتر (الشكل، 6).

جدول(7): حسابات الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية وقمم المواد البروتينية المثبطة النقية.

البروتينات	الوزن الجزيئي M. W.دالتون	لوغارتم الوزن الجزيئي Log M. W.	حجم الاسترداد Ve	حجم الاسترداد/حجم الفراغ*Ve/vo
Insulin	5730	3.7581	108	3.27
Lysozyme	14400	4.1464	90	2.727
Trypsin	23000	4.362	78	2.363
Ovalbumine	43000	4.6334	66	2
Bovine Serum Albumin	67000	4.8260	54	1.637
P2 tube No. 35**	-	-	**105**	**3.181**

* استخراج حجم الفراغ بأستعمال الدكستران الازرق.

** استخراج الوزن الجزيئي بعد رسم العلاقة الخطية وعكس لوغارتم الوزن الجزيئي.



شكل (6): المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي والمواد البروتينية المثبطة المنقاة بطريقة الترشيح الهلامي بأستعمال Sephacryl S-200.

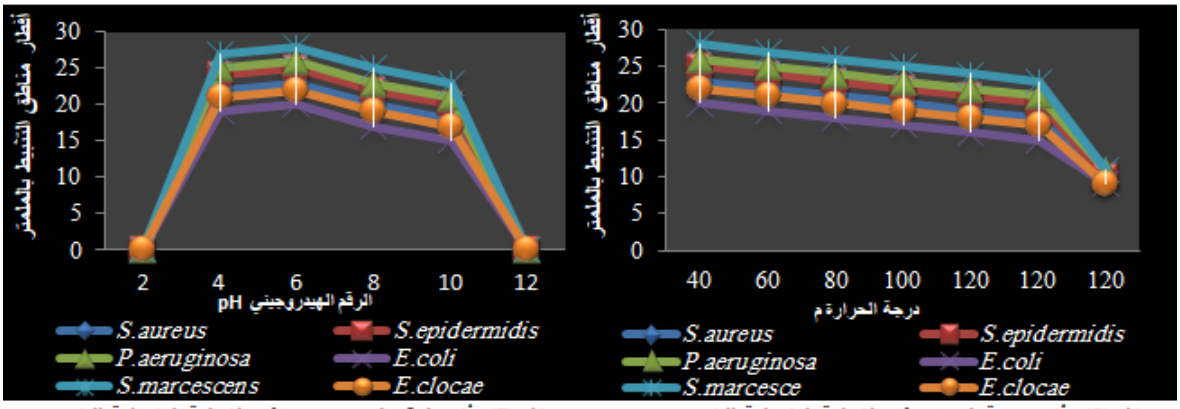
بعد تعيين حجم الفراغ و لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية و حجم الاسترداد، رسمت العلاقة الخطية بين حجم الفراغ (Vo)/حجم الاسترداد (Ve) مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية لأستخراج الوزن الجزيئي للبكتريوسين المنقى استنادا الى المنحنى القياسي للبروتينات القياسية **(Lewus *et al.*, 1991)**، وأستعملت هذه الطريقة في الحصول على الوزن الجزيئي لعدد كبير من البكتريوسينات عالية النقاوة **(Vera Pingitore *et al.*, 2006)**، أظهرت النتائج التي تم التوصل اليها أن الوزن الجزيئي للبكتريوسين المنقى والمنتج من عزلة بكتريا *L. lctis*ssp. *lctis* (Lc4) قد بلغت 6310 دالتون.

تاثير الرقم الهيدروجيني Effect of pH

درس تاثير الرقم الهيدروجيني على الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنقى والمنتج من عزلة *L. lactis*ssp. *lactis* (Lc4) بأرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 2 الى 12والتي حضنت بدرجة حرارة 37م لمدة اربع ساعات، وأظهرت النتائج بأن البكتريوسين المنقى قد احتفظ بفعاليته التثبيطية عند الأرقام الهيدروجينة من 2 الى 10 وظهر اعلى تأثير له عند الرقم الهيدروجيني من 4 الى 6، بينما فقد فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 12 كما موضح في (الشكل، 7)، وقد يعزى سبب ذلك الى زيادة تأين مجموعة الكاربوكسيل الموجودة في جزيئة البكتريوسين المنقى بزيادة الرقم الهيدروجيني العالى مما يؤدي الى أنخفاض الفعل التثبيطي للبكتريا، فيما اشار **Chen *et al.* (1997)** الى أن سبب ثبات البكتريوسين عند الأرقام الهيدروجينية المنخفضة من 2 الى 7 يعود الى زيادة الشحنات الموجبة مما يزيد من قوه ارتباط البكتريوسين مع الفوسفوليبيد الموجود في جدران الخلايا البكتيرية، ويتضح مما تقدم أن البكتريوسين المنقى قد احتفظ بفعله التثبيطي تجاه البكتريا الاختبارية في ارقام هيدروجينية تراوحت من 4 الى 10، وأن الارقام الهيدروجينية المتطرفة القاعدية والحامضية ادت الى فقدان الفعالية التثبيطية، إذ اثرت في الهيئة الفراغية اي بنية البروتين و تناقص الفعالية التثبيطية قد يرجع الى ذوبان البكتريوسين المنقى من بكتريا حامض اللاكتيك، إذ أن نقطة التعادل الكهربائي للبكتريوسينات تتراوح بين 8 الى 9 وذوبانية البكتريوسين المنتج تتناقص بزيادة الرقم الهيدروجيني **(Dunder, 2006)** وهذا متفق مع ما اشار اليه **Arauz *et al.* (2009)** و**Dal Bello *et al.* (2012)**، إذ اكدواعلى أن النشاط الحيوي العاللنايسين يعتمد على الرقم الهيدروجيني للمحلول إذأنه يظهر اعلى نشاط له في الظروف الحامضية لكن نشاطه يتناقص في الظروف القاعدية.

تاثير المعاملة الحرارية Effect of heat treatment

درس الثبات الحراري للبكتريوسين المنقى من بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* (Lc4) من خلال اختبار الفعالية التثبيطية تجاه البكتريا الاختبارية بعد معاملتها بدرجات حرارية مختلفة ولفترات زمنية متفاوتة، واوضحت النتائج أن البكتريوسين المنقى احتفظ بفعاليته عند تعريضه لدرجة حرارة 40 و60 و80 100م ولمدة 5 و15 و30 دقيقة، فيما عرض البكتريوسين المقاوم الى درجة الحرارة 100م لمدة 30 دقيقة الى درجة حرارة 120م لمدة 5 و15 و30 دقيقة ولوحظ أن البكتريوسين المنقى لم يتاثر بدرجة حرارة 120م لمدة 5 و15 دقيقة، فيما فقد 50% من فعاليته عند درجة حرارة 120م لمدة 30 دقيقة (الشكل، 8)، واتفقت هذه النتيجة مع ماتوصل اليه **Bromberg *et al.* (2005)** والذي اشارالى أن معظم البكتريوسينات المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك تتصف بالثباتية للحرارة العالية ولفترات زمنية محدودة، وقد يعزى سبب ذلك وجود مناطق كارهة للماء والمحتوى العالي من الكلايسين فضلاً عن تركيب الهيكل الكروي والروابط المستقرة والقوية **(DeVuyst & Vandamme 1992)**، او قد يعود الى طبيعة تركيب البكتريوسينات الذي يحتوي على اواصر ثنائية الكبريت التي تربط بين جزيئات الحامض الاميني السستين **(Rodriguez *et al* , 2002)**.



شكل (7) تأثير الرقم الهيدروجيني في الفعالية التثبيطية للبكتريوسين من بكتريا المنقى والمنتج *L .lactis* ssp. *lactis* (Lc4)

شكل (8) تأثير درجة الحرارة في الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنقى والمنتج *L. lactis* ssp. *lactis* (Lc4)

تأثير الأنزيمات:

درس تأثير الأنزيمات على ثبات الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنقى تجاه البكتريا الاختبارية بطريقة الأنتشار في الحفر، إذ عومل البكتريوسين بنوعين من الأنزيمات وهما البيسين pepsin والتربسين Trypsine وهما من الأنزيمات المحللة للبروتينات، واوضحت النتائج التي تم التوصل اليها عدم تأثر الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنقى من بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* عند المعاملة بهذه الأنزيمات عند درجة حرارة 37م لمدة ساعة واحدة وعند رقم هيدروجيني 7، وهذا يتفق مع ما توصل اليه **Tuncer & Ozden (2010)**، فيما وجد **Sahnouni *et al.* (2014)** أن الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنتج من بكتريا *L. lactis* ssp. والمعزولة من الأسماك البحرية قد تأثرت عند معاملتها بأنزيم Trypsine وα-chymotrypsin وProteinade k، بينما بقى محتفظاً بفعاليته عند المعاملة بأنزيم Lipase وamylase، فيما اشار كلاً من **Jarvis & Mahoney (1969)** و **Wilimowskes *et al.* (1979)** أن البكتريوسين المنقى من بكتريا *L. lactis*ssp. *lactis*. فقد فعاليته عند المعامله بأنزيم α–chymotrypsin وα-amylase، بينما بقي محتفظاً بفعاليته عند المعاملة بالبيبسين والتربسين وقد يعزي هذا الى وجود الكربوهيدرات او الدهون مرتبطة بالاحماض الأمينية من الطرف الكاربوكسيلي الكاره للماء والتي لها دوراً في فعالية البكتريوسين.

الاستنتاجات Conclusions

امتلاك العزلات المحلية لبكتريا *L. lactis*ssp. *lactis* المعزولة من امعاء الأسماك القدرة على انتاج البكتريوسين ذي التاثير التثبيطي للبكتريا المرضية، وكذلك ازدياد الفعالية التثبيطية بزيادة عمليات التنقية.

References

I. Alkhafaji, Z. M. (2008). *Curative Biology (for Life)*. Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Graduate Studies, University of Baghdad, Iraq.

II. Al-Soufi, M. A., Al-Bayati, S. I. and Abbas, S. F. (2016). Purification of red wasp *Vespa orientalis* and yellow wasp *Polistes olivaceaus* toxin and estimating some of its biological characteristics. *Iraqi Journal of Science*, 57(2A), 843-854

III. Alsoufi, M. A. A. (2001). *Separation and Purification of Peroxidase from Calotropus procera Latex and the Possibility of its Applications*. Master Thesis, College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq.

IV. Al-Soufi, M. A. (2016). Use of Purified Laccase from Prickly Lettuce (*Lactuca serriola* L.) In Removal of Phenolic Compound from Some Foods. *International Journal of Novel Research in Life Sciences*, 3(3), 7-17.

V. Aziz, R. A., Al-Soufi, M. A. and Ateia, A. M. (2014a). Study of bakery yeast extract activity on some enteric bacteria that isolated from some hospital in Baghdad city. *Journal of the College of Basic Education*, 20(82), 143-166.

VI. Aziz, R. A., Al-Soufi, M. A. and Ateia, A. M. (2014b). *Purification and Determination of Some Proteins Inhibitors Properties that Produced from Bakery Yeast and Study their Activity Against Some Types of Bacteria that Cause Diarrhea*. 1st International Scientific Conference, Cihan University. Erbil-Kurdistan Region, Iraq.

VII. Bachoon, D. S. & Wendy, A. (2008). *Microbiology Laboratory Manual*. Ed. Michael Stranz. Mason, OH: Cengage Learning.

VIII. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. (2014). Coagulase-negative *staphylococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 870-926.

IX. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

X. Brashears, M. M., Galyean, M. L., Loneragan, G. H., Mann, J. E. & Mann, K. K. (2003). Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct fed microbials. *Journal of Food Protection*, 66(5), 748-754.

XI. Bromberg, R., Moreno, I., Delboni, R., Cintra, H. & Oliveira, P. (2005). Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcuslactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 351-358.

XII. Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. & Mietzner, T. A. (2013). *Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology*. 26th ed., McGraw-Hill. United States.

XIII. Brown, A. E. & Smith, H. (2014). *Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology*. 14th. McGraw-Hill Education.

XIV. Chen, Y., Ludescher, R. D. & Montville, T. J. (1997). Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4770-4777.

XV. Dal Bello, B., Cocolin, L. & Zeppa, G. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcuslactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 58-65.

XVI. De Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G. & Penna, T. C. V. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 146-154.

XVII. De Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcuslactis sub sp. lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology*, 138, 571-578.

XVIII. Dubois, N., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for detection of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

XIX. Dundar, H. (2006). *Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by Leuconostoc mesenteroides sub sp. cremoris.* MSc. Thesis. Middle East Technical University Practice of Infectious.

XX. Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. (2000). Class II a bacteriocin biosyntheses, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85-106.

XXI. Garcia L. (2010). *Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria*. 503-642. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd Edition. ASM Press, Washington, DC.

XXII. Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kapila, S. & Kumar, A. (2014). Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification.

XXIII. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 47-55.

XXIV. Gaudu, P., Vido, K., Cesselin, B., Kulakauskas, S. & Tremblay, J. (2002). Respiration capacity and consequences in *Lactococcuslactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82(1-4), 263-269.

XXV. Goldman, E. & Green, L. H. (2015). Practical Handbook of Microbiology, 3rd Edition. Taylor and Francis Group.

XXVI. Hansen, M. E., Wangari, R., Hansen, E. B., Mijakovic, I. & Jensen, P. R. (2009). Engineering of *Bacillus subtilis* 168 for increased nisin resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6688-6695.

XXVII. Hemraj, V., Diksha, S. & Avneet, G. (2013). A review on commonly used biochemical test for Bacteria. *Innovare Journal of Life Sciences*, 1(1), 1-7.

XXVIII. Janson, J. C. and Rydén, L. (1998). *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*. New York: John Wiley and Sons.

XXIX. Jarvis, B. & Mahoney, R. R. (1969). Inactivation of nisin by alpha chymotrypsin. *Journal of Dairy Science*, 52, 1448-1450.

XXX. Karaoghlu, S. A., Aydin, F., Kilic, S. S. & Kilic, A. O. (2003). Antimicrobial activity and characteristic of bacteriocins produced by Vaginal *lactobacilli*. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 33, 7-13.

XXXI. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-285.

XXXII. Larsen, A. G., Vogensen, F. K. & Josephsen, J. (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 113-12.

XXXIII. Levinson, W. (2016). Review of Medical Microbiology and Immunology. 14th ed., McGraw-Hill Education, USA.

XXXIV. Lewus, C. B., Kaiser, A. & Montville, T. J. (1991). Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1683-1688.

XXXV. Loh, J. Y., Lim, Y. Y. & Ting, A. S. Y. (2017). Bacteriocin like substances produced by *Lactococcuslactis* subsp. *Lactis* CF4MRS isolated from fish intestine: Antimicrobial activities and inhibitory properties. *International Food Research Journal*, 24(1), 394-400.

XXXVI. Mendoza, R. & Baybay, Z., Fernando, L., Montecillo, A., Ilag, L. & Villegas, L. (2019). *Characterization of Gold Nanoparticles Produced by Biogenic Synthesis Using Serratia marcescens NBL1001*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 230.

XXXVII. Mulla Khalil, A. K. S. (2012). *Isolation and Diagnosis of some Wound Infection Pathogens and Studying the Effect of the ND-YAG Laser on these Pathogens*. Master Thesis . College of Science. Tikrit University, Iraq.

XXXVIII. Otles, S., Cagınd, O. & Akcicek, E. (2003). Probiotics and health. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 4, 369-272.

XXXIX. Rodriguez, J. M., Martinez, M. J. & Kok, J. (2002). Pediocin PA: a wide spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 91-121.

XL. Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C. & Ross, P. P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcuslactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 612-619.

XLI. Sahnouni, F., Boutibamaatallah, A., Bouhadi, D. & Boutiba, Z. (2014). Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcuslactis* ssp. *lactis*strains isolated from marine fish caught in the Algerian west coast. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, Special Issue, 2, 1838-1843.

XLII. Talaiekhozani, A., Alaee, S. & Mohanadoss, P. (2015). Guidelines for quick application of biochemical tests to identify unknown bacteria. *Accounts of Biotechnology Research*, 2, 65-82.

XLIII. Thille, P. M. (2016). *Diagnostic Microbiology*. 14th Edition. Bailey & Scott's, Elsevier.

XLIV. Tuncer, Y. & Ozden, B. (2010). Partial biochemical characterization of nisin like bacteriocin produced by *Lactococcuslactis* subsp. *lactis* YBD11 isolated from Boza, A traditional fermented Turkish beverage. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(1), 4940-4948.

XLV. Vera Pingitore, E., Salvucci, E., Sesma, F. & Nader-Macías, M. E. (2007). *Different Strategies for Purification of Antimicrobial Peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB) In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Ed. (Mendez-Vilas, A.). Vol.2 pp: 557-568.

XLVI. Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. & Sahl, H. G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity.

XLVII. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1772-1779.

XLVIII. Wilimowska-Pelc, A., Olichwier, Z., Malicka-Blaszkiewicz, M. & Mejbaum-Katzenellenbogen, W. (1976). The use of gel filtration for the isolation of pure nisin from commercial products. *Acta Microbiologica Polonica*, 25, 71-77.

XLIX. Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. & Prescott, H. (2008). *Klein's Microbiology*. 7th Ed., Joanne M Willey, USA.

L. Yusuf, M. A., Ichwan, A., Jauhari, S., Abdul Hamid, T. & Haziyamin, T. (2015). Anti proliferative activities of purified bacteriocin from *Enterococcus mundtii* strain c4l10 isolated from the caecum of Malaysian non broiler chicken on cancer cell lines. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 883-883

LI. Zhang H. & Cai, Y. (2014). *Lactic Acid Bacteria*. Springer Science.