تاثير الانتروسين U36 المنتج من بكتريا *Enterococcus faecalis* U36 ضد بعض الممرضات البكتيرية المسببة لتلوث الاغذية

Study the Effect of Enterocin produced by *Enterococcus faecalis*U36 Against Some Food Borne Pathogenic Bacteria

نهى جوزيف قندلا غازي منعم عزيز حسين خانقاه*

كلية العلوم / قسم القنيات الاحيائية / جامعة بغداد

*جامعة كركوك

Nuha Joseph Kandala Ghazi M. Aziz Hussein Khanaka*

Biotechnology Department /Collage of Science/ Baghdad University

* karkuk University

المستخلص

الانتروسين U36 (ENT U36) , هو بكتريوسين منتج من بكتريا *Enterococcus faecalis* U36المعزولة محليا من عينات ادراراخذت من مرضى يعانون من التهابات السبيل البولي ، ذي فعالية مثبطة لعدد من الانواع البكتيرية القريبة الصلة التي تعود للبكتريا المنتجة لحامض اللاكتيك Lactic acid bacteria والتي شملت *E. faecalis S10.* و *Lactococcuslactis* و *L. fermentum*، بالاضافة الى فعاليته التثبيطية ضد بعض الممرضات البكتيرية الملوثة الاغذية والتي تضمنت الانواع الاتية *Listeria mono cytogenes* و *Staphylococcus auraus* و *Streptococcus spp.* و *Escherchia coli* والعصياتالمكونة للسبورات *Bacillus subtilis* والتي غالبا ما تلوث عمليات انتاج الغذاء. درس النمط التثبيطي والية عمل الانتروسين المنقى تجاه بعض العزلات من بكتريا الاختبار *L. monocytogenes* و *S. aureus*. وقد اظهرت النتائج ان الانتروسين ENT U36 ذي تاثير مثبط من خلال خفض العدد الحي لبكتريا الاختبار *L. monocytogenes* و *S.auraus* من لوغارتم (7.9، 7.7)الى لوغارتم (2، 3) *على التوالي* بعد مرور 24 ساعة من المعاملة بالانتروسين بفعالية مثلى للتحلل 400وحدة / مليلتر ، كما لوحظ وجود تاثير واضح لتركيز الانتروسين U36 (ENTU36)ومدة المعاملة تجاه كل من بكتريا الاختبار *L .monocytogenes* و *S. auraus* ، حيث امتلك ENTU36 بفعالية 400 وحدة/ مليلتر تاثيرا قاتلا بعد ساعتين من المعاملة تجاه بكتريا الاختبار *L. monocytogenes* بعدد $103.1x^{5}$ خلية / مليلتر ، كذلك ابدى تاثير مثبطا تجاه بكتريا *S.auraus*بعدد 3.8 $10x^{5}$خلية/ مليلتر بعد 24 ساعة من المعاملة بالفعالية اعلاه . وعند دراسة الفعالية الحالة للانتروسينلوحظ ان الية عمله كانت على الغشاء الخلوي فقطولم يظهر اي فعالية تحللية تجاه الجدار الخلوي المستخلص من خلايا بكتريا الاختبار اعلاه او فعالية حالة للدنا(DNA) . لذلك يمكن اعتبار الانتروسين قيد الدراسة مادة حافظة للاغذية في المستقبل يمنع نمو الممرضات البكتيرية الملوثة للاغذية مما يزيد من إمكانية إطالة فترة حفظ الأغذية التي تضاف إليها .

Abstract

Enterocin U36 (ENT U36), is a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis*U36, strain isolated from urine samples have collected from patients suffering from urinary tract infections. The Bacteriocin is an antimicrobial proteins or peptides that inhibit growth of bacteria closely related to the producing organism. The results has been shown that ENT U36 active against *Enterococcus faecalis* S10 *Lactococcuslactis,Lactobacillus fermentum*and few other food borne gram positive pathogens bacteria including *Listeria monocytogenes, Staphylococcus auraus,Bacillus subtilis* and *Streptococcusspp* . The inhibitory type and mode of

action of purified ENT U36 were tested against some isolates test bacteria which included *L.monocytogenes* and *E.coli* It was observed that purified ENT U36 have bacteriostatic effect when the numbers of inhibited test bacteria increased in parallel with the increased activity of ENT U36 (unit/ml) . The treatment period also has its effect on reducing the numbers of test bacteria. The results showed that 400 unit/ml was enough to kill *L.monocytogenes* viable count of in 3.1 x10^5 cell/ml in 2 hours when treated with ENT U36, and *E.coli* in 3.7x10^5 cell/ml in 24 hour'. And when lytic activity of purified ENT U36 studied, it was observed that its mode of action was on cell membrane and did not show any lytic activity on the isolated cell walls of test bacteria or any lytic activity on DNA. This beneficial trait has led to utilization of purified enterocinas as food additives.

المقدمة

لاقت البكتريوسينات (مركبات ذات طبيعة بروتينية او ببتيدية) في الاونة الاخيرة وخاصة الانواع المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك (Lactic acid bacteria (LAB ، قدرا كبيرا من الاهتمام لاسباب تاتي في مقدمتها انها ذات طيف تثبيطي واسع المدى ، اذ تؤثر في العديد من المسببات المرضية ومسببات تلف الاغذية من البكتريا التي تنتقل عن طريق الغذاء خاصة بكتريا *Listeriamonocytogenes* ، مما يزيد من امكانية اطالة فترة حفظ الاغذية التي تضاف اليها ، وهي بذلك تشكل بديلا طبيعيا عن المواد الحافظة الكيميائية التي غالبا ما يحاول المصنعون والمستهلكون تحاشيها لما لها من مضار على مستوى سلامة الغذاء وصحة المستهلك [1 , 2]. تتشابة اليات عمل البكتريوسين في تاثيرها على الخلية الهدف مع اليات عمل المضادات الحيوية فقد تعمل على الجدار الخلوي او الغشاء السايتوبلازمي ومنها مايثبط صنع البروتين والاخرى تتداخل مع الفعاليات الايضية للمادة الوراثية [3] . يكون تاثير البكتيريوسين قاتلا (Bacteriocidal) اومثبطا للنمو (Bacteriostatic) والتغيرات التي يحدثها البكتريوسين في الفعاليات الايضية الحيوية للخلايا المعاملة به تعتمد على نوع البكتريوسين والية عمله [4،5] . عدت الدراسات قليلة على انواع البكتريوسينات (الانتروسينات) المنتجة من بكتريا *Enterococcusfaecalis* احدى الانواع التابعة الى بكتريا حامض اللاكتيك . لذا جاءت هذه الدراسة لتهدف الى تحديد النمط التثبيطي للانتروسين المنتج من العزلة المحلية *Enterococcusfaecalis U36* والية عمله على الخلايا الهدف .

المواد وطرائق العمل

بكتريا الاختبار

استخدمت سلالات الاختبار الآتية للتحري عن قابلية العزلة المحلية U36*E.faecalis* لانتاج الانتروسين والتي شملت على :

* **السلالات البكتيرية القياسية**

السلالة البكتيرية	المصدر
Staphylococcus aureus ATCC 25923 *Escherichia coli*	قسم التقنيات الأحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد

* **العزلات البكتيرية المحلية**

العزلة البكتيرية	منطقة العزل	المصدر
Lactococcuslactis	معزولة من المهبل	طلبة الدراسات العليا في قسم علوم الحياة/كلية العلوم /الجامعة المستنصرية
Lactobacillus fermentum	معزولة من المهبل	
S. aureus	معزولة من المعجنات	قسم الاحياء المجهرية/طب النهرين
Listeria monocytogenes	معزولة من الالجبان المحلية	

العزلة البكتيرية	منطقة العزل	المصدر
Shigella sp.	معزولة من البراز	دائرة المختبرات التعليمية/ مستشفى بغداد
Bacillus subtilis.	معزولة من المعجنات	
Enterococcus faecalis S10	معزولة من البراز	

العزلات البكتيرية وظروف التنمية

انتخبت العزلة المحلية U36*Enterococcusfaecalis* من مجموع 50 عزلة من بكتريا المكورات المعوية الاخرى (6) , لكفائتها العالية وتاثيرها التثبيطي ضد عدد كبير من بكتريا الاختبار قيد الدراسة . حفظت هذه العزلة في (–20°م) في وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Difco) مضافا له 20% كليسرول لحين استخدامها في التجارب اللاحقة. نميت العزلات جميع عزلات الاختبار البكترية التابعة لبكتريا حامض اللاكتيك (*Enterococcus faecalis* و*S10.* و*Lactococcuslactis* و*Lactobacillus fermentum*)، في وسط (Man Regosa Sharp Broth Hi - media\ India) , اما العزلات *S. aureus* و*E.coliB.subtilis* و *Streptococcus sp.* و*Shigellasp.* فقد نميت في وسط نقيع القلب والدماغ) , في حين كانت العزلة *L.monocytogenes* منماة في وسط Trypticases Soya Broth (BBL) مزود بمستخلص الخميرة بنسبة 0.6 % (TSBYE) وحضنت جميع العزلات في حرارة 35 م باستثناء الاخيرة في درجة حرارة 30 م .

قياس فعالية الانتروسين

تم التحري عن انتاجية الانتروسين كميا في الاوساط المستخدمة باستعمال طريقة التخافيف المتسلسلة (نصفية او عشرية) حسب ما جاء في [5] وكالآتي:

حضرت تخافيف نصفية لمستخلص الانتروسين باستعمال المحلول الملحي الفسيولوجي المعقم , استخدمت هذه التخافيف في اختبار الفعالية التثبيطية تجاه العزلات المراد اختبار حساسيتها للانتروسين .

قيست الفعالية التثبيطية لمستخلص الانتروسين بأخذ معكوس اعلى تخفيف اظهر فعالية تثبيطية تجاه العزلة المراد اختبار حساسيتها والتعبير عنها بوحدات Arbitrary Units لكل مليلتر (Au/ml) وتمثل هذه الوحدة تركيز الانتروسين لكل مليلتر من مستخلص الانتروسين.

دراسة نمط الفعل التثبيطي للانتروسين U36 والية عمله

درس تأثير الانتروسينالمنقى (6) علـى حيوية (عيوشية) الخلايا البكترية الاختبارية والفعالية المحللة لها ، فضلا عن الفعالية المحللة للميورين الداخل فـي تركيب جدارعزلات وحسب الطريقة الموصوفة فـي [7] وكالتالي :

تأثير الانتروسين على حيوية بكتريا الاختبار

درس تأثير الانتروسين على حيوية (عيوشية) الخلايا البكتيرية من خلال تعريض عدد ثابت من بكتريا الاختبار *E.coli* , *L. monocytogenes* للانتروسين بفعاليات مختلفة . نميت خلايا بكتريا الاختبار *L. monocytogenes* و *E.coli* المنشطة في 50 مليلتر من وسط (BHI, TS) السائل وكلا على انفراد لمدة 18 ساعة وفي درجة حرارة (30 , 37) م على التوالي . ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة و اعيد تعليق الخلايا في حجم معينمن دارئ الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 7 لاجراء تخافيف للعزلات للحصول على عدد 10^5 خلية / مليلتر ثم عومل حجم معين من عالق الخلايا المخفف مع حجم معين من محلول الانتروسين للحصول على فعالية نهائية من الانتروسين (4 ، 40 ،400) وحدة / مليلتر، حضن المزيج لكل فعالية في درجة حرارة 37م لمدد متعاقبة شملت (0 ، 0.5 ، 1 ، 1.5 ، 2 ، 4 ، 24) ساعة، سحب من كـل فعالية وبمـدد زمنية مختلفة 0.1 مليلتر من المزيج واجريت عليه تخافيف عشرية وحسب العدد الحي للخلايا البكترية بطريقة عد الاطباق.

دراسة الفعالية التحللية للانتروسين تجاه بكتريا الاختبار

لقح وسط مرق نقيع القلب والدماغ بلقاح بكتريا الاختبار *L. monocytogenes* و*E.coli*(المنشطة مسبقا) بنسبة 1% وحضنا في درجة حرارة37°م لمدة 5 ساعات.

سحب حجم معين من عالق خلايا كل نوع من بكتريا الاختبار ومزج مع حجم معين من الانتروسين للحصول على فعالية نهائية 400 وحدة / مليلتر حضن المزيج لكل بكتريا بالفعالية المطلوبة في درجة حرارة الغرفة لمدد متعاقبة شملت (0 ، 0.5 ، 1 ، 1.5 ، 2 ، 4 ، 24) ساعة ثم درست الفعالية التحللية للانتروسين تجاه بكتريا الاختبار اعتماداً على معدل الانخفاض في العكارة بالنسبة لعالق خلايا بكتريا الاختبار وذلك من خلال قراءة طيف الامتصاصية لكل مدة زمنية عند الطول الموجي 600 نانومتر[8].ولغرض حساب النسبة المئوية للتثبيط بعد فترات التعريض المذكورة استخدمت المعادلة الاتية:

النسبة المئوية للتثبيط= عدد الخلايا / مليلتر في زمن الصفر – عدد الخلايا / مليلتر في الزمن المطلوب X 100
عدد الخلايا / مليلتر في الزمن صفر

عدد مرات الاختزال في الدورة اللوغارتمية =
العدد اللوغارتمي في زمن السيطرة(الصفر) - العدد اللوغارتمي في الزمن المطلوب

الفعالية التحللية للانتروسين تجاه جدار الخلايا المعزولة من بكتريا موجبة وسالبة لملون غرام

اختبرت فعالية الانتروسين الحالة لجدار الخلايا المعزولة من بكتريا *L.monocytogenes* و *E.coli*الحساسة تجاه الانتروسين وبكتريا *Shigella sp.* التي لم تظهر حساسية تجاه الانتروسين وباتباع الطريقة الموصوفة في [7 ، 9] مع بعض التحويرحسب ماجاء في[6] .

بعد الاستخلاص خفف عالق الجدار المستخلص لكل بكتريا ليعطي كثافة ضوئية 0.4 عند قراءة الامتصاصية الضوئية على الطول الموجي 600 نانومتر. تم مزج حجوم متساوية من معلق الجدار لكل بكتريا مع محلول الانتروسين ليعطي فعالية نهائية للانتروسين 400 وحدة / مليلتر. وحضن المزيج في درجة حرارة الغرفة وقيس الامتصاص الضوئي لعالق الجدار المعامل عند طول موجي 600 نانومتر ولمدد زمنية مختلفة (0 و 20 و 40 و 80 و 120) دقيقة، وقد استخدم الانزيم الحال (Lysozyme) كسيطرة موجبة (محلل للجدار الخلوي) حيث أضيف بدلا من الانتروسين , وحضربالتركيز المحلل للخلايا (300) ملغم / مللتر واتبعت نفس الخطوات المذكورة اعلاه في طريقة التقييس.

الفعالية الحالة للدنا

استخدمت طريقة الاقراص في التحري عن قابلية الانتروسين المنقى في امتلاك الفعل الانزيمي المحلل للدنا لبكتريا الاختبار*L.monocytogenes*و*E.coli*باتباع الطريقة المذكورة في [10] مع بعض التحوير وحسب ماجاء في [6] .

الفعالية الحالة للغشاء الخلوي

اتبعت الطريقة الموصوفة في [11]بالتحري عن قابلية الانتروسين المنقى في تحطيم الغشاء الخلوي لبكتريا الاختبار اذ زرع وسط الفنولفثالين ثنائي الفوسفات الصلب بالعزلة *L.monocytogenes* و *E.coli* بطريقة النشر ثم وزعت الاقراص المشبعة بالانتروسين المنقى وبفعالية نهائية 400 وحدة/مليلتر حضنت الاطباق بدرجة حرارة37م لمدة 18 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن اضيفت قطرات من محلول NaOH %40 ، ان ظهور اللون الوردي البراق حول اقراص الانتروسين دلالة على ايجابية الفحص.

النتائج والمناقشة

اختبرت القابلية التثبيطية للعزلة المحلية U36*Enterococcusfaecalis* المعزولة محليا من عينة ادرار اخذت من مرضى يعانون من التهابات السبيل البولي على الاوساط الصلبة بطريقة الانتشار بالاكار تجاه عزلات بكتريا الاختبار قيد الدراسة . وقد اظهرت النتائج ان الانتروسين المنتج من بكتريا U36*Enterococcusfaecalis* يمتلك فعالية تثبيطية ضد الممرضات البكتيرية المسببة لتلوث الاغذية والتي تضمنت , *Staphylococcusauraus* *Listeriamonocytogenes*و *Streptocooussp.* و *E.coli* و *Bacillus subtilis* ، بالاضافة لامتلاكة الفعالية المثبطة لعدد من الانواع البكتيرية القريبة الصله وتلك التي تعود للبكتريا المنتجة لحامض اللاكتيك Lactic acid bacteria والتي شملت *Enterococcus faecalis* و *Lactococcuslactis* و *Lactobacillus fermentum* جدول (1).

جدول(1) : قابلية العزلة المحلية U36*E. faecalis* المنتجة للانتروسين ضد عزلات بكتريا الاختبار بطريقة الانتشار Well Diffusion Method في وسط نقيع القلب والدماغ السائل

Micoorganism	Sensitivity[b]
Enterococcus faecalis S10	+++
***Escherichia coli* ATCC 25923**	++
Lactobacillus fermentum	+++
Lactococcuslactis* subsp. *lactis	++
Listeria monocytogenes	+++
Bacillus subtillis	+
S.aureus	++
Streptococcus sp.	+
Streptococcus pneumoniae	++

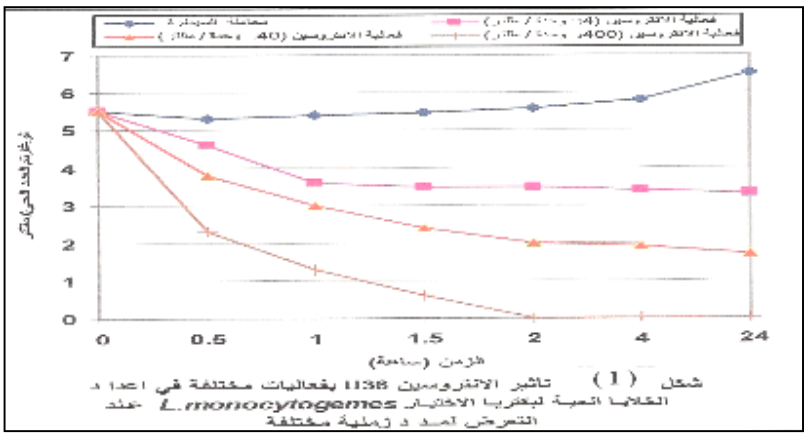
[b] **+, sensitive to enterocins u36 (+(10-15)mm, ++(16-20)mm, and +++(21-25)mm reflect the degree of sensitivity); □, resistant to enterocins u36.**

وتتفق هذه النتائج مع ماوجده [12] عند انتاج البكتريوسين من *E.faecalis* IUTA4 الذي كان فعالا ضد *Lactobacillussp.* و *L. monocytogenes* .لقد اشار [13]الى ان اغلب انواع البكتيريوسينات المعزولة من بكتريا حامض اللاكتيك والتي من ضمنها المكورات المعوية فعالة ضد عدد من انواع البكتريا الملوثة للاغذية منها *L. monocytogenes* وعلية يمكن استخدامها كمواد حافظة في الصناعات الغذائية . فيما بين [14] ان الانتروسين RJ-11 المنتج من *E.faecalis* RJ-11 ذو فعالية واسعة الطيف ضد سلالات البكتريا الموجبة لملون غرام مثل *S.aureus* و *Enterococcus spp.* و *Lc.lactis* و *Bacillus spp* . وهذا ما اكدت[15] الى ان اغلب الانواع المنتجة للانتروسين من بكتريا المكورات المعوية البرازية تمتلك فعالية ضد البكتريا الموجبة لملون غرام مثل *Lactococcusspp* و *L. monocytogenes* و *Lactobacillus spp* و *S. aureus*

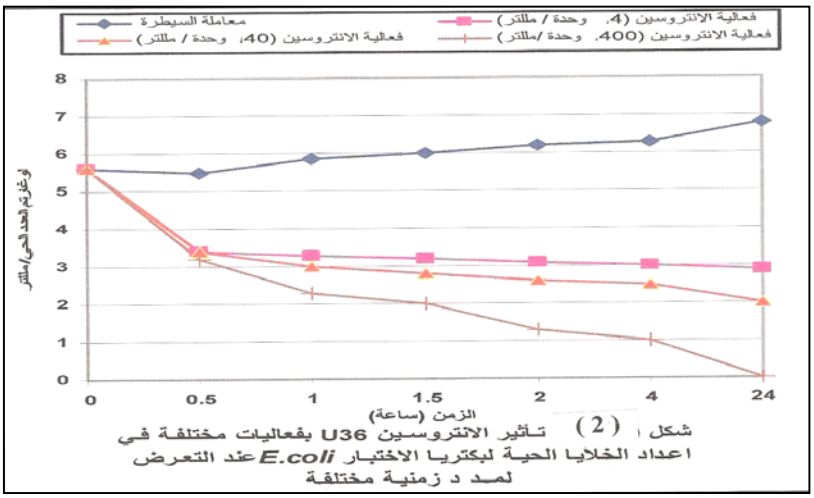
دراسة الفعل التثبيطي للانتروسين U36 والية عمله

تاثير الانتروسين على حيوية بكتريا الاختبار

اختبر تاثير الانتروسين U36 بفعاليات مختلفة (4 , 40 ,400) وحدة/مليلتر على حيوية بكتريا الاختبار *L.monocytogenes*(الموجبة لملون كرام) و(*E.coli*السالبة لملون كرام) من خلال حساب العدد الحي لها بمدد زمنية مختلفة . وقد اظهرت النتائج الموضحة في شكل (1) ان الانتروسين U36 المنتج من العزلة المحلية EFU36 ذي تاثير مثبطا لخلايا بكتريا الاختبار اذ لوحظ حدوث انخفاض في اعداد الخلايا الحية لبكتريا *L.monocytogenes* الى $108.9\ x^2$ خلية / مليلتر وبنسبة تثبيط 99.71 % بعد تعريض هذه الخلايا الى الانتروسين بفعالية 400 وحدة / مليلتر لمدة نصف ساعة مقارنة بالسيطرة (بدون معاملة) والبالغ عددها $103.1x^5$ خلية/ مليلتر. وقد بلغ عدد الخلايا الحية صفرا بعد مرور 2 ساعة من المعاملة . ولم يسجل حدوث انخفاض كبير باعداد الخلايا الحية لهذه البكتريا بعد المعاملة بالفعالية 4 و 40 وحدة / مليلتر اذ انخفض عدد الخلايا الحية من $4\ x\ 10^5$ خلية/ مللتر في زمن صفر الى (104 x 10^4 و $106.4\ x^3$) وبنسب تثبيط (87.1 % و 97.93 %) على التوالي بعد نصف ساعة من المعاملة , واستمر العدد الحي بالانخفاض التدريجي بزيادة مدة التعرض عندما بلغ ($3.1\ x\ 10^3$ و $1\ x1\ 10^2$) خلية / مليلتر بعد 2 ساعة من المعاملة بفعالية (4، 40) وحدة / مليلتر وبنسبة تثبيط (99، 99.96)% على التوالي , وبعد 24 ساعة من مدة التعرض بلغت نسبة التثبيط 99.99 % عندما انخفض العدد الحي الى $1.5\ x\ 10$خلية / مليلتر بعد المعاملة بفعالية 40 وحدة/ مليلتر في حين لم يلاحظ حدوث انخفاض ملحوضباعداد الخلايا عند المعاملة بفعالية 4 وحدة / مليلتر . وكان تاثير الانتروسين واضح ايضا على بكتريا الاختبار *E.coli*عند المعاملة بالفعاليات (4 , 40 , 400) وحدة / مليلتر شكل (2) اذ لوحظ حدوث انخفاض تدريجي في العدد الحي لخلايا البكتريا من $3.7x\ 10^5$خلية / مليلتر في زمن الصفر (معاملةالسيطرة) الى $3\ x\ 10^3$، $2\ x10^3$، $1.5\ x$ 10^2 خلية/ مليترعلى التوالي وبنسب تثبيط (99.18 , 99.45, 99.95)% على التوالي بعد نصف ساعة من المعاملة بالفعاليات اعلاه , وباستمرارمدة التعريض اظهرت المعاملة بالانتروسين U36 بفعالية 400 وحدة / مليلتر تاثير مثبطا على الخلايا الحية بعد مدة 24 ساعة من التعرض مقارنة بالفعالية (4، 40) وحدة / مليلتر اللتان اظهرتا تاثيراقل عندما بلغت نسبة التثبيط 99% و 99.95% لكليهما على التوالي .



شكل (1) تاثير الانتروسين U36 بفعاليات مختلفة في اعداد الخلايا الحية لبكتريا الاختبار *L.monocytogenes* عند التعرض لعدد زمنية مختلفة



شكل (2) تأثير الانتروسين U36 بفعاليات مختلفة في اعداد الخلايا الحية لبكتريا الاختبار *E.coli* عند التعرض لمدد زمنية مختلفة

وتتفق هذه النتائج مع النتائج المستحصل عليها من دراسة اجريت من قبل [16] التي من خلالها تم التوصل الى ان زيادة الفعالية للبكتريوسين يعطي فعالية تحللية اعلى وصولا الى فعالية معينة تعد المثلى في تاثيرها على الخلايا البكترية الاختبارية . وقد يعزى هذا الى تناسب في عدد جزيئات البكتريوسين في هذه الفعالية مع عدد خلايا بكتريا الاختبار الحساسة له والتي يفضل ان تكون اعدادها قليلة تتراوح مابين (10^5 -10^6) خلية / مليلتر لكي يظهر البكتريوسينفعله القاتل .

وهذا ماكده في [17] في دراسة اجريت على الاجبان المجمدة حين وجد ان الانتروسين المنتج من بكتريا *E.faecalis* قد سبب انخفاضا في اعداد البكتريا الملوثة للاجبان بما يوازي زيادة الفعالية (وحدة/ مليلتر) من الانتروسين المستخدم في معاملتها وكان لمدة المعاملة تاثير ايضا في عدد العزلات المثبطة اذ بلغ 16 عزلة مثبطة من مجموع 21 بعد 6 ساعات من المعاملة بفعالية 400 وحدة / مليلتر وارتفع عدد العزلات المثبطة الى 21 عزلة مانسبته 100% من العزلات بعد مرور 24 ساعة من الفعالية اعلاه .

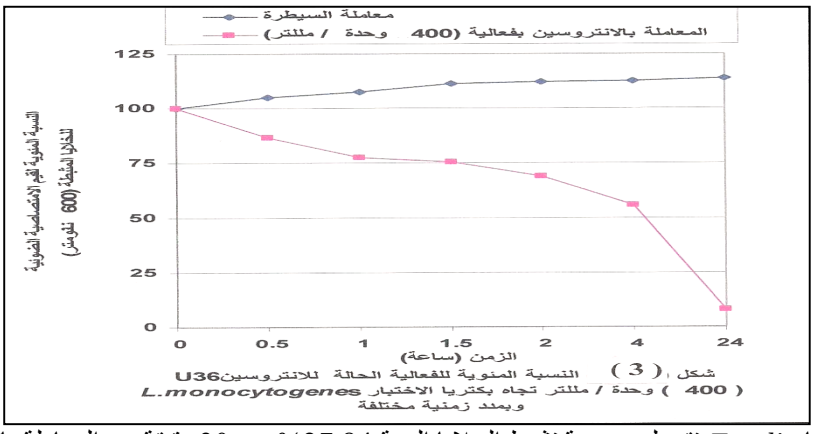
الفعالية التحللية للانتروسين تجاه بكتريا الاختبار

درس تاثير الانتروسين U36 على تحليل خلايا بكتريا الاختبار *L.monocytogenes* و*E.coli* المنماة في الطور اللوغارتمي (5 ساعات) وصولا الى عدد حي $105.1x^7$ و $8x^7$ 10خلية /مليلتر على التوالي وبفعالية مثلى400 وحدة/ مليلتر ولمدد زمنية مختلفة .

فقد اظهرت النتائج الموضحة في جدول (2) قابلية الانتروسين U36 بفعالية تحلل 400 وحدة / مليلتر على تثبيط نمو بكتريا الاختبار عندما ادت الى خفضا عداد الخلايا الحية لبكتريا *L.monocytogenes* من لوغارتم 7.7 (بدون معاملة) الى لوغارتم 4.34 بعد مرور نصف ساعة اي اختزل حوالي ثلاثة دورات لوغارتمية وبنسبة تثبيط 43.6% في حين ازدادت اعداد الخلايا الحية الى لوغارتم 8.3 في معاملة السيطرة (بدون اضافة الانتروسين) .

وكان لتاثير الانتروسينU36 في احداث انخفاض تدريجي في العدد الحي لخلايا بكتريا *L.monocytogenes* في الطور اللوغارتمي عندما وصل الى لوغارتم 3 بعد 4 ساعات وبنسبة تثبيط 61 % في حين بلغت نسبة التثبيط بعد 24 ساعة من المعاملة 74% وبعدد حي لوغارتم 2 اذ اختزلت حوالي 6 دورات لوغارتمية .

كما لوحظ انخفاض في قيم الامتصاصية الضوئية عند الطول الموجي 600 نانومتر رافق الزيادة في النسبة المئوية للخلايا الميتة وهذا مايوكده شكل (3) عندما قورنت النسبة المئوية للعكارة مع زمن التعرض .



شكل (3) النسبة المئوية للفعالية الحالة للانتروسين U36 (400 وحدة / ملليتر تجاه بكتريا الاختبار *L.monocytogenes* وبمدد زمنية مختلفة

اما بكتريا الاختبار *E.coli* فقد بلغت نسبة تثبيط الخلايا الحية 27.84% بعد 30 دقيقة من المعاملة بالانتروسين U36 بفعالية 400 وحدة / مليلتر اذ انخفض فيها عدد الخلايا الحية من لوغارتم 7.9 في معامل السيطرة(بدون معاملة) الى لوغارتم 5.7 حيث اختزلت 2 دورة لوغارتمية عندها تناقصت اعداد الخلايا ببطء لحين وصولها الى لوغارتم 3.5 بعد مرور 4 ساعات وبنسبة تثبيط 55.69% ولم يسجل انخفاض كبير باعداد الخلايا الحية عندما بلغت لوغارتم 3 بعد مضي 24 ساعة من المعاملة جدول (3).

وهذا ما لوحظ ايضا في شكل [4] عندما تمت مقارنة النسبة المئوية للعكارة (نسبة الخلايا الميتة) مع مدد التعرض .

من النتائج اعلاه ونتائج التجربة السابقة يظهر لنا ان الانتروسين U36 سلك سلوكا مثبطا للبكتريا اذ اعتمد في تاثيره على نوع بكتريا الاختبار وعلى مقدار الفعالية (وحدة / مليلتر) ومدة المعاملة . اشارت العديد من الدراسات الى امتلاك البكتريوسين للفعالية القاتلة والمحللة للخلايا البكتيرية منها والبكتريوسين المنتج من البكتريوسين AS–48 المنتج من [18] *E. faecalis* , والانتروسين EJ–11 المنتج من [19] *E. faecalis* J-11 .

لقد وجد[20] ان الانتروسين 4 المنتج من *E. faecalis* يثبط بكتريا *L. monocytogenes* بعد مرور 8 ساعات من المعاملة بفعالية 400 وحدة/ مليلتر باختزاله 3 دورات لوغارتمية . اما [21] فقد عامل بكتريا الاختبار *L*.monocytogenes بالبكتريوسين V24 المنتج من *E. faecalis* V24 بفعالية اثر فيها من خلال اختزاله 1.44 و2.03 دورة لوغارتمية على التولي.

يختلف تاثير البكتريوسين في الخلايا الهدف حسب مراحل او اطوار النموالبكتيري حيث تكون الخلايا اكثر حساسية للبكتريوسين في طور التضاعف اللوغارتمي مقارنة مع الاطوار الاخرى فالبكتريا في هذا الطور في حالة انقسام اضافة للتغيرات في غلافها يجعلها اكثر حساسية للبكتريوسين [22] .

جدول (2) : التاثير التحللي للانتروسين U36 المنقى لفعالية 400 وحدة /مليلتر في بكتريا الاختبار *L.monocytogenes* في الطور اللوغارتمي في مدد زمنية مختلفة

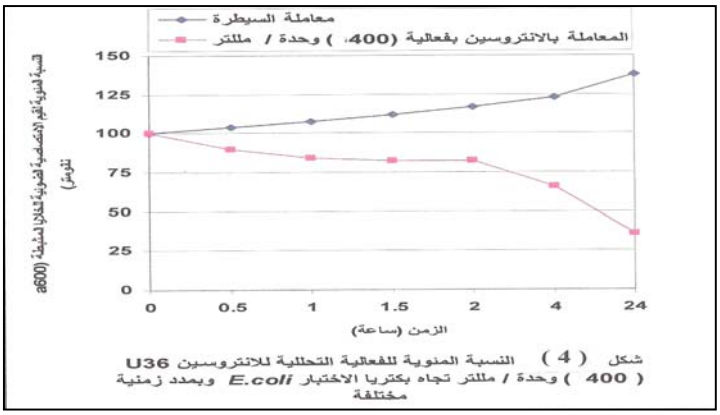
مدة التعرض للانتروسين	العدد اللوغارتمي للبكتريا المعاملة	العدد اللوغارتمي للسيطرة	النسبة المئوية للتثبيط	الاختزال في عدد الدورات اللوغارتمية	الامتصاصية الضوئية (0D) (600 نانومتر)	النسبة المئوية للخلايا الميتة
صفر (5 ساعات)	7.7	7.7	0.0	–	0.9	0.0
0.5 ساعة	4.34	8.3	43.6	3.36	0.78	13.34
1 ساعة	4	8.5	48.1	3.7	0.7	22.32
1.5 ساعة	3.5	8.8	54.6	4.2	0.68	24.45
2 ساعة	3.2	8.85	58.4	4.5	0.62	31.12
4 ساعة	3	8.9	61	4.7	0.52	42.23
24 ساعة	2	9	74	5.7	0.19	78.89

جدول (3): التاثير التحللي للانتروسينU36 المنقى لفعالية 400 وحدة/ مليلتر في بكتريا الاختبار*E.coli*في الطور اللوغارتمي في مدد زمنية مختلفة

مدة التعرض للانتروسين	العدد اللوغارتمي للبكتريا المعاملة	العدد اللوغارتمي للسيطرة	النسبة المئوية للتثبط (%)	الاختزال في عدد الدورات اللوغارتمية	الامتصاصية الضوئية (OD)(600نانو متر)	النسبة المئوية للخلايا الميتة
صفر (5 ساعات)	7.9	7.9	(0.0)	–	0.9	–
0.5 ساعة	5.7	8	27.84	2.2	0.81	10
1 ساعة	4.5	8.3	43.04	3.2	0.76	15.56
1.5 ساعة	4.1	8.6	48.1	3.8	0.74	17.78
2 ساعة	4	8.7	49.36	3.9	0.74	17.78
4 ساعة	3.5	9	55.69	4.4	0.59	34.45
24 ساعة	3	10	62.03	4.9	0.32	64.45

الفعالية المحللة للدنا

استخدم وسط DNase للكشف عن احد اليات عمل الانتروسينU36 وهو تحليل الدنا وقد اظهرت النتائج عدم امتلاك هذا النوع من الانتروسين الفعل المحلل للدنا حيث لم تظهر هالة شفافة حول القرص المشبع بالانتروسين (فعالية 400



شكل (4) النسبة المئوية للفعالية التحللية للانتروسين U36 (400) وحدة / مللتر تجاه بكتريا الاختبار *E.coli* وبمدد زمنية مختلفة

وحدة / مليلتر) عند مقارنتها بالسيطرة الموجبة *S. aureus* المحللة للدنا وذلك بظهور منطقة شفافة حول القرص الحاوي على النمو البكتيري والسيطرة السالبة *S. epidermides* غير المحللة للدنا .

الفعالية الحالة للغشاء الخلوي

استخدم وسط اكارالفينولفثالين ثنائي الفوسفات في الكشف عن الية عمل الانتروسينU36 في تحليل الغشاء السايتوبلازمي حيث تعد طريقة بسيطة وسريعة الاستخدام وقد اظهرت النتائج امتلاك الانتروسينU36 المنقى بفعالية 400 وحدة / مليلتر القابلية على تحطيم الغشاء السايتوبلازمي وذلك بظهور اللون الوردي البراق حول قرص الانتروسين بعد اضافة الكاشف من محلول40 % NaOH ان تحلل الغشاء السايتوبلازمي لبكتريا الاختبار الحساسة ادى الى افراز وانتشار الفوسفتاز القاعدي (ALP) الموجود في الفراغ البلازمي الى الوسط الصلب الحاوي على المادة الاساس له ومن ثم حصول التفاعل الانزيمي الذي يؤدي الى تحريرمادة الفينولفثالين بصورة حرة الى الوسط ، وعند المعاملة بالقاعدة يرتفع الرقم الهيدروجيني مما يسبب ظهور اللون البراق [11].وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه الباحثون ان اغلب انواع البكتريوسينات التي تعود الى مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك تمتلك الفعالية المحللة للغشاء السايتوبلازمي .

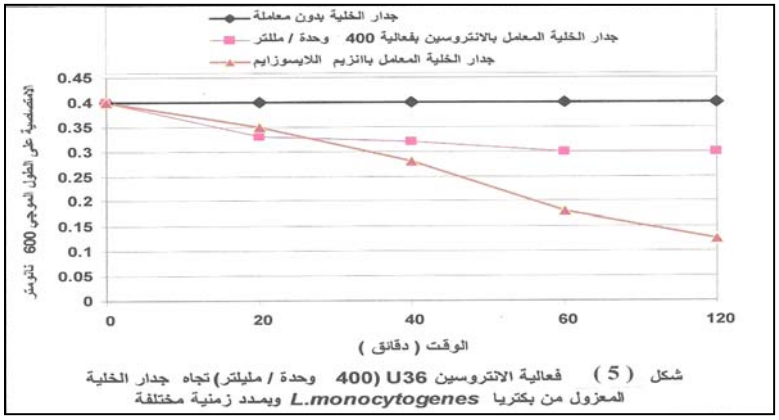
فعاليـة الانتروسين U36المنقى تجـاه جـدار خلايـا بكتريا الاختبارالموجبة والسالبة لملون كرام

درست فعالية الانتروسين U36 المنتج من العزلة المحلية EFU36 تجاه الخلايا المعزولة من بكتريا الاختبار *E.coli* و *L.monocytogenes* و *Shigella sp.* . وبينت النتائج عدم وجود تأثير للانتروسينU36بفعالية 400 وحدة / مليلتر تجاه الجدار الخلوي لكل من بكتريا الاختبار *L.monocytogenes* و*E.coli* على الرغم من حساسية هذه العزلات تجاه الفعل التحللي للانتروسينU36 المنقى. وايضا انعدام الفعالية تجاه جدار بكتريا *Shigellasp* التي لم تتأثر بالفعالية المثبطة للانتروسين U36 , وقد سجل اختزال بسيط في درجة العكارة من خـلال الانخفاض بقيم الامتصاصية الضوئية للـجدار المعزول مـن بكتريا *L.monocylogenes* شكل (5) والمعامل بالانتروسين U36 بفعالية 400 وحدة/ مليلتر مقارنة بمعامل السيطرة السالبة والمتمثلة بجدار الخلية غير المعامل بالانتروسين والسيطرة الموجبة الذي يمثل جدار الخلية المعامل بالانزيم الحال (Lysozyme) والذي سجـل انخفاضاً واضحاً في قيم الامتصاصـية الضوئـية.

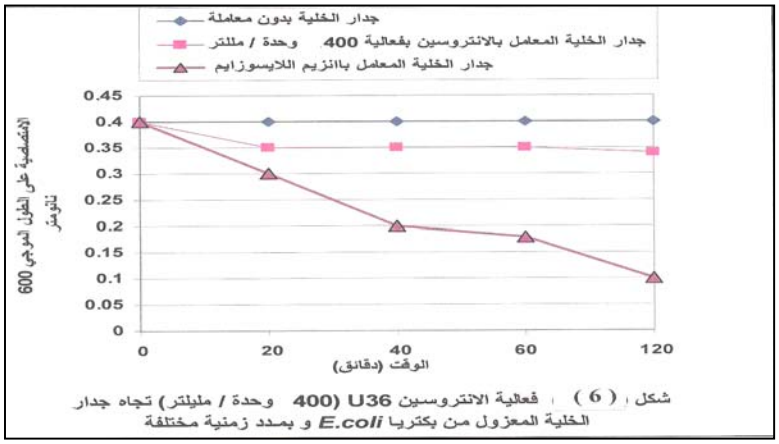
كمـا لـم يتأثر الجدار المعزول مـن بكتريـا الاختبار *E.coli* شكل (6) وبكتريا *Shigellasp.* شكل (7) بالانتروسين U36، فـي الوقت نفسه اظهر الجدار المعزول لكـلا النوعين تحللاً بالانزيم الحال وخاصة جدار الخلية السالبة لملون كرام . وفي ضوء النتائج اعلاه أستدل ان جدار الخلية لا يمثل الهدف الاساس للفعالية ضد البكترية للانتروسين U36 المنتج من العزلة المحلية EFU36 ، ولا يمتلك تأثير على الـ DNA انما يستهدف الغشاء الخلوي للبكتريا في الية عمله باعطاءه نتيجة ايجابية من خلال الاختبار الذي اجري بهذا الخصوص.

وقد أشارت العديد من الدراسات الحديثة ان الية عمل البكتريوسينات التي تعود الى البكتريا الموجبة لملون كرام تتركز على النفاذية للغشاء السايتوبلازمي دون حاجتها الى مستقبلات خاصة في الجدار الخلوي .

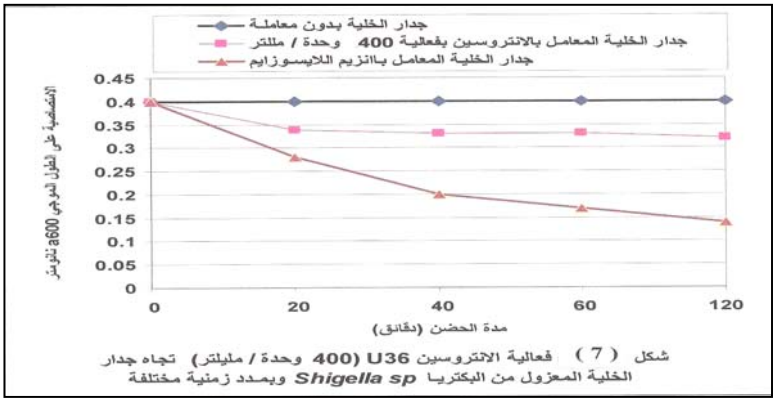
قد وضح [18]ان البكتريوسين AS-48 المنتج من *E.faecalis S-48 sub sp.liquefaciens* يمتلك الية عمل على الغشاء السايتوبلازمي من خلال احداث فتحات في الغشاء تودي الى تدفق الايونات من الخلية وبالتالي تحللها وموتها.



شكل (5) فعالية الانتروسين U36 (400 وحدة / مليلتر) تجاه جدار الخلية المعزول من بكتريا *L.monocytogenes* وبمدد زمنية مختلفة



شكل (6) فعالية الانتروسين U36 (400 وحدة / مليلتر) تجاه جدار الخلية المعزول من بكتريا *E.coli* و بمدد زمنية مختلفة



شكل (7) فعالية الانتروسين U36 (400 وحدة / مليلتر) تجاه جدار الخلية المعزول من البكتريا *Shigella sp* وبمدد زمنية مختلفة

المصادر:

1. Fimland, G. ; Jack , R . ; Jung, G.;Nes, I. F. and Nissen–Meyer, J. (2002). The bacteriocidal activity of pediocin pA-1 is specifically inhibited by a 15–mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C-terminus. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 5057–5060
2. Kawamoto,S. ; Shima,J. ; Sato,R. ; Eguchi,T. ; Ohmomo,S. ; Shibato,J. ; Horikoshi,N. ; Takeshita,K. and Sameshima,T. (2002) . Biochemical and genetic characterization of Mundticin KS, an antilisterial peptide produced by Enterococcus mundii NFRI 7393.Appl.Enviromn.Microbiol .68(8): 3830–3840.
3. Laurence, D. R.; Bennett, P. N. and Brown, M. J. (1997). Clinical Pharamacology. 8th ed. Churchill liungslon.
4. Riley, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annu. Rev.Genet. 32: 255–278.
5. Balla, E. ; Dicks, L.T. ; Toit, M.D. ; Van–Dermewe, M.J. and Holzapfel, W. H. (2000). Characterization and cloning of the gene encoding enterocin 1017A and enterocin 1017B, two antimiciobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. Appl. Environ. Microbiol. 66(4): 1298-1304.
6. Kandala,N.J.(2006).Production,Purification and Charactertzation of Enterocin from *Enterococcus faecalis* that Isolated Locally from Different Clinical Sources .Ph.D thesis ,college of science .Al-Mustansiriya University.
7. Nilsen, T. ;Nes, I.F. and Holo, H.(2003). Enterolysin A, a cell wall–degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl. Environ. Microbiol. 69(5) : 2975–2984.
8. Kabuki, T. ; Saito, T. ; Kawai, Y. ; Uemura, J. and Ltoh, T. (1997) Production, purifrication and characterization of reatericin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. International Journal of Food Microbiology. 34 : 145–156.
9. Umeda, A. ; Ueki, Y. and Amoko,K. (1985). Structure of the *Staphylococcus aureus*Cell-wall determind by freez – substitution method. J. Bacteriol. 169(6) : 2482 – 2487.

10. Harley, J. P. and Prescott, L .M . (1996). Laboratory Exercises in Microbiology. 3rd addition. Wcb.McGraw. Hill. USA.

11. Oxoid. (1982). Theoxoid manual of culture media, ingredients and other laboratory services. 5thedition . Published by Oxoid limited, Wide road, Basing stocke.

12. Salzano, G. ; Villain, F. ; Pepe, O. ; Sorrentino, E. ; Moschelti, G. and of Coppola, S.(1992). Conjugal transfer of plasmid–borne bacteriocin production in *Enterococcus faecalis* 226 NWC. FEMS. Microbiol. 99 : 1– 6.

13. Nes, I.F. and Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopolymers. 55(1): 50-61.

14. Yamamoto,Y. ; Togawa,Y. ; Shimosaka, M and Okazaki, M.(2003). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RS-11. Appl. Environ. Microbiol. 69(10) : 5746–5753.

15. Hirt,H. ; Schlivert , P. and Dunny , G.M . (2002) . In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by sex pheromone – sensing system of pCF10 . Infect. Immun.70(2) : 716–723.

16. Obrien, G.J. and Mahanty, H.K. (1994). Colicin 24, a new plasmid bornecolicin from auropathogenic strain of *E.coli*. Plasmid. 31 : 283–296.

17. Rodriguez, S.L. ; Gaya, P. ; Medina, M. and Nunes, M. (1997). Bacteriocidal effect enterocin 4 on *listeria monocytogenes* in a model dairy system. J. Food .Prot. 60(1) : 28–32.

18. Sanchez – Barrena, M. J.; Martinez – Ripoll, M.; Galvez, A.; Valdivia, E. ;Magueda, M. ; Gruz, A. and Albert. A. (2003). Structure of bacterocin AS-48 from soluble state to membrane bound state. J. Mol. Biol. 334(3): 541–9.

19. Sanchez – Hidalgo, M.S. ;Maqueda; M. ; Gluvez, A. ; Abriouel, H. ; Valdivia, E. and Martinez – Bueno, M.(2003). The gene Coding for Enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. Appl. Environ. Microbiol. 69(3): 1633 – 1641.

20. Nunez, M. ; Rodriguez, J. L. ; Garcia, E. ; Gaya, P. and Medina, M.(1997). Inhibition of *Listeriamonocytogenes* by enterocin 4 during the manfacture and ripening of manchego cheese. J. Appl. Microbiol. 83(6) : 671–7.

21. Laukova, A. ;Juns, P. ; Vasillova, Z. and Papasova, I. (2000). Treatment of saniyary–important bacteria by bacteriocin. Substance V24 in cattle dung water. Lett. Appl. Microbiol. 30(5) : 402–406.

22. Ko, S. H. and Ahn, C.(2000). Bacteriocin production by *Lactococcuslactis* KCA 2386 isolated from kimchi food. Sci. Biotechnol. 9(4): 263–269.

23. Nes, I.F. ;Holo, H. ; Fimland, G. ; Hauge, H.H. ; Nissen-Meyer, J.(2002). Unmodified peptide –bacteriocin (class11) produced by lactic acid bacteria. In Peptide antibiotics, discovery, modes of action and application. Edited by C. J. Dutton, M. A. Haxell, H. A. I. McArthur and R. G. Wax. New York. Marcel Decker.