تاثير بعض المحثات في زيادة انتاجية الانتروسين U36 المنتج من بكتريا *Enterococcus faecalis* U36 المعزولة محليا من التهابات السبيل البولي

نهى جوزيف قندلا* غازي منعم عزيز* حسين خانقاه**

تاريخ قبول النشر 1 /3 /2010

الخلاصة

الانتروسين U36 (ENT U36) , هو بكتريوسين منتج من بكتريا *Enterococcus faecalis* U36 المعزولة محليا من عينات ادرار اخذت 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 *Lactococcus lactis* و *L. fermentum*، بالاضافة الى فعاليته التثبيطية ضد بعض الممرضات البكتيرية والتي تضمنت الانواع الاتية *Listeria mono cytogenes* و *Staphylococcus auraus* و *Streptococcus spp.* و *Escherchia coli* والعصيات المكونة للسبورات *Bacillus subtili s*.

حددت الظروف المثلى لانتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36 باستخدام المزارع المغمورة اذ اظهرت النتائج ان وسط الانتاجية الامثل للانتروسين اشتمل على مصادر كاربونية ومصادر نايتروجينية وبعض الاملاح ولقح الوسط بحجم نهائي 2% من لقاح بعدد خلايا حية $10X1^9$ خلية / مليلتر و رقم هيدروجيني امثل 6 عند درجة حرارة مثلى (35 – 37) ْم بسرعة 120 دورة / دقيقة اذ بلغت الفعالية النوعية 10×91^3 وحدة/ مليغرام بروتين. ودرس تاثير عدد من المحفزات للانتاجية مثل Chloramphenicol و B12 Vitamin وFolic Acid و Mitomycin-C في الوسط الامثل للانتاجية للعزلة المنتخبة وقد لوحظ ان استخدام 1.5% من المايتومايسين –C قد اعطى اعلى فعالية نوعية عندما بلغت $10 \text{ X } 103^3$ وحدة / مليغرام بروتين عند اضافته بعد 3 ساعات من المدة المثلى للانتاج.

الكلمات المفتاحيه: الانتروسينU36، U36 *Enterococcus faecalis*

المقدمة:

تتواجد بكتريا *E.faecalis* كنبيت طبيعي في الجهاز المعدي المعوي للقناة الهضمية (Gastrointestinal Tract) فضلا عن وجودها في الجهاز التناسلي الانثوي وفي تجويف الفم , وتعد من اكثر انواع جنس المكورات المعوية *Enterococcus* تواجدا وانتشارا كما ان نسبة انتاجها للانتروسين(البكتريوسين المنتج من هذا الجنس تحديدا) الاعلى مقارنة بباقي انواع المكورات المعوية سواء المعزولة من النبيت الطبيعي أو من مصادر سريريـة [1], وهي مركبات ذات طبيعة بروتينية تمتلك قابلية ابادة العديد من انواع البكتريا القريبة الصلة من الكائن المنتج او الحد من نموها[2]. يودي الانتروسين دوراً بيئيا ورئيسيا مهما في حياة الكائن المنتج بمعادلته التوازن المايكروبي بالامعاء فضلا عن استخدامه على الصعيد الطبي والعلاجي فـي علاج التهابات المعدة والامعـاء(Gasteroenteritis) للانسان والحيوان , و كمادة حافظة في الصناعات الغذائية [3].وتتحكم في عملية انتاج الانتروسين عدد من اليات البناء والتي تشمل المصدر الكاربوني والنتروجيني والفوسفات والاملاح والمحفزات والمنشطات مثل السكريات و الفيتامينات وحامض الفولك حيث تعد المحفزات كعوامل منظمة ثانوية تقوم بدور محفز في انتاج الانتروسين ولكن في احيان اخرى تودي الى كبح وتثبيط الانتاجية [4]. كمايتحدد انتاج الانتروسين بعوامل بيئية مختلفة منها كيمياوية واخرى فيزياوية. وتعد درجة الحرارة ,الرقم الهيدروجيني من العوامل المؤثرة في معظم الفعاليات الحيوية كالنمو والانتاجية بالاضافة الى عوامل اخرى ذات اهمية في انتاج البكتريوسين مثل حجم اللقاح والتهوية الجيدة وفترة الحضانـة حيث تساهم بشكل اساسي في زيادة الانتاجية .[5] [6] . و درس تأثير بعض المحفزات او المحثات مثل الاشـعة فوق البنفسـجية والمايتومايسين- C فـي انتاج الانتروسين من بكتريا *E.faecalis* [7] . و

*كلية العلوم /قسم التقنيات الاحيائية/ جامعة بغداد 290
** رئيس جامعة كركوك

نظرا للاهمية التطبيقية للانتروسين فقد جاء هذا البحث ليهدف الى تحديد الظروف المثلى لانتاج الانتروسين من العزلة المنتخبة والتي شملت مكونات الوسط الخاص وظروف تنميتها فضلا عن استخدام بعض المحثات لتحفيز الإنتاجية.

المواد وطرائق العمل:

العزلات البكتيرية وظروف التنمية

انتخبت العزلة المحلية U36 *Enterococcus faecalis* من مجموع 50 عزلة من بكتريا المكورات المعوية الاخرى [8] لكفائتها العالية وتاثيرها التثبيطي ضد عدد كبير من بكتريا الاختبار قيد الدراسة . حفظت هذه العزلة في (– 20ْم في وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Difco) مضافا له 20% كليسرول لحين استخدامها في التجارب اللاحقة. نميت جميع عزلات الاختبار البكترية التابعة لبكتريا حامض اللاكتيك *Enterococcus faecalis S10.* و *Lactococcus lactis* و *Lactobacillus fermentum*، في وسط Man Regosa Sharp Broth (Hi - media\ India) , اما العزلات *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *B.subtilis* و *Streptococcus sp.* و *Shigella sp* و *Escherichia coli* ATCC 25922 فقد نميت في وسط مرق 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 37 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 [9] .

تقدير تركيز البروتين

قدر تركيز البروتين باتباع الطريقة الموصوفة من قبل [10]والتي تعتمد على ارتباط صبغة Coomassi Brillient Blue – G250 بالبروتين مما يسهم في ظهور اللون الازرق وزيادة الامتصاص.

تعيين الظروف المثلى لانتاج الانتروسين

اخضعت العزلة المنتخبة لاختبارات مختلفة لتحديد الظروف المثلى لانتاج الانتروسين. تضمنت هذه الاختبارات استخدام اوساط مختلفة، ثم اختيار احداها وهو الوسط الذي مكن العزلة من انتاج الانتروسين بكفاءة، اخضع هذا الوسط لتغييرات في مكوناته شملت التغيير في نوع وتركيز المصدر الكربوني والنتروجيني والفوسفوري كما واختبرت بعض المحفزات للانتاجية والتي شملت Chloramphenicol و Folic acid و Vitamin B12 والمادة المحثة – Mitomycin C اضافة لاختبار درجات مختلفة من الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة كما ودرس تأثير التغيير في حجم اللقاح وفترة الحضانة على انتاج الانتروسين [11][12] .

*** تحديد الوسط الزرعي الامثل للانتاجية**

اختبرت كفاءة عدد من الاوساط الزرعية المختلفة في قابلية العزلة المنتخبة في انتاج الانتروسين، حيث نميت هذه العزلة في الاوساط الزرعية السائلة Man Regosa Sharp Broth (MRS) , Brain Heart Infusion Broth(BHI), Tryptic Soy Broth (TSB) , Tryptose Broth (TB), TryptoneYeast Extract Broth (TYE), Glucose Yeast Broth (GYB), Nutrient Broth (NB) , Cooked Meat Media (CMM) , Thioglucolate Broth (THB), Casein Glucose Broth (CGB).

واتبعت الطريقة الموصوفة وحسب ماجاء في [6] ثم قيست الفعالية لراشح الانتروسين الخام والتركيز للبروتين..

*** تحديد نوع المصدر الكاربوني وتركيزه الامثل**

اختبرت كفاءة مصادر كاربونية عدة شملت المالتوز والكلوكوز والكليسرول والسكروز واللاكتوز والفركتوز والنشا بتركيز 0.2 % حيث اضيفت هذه المصادر الى الوسط الانتاجي الامثل فضلا عن معاملة السيطرة الخالية من المصدر الكاربوني ، وبعد انتخاب افضل المصادر الكاربونية (الكلوكوز والكليسرول) ، ثم تحديد تراكيزهما المثلى بتدعيم الوسط الانتاجي بتراكيز مختلفة من احد المصدرين شملت (0 و 0.1 و 0.2 و 0.4 و 0.8 و 1.2 و 1.6 و 2 و 2.4 و 3) % قيست الفعالية لراشح الانتروسين الخام والتركيز للبروتين.

***تحديد المصدر النتروجيني الامثل وتركيزه**

لاجل اختبار المصدر النتروجيني الملائم لانتاج الانتروسين، استخدمت مصادر نتروجينية عضوية متنوعة والتي تعد من مكونات الوسط الزرعي الانتاجي مرق نقيع القلب والدماغ وشملت على مستخلص الخميرة والببتون والتربتون ومستخلص اللحم وبتراكيز مختلفة فضلا عن المصدر النتروجيني غير العضوي نترات البوتاسيوم.

وقد اختبر تأثير التراكيز المثلى لكل مصدر من المصادر النتروجينية السابقة في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية وحسب الجدول الاتي:

المعاملات	الوسط الزرعي مضافا له احدى المصادر النتروجينية	تركيز المصدر النتروجيني %
المعاملة الاولى	Modefied BHIB	–
	M- BHIB+Tryptone	0 و 1 و 1.5 و 2 و2.5
	M- BHIB+Meat extract	0 و 0.35 و 0.7 و 1.5 و 2 و 2.5
	M-BHIB+Yeast extract	0 و 0.2 و 0.4 و 0.6 و 1.2 و 1.5 و2 و2.5
	M- BHIB+Peptone	0 و 0.5 و 1.2 و 1.5 و 2.5
	BHIB+KNO3	0 و 0.5 و 0.75 و 1
المعاملة الثانية	Tryptone + M-BHIB +Yeast extract	0.6و1.5
	M- BHIB + Peptone +Meat extract +Yeast extract + Tryptone	1.5 و0.35 و 0.6و1.5
	M- BHIB	–

تأثير تركيز الفسفور في انتاج الانتروسين

درس تأثير فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين في انتاج الانتروسين حيث حضر الوسط الانتاجي مضافا له تراكيز مختلفة من Na2HPO4 (0 و 0.1 و 0.2 و 0.25 و 0.5) % ثم اختبرت فعالية الانتروسين وتركيز البروتين.

تأثير تركيز كلوريد الصوديوم في انتاج الانتروسين

درس تأثير كلوريد الصوديوم في انتاج الانتروسين حيث حضر الوسط الانتاجي مضافا له تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (0 و 0.5 و 1 و 1.5 و 2 و 2.5) % ثم اختبرت فعالية الانتروسين وتركيز البروتين.

تحديد تركيز اللقاح الامثل للانتاج

استخدم الوسط الغذائي المكون من تربتون 1.5% و مستخلص الخميرة 0.6% و الكلوكوز 1.2% و الكليسرول 1.0% وكلوريد الصوديوم 1.0% و Na_2HPO_4 0.25% وسطا للانتاج في التجارب اللاحقة بناء على نتائج التجارب السابقة ثم حضر اللقاح من البكتريا الحية بتراكيز تراوحت بين (10^1 – 10^9) خلية / مليلتر ولقح الوسط باضافة 1 % من كل تركيز وحضن بدرجة حرارة 37ْم لمدة 18 ساعة ثم قدرت الفعالية للمستخلص الخام للانتروسين وتركيز البروتين . ودرس تأثير حجم اللقاح في التركيز الامثل للخلايا على فعالية الانتروسين حيث انتخبت 1 % و 2 % و 4 % و 8 % من التركيز الامثل لعدد الخلايا 10^9 خلية / مليلتر ثم اختبرت فعالية الانتروسين وتركيز البروتين.

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل

حضر الوسط الانتاجي الامثل بارقام هيدروجينية مختلفة شملت (3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 و11) كلا على انفراد لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانتروسين ثم اختبرت فعالية الانتروسين وتركيز البروتين.

تحديد درجة الحرارة المثلى

حددت درجة الحرارة المثلى للانتاجية والتي شملت (25 و 30 و 35 و 37 و 40 و 42 و 45 و 48) ثم اختبرت فعالية الانتروسين وتركيز البروتين.

مدة الحضانة المثلى لانتاج الانتروسين

لقح وسط الانتاج باضافة 2% من المزروع البكتيري بعدد 10^9 خلية/ مليلتر بعمر 24 ساعة وحضن بدرجة حرارة 37ْم لمدد حضانة مختلفة شملت (0– 48) ساعة ثم اختبرت فعالية الانتروسين وتركيز البروتين .

- تأثير بعض المركبات في انتاج الانتروسين

اختبر تأثير بعض المركبات في انتاج الانتروسين وشملت الكلورامفينكول وحامض الفولك وفيتامين B12 [13][14] , حيث اضيفت هذه المركبات الى الوسط الانتاجي المنتخب بعد التعقيم بالتراكيز الاتية (3 و 6 و9 و12 و15) مايكروغرام/ مليلتر كلا على انفراد ثم اختبرت فعالية الانتروسين وتركيز البروتين.

اختبار تركيز المايتومايسين - C المناسب لحث الانتروسين

اختبر تأثير المادة المحثة المايتومايسين – C بتراكيز نهائية مقدارها (0.5 و 1 و 1.5 و 2) مايكروغرام / مليلتر في الوسط الانتخابي الامثل اعلاه مع الاحتفاظ بمعاملة السيطرة بدون اضافة مايتومايسين – C. بعد تحديد التركيز الذي اعطى افضل انتاجية ثم تعيين وقت الاضافة الامثل للمايتومايسين حيث اختبرت الفترات الزمنية الاتية (1 و 3 و 5 و 7 و 24) ساعة وبعد جمع الراشح لكل فترة زمنية قيست الفعالية للانتروسين المنتج وتركيز البروتين.

النتائج والمناقشة

اختبرت القابلية التثبيطية للعزلة المحلية U36 *Enterococcus faecalis* 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 *Enterococcus faecalis* U36 يمتلك فعالية تثبيطية ضد الممرضات البكتيرية والتي تضمنت , *Staphylococcus auraus* و *Listeria monocytogenes* و *Streptocoous sp.* 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 *Lactococcus lactis* و *Lactobacillus fermentum* (جدول 1).

جدول(1) : قابلية العزلة المحلية *E. faecalis U36* المنتجة للانتروسين ضد عزلات بكتريا الاختبار بطريقة well diffusion method في وسط نقيع القلب والدماغ السائل

Micoorganism	Sensitivity[b]
Enterococcus faecalis S10	+++
Escherichia coli ATCC 25923	++
Lactobacillus fermentum	+++
Lactococcus lactis 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 [15] عند انتاج البكتيريوسين من *E.faecalis* IUTA4 الذي كان فعالا ضد *Lactobacillus sp.* و *L. monocytogenes* . لقد اشار [16] الى ان اغلب انواع البكتيريوسينات المعزولة من بكتريا حامض اللاكتيك والتي من ضمنها المكورات المعوية فعالة ضد بكتريا *L. monocytogenes*. فيما بين[5] 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.* .

تحديد الظروف المثلى لانتاج الانتروسين

اختبار الوسط الامثل لانتاج الانتروسين

عد وسط مرق نقيع القلب والدماغ من افضل الاوساط الغذائية لكفاءته في انتاج الانتروسين وتأثيره تجاه عزلات من بكتريا الاختبار هي *Lc.lactis* و *Lb.fermentum* و *S.aureus* و *S.pyogenes* و *S.pneumoniae* و *E.coli* و *E.faecalis S23* و *L. monocytogenes* وبأقطار تثبيط تراوحت (21 و 21 و 20 و 15 و 14 و 15 و 20 و 24) مليمتر على التوالي.

وتباينت قابلية الاوساط الاخرى في انتاج الانتروسين فقد تفاوتت الفعالية االتضادية للانتروسين تجاه بكتريا الاختبار اذ تأثرت 7 عزلات من بكتريا *الاختبار* براشح الوسط الزرعي Tryptic Soya . واظهرت رواشح الاوساط السائلة الاخرى Thioglycolate و Cooked Meat Medium و Tryptose و Casein Glucose و TryptoneYeast Extract فعالية تثبيطية تجاه 4 عزلات فقط من بكتريا الاختبار , بينما تأثرت عزلتان فقط *L.monocytogenes* و *Lc.lactis* براشح وسط المرق المغذي (Nutrient Broth) ولم تظهر اي من رواشح الاوساط المستخدمة فعالية تجاه عزلات البكتريا السالبة لملون غرام *Shigella sp.* و *Acinetobacter sp.* و *P. aeruginosa* . أشار[3] الى أن وسط مرق نقيع القلب والدماغ يعد من الأوساط الملائمة في انتاج الانتروسين EJ97 من بكتريا *E. faecalis* J–97 .

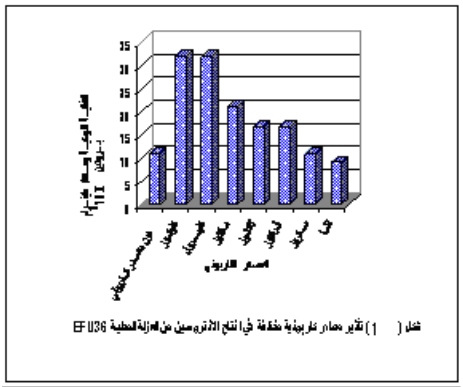
المصدر الكاربوني الأمثل .

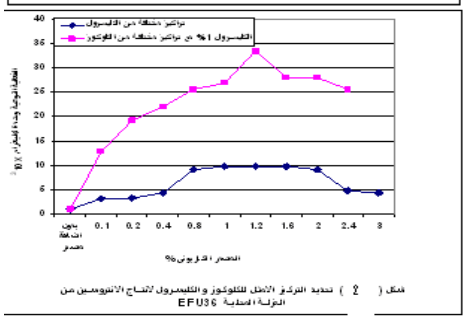
اظهرت النتائج المبينة في شكل (1) ان الكليسرول والكلوكوز كانا المصدرين الملائمين فقد بلغت الفعالية النوعية للانتروسين المنتج من العزلة المحلية EFU36 تجاه بكتريا الاختبار *L.monocytogenes* حوالي 3.2×10^3 وحدة / مليغرام بروتين مقارنة بالمعاملة الخالية من المصدر الكاربوني اذ بلغت الفعالية النوعية للانتروسين 1×10^3 وحدة/مليغرام بروتين.اما النشأ فقد اتصف بقابليته الضعيفة في تحفيزالعزلة EFU36 في إنتاج الانتروسين اذ بلغت الفعالية النوعية 8×10^2 وحدة/مليغرام. ويتضح من النتائج المستحصلة من هذه الدراسة أن تحفيز إنتاج الانتروسين يتحدد باحتواء الوسط الغذائي على المصدر الكاربوني فضلا عن نوع هذا المصدر الكاربوني وهذا ما يعكس انخفاض إنتاج الانتروسين من البكتريا عند تنميتها في وسط غذائي خالي من المصدر الكاربوني.

تحديد التراكيز المثلى للكليسرول والكلوكوز

أضيف كل من الكلوكوز والكليسرول كأفضل مصدرين للكاربون إلى الوسط الإنتاجي بتراكيز مختلفة لاجل تحديد التركيز الأمثل لهما في إنتاج الانتروسين (شكل 2) وظهر بان أعلى فعالية نوعية للانتروسين كانت 9.8×10^3 وحدة/مليغرام عند تركيز 1% من الكليسرول وانخفضت الفعالية النوعية للانتروسين عند اضافة تراكيز عالية من الكليسرول في الوسط الغذائي حتى وصلت 4.4×10^3 وحدة / مليغرام بروتين عند تركيز 3%. أما المعاملة الثانية فقد تم تثبيت تركيز الكليسرول في الوسط الغذائي لانتاج الانتروسين بـ 1% مع اضافة تراكيز مختلفة من الكلوكوز مما ادى إلى زيادة ملحوظة في الفعالية النوعية للانتروسين الناتج (شكل 2). حيث بلغت الفعالية النوعية أقصاها 33.4×10^3 وحدة/ مليغرام عند تركيز 1.2% كلوكوز. لذلك اعتمد المصدرين الكليسرول والكلوكوز بتركيز 1% و 1.2% على التوالي كمصادر كربونية ملائمة في تدعيم الوسط الغذائي في التجارب اللاحقة.

وقد ذكر [6] ان اضافة 4% من الكلوكوز الى الوسط الغذائي يحفز انتاج الانترولايسين A من بكتريا *E.faecalis* . وقد أكدت الدراسات التي أجريت من قبل [17] و[18] ان الكليسرول يعد من المصادر الكاربونية الجيدة إذ يحفز إنتاج الكولسين من بكتريا *E.coli* عند اضافته للوسط الزرعي بتركيز 5%.

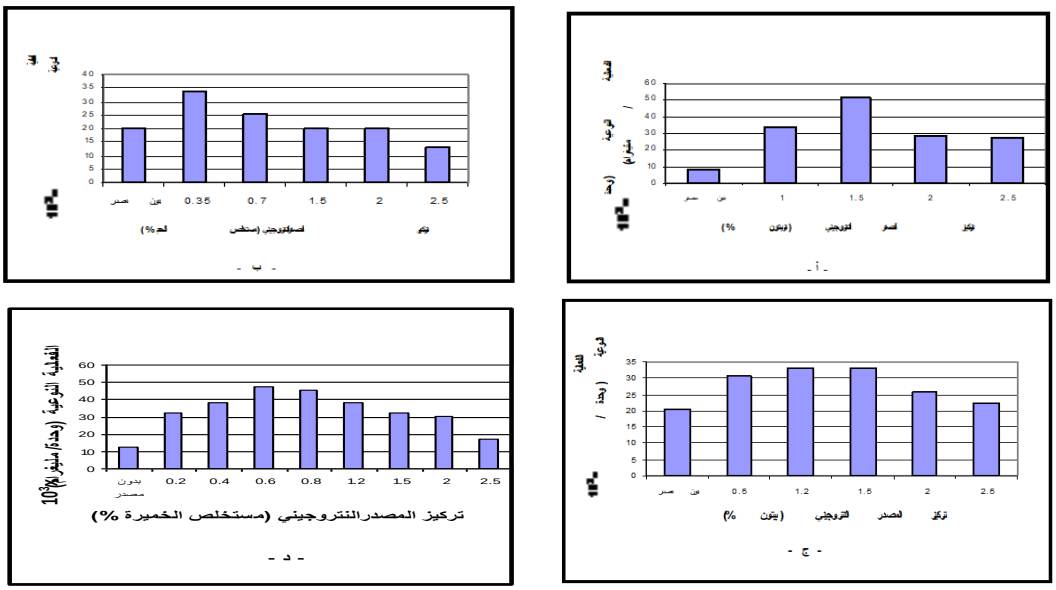




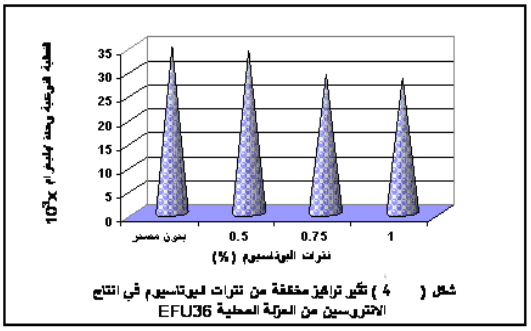
تعيين المصدر النتروجيني وتركيزه الامثل

أظهرت النتائج أن الوسط الزرعي الحاوي على التربتون بتركيز 1.5% (شكل 3- أ) هو الأفضل إذ بلغت الفعالية النوعية $^{3}10x51.2$ وحدة/مليغرام تجاه بكتريا *L.monocytogenes* مقارنة بالفعالية النوعية للوسط الزرعي الحاوي على التركيز الأصلي لهذه المادة ضمن مكوناته والبالغة $^{3}10x33$ في حين تأثرت الفعالية النوعية عند إزالة هذا المصدر إذ انخفضت إلى $^{3}10x8.8$ وحدة/مليغرام. في حين تناقصت إنتاجية الانتروسين عند إضافة مستخلص اللحم إلى الوسط الزرعي بتركيز 0.7% عندما بلغت الفعالية النوعية $^{3}10 \times 25.6$ عن الفعالية النوعية للتركيز الاصلي للمصدر في الوسط الزرعي حيث كانت $^{3}10 \times 34.3$ وحدة/مليغرام بروتين، وتأثرت الانتاجية قليلا عند ازالته من الوسط الزرعي بفعالية نوعية $^{3}10 \times 19.7$ وحدة/مليغرام (شكل 3- ب). ولم تتأثر إنتاجية الانتروسين كثيراً عند إضافة البيتون بالتراكيز المحددة إلى الوسط الزرعي مقارنة بالتركيز الأصلي لها بالوسط الزرعي (شكل 3- ج) إذ بلغت أعلى فعالية نوعية $^{3}10x\ 33$ عند التركيز 1.2%، وانخفضت قليلا عند مقارنتها بالوسط الزرعي الخالي من هذا المصدر حيث بلغت الفعالية النوعية له $^{3}10x20.5$ وحدة/مليغرام.

أما مستخلص الخميرة فقد كانت أعلى فعالية نوعيه $^{3}10x47.6$ وحدة/مليغرام عند تركيز 0.6% . ومن جهة أخرى تناقصت هذه الفعالية كثيراً عند إزالة هذا المصدر من الوسط الزرعي إذ بلغت $^{3}10x12.8$ وحدة/مليغرام (شكل 3- د). ولم يؤثر اضافة المصدر النتروجيني اللاعضوي نترات البوتاسيوم الى الوسط الزرعي في انتاج الانتروسين عندما بلغت الفعالية النوعية $^{3}10x34.1$ بتركيز 0.5% المنخفضة قليلا عن الفعالية النوعية للانتروسين في الوسط الزرعي الخالي من هذا المصدر عندما بلغت $^{3}10x34.9$ وحدة لكل ملغرام بروتين (شكل 4). وفي ضوء هذه النتائج تم انتخاب افضل مصدرين للنتروجين كانا الاكفأ في اظهار اعلى انتاجية للانتروسين، وشملت التربتون 1.5% ومستخلص الخميرة 0.6% ليشكلا احد مكونات الوسط الانتاجي. يؤدي هذا التباين في التراكيز للمواد المجهزة للوسط الزرعي دوراً مهماً في انتاجية البكتريوسين من قبل الاحياء المجهرية [12] .



شكل (3) تأثير مصادر نتروجينية مختلفة في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية *E. faecalis U36*



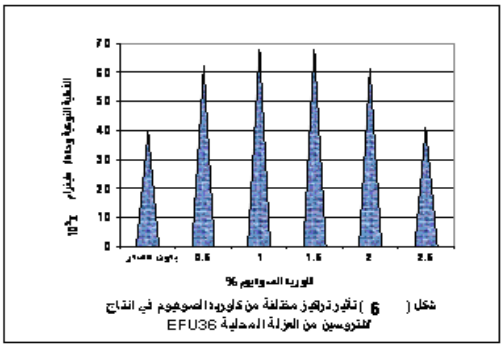
شكل (4) تأثير تراكيز مختلفة من نترات البوتاسيوم في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36

تأثير فوسفات الصوديوم في انتاج الانتروسين

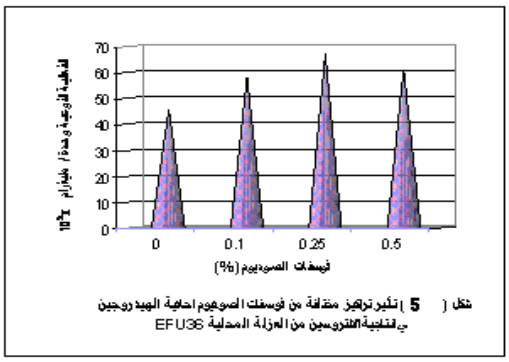
اختبرت تراكيز مختلفة من فوسفات الصوديوم احادي الهيدروجين (0-0.5)% لمعرفة التركيز الامثل لانتاج الانتروسين، وتشير النتائج المبينة في شكل (5) ان تركيز 0.25% من فوسفات الصوديوم كان الامثل للحصول على اعلى انتاجية من الانتروسين اذ بلغت الفعالية النوعية $10x67.1^3$ وحدة/ مليغرام مقارنة بالمعاملة الخالية من فوسفات الصوديوم اذ كانت الفعالية النوعية حوالي $10x45.5^3$ وحدة /مليغرام.

تأثير كلوريد الصوديوم في انتاج الانتروسين

اختبرت تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl لتحديد التركيز الأمثل في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36. تبين النتائج الموضحة في شكل (6) حاجة العزلة الى كلوريد الصوديوم في إنتاج الانتروسين من ملاحظة حدوث زيادة تدريجية في انتاج الانتروسين عند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم اذ بلغت الفعالية النوعية حوالي $10x68.3^3$ وحدة /مليغرام عند التركيزين 1 و 1.5% بعدها انخفضت لتصل الى حوالي $10x41^3$ وحدة / مليغرام عند تركيز 2.5% بينما كانت الفعالية النوعية للانتروسين $10x\ 39.4^3$ وحدة/ مليغرام في الوسط الغذائي الخالي من كلوريد الصوديوم.



شكل (6) تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36

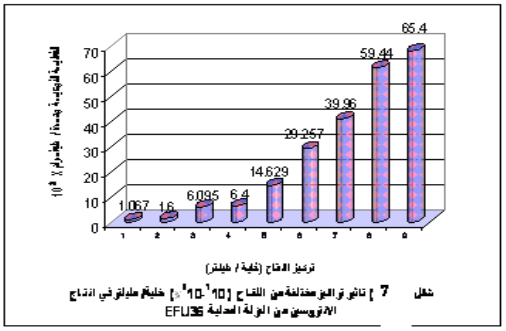


شكل (5) تأثير تراكيز مختلفة من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين في انتاجية الانتروسين من العزلة المحلية EFU36

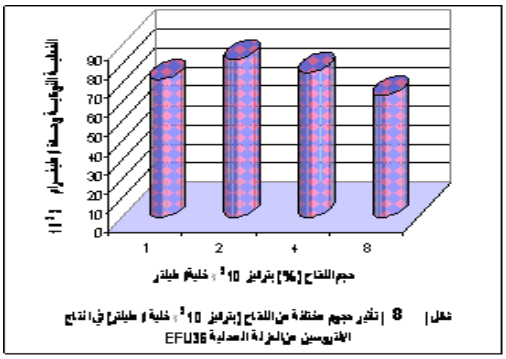
تعيين اللقاح الأمثل لانتاج الانتروسين

لوحظ زيادة تدريجية في انتاج الانتروسين مع زيادة اعداد الخلايا في كمية اللقاح المضاف الى الوسط الزرعي حيث بلغت اعلى انتاجية عند اضافة $10\ X\ 1^9$ خلية / مليلتر اذ بلغت الفعالية النوعية للانتروسين $10X65.4^3$ وحدة / مليغرام (شكل - 7).

كما بينت النتائج ان تلقيح الوسط الغذائي باعداد قليلة من الخلايا ($10^1 - 10^4$) خلية / مليلتر قد تكون غير كافية للانتاج العالي للانتروسين ، في حين ان زيادة تركيز اللقاح ضمن الحدود المثلى يجعل الخلايا في حالة تنافس فتبدأ بانتاج الانتروسين لادامة حياة البكتريا من التغيرات المزرعية . ولتحديد حجم اللقاح ضمن التركيز الامثل لعدد الخلايا والبالغ10^9 خلية / مليلتر, لوحظ ان حجم اللقاح 2% بعدد خلايا 10^9 خلية / مللتر كان الامثل للحصول على أعلى فعالية نوعية للانتروسين المنتج اذ بلغ $10x74.5^3$ وحدة/مليغرام، ألا إنها أخذت بالانخفاض مع زيادة حجم اللقاح عن ذلك وكانت الفعالية النوعية للانتروسين $10x\ 51.2^3$ وحدة / ملغرام بروتين عند حجم لقاح 8% (شكل - 8)



شكل 7] تأثير تراكيز مختلفة من اللقاح [10^1-10^9] خلية مليلتر في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36



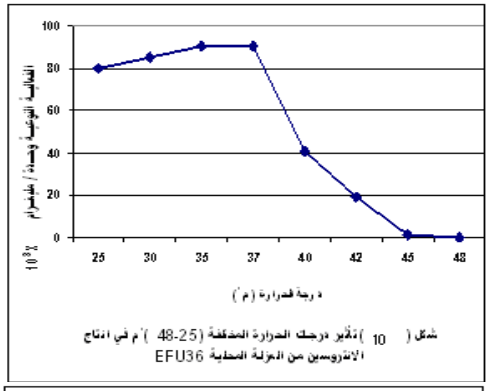
شكل (8) تأثير حجوم مختلفة من اللقاح [بتراكيز 10^5 خلية / مليلتر] في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36

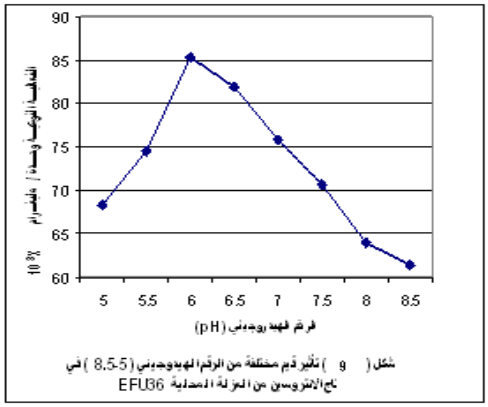
تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانتروسين

اظهرت النتائج ان اقصى فعالية نوعية للانتروسين كانت عند الرقم الهيدروجيني 6 ومقدارها $10x85.3^{3}$ وحدة / مليغرام بروتين مع انخفاض ملحوظ في قيم الفعالية النوعية عند الارقام الهيدروجينية الاقل والاعلى من 6 حيث نجد انخفاضا للفعالية النوعية عند الرقم الهيدروجيني 5 عندما وصل الى $10x68.7^{3}$ وحدة / مليغرام بروتين، اما الفعالية النوعية فقد بلغت $10x61.4^{3}$ وحدة / مليغرام عند الرقم الهيدروجيني 8.5 (شكل - 9) . تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحثون عند دراستهم تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج البكتريوسين ووجدوا ان افضل انتاجية للبكتريوسين المنتج من بكتريا *E.faecalis* كانت عند الرقم الهيدروجيني 6 [5][6]

تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانتروسين

درس تأثير مدى من درجات الحرارة تراوح بين (25 – 48) م في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36، وبينت النتائج وجود زيادة في الفعالية النوعية عند درجة حرارة (35 و 37) م اذ بلغت $X\ 90.4\ 10^{3}$ وحدة/مليغرام على التوالي بعدها انخفضت انخفاضا واضحا مع ارتفاع درجة الحرارة حتى وصلت الفعالية النوعية 10^{3} 41 x 10^{3} و19.1 x 10^{3} وحدة / مليغرام بروتين عند درجتي حرارة 42˚م و 45˚م على التوالي مع فقدان الفعالية النوعية عند درجة حرارة 48مْ (شكل - 10)، مما يشير الى حساسية العزلة المحلية EFU36 للدرجات الحرارية وعلاقة ذلك بانتاج الانتروسين في الوسط . ووجد [6] ان اعلى فعالية نوعية للانتروسين A كانت 5120 وحدة / مليغرام عند درجة حرارة 35مْ في حين ذكرت دراسة اخرى ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الانتروسين من بكتريا *E. faecalis* كانت 30˚م [5].





شكل (10) تأثير درجات الحرارة المختلفة (25-48)˚م في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36

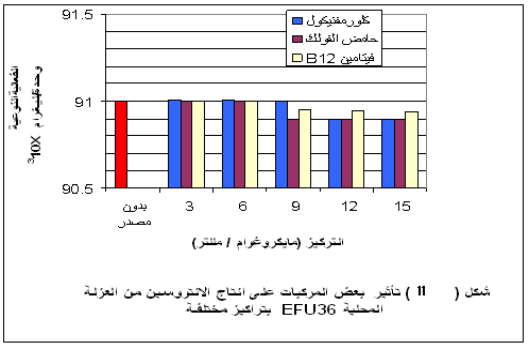
شكل (9) تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (5-8.5) في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36

تحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج الانتروسين

تم متابعة تطور إنتاج الانتروسين من العزلة المنتخبة في مدد زمنية مختلفة وقد بدأ انتاج الانتروسين بعد 6 ساعات من تلقيح الوسط الغذائي بفعالية نوعية بلغت 640 وحدة/ مليغرام بروتين ووصلت أقصاها بعد 12 ساعة من الحضن بفعالية نوعية 91.3 x 10^{3} وحدة / مليغرام بروتين ، واستمرت الفعالية بالثبات حتى 32 ساعة بعدها بدأت بالانخفاض التدريجي فيما كان انتاج الانتروسين CC4231 من بكتريا *E.faecalis* في وسط حليب فول الصويا يتناسب طرديا مع النمو اذ بدأ الانتاج بعد ساعتين من الحضن ليصل اقصاه ما بين 18 – 24 ساعة [19].

تأثير بعض المركبات على انتاج الانتروسين

لتحديد تأثير بعض المحفزات على إنتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU 36 تم اضافة كل من الكلورمفنكول وحامض الفوليك وفيتامين B12 كلا على حدة بتراكيز مختلفة إلى الوسط الإنتاجي للانتروسين، لم تظهر اي من المركبات قيد الدراسة زيادة ملحوظة في الفعالية النوعية للانتروسين وكما مبين في شكل (11) عند مقارنتها بالوسط الزرعي الخالي من هذه المركبات والذي بلغ 91 x 10^{3}وحدة / مليغرام.

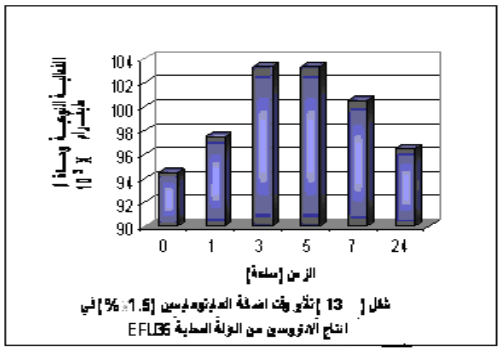


شكل (11) تأثير بعض المركبات على انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36 بتراكيز مختلفة

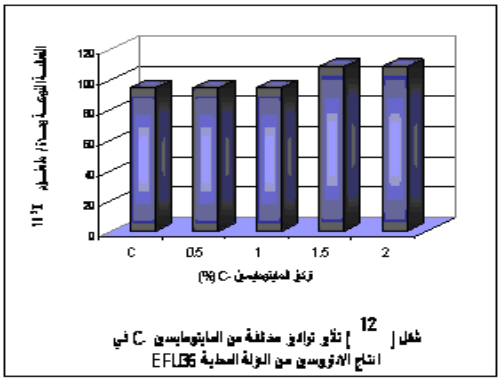
تاثير المايتومايسين – C على استحثاث انتاج الانتروسين

اظهرت النتائج الموضحة في شكل (12) عدم تاثر الانتاجية عند معاملة العزلة بتركيزي 0.5 % و 1% من المايتومايسين –C في حين ارتفعت الفعالية النوعية لتصل الى 103.4 × 10 ^{3} وحدة / مليغرام بروتين عند معاملة العزلة بالتركيزين 1.5 % و 2 % من المايتومايسين مقارنة بالفعالية النوعية للانتروسين المنتج في الوسط الانتاجي الامثل والبالغة 91 × 10^3 وحدة /.

حددت المدة الزمنية المثلى للمعاملة بالمايتومايسين –C . اذ اظهرت النتائج والموضحة في شكل (13) ان المعاملة بالمايتومايسين لمدة 3 و 5 ساعة كانت هي الامثل في اعطاء اعلى فعالية نوعية اذ بلغت103 × 10 ^{3} وحدة/ مليغرام . لذا عدت المعاملة بالمايتومايسين –C بتركيز1.5 % ولمدة 3 ساعات هي الامثل في استحثاث انتاجية الانتروسين . ويعزا استخدام المايتومايسين –C كمادة حاثة لقدرته على الاستحثاث بالتراكيز الواطئة وزيادة انتاجية البكتريوسين وهو من المواد الشائعة الاستخدام في هذا المجال [20] . وبينت نتائج الظروف المثلى لانتاج الانتروسين باستخدام المزارع المغمورة أن الوسط الإنتاجي الأمثل والمحضر في هذه الدراسة ذي كفاءة عالية في زيادة الانتاجية للانتروسين من العزلة المنتخبة والمكون من الكلوكوز 1% والكليسرول1.2% كمصادر كربونية و 1.5 % و 0.6% من التربتون ومستخلص الخميرة على التوالي كمصادر نتروجينيةو1% كلوريد الصوديوم و0.25% فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين وبعد تثبيت باقي الظروف المثلى للانتاج من درجة الحرارة (37) م والرقم الهيدروجيني الامثل (6) وتركيز اللقاح (10^9 خلية / مليلتر) وبحجم 2% ومدة التخمير(12 ساعة) مع امكانية زيادة انتاجية الانتروسين بالظروف المثلى باستخدام المادة الحاثة المايتومايسين بتركيز 1.5% وبمدة تعرض 3 ساعات حيث بلغت اعلى فعالية نوعية10X103^3 وحدة / مليغرام بروتين.



شكل (13) تأثير وقت اضافة المايتومايسين [1.5 %] في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36



شكل (12) تأثير تراكيز مختلفة من المايتومايسين C- في انتاج الانتروسين من العزلة المحلية EFU36

C : الوسط الانتاجي الامثل (معاملة سيطرة)

المصادر :

1-Kau, A.L.; Martin, S.M.; Lyon, W.; Hayes, E.; Caparon, M.G. and Hultgren, S.J. 2005. *Enterococcus faeclis* tropisa for the kindney in the urinary tract of C57BL/6J Mice. Infect . Immun. 73(4):2461–2488.

2-Luders, T. ; Birkemo,G.A. ; Fimland, G. ; Nissen- Meyer, J. and Nes, I.F.2003 . Strong synergy between eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria . Appl . Environ. Microbiol. 69(3) : 1797–1799.

3-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.

4-Ogunbanwo, S.T. ; Sanni, A.I. and Onilude, A.A.2003. Influence of

principle of protein – dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.

11-Nilsen,T. ; Ingolf,F. and Holo, H. 1998 . An exprted inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492 . J. Bacteriol. 180(7) : 1848–1854.

12-Ogunbanwo, S.T. ; Sanni, A. I. and Onilude, A. A. 2003 . Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology. 2(8) : 219–227.

13-Al-Shibib,A.S. and Kandela,S.A. 1991 . Production of proteocin by local *Proteus mirabilis* .Acta . Ciencia Indica ,XVII : 1–10 .

14-Pugsley, A.P. 1983. Auto induced synthesis of colicin E2. Mol. Gen. Genet. 190 : 379–383.

15-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.

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

17-Tishvarian, J.A.M. 1996. Optimization, partial purification and characterization of colicin produced by local *Escherishia coli* isolated from urinary tract infection. M.S.C. thesis/collage of Medicine/ Al–Mustansiriya University

18-Al-Dulami, H.H.O. 1999. Effect of crude colicin extracted from *Escherichia coli* on immune cells. M.Sc Thesis, Collage of Science. Al–Mustensiriya University.

19-Laukova, A. and Czikkova, S. 1999. The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* cultural condition on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology. 2(7):179–184.

5-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.

6-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.

7-Lara, I . ; Martinez–Bueno, M. ; Galvez, A. ; Maqueda, M. and Valdivia, E.1990. Introduction of inhibition agent produced by *Enterococcus faecalis* . Folia .Microbiol .35(2) : 124–9.

8-.**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.

9-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.

10-Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the

against the sister chromatid exchanges produced by mitomycin– C in vitro. J . Med. Sci. Res. 23 : 835–836.

and *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiology. 87 : 182–186.

20-Diaz–Barriga, S. ; Madrigal–Bugaidar E. and Vaquez, S. 1995. Inhibitory effects of vitamin E

The Effect of some inducer agents in increase the production of Enterocin U36 produced by *Enterococcus faecalis* U36 that isolated from Urinary Tract Infection

Nuha J. Kandela* ***Ghazi M. Aziz**** ***Hausain Khanika ****

* Collage of Science / Biotechnology Dep /Baghdad University The chief of Baghdad- Iraq Kurkuk University

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 *Lactococcus lactis* ,*Lactobacillus fermentum* and few other gram positive pathogens bacteria including *Listeria monocytogenes, Staphylococcus auraus* ,*Bacillus subtilis* and *Streptococcus spp.* The optimum conditions for enterocin production from selective local isolates EFU36 were determined by using the cultural submerged and the results showed that the optimum media for production of enterocin contained carbon sources , nitrogen source and some mineral salts with an inoculum size of 2% which contains $1x10^9$ cell/ml. at an optimum pH 6 in optimum degree(35-37) in shaker incubator 120 cycle/ min reached to the specific activity of 91x103 unit/mg.The effect of some inducers of production like chloramphenicol, folic acid, vitamin B12 and mitomycin-c was studied. The results showed that 1.5% of mitomycin gave specific activity of about $103x10^3$ unit/mg when added to the optimum media after 3 hours from optimum production period.