مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد(12) العدد(3)-(2012)
ISSN-1813-1646

استخلاص وتنقية المادة المثبطة المنتجة من بكتريا الـ *Leuconostoc mesenteroids* واستخدامها ضد بعض انواع البكتريا المرضية

مها اسماعيل قصير وحامد صالح البدراني ونزار فخري محمد
قسم علوم الأغذية-كلية الزراعة والغابات-جامعة الموصل-العراق

الكلمات الدالة :
تنقية ، بكتريا ، استخلاص

للمراسلة :
مها اسماعيل قصير
قسم علوم الاغذية-كلية الزراعة - جامعة الموصل

الاستلام:
18-5-2011
القبول :
14-10-2011

الخلاصة

تم عزل وتشخيص بكتريا الـ *Leuconostoc mesenteroids* من مولاس البنجر السكري(ناتج ثانوي) الـذي تـم الحصول عليه من مصنع السكر في الموصل وذلك من خلال الفحوصات المظهرية والكيميائية . كما تم استخلاص وتنقية المـادة المثبطة باستخدام الطرد المركزي وبوساطة الكلوروفورم والميثانول والاسيتون. لقد لوحظ من النتائج ازدياد نمو البكتريا *Leu. mesenteroids* بزيادة مدة التحضين حيث وصلت الاعداد الى 115 × 10^4 cfu / مل خلال مـدة 24 سـاعة ثـم لـوحظ انخفاض في الاعداد بعد 48 ساعة لتصل الى 47 × 10^4 cfu / مل. اما بالنسبة لانتاج المادة المثبطة فقد وجد زيادة مسـتمرة مع زيادة مدة التحضين حيث لوحظ ان قطر منطقة التثبيط على بكتريا *Staphylococcus aureus* قد وصل الى 10 ملم بعـد 24 ساعة والى 12 ملم بعد 48 ساعة من التحضين. اما من حيث تأثير معاملات التسخين في المادة المثبطة فقد تبين ان التـاثير كان ثابتا تجاه معاملات التسخين على 60، 80 ، 100 ْم ولمدة نصف دقيقة ، لقد كانت اقطار المنـاطق الخاليـة مـن النمـو للمعاملات الحرارية الثلاثة 11 ، 9 ، 7 ملم على التوالي. وفيما يتعلق بتأثير الاس الهيدروجيني فقد وجد ان الاس الهيـدروجيني (5) كان له التاثير الاكبر في المادة المثبطة حيث بلغ قطر المنطقة الخالية 12 ملم. اما من حيث تاثير المادة المثبطة في بعض انواع البكتريا المرضية (*Staph.aureus* و *E.coli* و *Salmonella typhi* و *Proteus vulgrais* و *B.subtilus*) فقد لوحظ ان اكثر الانواع حساسية للمادة المثبطة كانت البكتريا *Staph.aureus* حيث وصل قطر المنطقة الخالية من النمو لها 12 ملم في حين كانت اكثر الانواع مقاومة هي بكتريا الـ *E.coli* اذ كان قطر المنطقة الخالية من النمو 5 ملم اما الانواع الاخـرى *B.subtilus* و *P.vulgaris* و *Staph.typhi* فقد بلغت اقطارها 10 ، 6 ، 6 ملم على التوالي. عليه يمكننـا الاسـتنتاج انـه بالامكان ان تستخدم بكتريا الـ Leuconostoc في منتجات الألبان المتخمرة لاهميتها الصحية وانتاجها المادة المثبطة لانـواع عديدة من البكتريا المرضية خاصة في منتجات الألبان المتخمرة و الكريمة الحامضية وبعض الاجبان كجـبن الكـوتج وكـذلك المثلجات القشدية .

Isolation And Purification Of Antimicrobial Substance Produced By *Leuconostoc mesenteroids* For Using As Inhibiter For Some Pathogenic Bacteria

M. I. Kasir ,H. S. AL-Badrany and N. F. Al-Jalel
Dept. of Food Science-College of Agric. And Forestry-Mosul Uni.-Iraq

KeyWords:
Leuconostoc mesenteroids . Pathogenic Bacteria

Correspondence:
M. I. Kasir

Dept. of Food Science-College of Agric. And Forestry-Mosul Uni.-Iraq

Received:
18-5-2011
Accepted:
14-10-2011

Abstract :

Leuconostoc mesenteroids was isolated from molasses obtained from Mosul sugar factory as a byproduct, using the morphological. The *Leuconostoc mesenteroids* antimicrobial substances were extracted and purified by centerfuge force with the aid of chloroform, methanol, and acetone. The results showed that the rate of the growth of bacteria increased with the increase in the incubation period, the total number of bacteria reached 115 * 10 cfu/ml after 24 hours of incubation and then the number decreased after 48 hours to 47 * 10 cfu/ml.. In case of the production of inhibition substances, it appeared that the inhibiting substances continued to increase with incubation, the diameter of the inhibition zone for *Staph. aureus* was 10 mm. after 24 hours and increased to 12 mm. after 48 hours. Results also showed, that the heat treatments at 60, 80, and 100 c for 30 seconds were not affective on the inhibition , the inhibition zones stayed more or less stable, the zones for the used temperatures were 11, 9, and 7 mm. respectively. With regard to the effect of pH, it appeared that the most effective pH value was pH 5which resulted in an inhibition of 12 mm. The test bacteria showed different response to the inhibiting substances, *Staph aureus* was the most sensitive, were as *E. coli* was the most resistant to inhibition, the dimeter of the zones for both were 12 and 5 respectively. The inhibition for the other test bacteria; *B. subtilus* , *Proteus bulgares and Salmonella typhi* were 10, 6, 6 mm. respectively. In conclusion, the use of Leuconostoc merenteroids in fermented dairy product could be beneficial in elongating the shelf life of the products due to the production of the inhibiting substances which are affective to many pathogenic bacteria especially in fermented milk ,sour cream cottage cheese and ice cream.

المقدمة

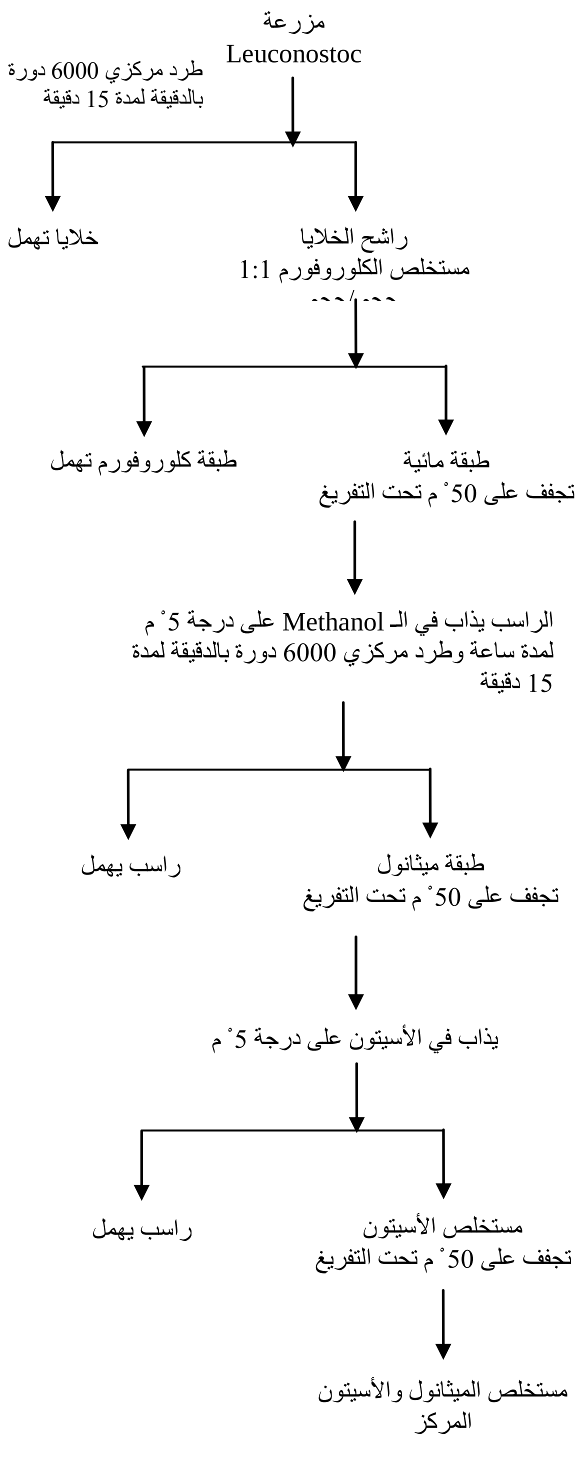
تنتمي بكتريا الـ Leuconostoc الى بكتريا حامض اللاكتيك المنتجة للحموضة وتوجد بشكل واسع على النباتات وفي المنتجات اللبنية ومنتجات غذائية اخرى (Garvie ،1986). أن نمو هذه البكتريا ضعيفاً في الحليب وقسم منها تستخدم كبادئات في بعض الالبان المتخمرة والكريمة الحامضية والزبد لانها تنتج مركبات النكهة وذلك بخفض الأس الهيدروجيني بوساطة بكتريا حامض اللاكتيك الكروية.

تسبب هذه البكتريا مشاكل في معامل صناعة السكر لانتاجها الدكستران dextran ، وقد وصف هذا الجنس من البكتريا ضمن المجموعة السابعة عشر وهي كروية موجبة لصبغة كرام وقد تظهر بيضوية حسب نوع الوسط النامية به وقد تكون ثنائية او على شكل سلاسل قصيرة تتراوح ابعادها 0,5– 0,7 × 0,7 – 1,2 مايكروميتر وقد تنمو على شكل سلاسل وليس بشكل تجمعات clumps فضلا" عن انها غير متحركة وغير مكونة للسبورات وعادة يكون نموها بطيء وتنتج عنه مستعمرات صغيرة ذات لزوجة على سطح المزرعة الحاوية على السكروز لاحتوائها على الكبسولات ذات السكريات المتعددة وهي لا هوائية اختيارية ودرجة الحرارة المثلى لها هي20 – 30 ْم حسب ما جاء بتقسيم Holt واخرون (1994). وصنفت ضمن القسم الثاني عشر حسب ما جاء في تقسيم Gilmour و Rowe (1990). وهذه البكتريا مختلطة التخمر Hetero lactic acid fermentation. اذ انها تنتج حامض اللاكتيك ومركبات النكهة Diacetyl و Acetyl methyl carbinol وغاز ثنائي اوكسيد الكربون وحامض الخليك والايثانول. تتضمن هذه البكتريا أربعة أنواع رئيسية *Leu.dextranicum* و *Leu.paramesenteroids* و *Leu.mesenteroids* و *Leu.cremoris* فضلا" عن الأنواع الأخرى مثل *Leu.lactis* و *Leu.oenos* و *Leu.carnosum* و *Leu.gelidum*. أن أفراد هذا الجنس له تأثير مثبط لبعض الانواع البكتيرية المرضية واعزي ذلك لانتاجها الاحماض العضوية (Speck و Sorrelis ، 1970) إضافة إلى البكتريوسينات , وأول من عزل البكتريوسينات المنتجة من هذه البكتريا Sandine و Orber (1984). اذ تنتج الـ Leucosin عند درجة حرارة 1 – 25 ْم وأس هيدروجيني 4,5 – 6,5 . هدفت هذه الدراسة الى عزل بكتريا الـ Leuconostoc من مولاس البنجر السكري وتشخيصها وتنميتها وفصل البكتريوسين المنتج منها ودراسة تأثيرها ضد بعض أنواع البكتريا المرضية وكذلك دراسة تأثير ظروف التحضين في نمو البكتريا وانتاج المادة المثبطة مع دراسة ثباتيتها تجاه درجات الحرارة والاس الهيدروجيني.

مواد وطرائق البحث

عزلت بكتريا الـ Leuconostoc من مولاس البنجر السكري لمعمل السكر في الموصل. واستخدم الوسط الغذائي السائل المعقم Gilliand media (1970) (MRS). و التحضين على 22 ْم لمدة 24 ساعة وتم التنشيط ثلاثة مرات ثم الزرع والتحضين على نفس الوسط باضافة الاكار 1,5 % حسب طريقة حسن وأخرون (2007). كما اجريت الفحوص المظهرية والكيموحيوية حسب طريقة (Harrigan و McCance ، 1976) وبالاعتماد على Bergey's manual (1994) تم انتاج المادة المثبطة من العزلة المحلية بتنميتها على الوسط MRS وفصلت الخلايا باستخدام الطرد المركزي 6000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة وقدرت المادة المثبطة لها حسب طريقة (Husein وآخرون، 2006) متبعاً المخطط(1).

قدرت الفعالية التثبيطية على بكتريا *staph.aureus* بطريقة الاقراص المغمورة (Disk assay) وباستخدام الوسط Mannitol salt agar وتم قياس المنطقة الخالية من النمو حسب طريقة (Ryan واخرون ، 1988). تم تنمية بكتريا الـ *Leu.mesenteroids* في الوسط MRS وعلى درجة حرارة 22 ْم والتحضين للمدد (8 ، 12 ، 24 و 48 ساعة) واجري الطرد المركزي على 6000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم اخذ الراشح وتم تنقية المادة المثبطة باستخدام الكلوروفورم والميثانول والاسيتون وقدر التأثير التثبيطي على بكتريا *B.subtilus* و *E.coli* و *Staph . aureus* و *Salmonella typhi* و *Proteus vulgaris* باستخدام الاوساط المنتخبة لكل نوع من البكتريا وبطريقة الاقراص المغمورة ، ايضاً قدر التأثير التثبيطي للمادة المثبطة على بكتريا *Staph.aureus* وكذلك قدرت اعداد بكتريا الـ *Leu.mesenteroids* بطريقة الاطباق المصبوبة وعلى درجة حرارة 22 ْم لمدة 48 ساعة ، كما درس تأثير المادة المثبطة تجاه الاس الهيدروجيني حيث ضبط pH المادة المثبطة عند (4 ، 5 ، 6 ، 7 و 8) وكذلك تم دراسة الثبات الحراري للمادة المثبطة اذ عوملت على درجة حرارة (60 ، 80 و 100مْ) ولمدد (صفر، 15 و 30 دقيقة) وقدر التأثير التثبيطي على بكتريا الـ *Staph.aureus*.



مخطط(1) يوضح استخلاص المادة المثبطة المنتجة بواسطة بكتريا Leuconostoc

النتائج والمناقشة

من خلال الفحوص التأكيدية للعزلة المحلية المأخوذة من مولاس البنجر السكري ومطابقتها مع Bergey's manual، وجد من الجدول (1) بأن الخلايا المعزولة كانت كروية وقسم منها بيضوية على شكل سلاسل قصيرة او خلايا مفردة او ثنائية وهي غير قادرة على اختزال صبغة الــ Litmus milk ولكنها انتجت حموضة قليلة وادت الى تكوين خثرة ضعيفة وعدم قدرتها على تحليل الحامض الاميني الارجنين وتحرير الامونيا وقدرتها على انتاج غاز ثنائي اوكسيد الكربون من تخمير الكلكوز وغير محللة للحامض الاميني التربتوفان وانتاج الاندول، الذي يوضح ان البكتريا بهذه الصفات انها من الجنس Leuconostoc هذا يتفق مع Holt وأخرون (1986). وابدت العزلة قدرتها على النمو بدرجات حرارة (20 ، 30 و 37 ْم) وعدم قدرتها على النمو بدرجات حرارة (5 ، 45 ْم) كذلك قدرة البكتريا على استهلاك السكريات الكلكوز والفركتوز والجالكتوز والسكروز واللاكتوز والزايلوز والمالتوز والمانوز في حين لم تستطع من استهلاك الرافينوز والرامينوز والسالسين والسكوالين والسيليبيوز والسوربيتول والمانيتول والانيولين الذي يوضح بان النوع هو من *Leu.mesenteroids* وكما في Robinson (2002).

من الجدول (2) يتبين أن التأثير التثبيطي للبكتريوسين ضد بكتريا الــ *Staph.aureus* في انها أكثر حساسية من بقية الانواع البكترية وبلغ قطر المنطقة المثبطة الخالية من النمو 12 ملم في حين بكتريا الــ *E.coli* اكثر مقاومة للمادة المثبطة اذ ان قطر منطقة التثبيط 5 ملم وكانت الانواع الاخرى *B.subtilus* و *Proteus vulgaris* و *Salmonella typhi* تقع بينهما اذ بلغت اقطار المنطقة المثبطة 10 ، 6 و 6 ملم .

من الجدول (3) نلاحظ هناك زيادة في النمو بزيادة مدة التحضين اذ وصلت اعداد البكتريا بعد 24 ساعة من التحضين الى 115×10^4 cfu / مل ثم انخفضت الاعداد لتصل الى 47×10^4 cfu / مل بعد 48 ساعة بينما كان التأثير التثبيطي على بكتريا *Staph.aureus* بعد 24 ساعة 10 ملم وبعد 48 ساعة الى 12 ملم من التحضين حيث تعتبر المادة المثبطة من المنتجات الثانوية وتنتج في نهاية الطور اللوغاريتمي وفي طور الثبات ونجد هناك علاقة طردية بين نمو بكتريا الــ Leuconostoc وإنتاج المواد المثبطة خلال 24 ساعة من التحضين وهذه تتفق مع Yildrim و Johson ،(1998).اذ ازداد النمو خلال 36 ساعة ثم انخفض بعد ذلك نتيجة لفعل الانزيمات المحللة للبروتينات الذائبة.

الجدول (1) الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا *Leuconstoc mesenteroids*

الصفات المظهرية	درجات حرارة النمو		الصفات الكيموحيوية	القدرة على تخمر السكريات	
موجبة لصبغة كرام.	5 ْم	لا تنمو	غير مسيلة للجلاتين.	كلكوز+	رامينوز−
الحركة: غير متحركة	20 ْم	نمو جيد جدا	غير محللة للكيزين.	فركتوز+	سليبايوز−
تكوين الابواغ: غير مكونة	30 ْم	نمو جيد	غير محللة للنشا.	جالاكتوز+	مانيتول−
الشكل: كروي او بيضوي	37 ْم	نمو	سالبة لفحص الكاتاليز.	سكروز+	سكوالين−
نظام التجمع : خلايا مفردة او	45 ْم	لا تنمو	لا تكون الامونيا من الارجنين.	لاكتوز+	سالسين−
ثنائية او بشكل سلاسل			غير منتجة للاندول من التربتوفان.	مانوز+	سوربيتول−
قصيرة.			انتاج حامض مع خثرة ضعيفة على	اربينوز+	رافينوز−
			وسط زهرة عباد الشمس	زايلوز+	انيولين−
				مالتوز+	انيولين−

الجدول(2):التأثير التثبيطي للمادة المثبطة لبكتريا *Leuconostoc mesenteroids* بعد تنميتها على الوسط MRS والتحضين على 37 ْم لمدة 48 ساعة ضد بعض أنواع البكتريا المرضية

البكتريا	قطر منطقة التثبيط
Staph.aureus	12
B.subtilus	10
Salmonella typi	6
Proteus vulgaris	6
E.coli	5

الجدول(3): تأثير مدة التحضين على نمو بكتريا الـ *Leuconostoc mesenteroids* وقطر منطقة التثبيط في نمو بكتريا *Staph.aureus*

مدة التحضين / ساعة	اعداد البكتريا cfu / مل	قطر منطقة التثبيط بالملم
صفر	20×10^{4}	3
8	33×10^{4}	5
12	98×10^{4}	8
24	115×10^{4}	10
48	47×10^{4}	12

من الجدول (4) نجد المعاملة الحرارية على (60 ، 80 و 100 ْم) ولمدد (صفر ، 15 و30 دقيقة)، كان التأثير التثبيطي للراشح على 60 ْم ولمدة 30 دقيقة تجاه بكتريا الاختبار *Staph.aureus* ثابتاً وقطر المنطقة الخالية من النمو 11 ملم. اما عند 80 ْم ولمدة 30 دقيقة كانت 9 ملم. وعلى 100 ْم ولمدة 30 دقيقة كانت 7 ملم. نستنتج من ذلك بأن البكتريوسين ذو ثباتية عالية تجاه الحرارة وهذه تتفق مع Rabab وآخرون ،(2007) بأن المادة المثبطة المنتجة من قبل جنس الـ Leuconostoc اكثر ثباتية للحرارة ، وتتلف على درجة حرارة 121 ْم.

الجدول (4) تأثير المعاملة الحرارية على فعالية البكتريوسين المنتجة من بكتريا *Leuconostoc mesenteroids* في نمو بكتريا *Staph.aureus*

درجة الحرارة ْم	الوقت / دقيقة	قطر منطقة التثبيط بالملم
	صفر	12
60	15	12
	30	11
	0	12
80	15	10
	30	9
	0	12
	15	9
100	30	7

من الجدول (5) : تأثير الأس الهيدروجيني في تثبيط نوع البكتريوسين لبكتريا الـ *Staph.aureus* نجد ان البكتريوسين كان اكثر تأثيراً عند آس هيدروجيني (5 ، 6 و 7) وكان قطر المنطقة الخالية من النمو (12 ، 11 و 9 ملم) على التوالي ثم انخفض التأثير عند الابتعاد من تلك القيم للأس الهيدروجيني اذ بلغ قطر المنطقة الخالية من النمو على اس هيدروجيني 9 ضد بكتريا الاختبار *Staph.aureus* 6 ملم ، وعند الاس الهيدروجيني 4 كان قطر المنطقة الخالية من النمو 7 ملم.

الجدول (5) : تأثير الاس الهيدروجيني pH على فعالية البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا *Leuconostoc* في نمو بكتريا *Staph.aureus*

pH	قطر منطقة التثبيط (ملم)
4	7
5	12
6	11
7	9
8	7
9	6

نستنتج من الدراسة امكانية استخدام هذه البكتريا *Leuconostoc* في حفظ منتجات الالبان لاهميتها الصحية وانتاج المادة المثبطة ضد انواع عديدة من البكتريا المرضية.

المصادر

حسن , غانم محمود (2007) . تصنيع منتـــوج لبنـــي متخمـــر باستخدام عزلات مختلفة من بكتيريا حامض اللاكتيـــك . أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة والغابـــات – جامعـــة الموصل .

Garvie, E. I. (1986). Genus leuconostoc in Bergey’s manual. Vol. II, Williams and Wilkins, Baltimore, MD. PP. 1071-1075.

Gilmore, and M. T. Row (1990). Microorganism associated with milk. (c.f. Dairy microbiology, Vol. I, Robinson, R. K., London and NewYork).

Harrigan, W. F. and M. E. McCance (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press. London, NewYork, Sanfrancisco.

Holt, J.C.; N. R. Rvieg, J. T. Statley, and S. T. Williams (1986). Bergey’s Manual of Systematic Bacteriolog . Vol. II, Williams and Wilkins. Baltimore, MD USA.

Holt, J.C.; N. R. Rvieg, J. T. Statley, and S. T. Williams (1994). Bergeys manual of Determinative bacteriology, 9th edition. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

Husein, S. A., R. M. Kebary, I. I. Badran, and R. M. Badran (2006). Partial purification and stability of antimicrobial substances produced by some bifidobacteria strain .Egyption J. of Dairy Sci.. 34: 13-21.

Orberg, P. K. and Sandine, W. E. (1984). Common occurrence col plasmid DNA and vancomycin resistance in leuconostoc spp. Applied and Enviromental Microbiology, 48: 1129.

Rabab, M. M., I. M. Elsayed, A. M., Yousif, and M. A. Hamdy (2007). Studies on Leuconostoc strains isolated from riab milk. Egyption J. of Dairy Sci.. 35: 153-164.

Robinson, K. (2002). Dairy microbiology. 3rd edition, Wiley-Interscience. NewYork

Ryan, J. J., M. M. Hattier, R. W. Adkinson, and R. H. Gough (1988). Effect of disc moistening method on Bacillus *stearothermophilus* disc assay zone diameters. J.of Dairy Sci. 17: 2384-2487.

Sorrells, K. M. and M. L. Speak (1970). Inhibition of *Salmonella gallinarium* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum* . J. Dairy Sci.. 53: 239-2411**.**