التأثير التثبيطي للبكتريوسين المستخلص من بكتريا *Lactobacillus plantrum* على فعالية أنزيم urease لبكتريا *Helicobacter pylori* المعزولة من الأنسان

فيصل غازي حسين
جامعة سامراء/ كلية العلوم التطبيقية/

د. رشيد حميد حسن
جامعة سامراء/ كلية التربية

الملخص:

استهدفت هذه الدراسة استخلاص البكتريوسين المنتج من البكتريا العصوية اللبنية نوع *Lactobacillus plantrum* المعزولة من 30 عينة اشتملت على اللبن الرائب والجبن المحلي واللبن نوع Activia واختيرت العزلات اعتمادا على قدرتها في انتاج البكتريوسين وفعاليته التثبيطية على بعض انواع البكتريا المرضية.وقد تضمنت دراستنا هذه على استخلاص وتنقية البكتريوسين ودراسة تاثيره على بكتريا *Helicobacter pylori* المعزولة من معدة المرضى في قسم الجهاز الهضمي في مستشفى اليرموك التعليمي للفترة من 2015/2/20 ولغاية 2015/9/10 .وقد أظهرت نتائج الأختبارات التشخيصية المزرعية والمجهرية والكيموحيوية التي اجريت للعزلات ان خمس عزلات تعود لبكتريا *L.plantarum* كان لها القدرةعلى انتاج البكتريوسين بصورة متفاوتة. وقد أثبتت الدراسة على قدرة البكتريوسين في تثبيط فعالية أنزيم اليوريز (Urease) لبكتريا *H.pylori* بحسب التركيز المستعمل اذ درست فعالية البكتريوسين اعتمادا على نسبة التثبيط بفعل البكتريوسين.

المقدمة:

البكتريوسينات هي ببتيدات مضادة للأحياء المجهرية منها الكولسين Colicin الذي ينتج من بكتريا *E.coli*, وقد بينت الدراسات أن هذا البكتريوسين يقتل العديد من البكتريا و بأليات عدة مثل تثبيط بناء الجدار الخلوي أو تثبيط النفاذية الخلوية للأغشية (Kim *et al*.,2014). استقطبت البكتريا العصوية الحامضية في الآونة الأخيرة اهتمام العديد من الباحثين لما لها من فوائد عديدة من الناحية الصحية والصناعية وقد أثبتت بما يدع مجالا للشك أنَّ بكتريا حامض اللاكتيك تساعد في الحفاظ على التوازن الطبيعي والصحي لأجسام الكائنات الحية و وتمارس البكتريا هذا التوازن بعدة وسائل مثل : إنتاج حامض اللاكتيك وغيره من الأحماض وكذلك إنتاج العديد من المواد العضوية

صغيرة الحجم ذات التأثير التثبيطي لعدد من الأحياء المجهرية وتفرز أيضا عدداً كبيراً من أنواع البكتريوسينات (Venema *et al* .,1990).العديد من بكتريا موجبة وسالبة صبغة كرام تنتج أثناء نموها مواد بروتينية (بروتينات أو متعدد الببتيد) والتي لها دور مضاد للأحياء المجهرية وقد سميت ببكتريوسين Bacteriocin, وبالرغم من أنها تعد مضاداً حيوياً ولكنها ليست كذلك, فالاختلاف الرئيس بينها وبين المضادات الحيوية هي أن البكتريوسين محددة النشاط بحسب نوع البكتريا المنتجة لها وبحسب السلالات للنوع نفسه, من ناحية أخرى فالمضادات الحيوية لديها نشاط أوسع وأكبر ضد السلالات البكتيرية, فضلا عن ذلك فإنَّ البكتريوسين ذا انتاج رايبوسومي ribosomally synthesized وينتج خلال المرحلة المبكرة من النمو primary phase بينما المضادات الحيوية تنتج كنواتج ايضية ثانوية secondary metabolites (Beasley and Saris, 2004). ومن بين البكتريا موجبة صبغة غرام البكتريا العصوية الحامضية التي أكتسبت أهتماما خاصا في الوقت الحاضر ويرجع ذلك الى أنتاجها للبكتريوسين, اذ أن هذه المواد من الممكن أن تستعمل في الصناعات الغذائية كمواد حافظة وبصورة عامة فإنّها آمنة وتصنف من الصنف ألأول الأمن (GRAS, Grade One), كما أن هذه المركبات تشكل حاجز طبيعي natural barrier ضد الكائنات الممرضة وضد تلف الأغذية (Zacharof & Lovitt, 2012).

إنَّ لبكتريا *Lactobacillus* صفة المعزز الحيوي إذ استعملت في معالجة المرضى الذين يعانون سوء الهضم واضطرابات الجهاز الهضمي والمصابين بقرحة المعدة نتيجة الإصابة ببكتريا *H.pylori* التي تتواجد عادة في المجرى المعوي. وتستوطن الطبقة المخاطية من غار المعدة و من الممكن أن تستوطن كل المعدة والاثني عشري (Enomoto *et al.* 1998), وتعيش في الطبقة المخاطية بالقرب من الخلايا الطلائية حيث إنَّ الأس الهيدروجيني يكون متعادلاً ولكن بعضٌ منها ممكن أن يغزو خلايا الجسم (Liu *et al*.,2012).

إنَّ لبكتريا *Lactobacillus* فائدة للأشخاص الذين لا تستطيع أمعاءهم تكسير جزيئات اللاكتوز فتقوم هذه درست العلاقة ما بين Lactobacillus Sp وما بين *H.pylori* بعدة بحوث وقد كان مضمون هذه الدراسات هو تثبيط بكتريا *H.pylori* من قبل بكتريا *Lactobacillus* Cui *et al.* (2010; Lionetti *et al*.2010; Felley and Michetti 2003) وان هذا التثبيط كان نتيجة التنافس على مواقع الارتباط في الميكوزا لجدار الأمعاء مما يؤدي لتثبيط نمو بكتريا *H.pylori* (Ryan *et al.* 2008).

المواد وطرائق العمل :

أجريت هذه الدراسة على المرضى الذين يعانون من أعراض عسر الهضم والتقرحات الهضمية والسرطانات المعدية من مجاميع المرضى المحالين إلى وحدة الناظور(Endoscopy)/ قسم الباطنية التابع لمستشفى اليرموك التعليمي خلال الفترة من 2015/2/20 ولغاية 2015/9/10 ولكلا الجنسين وللمرحلة العمرية 18 –75 سنة, تم جمع 150 عينة بواقع خزعتين نسيجيتين (Tow Biopsies) لكل مريض أخذت من المعدة بواسطة الناظور(Gasteroduodenal Endoscopy). تم عزل وتشخيص بكتريا *H.pylori* من المرضى المصابين باستخدام طرائق مختبرية عدة (الاختبارات المصلية, اختبار تحلل أنزيم اليوريا السريع Rapid Urea Enzyme, الاختبارات البيوكيماوية, تقنية تفاعل البوليمريز المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR). أجري اختبار الزرع البكتيري على الوسط الانتقائي لعزل هذه البكتريا بوسط كولومبيا الصلب (Columbia Agar Base) وأجريت اختبارات عدة على قدرة البكتريا لإنتاج أنزيم اليوريز باستخدام العدة السريعة والحديثة (Detects the urease enzyme of H.pylori Kit) والاختبارات التشخيصية الاخرى.

عزلت بكتريا Lactobacillus من بعض المصادر الغذائية باستخدام وسط De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) وشخصت بالطرائق المختبرية وذلك لدراسة تأثيرها على بكتريا *H.pylori* كونها تعد من المعززات الغذائية (Probiotic) التي تقوم بدور تحسين توازن ميكروفلورا القناة الهضمية. بعض من هذه البكتريا تنتج مواد عدائية antagonistic تسمى بالبكتريوسين Bacteriocin, وإنَّ كميات قليلة منها تسبب في تثبيط الجراثيم الممرضة الأخرى مثل *H.pylori*, وقد شملت دراستنا على دراسة تأثير بعض أنواع بكتريا Lactobacillus وإفرازاتها السمية مثل البكتريوسين المنتجة من قبلها على فعالية انزيم اليوريز لبكتريا *H.pylori* باستخدام تراكيز مختلفة من البكتريوسين.

الخطوات:

1- **جمع العينات:** جمعت 30 عينه من اللبن الرائب والجبن المحلي واللبن نوع Activia المصنع محليا وأستخدمت كمصادر للحصول على عزلات بكتيرية منتجة للبكتريوسين.

2- عزل البكتريا: حضرت اطباق الوسط MRS agar ولقحت بنماذج من نوعي اللبن بطريقة التخطيط ثم حضنت في درجة حرارة 37م^{o} لمدة 24 ساعة وشوهد ظهور مستعمرات بكتيرية بيضاء اللون.

3- شخصت البكتريا اعتمادا على الفحوصات الكيموحيوية والصفات الزرعية.

4- أعيد زراعة البكتريا المعزولة والمشخصة في الوسط السائل MRS broth.

إنَّ أولى الخطوات تتضمن عمل مسح (Screening) للبكتريا الحامضية من مصادرها المحددة بهذا البحث, أذ فحصت خمس عزلات من البكتريا لاختبار فعاليتها الحيوية, وأستعملت طريقة الانتشار بالحفر(Well diffusion method) لقياس فعالية البكتريا *L.acidophillus* المعزولة ضد بكتريا الأختبار المرضية المختارة (الدليل) (Desai,2008).

عزل بكتريا *H.pylori* من المرضى:

عزلت بكتريا *H.pylori* من الخزعات التي اعطت نتيجة إيجابية لفحص اليوريز السريع Rapid urease test (RUT) وبعد وصول العينات إلى المختبر الخاص بالزرع البكتيري استخدمت طريقة Parsonnet et al (1998) في زرع العينات, أخذت عينات بواسطة الحامل Loop وزرعت بطريقة Streaking على الوسط الانتقائي Helicobacter pylori Selective medium من نوع Columbia blood agar base والمضاف أليه Helicobacter pylori Selective supplement (DENT) وبمعدل ثلاث مكررات لكل عينه نسيجية, وضعت هذه الأطباق في وعاء لا هوائي معقم (Anaerobic jar) وقد وفرت ظروف قليلة التهوية (Microaerophilic Condition) لهذا الوعاء, وفرت هذه الظروف قليلة التهوية وذلك باستخدام عدة تكوين الغاز (Gas generation Kit) المجهزة من شركة Oxoid حيث يتم فتح العبوة ووضعها خلال 30 ثانية داخل الوعاء (Jar) ويتحرر بذلك غاز O_2 بنسبة 5% وغاز CO_2 بنسبة 10% وغازN_2 بنسبة 85% مع توفير رطوبة مناسبة داخل الوعاء. يوضع الوعاء المحكم الغلق في الحاضنة Incubator بدرجة حرارة 37م ولمدة 7-4 أيام (Forbes *et al*.,2007).

شخصت البكتريا بعد ظهور النمو بالأطباق أعتمادا على خواص البكتريا الزرعية والفحوصات الكيموحيوية كفحص أنزيم الكتليز و الأوكسديز واليوريز وفحص الحركة.

أدامة البكتريا وتنقيتها Purification and Sustainability

استعمل وسط مرق نقيع الدماغ-القلب Brain-Heart infusion broth ووسط الدم الصلب Blood agar ووسط نقيع الدماغ – القلب الصلب Brain-Heart infusion agar المدعم بإضافة 7% دم الحصان والمحضر مسبقا لأدامه البكتريا .

التشخيص باستعمال تقنية تفاعل البوليميريز التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR)

بداية الخطوات هي عملية استخلاص الدنا DNA Extraction وتجهيز الحامض النووي للبكتريا والخاصة بقطعة الموروثة المعنية والتي مسؤولة عن تنظيم عمل معين في السلالات الممرضة لبكتريا *H.pylori*. كشف عن موروثات هذه البكتريا باستعمال تقنية PCR بعد أن عزلت *H.pylori* والتعرف عليها في عينات الخزعات النسيجية المعدية Gastric biopsies من المرضى الذين خضعوا للفحص بالناظور والتي اعطت نتائج إيجابية للإصابة بالبكتريا, تم الكشف والتحري عن ناتج التضخيم Amplification product لقطعة DNA والتي تساوي 820bp وعن الموروثة الخاصة بأنتاج انزيم اليوريز gen (*ureAB*) بأستعمال بادئ خاصة لهذا الجين (Primer) والذي جهز من قبل شركة (IDT, GmbH). استعمل البادئ كما موضح بالجدول (1) (Farshad, *et al* .,2007).

جدول (1): تتابع البادئ الخاص بجين *ureAB*

Primer	Primer Sequence	Length	TM*	TA*
Ure AB Forward	5-'AGGAGAATGAGATGA-'3	15	41.3	36.3
Urea AB reverse	5'-ACTTTATTGGCTGGT-3	15	43.6	38.6

درجة الذوبان TM = Melting Temperature= 2(A+T) + 4(G+C)

درجة الالتصاق TA = Annealing Temperature = TM – 5

أجريت طريقة العمل بحجم نهائي مقداره (50) مايكرولتر بأنبوب أبندروف الخاص بـ PCR وبحسب ما موضح في الجدول (2) اعتماداً على النشرة المرفقة Green Master Mix المصنع من قبل شركة Promega.

جدول(2): أحجام المواد الكيمياوية المستعملة في التفاعل

المواد الكيميائية	الحجم
Go Tag Green Mster Mix	25 µl
Primer for War d	5 µl لكل جين
Primer Revers e	5 µl لكل جين
DNA DNA	5 µl
Nuclease – Free Wate r	10 µl

50 µl	Total	l

بعد إتمام الإضافات جميعها مزجت العينات مركزياً بوساطة الطرد المركزي الخاص بأنابيب ال PCR ونقلت العينات إلى جهاز المبلمر الحراري الحلقي PCR thermal cycler ضبط برنامج عمل الجهاز و بحسب نوع الجين (Han *et al.*,1998) كما في الجدول (3).

جدول (3): برنامج عمل الجهاز **للجين** *ureAB*

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة	الخطوات	رقم الخطوة
1	2min	94مْ	Initial denaturation	1
35	1min	94مْ	Denaturation	2
	1min	50مْ	Annealing	3
	2 min	72مْ	Extension	4
1	10min	72مْ	Final	5

الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية PCR: اتبعت طريقة الترحيل نفسها للحامض النووي DNAالمستخلص مع نواتج عملية تفاعل البوليميراز المتسلسل فإنَّ ظهور حزمة عند القاعدة الزوجية 2.420 bp يشير إلى وجود جين *ureAB*. (Mohammad and Essam . 2013;Farshad *et al* .,2007) .

استخلاص وتنقية البكتريوسين : بعد تحديد العزلات البكتيرية للبكتريا العصوية الحامضية والتي قد أعطت أعلى معدل تثبيط لبكتريا الدليل, تم أنتاج البكتريوسين من هذه العزلات وتم استخلاص البكتريوسين بصورة نقية (pure) اعتمادا على طريقة Burianek and Yousef (2000) وبطريقة الاستخلاص بالكلوروفورم (Chloroform extraction) إذ وجد أنَّ هذه الطريقة مقارنة بالطرائق الأخرى تعد الطريقة المثلى للاستخلاص من حيث الحصول على تركيز عالٍ من البكتريوسين وكذلك من حيث النقاوة و اختصار الوقت وسهولة التحضير(Parada *et al.*,2007), اذ حضر لتر واحد من وسط MRS broth السائل المعقم بدورق سعة 2 لتر, وقد لقحت الأوساط بالبكتريا المعزولة من المصادر المختلفة والمختارة وذلك باخذ0.1% من وسط زرعي أخر قد تم تحضينه لمدة يوم واحد بالبكتريا المنتجة للبكتريوسين المختارة.

حضنت الدوارق بدرجة حرارة 37م وفي حمام مائي باستخدام الرج (Shaker Incubator) وبواقع 150دورة/دقيقة,وبوقت 18 ساعة وذلك للحصول على أفضل نوعية للبكتريوسين من حيث التثبيط والنقاوة وأكبر كمية منه.

الطريقة :

- نبذت الأوساط الزرعية باستخدام أنابيب بقطر 24 ملم وطول 10 سم بواسطة أنابيب مصنوعة من التفلون Teflon وبوساطة جهاز الطرد المركزي المبرد (Refrigerated centrifuge) بسرعة 7100g وبدرجة حرارة 12 م ولمدة 15 دقيقة.
- يؤخذ الطافي (supernatant) والذي سيكون حاوياً على البكتريوسين ويجمع بوساطة ماصة معقمة, تكرر عملية الفصل مرات عدة لحين اكتمال كل الكمية ويجمع بدورق معقم.
- أضيف 500 مل من الكلوروفورم لجميع الطافي الذي قد جمع ويخلط بقوة بجهاز المازج الكهربائي (magnetic stirrer) لمدة 20 دقيقة.
- تعاد عملية التنبيذ بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 10400 g وبدرجة حرارة 12 م^{o} ولمدة 20 دقيقة.
- يؤخذ الراسب بعناية ودقة وبوساطة ماصة باستور معقمة من على جوانب وقاع الأنبوب والحاوي على البكتريوسين و بعض من الوسط الزرعي ويؤخذ الطافي فوق الطبقة المائية بعناية جدا واستبعاد مادة الكلوروفورم (المذيبة) وتعاد هذه المادة المفصولة لتيوب أخر معقم وتعاد مرة اخرى لزيادة عملية الفصل, ويفصل المادة المذيبة مع الوسط الزرعي المتبقي, ويترك الراسب الحاوي على البكتريوسين.
- يمزج الراسب والذي هو عبارة عن الراسب ومواد مترسبة من الوسط وبقايا من الكلوروفورم مع دارئ ترس (Tris buffer=0.1moll^{-1}) بمقدار 5−10 مل وأس هيدروجيني pH=7.0, ويجمع الكل في تيوب مصنوع من التفلون مصنع محليا بقطر24 ملم ,وبطول 10سم.
- تعاد عملية التنبيذ بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 12100 g لمدة 15 دقيقة وبدرجة 12م , يفصل الرائق والذي سيكون حاوي على الكلوروفورم وبقايا الوسط الزرعي. تعاد عملية الغسل مرة ثانية لحين التخلص من الوسط الزرعي.
- يؤخذ الراسب (البكتريوسين) ويجمع بوعاء معدني من الألمنيوم ويغطى بشاش معقم ويترك بمكان معقم وجاف (Hood) لمدة يوم واحد لحين الجفاف وذلك للتخلص من بقايا الكلوروفورم.
- يؤخذ المسحوق المحضر بعد التجفيف ويعاد مزجه مع واحد مل (1ml) من دارئ الترس (Tris buffer=0.1moll^{-1}) ويكون الأس الهيدروجيني (pH=7.0).
- يحفظ البكتريوسين بالثلاجة لحين ذوبان كل البكتريوسين المتكتل ويستخدم بعدها لإكمال التجارب.

تقدير تركيز البكتريوسين Determination of bacteriocin: قيست كمية بروتين البكتريوسين في المستخلص بطريقة تقدير كمية البروتين اعتمادا على طريقة لوري Lowry وذلك

باستخدام الطريقة اللونية بوساطة جهاز التحليل الضوئي المرئي (Spectrophotometer) للكشف عن كمية البروتين (Rajaram, *et al* ;2010) وذلك باستخدام العدة (Kit) المجهزة من شركة Linear Chemicals S.L Spain.

التثبيط بطريقة التوزيع بالطبق Microplates reader assay :

استخدمت طريقة قياس مقدار تثبيط النمو في المزارع السائلة بدلالة عكورة الوسط باستخدام Spectrophotometer بطريقة قراءة الطبق Microplate Reader وذلك بعد تخفيف مستحضر البكتريوسين إلى سلسلة من التخافيف المتدرجة.

تم تحضير العالق البكتيري ببكتريا *H.pylori* وبتركيز $1x10^9$ CFU/ml (zaman *et al.*,2014) والمعلق بوسط BHI الحاوي على 7% دم الحصان والخالي من المضادات الحيوية المعززة, تحضر تخافيف 2,4,8,16,32 من الراشح البكتيري للبكتريا حامض اللبنيك والمخفف بوسط MRS broth, يعقم الطبق ذي ال 96 حفرة (96-well plates) بواسطة الموصدة.

يوضع من كل راشح بكتيري لبكتريا العصوية الحامضية ولكل تخفيف مقدار 100مايكروليتر في الحجرة well, ثم يضاف 50 مايكروليتر من العالق البكتيري لبكتريا *H.pylori* في الحجرة ويتم خلط المحتويات بجهاز الرج (mixer) المعد لذلك, تحضن الأطباق وبوسط قليل التهوية microearophilic ولمدة 72 ساعة وبدرجة حرارة 37م وبثلاثة مكررات لكل تركيز, مع وجود حجرة خالية من الراشح البكتيري وبوجود بكتريا *H.pylori* كسيطرة (Control).

بعد التحضين يتم قراءة الامتصاصية لكل حجرة وبطول موجي OD_{595} nm بجهاز قراءة الأطوال الموجية (Reader) مقابل الضابط وتسجل النتائج.

دراسة الفعالية التثبيطية للبكتريوسين على فعالية أنزيم urease لبكتريا *H.pylori*

دراسة فعالية البكتريوسين على فعالية أنزيم اليوريز بطريقة التغيير القلوي (alkalimetric) method developed, اذ تم تنشيط بكتريا *H.Pylori* في وسط Mueller-Hinton broth والحاوي على 10% مصل جنين العجل, حضر محلول اخر من اليوريا بتركيز 0.33ug/ml مع الفينول 7µg/ml المحضر بواسطة PBS, يخلط جزئين متساويين من الوسط والمحلول ويضبط الأس الهيدروجيني على pH=6.8, وبوجود بكتريا *H.pylori* فإنّ أنزيم اليوريز سوف يحلل اليوريا وبذلك ترتفع قيمة الأس الهيدروجيني pH وبذلك يتحول اللون من الأصفر إلى ألأحمر ويتم تقدير ذلك التغير بواسطة قراءة الامتصاص اللوني بجهاز Spectrophotometer reader على طول موجي Optical density at 540 nm (yang *et al* .,2012).

حضرت حجرات الفحص بعد التعقيم (96 حفرة) وقد وضع 200 مايكرولتر من المخلوط السابق في كل حفرة ويخلط مع 100 مايكروليتر من البكتريوسين بتركيز Sub-MIC والمحدد مسبقا في بحثنا لكل نوع من البكتريا الحامضية العصوية *Lactobacillus* على أن يعطي تركيزاً نهائياً بحسب المحدد من التجربة بعد الخلط وبثلاثة مكررات لكل تركيز من البكتريوسين.

تحضن well plate بالأوقات 60 , 50 , 40 , 30 , 20 , 10, 0 دقيقة وبدرجة حرارة 37م وتسجل القراءات مقابل السيطرة control والذي لا يحتوي على البكتريوسين.

النتائج والمناقشة :

وجد الباحث Sgouras et al (2004) أن بعض أنواع بكتريا *Lactobacillus* لها تأثير تثبيطي على نمو بكتريا *H.pylori*. وأوضح أخرون أن بعض المواد المفرزة من بعض بكتريا حامض اللبن نتيجة الفعّاليات الأيضية لها دور تثبيطي لنمو بكتريا *H.pylori* ومن هذه المواد الأحماض العضوية والبكتريوسينات (Bhatia *et al*.,1989;Midolo *et al*.,1995; Perez *et al*.,2014). وجد أن لبعض أنواع البكتريوسينات فعّالية تثبيطية واسعة ضد البكتريا الممرضة ولا سيما السلالات التي لها مقاومة للمضادات الحيوية Multi-antibiotic resistant (MAR) (Cotter *et al*.,2013). عزلت 22(21.5%) عزلة من عينات الخزع النسيجية المعدية, وأجري لهذه العزلات فحص بتقنية PCR وذلك للكشف عن هذه البكتريا التي تحمل جميع الصفات المظهرية السائدة من خلال الكشف عن المورثة *ureAB* بأستخدام بادئات Primers مخصوصة بالصفات المظهرية السائدة وكما ذكرها(Farshad, *et al*.,2007) وقد تم الكشف عن الجينات بطريقة التضخيم لقطع DNA لبكتريا *H.pylori* والتي قيمها2420 bp.

تبين أنَّ من مجموع 22 عزلة بكتيرية قد شخصنا 14(63.6%) عزلة بكتيرية تحمل جينUreas السائدة الذي يعتبر من عوامل الضراوة. الشكل (1).أظهرت نتائج التجربة الشكل (2) أن هناك تثبيطاً لنمو بكتريا *H.pylori* اذ وجد اختلاف بمستوى معنوي $p< 0.05$ وبحسب نوع البكتريوسين و التخفيف والوقت.

تشير النتائج بالشكل (2) وبوقت خلط 20 دقيقة الى أنَّ البكتريوسين المنتج من قبل البكتريا كان لها تثبيط لبكتريا *H.pylori* بالتراكيز العالية 5،10،20 مايكروكرام/ مل و لم يحصل فعل تثبيطي للبكتريوسين المنتج من بكتريا *L.plantarum* بتركيز 2.5،1.25,0.62,0.31,0.15 مايكروكرام/مل. أي انَّ بكتريوسين بكتريا *L.plantarum* لم يكن له فعَّالية تثبيطية بعد التركيز 5 مايكروكرام/لتر. وبينت النتائج بالشكل(2) وبوقت خلط 40 دقيقة الى أنَّ هناك تثبيطاً لنمو بكتريا

H.pylori حيث وجد أختلاف بمستوى معنوي $p<0.05$ وبحسب تركيز بكتريوسين البكتيريا. وتبين أن تركيز 0.15،0.31،0.62 مايكروكرام/مل لبكتريوسين بكتريا *L.plantarum* لم يكن لها نسبة تثبيط لبكتريا *H.pylori*.

كما بينت النتائج بالخلط لمدة 60 دقيقة أن هناك تثبيطاً معنوياً بمستوى $p<0.05$ لجميع تراكيز البكتريوسين ما عدى التركيزين 0.15،0.31 مايكروكرام/مل ويتبين من ذلك أن هناك عوامل عدة تؤثر على نمو بكتريا *H.pylori* كنوع البكتريوسين وتركيزه ووقت تعرض بكتريا *H.pylori* لها و بزيادة وقت تعرض بكتريا *H.pylori* للبكتريوسين تزداد نسبة التثبيط.

أن ألية عمل البكتريوسين شبيه بألية عمل المضادات الحيوية من حيث تكوين ثقوب Ionophore في جدار بكتريا *H.pylori* حيث ان البكتريوسين متعدد ببتيدي مضاد للبكتريا.

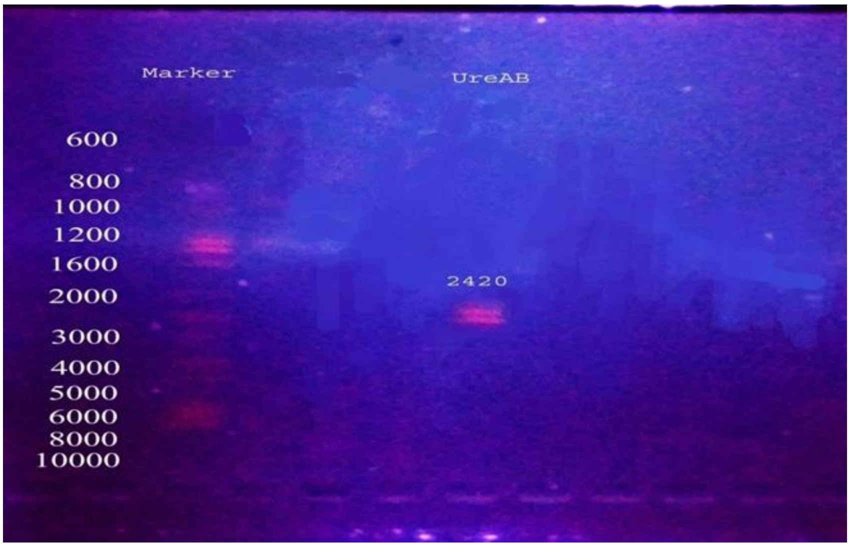
وبدراسة تأثير الوقت على تثبيط بكتريا *H.pylori* لنفس نوع البكتريوسين نلاحظ أن بازدياد عامل الوقت تزداد نسبة التثبيط كما نلاحظ عند استخدام التركيز 0.15 مايكروكرام/لتر وبوقت خلط 40 و20 دقيقة لم يكن له تأثير تثبيطي ولكن بالوقت 60 دقيقة لاحظنا وجود تثبيط أن الوقت 60 قد أعطى أعلى نسبة تثبيط.

استخراج قيم التركيز المثبط الادنى MIC minimum inhibitory concentration

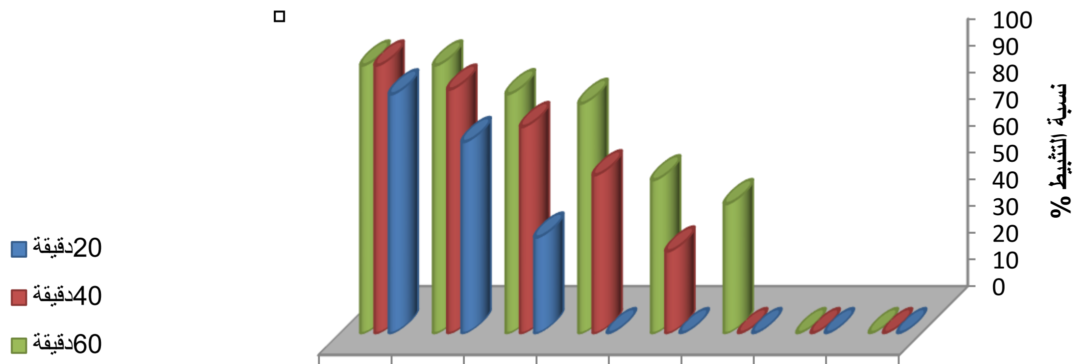
استخرجت قيمة MIC وهي أقل قيمة تركيز من البكتريوسين ممكن أنْ تعمل تثبيط لبكتريا *H.pylori* بعد تحديد البكتريوسين الذي ممكن أنْ يثبط البكتريا, وذلك باستخدام طريقة التخفيف(CLSI,2012), من الشكل (2) أظهرت النتائج لأقل قيم التثبيط واعتمادا على تركيز البكتريوسين المستخلص. بينت النتائج أنَّ أقل قيمة لتركيز المثبط الأدنى للبكتريوسين ممكن أنَّ تعمل تثبيطاً كاملاً لبكتريا *H.pylori* في وقت 60 دقيقة لبكتريوسين بكتريا *L.plantarum* هو 10مايكروغرام/مل, و تبين أنَّ كل الفروقات بين أنواع التراكيز وفي كل الأوقات معنوية بمستوى $p<0.05$. أكدت العديد من الدراسات أن البكتريوسين المنتج من بكتريا *Lactobacillus* يمتلك القابلية على تثبيط أنواع من بكتريا سالبة صبغة كرام (Bisson *et al.*,2012;Flynn *et al.*,2002).

أن التفاوت في فعّالية البكتريوسين المستخلص والمنقى مقارنة مع المفرز من قبل الخلايا الحية Cell free Extract(CFE) ممكن أنْ يرجع الى كفاءة المادة المستخلصة من البكتريا فقد أوضح Lamendella et al (2011) أنَّ البكتريوسين المنتج من بكتريا *Lactobacillus* داخل الجسم الحي يكون ذو فعالية كبيرة تجاه البكتريا السالبة كرام اذ أن الأنواع البكتيرية السالبة الصبغة كرام تكون ضعيفة الحساسية للبكتريوسين المنتج من قبل الأنواع الموجبة لصبغة كرام.إنْ

للبكتريوسين تأثيراً مثبطاً لنمو البكتريا (Bacteriostatic) أو قاتلة للبكتريا (Bactericidal) (Arihara *et al*.,1996) وترجع فعالية البكتريوسين العالية ضد الأنواع البكتيرية الى مقدرته على تكوين فتحات في طبقة الفوسفات المزدوجة Phosphate bilayer الموجودة ضمن تركيب غشاء السيتوبلازم مما يسبب في اعاقة القوة المحركة للبروتونات (Saranya and Hemashenpagam 2013,.). وقد جاءت نتائجنا مطابقة لما توصل إليه Azab et al (2016) من أنَّ البكتريوسينات المنتجة من *Lactobacillus Plantarum* لها دور تثبيطي للبكتريا الممرضة والمحضنة مع البكتريوسين لمدة ساعتين وما توصل اليه Elsilk et al (2015) من أن للبكتريوسسين نشاطاً تثبيطياً عالياً لبكتريا سالبة كرام. توصل Yang et al (2012) الى أنَّ تناول اللبن الرائب والذي يحتوي على بكتريا *L.acidophilus* قد تحسن حالة المصابين بالالتهاب المعدي ببكتريا *H.pylori*.



شكل (1): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز لنواتج تضاعف ال PCR لجين عزلات بكتريا *H.pylori* (*ureAB*) وبوجود Marker .



	con 20	10	5	2.5	1.25	0.65	0.31	0.15
20دقيقة	89.2	71.4	35.7	0	0	0	0	0
40دقيقة	100	91	77	59	30.5	0	0	0
60دقيقة	100	100	89.28	85.7	57.14	48.21	0	0

تركيز البكتريوسين مايكروكرام/مل

شكل(2): مقارنة تثبيط نمو بكتريا *H.pylori* بخلطها مع تراكيز مختلفة من البكتريوسين لبكتريا *L.plantarum* لمدة 60,40,20 دقيقة .

دراسة الفعالية التثبيطية للبكتريوسين على فعالية أنزيم urease لبكتريا *H.pylori* :

يبين الجدول (4) نتائج قراءة الفعَّالية التثبيطية للبكتريوسين التي له فعَّالية تثبيطية مختلفة لأنزيم اليوريز وبحسب نوع البكتريا المنتجة للبكتريوسين مقارنة مع السيطرة لكل نوع, ففي البكتريوسسين المنتج من بكتريا *L.plantarum* **لوحظ** وجود تثبيط وأنَّ عامل الوقت في تثبيط أنزيم اليوريز كان له تأثير مختلف وبحسب تركيز البكتريوسين وكانت الفروق معنوية وبمستوى $p<0.05$ فقط بين 0 و 10 دقيقة والأوقات الأخرى, أما ما بين 20 دقيقة وما بعدها فلم تكن الفروق معنوية. وقد جاءت النتائج متوافقة مع نتائج yang et al (2012) من أن راشح بكتريا *L.plantarum* والمعزولة من مستخلص نبات الجنسنك Ginseng لها قوة تثبيطية على فعالية أنزيم اليوريز ضد بكتريا *H.pylori* حيث وجد أن راشح هذه البكتريا له نشاط مضاد للبكتريا Anti-bacterial ومضاد لالتصاق البكتريا anti-adhesion وبذلك يكون له دور مانع لتلف الغلاف المعدي. كما بين Dore et al (2013) أن لبعض أنواع بكتريا *Lactobacillus* دور تثبيطي لأنزيم اليوريز وهذا يتوافق مع النتائج التي تم التوصل إليها. من ذلك يتبين أن استخدام البكتريا العصوية الحامضية لها تأثير على تثبيط أنزيم اليوريز المفرز من قبل بكتريا *H.pylori*وبذلك فأن هذه البكتريا لن تستطيع مقاومة الوسط الحامضي المعدي وسيؤدي ذلك إلى تعرضها إلى درجات عالية من الحموضة مما سيتسبب في القضاء عليها, لأنَّها فقدت وسيلة دفاعية مهمة لها.

توصل Yang et al (2012) الى أنَّ تناول اللبن الرائب والذي يحتوي على بكتريا *Lactobacillus* قد تحسن حالة المصابين بالالتهاب المعدي ببكتريا *H.pylori*.وتوصل الباحث Sgouras et al (2004) إلى أنَّ العلاج بمجموعة سلالة بكتريا *Lactobacillus* والمعزولة من الحليب المبستر لها قوه تثبيطيه على نمو بكتريا *H.pylori* في داخل الجسم الحي وهبوط معنوي في التهاب المعدة الحاد. وتوصل الباحث Boyanova (2012) إلى أنَّ المعززات الغذائية (Probiotic) لها تأثير كبير في التقليل من الأثار الجانبية لبكتريا *H.pylori* وربما تؤدي إلى استئصال هذه البكتريا عندما توصف كبديل للمضادات الحيوية ولفترة 1–3 أسابيع وتؤخذ مع الطعام حيث إنَّ زيادة درجة حموضة المعدة هي أكثر ملائمة للمعززات الحيوية. إنَّ استخدام المعززات الغذائية ستؤدي الى التقليل من الأثار الجانبية باستخدام المضادات الحيوية من حيث حصول الإسهال والإمساك والدوخة والغثيان وكلفة أسعارها العالية علاوة على أنَّ المعززات لها مذاق مستحب قياسا للمضادات الحيوية, ومع أن تأثيرها المباشرة على البكتريا يعد ضعيفاً ولكن له

تأثير بالاستخدام المستمر ويمكن أن يمنع أمراض مثل سرطان المعدة والقرحة الهضمية Lesbros (*et al.*,2007).

جدول (4):القراءة أللونية (OD560) لقياس فعَّالية أنزيم اليوريز والمعاملة بتراكيز مختلفة من البكتريوسين (Sub-MIC) وبأوقات مختلفة.

Lactobacillus Sp	control	Time min						
	60	0	10	20	30	40	50	60
L.plantarum Sub-MIC = 0.62	2.3	0.62	1.5	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7

References:

- Arihara, K.; Ogihara, S.; Mukai, T.; Otoh, M. and Kondo,Y.(1996) .Salivacin 140, a novel bacteriocin from Lactobacillus salivarius subsp. salicinius T140 active against pathogenic bacteria. Lett. Appl. Micr.22: 420–424.
- Azab, E. A., Elsilk, S. E., El-Salam, I. S. A., & Tahwash, A. M. (2016). Determination of The Bacteriocin-Like Substances Produced by Enterococcus Hirae Isolated from Traditional Egyptian Food (Koskos). Biosciences Biotechnology Research Asia, 13(2), 803-813.
- Beasley, S. S., Saris, P. E. J.,(2004) Nisin-producing Lactococcus lactis strains isolated from human milk. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 70, 5051-5053.
- Bhatia, S. J., N. Kochar, P. Abraham, N. G. Nair and A. P. Mehta (1989). "Lactobacillus acidophilus inhibits growth of Campylobacter pylori in vitro." J Clin Microbiol 27(10): 2328-2330
- Bisson, E.; Sturme, H.M.; Jeffery, I.B.; Neville, B.A.; Forde, B.M.; Claesson, M.J.; Harris, H.; Gardiner, G.E.;Casey, P.G.; Lawlor, P.G. and Ross, R.P.(2012). Effect of Lactobacillus salivarius Bacteriocin Abp118 on the Mouse and Pig Intestinal Microbiota.PLOS.ONE.7 (2):31113.
- Boyanova L, Mitov I.(2012) Coadministration of probiotics with antibiotics: why, when and for how long. Expert Rev. Anti Infect. Ther, 10: 407–409,.
- Burianek, L. L., & Yousef, A. E. (2000). Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. Letters in applied microbiology, 31(3), 193-197.
- Cotter PD, Ross RP, Hill C(2013), Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? Nat Rev Microbiol 11:95-105.
- Cui, Y., C. L. Wang, X. W. Liu, X. H. Wang, L. L. Chen, X. Zhao, N. Fu and F. G. Lu .(2010). "Two stomach-originated lactobacillus strains improve Helicobacter pylori infected murine gastritis." World J Gastroenterol 16(4): 445-452.
- Desai, A. R. (2008). Strain identification, viability and probiotics properties of Lactobacillus casei (Doctoral dissertation, Victoria University) .

- Elsilk, S.E., Azab, E.A., Tahwash, A.M.(2015) Bacteriocins-like substances produced by *Enterococcus sanguinicola* isolated from traditional Egyptain food Sires (Chicorium pumilum). *JSM Microbiology*,; **3**(1): 1018.
- Enomoto, H., H. Watanabe, K. Nishikura, H. Umezawa and H. Asakura (1998). "Topographic distribution epithelium by the Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA)." Front Cell Infect Microbiol 2 Beasley, S. S.
- Farshad, S., Alborzi, A., & Abbasian, A. (2007). Association of H. pylori virulence genes CagA, VacA and UreAB with ulcer and nonulcer diseases in Iranian population. Pak J Biol Sci, 10(8), 1185-9.
- Farshad, S., Alborzi, A., & Abbasian, A. (2007). Association of H. pylori virulence genes CagA, VacA and UreAB with ulcer and nonulcer diseases in Iranian population. Pak J Biol Sci, 10(8), 1185-9.
- Farshad, S., Alborzi, A., & Abbasian, A. (2007). Association of H. pylori virulence genes CagA, VacA and UreAB with ulcer and nonulcer diseases in Iranian population. Pak J Biol Sci, 10(8), 1185-9.
- Felley, C. and P. Michetti (2003). "Probiotics and Helicobacter pylori." Best Pract Res Clin Gastroenterol 17(5): 785-791
- Flynn, S.; van Sinderen, D.; Thornton, G.M.; Holo, H.; Nes, I.F. and Collins, J.K.(2002).Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118,a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium Lactobacillus salivarius subsp . salivarius UCC118.J. Microbiol.148:973-984.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S., & Bailey, S. S. (2007). Diagnostic microbiology 12th Edition: Mosby Elsevier, St. Louis, MO, 778-781.
- Han, S. R., Schreiber, H. J., Bhakdi, S., Loos, M., & Maeurer, M. J. (1998). vacA genotypes and genetic diversity in clinical isolates of Helicobacter pylori. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 5(2), 139-145.
- Kim, W.; Moss, S.F. (2008). "The role of H. pylori in the development of stomach cancer".Oncology Review. 1 (Suppl 1): 165–168.
- Lamendella, R.; Domingo, J.W.; Ghosh, S.; Martinson, J. and Oerther, D.B. (2011).Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. BMC. Microbail.11: 103.
- Lesbros-Pantoflickova D, Corthesy-Theulaz I, Blum A.L.(2007)Effects of Probiotics and Prebiotics. Helicobacter pylori and Probiotics. J. Nutr.,137: 812S–818S.
- Lionetti, E., F. Indrio, L. Pavone, G. Borrelli, L. Cavallo and R. Francavilla (2010). "Role of probiotics in pediatric patients with Helicobacter pylori infection: a comprehensive review of the literature." Helicobacter 15(2): 79-87.
- Liu, H., C. Semino-Mora and A. Dubois (2012). "Mechanism of H. pylori intracellular entry: an in vitro

- Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F., & Grayson, M. L. (1995). In vitro inhibition of Helicobacter pylori NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 79(4), 475-479.
- Mohammad. J. Mohammed & Essam M. Abdullah.(2013) Detection of H.pylori cagA gene in patient's with gastroduodenal disease . Journal of university of Anbar for Pure science . Volume: 7 Issue: 1 Pages: 57-65 .

- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50(3), 512-542
- Parsonnet ,jan.,Weleh,K.,Compton,C.,Strauss,R.,Timothy,W.,Kelsey,P,and Ferraro,M.J.(1998).Simple microbiological detection of Campylobacter pylori .J.Clin.microbial.926(5);948-949.
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories*, *13*(1), 1.
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravanakumar, A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus lactis isolated from marine environment. Adv J Food Sci Technol, 2(2), 138-144.
- Ryan, K. A., P. Daly, Y. Li, C. Hooton and P. W. O'Toole (2008). "Strain-specific inhibition of Helicobacter pylori by Lactobacillus salivarius and other lactobacilli." J Antimicrob Chemother 61(4): 831-834.
- Saranya, S. and Hemashenpgam, N.(2013).purification and characterization of bacteriocin production by different Lactobacillus species isolated from fermented food.Int.J.Micr. .5(1):341-348.
- Venema,G.; Huis,J.H. and Hugenholtz,J.(Eds)(1990): Lactic acid bacteria:Genetics, Metabolism and Application.Kluwer Academic Press: Dordrecht,Boston, London.
- Yang, J. W., Choi, S. Y., Park, S. J., Paek, N. S., & Kim, S. S. (2012). Anti-Helicobacter Pylori effect of fermented ginseng extracts with Lactobacillus plantarum MG 208. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 55(1), 53-56.
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. APCBEE Procedia, 2, 50-56.
- Zaman, C., Osaki, T., Hanawa, T., Yonezawa, H., Kurata, S., & Kamiya, S. (2014). Analysis of the microbial ecology between Helicobacter pylori and the gastric microbiota of Mongolian gerbils. Journal of medical microbiology, 63(1), 129-137

The inhibitory effect of bacteriocin extracted from *Lactobacillus plantrum* bacteria on urease enzyme of *Helicobacter pylori* isolated from human

Abstract:

This study aimed at extracting bacteriocin produced from *Lactobacillus plantrum* isolated from 30 samples, including yoghurt, local cheeses and Activia yoghort. The isolates were selected based on their ability to produce bacteriocin and its inhibitory effect on some pathogenic bacteria. This study included the extraction of bacterium Influence on *H.pylori* bacteria isolated from the stomach of patients and transformers to the Department of Gastroenterology at Yarmouk Hospital for the period from 20/2/2015 to 10/9/2015.The results of our culture and microscopic study and biochemical diagnostic tests performed on isolates showed that five isolates of *L.plantrum* had the ability to produce bacteriocin differently depending on the isolates and were extracted purely. The study improved the ability of bacteriocin to inhibit the growth of *H.pylori* bacteria and urease enzyme at concentration used, The effect of bacteriocin was studied based on bacteriocin inhibition. .