

(Ennahar) . وهذا () . ويتكون من class II البكتيريوسين هو من () ، وينتجها ببتيديين اثنين ينصب ه () ، الخاليا البكتيرية وتودي الى موتها (Deip) ، وللحرارة العالي () ، وتقل الثباتية تجاه الحرارة عند الحرارة العاليية (Jack) .

هدفت هذه الدراسة الى عزل بكتيريا Bifidobacterium من براز الاطفال وتنقيتها وتشخيصها وتنميتها على الوسط الغذائي MRS وتم فصل وتنقية ؛ البكتيريوسين المنتج من قبلها باستخدام الطرد المركزي وكبريتات الامونيوم والترشيح الهلامي ودراسة تأثيره في بعض انواع البكتيريا المرضية وكذلك دراسة تأثير ، التحضين في نمو البكتيريا وانتاج البكتيريوسين المنتج مع دراسة ثباتيته تجاه الاس الهيدروجيني و درجات الحرارة العاليية .

مواد البحث وطرقه

لت بكتيريا *B. bifidum* من براز الاطفال حديثي الولادة وبعمر اسبوعين والمعتمدين في تغذيتهم على حليب الام ويتمتعون بصحة جيدة ، (MRS deMan)

(Rogosa Sharp broth) المعقم والتحضين على لتنمية البكتيريا حسب طريقة ()

() جريت الفحوصات المظهرية والكيميائية بطريقة (McCance Harrigan) ()

() Bergey's manual () . تم انتاج البكتيريوسين من العزله المحلي بتنميتها في الوسط MRS وفصلت الخلايا باستخدام الطرد المركزي دورة بالدقيقة ولمدة دقيقة

ت المادة المثبطة لها حسب طريقة (Karaoğlu) () %

اشباع من كبريتات الامونيوم مع التحريك المستمر في حمام ثلجي ولمدة دقيقة وفصلت دورة بالدقيقة لمدة دقيقة واضيفت كبريتات الامونيوم الثلجي مع التحريك المستمر لمدة دقيقة ثم تبعها فصل الراسب . اذيب الراسب بكمية

مل من المحلول المنظم سترات الصوديوم () . ذاته ()

السي G-100

الامتصاص باستخدام جهاز Spectrophotometer Pye Unicom

نانوميتر وجمعت الانابيب لكل قم وقدرت الفعالية التثبيطية على بكتيريا الاختبار *aureus*

Staphylococcus وبطريقة الاقراص المغمورة (Disk/assay) Mannitol salt agar

وتم قياس المنطقة الخالية من ال و حسب طريقة (Ryan) () . تم تنمية البكتيريا

MRS Bifidobacterium

دورة بالدقيقة در التأثير التثبيطي له على البكتيري

Proteus vulgaris *B. subtilis* *Brevibacterium sp.* *Klebsella aerogenes*

Staph. aureus *E. coli* *Salmonella typhi* وباستخدام الاوساط الغذائية المنت

نوع من البكتيريا بطريقة الاقراص المغمورة ، وايضا" اخذ الراشح وقدّر التأثير التثبيطي له بكتيريا *Staph. aureus* وكذلك قدرت اعداد بكتيريا *Bifidobacterium bifidum* بطريقة الاطباق المصبوبه ساعة لاهوائي" . ودراسة ثباتية الراشح Bifidin تجاه الاس الهيدروجيني

الاس الهيدروجيني للبقدين ، كذلك تم دراسة الثبات الحراري للبقدين دقيقة وقدّر التأثير

التثبيطي له بكتيريا *Staph. aureus* .

النتائج والمناقشة

من خلال الفحوصات التأكيدية للعزل لمحلية الماخوذة من براز الاطفال ومطابقتها مع موسوعة Bergey's manual (1986) نجد من الجدول (1) بان صفات العزلة غير محللة للجيلاتين والكازين والنشا وسالبة لانتاج الامونيا من الارجينين والكتاليز وغير منتجة للانحول وهذه الصفات تتفق مع ما ذكره Holt () كذلك فان العزل للسكريات الكلوكوز واللاكتوز والفركتوز والكالكتوز والسكروز و الرافينوز والمالتوز والسكوالين وغير مخمر سين والزايول والارابين والمانيتول والسوربيتول والايولين وهذه تتفق مع Moli () .

ومن اجدوا () نجد التأثير الذي يطى لراشح بكتيريا Bifidobacterium في نوع البكتيريا المرضية *Staph. aureus* اكثر حساسية من بقية الانواع لذلك بلغت قطر المنطقة الخالية م في حين بكتيريا *E. coli* الخالي في حين *Bacillus subtilis* *Proteus vulgaris* *Brevibacterium sp.* *Klepsella aerogenes* *Salmonella typhi* اقطار منطقة التثبيط الخالية

() نلاحظ وجود قاتين بعد عملية التنقية بالفصل بالترشيح الهلامي اذ ظهرت القمة الاولى في الانابيب رقم - ، الثانية فظهرت في الانابيب رقم ٢٠-٢٦. من الجدول (٣) نجد عند جمع المحلول لكل قمة كان التأثير تثبيطي في بكتيريا *Staph. aureus* ١٣ ملم للقمة الاولى وكان قطر المنطقة التثبيطية للقمة الثانية في بكتيريا *Staph. aureus* ٨ ملم. ومن ذلك نستنتج بان التأثير التثبيطي لمحلول القمة الاولى اكبر تأثيرا من محلول القمة الثانية كما نجد بان الراشح الكلي له تأثير تثبيطي اكبر من كل من محلول للقمة الاولى وكذلك محلول القمة الثانية ونستنتج من ذلك بانه هناك علاقة تازرية لمحلول القمة الاولى والثانية في التأثير التثبيطي على بكتيريا *Staph. aureus*.

من الجدول (٤) يلاحظ اذ ان هناك زيادة في النمو بزيادة مدة التحضين الى ٧٨ x ١٠ و. ت / م / مل ثم انخفضت بعد ٤٨ ساعة لتصل الى ١١ x ١٠ و. ت / م / مل كذلك يلاحظ التأثير التثبيطي للراشح في بكتيريا *Staph. aureus* بعد ٢٤ ساعة اذ ازداد ليصل الى ١٢ مل من قطر المنطقة الخالية من النمو اذ تعتبر المواد المثبطة (البكتريوسينات) منتجات ثانوية تنتج في نهاية الطور اللوغاريتمي و طور الثبات ونجد هناك علاقة موجبة بين نمو البكتيريا *B. bifidum* ساعة من التحضين , وهذه تتفق مع ما ذكره Yildirim Johnson () حيث خفض بعد ذلك نتيجة فعل الانزيمات المحللة للبروتين

من الجدول (٥) نجد المعاملة الحرارية على دقيقة كان التأثير التثبيطي للراشح على ٦٠ م ولمدة ٢٠ دقيقة ثابتا تجاه بكتيريا *Staph. aureus* وقطر المنطقة الخالية من النمو / دقيقة فكان / دقيقة كانت ملم من ذلك نستدل بان البكتريوسين ذو ثباتيه عالية للحرارة . وهذه تتفق مع ما ذكره El- Saleh Sayed () بان المواد المثبطة المنتج تثبيطي *Bifi. lactis* ثباتي و نلاحظ ايضا () تأثير الاس الهيدروجيني تثبيطي البكتريوسين لبكتيريا *Staph. aureus* اذ نجد اكبر تأثير له على ا هيدروجيني وكان قطر المنطقة الخالية من النمو ١٥ و ١٤ ملم على التوالي , ثم انخفض التأثير عند الابتعاد عن تلك القيم للاس الهيدروجيني المنطقة الخالية من النمو على الاس الهيدروجيني ٤ لبكتيريا *Staph. aureus* هو ٦ ملم . وعند ا هيدروجيني المنطقة الخالية من النمو

() : المظهرية والكيميائية لبكتيريا *Bifidobacterium bifidum*

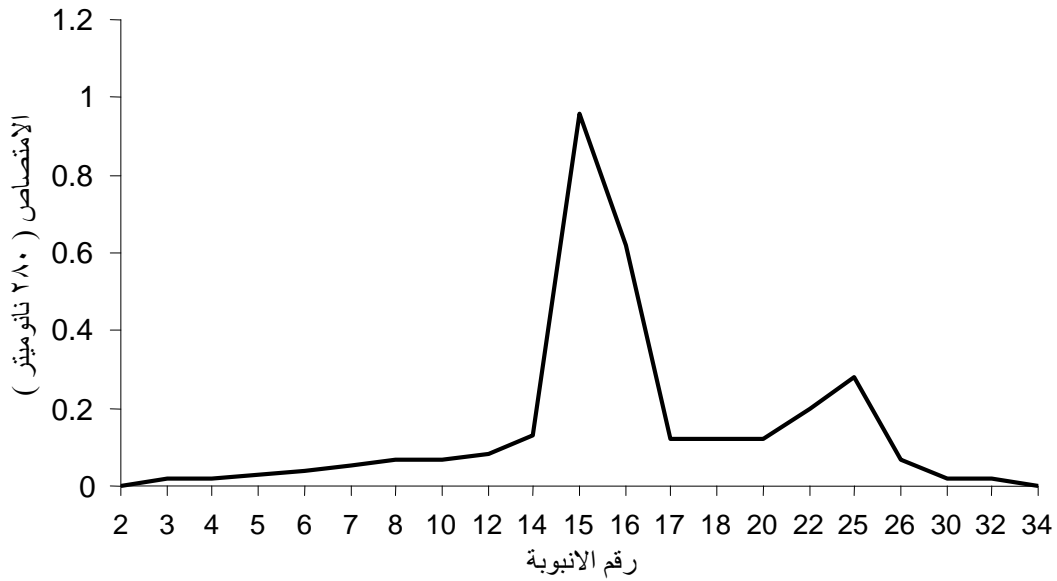
لسكريات		الصفات الكيميائية	المظهرية
اسكوالين +	+	غير مسيله للجلائين	:
سالسين -	+	غير محلله للكازين	:
+	±	غير محلله للنشاء	: ضعيف
ارابينوز -	+	له لفحص الكالتيز	: نمو جيد
سوربيتول -	+	لا تكون الامونيا من الارجين	: نمو جيد جدا
زايلول -	-	غير منتج للاندول م	: نمو جيد
انيولين -	+	التريبتوفان	

() : تأثير التثبيطي بريا *B. bifidum* بعد تميتها على وسط MRS والتحضين

() على بعض الانواع البكتيري المرضي

منطقة التثبيط ()	البكتيريا
	<i>Staph. aureus</i>

	<i>B. subtilis</i>
	<i>Proteus vulgaris</i>
	<i>Brevibacterium sp.</i>
	<i>Kelpsella aerogenes</i>
	<i>Salmenell typhi</i>
	<i>E. coli</i>



() : من بكتيريا *Bifidobacterium bifidum* بالترشح الهلامي
(Gel filtration) سيفادكس G-100

() : تأثير المادة المثبطة لببتيدان المفصولان بطريقة الترشيح الهلامي ا
يريا *Staph. aureus*

الانابيب	لتثبيط ()
-	
-	
-	

() : تأثير مدة التحضين يريا *B. bifidum* منطقة التثبيط الناتج من راشحها
يريا *Staph. aureus*

مدة التحضين ()	اعداد البكتيريا و . . /	منطقة التثبيط ()
	X	

	X	
	X	
	X	
	X	

() : تأثير المعاملة الحرارية على فعالية البكتيريوسين المنتج من قبل بكتيريا *bifidum* نمو بكتيريا *Staph. aureus* B.

قطر منطقة التثبيط ()	المعاملة الحرارية	
	(دقيقة)	()

جدول () : تأثير الاس الهيدروجيني (pH) على فعالية البكتيريوسين المنتج من قبل بكتيريا *B. bifidum* نمو بكتيريا *Staph. aureus*

قطر منطقة التثبيط ()	pH

ISOLATING AND PURIFYING OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES PRODUCED BY *Bifidobacterium bifidum* AND USING IT AS INHIBITOR FOR SOME PATHOGENIC BACTERIA

Al- badrany H . S. Kh. M. Hassen Mawafak. M. Ali
Food Sci. and Biotechnology Dept., Collage of Agric. and Forestry, Univ. Mosul,
Iraq.

ABSTRACT

Bifidobacterium bifidum was isolated from the stool of newly born infant using the morphological and biological tests of the Berge's Manual,1986. The *B. bifidum* antimicrobial substances were extracted and purified by Gel-filtration. Results showed that two peptides were found for the bifidin . The inhibition zone of the first peptide for *Staphylococcus aureus* was 13 mm , whereas the second peptide was 8 mm. The activity of the inhibited substances of the above local strain was increased during the incubation period . The total numbers of *B. bifidum* were 78×10^6 c.f.u / ml after incubation for 24 hr and decreased to 11×10^6 c.f.u / ml for 48 hr . The inhibition zone was 12 mm after incubation for 24 hr and increased to 15 mm after incubation for 48 hr. Results also showed that heat treatment at 60 , 80 and 100 C° at

30 minutes were not affected and the inhibition zone had been stable. The inhibition zones at these temperatures was 14, 13, 12 mm, respectively . The most effective PH values was 6 PH and the inhibition zone was 15 mm. *Staph. aureus* was the most sensitive species, whereas *E. coli* was the most resistant to bifidin and the zone of inhibition, were 15 , 9 mm, respectively . The zones of inhibition for *B. subtilis* , *Proteus vulgaris* , *Brevibacterium sp.* , *Klebsella aerogenes* , *Salmonella typhi* were 13 , 12 , 11 , 10 and 10 mm, respectively .In conclusion, due to the bacteriocin and in view of health benefits , the *B. bifidum* could be used for elongating the shelf life of some fermented dairy products .

المصادر

- غانم محمود () . تصنيع منتوج لبني متخمّر باستخدام عزلات مختلفة من بكتيريا حامض اللاكتيك . - كلية الزراعة والغابات -
 زهره محمود () . الاحياء العلاجية (من اجل الحياة) . معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا -
 Berge's Manual of Systematic Bacteriology volume 2. Peter, H. A. Sneath. Nicholas, S. Mair, M. Elisabeth Sharpe. John G. Holt (1986).
 Diep , D. B. L.S. Hararstein and I.F.Nes (1996). Characterization of the Locus responsible for the bacteriocin production in *lactobacillus plantarum* c11 .Bacteriol. 178, 4472-4484.
 Ennahar , M.A. V.G. Remiger, H. Eijsink. and R.F. Vogel (2000). Agene cluster encoding plantaricin 1-25 beta and other bacteriocin –like peptides in *lactobacillus plantarum* TMW 1-25 Biochemic–et Biophysica –Acta .
 Gurosy , O. O. Kinik, and R. Gokce (2005). The role of dairy foods and probiotic bacteria in cancer prevention . Egyptian J. Dairy Sci. , 33:13-20 .
 Harrigan, W. F. and M. E. McCance (1976). Laboratory method in food and dairy microbiology Academic press. London. New York. San-Francisco.
 Holt, J. C. ,N. R. Krieg, J. T. Statley, and S. T. Williams (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams and Wilkins Baltimore. Maryland, U.S.A.
 Jack, R.W., J. R. Tagg and B. Ray (1995). Bacteriocin of gram positive bacteria, Microbiology Review , 59: 171-200 Deipet .
 Karaoghlu , S.A. ,F. Aydin , S.S Kilic and A. O. Kilic (2003) . Antimicrobial activity and characteristic of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli, Tark . J. Med . Sci ., 33:7-13.
 Kebary, K. M. K. and S. Hussein (1999) . Manufacture of law Fat Zabady using different Fat substitutes, Acta. Alimentaria 28: 1-14.
 Kerjavalune, P. V.,S.J. Salminen and E. Isolauri (2003). Probiotic bacteria in the management of a topic disease . under scoring the importance of viability . J. pediatr. Gastroenterol Nutr. , 36 : 223 .
 Moli, G. B. Jeppsson, and S. Ahrne (1993). Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. Associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. J. Appl. Bacteriol, 74: 314-323.
 Ryan, JJ., MM., 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 : 2384-2387.

- Saleh, F. A. and E. M. El-sayed (2004). Isolation and characterization of bacteriocins produced by *Bifidobacterium lactis* BB-12 and *Bifidobacterium longum* BB-46 . Proc. The 8th Egyptian conf. for Dairy Sci, and Tech, Cairo. PP. 323.
- Yildirim ,Z. and M.G. Johnson (1998). Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J. Food Protection 61 : 47.