التحري عن انتاج البكتريوسين وتحفيز انتاجه بوساطة مستخلص نبات *Brassica rapa*

هند حسين عبيد
قسم علوم الحياة , كلية العلوم , جامعة بغداد

استلم في: 15 ايار 2016 ,قبل في: 29 ايار 2016

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى محاولة التوصل الى مواد طبيعية تعمل على تحفيز انتاج البكتريوسينات، فضلا" عن الكشف عن العزلات المنتجة بوساطتها. عزلت (280) عزلة بكتيرية سالبة لصبغة كرام تم الحصول عليها من جمع (760) عينة مرضية مختلفة، شملت : (التهاب المجاري البولية/ Urinary tract infection وتسمم الدم / septicemia والتهاب المهبل /Vaginal inflammation والأسهال /diarrhea)، والبكتيريا المعزولة هي: *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Salmonella typhi* و *Enterobacter cloacae* و *Acinetobacter baumannii* و *Serratia liquefaciens* و *Citrobacter freundii* و *Serrattia odorifera* و *Proteus mirabilis*. أستخدمت طريقة أقراص الأكار (cup assay) للكشف عن العزلات المنتجة للبكتريوسين. حضر الوسط الزرعي المصنع محليا" (الوسط الزرعي المغذي الصلب + مستخلص جذور نبات *Brassica rapa*)، للكشف عن العزلات المنتجة للبكتريوسين مقارنة " مع الوسط المغذي الصلب. وجد أن العزلات المنتجة للبكتريوسين في الوسط المغذي الصلب بلغت (80) عزلة فقط بنسبة (28.57٪)، في حين وصلت النسبة الى (82.5٪) اي (231) عزلة منتجة عند أستعمال الوسط المحلي. كما أعطى الوسط المحضر مناطق تثبيط نمو وصلت الى (45 ملم) في بكتيريا *E. coli* ، كما إستعمل مستخلص النبات قيد الدراسة في تحفيز انتاج الكولسين مقارنة مع عقار المايتومايسين – C في خمس عزلات من بكتيريا *E. coli* ، وجد إنه يضاهي المايتومايسين C- (Mt-C) في عمله بل وكان أفضل منه في بعض العزلات في كمية البكتريوسين المنتج ومناطق تثبيط النمو والفعالية.

الكلمات المفتاحية: Cup assay ، *Brassica rapa* ، Bacterocin، mitomycin-c

المقدمة

البكتريوسينات هي مركبات بروتينية ذات وزن جزيئي عالٍ، مضادة للجراثيم تنتج من البكتريا وتقوم بتثبيط أو قتل الانواع القريبة والمشابهة لها، وهي تنتج من مختلف المجاميع البكتيرية سواء Eubacteria أو الـ Archaebacteria، تختلف هذه المضادات فيما بينها بالحجم وطرائق إفرازها من الخلايا المنتجة وكذلك في طرائق نقلها الى داخل الخلايا الحساسة [1،2]. يعود تاريخ اكتشاف البكتريوسينات إلى عام 1877، عندما لحظ الباحثون ظاهرة التضاد البكتيري (antagoniusm) بين الكائنات المجهرية، إذ تتمكن بعض السلالات البكتيرية من تثبيط نمو بكتيريا أخرى تعود للنوع نفسه [4]. أما تسمية هذه المضادات فإنها تعتمد أساساً على اسم البكتيريا المنتجة (اسم الجنس والنوع)، فضلاً عن وجود تحت أنواع متعددة منها تنتمي إلى النوع الواحد، [4]. ان صفة انتاج البكتريوسينات تقع تحت السيطرة البلازميدية بصورة عامة [5]، ومع ذلك توجد بكتريوسينات يقع انتاجها تحت سيطرة الكروموسوم وبالاخص الـ Microcins، مثل الـ Bacterocin 28b الذي تنتجه *Serratia marcescenc* الذي تكون جيناته محمولة على الكروموسوم، وقد تم تأكيد ذلك من قبل الباحث Cursino وجماعته [6]. يصنع البكتريوسين ويحث في البكتريا التي تمتلك بلازميد خاص لإنتاج البكتريوسين فقط، ويكون تصنيعه في الحالات الاعتيادية بكميات قليلة [7] لكن يمكن زيادة انتاج هذه البروتينات عشرات أو مئات المرات بوساطة استعمال المحفزات مثل مادة المايتومايسين-C (Mt-C) [8]، أو تستعمل بعض المضادات الحياتية مثل Chlormephincol [9] أو globomycin [10]، أو Ciprofloxacin [11] للغرض نفسه. كما قد تستخدم مادة بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وبعض انواع الاصباغ [12]. واستعملت الأشعة فوق البنفسجية في دراسات أخرى لحث الانتاج، كذلك استعملت الحرارة [8]. أما الباحث Bures وجماعته فاستعمل الثايمين (Thymine) لحث الأنتاج في الزجاج [13]. من جانب آخر يمكن حث انتاج الكولسين ذاتياً، وهذا ما أكده الباحث Pugsley [14]. على الرغم من تعدد المواد المحفزة سواء أكانت فيزيائية أم كيميائية الا ان مبدأ عملها واحد، إذ تقع عملية التصنيع تحت سيطرة (SOS system) وقد يسمى SOS Repair System أو SOS Operon System، وهو نظام انزيمي معقد [15].يُعرف القليل عن الوظيفة البيئية للبكتريوسينات وان دورها في الطبيعة لا زال غير واضح [1]. لكن بعض الدراسات اشارت الى دوره في التنافس والغزو بين المجتمعات البكتيرية أعتماداً على ظروف البيئة والموطن الفسيولوجي الذي يحدث فيه، إذ أن الكائن المجهري يتمكن من حماية نفسه كما يحمي الانسان نفسه منها، ومن ثم يوفر ذلك الكائن حماية للبيئة الموجود فيها [15،16].

يعد نبات الشلغم *Brassica rapa* من النباتات شائعة الاكل في العراق ، اذ يؤكل في الشتاء مسلوقاً للحصول على الدفئ. تطلق لفظة اللفت Turnip على الشلغم في الاصطلاح الحديث ومنذ القرن التاسع عشر، اما في المعاجم القديمة فقد أطلق علية اسم (السلجم – الشلجم) , أما الشلغم فهي عن التركية المنقولة عن الفارسية. كما تختلف تسمية النبات من بلد لأخر ، ففي العراق يسمى شلغم ، أما في مصر يطلق عليه أبو ركبة ، في حين يسمى كرنب في الشام [17،18]. ينتمي الشلغم الى العائلة الصليبية (Cruciferae Brassicaceae) وهو عشبة حولية أو ثنائية الحول ، جذورها درنية ، من النوع المتضخم اللحمي Flesh Root بيضاء اللون طرية وقد تحتوي على اللون الارجواني. يحتوي هذا النبات على أنواع عدة من الأملاح المعدنية : الكالسيوم Ca ، والفسفور P ، والبوتاسيوم K ،والصوديوم Na ، والمنغنيز Mn ، والكبريت S ، واليود I ، والزرنيخ A s ، اذ يعد هو النبات الوحيد مع الملفوف الذي يحتوي على عنصرالزرنيخ ، فضلاً عن وجود الحديد Fe ، والنحاس Cu. كما يحتوي الشلغم على السكريات والبروتين وكميات قليلة من الدهون . وكذلك Thiamine و Riboflavin و Niacin و Ascorbic acid وأثر من β – Carotene ، اما زيت بذوره فتحتوي كمية كبيرة من Erucic and Linoleic acid [18،19]. كما يحتوي الشلغم كغيره من أنواع هذا الجنس Brassica على مجموعة كبيرة من المركبات الكيميائية النباتية Phytochemicals المهمة في منع حدوث السرطان، وكذلك في قتل أنواع عدة من الخلايا السرطانية، فضلاً عن دورها في الحماية ضد المسرطنات Carcinogenesis والمطفرات Mutagenesis ومكضادات للأكسدة Antioxidant [19،20،21]. كذلك دوره كعلاج للعديد من الأمراض ومنها خفض نسبة الكلسترول في الدم [21] وخفض مستوى السكر في الدم[22] وغيرها من الأستعمالات الصيدلانية الكثيرة[20].

هدف البحث : نظرا" لأهمية البكتريوسينات وانتاجها في البيئة المعوية أو في حقل التجارب المختبرية لذا جاءت هذه الدراسة للتحري عن إنتاجية البكتريوسين من العزلات البكتيرية بأختلاف انواعها المعزولة من حالات مرضية سريرية وثم الكشف عن الأنتاجية باستخدام وسط زرعي مصنع محليا" ، وأخيرا" استعمل مستخلص نبات *Brassica rapa* في تحفيز البكتيريا على الأنتاج بدل المايتومايسين – C.

المواد وطرائق العمل

العزل والتشخيص

تم جمع (760) عينة مرضية من حالات مختلفة هي (التهاب المجاري البولية/ Urinary tract infection وتسمم الدم / septicemia والتهاب المهبل/ Vaginal inflammation والأسهال/ diarrhea)، شملت عينات : (الأدرار و الدم و مسحات المهبل والبراز) على الترتيب، للتحري عن البكتيريا السالبة لصبغة كرام وذلك حسب الطرائق التشخيصية

التقليدية المتبعة من قبل [23] ، أكد تشخيص العزلات البكتيرية باستعمال نظام Api 20-E وحسب تعليمات الشركة المصنعة.

الكشف عن العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسين.

التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسين باستعمال الوسط الزرعي المغذي الصلب (Nutriernt agar) كوسط إختباري

تم ترقيم البكتيريا المعزولة والمشخصة في هذه الدراسة أولاً، ولغرض التحري عن العزلات المنتجة للبكتريوسين، عُدت بعض العزلات منتجة (Producing cells) وبعضها الآخر دالة أو حساسة (Indicator or sensitive cells) تارةً، ثم طُبق العكس تارةً اخرى.أما الطريقة المتبعة في التحري فهي: طريقة أقراص الأكار (Cup assay)، [24].

التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسين باستعمال وسط زرعي مصنع محليا".

- **تحضير الوسط الزرعي المحلي:**

حضر الوسط الزرعي المحلي (مستخلص نبات جذور الشلغم + وسط الأكار المغذي) بالطريقة الآتية :

- **جمع النبات**: تم الحصول على نبات الشلغم من السوق المحلية ، وأختيرت الجذور ذات الحجم المتوسط والكبير الممتلئة الجديدة ، ذات الجلد اللماع والسليم . نظفت جيداً من الأتربة أن وجدت بوساطة غسلها بماء الحنفية مع ازالة الاجزاء غير المرغوب فيها.
- **تحضير المستخلص النباتي:** حضر مستخلص نبات جذور الشلغم بأخذ 100 غم من جذور النبات، قطعت الى شرائح خفيفة السمك ثم إضيف إليه 100 مل الماء المقطر ، ترك لمدة ثلاثة أيام في درجة حرارة الغرفة ثم رشح المستخلص عبر الشاش وبعدها طرد مركزيا" (5000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق) للتخلص من كل الشوائب، حفظ الراشح في درجة حرارة 4م لحين الأستعمال.
- **تحضير الوسط**: حضر الوسط الزرعي المحلي لغرض إستخدامه في الكشف عن العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسين، بوزن (2.8) غم من وسط الأكار المغذي الصلب (شركة Difco/USA) ثم إضيف اليه 100 مل من المستخلص المحضرأعلاه (بعد ان ضبط الإس الهيدروجيني مابين (7 – 7.2)، ذوب الوسط بالطريقة المعتادة ثم عقم بالموصدة (بدرجة حرارة 121م / تحت ضغط 15 باوند / إنج2 / لمدة 20 دقيقة). صب الوسط المحضر في خمسة أطباق زرعية، وترك ليبرد، حفظت الأطباق في الثلاجة (4م) لحين الإستعمال.

- **الكشف عن العزلات المنتجة للبكتريوسين:**

إجريت التجربة بالطريقة نفسها المتبعة في الكشف عن البكتيريا المنتجة في الوسط العادي (Cup assay)، بإستعمال الوسط المصنع أعلاه بدلا" من الأكار المغذي لوحده، وذلك بزراعة العزلة الدالة عليه للكشف عن العزلات المنتجة للبكتريوسين ومنها التي اظهرت نتائج سالبة في الأختبار الأول.

تحفيز انتاج البكتريوسين في بكتيريا *E.coli* بأستعمال مستخلص نبات الشلغم :

- **استخلاص البكتريوسين من بكتريا *E.coli* المنتجة:**

استخلص الكولسين من عزلات منتجة كفوءة تم اختيارها بناء" على النتائج السابقة واعتماداً على طريقة الباحثين HerschmanوHelinski [25] وتضمن الآتي:

1. تم زرع (5) أنابيب اختبار يحوي كل منها على (2.5) مل من وسط الدماغ والقلب السائل (B.H.I broth) المعقم، فقد لقحت بالعزلات المنتجة الخمس وحضنت بدرجة حرارة (37)م لمدة (18) ساعة.
2. حضر وسط (B.H.I السائل مضافاً اليه (5%) كليسرول) ووزع بعشرة دوارق مناسبة الحجم بمعدل (100) مل لكل دورق ثم عُقمت بالموصدة (121م/ تحت ضغط 15 باون/انج^2/ لمدة 20 دقيقة) وترك ليبرد.
3. في اليوم التالي تم تلقيح كل وسط في الخطوة السابقة بأنبوبة اللقاح المحضرة في الخطوة الاولى وعلى التوالي، ثم حضنت الدوارق العشرة الملقحة في حاضنة هزازة (Shaking incubator) بدرجة حرارة (37)م حتى وصل عدد الخلايا حوالي (3×10^8) خلية/مل [بعد 14 ساعة حضن] وبسرعة (150-200) دورة/ دقيقة.
4. بعد انتهاء مدة الحضن: تم توزيع المزروع البكتيري الى دورقين: بواقع خمسين مل لكل دورق لكل عزلة بكتيرية، ثم:

- أضيفت مادة المايتومايسين-C المحفزة على إنتاج البكتريوسين بتركيز نهائي مقداره (2) مكغم/مل إلى الدورق الأول (سيطرة موجبة)، ثم أعيدت إلى الحاضنة الهزازة لمدة (3) ساعات اخرى.
- أضيف مستخلص نبات الشلغم المحضرلغرض أختبار قدرته على تحفيز إنتاج البكتريوسين بواقع (امل من المستخلص لكل 10 مل من المزروع البكتيري المحضر حسب الطريقة الاساس)، علما" تم تعقيم المستخلص النباتي بواسطة الترشيح باستعمال المرشحات الغشائية (0.22 µ) إلى الدورق الثاني، ثم أعيدت إلى الحاضنة الهزازة لمدة (3) ساعات اخرى.

5. نبذ المزروع مركزياً بجهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة حرارة (4)م وبسرعة (7000 دورة/ دقيقة) ولمدة (30) دقيقة، ثم حفظت بدرجة حرارة (4)م لحين الاستعمال.
6. أخذت عينات من الراشح لكل عزلة وقيست فعالية الكولسين (Colicin activity) بأستعمال طريقة الحفر Wells (assay)/ [26]، كما قيس تركيز البروتين (Protein determination) للرواشح وذلك حسب طريقة لوري[27].

النتائج

عزل وتشخيص البكتيريا

جمعت (760) عينة مرضية مختلفة من حلات: (الاسهال والتسمم الدموي والتهاب المجاري البولية والتهاب المهبل) للتحري عن البكتيريا السالبة لصبغة كرام. تم الحصول على (280) عزلة بكتيرية. شخصت حسب الطرائق التشخيصية المعتمدة [23]، فضلا" عن التشخيص بنظام AP E20، ومنها تم الحصول على الأنواع البكتيرية الآتية: *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Salmonella typhi* و *Enterobacter cloacae* و *Acinetobacter baumannii* و *Serratia liquefaciens* و *Citrobacter freundii* و *Serrattia odorifera* و *Proteus mirabilis* , حسب ماموضح في جدول (1)، فقد كانت أعلى نسبة عزل من حالة التهاب المجاري البولية (98) عزلة بكتيرية مختلفة بنسبة (35٪). سجلت بكتيريا *Escherichia coli* أكثر عزلا" بين الأنواع الأخرى (117) عزلة بنسبة (41.79٪). أما أقلها عزلا" فكانت بكتيريا *Serrattia odorifera* (1) بنسبة (0.36٪).

التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسينات باستعمال الوسط المغذي الصلب (Nutriernt agar) كوسط إختباري

استعملت طريقة أقراص الأكار (Cup assay) في التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسين باستعمال الوسط الزرعي المغذي الصلب (Nutriernt agar) كوسط اختبار والوسط (B.H.I. agar المزود بـ 5% كليسرول) كوسط تنمية للعزلة المنتجة، وقد أظهرت النتائج أن هناك (80) عزلة بكتيرية منتجة من بين المجموع الكلي للعزلات الـ (280) وبنسبة (28.57٪). أعلى نسبة للعزلات المنتجة ظهرت في إصابات التهابات المجاري البولية (24) عزلة من العدد الكلي (280) بنسبة (12.14٪)، أما *Escherichia coli* فسجلت أعلى نسبة إنتاجية للبكتريوسين (36 من 280) بنسبة (12.85٪)، في حين ظهرت ثلاث أنواع بكتيرية غير منتجة للبكتريوسين وهي *Salmonella typhi* و *Serratia liquefaciens* و *Serrattia odorifera* ، وتراوحت نسب الأنتاج للأنواع الأخرى مابين (7.14٪) في بكتيريا *Klebsiella pneumonia* الى (0.36٪) في بكتريا *Enterobacter cloacae* و *Citrobacter freundii*. (جدول 2).

أما أعداد البكتيريا المنتجة للبكتريوسين ونسبها في كل نوع بكتيري، موضحة في جدول (3)، فقد سجلت بكتيريا *Acinetobacter baumannii* نسبة (80٪) عزلات منتجة، تلتها *Proteus mirabilis* نسبة (45.83٪) عزلات منتجة للـ Proticin ، ثم *Pseudomonas aeruginosa* بنسبة (35٪) عزلات منتجة للـ Pyocin ، ثم *Citrobacter freundii* بنسبة (33.33٪)، ثم *Escherichia coli* بنسبة (30.77٪) عزلات منتجة للـ Colicin ، ثم *Klebsiella pneumonia* منتجة للـ Klebocin بنسبة (26.67٪)، وأخيرا" *Enterobacter cloacae* بنسبة (12.5٪) منتجة للـ Cloacin. أما أقطار مناطق تثبيط النمو التي أعطتها البكتريوسينات باستعمال الوسط المغذي الصلب كوسط إختباري، فهي تراوحت مابين (20 - 11) ملم ، للبكتريا المنتجة للكولسين وهي *Escherichia coli* والبكتريا المنتجة للبايوسين وهي *Pseudomonas aeruginosa* على الترتيب. في حين إشترك كل من الكليبوسين والبروتسين والبكتريوسين المنتج من بكتيريا *Ainetobacter baumannii* بقطر تثبيط النمو نفسه (17) ملم، والـ Cloacin (15 ملم)، واخيرا" البكتريوسين المنتج من *Citrobacter freundii* (12 ملم). جدول (4).

التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسينات باستعمال الوسط الزرعي المحضر محليا" كوسط إختباري

نظرا" لصعوبة الكشف عن العزلات المنتجة وقلة عددها وصغر مناطق تثبيط النمو فيها(Inhibition Zone)، فقد تم تحضير وسط زرعي محلي مكون من (مستخلص جذور نبات الشلغم مع وسط الأكار المغذي) ليستعمل كوسط إختباري للتحري عن إنتاجية العزلات بدلا" من وسط N. agar أو Mullerhinton agar. وفعلا" أعطى الوسط المحضرمحليا" وبالطريقة نفسها المستخدمة وهي أقراص الأكار (Cup assay) عزلات منتجة بنسبة بلغت (82.5٪) اي 231 عزلة من مجموع 280، في حين كانت النسبة 28.57٪ (80 من مجموع 280) في الوسط الاعتيادي (جدول 5). النتائج التفصيلة في إطارها العام كانت مشابهة لنتائج العزلات المنتجة على الوسط المغذي الصلب، فقد ظهرت أعلى نسبة للعزلات المنتجة في التهابات المجاري البولية : (91) عزلة من العدد الكلي (280) بنسبة (32.5٪)، وكذلك الـ *Escherichia coli* أعطت أعلى نسبة إنتاجية (110 من 280) بنسبة (39.29٪)، وتأكد عدم إنتاجية العزلات *Salmonella typhi* و *Serratia liquefaciens* و *Serrattia odorifera* للبكتريوسين بأستخدام الوسط المحلي،إذا لم تظهر اي منها مناطق تثبيط نمو.

يوضح الجدول (6) أعداد البكتيريا المنتجة للبكتريوسين ونسبها في كل نوع بكتيري بأستخدام الوسط الزرعي المحلي. بكتيريا *Acinetobacter baumannii* وبكتيريا *Citrobacter freundii* أعطت نسبة إنتاجية (100٪)، تلتها *Escherichia coli* بنسبة (94.02٪) عزلات منتجة للكولسين، ، ثم *Klebsiella pneumonia* و *Pseudomonas aeruginosa* منتجة للكليبوسين والبايوسين بنسب (90.67 و 90)٪ على الترتيب، ثم بكتيريا *Proteus mirabilis* بنسبة (87.5٪) عزلات منتجة للـ Proticin، وأخيرا" *Enterobacter cloacae* بنسبة (75٪) منتجة للـ Cloacin.

أقطار مناطق تثبيط النمو التي أعطتها البكتريوسينات باستخدام وسط الشلغم المحضر كوسط إختباري كانت أكبر بكثير من تلك التي اعطتها البكتريا على الوسط العادي، جدول (7). فقد أعطت بكتيريا *Escherichia coli* المنتجة للكولسين منطقة تثبيط نمو مقدارها (45 ملم)، وبكفاءة عالية فقد كانت منطقة واضحة جدا. أما البروتسين المنتج من بكتيريا *Proteus mirabilis* فقد أعطى منطقة تثبيط نمو مقدارها (40 ملم)، وأشترك الـ Klebocin و Pyocin والبكتريوسين المنتج من بكتيريا *Acinetobacter baumannii* بقطر تثبيط نمو واحد (35 ملم)، وأخيرا" (30 ملم) هو قطر منطقة التثبيط التي أعطتها البكتريوسينات المنتجة من قبل بكتيريا *Enterobacter cloacae* و *Citrobacter freundii* .

تحفيز انتاج البكتريوسين في بكتيريا *E.coli* بأستعمال مستخلص نبات الشلغم :

إجري هذا الأختبار على عزلات بكتيريا *E. coli*، اختيرت خمس عزلات كفوءة الأنتاج من خلال الإعتماد على النتائج السابقة لقطر منطقة منع النمو (I.Z) وثباتية الأنتاج عند تكرار التجربة لمرات عدة. أظهرت النتائج وجود كفاءة عالية في مستخلص جذور نبات الشلغم في تحفيز إنتاج البكتريوسين من بكتيريا *E. coli* المدروسة وهي لا تقل كفاءة عن مادة المايتومايسين C- المحفزة على الأنتاج بل تتفوق عليها في التأثير في بعض العزلات البكتيرية.جدول (8) يوضح مناطق تثبيط النمو وتركيز البروتين للبكتريوسين المحفزوفعاليته بوساطة المستخلص النباتي والمايتومايسين. يلحظ أن منطقة تثبيط النمو متساوية في الحالتين للعزلة رقم (E10)، بينما ترتفع في العزلات الاخرى بالنسبة لمستخلصات البكتريوسين المحفزة بالمستخلص النباتي. أما تركيز البروتين فأنه ارتفع في كل العزلات عندالمعاملة بالنبات. بالنسبة للفعالية فكانت متساوية في العزلتين (E41 و E95)، فقد بلغت 320 وحدة/مل في حين ارتفعت عند المعاملة بالنبات في العزلات البكتيرية الاخرى.

المناقشة

هدفت الدراسة الحالية الى محاولة التوصل الى مواد طبيعية تعمل على تحفيز إنتاج البكتريوسينات، تكون متوفرة ورخيصة الثمن وغير مطفرة وغير مسرطنة، وبالوقت نفسه هي مواد مضادة للسرطان، وهي دراسة أولية إجريت خارج الجسم الحي (*In vitro*) للحصول على نتائج أولية، لغرض استعمالها مستقبلا" في تحفيز الفلورا الطبيعية (Microflora) داخل الجسم الحي (*In vivo*) لإنتاج البكتريوسينات التي تعد مضادات سرطانية واعدة من جانب، وذات وظائف علاجية كبيرة جدا" من جانب آخر، فضلا" عن دور هذا المستخلص نفسه كمضاد للسرطان [28، 29،30،31].

لتحقيق هدف الدراسة، تم جمع أكبر عدد ممكن من البكتيريا من حالات مرضية مختلفة، عزلت فقط البكتيريا السالبة لصبغة كرام وهي (280) عزلة من (760) عينة مرضية، فقد تم الحصول على عشرة أنواع بكتيرية وهي *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Salmonella typhi* و *Enterobacter cloacae* و *Acinetobacter baumannii* و *Serratia liquefaciens* و *Citrobacter freundii* و *Serrattia odorifera* و *Proteus mirabilis*.

من خلال التحري عن البكتيريا المنتجة للبكتريوسين بطريقة أقراص الأكار (Cup assay)، وجد إنها شكلت نسبة (28.57٪) وهي (80) عزلة، كما موضح في جدول(1)، فقد إستخدم هنا الوسط الزرعي (N. agar) كوسط إختباري.

تعد هذه النسب قليلة، ولاتوجد دراسة عالمية أو محلية تطرقت لإجراء مسح للعزلات المنتجة من الحالات المرضية وانما توجد على أنواع معينة من البكتيريا وبأعداد قليلة وهي كنسب مئوية مقاربة لنتائج هذه الدراسة التي وضحت في جدول (2).

تتحكم العديد من الظروف في إنتاجية العزلات المنتجة أثناء إجراء الأختبار، إذ أن للطريقة المستعملة في التحري دورٌ كبير، فبالرغم من إن طريقة أقراص الأكار (Cup assay) المستعملة هي من أنجح وأفضل الطرائق في الكشف عن أكبر عدد ممكن من العزلات المنتجة، إلا إنها لاتخلو من بعض العيوب، ومنها سمك طبقة الأكار الذي قد يعيق انتشار البكتريوسين المنتج، ولاتظهر فعاليته [32]. وعلى العموم يعدّ الوسط الصلب أفضل بكثير من الوسط السائل عند التحري عن الإنتاج، فهو يعتمد بصورة أساس على تحفيز التضاد بين العزلتين. [6].فضلا" عن ذلك فأن للوسط الذي تجري فيه عملية اختبار التحري دوراً مميزاً ومهماً في إظهار العزلات المنتجة والعزلات الدالة لها، إذ إن لنوع وتركيز وعمق طبقة الأكار أهمية بالغة في ذلك، كما تراعى كثافة العزلة الدالة فمن المفضل أن لاتزيد عن (10^{5} – 10^{6}) خلية/مل إذ يتمكن البكتريوسين المنتج - وإن كان بكميات قليلة-من إظهار فعله القاتل [33]. أما فيما يتعلق بالكائن المجهري نفسه ، فان له دورا" كبيرا" في إظهار العزلات المنتجة للبكتريوسين، فهناك عزلات تتمكن من إنتاج أكثر من نوعٍ واحدٍ من البكتريوسينات مثل الكولسينات، وهي بذلك تكون مقاومة لأكثر من نوع منها، كما وتوجد عزلات أخرى تحمل جينات مناعية (Immunity genes) لعدة أنواع من الكولسينات، فقد وجدت الباحثة Riley [1] أن (70٪) من عزلات بكتيريا *E.coli* المنتجة تمتلك مقاومة مفردة بينما (30٪) تمتلك مقاومة مشتركة لثلاثة أو أكثر منها. فضلاً عن ذلك، فقد تكون العزلة الدالة متحسسة لنوع معين من البكتريوسين، لكن عدم إظهار الفعالية القاتلة يعزى إلى افتقارها للمستقبلات الخاصة بنقله [34] ، أو حدوث تحوير بتلك المستقبلات نتيجة حدوث طفرات فتكون العزلات مقاومة[6] ، وقد ينتج البكتريوسين لكن بكميات قليلة لاتتمكن من قتل الخلية الحساسة، أو إنها تكون متحملة (Tolerance) لذلك النوع أو الكميات القليلة التي تنتج منه، واكتساب هذه الصفة يكون بسبب حدوث تغيرات في المستقبلات السطحية الخلوية أو في صفات الغشاء السايتوبلازمي [35] ، وهناك احتمال آخر، فقد تكون العزلة البكتيرية منتجة، والعزلة الدالة حساسة لذلك النوع ، لكن قد يتحلل هذا النوع المنتج عند الإفراز أو بعده [36]، فيما توجد أنواع أخرى يعاد إدمصاصها إلى الخلية المنتجة نفسها بعد الإفراز، وذلك لامتلاك بعض البكتيريا مستقبلات متخصصة لنوع البكتريوسين الذي تنتجه، وهذا يقود إلى عدم ظهور فعاليته القاتلة [14،37]. هناك عوامل أخرى تؤثر في إظهار فعالية هذه المضادات البروتينية وهي وجود بعض العناصر الغذائية بكميات كبيرة بوسط الاختبار[38] مثل $V.B_{12}$ وsiderophorase فهي تثبط فعل البكتريوسين من خلال تنافسها معه للارتباط بالمستقبلات على سطح الخلية الحساسة، وبذلك تمنعه من إظهار فعاليته [26،39،40]، أما وجود أيونات الكالسيوم ثنائية الشحنة (Ca^{+2}) فإنه يزيد من فعالية الكولسين، إذ يعدّ كحامل لتلك الجزيئة، يشترك في نقله الى مكان عمله [37،41].

لذلك ولجميع الأسباب التي ذكرت أعلاه فانه لا يعني جزما" أن العزلات المتبقية (200) عزلة، هي غير منتجة وأن فقط (80) عزلة هي المنتجة، فربما تكون غير منتجة أو قد تكون منتجة ولم تظهر إنتاجيتها. لذلك تم التقصي عن إنتاجية العزلات بتحضير وسط محلي مكون من مستخلص طبيعي وهو جذور نبات الشلغم الذي حضر مع وسط (N. agar) الذي أعطى نتائج مذهلة ومميزة، إذ بلغت عدد العزلات المنتجة للبكتريوسين (231) من مجموع (280)عزلة وبنسبة (82.5٪) كناتج كلي للعزلات (جدول 5). كذلك إرتفعت نسبة الأنتاج لكل نوع بكتيري كما يوضح جدول (6)، اذ تراوحت مابين (75 – 100) ٪، في حين أن العزلات غير المنتجة التي ظهرت في الوسط الأختباري الأعتيادي (N. agar)، (جدول 2)، ظهرت كذلك في الوسط الزرعي المحضر محليا" غير منتجة (جدول 6) وهي الـ *Salmonella typhi* و *Serratia liquefaciens* و *Serrattia odorifera* وهذا دليل على أنها غير حاملة لبلازميد إنتاج البكتريوسين أو يوجد سبب آخر لازال مبهما" علميا". إذ توصل الباحثان Patankar و Josh الى ان نسبة عزلات الـ *Salmonella* المنتجة للبكتريوسين هي (1.04 ٪) اي خمسة عزلات فقط من بين 377 عزلة، وكانت تابعة الى serotype B *Salmonella* [42]. في حين لم تتوفر ادبيات تدعم ماتم التوصل اليه حول عدم امكانية عزلات بكتيريا *Serratia liquefaciens* و *Serrattia odorifera* على انتاج البكتريوسينات بينما تنتج بكتيريا *Serrattia marcescenc* البكتريوسين 28B [6].

من الجدير بالذكر، إنه لاتوجد دراسة محلية أو عالمية استعملت النباتات أو غيرها أو جذور الشلغم خصيصا" في الكشف عن إنتاج البكتريوسينات. لغرض فهم آلية التحفيز، فأن كل أنواع المحفزات (المواد الحاثة) سواء المايتومايسين-C أو الحرارة أو المضادات الحياتية أو غيرها فأنها تعمل على تحطيم الـ DNA الكروموسومي وايقاف الفعاليات الحيوية للخلية البكتيرية جميعها، ويبدأ مباشرة (SOS regulator genes) بعملية الاصلاح لانقاذ الخلية باللحظات الاخيرة من خلال تحفيز العديد من الجينات خلال آليات خاصة لإصلاح الخطأ الحاصل بفعل تأثير تلك المادة المطفرة [15، 38]، أن احد الجينات الذي يتحفز هو *Rec A* gene وبدوره يصنع بروتيناً انزيمياً Rec A Protease وهذا الاخير يعمل على أهداف خاصة وهي بروتينات تصنع كروموسومياً Lex A protiens، فعند تقطيع وكبح هذه البروتينات من قبل الانزيم المذكور مباشرة يبدأ الجين التركيبي (Structural gene) في بلازميد البكتريوسين بالعمل، إذ تبدأ عملية استنساخ الجينات، وتزداد عدد نسخ هذا البلازميد وبالتالي يزداد الأنتاج، وفي الوقت نفسه يتم استنساخ وتصنيع البروتين المناعي والبروتين المحلل الى جانب بروتين البكتريوسين نفسه [40].

لذلك فأن من المؤكد أن مستخلص جذور الشلغم عمل بالطريقة نفسها المتبعة من قبل المواد المحفزة أو الحاثة، أذ أن هناك إهتمام كبير عالميا في الوقت الحاضر بهذا النبات لما يحويه من مركبات كيميائية فعالة كثيرة جدا" ومتنوعة التي تعمل على الـ DNA ومن هذهِ المركبات Isothiocyanate و 3-hydroxy-methyl-indole و thion(goitrin) -2- -5 vinyl-oxazolidine و Rhadanides و Anthocyanin و Rapine و Machrolysin و Brasicasterol و Sinigrin و Glucosinolates [19،20]، إذ أن تأثير هذه المركبات على الخلايا الحيوانية ومنها السرطانية مثبت علميا" ، لكن تأثيره على DNA خلايا البكتيريا أو بدائية النواة فلا توجد أدبيات علمية تدعم الموضوع. فقد وجد أن المركب Indole-3-carbinol (I3C) يوقف نمو خلايا (LNCaP) human lymph node carcinoma of prostate في طور الـ G1 من الدورة الخلوية إذ يكون التأثير على مستقبل الاندروجين Androgen Receptor (AR) الذي يتوسط عملية تكاثر وتمايز هذهِ الخلايا من خلال تثبيط مستوى mRNA و بالتالي تثبيط تعبير الـ expression (AR) [43]. اما مركب Isothiocyanate (ITC) الذي يُعد أحد المركبات الفعالة بايولوجياً في نبات الشلغم ، فانه يسبب تقطيع الـ DNA (DNA-Fragmentation) وتحفيز Caspase-3 وذلك عند معاملة خلايا سرطان القولون بهِ HT-29 [44]، فضلاً عن ذلك فان الـ DIM يوقف عملية صنع الـ DNA و الانقسام اعتماداً على التركيز المستخدم في خلايا سرطان الكبد البشري Hep-G2 من خلال تثبيط انزيمي DNATopoisomeras Π alpha و DNA Topoisomerase Į and Π beta [45].

ومما يثبت تحفيز إنتاج البكتريوسينات بالوسط المحلي المحضر هو زيادة قطر منطقة تثبيط النمو بصورة ملحوظة جدا" (جدول7)، اذ تراوح مابين (45) ملم في بكتيريا *E. coli* الى (30) ملم في كل من *Enterobacter cloacae* و *Citrobacter freundii*، في حين لم يتجاوز قطر منطقة منع النمو(20) ملم بأستخدام الوسط الزرعي المغذي الاعتيادي وظهر هذا في بكتيريا *E. coli* جدول (4).

أما الذي يدعم النتائج السابقة كلها، هو إستخدام جذور نبات الشلغم في تحفيز إنتاج البكتريوسين بصورة مباشرة في الوسط الزرعي السائل ومقارنة النتائج مع المادة المحفزة المعتمدة عالميا" وهي Mt-C. إختيرت هنا الـ *E. coli* كنموذج للتحفيز لأنها أعطت أكبر مناطق تثبيط نمو مقارنة" بالبكتيريا الأخرى. إذ يوضح جدول (8) ان هناك تقارب كبير في بعض العزلات في قطر منطقة تثبيط النمو وكذلك تركيز بروتين البكتريوسين الناتج وفعاليته عند إستخدام المستخلص النباتي مقارنة" مع الـ Mt-C في بعض العزلات البكتيرية، في حين وجد هناك إرتفاع كبير في كل هذه المعاملات عند استعمال مستخلص جذور الشلغم كما في العزلات E63 و E73 (جدول 8).

تستعمل مادة الـ Mt-C المحطمة للـ DNA في حث إنتاج البكتريوسينات وهي من المواد الشائعة الاستعمال في هذا المجال وبتركيز قدره (2) مكغم/مل، إذ يُعد هو التركيز الأمثل لحث معظم سلالات بكتيريا *E.coli*، اما التراكيز الواطئة منه قد تسبب تكوين كتلة خلوية خيطية كبيرة دون زيادة إنتاجية العزلات [46]. وقد أثبتت الدراسات أن للمايتومايسين دوراً فعالاً في حث إنتاج الكولسين من جهة، ومضاعفة ذلك الانتاج إلى كميات غزيرة من جهة أخرى، فوجد إنه يضاعف إنتاج كولسين (7) إلى (8) مرات [47]. وتوصل آخرون الى أنه يمكن أن يزداد (100) مرة [48]، وممكن ان تصل الزيادة إلى (1000) مرة [49].

يعود سبب استعمال مواد حاثة لزيادة إنتاج الكولسين إلى أن الخلايا البكتيرية الحاملة لبلازميد الكولسين تنتج الكولسين بكميات قليلة جداً في الحالات الاعتيادية وبدون استعمال المواد الحاثة، فقد وجد أن (1٪) فقط من الخلايا الحاملة لذلك البلازميد تستطيع إنتاج الكولسين، لكن عند استعمال المايتومايسين-C فإن (55٪) من البكتيريا تصبح منتجة لكولسين E_1 و(83٪) تنتج كولسين E_2 [50]. ويعود ذلك لكون بروتين Lex-A يكبح في الحالات الاعتيادية الجينات الخاصة بصنع الكولسين(Colicin Structural Genes) ويمنعه من العمل، لكن باستعمال المواد الحاثة سوف يعمل نظام (SOS-system) ويصنع بروتين (Rec A Protease) الذي يحطم *Lex-A*، وبالتالي تتمكن الخلية البكتيرية من استنساخ جينات الكولسين بأعداد كبيرة، فضلاً عن تكاثر وتضاعف البلازميد نفسه وإنتاج الكولسين بغزارة، وأساس هذه العملية يعتمد على تثبيط الأفعال الحيوية للمادة الوراثية الكروموسومية (DNA metabolisms) مما يؤدي إلى توقف إنقسام الخلية البكتيرية، وبما أن عملية الإنقسام الخلوي تسيطر عليها مجموعة من الجينات فإن المايتومايسين -C المستعمل سوف يثبط تلك الجينات، ويسبب توقف ذلك الانقسام [51،52] هذا من جانب، من جانب آخر يبدأ تضاعف بلازميد الكولسين مع محاولة إصلاح الـ DNA الكروموسومي بمختلف الوسائل اعتماداً على (SOS Repair System)، أي إن عملية إنتاج الكولسين تقع تحت سيطرة نظام انزيمي داخلي متخصص[47].

لذلك ومن خلال هذه النتائج نجد أن مستخلص جذور نبات الشلغم، يعد من العلاجات الواعدة في محاربة السرطان من جانب وأكدت ذلك العديد من البحوث العالمية والمحلية.أذ يمكن إستعماله كبديل عن عقار الـ Mt-C السام والمطفر والمسرطن للخلايا الطبيعية والمستخدم حاليا" في علاج أنواعا" عدة من السرطانات. فضلا" عن استعمال هذا المستخلص لتحفيز إنتاج البكتريوسينات داخل الجسم الحي كعلاج ضد مختلف أنواع الأمراض والسرطانات، وكذلك إستعماله مختبريا" لتحفيز إنتاج البكتريوسينات كونه آمن الاستعمال ورخيص الثمن ولا يؤثر في المادة الوراثية لخلايا الانسان الطبيعية كما تم التوصل اليه من قبل Obaid وجماعته [53] مقارنة" بالـ Mt-C المطفر عالي الخطورة.

المصادر

1- Riley, M. A. (2002). Bacteriocin-Mediated Competitive Interactions of Bacterial Populations and Communities in " Prokaryotic Antimicrobial Peptides:From Genes to Applications "Drider, D. and Rebuffat, S. (eds.), Springer Scienc.

2- Ridley, H. and Lakey, J. H. (2015). Antibacterial toxin colicin N and phage protein G3p compete with TolB for a binding site on TolA. Microbiology,161:503-15.

3- Waters, V. L. and crosa, J. H. (1991). Colicin Virulence Plasmids. Microb. Rev., 55: 437- 50.

4- Vidotto, M. C.; Furlaneto, M. C. and Perugini, M. R. E. (1991). Virulence Factors of *Escherichia coli* in Urinary Isolates. Brazilian J. Med Biol. Res., 24: 365- 73.

5-Harry,C.O. and Walker,D.(2013). Cytotoxic activity of colicin E1, E3 and E9 against *E.coli* BW25113 in the planktonic and biofilm states.Int.J.Curr.Res.Aca.Rev.1 (2):55-71.

6-Cursino, L.; Smarda, J.; Chartone, E. and Nascimento, A. (2002). Recent Updated aspects of Colicins of Enterobacteriaceae. Braz. J. Microbiol., 33: 196-217.

7-Pugsley, A. P. and Schwartz, M. (1983). Agenetic Approach to the Study of Mitomycin-Induced Lysis of *E. coli* K-12 Strains Which Produce Colicin E_2. Mol. Gen. Genet., 190: 366- 72.

8- Cascales, E.; Buchanan, S.K.; Duche, D.; Kleanthous, C.; Lloubes, R.; Postle, K., Riley, M.; Slatin, S. and Cavard, D. (2007). Colicin biology. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 71, (1): 158-229, ISSN 1092-2172.

9- Pugsley, A. P. and Schwartz, M. (1984). Colicin E_2 Release: Lysis, Leakage or Secretion? Possible Role of Aphospholipase. The EMBO J., 3: 2393- 7.

10- Cavard, D.; Baty, D.; Howard, S. P.; Verheij, H. M. and Lazdunski, C. (1987). Lipoprotein Nature of the Colicin A lysis Protein: Effect of Amino acid Substitutions at the Site of Modification and Processing. J. of Bacteriology, 169: 2187- 94.

11- Jerman, B.; Butala, M. and Zgur-Bertok, D. (2005). Sublethal concentrations of ciprofloxacin induce bacteriocin synthesis in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother., 49: 3087-90.

12- Bradley, D. E. (1967). Ultrastracture of Phages and Bacteriocins. Bacteriol. Rev., 31: 231-314.

13- Bures, J.; Horak, V.; Fixa, B.; Komarkova, O.; Zaydlar, K.; Lonsky, V. and Masurka, V. (1986). Colicinogeny in Colorectal Cancer. Neoplasma, 33: 233- 37.

14- Pugsley, A. P. (1983). Autoinduced Synthesis of Colicin E_2. Mol. Gen. Genet., 190: 379-83.

15- Mader, A., ; Bronk, B. ; Ewald, B. ; Kesel , S; Schnetz, K. ; Frey, E. and Opitz, M. (2015). Amount of Colicin Release in *Escherichia coli* Is Regulated by Lysis Gene Expression of the Colicin E2 Operon. journal.pone,9:1-17.

16- Ghoul, M. ; West, S. A. ; Johansen, H. K. ; Molin, S. ; Harrison, O. B. ; Maiden, M. C. J. ; Jelsbak, L. ; Bruce, J.B. and Griffin, A. S. (2015). Bacteriocin mediated competition in cystic fibrosis lung infections. Proc. R. Soc.B 282:20150972.

17- الخطيب ، احمد شفيق, **1982**, معجم الشهابي في مصطحات العلوم الزراعية ، مكتبة لبنان.

18- قدامة ، أحمد,**1985**, قاموس الغذاء والتداوي بالنبات، موسوعة غذائية وصحية عامة. دار النفائس. بيروت.

19- Farag, M. A. and Abdel Motaal,A.(2010). Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. Journal of Advanced Research,**1**:65–70.

20- Mazumder, A.; Dwivedi, A. and Plessis, D. (2016). Sinigrin and Its Therapeutic Benefits(Review). Molecules, 21:416- 26.

21- Vafaeinejad, S. ; Serki, E. ; Hassanpour Fard, M. and Hosseini, M. (2015). Hypolipidemic Activity of Aqueous Extract of Turnip (Brassica rapa) Root in Hyperlipidemic Rats .Quarterly of the Horizon of Medical Sciences, 21(1):45-51.

22- Berdja, S.; Smail, L. ; Saka, B.; Abbas, T. Neggazi, S. ; Haffaf , E. ; Benazzoug, Y. ; Kacimi, G. ; Boudarene , L. and Bouguerra, S. A. (2016). Glucotoxicity Induced Oxidative Stress and Inflammation *In Vivo* and *In Vitro* in *Psammomys obesus*:
Involvement of Aqueous Extract of *Brassica rapa rapifera*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016.

23- Brenner, D. J.; Krieg, N. R. and Staley, J. T. (2005). (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria. 2nd Ed. Springer Science+ Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA.

24- Al-Qassab, A.O. and Al-Khafaji, Z.M. (1992). Effect of different conditions on inhibition activity of enteric lactobacilli against diarrhea-causing enteric bacteria. J. Agric. Sci. 3(1): 18-26.(Arabic).

25- Herschman, H. R. and Helinski, D. R. (1967). Purification and Characterization of Colicin E_2 and Colicin E_3. The J. of Biological Chemistry, 242: 5360- 8.

26- Smajs, D.; Pilsl, H. and Braun, v. (1997) Colicin U, Anovel Colicin Produced by S*higella boydii*. J. of Bacteriol., 179: 4919- 28.

27- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protien Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chemical., 193: 265- 75.

28- Obaid, H. H. ; Yaseen, N.Y. and Essa, R.H. (2009). Study the toxic effect of non-bound colicins extracted from *Escherichia coil* on transplanted Murine adenocarcinoma (AM3). Biotechnology Research Center (special edition), 3(2):53-62.

29- Obaid, H. H. ; Essa, R.H. and Yaseen, N.Y. (2010). Cytotoxicity of non-bound colicins extracted from *Escherichia coil* on normal with blood cells and myeloblast isolated from Acute Myeloid Leukemia blood patients. Iraqi Journal of Science, 5(4):528-38.

30- Dobson, A; Cotter, P.D. ; Ross, R. P.and Hillb, C.(2012). Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? Applied and Environmental Microbiology,78(1):1-6.

31- Yang,S. ; Lin, C. ; Sung, C. T. and Fang, J. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins:application in foods and pharmaceuticals.Food Microbiology, 5 : 1-10.

32- Cabo, M.L.; Murado, M.A.; Gonzalez, M.P. and Pastoriza, L. (1999). A method for bacteriocin quantification. Journal of Applied Microbiology, 87: 907-14.

33- Richardson, H.; Emslie-smith, A. H. and Senior, B. W. (1968). Agar Diffusion Method for the Assay of Colicins. App. Microb., 16: 1468- 1474.

34- Tagg, J. R.; Dajani, A. S. and Wamamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram- Positive Bacteria. Bacteriol Rev. 40: 722- 56.

35- Cardelli, J. and Konisky, J. (1974). Isolation and Characterization of an *Escherichia coli* Mutant Tolerant to Colicins Ia and Ib. J. of Bacteriology, 119: 379- 85.

36- Cavard, D. and Lazdunski, C. (1990). Colicin Cleavage by OmpT Protease During both Entry into and Release from *E. coli* Cells. J. of Bacteriology, 172: 648- 52.

37- Harkness, R. E. and Braun, V. (1990). Colicin M is only Bactericidal when Provided from Outside the Cell. Mol. Gen. Genet., 222: 37- 40.

38- Hol, F. J. ; Voges, M.J. ; Dekker, C. and Keymer, J. E. (2014). Nutrient-responsive regulation determines biodiversity in a colicin-mediated bacterial community.BMC Biology, 12:68-81.

39- Housden, N.; Loftus, S.; Moore, G. and Kleanthous, C. (2005). Cell entry mechanism of enzymatic bacterial colicins: porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding. Proc. Natl. Aced. Sci. USA. 102: 13849-54.

40- Calcuttawala, F. ; Hariharan, C. ; Pazhani, G.P. ; Ghosh, S. and Ramamurthy, T. (2015). " Activity spectrum of colicins produced by *Shigella sonnei* and genetic mechanism of colicin resistance in conspecific *S. sonnei* strains and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 59(1):152-8.

41- Braun, V.; Gaisser, S.; Glaser, C.; Harkness, R.; Ölschäger, T. and Mende, J. (1992). Import and Export of Colicin M. Nato ASI Series H_{65}: 226- 42.

42- Patankar, C. V. and Joshi, L. M.(1985). Bacteriocin production in *Salmonella.* Postgrad Med., 31: 46-51.

43- HSU , J . C ; Zhang , J ; Dev , A. ; Wing , A ; Bjeldanes , L .F and firestone , G .L ., (2005) . Inoble 3 – carbinol inhibition of androgen receptor expression and downregulation of androgen response – veness in human prostate cencer cells . Carcinogenesis 26 : 1896 – 1904.

44- Mas, S.; Crescenti, A.; Gasso, P.; Deulofeu, R.; Molina, R.; Ballesta, A.; Kensler, T.w. and hafuente, A. (2007). Induction of Apoptosis in HT- 29 cells by extracts from isothiocyanates- rich varieties of Biassica oleracea .Nutr . Cancer. 58(1): 107- 114.

45- Gong, Y.; Firestone , G.L. and Bjeldanes, L.F. (2006). 3, 3- diindolylmethane is . anovel topoisomerase II alpha catalytic inhibitor that induces S- phase retardation and mitotic delay in human hepatoma (HepG2) cells.Mol. Pharmacol. 69(4): 1320- 1327.

46- Nakazawa, A.; Suzuki, N. and Tamada, T. (1977). Requirements of Glucose and Incubation Under Static Conditions for Optimal Colicin E_1 Induction. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 11: 219- 224.

47- Tigvi, Z.; Kispal, G. and Pal, T. (2005). Identification of the plasmid and the structural gene of colicin type 7 of *Shigella sonnei*. Acta. Biol. Hung., 56: 359-73.

48- Kock, J.; OlschlAger, T.; Kamp, R. M. and Braun, V. (1987). Primary Structure of Colicin M on Inhibitor of Murein Biosynthesis. J. of Bacteriol., 169: 3358- 61.

49- Schramm, E.; Mende, J. Braun, V. and Kamp, R. M. (1987). Nucleotide Sequence of the Colicin B Activity Gene Cba: Consensus Penta- Peptide Among Ton B. Dependent Colicins and Receptors. J. of Bacteriol., 169: 3350- 7.

50- Durkacz, B. W.; Kennedy, C. K. and Sherratt, D. J. (1974). Plasmid Replication and the Induced Synthesis of Colicins E_1 and E_2 in *Escherichia coli*. J. of Bacteriol., 117: 940-6.

51-Butala, M.; Klose, D.; Hodnik, V.; Rems, A.; Podlesek, Z.; Klare, J.P.; et al.(2011). Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. Nucleic Acids Res .39(15):6546–57.

52- Bano,S.;Vankemma beke, M.;Penfold, C.N. and James, R.(2014).Detection of induced synthesis of colicin E9 using ColE9P: gfpmut2 based reporter system.World J.Microbiol.Biotechnol.30(7):2091-9.

53- Cytogenetics toxicity effects of *Brassica rapa* roots on humane proliferated lympgocyte *in vitro*. (2008).The 9th Scientific Conference of Medical and Health Specialties, 23-24 march.

جدول (1) الأعداد والنسب المئوية للأنواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام المعزولة من حلات مرضية سريرية مختلفة

الحالة المرضية / نوع البكتيريا	تسمم الدم Septicemia	التهاب المهبل Vaginal inflammation	التهاب المجاري البولية Urinary tract infection	الأسهال diarrhea	المجموع (النسبة المئوية)
Escherichia coli	11	36	56	14	117 (٪41.79)
Klebsiella pneumonia	15	48	12	.....	75 (٪26.79)
Pseudomonas aeruginosa	9	5	6	.....	20 (٪ 7.14)
Salmonella typhi	9	.....	.....	15	24 (٪8.57)
Enterobacter cloacae	8	.....	.....	.....	8 (٪2.86)
Acinetobacter baumannii	5	.....	.....	.....	5 (٪1.79)
Serratia liquefaciens	3	.....	.....	.....	3 (٪1.07)
Citrobacter freundii	.....	3	.....	.....	3 (٪1.07)
Serrattia odorifera	.....	1	.....	.....	1 (٪0.36)
Proteus mirabilis	.....	.....	24	.....	24 (٪8.57)
المجموع (النسبة المئوية)	60 (٪21.43)	93 (٪33.21)	98 (٪35)	29 (٪10.36)	280 (٪100)

جدول (2)الأعداد والنسب المئوية للبكتريا المنتجة للبكتريوسين من بين أعداد البكتيريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من حلات مرضية سريرية مختلفة باستخدام الوسط الزرعي المغذي الصلب كوسط إختباري

الحالة المرضية / نوع البكتيريا	تسمم الدم septicemia	التهاب المهبل Vaginal inflammation	التهاب المجاري البولية Urinary tract infection	الأسهال diarrhea	المجموع (النسبة المئوية)
	عدد البكتيريا المنتجة للبكتريوسين/ من العدد الكلي لكل نوع بكتيري				
Escherichia coli	3 (11)	13 (36)	17 (56)	3 (14)	36 (117) (٪12.85)
Klebsiella pneumonia	2 (15)	14 (48)	4 (12)	.....	20 (75) (٪7.14)
Pseudomonas aeruginosa	4 (9)	1 (5)	2 (6)	.....	7 (20) (٪ 2.5)
Salmonella typhi	صفر (9)	.....	.....	صفر (15)	صفر (24) (٪0)
Enterobacter cloacae	1 (8)	.....	.....	.....	1 (8) (٪0.36)
Acinetobacter baumannii	4 (5)	.....	.....	.....	4 (5) (٪1.43)
Serratia liquefaciens	صفر (3)	.....	.....	.....	صفر (3) (٪0)
Citrobacter freundii	.....	1 (3)	.....	.....	1 (3) (٪0.36)
Serrattia odorifera	.....	صفر (1)	.....	.....	صفر (1) (٪0)
Proteus mirabilis	.....	.....	11 (24)	.....	11 (24) (٪3.93)
المجموع (النسبة المئوية)	14 (60) (٪5)	29 (93) (٪10.36)	34 (98) (٪12.14)	3 (29) (٪1.07)	80 (280) (٪28.57)

** النسب المئوية محسوبة نسبة الى العدد الكلي لجميع انواع البكتيريا المعزولة (280)

جدول (3) الأعداد والنسب المئوية للبكتريا المنتجة للبكتريوسين لكل نوع بكتيري باستخدام الوسط الزرعي المغذي الصلب كوسط إختباري

نوع البكتيريا	إسم البكتريوسين المنتج	عدد العزلات البكتيرية لكل نوع	عدد العزلات المنتجة لكل نوع	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لكل نوع
Escherichia coli	Colicin	117	36	٪30.77
Klebsiella pneumonia	Klebocin	75	20	٪26.67
Pseudomonas aeruginosa	Pyocin	20	7	٪35
Salmonella typhi	Bacteriocin	24	صفر	٪0
Enterobacter cloacae	Cloacin	8	1	٪12.5
Acinetobacter baumannii	Bacteriocin	5	4	٪80
Serratia liquefaciens	Bacteriocin	3	صفر	٪0
Citrobacter freundii	Colicin A	3	1	٪33.33
Serrattia odorifera	Bacteriocin	1	صفر	٪0
Proteus mirabilis	*Proticin*	24	11	٪45.83
المجموع	.....	280	80	٪28.58

** النسب المئوية محسوبة نسبة الى العدد الكلي لكل نوع بكتيري

جدول (4) معدل أقطار تثبيط النمو للعزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسينات مقاسة بالميليمتر(mm).
باستخدام الوسط الزرعي المغذي الصلب كوسط إختباري

نوع البكتيريا	إسم البكتريوسين المنتج	معدل قطر تثبيط النمو (mm)
Escherichia coli	Colicin	20
Klebsiella pneumonia	Klebocin	17
Pseudomonas aeruginosa	Pyocin	11
Salmonella typhi	Bacteriocin	.....
Enterobacter cloacae	Cloacin	15
Ainetobacter baumannii	Bacteriocin	17
Serratia liquefaciens	Bacteriocin	.....
Citrobacter freundii	Colicin A	12
Serrattia odorifera	Bacteriocin	.....
Proteus mirabilis	*Proticin*	17

جدول (5) الأعداد والنسب المئوية للبكتريا المنتجة للبكتريوسين من بين أعداد البكتيريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من حلات مرضية سريرية مختلفة باستخدام الوسط الزرعي المحضر محليا" كوسط إختباري

الحالة المرضية / نوع البكتيريا	تسمم الدم Septicemia	التهاب المهبل Vaginal inflammation	التهاب المجاري البولية Urinary tract infection	الأسهال diarrhea	المجموع (النسبة المئوية)
	عدد البكتيريا المنتجة للبكتريوسين/ من العدد الكلي لكل نوع بكتيري				
Escherichia coli	9 (11)	34 (36)	54 (56)	13 (14)	110 (117) (٪39.29)
Klebsiella pneumonia	14 (15)	44 (48)	10 (12)	.....	68 (75) (٪24.29)
Pseudomonas aeruginosa	7 (9)	5 (5)	6 (6)	.....	18 (20) (٪ 6.43)
Salmonella typhi	صفر (9)	.....	.....	صفر (15)	صفر (24) (٪0)
Enterobacter cloacae	6 (8)	.....	.....	.....	6 (8) (٪2.14)
Acinetobacter baumannii	5 (5)	.....	.....	.....	5 (5) (٪1.79)
Serratia liquefaciens	صفر (3)	.....	.....	.....	صفر (3) (٪0)
Citrobacter freundii	.....	3 (3)	.....	.....	3 (3) (٪1.07)
Serrattia odorifera	.....	صفر (1)	.....	.....	صفر (1) (٪0)
Proteus mirabilis	.....	.....	21 (24)	.....	21 (24) (٪7.5)
المجموع (النسبة المئوية)	41 (60) (٪14.64)	86 (93) (٪30.71)	91 (98) (٪32.5)	13 (29) (٪4.64)	231 (280) (٪82.5)

**** النسب المئوية محسوبة نسبة الى العدد الكلي لجميع انواع البكتيريا المعزولة (280)**

جدول (6) الأعداد والنسب المئوية للبكتريا المنتجة للبكتريوسين لكل نوع بكتيري باستخدام الوسط الزرعي المحضر محليا" كوسط إختباري

نوع البكتيريا	إسم البكتريوسين المنتج	عدد العزلات البكتيرية لكل نوع	عدد العزلات المنتجة لكل نوع	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لكل نوع
Escherichia coli	Colicin	117	110	٪94.02
Klebsiella pneumonia	Klebocin	75	68	٪90.67
Pseudomonas aeruginosa	Pyocin	20	18	٪90
Salmonella typhi	Bacteriocin	24	صفر	٪ 0
Enterobacter cloacae	Cloacin	8	6	٪75
Acinetobacter baumannii	Bacteriocin	5	5	٪100
Serratia liquefaciens	Bacteriocin	3	صفر	٪0
Citrobacter freundii	Colicin A	3	3	٪100
Serrattia odorifera	Bacteriocin	1	صفر	٪0
Proteus mirabilis	*Proticin*	24	21	٪87.5
المجموع	.....	280	231	٪82.5

**** النسب المئوية محسوبة نسبة الى العدد الكلي لكل نوع بكتيري**

جدول (7) معدل أقطار تثبيط النمو للعزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسينات مقاسة بالميليمتر(mm) باستخدام الوسط الزرعي المحضر محليا" كوسط إختباري

نوع البكتيريا	إسم البكتريوسين المنتج	معدل قطر تثبيط النمو (mm)
Escherichia coli	Colicin	45
Klebsiella pneumonia	Klebocin	35
Pseudomonas aeruginosa	Pyocin	35
Salmonella typhi	Bacteriocin	.....
Enterobacter cloacae	Cloacin	30
Acinetobacter baumannii	Bacteriocin	35
Serratia liquefaciens	Bacteriocin	.....
Citrobacter freundii	Colicin A	30
Serrattia odorifera	Bacteriocin	.....
Proteus mirabilis	*Proticin*	40

جدول (8) مقارنة فعالية وتركيز البروتين وقطر منطقة منع النمو للبكتريوسينات المحفزة بوساطة المايتومايسين- C ومستخلص جذور الشلغم

ت	العزلة المنتجة	البكتريوسين المحفز بالمايتومايسين- C			البكتريوسين المحفز بمستخلص جذور الشلغم		
		قطر منطقة منع النمو (ملم)	تركيز البروتين (مكغم/مل)	الفعالية (وحدة/مل)	قطر منطقة منع النمو (ملم)	تركيز البروتين (مكغم/مل)	الفعالية (وحدة/مل)
1	E10	15	725	160	15	940	320
2	E41	15	845	320	25	850	320
3	E63	20	1110	640	25	2100	1280
4	E73	22	975	640	30	2350	1280
5	E95	15	625	320	20	640	320

Detection of Bacteriocin Production and Induction by *Brassica rapa extract*

Hind Hussein Obaid
Dep. of Biology , College of Science, University of Baghdad,

Received in :15 May 2016 ,Accepted in: 29 May 2016

Abstract

The present study aimed to try to find natural substances stimulate the production of bacteriocin, as well as "for detection of bacteriocin producing isolates. Two hundred and eighty (280) bacterial isolates, gram negative only, were collected from 760 different pathogenic samples, consist: (Urinary tract infection, septicemia, Vaginal inflammation and diarrhea).

The isolated bacteria are: *Escherichia coli, Klebsiella pneumonia Pseudomonas aeruginosa,, Salmonella typhi, Enterobacter cloacae, Acinetobacter baumannii, Serratia liquefaciens, Citrobacter freundii, Proteus mirabilis and Serrattia odorifera.*

Cup assay method was used to detect bacteriocin production. Locally media prepared (Nutriernt agar + *Brassica rapa* roots extract) to detect bacterial bacteriocin production, compared with (N. agar) only. The results showed, the percentage of bacteria production of bacteriocin were (28.57%)/(80) isolates only on N. agar, while the ratio reached to (82.5%)/ (231) isolates by local media.Also this media gave (45 mm) in dimeter of inhibition zone in *E. coli. Brassica rapa* roots extract was used to stimulate bacteriocin production compared with mitomycin-c (Mt-c) in five isolates of the *E. coli. It was* found the extract emulate Mt-, in dimeter of inhibition zone , protein concentration and activity. But it was better than Mt-c in some isolates.

Key words: Cup assay , *Brassica rapa* , Bacterocin, mitomycin-c