مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 40 العدد 2 (2024): 61-74

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 40 No.2 (2024): 61-74

إنتاج البيديوسين من بكتيريا *Pediococcus acidilactici* المعزولة محلياً وتنقيته ووصفه

محمد حسن شباط[1]، أ.د. عبد الحكيم فهد عزيزية[2]، أ.د. عهد الياس أبو يونس[3]

[1]طالب دكتوراه في علوم الأغذية بكلية الزراعة في جامعة دمشق
mohammad.shbat88@damascusuniversity.edu.sy

[2] استاذ دكتور في علوم الأغذية جامعة دمشق تخصص تكنولوجيا لحوم.
a.azizieh@damascusuniversity.edu.sy

[3]استاذ دكتور في علوم الأغذية جامعة دمشق تخصص تصنيف بكتيريا.
ahed.abouyounes@damascusuniversity.edu.sy

الملخص:

نُفّذت هذه الدراسة في مخابر قسم علوم الأغذية بكلية الزراعة في جامعة دمشق ومخبر مديرية التجارة الداخلية وحماية المستهلك بدمشق عام 2021، وهدفت إلى إنتاج البيديوسين بواسطة بكتيريا *Pediococcus acidilactici* المعزولة من بعض المنتجات الغذائية المصنعة بطريقة تقليدية وتحديد فعاليته في تثبيط بعض أنواع بكتيريا الفساد، تم الإنتاج بالتنمية في مرق MRS، بعدها الاستخلاص والتنقية ثم قياس فعاليته في تثبيط بعض أنواع بكتيريا الفساد المعزولة مسبقاً ودراسة تأثير كل من المعاملات الحرارية والمعاملة بأرقام مختلفة من الـ pH والمعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتينات. أظهرت النتائج فعالية جيدة للبيديوسين في تثبيط البكتيريا المدروسة وهي *Proteus mirabilis*، *Citrobacter murliniae*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas spp*، *Listeria monocytogenes* وبدرجة أقل تثبيط *Klebsiela oxytoca*، كما بينت النتائج ثبات البيديوسين تجاه المعاملات الحرارية حتى الدرجة 100مْ مدة 15 دقيقة، وتحسّن في فعالية البيديوسين التثبيطية في الأوساط القلوية وانخفاض في الفعالية في الأوساط الحامضية لتصل أدنى مستوى عند pH=11، وقلّت فعالية البيديوسين التثبيطية بشكل كبير عند المعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتينات.

الكلمات المفتاحية: البيديوسين، بكتيريا الفساد، معاملات حرارية، pH.

تاريخ الايداع:2022/8/15
تاريخ القبول: 2022/10/3

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

Production, purification and characterization pediocin from *Pediococcus acidilactici* locally isolated

Mohammad Hassan Shbat[1], Prof. Abdulhakim Fahed Azizieh[2], Prof. Ahed Abu Younis[3]

[1]Postgraduate Student (PhD), Dept. of food science, Faculty of Agriculture, Damascus University. Mohammad.shoubat88@damascusuniversity.edu.sy

[2]Professor of Food Sciences, Damascus University, specialized in meat technology a.azizieh@damascusuniversity.edu.sy

[3]Professor of Food Sciences, Damascus University, specialized in bacterial classification. ahed.abouyounes@damascusuniversity.edu.sy

Abstract:

This study was conducted at Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University and directorate of internal trade and consumer protection laboratory in Damascus in 2021. The research aimed to produce pediocin by *Pediococcus acidilactici* isolated from some food products traditionally manufactured and determine its effectiveness in inhibiting some types of spoilage bacteria. Production was carried out by growing in MRS broth medium, then extraction and purification, and then measuring its effectiveness in inhibiting some types of spoilage bacteria previously isolated. Pediocin efficiency then tested against heat treatments, pH changes and protease enzymes. The results showed a good efficacy of pediocin in inhibiting the studied bacteria, which are *Proteus mirabilis*, *Citrobacter murliniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Listeria monocytogenes* and with a lesser degree *Klebsiela oxytoca*. The results also showed the stability of pediocin toward the heat treatments up to 100°C for 15 minutes, and an improvement in the inhibitory activity in alkaline media and a decrease in this activity in acidic media to reach the lowest level at pH=11. The inhibitory activity of pediocin significantly reduced when treated with protease enzymes.

Key Words: Pediocin, Spoilage Bacteria, Heat Treatments, Ph.

Received: 15/8/2022
Accepted: 3/10/2022

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

المقدمة Introduction:

تجذب البكتيريا المنتجة للمواد المثبطة لنمو الميكروبات، وخصوصاً بكتيريا حمض اللبن اهتماماً متزايداً كمواد حافظة للأغذية، وتعد البكتيريوسينات ببتيدات مضادة للميكروبات ذات أوزان جزيئية صغيرة، تتميز بمجال فعالية وطريقة تأثير ووزن جزيئي ومصدر وراثي وخواص بيوكيميائية متباينة (Reis *et al*., 2012, 124). أُنتجت العديد من البروتينات المضادة للبكتيريا بوساطة أنواع من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام، حيث استخدمت بكتيريا حمض اللبن كمواد حافظة طبيعية للأغذية، لأنها آمنة صحياً، وتتحلل بوساطة الأنزيمات المحللة للبروتينات الموجودة في إفرازات المعدة (Konings *et al*., 2000, 276).

بدأت دراسة البكتريوسينات عام 1925م باكتشاف بلازميد يحمل مورثات تشفر لبروتين تنتجه بكتيريا *Esherichia coli*، يعمل هذا البروتين على قتل الخلايا البكتيرية المعوية الأخرى قريبة الصلة بالبكتيريا المنتجة له، ويطلق اسم (Colicin) على البروتين الذي تنتجه بعض سلالات *E.coli* (Rily, M.,A. and chavan, M.,A., 2007, 20).

تُعرف البكتريوسينات بأنها مركبات حيوية تنتج بوساطة البكتيريا، وهي مواد ذات طبيعة بروتينية، وقد تكون متحدة مع الدهون أو الكربوهيدرات، وتتصف بقدرتها على منع نمو سلالات النوع نفسه أو أنواع مقاربة، ويعزى فعلها القاتل لارتباطها مع مستقبلات الخلية الحساسة له (Gillor *et al*., 2009, 591). تنتج 90% من البكتيريا ومنها الموجبة والسالبة لصبغة غرام مواد مضادة لنمو الميكروبات، وهي ببتيدات لها خصائص مضادة للجراثيم ولا تتبع من الناحية التقسيمية المواد الحيوية المثبطة لنمو الميكروبات، حيث تختلف عنها في كونها ذات مجال تثبيطي ضيق يقتصر على البكتيريا القريبة جداً من السلالة أو النوع المنتِج للبكتريوسين (Jack and Jung, 2000, 310)، تضم البكتيريوسينات عدة أنواع أهمها:

Microgard: مضاد ميكروبي ينتج من تخمر الحليب خالي الدسم بوساطة *Propionibacterium freudenreichii subsp. Shermanii* (Faye, T. *et al*., 2000, 4230).

النيسين (Nisin): يعد أفضل البكتيريوسينات المدروسة تقريباً، وينتج بوساطة بكتيريا *Lactococcus lactis*.

البيديوسين (Pediocin): ينتج عن بكتيريا *Pediococcus spp.*، وهو عديم الفعالية ضد أغلب الأبواغ، لكنه يمتلك فعالية عالية في تثبيط نمو بكتيريا *Listeria monocytogenes* (Amado, I., R. *et al*., 2016, 8070).

الساكاسين (Sakacin): ينتج بواسطة بكتيريا *Lactobacillus sake* المعزولة من اللحم ويؤخر نمو بكتيريا *Listeria monocytogenes*أو يثبطها كلياً (Abee *et al*., 1995, 175).

أَنتج Osmanagaoglu وآخرون (2011، 2070) البكتيريوسين من *P.pentosaceus* OZF المعزولة من حليب المرأة، ووجد أن وزنه الجزيئي 4623 دالتون وهو مطابق للبيديوسين AcH/PA-1، ويمتلك نشاطاً مثبطاً لنمو عدد من أنواع البكتيريا الموجبة لصبغة جرام بما في ذلك تلك المسببة للأمراض المحمولة بالغذاء *Listeria monocytogenese*. كما دَرس Ketaren وآخرون (2016، 290) تأثير تغليف البيديوسين N6 المنتج بواسطة بكتيريا *P. pentosaceus* المعزولة من مياه الينابيع الحارة في اندونيسيا ضمن كبسولات في النشاط المضاد للبكتيريا من خلال ثلاثة عوامل، فوجد أن أفضل نشاط تثبيطي حصل عليه عند استخدام مادة حاملة للبيديوسين مكونة من 83.33% مالتوديكسترين و16.67% قشدة الحليب وتركيز البيديوسين السائل النقي 20% ودرجة حرارة التحضير 150مْ، حيث كانت منطقة التثبيط 50.2مم ضد بكتيريا *L. monocytogenese* و42.5مم ضد بكتيريا *E. coli* O157:H7 و37.3 مم ضد بكتيريا *S. thyphimurium*، في حين كانت منطقة التثبيط قبل التغليف في الكبسولات أقل من ذلك 37.4، 32.3، 29.2 مم على الترتيب.

أورد Khorshidian وآخرون (2021، 1) أن البيديوسين والبكتيريوسينات المشابهة تمتلك تأثراً مثبطاً لنمو طيف واسع من البكتيريا الموجبة لصبغة جرام خصوصاً البكتيريا الممرضة كبكتيريا *Listeria monocytogenes* عبر تشكيل مسامات في الغشاء السيتوبلاسمي وخلل في وظائف غشاء الخلية، يعد البيديوسين حساساً تجاه الإنزيمات المحللة للبروتينات لكنه يحافظ على فعاليته عند تعريضه لدرجات الحرارة المنخفضة حتى −80مْ.

أوضح Niamah (2018، 59) أن البيديوسين يمتلك خواص مثبطة تجاه العديد من الخلايا البكتيرية الحساسة ويعمل على الغشاء السيتوبلاسمي خلال تشكيل المسامات، حيث يتداخل مع امتصاص الأحماض الأمينية في فوسفوليبيدات الأغشية السيتوبلاسمية للخلايا المستهدفة، ويتميز البيديوسين بخواص فريدة تتمثل بثباته عند درجات الحرارة العالية وحفاظه على فعاليته ضمن مجال واسع من أرقام الـ Ph، ويمتلك البيديوسين تأثراً مثبطاً للعديد من البكتيريا الممرضة وتلك المسببة لفساد الأغذية تتضمن *Listeria*، *Clostridium*، *Bacillus*، *Aeromonas*، *Staphylococcus*، *Lactobacillus* و *Enterococcus*.

درس Amado وآخرون (2016، 8070) تأثير إضافة البيديوسين SA-1 مع بادئ من بكتيريا حمض اللبن إلى العلف في حمولته الميكروبية ومحتواه من بكتيريا *Listeria monocytogenes* مقارنة بإضافة البادئ لوحده وبعينة شاهد دون إضافات، ووجدوا أن إضافة البيديوسين مع البادئ أدت إلى اختفاء البكتيريا المذكورة مع بقائها في عينتي المقارنة.

عزل Anastasiadou وآخرون (2008، 448) بكتيريا *Pediococcus pentosaceus* من اللحم واستخدمه في إنتاج البيديوسين، وجد أن البيديوسين الناتج يمتلك القدرة على تثبيط العديد من البكتيريا الممرضة والمسببة لفساد الغذاء، وأظهر ثباتاً ملحوظاً تجاه المعاملة الحرارية ومجال واسع من رقم الـ pH لكنه حساساً تجاه انزيمات البروتياز المحللة للبروتينات، بلغ الوزن الجزيئي للبيديوسين 5.370 دالتون. وقد أنتج Huang وآخرون (2009، 1030) البيديوسين من *P. pentosaceus* المعزولة من مخلل Sichuan، أظهر البيديوسين المنتج فعالية تجاه كل من *Listeria*، *Lactobacillus*، *Streptococcus*، *Enterococcus*، *Pediococcus*، *Leuconostoc*. لكنه كان حساساً تجاه الانزيمات المحللة للبروتينات وثابتاً تجاه أرقام الـ pH بين 4−8 ومقاوم للحرارة 121 مْ مدة 15 دقيقة.

درس Wang وآخرون (2015، 1756) الخواص الفيزيائية للبيديوسين المنتج بواسطة بكتيريا *Pediococcus acidilactici* PA003 من خلال فعاليته في تثبيط نمو بكتيريا *Listeria monocytogenes*، ووجدوا أن فعاليته لم تتأثر بتعريضه لحرارة تتراوح بين 20−100مْ، بينما انخفضن هذه الفعالية إلى النصف عند تعريضه لحرارة 121مْ لنفس المدة، وحافظ البيديوسين على فعاليته عند تحضينه مدة ساعتين عند درجة حرارة 25مْ على أرقام Ph تتراوح بين 1−14، وتبين أن الإنزيمات هي العوامل الرئيسية التي تؤثر في فعالية البيديوسين كالبيبسين والتربسين والبابايين والبروتيناز K.

يعاني منتجو اللحوم ومصنعوها من فسادها رغم استخدام العديد من طرائق الحفظ، لذا تزايد الاهتمام بالأمراض الناتجة عن الأحياء الدقيقة المنتقلة بالغذاء، هذا وتشكّل مقاومة بعض الأحياء الدقيقة الموجودة في اللحوم للمضادات الحيوية مشكلة أخرى، وتعد سلامة المواد الحافظة الصنعية المستخدمة في بعض المنتجات مصدر قلق للمستهلك، لذا يوجد اهتمام متزايد بتطوير مواد حافظة جديدة أكثر فاعلية وعديمة السمية كالبكتيريوسينات، لذا هدف هذا البحث إلى إنتاج البيديوسين من بكتيريا *P. acidilactici* معزولة محلياً وتنقيته ووصفه تمهيداً لاستخدامه في حفظ اللحوم ومنتجاتها.

مواد البحث وطرائقه Materials and Methods:

1) إنتاج البيديوسين ووصفه

تم إنتاج البيديوسين حسب طريقة Al-Zahrani, S. و Al-Zahrani, F. (2006، 136) بتلقيح (10 مل) من مرق MRS (من إنتاج شركة MERCK الألمانية والتي يتكون الليتر الواحد منها من 10غ بيبتون، 8غ مستخلص اللحم، 4غ مستخلص الخميرة، 20غ جلوكوز (+D)، 2غ فوسفات الهيدروجين ثنائي البوتاسيوم،1غ توين 80، 5غ أسيتات الصوديوم، 2غ سيترات ثلاثي الأمونيوم، 0.2غ كبريتات المغنزيوم، 0.04غ كبريتات المنغنيز أُكمل الحجم إلى 1000مل بالماء منزوع الشوارد وحُرّك المزيج مع التسخين حتى تمام الذوبان ثم ضُبط رقم الـ pH عند 5.7±0.2 عند حرارة 25مْ وعُقّم الوسط بالاوتوغلاف على حرارة 121مْ مدة 15دقيقة) باستخدام (0.1 مل) من مزرعة بكتيريا *Pediococcus acidilactici* المعزولة سابقاً (شباط وآخرون، 2021)، وحُضّنت على حرارة (35مْ) مدة (12 ساعة)، وأُخذ من الأخيرة (1 مل) لتلقيح (100 مل) من مرق MRS وحُضّنت على حرارة (35مْ) مدة (48 ساعة).

2) استخلاص البيديوسين

استُخلص البيديوسين الناتج حسب الطريقة المتبعة من قبل Mourad وآخرون (2005، 193) و Gautam و Sharma (2009، 207) مع بعض التعديلات، حيث عُرّضت الأنابيب بعد انتهاء مدة التحضين للطرد المركزي بسرعة (8000 دورة/ دقيقة) على درجة حرارة (4مْ)، ثم أُخذت الطبقة العلوية ورُشّحت باستخدام ورقة ترشيح فحصلنا على البيديوسين الخام.

3) التنقية الجزئية للبيديوسين:

نُفّذت هذه العملية بطريقة الإشباع بالملح، وذلك بإشباع البيديوسين الخام بوساطة (70%) كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ من إنتاج شركة HIMEDIA الهندية، وتخزينه مدة (24 ساعة) مع التحريك المستمر باستخدام محرك مغناطيسي لترسيب البروتين، ثم عُرّض للطرد المركزي على سرعة (8000 دورة/ دقيقة) مدة ساعة على حرارة (4مْ)، وفُصل الراسب وأُذيب في (25 مل) محلول موقي من فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4 (0.1 مولر) من إنتاج شركة HIMEDIA الهندية رقم حموضته (7) مضاف إليه كمية مكافئة من ثلاثي كلور حمض الخل $C_2HO_2CL_3$ (5%) من إنتاج شركة HIMEDIA الهندية، ثم عُرّض المزيج للطرد المركزي على سرعة (8000 دورة بالدقيقة) مدة (20 دقيقة)، فُصل الراسب وأُذيب في محلول موقي من فوسفات البوتاسيوم.

4) التنقية بطريقة الغسيل:

عُرّض البيديوسين المنقى جزئياً للطرد المركزي على سرعة (8000 دورة بالدقيقة) على حرارة (4مْ)، فُصل الراسب بالماء وأُعيد طرده مركزياً بسرعة (8000 دورة بالدقيقة) مدة (20 دقيقة) على حرارة (4مْ).

5) قياس فعالية البيديوسين المُنتج:

بطريقة الحفر وذلك بنشر (0.1 مل) من كل نوع من بكتيريا الفساد المعزولة سابقاً وهي 6 عزلات من البكتيريا المسببة لفساد السجق الطازج المحلي (عزيزية وآخرون؛ 2019، 73) موضحة في الجدول رقم (1) على طبق من الآغار المغذي (من إنتاج شركة MERCK الألمانية والتي يتكون الليتر الواحد منها من 5غ بيبتون، 3غ مستخلص اللحم، 12غ آغار آغار أُكمل الحجم إلى 1000مل بالماء المقطر وحُرّك المزيج مع التسخين حتى تمام الذوبان ثم ضُبط رقم الـ pH عند 7.0±0.2 عند حرارة 25مْ وعُقّم الوسط بالاوتوغلاف على حرارة 121مْ مدة 15دقيقة) بوساطة أداة معقمة، ثم تم عمل حفر بقطر (6 ملم) ليوضع ضمنها (70

ميكرولتر) من البيديوسين ضمن الحفر، ثم وُضعت الأطباق مدة ساعتين ضمن البراد، بعدها تم التحضين عند (37 ْم) مدة (24 ساعة)، وقيست بعدها منطقة المنع والتثبيط أو الهالة المحيطة بالحفر والخالية من النمو (Benkerrouym *et al.* 1993, 79).

الجدول (1): عزلات البكتيريا المسببة لفساد السجق الطازج المحلي المدروسة

رمز العزلة	البكتيريا المعزولة
A	*Proteus mirabilis*
B	*Citrobacter murliniae*
C	*Escherichia coli*
D	*Klebsiela oxytoca*
E	*.Pseudomonas spp*
F	*Listeria monocytogenes*

6) وصف البيديوسين المنقى: وُصف البيديوسين من حيث مقاومته للحرارة وحساسيته للرقم الهيدروجيني والأنزيمات المحللة للبروتينات.

أ. المقاومة للحرارة:

حُدّد الثبات الحراري للبيديوسين المنقى بتعريضه لدرجات حرارة مختلفة، حيث أُضيف (0.5 مل) من البيديوسين المنقى إلى (4.5 مل) من بيئة المرق المغذي (من إنتاج شركة HIMEDIA الهندية والتي يتكون الليتر الواحد منها من 5غ بيبتون، 5غ كلوريد الصوديوم، 1.5غ مستخلص لحم العجل، 1.5غ مستخلص الخميرة أُكمل الحجم إلى 1000مل بالماء منزوع الشوارد وحُرّك المزيج مع التسخين حتى تمام الذوبان ثم ضُبط رقم الـ pH عند 7.4±0.2 عند حرارة 25ْم ووُزّعت في أنابيب اختبار بمعدل 4.5 مل في كل أنبوب وعُقّمت بالاوتوغلاف على حرارة 121ْم مدة 15دقيقة) في أنبوب اختبار وسُخّن لدرجات حرارة مختلفة (40 و50 و60 و70 و80 و90 و100) مدة (15 دقيقة)، ثم اختُبر كل أنبوب لخواصه المضادة للميكروبات بطريقة الحفر.

ب. الحساسية للرقم الهيدروجيني:

اختُبرت حساسية البيديوسين المنقى للرقم الهيدروجيني بتعديل الرقم الهيدروجيني للأنابيب الحاوية على (4.5 مل) بيئة المرق المغذي المعقمة بين (2− 11)، ثم أُضيف (0.5 مل) بيديوسين إلى كل أنبوب، وحُضّن مدة ساعة على حرارة الغرفة، ثم اختُبر نشاطه المضاد للميكروبات.

ت. الحساسية للأنزيمات المحللة للبروتين:

دُرس تأثير المعاملة بإنزيم الرينين المحلل للبروتينات، حيث أُضيف إلى أنبوب حاوي على (0.15 مل) محلول موقي من الفوسفات تركيز (5 مولر) رقم حموضته (7) كمية (0.15 مل) بيديوسين، و(0.15 مل) من إنزيم الرينين تركيز (0.25 مغ/مل)، وللتأكد من أن التثبيط الميكروبي لا ينتج عن محلول الفوسفات الموقي، أُخذ أنبوب شاهد يحتوي على المحلول الموقي فقط وخالي من الإنزيم والبيديوسين.

7) التحليل الإحصائي:

أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS 25 لدراسة كل من:

– فعالية البيديوسين المنتج تجاه بكتيريا الفساد المدروسة وحساب قيم الفروقات بين متوسطات أقطار مناطق التثبيط لبكتيريا الفساد المدروسة حسب اختبار Tukey.

– دراسة تأثير المعاملات الحرارية والمعاملة بأرقام pH متباينة والمعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتينات في فعالية البيديوسين المنتج في تثبيط بكتيريا الفساد المدروسة وحساب قيمة أقل فرق معنوي LSD بين المعاملات المذكورة.

النتائج والمناقشة Results and Discussion:

1) قياس فعالية البيديوسين المنتج:

يبين الجدول (2) فعالية البيديوسين المنتج معبراً عنه بقطر منطقة التثبيط لنمو كل نوع من بكتيريا الفساد المدروسة بالميلي متر.

الجدول (2): فعالية البيديوسين المنتج تجاه بكتيريا الفساد المدروسة معبراً عنه بقطر منطقة التثبيط (مم)

رمز العزلة	قطر التثبيط (مم)
A	17.6 ± 0.52^{ababab}
B	15.4 ± 0.62^{baabaa}
C	16.9 ± 0.70^{aaabab}
D	12.2 ± 0.36^{bbbabb}
E	16.2 ± 0.70^{aaabab}
F	14.3 ± 0.98^{babbba}

تشير الأحرف المتباينة في العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية في فعالية التثبيط للبيديوسين مقارنة ببقية البكتيريا المدروسة عند درجة ثقة ($P\leq0.05$)

أظهر البيديوسين المنتج بواسطة بكتيريا *P. acidilactici* فعالية جيدة في تثبيط البكتيريا السالبة لجرام والمسببة لفساد السجق الطازج حيث تراوح قطر منطقة التثبيط عند الاختبار على الوسط الصلب بين (12.2–17.6 مم)، كما أظهر فعالية جيدة في تثبيط بكتيريا *L.monocytogenes* الموجبة لجرام حيث بلغ قطر منطقة التثبيط حوالي (14.3 مم)، وهذا يتفق مع ما وجده Yin وآخرون (2003) بأن البيديوسين يمتلك فعالية جيدة في تثبيط العديد من أنواع البكتيريا الموجبة لجرام مثل *L. monocytogenes* والبكتيريا السالبة لجرام مثل *Vibrio cholera* و *Klebsiella oxytoca* و *Proteus vulgaris* و *Shigella dysenteriae* كما تثبط الأنواع المنتجة للأبواغ مثل *Bacillus subtilis* و *B. cereus* و *Clostridium sporogenous* في حين يختلف معه فيما توصلوا إليه من عدم امتلاك البيديوسين فعالية في تثبيط *Escherishia coli* و *Pseudomonas fluorescens*.

بينت نتائج التحليل الإحصائي لفعالية البيديوسين في تثبيط البكتيريا المدروسة عند درجة الثقة ($P\leq0.05$)، وجود فروقات معنوية في فعالية البيديوسين في تثبيط *Proteus mirabilis* مقارنة بفعاليته في تثبيط *C.murliniae* و *K.oxytoca* و *L. monocytogenes* وبلغت قيم الفروقات بين المتوسطات حسب اختبار Tukey (2.2، 5.4، 3.3 على الترتيب)، ووجود فروقات معنوية في فعالية البيديوسين في تثبيط *C. murliniae* مقارنة بفعاليته في تثبيط *P. mirabilis* و *K. oxytoca* وبلغت قيم الفروقات بين المتوسطات حسب اختبار Tukey (2.2–، 3.2 على الترتيب)، ووجود فروقات معنوية في فعالية البيديوسين في

تثبيط *E. coli* مقارنة بفعاليته في تثبيط *K.oxytoca* و *L. monocytogenes* وبلغت قيم الفروقات بين المتوسطات حسب اختبار Tukey (4.7، 2.6 على الترتيب)، ووجود فروقات معنوية في فعالية البيديوسين في تثبيط *K. oxytoca* مقارنة بفعاليته في تثبيط البكتيريا الأخرى المدروسة وبلغت قيم الفروقات بين المتوسطات حسب اختبار Tukey (−5.4، −3.2، −4.7، −4.0، −2.1 على الترتيب)، ووجود فروقات معنوية في فعالية البيديوسين في تثبيط *Pseudomonas spp* مقارنة بفعاليته في تثبيط *K. oxytoca* و *L. monocytogenes* وبلغت قيم الفروقات بين المتوسطات حسب اختبار Tukey (4.0، 1.9 على الترتيب)، ووجود فروقات معنوية في فعالية البيديوسين في تثبيط *L. monocytogenes* مقارنة بفعاليته في تثبيط *Proteus mirabilis* و *E. coli* و *K. oxytoca* و *Pseudomonas spp* وبلغت قيم الفروقات بين المتوسطات حسب اختبار Tukey (−3.3، −2.6، −2.1، −1.9 على الترتيب).

2) تأثير المعاملات الحرارية في فعالية البيديوسين التثبيطية:

يبين الجدول (3) نتائج دراسة تأثير المعاملة الحرارية لمدة (15) دقيقة في فعالية البيديوسين التثبيطية (معبراً عنها بقطر منطقة التثبيط بالميلي متر) تجاه بكتيريا الاختبار مقارنة بالشاهد (بدون معاملة حرارية).

الجدول(3): تأثير المعاملات الحرارية في فعالية البيديوسين التثبيطية تجاه بكتيريا الاختبار معبراً عنها بقطر منطقة التثبيط (مم)

	رمز العزلة	A	B	C	D	E	F
قطر التثبيط (مم)	بدون معاملة	17.60± 0.52^a	15.40± 0.62^a	16.90± 0.70^a	12.20± 0.36^a	16.20± 0.70^a	14.30± 0.98^a
	حرارة 40 مْ	17.97± 0.40^a	15.80± 0.35^a	16.90± 0.61^a	12.23± 0.76^a	16.17± 0.78^a	14.60± 0.36^a
	حرارة 50 مْ	17.67± 0.40^a	15.67± 0.51^a	16.50± 0.76^a	12.07± 0.45^a	15.90± 0.53^a	14.20± 0.26^a
	حرارة 60 مْ	17.6± 0.53^a	15.73± 0.23^a	16.70± 0.15^a	12.33± 0.47^a	16.33± 0.31^a	14.50± 0.10^a
	حرارة 70 مْ	17.87± 0.23^a	15.73± 0.38^a	16.77± 0.40^a	12.43± 0.21^a	16.47± 0.15^a	14.43± 0.29^a
	حرارة 80 مْ	17.67± 0.15^a	15.73± 0.15^a	16.80± 0.53^a	12.13± 0.50^a	16.10± 0.53^a	14.57± 0.23^a
	حرارة 90 مْ	17.63± 0.25^a	15.70± 0.10^a	16.70± 0.62^a	12.03± 0.47^a	16.07± 0.32^a	14.50± 0.26^a
	حرارة 100 مْ	17.43± 0.25^a	15.57± 0.21^a	16.60± 0.53^a	12.00± 0.35^a	15.93± 0.47^a	14.37± 0.15^a

تشير الأحرف المتباينة في العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية في فعالية التثبيط للبيديوسين للعزلة البكتيرية الواحدة المدروسة بين المعاملات الحرارية عند درجة ثقة ($P\leq0.05$)

نلاحظ من الجدول بأن فعالية البيديوسين التثبيطية تجاه بكتيريا الاختبار لم تتأثر عند المعاملة بدرجات الحرارة المدروسة مدة (15 دقيقة)، وهذا يتفق مع Wu وآخرون (2004) الذي وجد بأن البيديوسين فقد جزء من فعاليته عند المعاملة بدرجة حرارة (121 مْ) مدة ساعة لكنه حافظ على ثباته عند معاملته بدرجة حرارة (100 مْ) مدة ساعة، ويتفق أيضاً مع Anastasiadou وآخرون (2008) الذين لاحظوا بأن البيديوسين حافظ على فعاليته عند المعاملة بدرجات حرارة (100 و121 مْ) مدة ساعة.

وبينت نتائج التحليل الإحصائي لتأثير المعاملات الحرارية المذكورة لمدة (15) دقيقة في فعالية البيديوسين في تثبيط البكتيريا المدروسة عند درجة الثقة ($P\leq0.05$) عدم وجود فروقات معنوية بين فعالية البيديوسين بعد تعريضه للمعاملات الحرارية مقارنة بالشاهد بدون معاملة حرارية في تثبيط نمو كل من بكتيريا الاختبار.

ويُعتقد بأن السبب في تحمل البيديوسين لدرجات الحرارة العالية يعود إلى تركيب البيديوسين نفسه ووجود الروابط ثنائية الكبريت التي تربط بين جزيئتي السيستين الموجودة في المواقع (9،14) و(24،44) (Rodriguez *et al.*, 2002).

3) تأثير رقم الـ pH في فعالية البيديوسين التثبيطية:

يبين الجدول (4) تأثير رقم الـ pH في فعالية البيديوسين التثبيطية (معبراً عنها بقطر منطقة التثبيط بالميلي متر) تجاه بكتيريا الاختبار مقارنة بالشاهد.

الجدول (4): تأثير رقم الـ pH في فعالية البيديوسين التثبيطية تجاه بكتيريا الاختبار معبراً عنها بقطر منطقة التثبيط (مم)

رمز العزلة	A	B	C	D	E	F
بدون معاملة	17.60± 0.52 a	15.40± 0.62 a	16.90± 0.70 a	12.20± 0.36 a	16.20± 0.70 a	14.30± 0.98 a
pH=**2**	22.67± 0.21 b	19.57± 0.21 b	20.40± 0.26 b	15.80± 0.36 b	19.47± 0.25 b	18.97± 0.21 b
pH =**3**	22.13± 0.21 b	19.53± 0.15 b	±40.20 0.26 b	15.73± 0.06 b	19.47± 0.12 b	18.97± 0.15 b
pH =4	22.03± 0.06 b	19.43± 0.06 b	19.93± 0.12 b	15.80± 0.36 b	19.47± 0.25 b	18.97± 0.21 b
pH =**5**	22.03± 0.12 b	19.57± 0.06 b	20.07± 0.06 b	15.77± 0.06 b	19.63± 0.06 b	18.90± 0.17 b
pH =**6**	21.67± 0.23 b	19.17± 0.06 b	19.53± 0.06 b	15.13± 0.06 b	19.20± 0.10 b	18.33± 0.06 b
pH =7	17.63± 0.21 a	15.43± 0.15 a	16.87± 0.06 a	12.33± 0.15 a	16.17± 0.25 a	14.37± 0.38 a
pH =**8**	17.47± 0.58 a	15.20± 0.10 a	16.60± 0.10 a	12.27± 0.12 a	16.10± 0.17 a	14.40± 0.26 a
pH =**9**	17.23± 0.06 a	15.00± 0.10 a	16.40± 0.10 a	12.17± 0.12 a	15.97± 0.15 a	14.23± 0.23 a
pH=**10**	2.90± 0.20 b	2.23± 0.15 b	2.47± 0.06 b	1.83± 0.06 b	2.50± 0.10 b	2.20± 0.10 b
pH=**11**	2.23± 0.06 b	1.77± 0.06 b	1.97± 0.12 b	1.47± 0.06 b	1.77± 0.06 b	1.57± 0.06 b

قطر التثبيط (مم)

تشير الأحرف المتباينة في العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية في فعالية تثبيط البيديوسين للبكتيريا المدروسة بين بأرقام pH المختلفة عند درجة ثقة ($P\leq0.05$)

بينت النتائج تحسّن في فعالية التثبيط للبيديوسين تجاه بكتيريا الاختبار مع انخفاض رقم الـ pH ، وتقل هذه الفعالية مع ارتفاع رقم الـ pH أعلى من (7.0) لتصل لأدنى حد عند أرقام PH (10.0، 11.0) وهذا يتفق مع Bhunia وآخرون (1988) الذين لاحظوا بأن البيديوسين حافظ على فعاليته التثبيطية ضمن مجال pH بين (2.5، 10.0) عند درجة حرارة (25 مْ) مدة ساعتين في حين فقد فعاليته عند رقم pH (10.0) بعد (24) ساعة، كما يتفق مع Chen وآخرون (1997) الذين أثبتو أن انخفاض رقم الـ pH من (7.5) إلى (6.0) زاد من فعالية البيديوسين التثبيطية نتيجة زيادة قابلية ارتباط البيديوسين بجدران بكتيريا الاختبار، ويتفق مع Osmanagaoglu وآخرون (2011) الذين وجدوا بأن فعالية البيديوسين التثبيطية انعدمت عند رقم pH بين (10–12) بعد التحضين مدة (24) ساعة عند حرارة (25 مْ) في حين لم تتأثر هذه الفعالية عند أرقام pH منخفضة.

بينت نتائج التحليل الإحصائي لتأثير المعاملة بأرقام متباينة من pH في فعالية البيديوسين في تثبيط البكتيريا المدروسة عند درجة الثقة ($P\leq0.05$)، وجود فروقات معنوية في فعالية البيديوسين بدون معاملة في تثبيط البكتيريا المدروسة مقارنة بالبيديوسين المعامل بأرقام (pH 2، 3، 4، 5، 6، 10، 11) وبلغت قيم أقل فرق معنوي (–4.04، –3.88، –3.81، –3.89، –3.41، 13.08، 13.63 على الترتيب).

هذا ويعزى سبب زيادة فعالية البيديوسين التثبيطية عند الأرقام المنخفضة من الـ pH إلى زيادة شحناته الموجبة وبالتالي زيادة قوة الربط مع فوسفوليبيدات جدران خلايا الاختبار.

4) تأثير المعاملة بإنزيم الرينين في الفعالية التثبيطية للبيديوسين:

يبين الجدول (5) تأثير المعاملة بإنزيم الرينين في فعالية البيديوسين التثبيطية (معبراً عنها بقطر التثبيط بالميلي متر) تجاه بكتيريا الاختبار مقارنة بالشاهد.

الجدول (5): تأثير المعاملة بإنزيم الرينين في فعالية البيديوسين التثبيطية تجاه بكتيريا معبراً عنها بقطر منطقة التثبيط (مم)

قطر التثبيط (مم)	رمز العزلة	A	B	C	D	E	F
	بدون معاملة	17.57± 0.51[a]	15.20± 0.62[a]	16.93± 0.50[a]	12.13± 0.31[a]	16.10± 0.79[a]	14.33± 0.74[a]
	الرينين	3.26± 0.15[b]	2.70± 0.17[b]	2.93± 0.12[b]	1.93± 0.06[b]	2.57± 0.12[b]	2.10± 0.17[b]

تشير الأحرف المتباينة في العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية في فعالية تثبيط البيديوسين للبكتيريا المدروسة بين المعاملات عند درجة ثقة ($P\leq0.05$)

لوحظ انخفاض في فعالية البيديوسين التثبيطية تجاه البكتيريا المدروسة بعد المعاملة بإنزيم الرينين المحلل للبروتينات مقارنة بفعالية البيديوسين غير المعامل وهذا يتفق مع (Anastasiadou *et al.*, 2008, 448).

وبينت نتائج التحليل الإحصائي لتأثير المعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتينات في فعالية البيديوسين في تثبيط البكتيريا المدروسة عند درجة الثقة ($P\leq0.05$)، وجود فروقات معنوية في فعالية البيديوسين بدون معاملة في تثبيط البكتيريا المدروسة مقارنة بالبيديوسين المعامل بالرينين.

الاستنتاجات Conclusions:

1. يمتلك البيديوسين المنتج بواسطة بكتيريا *Pediococcus acidilactici* فعالية جيدة في تثبيط بكتيريا *Proteus mirabilis*، *Citrobacter murliniae*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas spp*.، *Listeria monocytogenes* وفعالية أقل في تثبيط *Klebsiela oxytoca*.
2. لم تتأثر فعالية البيديوسين التثبيطية عند المعاملة بالحرارة العالية حتى 100مْ مدة 15 دقيقة.
3. تحسّنت فعالية البيديوسين التثبيطية عند المعاملة بأرقام منخفضة من الـ pH (2، 3، 4، 5، 6) ولم تتأثر عند أرقام الـ pH المعتدلة (7، 8، 9) في حين انخفضت بشكل كبير عند المعاملة بأرقام الـ pH المرتفعة (10، 11).
4. انخفضت فعالية البيديوسين التثبيطية عند معاملته بإنزيم الرينين المحلل للبروتينات.

التوصيات Recommendations:

دراسة إمكانية إنتاج البيديوسين بواسطة بكتيريا *Pediococcus acidilactici* صناعياً.

التمويل: هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. شباط، محمد؛ عزيزية، عبد الحكيم وأبو يونس، عهد (2021) عزل وتصنيف بكتيريا حمض اللبن من بعض المنتجات الغذائية المصنعة بالطرائق التقليدية، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية.
2. عزيزية، عبد الحكيم؛ أبو يونس، عهد وشباط، محمد (2019) عزل وتصنيف البكتيريا المسببة لفساد السجق الطازج المحلي، مجلة جامعة البعث للعلوم الهندسية، المجلد 41، العدد 97، 73–98.
3. Abee, T.; Krockel, L. and Hill, C. (1995) Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning, International Journal of Food Microbiology, 28, 169-185.
4. Al-Zahrani, S. and Al-Zahrani, F. (2006) Production of Bacteriocin(s) by four Lactic Acid Bacteria isolated from raw milk on organic waste, World applied science journal, 1(2), 135-143.
5. Amado, I., R.; Fuciños, C.; Fajardo, P. and Pastrana, L. (2016) Pediocin SA-1: A selective bacteriocin for controlling Listeria monocytogenes in maize silages, Journal of Dairy Science, 99(10), 8070-8080.
6. Anastasiadou, S.; Papagianni, M.; Filiousis, G.; Ambrosiadis, I. and Koidis, P. (2008) Growth and metabolism of a meat isolated strain of Pediococcus pentosaceus in submerged fermentation Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1, Enzyme and Microbial Technology, 43, 448-454.
7. Benkerrouym, N.; Houatwi, G.; Sandine, E. and Tantaoui-E laraki, A. (1993) Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins, Letters in Applied Microbiology, 17(2), 78-81.
8. Bhunia, A. K.; Johnson M. G. and Ray, B. (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici. Journal of applied bacteriology, 65, 261–268.
9. Chen, Y.; Shapira, R.; Eisenstein, M.; and Montville, T. J. (1997) Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. Applied and Environmental Microbiology, 63, 524–531.
10. Faye, T.; Langsrud, T.; Nes, I. F. and Holo, H. (2000) Biochemical and Genetic Characterization of Propionicin T1, a New Bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*, Applied and environmental microbiology, 66(10), 4230- 4236.
11. Gautam, N. and Sharma, N. (2009) Bacteriocin: safest approach to preserve food products, Indian Journal Microbiology, 49, 204- 211.
12. Gillor, O.; Etzion, A. and Riley, M.A. (2009) The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics, Applied Microbiology and Biotechnology, 81(4): 591–606.
13. Huang, Y.; Luo, Y.; Zhai, Z.; Zhang, H.; Yang, C.; Tian, H.; Li, Z.; Feng, J.; Liu, H. and Hao, Y. (2009) Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by Pediococcus pentosaceus 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China, Food Control, 20, 1030-1035.
14. Jack, R. W. and Jung, G. (2000) Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity, Current Opinion in Chemical Biology, 4(3):310-307.
15. Ketaren, N.; Marlida, Y.; Arnim and Yuherman (2016) Pediocin N6 Powder Production by Isolates *Pediococcus pentosaceus* Strain N6 and Storage Effect of Antimicrobial Activity against Bacterial Pathogens, World Journal of Agricultural Sciences, 12 (4): 290-298.
16. Khorshidian, N.; Khanniri, E.; Mohammadi, M.; Mortazavian, A. and Yousefi, M. (2021) Antibacterial Activity of Pediocin and Pediocin-Producing Bacteria against *Listeria monocytogenes* in Meat Products. Frontiers in Microbiology, 12:1-16.
17. Konings, W., N.; Kok, J.; Kuipers, O. P. and Poolman, B. (2000) Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium, Ecology and industrial microbiology, 276-282.

18. Mourad, K.; Halima, Z. K. and Nour-Eddine, K. (2005) Detection and activity of plantaricin OL15 a bacteriocin produced by Lactobacillusplantarum OL15 isolated from Algerian fermented olives, Grasasy Aceites, 56 (3) :192-197.
19. Niamah, A. (2018) Structure, mode of action and application of pediocin natural antimicrobial food preservative: A review. Basrah Journal of Agricultural Sciences, 31(1):59-69.
20. Osmanagaoglu, O.; Kiran, F. and Nes, I. F. (2011) A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF، isolated from human breast milk produces pediocin AcH/PA-1, African Journal of Biotechnology, 10(11): 2070-2079.
21. Reis, J. A.; Paula, A. T.; Casarotti, S. N. and Penna, A. L. B. (2012) Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications, Food Engineering Reviews, 4:124–140.
22. Rily, M. A. and chavan, M. A. (2007) Bacteriocins Ecology and Evolution. University of Massachusetts, USA, 150.
23. Rodríguez, J. M.; Martínez, M. I. and Kok, j. (2002) Pediocin PA-1, a Wide-Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42:2, 91-121.
24. Wang, J.; Li, L.; Zhao, X. and Zhou, Z. (2015) Partial characteristics and antimicrobial mode of pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* PA003. Annals of Microbiology, 65:1753–1762.
25. Wu CW, Yin LJ, Jiang ST. (2004) Purification and characterization of bacteriocin form Pediococcus pentosaceus ACCEL. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:1146–1154.