دراسة محتوى جرثومة *Listeria monocytogenes* من الاحماض الدهنية*

اميرة محمود الراوي   مياده احمد الطائي   ساهرة ادريس حميد
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

ABSTRACT

The study conducted the determination of fatty acids of *Listeria monocytogenes* by using Gas Liquid Chromatography (GLC) after extraction and esterification of fatty acids . From accounting the retention time of isolated fatty acids and comparison with standard fatty acids, the results showed domination of saturated types, Myristic acid (13.408%) Followed by Stearic acid (3.019%) among other saturated fatty acid while the unsaturated fatty acids, the Linoleic acid formed higher percent (4.591%) followed by Oleic acid (2.254%) . The other unsaturated fatty acids were differed in their percentages .

الخلاصة

تضمن البحث دراسة محتوى جرثومة *Listeria monocytogenes* من الاحماض الدهنية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز السائل Gas Liquid Chromatography (GLC) بعد استخلاص واسترة الاحماض الدهنية . ومن حساب زمن الاحتباس للاحماض الدهنية المفصولة بالمقارنة مع الاحماض الدهنية القياسية بينت النتائج سيادة الحامض الدهني المشبع Myristic acid بنسبة 13.408% تلاه الحامض الدهني Stearic acid من بين الاحماض الدهنية المشبعة بنسبة 3.019 % أما الاحماض الدهنية غير المشبعة فقد شكل الحامض الدهني Linoleic acid أعلى نسبة 4.591 % ثم الحامض الدهني Oleic acid بنسبة 2.254 % واختلفت النسب المئوية للاحماض الدهنية غير المشبعة الاخرى .

المقدمة

تمتلك جميع اشكال الخلايا الحية بما فيها البدائية والحقيقية النواة غشاء سايتوبلازمي يحيط بمكوناتها الخلوية ، تشكل الدهون Lipids الجزء الرئيسي لجميع الاغشية الحيوية وهي عادة تمثل المادة الاساسية المطمورة فيها المكونات الكيميائية الاخرى المكونة للغشاء (1) .

* البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

شهدت العقود القليلة الماضية تقدم بخطوط واسعة في الدراسات الكيميائية للدهون نتيجة لاكتشاف واستخدام جميع اشكال الكروماتوغرافيا في هذا الحقل حيث مكنت هذه التقنيات الباحثين من عزل العديد من الدهون غير المعروفة وجعلت من الممكن تحليل اصناف الدهون المختلفة ومعرفة مكوناتها من الاحماض الدهنية للنماذج الحيوية (2) .

اعتمد تركيب الحامض الدهني في الاحياء المجهريه بصورة واسعة في التشخيص الميكروبي وعموما فان محتوى الاحماض الدهنية في اغلب انواع الجراثيم يكون بمدى من سلاسل الكاربون C_9 الى C_{20} وتعد الاحماض الدهنية مكونا اساسيا في الاغشية السايتوبلازميه لمعظم الجراثيم الموجبة لصبغة كرام (3) .

تعد جراثيم *Listeria monocytogenes* ممرضات تنتقل عن طريق الغذاء موجبة لصبغة كرام غير مكونة للأبواغ لها القدرة على النمو في درجة حرارة الثلاجة وتسبب اصابات خطيرة جدا بنسبة وفيات 20_25 % (4) . وان قدرة جرثومية *Listeria monocytogenes* على النمو في درجة حرارة الثلاجة يعد جانباً مهماً وخطيراً في دورها كممرضات تنتقل عن طريق الغذاء لأن هذه الدرجة الحرارية تثبط نمو أغلب الممرضات المنتقلة عن طريق الغذاء (5) . ولدرجة الحرارة المنخفضة تأثير معقد على جميع الجوانب التركيبية والوظيفية للخلية الميكروبية بضمنها الكيان التركيبي للجزيئات الكبيرة والتركيب الجزيئي لها وصيغ البروتين والحصول على المغذيات (6) .

تختزل درجات الحرارة المنخفضة سيولة الغشاء Membrane fluidity وتسبب في حدوث اطوار انتقالية من الحالة المتبلورة السائلة الى الحالة الشبيهة بالهلام الاكثر صلابة . وللحفاظ على وظيفة الغشاء في درجات الحرارة المنخفضة فأن الاحماض الدهنية ذات درجات الانصهار الواطئة تتداخل في الدهون فتقوم الجراثيم بزيادة سيولة الغشاء بدمج الاحماض الدهنية غير المشبعة والاحماض الدهنية المتفرعة السلسلة Branched-Chain Fatty Acids (BCFAs) ذات درجات الانصهار الواطئة (7) .

ان مكونات الغشاء الخلوي لجرثومة *Listeria monocytogenes* تظهر سيادة الاحماض الدهنية متفرعة السلسلة (BCFAs) بنسبة قد تصل الى 90% (8) . لذلك حاولنا في هذا البحث التحري عن الاحماض الدهنية في الغشاء الخلوي الجرثومة *Listeria monocytogenes* المعزولة محليا .

المواد وطرائق العمل

اولا : استخلاص الاحماض الدهنية :

تم الحصول على عزلة سريرية من مسحة من مشيمة في حالة ولادة مبكرة لجرثومة *Listeria monocytogenes* من قسم علوم الحياة كلية العلوم في جامعة الموصل ، منماة على وسط المرق المغذي الحاوي على Tween 80 بعمر 24 ساعة ، تم التأكد من نقاوتها باعتماد الاختبارات الشكلية والكيمياحيوية كما ورد في (9، 10) .

رسبت الخلايا باستخدام جهاز الطرد المركزي الفوقي المبرد Ultra. Refrigerated centrifuge عند سرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة . غسلت الخلايا بالمحلول الملحي الفسلجي لمدة 10 دقائق كررت عملية الغسل مرتين .

استخلصت الاحماض الدهنية اعتمادا على ما جاء في طريقة (11) ، المحورة من قبل (12) . حيث مزجت الخلايا مع 20 سم^3 من هيدروكسيد الصوديوم 7.5 عياري المحضر في الميثانول المخفف بالماء المقطر بنسبة 4:6 بعد ذلك سخن المزيج بدرجة حرارة 105مْ لمدة 90 دقيقة وترك المزيج ليبرد ثم اضيف اليه 6 سم^3 من الماء المقطر وضبطت الدالة الحامضية عند 2 باستخدام جهاز pH meter ومحلول حامض الكبريتيك بتركيز 20% استخلصت الاحماض الدهنية باستعمال 30-50سم3 من Diethyl ether ثم اخذت طبقة الايثر الحاوية على الاحماض الدهنية وضبطت دالتها الحامضية عند 7 ثم جففت باستخدام جهاز Rotary Evaporator Vacuum بدرجة 50مْ .

ثانيا: تحضير استرات مثيل الاحماض الدهنية :

بعد استخلاص الاحماض الدهنية بالخطوة السابقة تم تحضير استرات مثيل هذه الاحماض الدهنية اعتمادا على ما جاء في (13-14) حيث تم اضافة 5سم^3 من محلول 14 % Boron-Trifluoride-methanol الى كل عينة من عينات الاحماض الدهنية وسخن المزيج الى درجة حرارة 85مْ لمدة 15 دقيقة ، لتحويل الاحماض الدهنية الى استرات مثيل الحامض الدهني التي استخلصت باضافة 2سم^3 من مزيج Hexane وDiethyl-ether بنسبة 1:1 (حجم : حجم) . نقلت المستخلصات الى انابيب اختبار بحجم 5سم^3 وتم تركيزها الى 0.3 سم^3 باستخدام التبخير تحت ظروف مشبعة بغاز النتروجين ثم اضيف 200 ملغم من كبريتات الصوديوم اللامائية الى مستخلص استير مثيل الحامض الدهني للتخلص من الرطوبة . نقلت النماذج الى انابيب اختبار وخزنت بدرجة حرارة -20مْ لحين تحليلها باستخدام تقنية (GLC).

ثالثا : تحليل الاحماض الدهنيه :

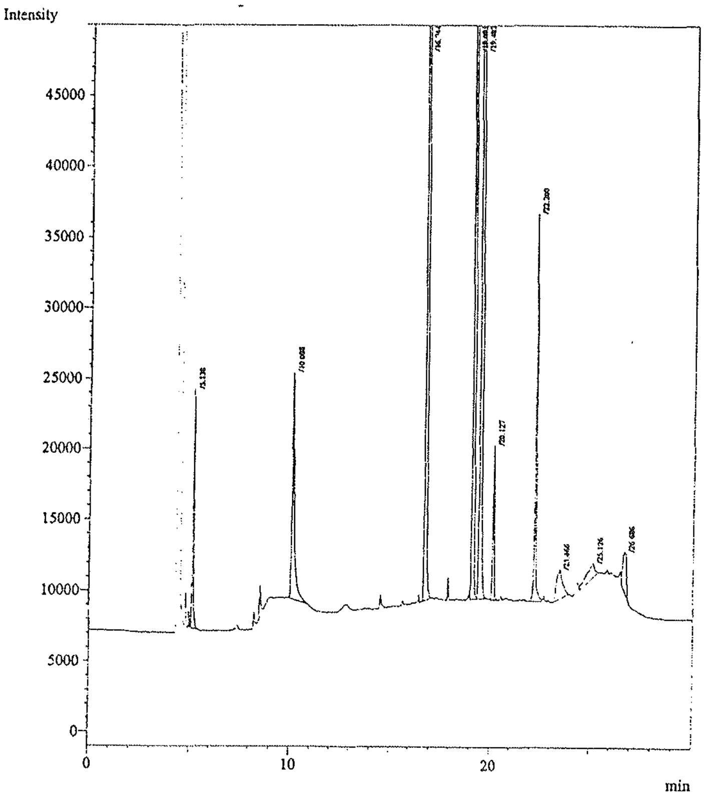
بعد استخلاص استرات مثيل الاحماض الدهنية ثم تحليها باستخدام جهاز الاستشراب الغازي ـ السائل الشعري Capillary GLC ياباني المنشأ SHIMADZU / 2010 مجهز من شركة Koyoto الى مركز التقييس والسيطرة النوعية التابع لوزارة التجارية والصناعة في القطر السوري . يحوي الجهاز عمود شعري زجاجي من نوع TR-WAX تبلغ ابعاده 30متر طولا و 0.32 ملم قطرا وبدرجة 240مْ ، بلغت درجة حرارة العمود الابتدائية 175مْ ورفعت تدريجيا الى حد اقصاه 240مْ بمعدل5 ْم لكل دقيقة .

بينما نظمت درجة حرارة الكاشف على 250مْ للحصول على اللهب باستخدام غازي الهيدروجين والهواء 40-400 مايكروليتر / دقيقة على التوالي . حقنت عينات الاحماض الدهنيه في الجهاز بواقع 1 مايكروليتر لكل نموذج وتم التعرف على الاحماض الدهنيه ونسبها بمقارنة زمن الاحتباس لها Retention time بأوقات ظهور الاحماض الدهنيه القياسية palmiticacid, 14:0 myristicacid, 12:0 Lauric acid, 10:0 Capric acid Linoleic acid, 18:1 Dleic acid, 18:0Stearicacid, 16:1 palmitolic acid,16:0 Eicosapentanoic acid, 20:4 Arachidonicacid, 18:3 acid Linolenic, 18:2 20:5 و22:6 Docosahexanoic acid . والتي حولت الى استرات ميثل الحامض الدهني كما جاء في الخطورة السابقة وحقنت بشكل مزيج للاحماض الدهنية القياسية .

النتائج والمناقشة

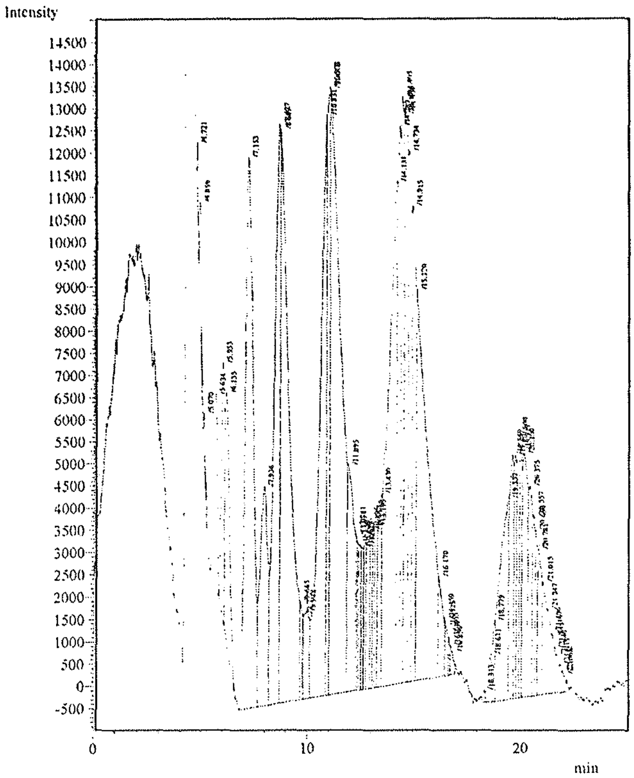
اظهرت نتائج تحليل الاحماض الدهنية لجرثومة *Listeria monocytogenes* باستخدام تقنية الاستشراب الغازي السائل GLC فصل عشرة انواع من الاحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة وبنسب متفاوتة عند مقارنة زمن الاحتباس للاحماض الدهنية في النموذج المختبر مع زمن الاحتباس للأحماض الدهنية القياسية المستخدمة بالأضافة الى الحصول على قراءات لزمن احتباس لأحماض دهنية أخرى لم يتم تحديد انواعها لعدم توفر الاحماض الدهنية القياسية ليتم مقارنتها بها .

اعتمد في قراءة النتائج على الاشكال (1) و(2) حيث يمثل الشكل (1) نتائج تحليل مزيج الاحماض الدهنية القياسية باستخدام جهاز GLC الشعري وزمن الاحتباس بالدقائق لكل حامض دهني قياسي .



(الشكل 1) تحليل مزيج الاحماض الدهنية القياسية بجهاز GLCالشعري

اما الشكل (2) فيوضح نتائج تحليل عينـــة الاحمـــاض الدهنيـــة لجرثومـــة *Listeria monocytogenes* المحقونة بجهاز الاستشراب الغازي السائل الشعري ، حيث تمثل كـــل قمة Peak من القمم المتداخلة في الشكل قراءة لحامض دهني تم تحديد نوع ذلك الحامض الدهني ونسبته في العينة الجرثومية من مقارنة زمن الاحتباس مع زمن الاحتباس للاحماض الدهنية القياسية المأخوذة من الشكل (1) .



شكل (2) تحليل عينة الاحماض الدهنية لجرثومة *L. monocytogenes* باستخدام جهاز GLC الشعري

ويوضح الجدول (1) انواع الاحماض الدهنية المتواجدة في جرثومة *Listeria monocytogenes* ونسبتها المئوية اعتمادا على نتائج الاشكال (1) و (2) .

جدول (1) انواع ونسب الاحماض الدهنية في جرثومة *Listeria monocytogenes*

نوع الحامض الدهني	الرمز	النسبة المئوية %
Capric acid	$C_{10}:_0$	0.393
Lauric acid	$C_{12}:_0$	0.116
Myristic acid	$C_{14}:_0$	13.408
Palmitic acid	$C_{16}:_0$	1.163
Palmitoleic acid	$C_{16}:_1$	0.498
Stearic acid	$C_{18}:_0$	3.019
Oleic acid	$C_{18}:_1$	2.254
Linoleic acid	$C_{18}:_2$	4.591
Linolenic acid	$C_{18}:_3$	0.193
Docosahexaenoic acid	$C_{22}:_6$	0.456

يتبين من الجدول (1) ان الحامض الدهني المشبع Myristic acid المتكون من اربعة عشر ذرة كاربون شكل اعلى نسبة تواجد في اغشية جرثومة *Listeria monocytogenes* بلغت (13.408%) اما الحامض الدهني المشبع Lauric acid المتكون في اثنتا عشر ذرة كاربون فكان متواجد بأقل نسبة بلغت (0.116%) وتفاوتت نسبة الاحماض الدهنية الاخرى المفصولة بين هاتين النسبتين .

لقد اتفقت نتائج دراستنا مع دراسة (15) في نسبة فصل عدد من الاحماض الدهنية لعزلة جرثومة *Listeria monocytogenes* سريرية منها الحامض الدهني Lauric acid البالغة 0.116% في دراستنا والمقاربة لنسبة فصله في دراستهم والمحصورة مابين 0.1-0.5 % باستخدام GLC كما بلغت نسبة فصل الاحماض الدهنية Oleic acid, Stearic acid . في دراستنا 3.019% و 2.254 % على التوالي مقاربة لنسبة فصلها في دراستهم والبالغة 5.0% و2.0% على التوالي . بينما اختلفت دراستنا عن دراستهم في نسبة فصل الحامض الدهني المشبع Myristic acid والبالغة 13.408% في حين كانت النسبة لديهم 3.0% والحامض الدهني المشبع Palmitic acid البالغة في دراستنا 1.163% مقارنة مع نسبة فصله لديهم والبالغة 18.0% . كما وكانت نتائج دراستنا مقاربة لدراسة (16) في نسبة فصل الاحماض الدهنية Lauric acid و palmitic acid و Palmitoleic acid والتي بلغت 0.116% و1.163% و 0.498% وفي دراستهم بلغت النسب 0.1% و2.7% و0.1% على التوالي .

كما واتفقت دراستنا مع دراسة (8) في نسبة فصل الحامض الدهني Palmitic acid والبالغة 0.9±0.1% في دارستهم على خلايا جرثومة *Listeria monocytogenes* (سلالة ابوية 10403S) مطفرة باستخدام جين قافز Tn917 وغير مطفرة . ولم يتم تحديد نسبة الاحماض الدهنية المستقيمة الاخرى في خلايا غير مطفرة للجرثومة بينما تمكنوا من تحديد نسبة الحامض الدهني Myristic acid المستقيم السلسلة في خلايا الجرثومة المطفرة باستخدام الجين القافز الذي حشر بين جينات الجرثومة المشفرة لمجموعة انزيمات Branched-chain Keto acid dehydrogenase (bKd) ويستحث هذا الجين القافز حساسية الجرثومة للبرودة ونقصان نسبة الاحماض الدهنية المتفرعة السلسلة الى اقل من 40% في خلاياها والتي تتواجد بنسبة عالية في الخلايا غير المطفرة تصل الى اعلى من 90% فضلا عن قلة سيولة الغشاء السايتوبلازمي لها ، حيث بلغت نسبة الحامض الدهني Myristic acid في هذه الخلايا 27.5% وهذه النسبة هي اعلى بكثير من نسبة هذا الحامض الدهني المستحصلة في دراستنا والبالغة 13.408% . في حين جاءت نسبة فصل هذا الحامض الدهني في دراستنا مطابقة لدراسة (17) حيث كانت نسبة فصل Myristic acid بتقنية GLC باستخدام عمود فصل شعري لاسترات مثيل الاحماض الدهنية في خلايا جرثومة

Listeria monocytogenes (Scott A) منماة بوجود مادة Tween 20 في درجة حرارة 30 °م (13%) اما نسبة فصل هذا الحامض الدهني في دراستهم لخلايا الجرثومة المنماة بدون وجود Tween20 وفي درجات حرارة 10و30مْ فقد بلغت 3.0 و 3.8% على التوالي .

في حين كانت نسبة فصل الاحماض الدهنية Stearic acid وOLeic acid وMyristic acid اقل مما توصلنا اليه في نتائجنا فقد بلغت النسب 1.0% و 0.5% و 0.4% في دراسة (16) مقارنة مع نتائج دراستنا البالغة 3.019% و 2.254% و 13.408% على التوالي .كما ولوحظ وجود احماض دهنية اخرى فصلت في دراستنا لكننا لم نتمكن من الحصول على دراسات مشابهة لمقارنتها بها فضلا عن الحصول على قراءات لم يتم تحديد انواع الاحماض الدهنية التي تمثلها لعدم توفرها والتي قد تعود للاحماض الدهنية المتفرعة السلسلة السائدة وبنسبة عالية تصل الى 90% او اكثر من نسبة الاحماض الدهنية المكونة لاغشية جرثومة *Listeria monocytogenes* . اشار (16) الى ان مكونات اغشية جرثومة *Listeria monocytogenes* من الاحماض الدهنية تظهر سيادة غير عادية للاحماض الدهنية متفرعة السلسلة تصل الى اعلى من 90% من المحتوى الكلي للاحماض الدهنية . وهذا ما اكده (8) في ان الاحماض الدهنية المتفرعة السلسلة BCFA تشكل اكثرمن 90% من نسبة الاحماض الدهنية المتواجدة في جرثومة *Listeria monocytogenes* . فيما ذكر (18) ان الاحماض الدهنية المتفرعة السلسلة وخاصة anteiso $C_{15:0}$ تلعب دور رئيسي في نمو جرثومة *Listeria monocytogenes* تحت درجات حرارة منخفضة وذلك بضمان الحفاظ على السيولة الكافية للغشاء .

وقد استنتج (19) ان الحامض الدهني متفرع السلسلة anteiso $C_{15:0}$ ذو اوطئ درجة انصهار بين بقية BCFAS وعندما تنخفض درجة حرارة النمو فان محتوى الغشاء من anteiso $C_{15:0}$ يرتفع ليحافظ على سيولة الغشاء .

المصادر

1-Purves W. K., Orians G. H., Heller H. C. and Sadava D. "Life : The Science of Biology".5th. Ed. Sinauer Associates. Salt Lake, U.S.A. (1998).

2- Habboush A. E., "Separation Methods in Chemical Chemistry Analysis". Mosul Univ. Press, Mosul, Iraq (1982). (In Arabic).

3- IMI Training Courses, The Principles of Fatty Acid Analysis. www.cyberlipid.org. (2005).

4- Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig F., Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M. and Tauxe R. V., Infect. Dis. 5: 607- 625 . (1999).

5- Bryan F. L. Food Safety Mag . 10:55-69 . (2004).

6- Weber M. H. W. and Marahie L. M. A. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci., 357: 895-907. (2002) .

7- Suutari M. and Laakso S. Crit. Rev. Microbiol. 20: 285- 328. (1994).

8-Zhu K., Bayales D. O., Xiong A., Jayaswal, R. K. and Wilkinson B. J., Microbiol., 151- 623. (2005).

9-Prescott L.M., Harely J.P. and Klein D.A., "Microbiology. 3rd Ed. Wm.C. Brown Communication, Inc., Iowa, U.S.A. (1996).

10-Al-Taee M.A. and Al-Rawi A.R., J. Rafidain J. Sci., 9: 27-39 (2006).

11- Fourche J., J. Chyom., 487:142 – 146. (1989).

12-ALKaisyM. T., Hadwan M. A., Humod M. and Hussen A. K. Iraqi . J. Microbiol., 3: 170- 174 . (1991) .

13- Morrison W. R. and Smith L. M. J. Lipid. Rev., 5: (1964) .

14-Chou S., Aldova E. and Kastiya S., J. Clin. Microbial., 29: 1072-1074. (1991) .

15-Hether N. W., Campbell P. A., Baker L. A. and Jackson L. L., Infec. Immun., 39: 1114-1121. (1983).

16-Annous B. A., Beckerr L. A., Bayles D. O., Labeda D. P. and Wilkinson B. J., Appl. Environ. microbial., 63:3887-3894 . (1997) .

17-Li J., Chikinds M. L., Ludescher R. D. and Montville T. J. Appl. Environ. Microbiol., 68: 5904-5910 . (2002) .

18-Zhu K., Ding X., Julotok M. and Wilkinson, B. J., Appl. Environ. Microbiol., 71 : 8002-8007 . (2005).

19- Nichols D. S., Persser K. A., Olley J. R., Ross T. and McMeekin T. A., Appl. Environ. microbiol. 68:2809-2813. (2002) .