

مقارنة بين السائل الجوفي والسائل المعوي لديدان الأرض في تثبيط نمو بعض الأنواع من البكتريا المرضية

نبراس فالح جيجان

كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية

الخلاصة

استهدف البحث دراسة تأثير السائل الجوفي Coelomic fluid والسائل المعوي Digestive fluid المستخلص من ديدان الأرض وبتراكيز 100%، 50%، 25% في تثبيط نمو عدد من البكتريا وهي *Salmonella typhimurium* و *Listeria monocytogenes* و *Brucella abortus* و *Staphylococcus aureus*. بينت النتائج بان تأثير السائل الجوفي في تثبيط نمو أنواع البكتريا المستخدمة في الدراسة كان أفضل من تأثير السائل المعوي في كافة التراكيز وخاصة في تركيز 100% حيث بلغ قطر دائرة التثبيط للسائل الجوفي لبكتريا *Salmonella typhimurium* 12 ملم وبلغ 10.66 ملم في حالة استخدام السائل المعوي وان قطر دائرة التثبيط للسائل الجوفي لبكتريا *Listeria monocytogenes* أعلى من قابلية التثبيط للسائل المعوي في تركيز 100% و 50% على التوالي ولكن تساوى القطر في تركيز 25% حيث بلغ 3.33 ملم، وسجل السائل الجوفي قابلية تثبيط أعلى لنمو بكتريا نوع *Brucella abortus* و *Staphylococcus aureus* مقارنة بالسائل المعوي وبنفس التراكيز المستخدمة في الدراسة، مما يشير إلى أهمية ديدان الأرض في المعالجات البايولوجية. الجوفي

Comparison between Coelomic fluid and Digestive fluid of earthworm to inhibit the growth of some pathogenic bacteria spp

N. F. Chechan

Collage of Science\ Al Mustansyriah University

Abstract

This paper was performed to study the effect of Coelomic fluid (C.F.) and Digestive fluid (D.F.) earthworm extract for inhibition the growth of some bacteria species which include *Salmonella typhimurium*– *Listeria monocytogenes*– *Brucella abortus* and *Staphylococcus aureus* at conc. of 25%- 50% and 100%.

Results showed that the effect of Coelomic fluid is batter than the effect of Digestive fluid especially in 100% that show the inhibition diameter zone of C.F. to *Salmonella typhimurium* was 12 mm and 10.66 mm when used the D.F. while diameter of inhibition zone of C. F. was higher than diameter inhibition zone of D. F. to *Listeria monocytogenes* in all concentration, but the diameter inhibition zone in 25% to both earthworm extract was equal and record 3.33 mm and after that the effect of C. F. again higher than effect of D. F. on growth of *Brucella abortus* and *Staphylococcus aureus* in 100% - 50% and 25%. Which indicate the important of earthworm in biotretment.

المقدمة

الأمراض المشتركة Zoonotic أو الانتقالية Transmittable كما يسميها البعض هي الأمراض التي تنتقل من الحيوانات سواء الحيوانات الحقلية المدجنة Domestic أو البرية Wild إلى الإنسان وبالعكس، وتشمل مجموعة من الأمراض الفايروسية والطفيلية والجرثومية وهذه الأخيرة تشمل أمراض عديدة أهمها السالمونيلا Salmonellosis والليستيريا Listeriosis والبروسيلات Brucellosis وغيرها من الجراثيم التي لها أهمية صحية خطيرة على الصحة العامة وتعد التربة المصدر الرئيس لتواجدها وانتشارها للبيئة والإنسان عبر الحيوان والنبات (1)، (2، 3).

تلعب ديدان الأرض دور مهم في البيئة التي تعيش فيها حيث تساعد حركة الديدان في تحريك جزيئات التربة وتهويتها والقنوات التي تكونها إلى دخول الماء والمبيدات للتربة بشكل أسرع مقارنة بالتربة غير الحاوية عليها (4). ديدان الأرض تحوي على سائل بين خلاياها يسمى السائل الجوفي والذي يمتلك القابلية على قتل الخلايا والتحلل الخلوي والتلازن الدموي (5) وأوضحت الدراسات عن السائل الجوفي بأنه يحوي على بروتين Lysenin (33KDa) حيث أن لهذا البروتين القدرة على تحليل جدران الخلايا من خلال اتحاده مع أحد الدهون الفسفورية وهو Sphingomyelin ثم يكون عدد من الثقوب في جدار الخلية قطر الواحد 3nm وهذا يؤدي إلى تمزق الجدار الخلوي وبالتالي تطرح جميع محتويات الخلية إلى الخارج وبدوره يؤدي إلى موت الخلية (6، 7، 8) يتكون السائل المعوي من محتويات القناة الهضمية إضافة إلى الأنزيمات التي تحويها والتي تعتبر بدورها كوسيلة دفاعية أخرى ضد الكائنات الممرضة، يهدف هذا البحث دراسة تأثير إفرازات ديدان الأرض (السائل الجوفي والسائل المعوي) وبتراكيز 25%، 50%، 100% في تثبيط نمو عدد من البكتريا وهي *Salmonella typhimurium* و *Listeria monocytogenes* و *Brucella abortus* و *Staphylococcus aureus*.

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على بكتريا *Salmonella typhimurium* التي عزلت وشخصت من قبل مختبرات الصحة المركزية/ وزارة الصحة، وأما الأنواع *Listeria monocytogenes* و *Brucella abortus* و *Staphylococcus aureus* تم الحصول عليها من مختبرات كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد.

- **جمع السائل الجوفي:** جمعت ديدان الأرض من بستان يقع في منطقة الزعفرانية/ جنوب محافظة بغداد، بعدها تؤخذ الديدان إلى المختبر فيتم غسلها بالماء المعمر لتنظيفها من الأوساخ العالقة على الجسم ثم توضع على ورقة ترشيح ليتم تجفيفها ثم يحرك الملقط على جسم الدودة من الأمام إلى الخلف وتعاد العملية عدة مرات ليتم التخلص من بقايا التراب الذي يوجد في القناة الهضمية للدودة ثم يتم غسل الدودة مره أخرى بالماء المعمر ثم توضع على ورقة ترشيح ليتم تجفيفها بعدها توضع في طبق بتري زجاجي معقم ويحرك فوق الدودة بيكر يحوي مكعبات من الثلج لتعرض الدودة للبرد الشديد وبهذا تقوم الدودة بإفراز السائل الجوفي من الثقوب الظهريّة للجسم ثم يتم جمعة في أنبوب معقم، جمع 2 مل من السائل الجوفي من 100 دودة تقريبا (2).

- **جمع السائل المعوي:** تم تنظيف الدودة بواسطة حركة الملقط من الأمام إلى الخلف بعد ان غسلت الديدان بالماء المعمر وجففت بورق الترشيح ثم توضع الديدان في طبق بتري يحوي 10% كحول اثيلي لمدة 10 دقائق تنقل بعدها إلى كحول اثيلي بتركيز 70% وتترك فيه لمدة 15 دقيقة بعدها يتم تشريح الدودة وتجمع القناة الهضمية جميعها من بداية الجسم وحتى النهاية، استخدم الهاون الخاص بالأنسجة tissue murtum مع

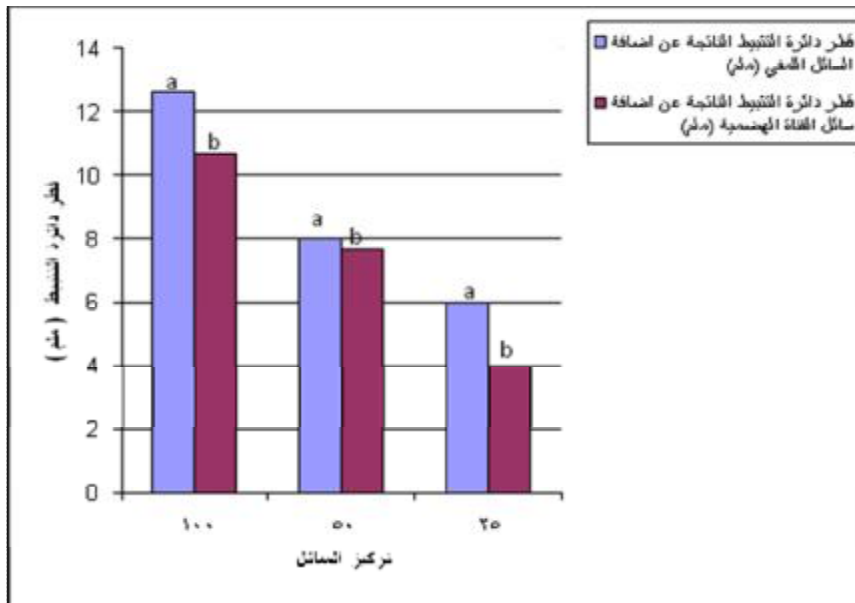
التبريد وضع الهاون في الثلج مجروش وجرى هرس الفتاة الهضمية مع إضافة حجم مماثل لها من Normal NaCl 0.85% saline وتم حفظ السائل بالتجميد لحين الاستخدام (3).

- اختبار الفعالية التثبيطية للسائل الجوفي والسائل المعي ضد البكتريا: استعملت طريقة الأقرأ ص الورقية المذكورة في (9) حيث استعملت أورا ق ترشيح مثقبة على شكل أقرأ ص دائرية بقطر 5 ملم ثم وضعت بعد تصميمها في أنابيب معقمة تحوي 0.5 مل من السائلين اللمفي والمعوي وبتراكيز مختلفة وهي 25 و 50 و 100% للحصول على أفضل تركيز لتثبيط نمو الأنواع البكتيرية المستخدمة في الدراسة، ثم تم وضع الأقرأ ص بواسطة ملقط معقم على طبق بتري مزروع بالجراثيم وعلى وسط Nutrient agar وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48 ساعة. بعدها تم حساب قطر منطقة التثبيط التي كونتها التراكيز المستخدمة في الدراسة.

- التحليل الإحصائي: جرى التحليل الإحصائي باستخدام جدول تحليل التباين ANOVA Table وعند مستوى 0.05% وتم مقارنة المعدلات باستخدام اختبار دنكن متعدد المديات (10).

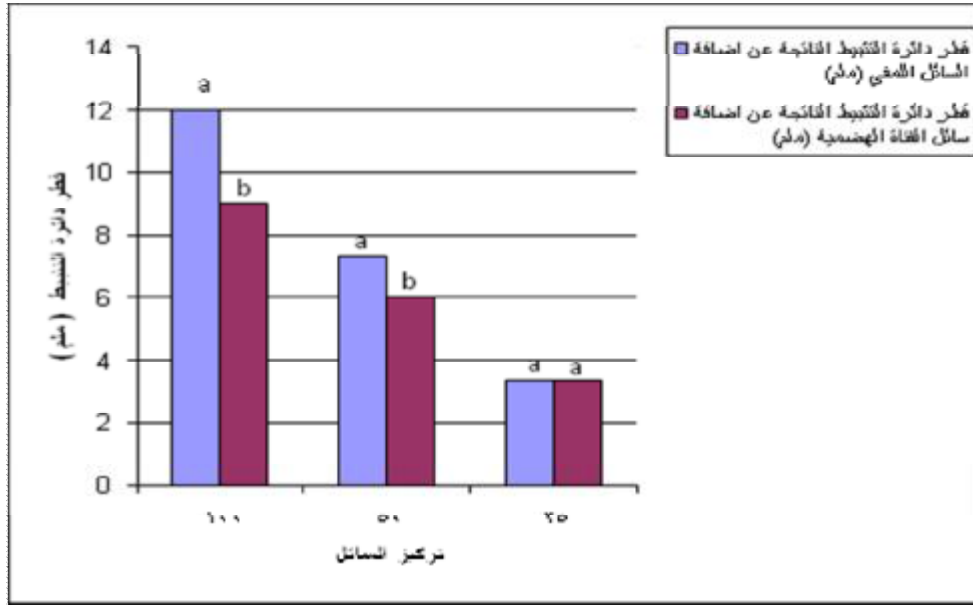
النتائج

يلاحظ وجود فروق معنوية عند مستوى ($P < 0.05$) حيث يشير الشكل (1) بأن قابلية التثبيط للسائل الجوفي عالية جدا تجاه بكتريا *Salmonella typhimurium* حيث بلغ قطر دائرة التثبيط 12 ملم في تركيز 100% مقارنة بالسائل المعي حيث بلغ قطر دائرة التثبيط 10.66 ملم في تركيز 100% ويلاحظ بأن قطر دائرة التثبيط متقاربة عند تركيز 50% حيث بلغت 8 ملم أثناء استخدام السائل الجوفي و 7.66 ملم في حالة استخدام السائل المعي ليعود وتزداد قابلية التثبيط للسائل الجوفي في تركيز 25% مقارنة بالسائل المعي.



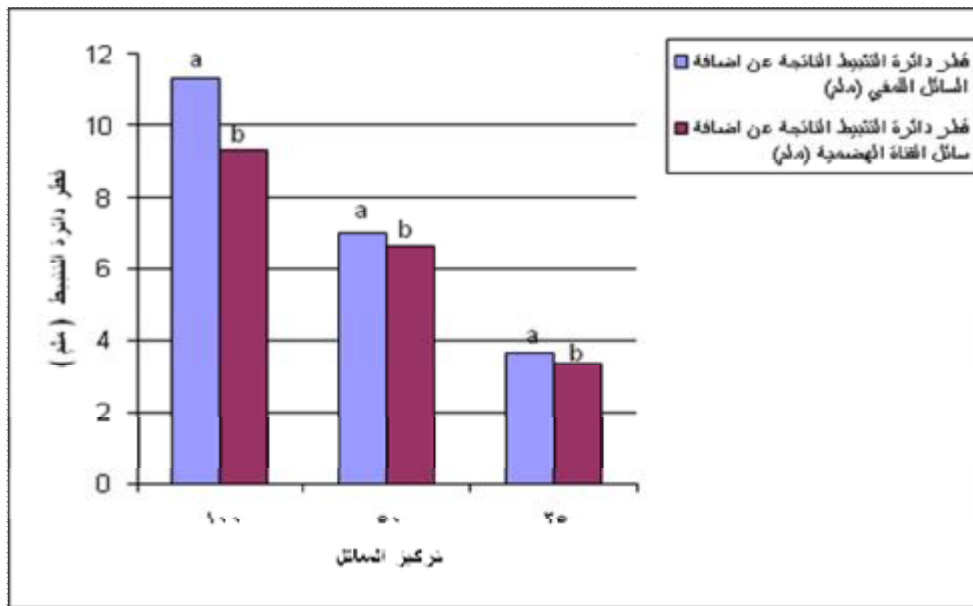
الشكل (1) يوضح قطر دائرة تثبيط نمو بكتريا *Salmonella typhimurium* الناتجة عن السائل الجوفي والسائل المعي

أما في الشكل (2) كانت فعالية التثبيط للسائل الجوفي لنمو بكتريا *Listeria monocytogenes* أعلى من قابلية التثبيط للسائل المعي في تركيز 100% و 50% على التوالي ولكن في تركيز 25% تساوى قطر دائرة التثبيط لكلا السائلين حيث بلغت 3.33 ملم.

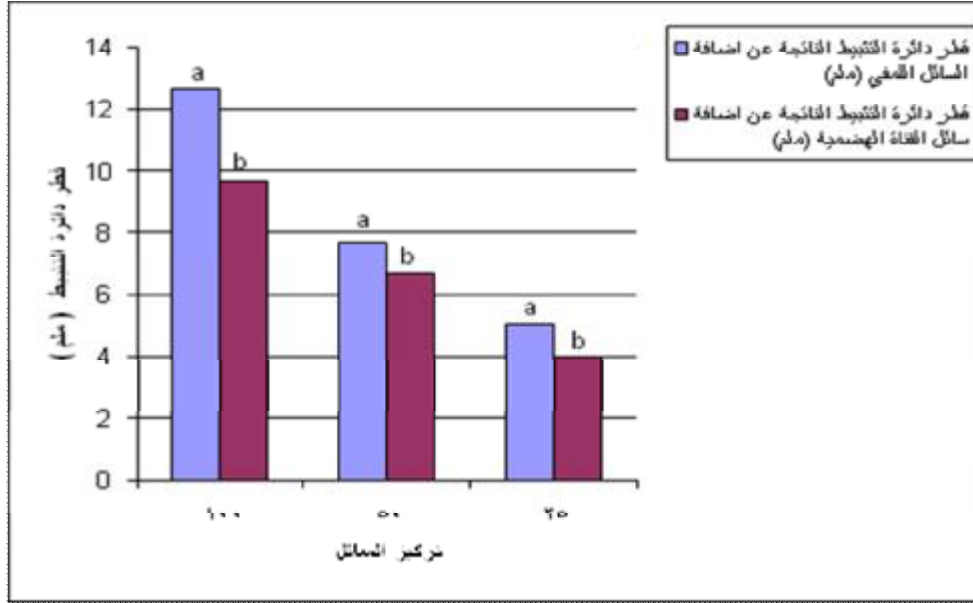


الشكل (2) يوضح قطر دائرة تثبيط نمو بكتريا *Listeria monocytogenes* الناتجة عن استخدام السائل الجوفي والسائل المعي

وكذلك في الشكلين (3، 4) سجل السائل الجوفي أعلى فعالية للتثبيط مقارنة بالسائل المعي تجاه بكتريا *Brucella abortus* و *Staphylococcus aureus* مع تقارب قطر دائرة التثبيط لكلا السائلين في تركيز 50% حيث بلغ لبكتريا *Brucella abortus* 11.33 ملم و 12.66 ملم لبكتريا *Staphylococcus aureus* مع تقارب دائرة التثبيط لكلا السائلين في تركيز 50% لبكتريا *Brucella abortus* حيث بلغت للسائل الجوفي 7 ملم أما للسائل المعي فبلغت 6.66 ملم وفي تركيز 25% بلغ قطر دائرة التثبيط للسائل الجوفي 3.66 ملم أما قطر دائرة التثبيط للسائل المعي 3.33 ملم ليعود السائل الجوفي مسجلا أعلى قابلية تثبيط تجاه بكتريا *Staphylococcus aureus* مقارنة بالسائل المعي في تركيز 50% و 25% على التوالي.



الشكل (3) يوضح قطر دائرة تثبيط نمو بكتريا *Brucella abortus* الناتجة عن استخدام السائل الجوفي والسائل المعي



الشكل (4) يوضح قطر دائرة تثبيط نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* الناتجة عن استخدام السائل

الجوفي والسائل المعوي المناقشة

تمتلك ديدان الأرض القدرة المناعية لمواجهة الأمراض التي تتعرض لها في البيئة التي تعيش فيها وتتمثل هذه القدرة المناعية بالسائل الجوفي Coelomic fluid حيث يحوي هذا السائل عدد من الأنزيمات التي تساعد في تثبيط نمو الكائنات المجهرية واهم هذه الأنزيمات هو إنزيم التحليل Lysenin 33KDa بينما السائل المعوي لم يلاحظ احتوائه على هذا الإنزيم (11). والدراسات قليلة جدا في هذا المجال حيث استخدم (12) السائل الجوفي وبتراكيز 25%، 50%، 100% على التوالي لتثبيط نمو عدد من البكتريا الممرضة وهي *Citrobacter freundii* - *K. - Klebsiella terrigena* - *B. cereus* - *Bacillus pumilus* - *Enterobacter cloacae* - *Serratia marcescens* و *Chryseomonas luteola - pneumophila* لاحظ ان السائل الجوفي ثبط البكتريا التي استخدمت في هذه الدراسة وانه كلما قل التركيز المستخدم للسائل الجوفي كلما قلت قابلية التثبيط للبكتيريا المستخدمة في الدراسة وتوافق هذا مع نتائج (13) حيث استخدم السائل الجوفي الذي جمع من ديدان الأرض نوع *E--- foetida* ولاحظ بان له القدرة على تثبيط بكتريا نوع *Bacillus megaterium*. وأشار كل من (14) بان إضافة السائل الجوفي إلى عدد من البكتريا الممرضة أد إلى موتها ومنها *Aremonas hydrophila* و *Versinia rukeri* و *Serratia marcescen*. وأوضح كل من (15، 16، 17) بان السائل الجوفي ثبط فعاليات عدد من البكتريا الممرضة ومنها *Aeromonas hydrophila* & *Bacillus megaterium* وأشار كل من (18) بان السائل الجوفي يثبط الخلايا العضلية للدجاج وخلايا الدم لخنازير غينيا وخلايا الدم للحشرات بينما لاحظ (19) ان حقن نوعين من الأسماك العظمية *Oreochromis mossabicus* & *Tanichthys albonubes* بالسائل الجوفي وبتراكيز 0.6% V/V أد إلى انحناء الصفائح الغلصمية وانتفاخ الخلايا الطلائية المبطنة للصفائح مع تحلل خلايا الدم الحمراء وهذا يحدث في غضون ساعتين من الحقن، والدراسات التي أجريت على السائل المعوي قليلة جدا حيث جمع (20) السائل المعوي من القناة الهضمية لديدان الأرض نوع *Aporrectodea caliginosa* بعد ان وضع بعض أفراد هذا النوع في تربة معقمة وعدد آخر وضعهم في تربة غير معقمة لاحظ بان السائل المعوي المأخوذ من المجموعتين ثبط قابلية نمو عدد من البكتريا وهي *Alcaligenes faecalis* و *Microbacterium sp.* و *Arthrobacter sp.* و *Pseudomonas reactans*. استنتج بان السائل المعوي يملك القابلية على قتل البكتريا وهذه القابلية آتية من جسم الدودة نفسها أي ان السائل المعوي لا يملك أي أنزيمات لها القدرة على التحليل كما في السائل الجوفي.

المصادر

1. Kobayashi, H.; Ohta, N. & Umeda, M. (2004). Biology of Lysenin, a protein in the coelomic fluid of earthworm *Eisenia foetida*, Int. Rev. Cytol., 236: 45-99.
2. Shobha, S. V. & Kale, R. D. (2008). In vitro Studies on Control of Soil- Borne Plant Pathogens by Earthworm *Eudrilus Eugeniae Exudates*.
3. Oleinik, A. S. & Byzov, B. A. (2008). Response of bacteria to earthworm surface excreta, Mikrobiologiia, 77(6): 854- 862.
4. Idowu, A. B.; Edema, M. O. & Adeyi, A. O. (2006). Distribution of bacteria and fungi in the earthworm *Libyodrilus violaceous* (Annelida: Oligochaeta) a native earthworm from Nigeria. Rev. Biol. Trop., 54(1): 49- 58.
5. Field, S. G.; Kurtz, J.; Cooper, E. L. & Michiels, N. K. (2004). Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms. J. of Invertebrate Pathol., 86: 45 – 49.
6. Lange, S.; Nubler, F.; Kauschke, E.; Lutsch, G.; Cooper, E. L. & Herrmann, A. (1997). Interaction of earthworm hemolysin with lipid membranes requires Sphingolipids. The J. of Biol. Chem., 272 (33): 20884-2089.
7. Lang, S.; Kauschke, E., Mohring, W. & Cooper, E. L. (1999). Biochemical characteristics of eiseniapore, a pore- forming protein in the coelomic fluid of earthworms, European J. of Biochem., 262: 547 – 556.
8. Cooper, E. L. & Roch, P. (2003). Earthworm immunity: a model of immune competence. Pedobiol., 47: 676 – 688.
9. Rios, J. L.; Recis, M. C. & Villar, A. (1988). Screening methods of Natural products with Antimicrobial activity: A review of the Literature. J. Ethopharmacol., 23: 127-149.
10. Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F test. Biometrics. 11:1-42.
11. Kauschke, E. (2007). Coelomic fluid proteins as Basic components of Innate Immunity in Earthworms. www. wormdigest.org/content/view/272/2-.
12. Elif, O. A. & Cotuk, A. (2008). Antibacterial and Hemolytic Activity of the Coelomic Fluid of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta, Lumbricidae) Living in different localities, IUFES J. Biol., 67(1):23 – 32.
13. Cotuk, A. & Dales, P. R. (1984). The effect of the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* sav. on certain bacteria and the role of the coelomocytes in internal defense. Comp. Biochem. Physiol., 78 (2): 271-275.
14. Dales, R. P. & Kalac, Y. (2003). Phagocytic defence by the earthworm *Eisenia foetida* against certain pathogenic bacteria. linkinghub. elsevier. com/ retrieve/pii/
15. Vlembois, P.; Philippe, R.; Lassegues, M. & Cassand, P. (1982). Antibacterial activity of hemolytic system from earthworm *Eisenia fetida Andrei*. J. of Invertebrate Pathol., 40: 21-27.
16. Pan, W.; Liu, X. & Zheng, T. (2003). Reconfirmation of antimicrobial activity in the coelomic fluid of earthworm *Eisenia fetida Andrei* by colorimetric assay. J. of Biosciences, 28(6):723-731.
17. Bakti, I. R.; Suri, F. D. & Agoes, A. (2003). The antibacterial potency of *Pontoscolex corethrurus* Fr mull earthworm extract on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* growth. The J. of Indonesian Medical Ass., 4: 444-454.
18. Kaushke, E. & Mohrig, W. (1987). Cytotoxic activity in the coelomic fluid of annelida *Eisenia fetida*. J. Comp physid. cal B., 157: 77- 83.
19. Ohta, N.; Aizu, M.; Kaneko, T.; Sato, T. & Kobayashi, H. (2003). Damage to the gills, skin and other tissues by lysenin and the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida Andrei* in two teleosts, *Tanichthys albonubes* and *Oreochromis mossambicus*.
20. Golyshin, P. N.; Kurakov, A. V.; Byzov, B. A. & Zviagintsev, D. G. (2008). Reaction of microorganisms to the digestive fluid of earthworms. Mikrobiologia, 76(1): 55-65.