دراسة تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لبكتريا *Cronobacter sakazakii*

الباحث / كاردينيا عامر إسماعيل
بأشراف : أ.م.د لمى عبد الهادي زوين
قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم/ جامعة بغداد ، بغداد ، العراق
gardinea1994@gmail.com
lumaabdalhadee@yahoo.com

الخلاصة

جاءت الدراسة الحالية للكشف عن تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral ، Curcumin ، Inulin ، Resveratrol ، Trans-cinnamaldhyde) في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm باستعمال طريقة الاطباق المعايرة Microtiter plate لبكتريا *Cronobacter sakazakii*.

تم الحصول على 17 عزلة لبكتريا *C. sakazakii* من مصادر سابقة مصدرها عزلات سريرية وعزلات الحليب ، بالاعتماد على الكشف المظهري والاختبارات الكيموحيوية وتم تأكيد التشخيص بأستعمال البادئ الفرعي للجين 16S rRNA .

وقد أظهرت المركبات ذات المصادر الطبيعية(Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol ، Trans-cinnamldhyde) بأستعمال التركيز (50،100) مايكروغرام/ مللتر فعالية في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي اعتماداً على مصدر العزلة وتركيز المركب .

الكلمات المفتاحية : *Cronobacter sakazakii*، Biofilm ، Citral ، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamldhyde

1ـ المقدمة

عرفت بكتريا *Cronobacter sakazakii* بأنها بكتريا سالبة لصبغة كرام، اختيارية لاهوائية (Singh *et al.*, 2015) ، يمكن عزلها من مواد متنوعة مثل الخضروات، السلطات، اللحوم، الأجبان والحليب (Beuchat *et al.*, 2009) . كما تم عزلها من الجلد، الفم والوجه (Holy and Forsythe, 2014) .

ان بكتريا *C. sakazakii* تصيب الأطفال الرضع الذين تقل أعمارهم عن الشهرين الذين يعتمدون في تغذيتهم على الحليب المجفف(Parra-Flores *et al.*, 2015). كما يمكن ان تصيب الأطفال الرضع بالتهاب السحايا Meningitis والالتهاب المعوي القولوني الناخر Necrotizing enterocolitis (NEC)، وتصيب البالغين بالتهاب رئوي، تسمم الدم، التهاب نقي العظم وخراجات الطحال (Mashoufi *et al.*, 2017).

ان بكتريا *C.sakazakii* لها القدرة على مقاومة العديد من الظروف البيئية من درجة الحرارة ، الرقم الهيدروجيني، الضغط الازموزي والجفاف (Amalardjou and Venkitanarayanan., 2011b). تمتلك بكتريا *C. sakazakii* عدداً من عوامل الضراوة تمكنها من الغزو والالتصاق واصابة خلايا المضيف (Singh *et al.*, 2015). ومنها بروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane protiens (OMPs) (Kim *et al.*, 2010a)، الذيفان الداخلي Endotoxin

(Pagotto *et al.*, 2003) ، تكوين طبقة السكريات المتعددة الدهنية Lipopoly saccharide (LPS) (Townsend *et al.*, 2007)، وتكوين المحفظة Capsule (Ogrodzki and forsythe., 2015) كما لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm على سطح اللاتكس وانابيب التغذية المعوية الذي يزيد من مقاومة البكتريا للمؤثرات البيئية (Beuchat *et al.*,2009). تمتلك بكتريا *C. sakazakii* القدرة على انتاج انزيمات البروتيزProteases التي تسمح للكائن من عبور الحواجز الضيقة للدماغ وتدمير عدد من الخلايا الأمعاء في الأطفال الرضع مع احداث الالتهاب المعوي القولوني الناخر (Chenu and Cox , 2009).

لوحظ ان استعمال عدد من المضادات المايكروبية المستخلصة من بعض النباتات والزيوت الاساسية له تأثير فعال في العديد من أنواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ، فضلاً عن تأثيرها في بكتريا *C. sakazakii* (Frankova *et al.*, 2014). وهذا ماتم رصده من قبل منظمة الغذاء و الدواء الامريكية(United States Food and Drug Administration (FDA فمثلاً مركبات مستخلص القرفة Trans- cinnamaldhyde الذي بالرغم من دوره الفعال في تثبيط البكتريا الا انه يعد من المركبات الامنة (Adams *et al.*, 2004). وأشار Shi *et al.* (2017) بان مستخلص الليمون Citral له تأثير كبير ومهم في تثبيط العديد من عوامل الضراوة لبكتريا *C. sakazakii* منها حركة البكتريا واشارات ادراك النصاب Quorum sensing (QS) وتكوين الغشاء الحيوي وانتاج الذيفان الداخلي Endotoxine .

اما Paulo وجماعته (2001) و Qin وجماعته (2014) و Subramaniana وجماعته (2014) فقد اشاروا الى ان زيادة مقاومة المايكروبات لعدد من المضادات الحيوية شجع على استعمال عدد من المركبات النشطة ضدها ومنها مركب Resveratrol المستخلص من الخضروات والعنب و الذي له دور في منع نشوء العديد من الامراض وهو مضاد لعدد من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

اما مركب Inulin فله أهمية غذائية كبيرة اذ يعمل كالياف تسهل وتحسن عملية الهضم وتعزيز امتصاص الكالسيوم والمغنيسيوم كما يشارك في ايض الدهون ويقلل من خطر الإصابة بامراض السرطان (RoberFroid , 2007). كما له تأثير في نظام التكوين المايكروبي للام الحامل وطفلها اذ يوفر الانيولين الطاقة للطفل والام (Zhou *et al.*, 2017) .كما لوحظ تأثير الانيولين في الطبقة الظهارية للامعاء ومنع المايكروبات من عبور الحاجز المعوي من خلال تعزيز منع الحواجز من دخول المايكروب (Wu *et al.*, 2017). اما مركب Curcumin فقد اشارت دراسة Tyagi وجماعته(2015) الى تأثيره في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام فضلاً عن احداثه اضرار في الغشاء البكتيري.

2ـ المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص بكتريا *C. sakazakii*

جمعت 17 عزلة من دراسة سابقة مصدرها عزلات الحليب وعزلات سريرية وانها تعود لبكتريا *C. sakazakii* وتضمنت العزلات السريرية (6 من الدم، 6 من سائل النخاع الشوكي) وعزلات الحليب (3 من عينات حليب Dialac ، 1 من عينات الحليب Novolac Allernova، 1من عينات الحليب Novolac AD) ، زرعت جميع العزلات على وسط الماكونكي ووسط التربتون صويا الصلب Trypton Soy Agar (TSA) ثم حضنت الأوساط الزرعية بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ، وذلك لاعادة تشخيصها والتأكد من العزلات النهائية النقية (Pure culture).

الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test

تم اجراء الاختبارات الكيموحيوية التالية :

اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test، اختبار تخمر السكريات وإنتاج غاز ثنائي أوكسيد الكاربون وغاز كبريتيد الهيدروجين على وسط Kliglar Iron Agar ، اختبار انتاج انزيم اليوريز Urease test

التشخيص بأستخدام الجين 16S rRNA

تم استخلاص الدنا DNA باستخدام عدة الاستخلاص المحضرة من قبل شركة Promega اذ اختبرت وبأستعمالPCR في التشخيص بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل *C. sakazakii* 17 عزلة تعود لبكتريا 16S rRNA بأستعمال البادئ لامامي ACAGGGAGCCAGCTTGCTGC بادئ الجين الفرعي اذ يتكون الحجم الكلي لمزيج تفاعل البلمرة المتسلسل والعكسي من 20 مايكروليتر كما في الجدول (1) ، بعد TGCTGCGGTTATTAACCAC تحضير مزيج التفاعل تم ضبط الظروف المثلى لتفاعل البلمرة

كما في الجدول (2)Thermal Cycler للعزلات البكتيرية بوساطة جهاز DNA اذ ضخم الدنا وحسب ماجاء في (Hassan *et al.*, 2007)

جدول(1) محتويات مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل

محتويات مزيج التفاعل	الحجم بالمايكروليتر
Saka-aالبادئ الامامي لجين	**1**
Saka-2aالبادئ العكسي لجين	**1**
DNA template	**3**
Go Taq Green Master Mix 2x	**10**
Nuclease –free water	**5**
الحجم الكلي	**20**

جدول(2) الظروف المثلى للكشف عن جين16S rRNA لتشخيص بكتريا *Cronobacter sakazakii*

مراحل PCR	درجة الحرارة	عدد الدورات	الوقت
1-مرحلة مسخ الدنا الاولي Initial denaturation	95 م°	دورة واحدة	**5 دقائق**
2- مرحلة مسخ الدنا Denaturation	95 م°	30 دورة	**30 ثانية**
3- مرحلة الالتحام Annealing	52 م°		**30 ثانية**
4- الاستطالةExtension	72 م°		**30 ثانية**
5- مرحلة الاستطالة النهائيةFinal Extension	72 م°	دورة واحدة	**7 دقائق**
6- مرحلة السيطرةHold	4م°	-	**مستمرة**

تم الترحيل الكهربائي لناتج تضاعف البلمرة المتسلسل PCR على سطح الاكاروز بتركيز 1% وبأستعمال 1 مايكروليتر من صبغة الايثاديوم لمدة 70 دقيقة وبفرق جهد 100 فولت ، ثم فحص هلام الاكاروز بأستخدام UV- Trasuilluminator .

اختبر تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية(Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol ، Trans-cinnamldhyde) في تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *C. sakazakii*

للكشف عن تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol ، Trans-cinnamldhyde) على معدل تكون الغشاء الحيوي تم استعمال طريقة الصفيحة العيارية ، اذ تم إضافة تركيزين (50،100)مايكروغرام/مللتر من المركبات كل على حدا الى وسط الترتون صويا السائل بحجم 200 مايكروليتر الملقح بعزلات بكتريا *C. sakazakii* (A1b، B4، CSF4) المنتخبة بأجراء تجارب أولية ثم اتبعت الطريقة ذكرها (Choi *et al.*, 2015).

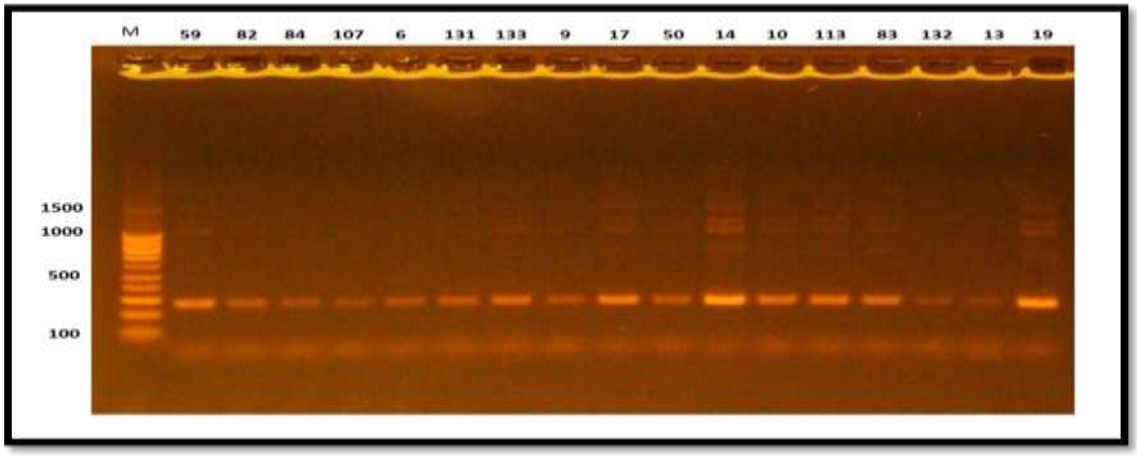
3ـ النتائج والمناقشة

اعتماداً على الخصائص المزرعية على وسط الماكونكي ووسط التربتون صويا الصلب تبين ان 17 عزلة لبكتريا *C. sakazakii* قد أظهرت بمستعمرات وردية دلالة على انها مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط الماكونكي وبمستعمرات صفراء على وسط التربتون صويا الصلب ، كما بينت نتائج الاختبارات الكيموحيوية ان جميع عزلات بكتريا *C. sakazakii* أعطت نتيجة متغايرة لاختبار استهلاك السترات ، كما كانت موجبة لتخمر الكلكوز واللاكتوز وغير منتجة لغاز H_2S ومنتجة لغاز CO_2 على وسطKligler Iron Agar كما كانت سالبة لاختبار انزيم اليوريز ((Fakruddin *et al* .,2014 ; Bailey and Scotts., 2007) .

كما أشار Al-joubori (2016) ان جميع العزلات أعطت فحصاً سالباً لاختبار الاندول واختبار الاوكسيديز ، فيما أعطت فحصاً موجباً لاختبار الكتاليز وفحصاً موجباً للحامض الاميني Ariginine و Ornithine مما يدل على انتاجها لانزيم Ornithine decarboxylase و Ariginine decarboxylase على التوالي ، وفحصاً سالباً لحامض Lysine مما يدل على انتاجها لانزيم Lysine decarboxylase وأظهرت جميع العزلات قدرتها على تخمر السكريات Raffinose وD- Melibios و Rhamnose وتكون اللون الأصفر دلالة على قدرتها على انتاج الحامض من السكر.

التشخيص الجزيئي Molecular Identification

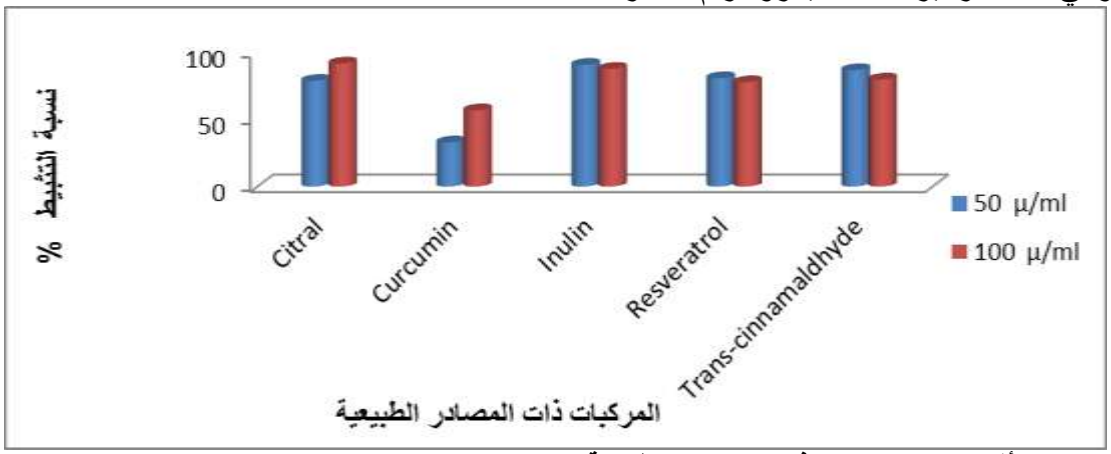
شخصت جميع عزلات C.sakazakii السريرية(12 عزلة) و العزلات المعزولة من الحليب (5 بكتريا
عزلات) بأستعمال البادئ الفرعي 16S rRNA للكشف عن جين 16S rRNA في جينوم البكتريا للجين
لتأكيد تشخيصها بتقنية تفاعل البلمرة (PCR) ،وباستعمال جهاز التدوير الحراري Thermal Cycler المتسلسل
اذ أظهرت النتائج ان كل العزلات تعود للنوع C.sakazakii لامتلاكها الجين 16S rRNA
ذو الوزن الجزيئي (406) زوج قاعدة كما في الشكل (1)



شكل (1)الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين 16S rRNA لعزلات بكتريا *C. sakazakii* بفرق جهد (100) فولت لمدة 70 دقيقة و 1% Agarose المسار M يمثل الدنا القياسي(100-1500) زوج قاعدة والمسار (107 ،133،131، 10، 113، 19) تمثل عزلات الدم والمسار (59، 82، 84،50، 83، 132) تمثل عزلات سائل النخاع الشوكي والمسار (6، 9، 17، 14، 13) تمثل عزلات الحليب

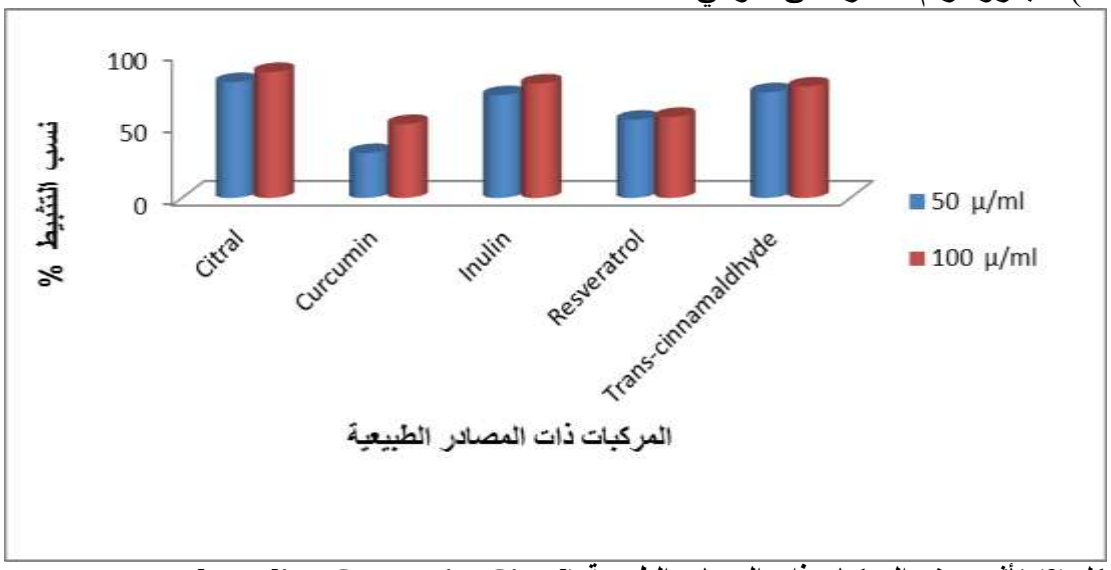
تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لبكتريا *Cronobacter sakazakii*.

نميت العزلات البكتيرية في وسط زرعي سائل، وبوجود تراكيز مختلفة من المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin،Inulin،Resveratrol، Trans-cinnamaldhyde) اذ أظهرت النتائج تأثيراً واضحاً في تثبيط قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي. وقد بين الشكل (2) التاثير المنخفض لمركب Curcumin في تكوين الغشاء الحيوي في العزلة A1b فقد لوحظ ان نسب التثبيط كانت (33،57)% عند التركيز (50،100) مايكروغرام/ مللتر على التوالي، اما نسب التثبيط لمركبات (Citral،Inulin،Resveratrol،Trans-cinnamaldhyde) كانت (79، 91، 81، 87)% على التوالي عند التركيز 50 مايكروغرام/ مللتر وكانت (92، 88، 78، 80)% على التوالي عند التركيز 100 مايكروغرام/ مللتر.



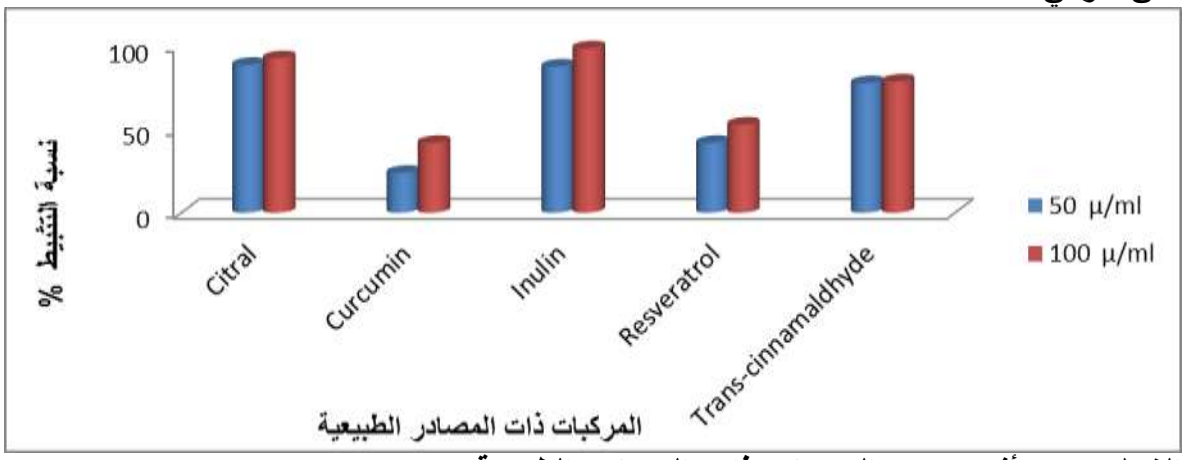
الشكل (2) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Resveratrol ، Inulin, Curcumin, Citral, Trans-cinnamaldhyde)في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلة بكتريا *C.sakazakii* (A1b).

اما الشكل (3) فبين ان نسبة تثبيط تكوين الغشاء الحيوي في العزلة B4 ليست مرتفعة في كل من المركب (Trans-cinnamaldhyde،Inulin،Citral) بمقدار (80، 71، 73)% للتركيز 50 مايكروغرام/ مللتر وبمقدار (87، 77،79)% للتركيز 100 مايكروغرام/ مللتر، وكانت نسبة تثبيط المركب Curcumin بمقدار (31،51)% وResveratrol (54، 56)% عند التركيز (50، 100) مايكروغرام/ مللتر على التوالي.



الشكل (3) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Resveratrol ,Inulin, Curcumin, Citral (Trans-cinnamaldhyde, في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلة بكتريا (B4) *C.sakazakii*.

كما بين الشكل (4) ان نسب التثبيط للمركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans- cinnamaldhde) في تكوين الغشاء الحيوي للعزلة CSF4 كانت (89، 24، 88، 42، 78)% و (93، 42، 99، 53، 79)% عند التركيز (50 ،100) مايكروغرام/ مللتر على التوالي.



الشكل (4) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral (Trans-cinnamaldhyde, Resveratrol, في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلة بكتريا (CSF4) *C.sakazakii*.

أشار Morohoshi *et al.* (2007) الى ان مركب Citral له تاثير كبير في تخليق المركبات التي تشترك مع تكوين السكريات المتعددة الخارجية التي تغير من تركيب الغشاء الحيوي مما تجعله اكثر حساسية فضلاً عن تأثيره في تثبيط تكوين إشارات استشعار النصاب (QS) ومنع تكوين مادة N-acyl-homoserine lactones (AHLs) والجينات التي تشترك في تكوين AHLs. في حين أشار Shi *et al.* (2017) ان مركب Citral يعمل على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي عن طريق تثبيط بروتين Lux R الذي يشترك في انتاج AHLS فضلاً عن تداخله مع الارتباطات التي تحدث بين خلية وخلية أخرى اثناء تكوين الغشاء الحيوي.

أظهرت دراسة Shi *et al.* (2017) تأثير مركب Citral في تكوين الغشاء الحيوي، اذ بلغت نسبة التثبيط (67.1، 69.5، 70.1)% عند التركيز 225 مايكرومولار عند درجة حرارة 25 ºم للمدة (24، 48، 72) ساعة على التوالي، مشيراً الى ان مركب Citral يعد مضاداً قوياً لتكوين الغشاء الحيوي Antibiofilm في درجات الحرارة الواطئة، وهذا يعود الى انخفاض عمليات الايض ونمو بكتريا *C.sakazakii* عند درجات الحرارة المنخفضة فضلاً عن تكوين الغشاء الحيوي بدرجة ضعيفة يكون اكثر حساسية لمركب Citral.

اما تأثير مركب Curcumin فقد أشار Singh *et al.* (2017) الى فعالية مركب Curcumin في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ، مشيراً الى ان نسبة التثبيط تعتمد على تركيز المثبط. اما مركب Resveratrol فقد أشار Ma *et al.* (2018) الى فعالية مركب Resveratrol في تثبيط تكوين وتشكيل الغشاء الحيوي من قبل البكتريا المسببة لتلف الأغذية، مشيراً الى ان ذلك يعود الى قدرته على التداخل مع إشارات استشعار النصاب (QS) مما تؤثر في تخليق البروتينات السطحية والسكريات المتعددة المكونة للمحفظة لاسيما جينات *cap*5ABCFG مما يؤثر في تكوين الغشاء الحيوي.

أشار Amalardjou and Venkitanaryana (2011a) الى ان مركب Trans-cinnamaldhde يؤثر في العديد من الجينات التي تشترك في تكوين الغشاء الحيوي ومن ضمنها *flg*J ، اذ ان مركب Trans-cinnamaldhyde له دور في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من خلال تثبيط تكوين السكريات المتعددة، وتكوين الاسواط والاتصال مابين خلايا وخلايا أخرى فضلاً عن تأثيره في التعبير عن العديد من الجينات التي لها علاقة بأشارات QS. اما Amalardjou *et al.* (2014) فقد أشار الى ان مركب Trans-cinnamaldhyde يؤثر في العديد من عوامل الضراوة ومنها جينات الحركة *flh*D، *fli*D، *flg*J ، مشيراً الى ان ذلك يعتمد على التراكيز المستعملة فالتراكيز العالية تكون اكثر تأثيراً من التراكيز المنخفضة. اما Amalaradjon and Venkitanarayanan (2011a) فقد أشار الى تأثير مركب Trans- cinnamaldhyde في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي عند درجة الحرارة 24ºم مقارنةً بدرجة الحرارة 12 ºم باستعمال التركيز 750 مايكرومولار، ويعود ذلك الى انخفاض تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde (TC) بدرجة حرارة 12 الى انخفاض معدل نمو بكتريا *C. sakazakii* عند درجات الحرارة المنخفضة فضلاً عن انخفاض عمليات الايض مقارنةً مع درجة حرارة 24 ºم كما ان انخفاض تكوين الغشاء الحيوي عند استعمال مركب Trans-cinnamaldhyde يعود ايضاً الى خفض التعبير الجيني لكل من الجينات (*lux* R gene, *bcs*A, *bcs*G, *fli* D, *flh*D,*flg*J, *mot*A, *mot*B) التي تؤدي دوراً في تكوين الغشاء الحيوي.

يلاحظ من نتائج الدراسة الحالية اختلاف نسبة التثبيط في تكوين الغشاء الحيوي لعزلات بكتريا *C. sakazakii* باختلاف نوع العزلة والتركيز المستعمل فضلاً عن نوع المركب المثبط وهذا

ماشار اليه Lebeaux *et al* .(2014) ان تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من قبل المضادات الحيوية، يعتمد على صنف المضاد الحيوي ومقدار انتشاره في الوسط وميكانيكية التعبير الجيني لتكوين الغشاء الحيوي من قبل البكتريا فضلاً عن مقدار تماسك البكتريا المكونة للغشاء الحيوي او مقدار تأثير المركبات على نمو البكتريا خلال الساعات الأولى من تكوين الغشاء الحيوي وايضاً عن مقاومة الغشاء الحيوي لبعض المركبات. كما لم يلاحظ وجود فروقات في نسبة التثبيط بين التركيزين 50 و 100 مايكروغرام/ مللتر.

4ـ المصادر

1. Al-joubori , T.A.M. (2016). Detection of some virulence factors genes of *Cronobacter sakazakii* isolated from infant milk powder and clinical samples . M.Sc. thesis .Collage of Education fore pure science (Ibn Al-Haitham) . University of Baghdad . 92 pp .

2. -Singh, N.; Goel1 , G. and Raghav, M. (2015). Prevalence and Characterization of *Cronobacter spp*. from Various Foods, Medicinal Plants, and Environmental Samples. SSBM .DOI 10.1007/s00284-015-0816-8.

3. -Beuchat , L.; Kim , H.; Gurtler , J .; Lin , L.; Ryu , J. and . Richards, G. (2009). *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth,

4. and inactivation. Int J Food Microbiol. 136 : 204–213

5. -Holy, O. and Forsythe , S. (2014). Cronobacter spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. J Hosp Infect. 86 : 169-177

6. -Parra-Flores, J., Rodriguez, A., Riffo, F., Arvizu-Medrano, S.M., Arias-Rios, E.V. and Aguirre, J., (2015). Investigation on the factors affecting Cronobacter sakazakii contamination levels in reconstituted powdered infant formula. Frontiers in pediatrics, 3, p.72.

7. -Mashoufi,A.; Hashemi,M.; Ghazvini, K.; Mobarhan,M.G. and Afshari, A .(2017) . *Cronobacter sakazakii,* a New Threat: Characteristic, Molecular Epidemiology and Virulence Factors. .ARRB. 21(5): 1-21

8. -Amalaradjou, M. A. R. & Venkitanarayanan, K. (2011a). Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. J Food Protect 74: 200–208

9. -Amalardjou ,M.A.R. and Venkitanarayanan, K.(2011b). Effect of Trance-cinnamaldhyde on reducing Resistance to environment stresses in *Cronobacter sakazakii* . Food born pathogens and Disease .8(3): 403-409

10.-Pagotto, F. ; Nazaroec-White,M.; Bidawid,S. and Farber , J.M. (2003). *Enterobacter sakazakii* :Infectivity and Enterotoxin Production InVitro and In Vivo.J Food Prot .66(3)370– 375.

11.-Townsend, S.; Barron,J.C. ; Loc-Carrillo,C. and Forsythe, S. (2007). The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of

endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat . Food Microbiol. 24 : 67–74

12.-Iversen , C. and S. Forsyth, S. (2003). Risk profile of *Enterobactersakazakii*, anemergent pathogen associated with infant milk formula . Trends Food Sci Technol. 14 : 443–454

13.-Fraňková, A., Marounek, M., Mozrová, V., Weber, J., Klouček, P. and Lukešová, D.,(2014.) Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. Foodborne pathogens and disease, 11(10), pp.795-797.

14.-Adams,T.B.; Cohen, S.M.; Doull, J. ; Feron, V.J .; Goodman,J.I.; Marnett, L. J.; Munro, I.C .; Portoghese , P. C. ; Smith, R.L. ;Waddell, W. J. and Wagner, B. M. (2004) . The FEMA GRAS assessment of cinnamyl derivatives used asflavor ingredients. Food Chem Toxicol. 42 : 157-185.

15.-Paulo, L. ;Oleastro, M. ; Gallardo, E. ;Queiroz1 , J. A. and Domingues, F. (2001). Antimicrobial properties of resveratrol: a review. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. Méndez-Vilas (Ed.).1225-1235.

16.-Qin, N., Tan, X., Jiao, Y., Liu, L., Zhao, W., Yang, S., & Jia, A. (2014). RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. Scientific reports, 4, 5467.

17.-Subramaniana, M.; Goswamib,M. ; Chakrabortya,S. and Jawalib, N. (2014). Resveratrol induced inhibition of Escherichia coli proceeds via membrane oxidation and independent of diffusible reactive oxygen species generation . Redox Biol. 2: 2213-2317

18.-Roberfroid, M.B. (2007). Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients1. J. Nutr. 137: 2493S–2502S

19.-Wu, R. Y., Abdullah, M., Määttänen, P., Pilar, A. V. C., Scruten, E., Johnson-Henry, K. C., ... & Sherman, P. M. (2017). Protein kinase C δ signaling is required for dietary prebiotic-induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. Scientific reports, 7, 40820.

20.-Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A., & Mukhopadhyay, K. (2015). Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. Plos one, 10(3), e0121313.

21.-Zhou, P., Zhao, Y., Zhang, P., Li, Y., Gui, T., Wang, J., ... & Xu, S. (2017). Microbial mechanistic insight into the role of inulin in improving

maternal health in a pregnant sow model. Frontiers in microbiology, *8*, 2242..

22.-Shi, C., Sun, Y., Liu, Z., Guo, D., Sun, H., Sun, Z., ... & Xia, X. (2017). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* virulence factors by citral. Scientific reports, 7, 43243.

23.-Hassan, A. A. O.; Akineden, C.; Kress, S. ; Estuningsih, E. ; Schneider, and E. Usleber. 2007. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. Int. J. Food Microbiol. 116: 214-220.

24.Forbes , B. A. ; Saham , D. F. and Weissfeld , A. S (2007) . Baily and Scott's Diagnostic Microbiology .12th ed. , Mosby, Inc. , an anffilliate of Elsevier, Inc. 957 pp.

25.-Fakruddin, M., Rahaman, M., Ahmed, M. M., & Hoque, M. M. (2014). Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. Biological research, 47(1), 63.

26.-Amalaradjou, M. A., Kim, K., & Venkitanarayanan, K. (2014). Sub-inhibitory concentrations of trans-cinnamaldehyde attenuate virulence in *Cronobacter sakazakii* in vitro. International journal of molecular sciences, 15(5), 8639-8655.

27.-Choi,H.; Kim,S.; Hwang,H.; Kim,K.; Kang,D.and Ryua,S.(2015). Plasmid-Encoded MCP Is Involved in Virulence, Motility, and Biofilm Formation of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544.Jornals ASM.org.83(1):197-204.

28.-Morohoshi,T.; Kato,M.; Fukamachi ,K.; Kato, N. and Ikeda, T.(2007). N –Acylhomoserine lactone regulates violacein productionin Chromobacterium *violaceum typestrain*ATCC12472 . FEMS Microbiol Lett 279 (2008) 124–130.

29.-Ma, D. S., Tan, L. T. H., Chan, K. G., Yap, W. H., Pusparajah, P., Chuah, L. H., ... & Goh, B. H. (2018). Resveratrol—potential antibacterial agent against foodborne pathogens. Frontiers in pharmacology, 9, 102.

30.-Lebeaux,D.; Ghigo,J. and Beloin , C. (2014) . Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics . MMBR. 78(3): 510-543 .

31.-Kim, K., Kim, K. P., Choi, J., Lim, J. A., Lee, J., Hwang, S., & Ryu, S. (2010). Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol., 76(15), 5188-5198.

32.-Singh, A. K.; Prakash, P.; Singh, R.; Nandy , N.; Zeba Firdaus, Z.'.
33.Bansal, M.; Singh,R.K.; Srivastava, A.; K. Roy ,J.; Mishra, B. and Rakesh K. Singh, R.K.(2017). Curcumin Quantum Dots MediatedDegradation of Bacterial Biofilms . Front. Microbiol. 8:1517. doi: 10.3389/fmicb.2017.01517
34.-Chenu, J. W. and Cox, J.M.(2009). Cronobacter ('*Enterobacter sakazakii'*): current status and future prospects . Lett Appl Microbiol .49 : 153–159
35.Ogrodzki, P. and Forsythe, S. (2015). Capsular profiling of the Cronobacter genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis. BMC Genomics. 16: 758.

Study of natural compounds effect on biofilm of Cronobacter sakazakii

Gardinea Amer Ismail Luma Abd-Alhady

Department of Biology Collage of Education of pure science / Ibn Al-haitham /University of Baghdad / Baghdad / Iraq

gardinea1994@gmail.com
lumaabdalhadee@yahoo.com

Abstract

The present study aimed to detect the effects of (Citral , Crcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldhyde) compounds on biofilm formation of Cronobacter sakazakii by uses microtiter plate method .

Seventeen isolates of C. sakazakii from different clinical isolates and milk sourses were collected from previous study. All isolates were identified depending on 16S rRNA gene

The addition of (Citral, Curcumin, Inulin , Resveratrol, Trans-cinnamaldhyde) at concentration (50, 100) microgram/ml was coulde inhibition biofilm formation based on isolate sourse and compound concentration .

Keyword: Cronobacter sakazakii ، Biofilm ،Citral ، Curcumin ، Inulin ،Resveratrol Trans-cinnamldhyde