أستخلاص الـ Surlactin لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* ودراسة تأثيره على بكتريا *Staphylococcus* المعزولة من إصابات مختلفة

أ. د. منيرة جلوب العبادي
جامعة بغداد– وحدة الابحاث البايولوجية
ا. م. د. مكارم عادل الطائي **لندى خلف كناوي**
الجامعة المستنصرية – كلية التربية الاساسية

الخلاصة :

تضمنت الدراسة تقصي تأثيرالسيرلاكتين (Surlactin) المنتج من بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus acidophilus* ضد بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* المعزولة من إصابات مختلفة شملت التهابات الجروح والحروق والمجاري البولية ، حيث شخصت 33 عزلة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* و 27 عزلة لبكتريا المكورات العنقودية البشروية *S.epidermidis* بما يعادل (41.77 % و 34.18 %) من 79 عزلة لأنواع مختلفة من البكتريا تم جمعها من تلك الاصابات وتشخيصها بالصفات الزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية وتأكيد التشخيص بأستخدام نظام الفايتك Vitek 2 System .

أكدت نتائج الدراسة فعالية مستخلص الـ Surlactin الخام لراشح بكتريا حامض اللاكتيك في ازالة الغشاء الحيوي وتثبيط الالتصاق لبكتريا المكورات العنقودية البشروية ، كما انه قد يكون له فعالية مثبطة لنمو بكتريا *S. aureus* وذلك بعد مرحلة الديلزة ضد 0.01 مولر دارئ الفوسفات التي بلغ معها تركيز البروتين والكربوهيدرات في مستخلص السيرلاكتين 3 مايكروغرام / ملليتر و7 مايكروغرام / ملليتر على التوالي .

المقدمة :

ينتشر جنس بكتريا اللاكتيك *Lactobacillus* بأنواعه المختلفة بصورة واسعة ويتواجد في القنوات الهضمية والبولية التناسلية . تمتازهذه البكتريا بقابليتها على تثبيط نمو العديد من الأحياء المجهرية , لقدرتها على أنتاج وإفراز العديد من المواد التي تتنوع في تركيبها الكيمياوي مابين البروتينات والبروتينات السكرية، ومن أهمها البكتريوسينات Bacteriocines وعوامل السطح الفعالة الحيوية (Surlactin) و البايوسيرفكتين Biosurfactants (Holzapfel وآخرون , 2001).

اثبتت الدراسات السابقة أن مادة السيرلاكتين المنتجة من بكتريا العصية اللبنية الحمضية لها القابلية على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي للعديد من أنواع البكتريا الممرضة ومنها بكتريا المكورات العنقودية الذهبية (Satpute وآخرون, 2016). كما ان سبب قلة التصاق بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بسطوح الخلايا باستعمال السيرلاكتين يعود إلى آلية عمل السيرلاكتين أو ما يسمى البايوسيرفكتين او عوامل السطح الفعالة (مجموعة متنوعة هيكليا من المواد النشطة على السطح التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة)، حيث يقوم السيرلاكتين بمنع تكوين الغشاء الحيوي للبكتريا وذلك باختزال الشد السطحي لهذه الخلايا والسطوح (Gudina وآخرون, 2010), كذلك فان للمحتوى ألبروتيني للبايوسيرفكتين دوراً مهماً في عملية تثبيط الارتباط بالسطوح و تقليل الشد السطحي عند إضافة هذه المادة للسطوح ، إذ تتنافس هذه البروتينات مع مستقبلات العوامل الأخرى للإرتباط بالسطوح وتحل محلها (Tianli وآخرون , 2013) . علاوة على ذلك فأن التأثير المضاد للالتصاق يرجع إلى طبيعة تركيب البايوسيرفكتين الذي يتميز باحتوائه على طرفين احدهما محب للماء وأخر كاره للماء والذي له دور في التصاقه على السطوح (Spurbeck و2010, Arvidson) ، كما يمكن أن يعود ذلك التأثير إلى قابلية عوامل السطح على الأدمصاص إلى السطوح الأساسية محدثاً تغييرا في القابلية الكارهة للماء للسطوح والذي يتعارض مع الالتصاق المايكروبي(Rodrigues وآخرون ,2010). كذلك لاحظ بعض الباحثين أن وجود البايوسيرفكتين تعمل على فتـــح الارتباط ما بين الخلايا بعضها ببعض ، أو فتح الارتباط ما بين الخلايا والسطوح بتداخل هذه المواد بقنوات

الاتصال المفتوحة ما بين الخلايا والسطوح , كما وانه يثبط عملية استشعار النصاب Quorum sensing وبالتالي تثبيط تكوين الغشاء الحيوي (Kiran وآخرون ,2010) .

تعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية أهم الأنواع الممرضة لجنس المكورات العنقودية , حيث تسبب عددا من الالتهابات منها التهاب الجروح والحروق والمسالك البولية والتنفسية والعيون وصمامات القلب والجلد فضلا عن التسمم الغذائي ومتلازمة الصدمة السمية Toxic Shock Syndrome وغيرها لإمتلاكها العديد من عوامل الضراوة فضلا عن أنتاجها السموم المختلفة (Sibbaid وآخرون, 2006). من الأنواع الممرضة الأخرى لجنس المكورات العنقودية النوع المكورات العنقودية البشروية التي تتواجد أحيانا بشكل طبيعي على الجلد والسطوح غير الحية . أن أغلب سلالات هذا النوع غير ممرضة وبإمكانها أن تلعب دورا فعالاً في حماية أنسجة المضيف لها , الا أنها يمكن أن تكون ممرضة عند وجودها في بيئات ملائمة لإظهار أمراضيتها ومنها بيئة المستشفيات (Das وأخرون , 2016).

المواد وطرائق العمل :

- عزل وتشخيص البكتريا :-

تم عزل الأنواع المكورات العنقودية الذهبية والمكورات العنقودية البشروية من نماذج (الادرار, مسحات الجروح والحروق) التي أخذت من المرضى الذين يعانون إصابات مختلفة (التهاب الجروح والحروق والمسالك البولية) ذلك من عدة مستشفيات في مدينة بغداد (مستشفى الكندي التعليمي , مستشفى اليرموك التعليمي و مستشفى ابن البلدي) للمدة من تشرين الأول 2015 لغاية شباط 2016 . شخصت البكتريا اعتمادا على الخصائص الزرعية , الفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية (أختبارالكاتليز , تخمر وسط آكارالمانيتول الملحي , الكشف عن أنزيم تحلل الدم , انتاج أنزيم مخثر بلازما الدم) (Brooks وآخرون , 2007) , كما تم تأكيد التشخيص بنظام الفايتك Vitek2 Compact System (Biomerieux – France) .

استعملت بكتريا *Lactobacillus acidophilus* المجهزة بشكل كبسولات علاجية Probiotic Capsule (North Hollywood – USA) بوزن 100 ملغم حاوية على العزلة البكترية بعدد 10^9 خلية بشكل مجفد ، فضلا عن مكونات اخرى

(حمض الأسكوربيك، والجيلاتين، glutamines، الليمون، مالتوديكسترين، السليلوز الجريزوفولفين، ثاني أكسيد السيليكون، والنشا) . تم تنشيط البكتريا باذابة كبسولة واحدة في 10 مل من الوسط MRS السائل – Deman Regosa Sharpe Broth (Himedia India) وتنميتها بظروف لاهوائية بوجود 5 % CO2 ودرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة وذلك بحسب تعليمات الشركة المجهزة .

- فحص الحساسية للمضادات الحيوية لبكتريا *S. aureus* :-

اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية بغية تحديد العزلات الأكثر مقاومة للمضادات لاستعمالها في التجارب اللاحقة ، واستعملت المضادات الأتية بالتراكيز المبينة لكل نوع :أميكاسين Amikacin (30 مايكروغرام/ قرص) ، كليندامايسين Clindamycin (2 مايكروغرام/ قرص) ،الاريثروميسين Erthromycin (15 مايكروغرام/ قرص) ، ميثيسلين Methicilan (5 مايكروغرام/ قرص) ، نيتروفورونتون Nitrofuronton ، (30 مايكروغرام/ قرص) ،اوكساسيلين Oxocillin (1 مايكروغرام/ قرص) المجهزة من شركة (Bioanalyse – Turkey) وكلورامفينيكول Chloramphenical (30 مايكروغرام/ قرص) ، سيبروفلوكساسين Ciprofloxacin (5 مايكروغرام/ قرص) ونيتيلميسين Netilmicin (30 مايكروغرام/ قرص) مجهزة من شركة (Oxoid – England) . اجري الفحص بطريقة انتشار أقراص المضادات الحيوية Antibiotic disk diffusion method بتلقيح الوسط الصلب مولر هنتن Muller –Hinton Agar (Himedia – India) بمقدار 0.1 مل من العالق البكتيري الحاوي على (1.5× 10^8 خلية / مل) بعد المعايرة بمحلول ثابت العكورة القياسي ماكفرلاند (0.5) ثم توزيع اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط الزرعي والحضن بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعدها تم قياس قطر التثبيط حول الأقراص بالملمتر وحددت الحساسية للمضادات الحيوية اعتمادا على معدلات قطر التثبيط المناظرة للمواصفات القياسية (Bensons، 2005 ; CLSI ، 2014).

- استخلاص Surlactin المنتج من بكتريا *L. acidophilus* :-

اعتمدت طريقة Velraeds وآخرون (1998) لفصل السيرلاكتين المنتج من بكتريا حامض اللاكتيك ، وهي طريقة مبسطة تعتمد على كون السيرلاكتين ينتج في طور

الثبوت العددي خلال نمو البكتريا خلافا لمواد اخرى تنتج خلال الطور اللوغارتمي للنمو كالبكتريوسين لذا يمكن تجاوز العديد من الخطوات التي تستعمل عادة في تنقية المواد (Van Hogmoed وآخرون 2000 ; Rojas و آخرون ، 2002).

تضمنت الطريقة تحضير 200 مل من مزروع منشط لبكتريا حامض الاكتيك بوسط MRS السائل لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ بوجود 5% CO_2 , مع الاهتزاز بسرعة 160 دورة / دقيقة للوصول الى طور الثبوت العددي للنمو . ثم نبذ المزروع مركزيا بسرعة 10000 دورة / دقيقة بدرجة حرارة 4 مْ لمدة 30 دقيقة , أهمل الراشح واخذ الراسب وعلق بـــ PBS ثم ترك لمدة 2hr بدرجة حرارة 25 مْ مع التحريك الخفيف . بعدها نبذ المزروع بسرعة 6000 دورة / دقيقة بدرجة حرارة 4 مْ لمدة 30دقيقة , أهمل الراسب واخذ الراشح وتم ترشيحه بأوراق مرشحه نبيذه Millipore filter بقطر 0.22 مايكروميتر ، ثم اجريت عملية الديلزة له ضد 0.01 مولر من دارئ الفوسفات ذي الأس الهيدروجيني 7.2 لمدة 18 ساعة .

تم تقدير تركيز البروتين في الراشح قبل مرحلة الديلزة وبعدها بطريقة Bradford (1976) وكذلك تقديرتركيز الكاربوهيدرات بطريقة Dubois وآخرون (1956) .

- الكشف عن قابلية بكتريا *L. acidophilus* لانتاج Surlactin ودراسة فعاليته :-

تم الكشف عن قابلية بكتريا حامض اللاكتيك لإنتاج السيرلاكتين من خلال تحديد الفعالية الحيوية للمستخلص في تثبيط التصاق الغشاء الحيوي Biofilm لاحدى العزلات الجرثومية المنتجة له في الزجاج Invitro بطريقة انابيب الاختبار Test tube method (Christensen وآخرون ، 1982). واستعملت بكتريا المكورات العنقودية البشروية المعروف قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي (Morris وآخرون , 1999) كخلايا هدف Target cells بعد انتخاب العزلة الأكثر انتاجا للغشاء الحيوي كعزلة دالة.

اجري الاختبار بأضافة حجم 250 مايكروليتر من المستخلص الحاوي على السيرلاكتين من بكتريا حامض اللاكتيك الى 2 مليليتر من مزروع منشط بعمر 18 ساعة لبكتريا المكورات العنقودية البشروية في الوسط السائل (BHIB) (LAB49-UK.) (Brain-Heart Infusion Broth , وحضن المزيج بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة. بعد ذلك تم التخلص من محتويات الأنابيب بعناية تامة وصبغت بصبغة البلورات

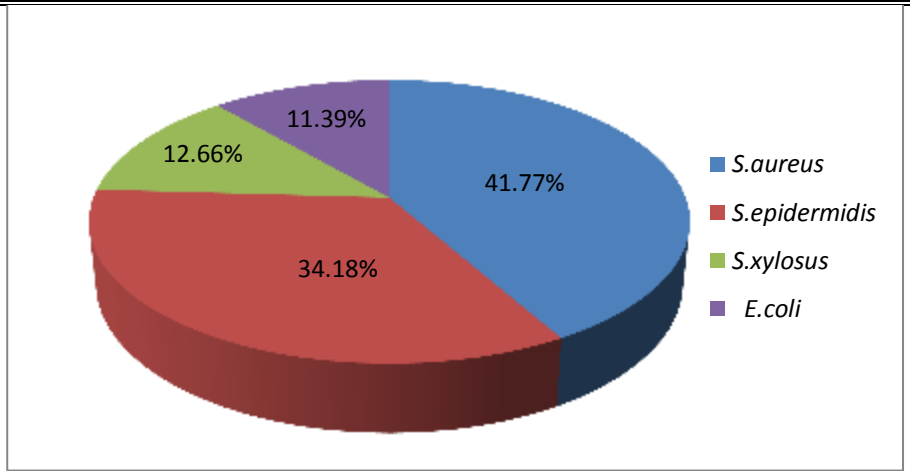
البنفسجية 1%, وتم ملاحظة النتائج بالعين المجردة مقارنتة بالسيطرة السالبة (بدون وجود بكتريا المكورات العنقودية البشروية) , والسيطرة الموجبة (لتكوين الغشاء الحيوي) بوجود بكتريا المكورات العنقودية البشروية فقط .

- **دراسة تأثير Surlactin المضاد للبكتريا *S.aureus* : -**

استعملت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion method (Lin و آخرون , 2008) للكشف عن الفعالية التثبيطية لمستخلص السيرلاكتين لبكتريا حامض اللاكتيك ضد عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية قيد الدراسة. اجري الفحص بتوزيع 100 مايكروليتر من عالق بكتريا *S.aureus* بعمر 24 ساعة في وسط BHIB وبتركيز (10^8 X1.5) خلية /مل , بعد المعايرة باستعمال أنبوب مكفرلاند (0.5) الى أطباق تحوي وسطأ صلبا Brain-Heart Infusion Agar (BHIA) LAB49- (UK.) ثم نشر العالق على الوسط الزرعي وتركت الأطباق لتجف بحرارة الغرفة 25مْ لمدة 15 دقيقة . استعمل ثاقب فلين معقم لعمل حفر بقطر 5 ملليتر في أطباق BHIA المزروعة , و ملئت كل الحفر بـــ 100 مايكرولتر من مستخلص السيرلاكتين الخام لراشح بكتريا حامض اللاكتيك قبل مرحلة الديلزة ومن المستخلص بعد الديلزة بواقع مكررين لكل عزلة مع سيطرة سالبة (PBS) وموجبة (حامض الخليك بتركيز 6%) ، وحضنت الأطباق بحرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعدها تم قياس قطر التثبيط بالملمتر .

النتائج والمناقشة :

تم الحصول على (79) عزلة بكتيرية من النماذج المأخوذة من اصابات مختلفة، شخصت 33 عزلة على أنها بكتريا المكورات العنقودية الذهبية و 27 عزلة شخصت بأنها المكورات العنقودية البشروية حيث مثلت نسبة 41.77% ,34.18% على التوالي من المجموع الكلي للعزلات , فيما شكلت كل من *S.xylosus* وبكتريا القالون *Escherichia coli* 10 عزلات بنسبة 12.66 % و 9 عزلات بنسبة 11.39% على التوالي من المجموع الكلي للعزلات , شكل (1) .



شكل (1): النسب المئوية لأنواع البكتيريا المعزولة .

لقد بات معروفا ان أنواعا من بكتريا *Staphylococcus* تسبب العديد من الإصابات تتراوح من الإلتهابات الطفيفة إلى التهابات خطيرة . وعلى الرغم من الجهود الواسعة النطاق للسيطرة على إنتشارها ، لا تزال قائمة كمسبب لأمراض المجتمع المكتسبة من المستشفى . وتعد بكتريا *S.aureus* من الممرضات ألانتهازيه المقاومة للعديد من المضادات الحيوية (Gill وآخرون , 2005؛ Azimian وآخرون ,2012). قد اثبتت نتائج الدراسة امتلاك جميع عزلات *S.aureus* مقاومة متعددة للمضادات الحيوية، وكانت المقاومة للمضادين الاوكساسيلين Oxocillin وميثيسيلين Methicilan بنسبة 100% للعزلات كافة ، في حين أظهرت جميع العزلات الحساسية للمضاد نيتيلميسين Netilmicin بنسبة 100% .كما موضح في الجدول (1) .

جدول (1)انواع المضادات الحيوية المستعملة لاختبار حساسية بكتريا *S.aureus* وأقطارالتثبيط

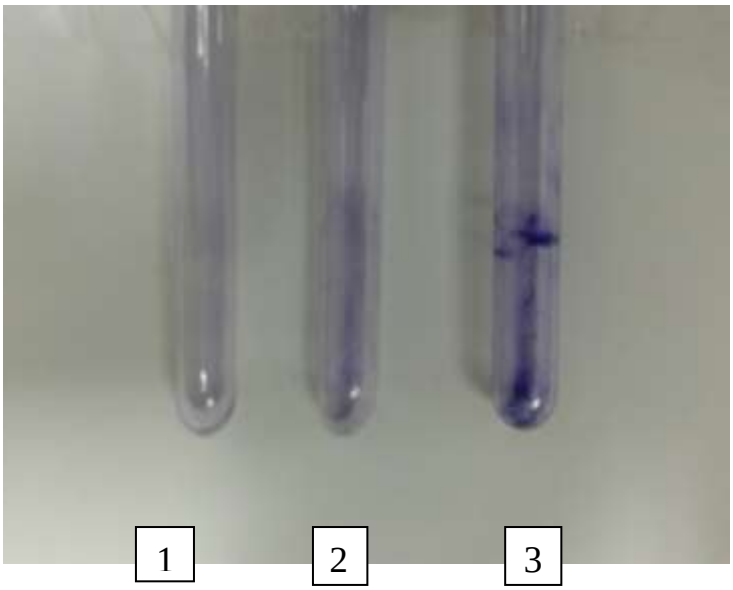
المضادات الحيوية	ME	CD	OX	C	E	AK	NET	F	Cif
*معدلات قطر التثبيط (ملم)	** S≥14 *** R ≤9	S ≥21 R ≤14	S ≥18 R ≤17	S ≥18 R ≤12	S ≥23 R ≤13	S ≥17 R ≤14	S ≥15 R ≤12	S ≥17 R ≤14	S ≥21 R ≤15
رقم العزلات									
S1	0	0	0	10	0	22	15	13	18
S2	0	32	0	36	0	28	20	21	30
S3	0	35	15	37	0	26	16	18	22
S4	0	22	7	27	24	26	23	21	28
S5	0	0	0	15	13	13	15	13	23
S6	0	29	0	30	0	22	21	22	20
S7	0	36	12	30	28	31	26	30	36
S8	0	0	0	0	0	20	15	8	18
S9	0	27	0	8	0	26	29	25	18
S10	0	30	16	29	0	27	25	21	22
S11	7	28	0	27	7	21	19	14	15
S12	0	30	7	27	7	26	22	22	22
S13	0	27	20	26	30	27	16	0	19
S14	0	0	0	0	0	12	19	8	13
S15	0	30	0	0	0	29	24	20	28
S16	0	0	0	0	0	23	18	9	12
S17	7	30	7	27	6	19	21	20	12
S18	0	0	0	0	0	22	19	6	10
S19	0	29	6	26	8	24	20	22	16
S20	0	14	0	20	0	0	15	14	30
S21	0	21	0	35	0	22	19	23	20
S22	0	32	12	30	28	33	20	29	32
S23	0	24	0	26	30	10	22	30	12
S24	0	21	14	7	0	14	25	27	18
S25	0	25	12	12	18	22	19	8	35
S26	0	13	6	29	33	0	12	32	13
S27	0	26	0	22	12	21	22	7	18
S28	0	0	10	18	28	33	22	35	33
S29	7	0	14	0	19	24	19	32	33
S30	0	18	19	13	0	23	21	0	19
S31	0	35	0	26	22	13	17	14	13
S32	0	27	7	29	17	15	10	30	12
S33	0	14	0	30	8	7	32	21	22

* حددت الحساسية للمضادات الحيوية اعتمادا على معدلات قطر التثبيط المناظرة للمواصفات القياسية (CLSI ، 2014).

**S البكتريا حساسة للمضاد الحيوي

***R البكتريا مقاومة للمضاد الحيوي

أظهرت نتائج اختبار قابلية بكتريا حامض اللاكتيك على انتاج عوامل السطح الفعالة أن مستخلص السيرلاكتين كان له القابلية على أزالة الغشاء الحيوي لبكتريا المكورات العنقودية البشروية وفصله عن جدار أنبوب الاختبار الذي نميت فيه (شكل - 2).



شكل (2) قابلية بكتريا *L.acidophilus* على انتاج الـ Surlactin
1- السيطرة السالبة (PBS) 2 – Surlactin و بكتريا *S.epidermidis*
3-بكتريا S.epidermidis

تتفق النتائج التي تم التوصل اليها في الدراسة الحالية مع ما ذكره Boris وآخرون (1998) من أن عامل السطح الفعال السيرلاكتين المنتج من قبل بكتيريا حامض اللاكتيك ذا كفاءة عالية في تثبيط التصاق الممرضات مقارنة بالأنواع الأخرى *L.gasseri* و *L.jensenii* . كما أكدت نتائج Satpute وآخرون (2016) التي أوضحت أن البايوسيرفكتين له نشاط ضد عدة مسببات للأمراض في الأمعاء والجهاز البولي والتناسلي للإناث من خلال التدخل في تشكيل الغشاء الحيوي والالتصاق بسطح الخلايا الظهارية. وأشار Shokouhfard وآخرون (2015) الى أن للبوسرفكتين المستخلص من بكتريا حامض اللاكتيك القابلية على تثبيط الغشاء الحيوي لأنواع عديدة من البكتريا . وقد

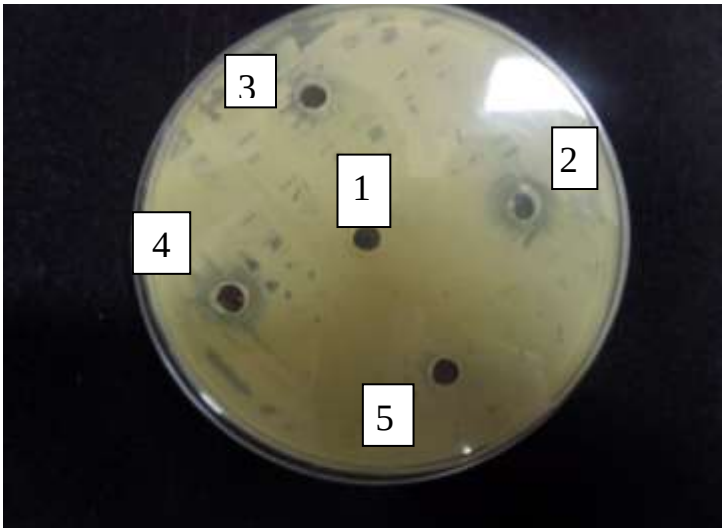
ذكرVelraed وآخرون , (2000) أن للبايوسيرفكتين ميلا شديدا للارتباط بالمستقبلات الموجودة على أهلاب الخلايا الطلائية لأنسجة الجسم مما لا يسمح للبكتريا المرضية من النجاح في لالتصاق بهذه الخلايا. اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Ali (2012) , إذ أوضح أن زيادة تركيز محلول البايوسيرفكتين المستخلص من بكتريا حامض اللاكتيك الذي إظهر قدرة جيدة على تثبيط إنتاج الغشاء الحيوي تؤدي إلى خفض كمية الغشاء الحيوي . وهذا ما أكده كامل (2005) حيث لاحظ أن السيرلاكتين له قدرة أو فعالية مضادة على قتل أو الحد من نمو الممرضات البكتيرية (*E.coli , E.faecalis , S.epidermidis*) , لذا استعمل كمساعد مناعي Adjuvant مع بعض الأنواع البكتيرية لتحفيز إنتاج الأضداد النوعية لهذه الممرضات والمتمثلة بالكلوبيولين المناعي – ج (IgG) والكلوبيولين المناعي – أ (IgA) (Olmos وOberhelman , 2001) .

بينت نتائج الدراسة الحالية ان تركيزالمستخلص الخام كأن 20 مايكروغرام / ملليتر المنتج من بكتريا حامض اللاكتيك بدلالة تركيز البروتين 8 مايكروغرام /ملليتر , والكاربوهيدرات

12 مايكروغرام / ملليتر ، في حين بلغ التركيز الكلي بعد مرحلة الديلزة ضد 0.01 مولر دارىء الفوسفات مايعادل 10 مايكروغرام /ملليتر بدلالة 3 مايكروغرام /ملليتر لتركيز البروتين , 7 مايكروغرام / ملليتر للكاربوهيدرات وذلك بالرجوع الى المنحنيات القياسية لتقدير كمية البروتين والكربوهيدرات. وبدراسة الفعالية الحيوية لوحظ وجود تباين في الفعالية المضادة لنمو بكتريا المكورات العنقودية الذهبية للراشح الخام لبكتريا حامض اللاكتيك قبل الديلزة عنه بعد مرحلة الديلزة ضد 0.01 مولر دارىء الفوسفات.

أعتمدت طريقة الانتشار بالحفر لتحديد الفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللاكتيك لكونها الأبسط والأفضل , وتمت من خلال تنمية البكتريا في الوسط السائل MRS الذي يحفز البكتريا على أنتاج المواد الفعالة ومنها البكتريوسين والبايوسيرفكتين وغيرها . حيث اعتبر Karthikeyan و Santhoth (2009) أن وسط MRS هو الأفضل في أنتاج هذه المواد .

يبين الشكل (3) نتائج فعالية مستخلص السيرلاكتين لبكتريا حامض اللاكتيك ضد نمو العزلة S8 لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية التي أظهرت المقاومة الأكبر للمضادات الحيوية قيد الدراسة . حيث لوحظ وجود فعالية لمستخلص السيرلاكتين بعد الديلزة ضد دارئ الفوسفات مضادة لنمو هذه البكتريا مقارنة مع السيطرة السالبة (PBS) ومع راشح البكتريا قبل الاستخلاص . من المعروف سابقا ان عوامل السطح الفعالة تثبط الالتصاق الحيوي دون ان يكون لها تأثير مثبط لنمو البكتريا كما اشار الى ذلك كامل (2005)، الا ان بعض الدراسات اللاحقة ذكرت ان لمستخلص السيرلاكتين فعالية تثبيطية لنمو بعض انواع البكتريا الممرضة ومنها ماذكره Gudiña (2010) الذي اكد ان لعوامل السطح الفعالة تأثيرا تثبيطيا ضد عدد من الكائنات الحية الدقيقة منها *Streptococcus , Candida albicans , E.coli , S.aureus , S.epidermidis agalactiae* ، وهو مايتفق مع نتائج الدراسة الحالية. الا انه لابد من الاشارة الى ان الفعالية التثبيطية لمستخلص السيرلاكتين غير المنقى قيد الدراسة قد تكون ناجمة أيضا عن احتمالية وجود مواد اخرى مثل الحوامض ومنها حامض اللاكتيك أو مواد اخرى تنتج من بكتريا حامض اللاكتيك في طور الثبوت .



شكل (3) : الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *L.acidophilus* (Surlactin) ضد *S.aureus*.

1-سيطرة سالبة (PBS) قطر التثبيط = 0 ملم (الفعالية التثبيطية = -)

2 و 4- مستخلص السيرلاكتين بعد الديلزة قطر التثبيط = 20 ملم (الفعالية التثبيطية = +)

3 و5- راشح بكتريا *L.acidophilus* قبل الديلزة قطرالتثبيط = 0 ملم (الفعالية التثبيطية = -)

لقد جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع أشار اليه Gupta وآخرون (1998) , من أن لراشح بكتريا حامض اللاكتيك المنماة في وسط MRS السائل فعالية تثبيطية واسعة لنموعدد من الأنواع البكترية الموجبة والسالبة لصبغة كرام . كما أكدت ما جاء به الجوعاني(2004) , في دراسته التي أشارت الى وجود فعالية تثبيطية لعزلات بكتريا *L.acidophilus* ضد نمو كل من من بكتريا *E.coli* , *P.aeruginos* . وكذلك فأن النتائج الحالية كانت معززة لما أثبته العديد من الباحثين من امتلاك بكتريا .spp *Lactobacillus* مركبات بروتينية قادرة على منع التصاق العديد من أنواع البكتريا في الأنسجة الحية والمعدات الطبية والأسطح وغيرها (Reid وآخرون ,1988 ؛ Coconnier وآخرون , 1992) .

أخيرا تجدرالأشارة الى أن استبدال المضادات الحيوية المستعملة في علاج الإصابات التي تسببها بكتريا المكورات العنقودية الذهبية , بالأنواع العلاجية من بكتريا حامض اللاكتيك خاصة يعود بالفائدة على العائل , وهذا ما أكده كل من Gudina و آخرون (2010) و Sambanthamoorthy وآخرون(2014) , حيث أن استعمال البايوسيرفكتين المنتج من *Lactobacillus spp.* تعد بديلا مناسبا عن المضادات الحياتية لعلاج الالتهابات التي تسببها البكتريا المرضية المتعددة المقاومة للمضادات الحياتية للقناة البولية ,التناسلية ,الهضمية , الجروح والحروق ,فضلا عن استعماله لمنع تكون ونمو الغشاء الحيوي من البكتريا المرضية على أنابيب القثطرة , الأدوات والأجهزة الطبية بدل المواد الكيمياوية , كذلك يمكن استعمالها في مجال الصناعات الغذائية إذ أنها أمنة ولا تسبب أي ضرر(Tahmourespour وKermanshahi ,2011 ؛ Wilbert وآخرون ,2013).

المصادر:

الجوعاني، عمر عبد الكريم علي حسن (2004) . دراسه تشخيصيه وأمراضيه للجراثيم المسببه لالتهابات الجهاز البولي عند اطفال مدينة الرمادي . رسالة ماجستير ،معهد الهندسة الوراثيه ، جامعة بغداد.

غريب ، عبد الأمير محمد . (2011). تأثيرالعاثيات على حساسية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية تجاه مضادات الحيوية. مجلة معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا/جامعة بغداد.

كامل ، فؤاد حسين .(2005) . تنقية وتوصيف لمادة Surlactin المنتجة من قبل بكتريا Lactobacillus acidophilus . أطروحة دكتوره ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

المعيني، اسماء محمد سعود . (2005) .دراسة كيموحيوية لأنزيم البروتييز المنتج من بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة محلياً . رسالة ماجستير . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية . جامعة بغداد .

Ali O.A.(2012).Prevention of Proteus mirabilis Biofilm by Surfactant Solution ,EygptAcad.J. Biolog.4(1):1-8.

Azimian, A. Najar-pirayeh, S. Mirab-Samiee, S. Naderi , M . (2012).Occurrene of Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) Among Clinical Samples in tehran-Iran and Its Correlation with Polymorphism of Specific Accessory Generegulator*(AGR)* GROUPS. B JM : 779-785 .

Bensons, A.E.B.(2005). Microbiology Applications . 9th ed Laboratory manual in general complete version .McGraw-Hill companies . New York.

Boris Soledad, Juan E. Suárez, Fernando Vázquez, and CovadongaBarbés (1998). Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens . Infect Immun: (66) 5.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.

Brooks, G.F.;ButBel,J.S; Caroll,K.C; and Morse, S.A .(2007). Jawets,Melnich and Adelbergs , Medical Mirobiology , 24th ed . Appleton and Lange .

Christensen, G. D. ;Simson W. A. ;Bisno, A. L. and Beachey ,E. H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis*to smoth surface. Infect.immun. 37:318-326 .

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute . (2014). Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, CLSI document M100-S21 ., USA. . 31(1) .

Coconnier,M.H.;Klaenhammer,T.R.;Kerneis,s.;Bernet,M.F. and Servin,A.L. (1992). Protein-mediated Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on Human Enterocyte and Mucous-Secreting Cell Lines in Culture.J.Appl. Enuirom.Microbiol., 58(6):2034-2039.

Das , B. Mandal, D. Dash .S.K. Chattopadhyay, S. Tripathy , S. Dolai, D.P. Dey, S.K. and Roy, S. (2016).Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage- Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*Strains .*Infectious Diseases: Research and Treatment* .9 :11–19 .

Dubois,M.,Gilles,K.A.Hamilton,J.K.,Rebers,P.A.andAmith,F.(1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances.Analytical Chemistry 28,350-356.

Fakrideen, A.J.; (2001). A Bacteriological study of the pathogens Nosocomial infection. M. Sc. Thesis in microbiology college of science, Kufa Univ.

Flayyih,M.T. and Abdrabaa, M .(2015). Isolation, identification and treatment of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus epidermidis. Iraqi Journal of Science, 2015, Vol 56, No.1C, pp: 701-707*

Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer,G.L., Mongodin, E.F., DeBoy,R.T., Ravel,J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson,R.J., Daugherty, S.C., Madupu,R., Angiuoli,S.V., Durkin,A.S., Haft, D.H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I.R., Nelson, K.E. and Fraser, C.M.(2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*strain and a biofilm-producing methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*strain. *J. Bacteriol*. 187(7),pp: 2426- 2438.

Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR.(2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20. Lett Appl Microbiol.;50(4):419-24

Gudina, E.J., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., (2010). Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. Colloids Surf. B. Biointerfaces 76, 298–304.

Gudina, E.J., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., (2010). Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. Colloids Surf. B. Biointerfaces 76, 298–304.

Gupta, U.; Radramma, R. ; Rati, E.and Joseph, R.(1998) .Nutritional quality of lactic acid fermented bitter gourd and fenugreek leaves . International Journal of Food Sciences and Nutrition, 49(2) : 101−108.

Holzapfel, W.H., Habere, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Ulrich, S. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microbes in food and nutrition. *Am. Clin. Nutr.* 37: 365 – 373.

Karthikeyan, V. and Santhosh , S. (2009). Study of Bacteriocin as a Food Preservative and the *Lactobacillus acidophilus* Strain as Probiotic .Department of Biotechnology, School of Bioengineering, SRM University, Kattankulathur−603203, Tamilnadu, India .Pakista. J. of Nut. 8 (4) :335−340.

Kiran, S.G.; Thomas, T.A.; Selvin, J.; Sabarathnam, B. and Lipton, A.P. (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptidebiosurfactant produced by marine *Brevibacteriumaureum* MSA13 in solid state culture. Bioresour. Technol. 101(9): 2389-2396.

Lin, C.K.; Tsai, H.C.; Lin, P.P .;Tsen , H.Y. and Tsai , C.C.(2008).*Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell.Anaerobe., 14:251-255.

Morris .N.S., D. J. Stickler, R. J. C. McLean (1999). The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. Publisher: Springer-Verlag Heidelberg Volume 17, Number 6.

Olmos Alvarez- MI andOberhelman RA.(2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. Clin Infect Dis. Jun 1; 32(11):1577-8.

Reid,G.;MacGroary,T.A.;Angolti,R.andCook,R.L.(1988).*Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens .cans .J. Microbiol ., 34:344-351.

Rodrigues, L.R. and Teixeira, J.A. (2010). Biomedical and therapeutic applications of biosurfactants . Adv. Exp. Med. Biol . 672(6):75-87.

Rojas,MauriliaAsFelipecencio, and Patricia L. Conway, (2002). Purification and Characterization of a Surface Protein from *Lactobacillus fermentum* 104R That Binds to Porcine Small Intestinal Mucus and Gastric Mucin . Applied and Environmental Microbiology, 68 (5) : 2330-2336.

Sambanthamoorthy, K. Feng,X. patel, R.Patel , S. and Paranavitana ,C. (2014). Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. BMC Microbiology , 14:197.

Satpute, S. K. Kulkarni, G. R. Banpurkar, A.G .Banat, I. M. Mone, N. S. Patil, R. H. (2016) . Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications Authors. Jou , Basic Microbiology .

Shokouhfard M, KasraKermanshahi R, VahediShahandashti R, Feizabadi MM, Teimourian Sh.(2015) The inhibitory effect of a *Lactobacillus acidophilus* derived biosurfactant on biofilm producer *Serratiamarcescens.* Iran J Basic Med Sci; 18:1001-1007.

Sibbaid,M.J.J.B.; Ziebantt, A..K.; Engelmann,S.; Hecker,M.;De Jong,A.;Harmsen,H.J.M.; Raarigns,G.C.;Stokroos,I.; Arends, J.P .;Dubois,J.Y.F.; and Van Dijl, J.M.(2006). Mapping the pathways to *Staphylococcal* pathogensis by comparative secretomics . Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70(3):755-788.

Spurbeck, R.R. and Arvidson, C.G. (2010). *Lactobacillus jensenii* Surface-Associated Proteins Inhibit *Neisseria gonorrhoeae* Adherence to Epithelial Cells. Infect Immun. 78(7): 3103-3111.

Tahmourespour, A. and Kermanshahi, R. (2011). The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral Streptococci. Bos. J. Bas. Med. Sci. 11:37-40.

Tianli, Y.; Jinjin,P.; and Yahong Y. (2013). Purification and Characterization of Anti-*Alicyclobacillus*Bacteriocin Produced by *Lactobacillusrhamnosus*. J. Food. Prot. .I.A.F.P. (9): 1488 -1657.

Van Hoogmoed C. G., M. van der Kuijl-Booij, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher.(2000). Inhibition of *Streptococcus mutans* NS Adhesion to Glass with and without a Salivary Conditioning Film by Biosurfactant- Releasing *Streptococcus mitis* Strains. Applied and Environmental Microbiology, February., (66)2 : 659-663.

Velraeds MM,van de Belt-Gritter B, Busse HJ., Reid G, van der Mei HC,(2000). Inhabition of uropathogenic biofilm growth on silicone rubber human urine by a *Lactobacillus* –a teleologic approach. World J Urol.Dec;18(6):422-6.

Velraeds, MM., B. van de Belt-Gritter, H. C. van der Mei, G. Reid, and H. J. Busscher. (1998). Interference in initial adhesion of uopathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus*biosurfactant. J. Med. Microbiol. 47:1081-1085.

Wertheim , H. F. L.; Vos , M. C. ; Ott, A. , Voss , A.; Kluytmans , J. A. J. W.;Vandenbroucke – Grauls , C. M. J. E.;Meester, M. H. M.;Vankeulen ,P. H. J. &Verbrugh , H. A. (2004) . Mupirocin prophylaxis against Nosocomial *Staphylococcus aureus* Infections in Nonsurgical Patients :A Randomized study . Ann Intern Med ., 140 : 419 – 425.

Wilbert, A.; Douwe, B.; Wilfred, C.; Koen, D.; and Remco, K. (2013). Genome Instability in *Lactobacillus rhamnosusGG* Environ. Microbiol. 79(7):2233.

Zadik , P. M. ; Davies , S. ; Witaker , S. &Muson , C. (2001) . Evaluation of new selective medium for methicillin – resistance *Staphylococcus aureus* . J. Med. Microbiol ., 50 : 476 – 479 .

Surlactin extraction of *Lactobacillus acidophilus* and study its effect on isolated *Staphylococcus* from various infections.

Dr. Munira Ch. Ismail
Science - University of Baghdad and biological research unit
Dr.Makarim Adil AL Tai **Linda khalafKenawe**
Al-Mustansiriya University - College of Basic Education

Abstract :

The study included the detection the effect of Surlactin produced by *Lactobacillus acidophilus* bacteria against *Staphylococcus* bacteria isolated from different injuries includes wound infections ,burns , wounds,and urinary tract infection . 33 isolates of *S.aureus* Bacteria and 27 isolates of *S.epidermidis* bacteria were Dignased in average of (%41.77, %38.18) from 79 isolates for different types of bacteria were collected from injuries and Diagnosed for cultural and microscopic characteristics and Biochemical tests and confermation test using Vitek 2 system.

The Resuts of the study confirmed the Activity of Surlactin Crude extract from *L.acidophilus* superratant in Remoral of Biofilm and inhihition of adherence of *S.epidermidis* the also may have an effective inhibitor of the growth of bacteria *S.aureus* after dialysis gainst 0.01 mol of phosphate buffer , and the concentration of protein and Carbohydrates in crude extract extract 3 microgram/ml and 7 microgram/ml Respectirely .