# الأثر التثبيطي لرواشح خميرة *Saccharomyces cerevisiae* على نمو المكورات العنقودية الذهبية المكونة للغشاء الحيوي

**م . د . فاطمة رمضان عبدل**
الجامعة المستنصرية/ كلية العلوم

## الخلاصة

شملت الدراسة التحري عن القابلية التثبيطية لرواشح عزلات خميرة *Saccharomyces cerevisiae* (التي تم الحصول عليها من المصادر التجارية المستوردة ) على نمو بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من حالات مرضية مختلفة , اذ امكن الحصول على (٣٠) عزلة لبكتريا *Staphylococcus aureus* . اخضعت جميع هذه العزلات للفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية وشخصت باستعمال نظام Vitek2 . اختبرت قابلية العزلات على تكوين الغشاء الحيوي باستعمال طريقتين هما وسط الكونغو الاحمر الصلب (CRA ) Congo Red Agar Method و طريقة اطباق المعايرة الدقيقة (MTP) Microtitration plates method , وقد اظهرت النتائج ان الطريقة الثانية كانت الاكثر حساسية في التحري عن تكوين الغشاء الحيوي , حيث ابدت (٦٠%) من العزلات قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة (CRA ) و (٨٣,٣%) بطريقة (MTP ) والعزلات الاخرى غير منتجة للغشاء الحيوي. وبخصوص فحص الحساسية , فقد ابدت تلك العزلات تباينا في مقاومتها للمضادات الحيوية قيد الدراسة باستثناء تشابه جميع العزلات في مقاومتها للPiperacillin و Ceftazidime و Azithromycin بنسبة ١٠٠%, وحساسيتها بنسبة ١٠٠% لمضاد Imipenem .

استعملت خمائر الخبز الجافة المستوردة من مصادر مختلفة والمتوافرة في الاسواق المحلية من اجل الحصول على عزلات خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* التي شملت كُلاْ من العزلة SY 1 من خميرة Angel الصينية المنشأ والعزلة SY 2 من خميرة Packmaya التركية المنشأ .

لم تظهر الرواشح غير المركزة لعزلات خميرة *S. cerevisiae* أي تأثير تثبيطي ضد عزلات بكتريا *S. aureus* , في حين ادى تركيز رواشح خميرة SY 1 و SY 2 لمرة واحدة الى اظهار فعاليتها التثبيطية اتجاه عزلات البكتريا ,اذ بلغ معدل اقطار التثبيط (10, 13.1) ملم على التوالي. ان معدل قطر منطقة التثبيط ضد العزلات البكتيرية قيد الدراسة لراشح عزلة خميرة SY 2 *S. cerevisiae* (المركزة لمرتين) بلغ (١٧,٨) ملم والذي يمثل اعلى تأثير اظهرته هذه العزلة تجاه عزلة بكتريا المكورات العتقودية.

## المقدمة:

ينتمي جنس المكورات العنقودية إلى عائلة Micrococcaceae, وهي بيضوية الشكل بكتريا وموجبة لصبغة كرام تكون هيئة عناقيد متجمعة عند رؤيتها بالمجهر الضوئي ، غير متحركة، غير مكونة للسبورات وتنمو بظروف هوائية ولا هوائية اختيارية. وتكون بكتريا *Staphylococcus aureus* من بين المكورات العنقودية المنتجة لأنزيم Coagulase و يعد هذا الانزيم وسيلة للتميز بين انواع المكورات العنقودية ، تعود قدرة المكورات العنقودية الذهبية الانتشار الواسع في انسجة وخلايا الجسم الى كونها اكثر امراضية الى امتلاك معظم سلالاتها للعديد من العوامل التي تلعب دورا كبيرا في الحالات الامراضية (Pathogenesis) والتي يعبر عنها بعوامل الضراوة (Virulence facter) (2,1). تشمل عوامل الضراوة عددا من الإنزيمات والذيفانات أو عوامل أخرى تتعلق بالتركيب المعقد لجدار الخلية , ومن الإنزيمات المهمة إنزيم الهيمولايسين (Haemolysin)، والمحلل للحامض النووي الدنا (DNase) والهيالاورونيديز (Hyaluronidase) والبيتالاكتاميز (B-lactamase) وغيرها. هذا الى جانب العديد من الذيفانات منها الذيفانات المعوية (Enterotoxin) ,إضافة إلى قدرتها على الإنتاج وبمستويات عالية (EnterotoxinA) (3,2). تعد قابلية البكتريا على تكوين

الغشاء الحيوي (Biofilm) من أحد عوامل الضراوة المهمة للبكتريا ، إذ أن تكوين الغشاء الحيوي يسمح للبكتريا بالهروب من دفاعات المضيف ويقلل من تغلغل المضادات المايكروبية خلال الاغشية الحيوية ، مما يؤدي الى قلة تعرض البكتريا للمضادات الحيوية ومن ثم قلة فعالية المضادات الحيوية تجاهها (4). فقد وجد أن تكوُّن الغشاء الحيوي لبكتريا *S.aureus* و *S.epidermidis* قلل من فعالية مضادات الكلايكوبيبتيد (الفانكومايسين والتيكوبلانين) تجاه هذه البكتريا(5) , وان بكتريا المكورات العنقودية من أكثر الانواع البكتيرية المنقولة خلال المستشفيات انتشاراً وضراوة وامراضية وعادة تكون مقاومة لعدة انواع من المضادات الحيوية، مما يجعل الاصابة بها صعبة المعالجة (6 ) ، ويكون علاجها مكلفاً اقتصادياً وقد ارتبطت إصاباتها بالامراضية العالية والوفاة (7) إذ تبدي البكتريا في الأغشية الحيوية درجة عالية من المقاومة للعوامل المضادة للجراثيم وجهاز مناعة المضيف اذ إن أكثر من % 20 من جينات البكتريا في الغشاء الحيوي يتم تعبيرها بصورة مختلفة والذي قد ينتج عنه حماية اكبر ضد خلايا البلعم الكبير، كما أن البكتريا تنمو ببطء وتكون فعاليتها الايضية بطيئة، وتنتج البكتريا مركبات ضمن الغشاء الحيوي تعادل تأثير المضادات الحيوية (8) .

شهدت السنوات الأخيرة توجها واسعا في استعمال الأحياء المجهرية ونواتجها الأيضية في علاج بعض الحالات المرضية من خلال استعمالها في إنتاج عدة مضادات حيوية وفيتامينات وانزيمات فضلا عن المواد المثبطة لنمو الأحياء المجهرية الأخرى، وقد أُبتكر مصطلح المعزز الحيوي Probiotic لأول مرة من قبل Lilly و Stillwell عام 1965 (9)، ومن اهم الكائنات المستعملة من البكتريا جنس *Lactobacillus* ومن الخمائر خميرة *Saccharomyces cerevisiae* التي تعمل على توازن النبيت الطبيعي من خلال زيادة البكتريا اللاهوائية المفيدة وخفض الكائنات الحية المسببة للمرض وتحفيز الآليات المناعية المخاطية والآليات غير المناعية من خلال منافسة الأسباب المرضية وشدته وخفض خطر سرطان القالون فضلا عن انتاج بروتينات وانزيمات وفيتامينات ومواد مضادة للسموم تعمل على زيادة تحسين الهضم (10) ، وقد شغلت خميرة الخبز حيزا واسعا في المجال الصناعي والغذائي (11)، فيما بدا الاهتمام بها في المجالات

الاخرى منذ وقت ليس بالطويل لاسيما بعد اكتشاف قدرتها في انتاج البروتينات القاتلة للخلايا الحساسة والمرافقة لها في وسط النمو وعدم تأثرها بهذه المواد البروتينية المفرزة من قبلها لعدم وجود مستقبلات على سطحها تمكن هذه المواد من الارتباط بها، مما ساعد على استعمال هذه الصفة في التخمرات الصناعية لغرض التقليل من مخاطر التلوث بالخمائر غير المرغوبة (12).

## المواد وطرائق العمل:

### عزلات الاحياء المجهرية:

**العزلات البكترية :** استعملت في هذه الدراسة 30 عزلة من بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات مرضية مختلفة التي شملتها الدراسة وعلى النحو الاتي : (11) عزلة من عينات الجروح ،(6) عزلات من دمامل الجلد ، (6) عزلات من التهاب اللوزتين,(٤) من الانف و (٣) عزلات من التهاب الآذن الوسطى, اذ تم الحصول على العينات من مختبرات بعض المستشفيات في بغداد ( الكندي التعليمي و الشهيد الصدر العام والامام علي والمختبرات التعليمية في مدينة الطب) .

**تشخيص العزلات البكتيرية:** بعد ان تم تنقية العزلات بتكرار الزرع لها شخصت مبدئيا اعتمادا على الصفات الشكلية للمستعمرات ولونها وارتفاعها وقوامها وفحصت مجهريا لغرض وصف اشكال الخلايا بعد معاملتها بصبغة كرام , اجريت الاختبارات الكيموحيوية اعتمادا على ما ورد في (٣) والتشخيص النهائي باستخدام نظام الفايتك Vitek 2Compact (Bio Merieux France).

**1**- اتبعت الطريقة الواردة في (١٤،١٣) للتحري عن قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm وهي طريقة وسط الكونغو الاحمر الصلب Congo Red agar Medium , و طريقة اطباق المعايرة الدقيقة Microtitration plates method .

**2**- اجري فحص الحساسية للعزلات المكونة للغشاء الحيوي تجاه (١٠) مضادات حيوية مختلفة شملت اهم الاقراص المستعملة (Bio analyse/Turke).

Ciprofloxacin (CIP 10µg), Levofloxacin (Lev5µg), Amikacin (AK 30µg), Topromycin(TOB5µg), Piperacillin (PRL 30µg), Amoxicillin /

Clavulanic acid(AMC 20/10µg), Imipenem(IPM 30µg), Azithromycin (AZM30µg), Ceftazidime(CAZ30µg), Vancomycine (VA 30µg) .

تم اجراء الاختبار باستعمال وسط مولر هنتون الصلب(Mueller-Hinton agar) وتم اعتماد الاقطار القياسية بحسب ما جاء في CLSI (15).

**عزلات خميرة *S. cerevisiae*:** جمعت نماذج من الخميرة الجافة المستوردة من مصادر مختلفة من الاسواق المحلية شملت كلاً من العزلة SY 1 من خميرة Angel الصينية المنشأ والعزلة SY 2 من خميرة Packmaya التركية المنشأ.

**A : تنشيط وتنمية عزلات خميرة *S. cerevisiae*:**

تم تنشيط الخميرة الجافة بأخذ 0.5غم من مسحوق الخميرة وتلقيحها في انابيب حاوية على 10 مللتر من وسط Yeast extract glucose peptone broth( YEGP) السائل، ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 30م لمدة 24 الى 48 ساعة تحت ظروف هوائية، وبعد انتهاء مدة الحضن زرعت الخميرة بطريقة التخطيط على سطح وسط السابرويد الصلب ليعاد حضنها تحت الظروف نفسها، وبعد ظهور النمو أخذ جزء من المستعمرات بوساطة الناقل المعقم، ونشر بطريقة التخطيط على الوسط المذكور في أعلاه وكررت هذه العملية أكثر من مرة إلى أن تم الحصول على مستعمرات منفردة ونقية من الخميرة، وفقا لما جاء في (16).

**B: تشخيص عزلات خميرة *S. cerevisiae*:** شخصت عزلات الخميرة اعتمادا على خصائصها المجهرية والزرعية والكيموحيوية وبحسب ما ذكر من قبل ( 17).

**٤- التحري عن الفعالية التثبيطية لراشح خميرة *S. cerevisiae* ضد بكتريا المكورات العنقودية**

**A: تحضير راشح خلايا الخميرة:** نميت الخميرة المشمولة بهذه الدراسة في ظروف نمو مثالية وكما يأتي: لقحت الخميرة في وسط ( YEGP) السائل بعد أن ضبط الاس الهيدروجيني في الوسط إلى 5.5، ثم حضنت بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة، بعدها وضع 100 مللتر من الوسط نفسه في دوارق سعة 250 مللتر ولقح ب 3 مللتر من الخميرة ١×١٠$^{6}$خلية/مللتر، وبعد أن ضبط الاس الهيدروجيني إلى 5.5،

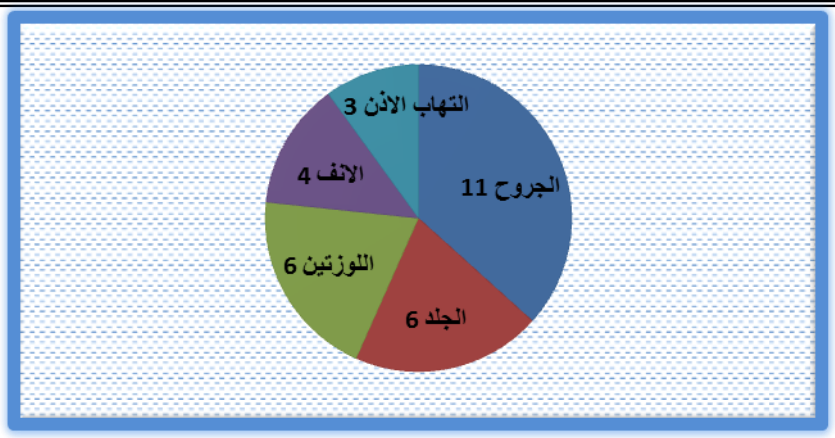
ثم حضنت بحاضنة هزازة بدرجة حرارة 30م وبسرعة 125 دورة/ دقيقة ولمدة 24 ساعة. فصلت الخلايا بالنبذ المركزي المبرد بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4 م. عقم الراشح بمرشحات دقيقة Millipore ذات قطر0.22 مايكرومتر، بعدها تم التأكد من خلو الراشح من الخلايا وذلك بزراعة نموذج من الراشح على وسط السابرويد الصلب. تم الاحتفاظ بحجم معين من الراشح ثم ركز الحجم المتبقي مرة واحدة (اختزال الحجم الى النصف) وتم الاحتفاظ بحجم معين منه، فيما ركز الحجم المتبقي مرة أخرى (اختزال الحجم الى الربع) باستعمال التنافذ الغشائي بمعدل ( Cut off) ٨-١٢ كيلو دالتون بوساطة السكروز لخفض نسبة الماء وتركيز المكونات فيه.

**B: تحضير لقاح مزارع البكتريا:** زرعت العزلات البكتيرية في انابيب حاوية على وسط المرق المغذي , ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ١٨-٢٤ ساعة , بعدها عمل تخطيط على سطح الوسط المغذي الصلب بوساطة العروة وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة , بعد انتهاء مدة الحضن نقلت بضعة مستعمرات بكتيرية نقية بعمر ٢٤ ساعة بوساطة العروة الى انابيب حاوية على وسط المرق المغذي المعقم بمقدار ٥ مللتر , ثم قورنت عكورة العالق البكتيري مع عكورة انبوبة ماكفرلاند رقم ٠,٥ القياسية والذي يعادل نموا بكترياً مساوياً ١,٥×١٠$^{8}$ خلية / مللتر

**C :تقدير الفعالية التضادية لراشح الخميرة ضد بكتريا المكورات العنقودية:** استعملت طريقة الانتشار بالحفر Well diffusion method للكشف عن الفعالية التضادية التي وصفها (18).

## النتائج والمناقشة:

تم الحصول على ( ٣٠ ) عزلة لبكتريا *S. aureus* من حالات مرضية مختلفة , وأمكن تثبيت الصفات الزرعية للمستعمرات ، والصفات المجهرية للخلايا البكتيرية ومن ثم تشخيصها باستعمال عدة التشخيص Vitek2 الخاصة ,اذ تميزت مستعمراتها على وسط المانيتول الملحي الصلب باللون الذهبي كما موضح في الشكل رقم (١) و(٢).

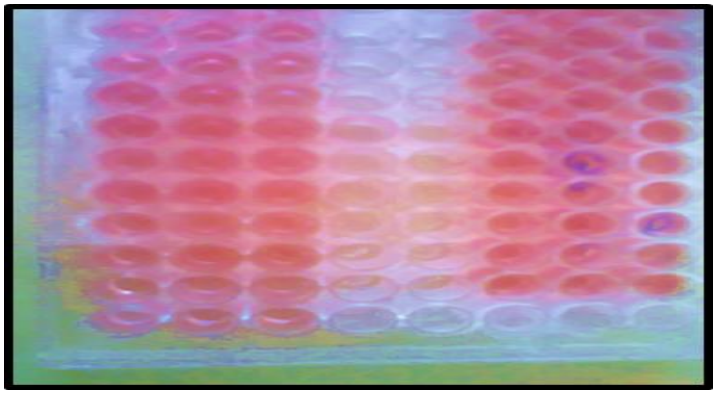



**شكل (1)عدد عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من مصادر مختلفة**

**شكل (٢) نمو بكتريا *S. aureus* على وسط المانيتول الملحي الصلب**

اختبار تكوين الغشاء الحيوي باستعمال طريقة احمر الكونغو الصلب CRA وطريقة اطباق المعايرة الدقيقة MTP. اظهرت نتائج الدراسة لعزلات بكتريا *S. aureus* بعد مدة الحضن بان (١٨) عزلة من مجموع (30) عزلة بنسبة ٦٠% كانت منتجة للغشاء الحيوي عندما ظهرت على سطح الوسط بشكل مستعمرات سوداء مع اتساق بلوري جاف كما في الشكل (٣).وبملاحظة نتائج طريقة MTP وبعد طرح قيمة معدل قراءة السيطرة السالبة من معدل قراءات الامتصاصية للعزلات , ابدت (٢٥ )عزلة بنسبة ٨٣,٣% نتيجة موجبة لتكوين الغشاء الحيوي, في حين بلغت نسبة العزلات السالبة ١٦,٧% كما موضح في الشكل (٤).

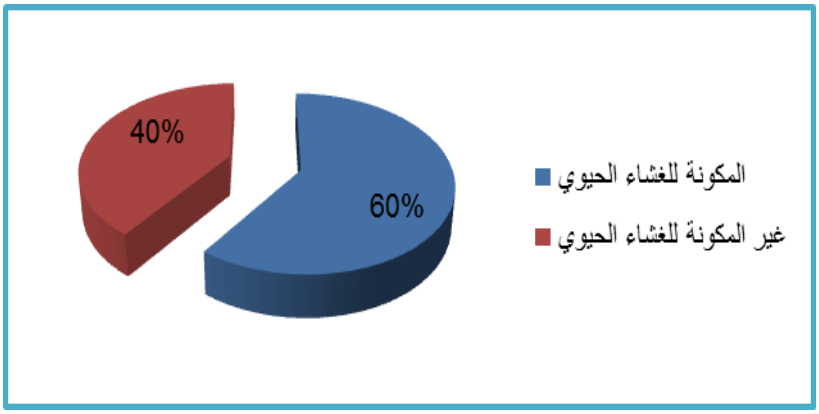
**شكل(٣) قدرة بكتريا *S. aureus* على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الكونغو الاحمر الصلب**



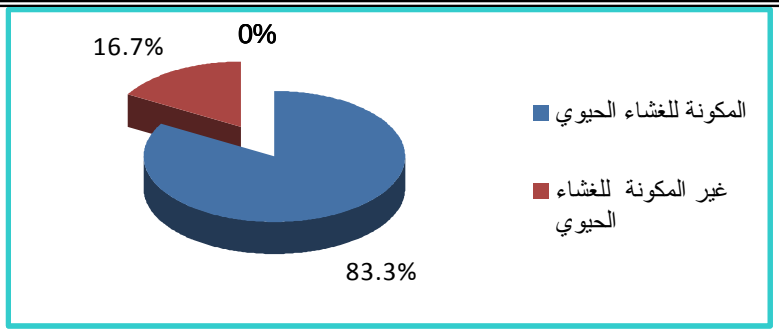
**شكل(٤) قدرة بكتريا *S. aureus* على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة اطباق المعايرة الدقيقة**

بين (19) أن طريقة CRA تعد طريقة واقعية لتمييز النمط المظهري للعزلات المنتجة للمادة المخاطية و ذات الضراوة العالية وان معرفة هذا النمط قد يساعد في التمييز بين المنتجات القوية للغشاء الحيوي والذي يعكس حدة الإصابة و يساعد في تحديد العلاج الأولي، وان الاختلاف في درجة إنتاج الغشاء الحيوي يعزى إلى الاختلاف في إنتاج لاصقات متعدد السكريات polysaccharide adhesion (PIA) و يعكس التغير في التنظيم الجيني .استعملت طريقة CRA للتحري عن إنتاج المادة المخاطية لعزلات عديدة كونها طريقة سهلة الاستعمال وتعتمد على تعزيز إنتاج السكريات المتعددة الخارجية باستعمال وسط غني ولكن يمكن عدها قليلة الحساسية والتخصص نتيجة الاختلافات التي قد تحدث في تكون الصبغة السوداء للمستعمرات، وقد يؤثر الاختلاف في الوسط الزرعي المستعمل على نتائج هذه الطريقة تظهر البكتريا التي تنمو في الغشاء الحيوي اختلافات مظهرية متنوعة عن السلالة الأصلية التي تنمو في المزرعة بشكل حر، تشمل هذه

الاختلافات تغيرات في الحركة، زيادة إنتاج السكريات المتعددة الخارج خلوية أحيانا وزيادة المقاومة للمضادات الحيوية (20) . اشار (21) الى ان طريقة احمر الكونغو الصلب (Congo red agar) لا ينبغي ان تستعمل كاختبار لقياس تشكيل الغشاء الحيوي لانها تعطي نتائج غير حقيقية ، خصوصا ان هذا الاختبار يقتصر على تحديد القدرة على افراز الوحل (slime) بدلا من الكشف عن التصاق البكتريا على سطح مادة، لذلك تعتبر طريقة اطباق المعايرة الدقيقة (Microtitration plates method) ادق منها. استعملت في الدراسة طريقة اطباق المعايرة الدقيقة للكشف عن قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي بوصفها تقنية قياسية لسرعة التصاق الخلايا وتكوين الغشاء الحيوي في مختلف انواع الاحياء المجهرية كما في البكتريا السالبة لصبغة كرام او الموجبة لصبغة كرام او الخمائر , اذ ترتبط الصبغة المستعملة مع الجزيئات سالبة الشحنة على سطح الخلية البكتيرية من سكريات متعددة فتعطي كامل القياس لتكوين الغشاء الحيوي . بينت دراسة (22)ا ن طريقة MTP تعد الاكثر حساسية وسهولة للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي , وان الكشف عن انتاج المادة المخاطية يعتمد على عوامل عديدة مثل طريقة التحري المستعملة , نوع الوسط المستعمل وظروف الحضن , كما ان نتائج الدراسة الحالية تتفق مع دراسة (١٤) اذ بين ان طريقة MTP باستعمال وسط TSB مضاف اليه ١% كلوكوز كانت الاكثر دقة من طريقة CRA في الكشف عن انتاج الغشاء الحيوي والقدرة على الالتصاق كما موضح في الشكل (٥) و (٦).

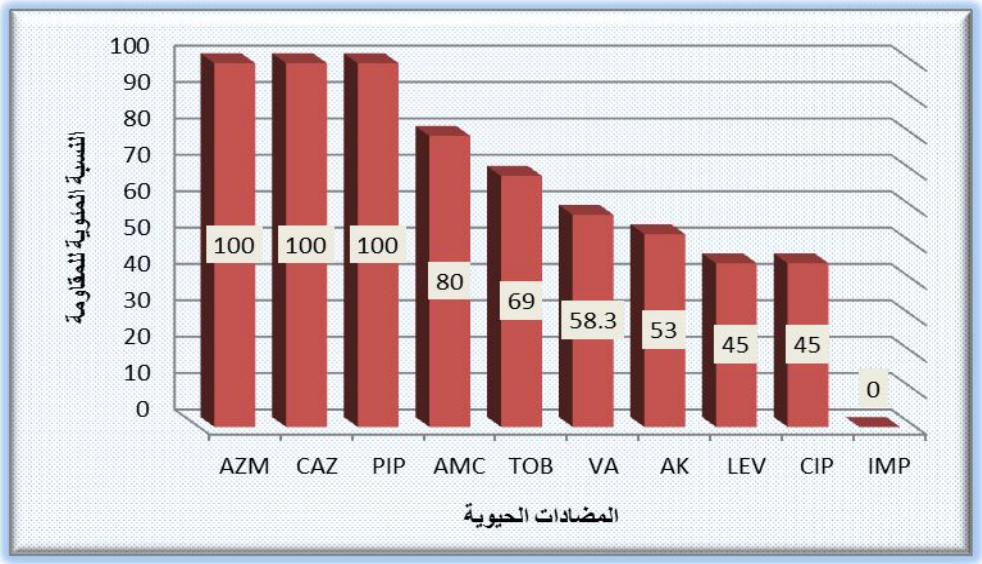



**شكل (٦) النسبة المئوية لقدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الكونغو الاحمر الصلب**




**شكل (5) النسبة المئوية لقدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي باستعمال طريقة اطباق المعايرة الدقيقة**

أختبرت حساسية (15) عزلة من بكتريا *S. aureus* قيد الدراسة المكونة للغشاء الحيوي تجاه عشرة من المضادات الحيوية , وحددت النتائج بوصف البكتريا مقاومة R او حساسة S من خلال قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة ذلك بما ورد في CLSI (١٨) و أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (7) ان هناك تباينا في مقاومة العزلات قيد الدراسة تجاه المضادات المستعملة، فقد بينت النتائج ان جميع عزلات بكتريا المكورات العنقودية كانت مقاومة لمضادات ( Ceftazidime و Piperacillin و Azithromycin) بنسبة ١٠٠% , فيما كانت حساسة لمضاد (Imipenem) بنسبة ١٠٠% ، واختلفت حساسيتها تجاه المضادات المستعملة الاخرى.

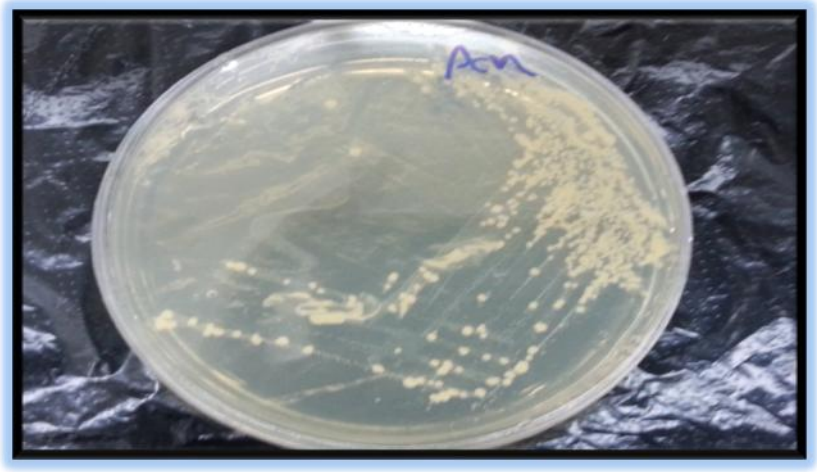


**شكل(7) النسب المئوية لعزلات بكتريا *S. aureus* المقاومة لمضادات**

وقد جاءت هذه النتائج متوافقة تقريبا لنتائج (23) عند اجرائهم فحص الحساسية لعدد من المضادات الحيوية تجاه بكتريا المكورات العنقودية الذهبية , وتتقارب نتائجنا الحالية مع ما اوردته (24) اذ كانت مقاومة *S.aureus* لمضاد الفانكومايسين هي (٤٠%).فقد جاءت نتائجنا الحالية على خلاف ما تشير اليه عدد من الدراسات وقد يعزى سبب التباين في نسب المقاومة للمضادات الحيوية بين دول العالم الى طبيعة النظام الصحي المعمول به وطريقة الاستعمال وعدد سنوات الاستعمال. افراد البكتريا ممكن ان تكتسب مقاومة مجموعة مضادات البيتالاكتام واسعة الطيف بوساطة آليات مختلفة , واحدة من اهم هذه الأليات هو البلازميد الذي يشفر الى مقاومة انزيمات البيتالاكتاميز ESBL و Ampc (٢٥) . الممرضات البكترية حاليا هي اكثر تعقيدا , لا يمتلكون آلية المقاومة المتمثلة ب (ESBLs) فقط , لكن هذه العزلات غالبا ما تنتج انزيمات متعددة والتي تسبب مشاكل علاجية خطرة في اجزاء عديدة من العالم (26) . الجراثيم المكونة للغشاء الحيوي تمتلك حماية من الوسائل المناعية للمضيف والمضادات الحيوية وتعد هذه صفة رئيسة في استمرار الاصابة, وهذه الكائنات تظهر مقاومة عالية للعلاج , مما يؤدي الى خلق مشكلة كبيرة , ولكي تكون هذه المضادات فعالة ضد هذه الجراثيم فمن الضروري استعمال تراكيز اعلى (٥٠٠-٢٠٠٠) مرة من تلك المطلوبة لقتل الجراثيم الغير مكونة للغشاء الحيوي من النوع نفسه (27) .

## عزل وتشخيص خميرة *Saccharomyces cerevisiae*

امكن الحصول على اربع عزلات لخميرة *S. cerevisiae* تم تنشيطها من خمائر الخبز الجافة المستوردة من مناشئ مختلفة والمتوافرة في الاسواق المحلية، وتم التأكد من جنس الخميرة ونوعها اعتماداً على المفاتيح التشخيصية التي تشمل الصفات المظهرية والزرعية والفحوصات الكيموحيوية الواردة في (17) والموضح في الشكل (٨).



**شكل (٨) نمو خميرة *S. cerevisiae* على وسط السابرويد الصلب**

## الفعالية التضادية لرواشح عزلات خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ضد عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية.

### غربلة عزلات خميرة *S.cerevisiae*

يعد تنقية هذه العزلات عدة مرات على اوساط متخصصة والتاكد من نقاوتها , اخضعت لعملية الغربلة بالاعتماد على قطر منطقة التثبيط التي تحدثها رواشح الخميرة ضد (10) عزلات من بكتريا *S.aureus* المكونة للغشاء الحيوي والمقاومة لمعظم المضادات الحيوية والمنماة على وسط مولر –هنتون باستعمال طريقة الانتشار بالاكار (طريقة الحفر) ,اظهرت النتائج في الجدول (١) تباين تأثير عزلات خميرة *S.cerevisiae* (التي تم تركيز رواشحها لمرة واحدة) ضد عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من حالات مرضية مختلفة, إذ لم تظهر رواشح الخميرة المركزة لمرة واحدة جميعها أية فعالية تثبيطية عند تنميتها فى وسط GYEP السائل خلال مدة الحضن (٢٤) ساعة ضد عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية , ما عدا الرواشح المركزة لمرة واحدة والمنماة على نفس الوسط التي تعود لعزلات الخمائر (SY2,SY1) والتي اظهرت تأثيرا تثبيطيا اتجاه عزلات البكتريا وكما موضح في الجدول نفسه,اذ سجل راشح عزلة الخميرة المركز (Packmaya SY2 ) *S.cerevisiae*

اعلى فعالية تثبيطية متمثلة بمعدل قطر منطقة تثبيط بلغ (١٣,١) ملم , فيما انخفضت الفعالية التثبيطية للراشح المركز لعزلة الخميرة Angel(SY1) اتجاة البكتريا نفسها متمثلة بمعدل قطر تثبيطي بلغ (١٠) ملم شكل (٩).

**جدول(1): التاثير التثبيطي لرواشح خميرة *S. cerevisiae* الخام والمركز (مرة واحدة ) ضد بكتريا *S.aureus***

| عزلة الخميرة (رمزة) | معد ل قطر منطقة التثبيط (ملم) | |
|---|---|---|
| | الراشح الخام | الراشح المركزمرة واحدة |
| SY1 | - | ١٠ |
| SY2 | - | ١٣,١ |

**(-) =لا يوجد تثبيط للنمو**

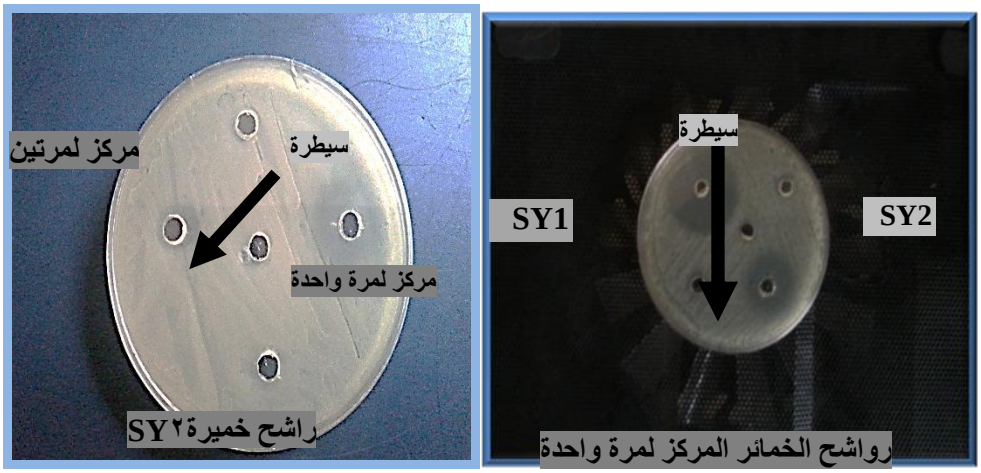
اظهرت النتائج في الجدول (2) ان تأثيرا واضحا في انتاج وثباتية المواد المثبطة التي انتجتها عزلة الخميرة Packmaya SY2 بعد تركيز رواشحها لمرتين . حيث ابدت فعالية تثبيطية عالية اتجاه العزلات البكتيرية كافة , اذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (١٧,٨) ملم لرواشح العزلات بعد تركيزها مرتين ضد عزلة البكتريا.

**جدول (2): تأثير تركيز راشح خميرة SY2 *S.cerevisiae* ضد عزلات بكتريا *S.aureus* المكونة للغشاء الحيوي**

| رقم العزلة البكتيرية | قطر منطقة التثبيط (ملم ) لخميرة SY٢ *S.cerevisiae* | |
|---|---|---|
| | راشح الخميرة مركز مرة واحدة | راشح الخميرة مركز مرنين |
| Sa2 | ١٣ | ١٦ |
| Sa5 | ١٠ | ١٥ |
| Sa6 | ١٥ | ١٩ |
| Sa9 | ١٦ | 20 |
| Sa10 | ١٠,٥ | 14 |
| Sa12 | ١٢ | ١٧ |
| Sa13 | 13.5 | ١٩ |
| Sa17 | ١٤ | ١٨ |

| | | |
|---|---|---|
| **Sa20** | ١١ | ١٦ |
| **Sa23** | **16** | **24** |
| معدل منطقة التثبيط(ملم) | ١٣,١ | **17.8** |

تشير النتائج اعلاه الى ان اكثر عزلات الخمائر ذات الفعالية التثبيطية اتجاه عزلات البكتريا المستعملة كانت الخميرة Packmaya SY2 . على الرغم من اكتشاف ظاهرة القتل بين الخمائر منذ وقت طويل وتوالي الدراسات حول الية تأثير السموم اتجاه الاحياء المجهرية, الا ان التقارير والبحوث والدراسات حول تأثير سموم الخمائر اتجاه البكتريا او الية تثبيطها لنمو البكتريا المرضية بقيت غير معروفة او مدروسة بشكل متكامل (٢٨) .يمكن ان يعود سبب تثبيط رواشح الخميرة الى نمو بكتريا المكورات العنقودية الذهبية في الدراسة الحالية الى انخفاض الاس الهيدروجيني للوسط الزرعي ولكون البكتريا لا تستطيع العيش في وسط حامضي , وهذا ما اشار اليه (٢٩) في دراسته التي اكدت ان الخمائر تنتج احماضا كنواتج للتخمرات مؤدية الى انخفاض الاس الهيدروجيني للوسط الزرعي الذي يعمل بدوره على تثبيط نمو البكتريا مثل انتاج حامض الاكتيك ولا سيما ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل بكتريا *S.aureus* ويثبط كذلك فعالية نمو الاحياء المسببه لفساد الاطعمة مثل*Clostridium spp.* و *S.aureus* و *Enterobacteria* .




**شكل (٩) التاثير التثبيطي لراشح خميرة *S.cerevisiae* المركز في نمو بكتريا *S.aureus* بطريقة الحفر**

ان تباين استجابة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من حالات مرضية مختلفة الى التثبيط بوساطة خميرة *S.cerevisiae* القاتلة ربما يعود الى اختلاف سلالاتها التي تختلف في عدد ومستقبلات السم الموجودة على الجدار الخلوي للخلايا الحساسة لها, وهذا يتفق مع ما تم تبريره من قبل (29) لسبب تباين استجابة سلالات خميرة *Candida albicans* الى التثبيط بوساطة الخمائر القاتلة لاختلافها في عدد المستقبلات المتوفرة على الجدار الخلوي للخلايا الحساسة اثناء تداخلها مع السموم القاتلة. اشار(30) الى دور مستخلص خميرة *S.cerevisiae* في تثبيطها لالتصاق بكتريا المكورات الذهبية بالخلايا Endothelial cells في الانسان من خلال ارتباطها بمواد بروتينية ذات وزن جزيئي عالٍ يقدر(٢٢٠) كيلو دالتون.

## المصادر


١. **Alalem**,A.M.(2008). Antibiotic Resistant Staphylococcus aureus Infection Studies In Hospitals. Doctoral Thesis. Middle East Technical University.

٢. **Jawetz** Melnick and Adelberg,s; Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A.(2004). Medical Microbiology. 23th ed. Appelton & Longe. Coliforina Woodford N. Biological counterstrike: Antibiotic resistance mechanisms of gram-positive cocci. *Clin Microbiol Infect*. (2005); 11 Suppl 3: 2-21.

٣. **Forbes**, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S.(2002). Baily and Scott's Dignostic Microbiology. 11th ed. Mosby, Inc, St. Louis. U.S.A.

٤. **Stepanović.** S. ; Vuković, D. ; Hola, V. ; Di-Bonaventura, G. ; Djukić, S. ;Cirković , I. and Ruzicka, F.( 2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci.* J. APMIS. ,115: 891-899.

٥. **Kostenko**, V. ; Ceri, H. and Martinuzzi R. J.(2007). Increased tolerance of Staphylococcus aureus to vancomycin in viscous media. J. Immunol. Med. Microbiol.,51: 277– 288.

٦. **Cooper**, B.S. ; Medley, G.F. ; Stone, S.P. ; Kibb1er, C.C. ; Cookson, B.D. ; Roberts , J.A. ; Duckworth, G. ; Lai, R. and Ebrahim, S. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: Stealth dynamics and control catastrophes. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) of the USA., 101(27): 10,223-8.

٧. **Bashir**, A. ; Mujahid, T.Y. and Jehan. N. (2007). Antibiotic resistance profile: Isolation and characterization of clinical isolates of Staphylococci from patients with community – acquired skin infections. J. Pharm .Sci. 20(4):299-304.

٨. **Hassan**, A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. ; Iqbal, M. (2011). Detection and antibiotic susceptibility

pattern of biofilm producing gram positive and gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. *Malaysian J. Microbiol.*, **7**(1), 57-60.

٩. **Kaur**, I. P.; Chopra, K. and Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur. J. Pharmaceutical. Sci. 15: 1-9.

١٠. **(WGO)** World Gastroenterology Organisation. (2011). Probiotics and prebiotics.

١١. **Sakamoto**, T.; Hasunuma, T.; Hori, Y.; Yamada, R. and Kondo, A. (2012). Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. Journal of Biotechnology.158: 203-

١٢. **Mushtaq**, M.; Sharfun-Nahar and Hashmi, M. H. (2013). Screening of killer-sensitive pattern (KSP) for biotyping yeast strains isolated from dairy products. Pak. J. Bot. 45(3): 1039-

١٣. **Nagaveni,**S.,Rajeshwari,H.,Kumar,A,Patil,S.A.andChardrakanth,R.K (2010). Evaluation of biofilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*.5(4):563-1044..566

١٤. **Bose,**S.,Khodke,M.,Basak,S.,Mallick,S.K.(2009).Detection of biofilm producing Staphylococci: need of the hour.J.Clin. Diag.Res.,3:1915-1915.

١٥. **(CLSI)** Clinical Laboratory Standards Institute. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test.

١٦. **Herrero,** M. B.; de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1999). Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. Biology of Reproduction. 61: 575-58.

١٧. **Ellis**, D. H. (1994). Clinical Mycology. The Human Opportunistic Mycosis. Gillingham Printers PTY Ltd.

١٨. **Gupta**, S. (1996). The Short Text Book of Pediatrics. 7th ed., Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.

١٩. **Seif El-Din**, S. S. ; El-Rehewy, M. S. ; Ghazaly, M. M. ; Abd-Elhamid, M.H.(2011). Biofilm formation by blood stream Staphylococcal isolates from febrile pediatric cancer patients at south Egypt cancer institute. *J. American Sci.* **7**(1), 674-686.

٢٠. **Ranjbar,** R.; Owlia, P.; Saderi, H.; Mansouri, S.; Jonaidi-Jafari, N.; Izadi, M.; Farshad, S. and Mohammad Arjomandzadegan, M. (2011). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burned Patients Hospitalized in a Major Burn Center in Tehran, Iran. *Acta. Medica. Iranica.* 49(10): 675-679.

٢١. **Bozkurt,** H. ; Kurtoglu, M.G. ;Bayram, Y. ;Kesli , R. and Berktas , M.(2009). Correlation of slime production investigated via three different methods in coagulase-negative *Staphylococci* with crystal violet reaction and antimicrobial resistance. *J. Int .Med. Res.*,37(121-128).

٢٢. **Samie**,A.;Nkgau,T.F.(2012).Biofilm production and antibiotic susceptibility profile of Escherichia coli isolates from HIV and AIDS patients in the Limpopo Province.Afr.J.Biotechnol.,11(34):8560-8570.

٢٣. **حسين**,مروان يوسف و نظام ,عدنان علي (٢٠١٢). عزلات من الجر ، المترافقة مع إنتانات الأذن في المستشفى الوطني بالقامشلي ومدى مقاومتها للمضادات الحيوية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية المجلد ٢٨ (العدد الأول):ص٣٧٤-٣٨٨.

٢٤. **الشويخ** ، رنا مجاهد عبدالله (٢٠٠٦) .أنتاج وتوصيف protease من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية وعلاقته ببعض مضادات الحياة .أطروحة دكتوراه . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

٢٤. **Branger,** C.; Zamfir, O.; Geoffroy, S.; Laurans, G.; Arlet, G.; Thien, H.V.; Gouriou, S.; Picard, B. and Denamur, E. (2005). Genetic Background of *Escherichia coli* and Extendedspectrum β-Lactamase Type. *Emerg. Infect. Dis*. 1(11):54-61.

٢٥. **Sharma** , J.; Ray, P. andSharma, M. (2010). Plasmid profile of ESBL producing Gram-negative bacteria and correlation with susceptibility to β-lactam drugs. Indian. *J. Pathol. Microbiol*. 1(53): 83-86.

٢٦. **Gohl,O**. ; Friedtich , Z. ; Hopper,M. and Averhoff,B. (2006). The thin pilli of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. Appl. Environment. Microbiol .72(2):1394-1401.

٢٧. **Izgu**,F.; Altinbay,D. and Sagiroglu, A.K. (1999).Isolation and characterization of the K6 type killer protein.Microbios.,99:161-172.

٢٨. **Lowes**,K.F.; Sheaman,C.A.; Payne,J.; Mackenzie,D.; Archer,D.B.;Merry,R.J.and Gasson,M.J.(2000).Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMk. Appl. Environ. Microbiol.,66(3):1066-1076.

٢٩. **Hodgson**,V.J. ; Button,D.and Walker,G.M. (1995).Anti-Candida activity of anovel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. Microbiol.,141:2003-2012.

٣٠. **Elliot,**D.A. ;Hatcher,V.B. and Lowy,F. (1991).A220-. kilodalton glycoprotein in yeast extract inhibits *Staphylococcus aureus* adherence to human endothelial cells.Infect.Immun.,59(6):2222-2223.

# Inhibitory Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Filterates on Growth *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation

**Dr. Fatima Rammadan Abdul**
Department of Biology / College of Science / Al-Mustansiryia University.

## ABSTRACT

The study included detecting the inhibitory ability of *Saccharomyces cerevisiae* ( isolated from commercial bakeris yeasts) against growth of *Staphylococcus aureus* isolated from different pathogenic cases.Thirty isolate of the bacterium *Staphylococcus aureus* were isolated . It was diagnosis based on the methods of microscopic , cultural and biochemical and final diagnosis using Vitek 2system . Two methods were used to detect biofilm production which included Congo Red Agar (CRA) and microtiter plates (MTP) . The results showed that (MTP) was more sensitive for biofilm detection as with a percentage of (83.3%) isolate biofilm producer, (%60) isolate biofilm producer with (CRA) method and other isolates are not biofilm producer . Antibiotic sensitivity test Which showed the resistant of bacteria different to antibiotics, all clinical isolates of *S.aureus* was resistant by (%١٠٠ )Piperacillin, Azithromycin , Ceftazidime and sensitive to the Imipenem (%١٠٠ ).

Dry imported bakery yeasts that are available in locally markets were used to obtain isolates of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* , Which included of SY1 isolate from Angel yeast (Chinese origin ) and SY2 isolate from Packmaya yeast (Turkish origin ) .

Unconcentrated filterates of the yeast isolates did not show any inhibitory effect against *S. aureus* isolates, while their concentrates(one fold) of yeast isolates (SY1,SY2) exhibited effects was recorded average diameters of inhibition zoon (10,13) mm respectively,. Concentrated filterates (two folds) of yeast isolates

(SY2) showed considerable best effect against of bacterial isolates. the average diameters of inhibition zoon by yeast extract was (17.8)mm.