دراسة فعالية المواد المثبطة المنتجة من بكتريا *Streptococcus thermophilus* في تثبيط نمو وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm لبعض البكتريا المرضية

Study of Inhibitory agent produced *by Streptococcus thermophilus* on growth and Biofilm formation for some pathogenic bacteria

جيهان عبد الستار سلمان　　خولة جبر خلف　　محمد فرج المرجاني
كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

Jehan A.S. salman　　Khawlah J. khalaf　　Mohammed F. Al-Marjani
College of Science/ AL-Mustansiriya University

المستخلص

درست الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Streptococcus thermophilus* المركز وغير المركز تجاه بعض البكتريا المرضية والتي شملت *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp. Pseudomonas aeruginosa Escherichia coli,* . ثم قدرت الفعالية التثبيطية للبروتين المستخلص من راشح بكتريا *S. thermophilus* المركز بعد ترسيبه بكبريتات الامونيوم، كما قدرت الفعالية التثبيطية للطبقة الدهنية المستخلصة من الراشح المركز بأستخدام كلوروفروم – ميثانول (1:1 حجم/حجم) تجاه البكترية المرضية . شملت الدراسة ايضا دراسة تأثير مادة المستحلب الحيوي Biosurfactant المنتجة من بكتريا *S. thermophilus* في تثبيط نمو وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm للبكتريا المرضية. بينت النتائج وجود فعالية تثبيطية واضحة لراشح بكتريا *S. thermophilus* المركز وغير المركز تجاه جميع البكتريا المرضية قيد الاختبار . كما اعطى كل من البروتين والطبقة الدهنية فعالية تثبيطية تجاه البكتريا المرضية، اما فيما يخص المستحلب الحيوي Biosurfactant فقد اعطى هو الاخر فعلا تثبيطيا لنمو جميع البكتريا المرضية ، فيما ادى الى تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S. aureus, E.coli* .

Abstract

Inhibitory activity of *Streptococcus thermophilus* unconcentrated and concentrated filtrate was studied against some pathogenic bacteria included: *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureu, Escherichia coli.* Inhibitory activity of protein that extracted from *S. thermophilus* concentrated filtrate was studied after precipitate by ammonium sulphate and inhibitory activity of lipophilic fraction that extracted from concentrated filtrate with chloroform-methanol (1:1 vol/ vol) was studied against pathogenic bacteria. Also inhibitory activity of biosurfactant produced by *S. thermophilus* was studied against growth and biofilm formation for pathogenic bacteria. The results showed that unconcentrated and concentrated filtrate had inhibitory activity against all pathogenic bacteria. Also protein and lipophilic fraction had inhibitory effect against pathogenic bacteria, while the biosurfactant show inhibitory activity against growth of all pathogenic bacteria but show inhibitory effect on biofilm formation only for pathogenic bacteria *S. aureus* and *E. coli.*

المقدمة

تعود بكتريا *Streptococcus thermophilus* الى مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك وتوصف بأنها موجبة لصبغة كرام ، كروية الشكل ، تترتب بشكل ازواج او سلاسل ، لاهوائية اختيارية ، درجة الحرارة المثلى لنموها 37م ولها القدرة على النمو بدرجات الحرارة العالية [2،1]. تمتلك هذه البكتريا مواصفات المعززات الحيوية (Probiotics) ولذا تستخدم بشكل واسع في هذا المجال ، كما لها تأريخ طويل في استخدامها الآمن كبادئ في صناعة اللبن الرائب yoghurt [3]. تعرف المعززات الحيوية على انها خلايا مايكروبية او مشتقاتها تؤدي عند تناولها الى تأثيرات مفيدة على صحة المضيف [4] تنتج بكتريا حامض اللاكتيك ومنها بكتريا *S.thermophilus* العديد من المواد المثبطة للنمو المايكروبي

الكلمات المفتاحية : *Streptococcus thermophilus* ، الغشاء الحيوي Biofilm ، البكتريا المرضية

وذات التأثير التثبيطي لنمو المايكروبات المرضية وتلك المسببة لتلف الاغذية ، ومن تلك المواد حامض اللاكتيك وحامض الخليك وحامض الفورميك والايثانول وبيروكسيد الهيدروجين والداي استيل والبكتريوسينات والحوامض الدهنية [5، 6 ، 7]. تكون بكتريا البادئ هذه فعالة في الوقاية والعلاج لبعض الامراض المتسببة عن المايكروبات المرضية وبعدة آليات منها انتاج العديد من المواد المثبطة وقدرتها على تثبيط استعمار البكتريا المرضية ومعالجة اصابات الجهاز الهضمي ولاسيما تلك المتسببة عن بكتريا *Clostridium difficile* و *Helicobacter pylori* [8] . كما لها دور في الحد من مشاكل سوء هضم اللاكتوز [9]. ولبادئ الالبان *S.thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* دور في تحفيز الجهاز المناعي [10] فضلا عن دورها في تثبيط البكتريا المسببة للاسهال[11]. تستعمل بكتريا *S.thermophilus* او بكتريوسيناتها كمعززات حيوية او كمادة حافظة لاطالة مدة حفظ الاغذية وتثبيط البكتريا المسببة للتلف مثل *Clostridium sporogenes* و*Clostridium tyrobutyricum* ، كما يمتلك البكتريوسين المنتج من هذه البكتريا والمسمى Thermophilin فعالية واسعة ضد العديد من الانواع البكتيرية المرضية مثل *Listeria monocytogenes* و *Salmonella typhimurium* و *Escherichia coli* و*Yersinia pseudotuberculosis* و *Yersinia enterocolitica* [12،13] . تنتج بكتريا *S.thermophilus* ايضا الـ Biosurfactant ذو الفعالية التثبيطية تجاه البكتريا والفطريات والفايروسات [14]

وتعرف Biosurfactants بالمواد الحيوية التي تقلل الشد السطحي والمنتجة من قبل بعض المايكروبات ، وتعمل كمواد ضد مايكروبية ومضادة للالتصاق وتساعد في التخلص من بعض الاحياء وتحتوي هذه المواد تراكيب متعددة مثل glycolipid وLipolipid وphospholipids و fattyacids و polysaccharide –protein complex . ويمتلك المستحلب الحيوي (Biosurfactant) دور في تثبيط التصاق الممرضات المسببة لاصابات المجاري البولية ، كما يستعمل كعامل وقائي لمنع التصاق البكتريا المسرطنة [15] .

نظرا لقلة الدراسات المحلية حول بكتريا *S.thermophilus* والمواد المثبطة التي تنتجها ولأهمية هذه البكتريا العلاجية والوقائية ودورها في تثبيط الممرضات البكتيرية جاءت هذه الدراسة بهدف التحري عن المواد المثبطة المنتجة من بكتريا *S.thermophilus* وأستخلاصها ودراسة تأثيرها التثبيطي في نمو بعض البكتريا المرضية فضلا عن دراسة تأثير الـ Biosurfactant المنتج منها في تثبيط النمو وأنتاج الغشاء الحيوي Biofilm لتلك البكتريا المرضية .

المواد وطرائق العمل :

العزلات البكتيرية

- بكتريا *Streptococcus thermophilus* : تم الحصول عليها من مختبرات قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية. تم التأكد من تشخيصها باتباع الفحوصات الزرعية والاختبارات الكيموحيوية الواردة في [1].

- عزلات البكتريا المرضية : تم الحصول على اربع عزلات من البكتريا المرضية من مختبرات قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية . والتي شملت :

Klebsiella spp, *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus*

تم التاكد من تشخيصها باجراء الفحوصات الكيموحيوية حسب ما ورد في [16].

- تقدير الفعالية التثبيطية لرواشح بكتريا *S.thermophilus* المركز وغير المركز تجاه البكتريا المرضية .

حضر راشح المزرعة السائلة بتنمية بكتريا *S. thermophilus* في انابيب اختبار حاوية على وسط De –Man – Rogosa - Sharpe(MRS) السائل بنسبة لقاح 2% (10^8 خلية/مل) وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة . نبذت مركزياً بسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق للحصول على سائل الخلايا الحرة للمزروع . رشح السائل من خلال مرشحات دقيقة Millipore filters بقطر 0.22 مايكروميتر . بعدها تم تركيز الراشح [17] . استخدمت طريقة الانتشار في الحفر Well-diffusion التي وصفها [18] للكشف عن الفعالية التثبيطية للراشح المركز وغيرالمركز لبكتريا *S. thermophilus* اذ زرعت الاطباق الحاوية على وسط الاجار المغذي بنشر 0.1 مل من مزروع البكتريا المرضية قيد الاختبار، وباستعمال الناشر الزجاجي المعقم ، واستعمل ثابت الفلين لعمل ثقوب قطرها 5 ملم على سطح الوسط . ملئت كل حفرة بـ 50 مايكروليتر من الراشح المركز وغير المركز كلا على انفراد ، حضنت بعدها الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة. وقيست مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت مع معاملة السيطرة الحاوية على وسط MRS السائل دون لقاح بكتيري.

- أستخلاص المواد المثبطة المنتجة من بكتريا *S.thermophilus* وتقدير فعاليتها التثبيطية تجاه البكتريا المرضية :

* أستخلاص البروتين من الراشح المركز وتقدير فعاليته التثبيطية :

أستخدم الترسيب بكبريتات الامونيوم كخطوة لتنقية البروتين وذلك باضافة كبريتات الامونيوم الصلبة الى راشح بكتريا *S.thermophilus* المركز مع التحريك المستمر وصولا الى نسبة اشباع 80% حفظ بعدها هذا المحلول بدرجة 4م لمدة 24 ساعة للسماح بترسب البروتين بشكل كامل . نبذ مركزياً بسرعة 000 10 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق . علق بعدها الراسب بمحلول Phosphate Buffer Saline المعقم [12] ، ثم قدرت الفعالية التثبيطية بأستعمال طريقة الأنتشار في الحفر [18].

*أستخلاص الطبقة الدهنية من الراشح المركز وتقدير الفعالية التثبيطية:

أستخلصت الطبقة الدهنية من راشح بكتريا *S.thermophilus* المركز باستخدام كلوروفورم – ميثانول 1:1 حجم /حجم تم تجفيف طبقة الكلوروفورم المتكونة ، وفصلت الطبقة الدهنية واعيد تعليقها بمحلول PBS المعقم لتقدير الفعالية التثبيطية [17].

-أستخلاص المستحلب الحيوي Biosurfactant المنتج من بكتريا *S. thermophilus* وتقدير فعاليته التثبيطية :

أستخلص المستحلب الحيوي المنتج من بكتريا *S.thermophilus* باتباع الطريقة الواردة في [15] ، أذ لقح وسط MRS السائل بمزرعة بكتريا *S.thermophilus* بعمر 24 ساعة ، حضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة . نبذت مركزياً بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق ثم غسلت مرتين وأعيد تعليق الخلايا بمحلول PBS ثم تركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين على المحرك المغناطيسي ،نبذت مركزيا للتخلص من بقايا الخلايا بعدها رشح السائل من خلال مرشحات دقيقة Millipore filters بقطر 0.22 مايكروميتر للحصول على المستحلب الحيوي . استخدمت طريقة الانتشار في الحفر [18] لتقدير فعالية المستحلب الحيوي في تثبيط نمو البكتريا المرضية ،كما اختبرت فعاليته في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي للبكتريا المرضية قيد الأختبار .

-تقدير فعالية المستحلب الحيوي Biosurfactant المستخلص من بكتريا *S.thermophilus* في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي

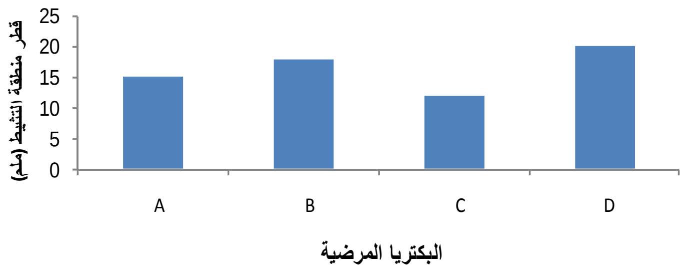
أختبرت أولا قابلية البكتريا المرضية على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة Christensen [19] وذلك بتلقيح انابيب الأختبار الحاوية على وسط المرق المغذي Neutrient broth بمزارع البكتريا المرضية قيد الأختبار كلا على انفراد وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة ، سكب بعدها المزروع البكتيري وتركت الانابيب لتجف ثم صبغت بصبغة Crystal violet لمدة 15 دقيقة . بعدها سكبت الصبغة وتركت الانابيب لتجف ، عدت النتيجة موجبة عند ظهور الخلايا ملتصقة على جدران الانبوبة بعد مقارنتها مع انبوبة السيطرة الحاوية على وسط المرق المغذي دون لقاح بكتيري.

لدراسة تاثيرالمستحلب الحيوي Biosurfactant في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي نقلت مستعمرة بكتيرية من كل من البكتريا المرضية قيد الأختبار الى انابيب الأختبار الحاوية على وسط المرق المغذي المضاف له Biosurfactant المستخلص من بكتريا *S.thermophilus* ، حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37م لفترات الحضن 24 ،48،72 ساعة ، ثم تم أتمام الخطوات اللازمة للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي كما ذكر اعلاه ولكل فترة من فترات الحضن وقورنت مع انابيب السيطرة الحاوية على المزروع البكتيري دون اضافة Biosurfactant ولفترات الحضن الثلاثة.

النتائج والمناقشة :

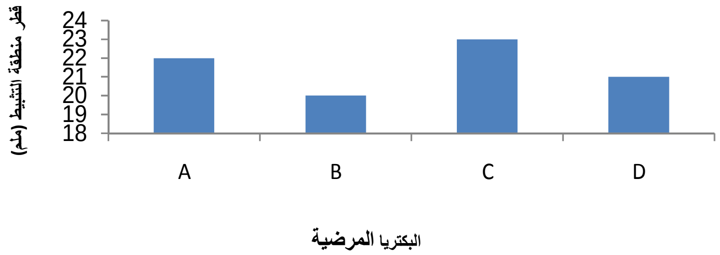
الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *S.thermophilus* المركز وغير المركز

تم تقدير الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *S.thermophilus* تجاه البكتريا المرضية *S. aureus ,Klebsiella* spp., *E.coli, P.aeruginosa* للتأكد من امتلاكها التأثير التثبيطي وانتاجها للمواد المثبطة .اظهرت النتائج امتلاك راشح بكتريا *S.thermophilus*غير المركز فعالية تثبيطية تجاه جميع البكتريا المرضية قيد الاختبار، عندما أعطى مناطق تثبيط بمعدل أقطار 12،15، 18،20 ملم تجاه بكتريا *S. aureus* و*Klebsiella spp* و *E.coli,* و *P.aeruginosa* على التوالي شكل (1).



شكل (1) : الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *S.thermophilus* غير المركز تجاه البكتريا المرضية
A-S.aureus B-Klebsiella* spp. *C- E.coli D-P.aeruginosa

أدى تركيز راشح بكتريا *S.thermophilus* الى زيادة الفعالية التثبيطية تجاه البكتريا المرضية ، ويوضح شكل (2) زيادة الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *S.thermophilus* بشكل ملحوظ عند زيادة اقطار مناطق التثبيط مقارنة باقطار مناطق التثبيط لدى استخدام الراشح غير المركز، اذ تراوحت معدلات اقطار مناطق التثبيط بين 20-23 ملم تجاه البكتريا المرضية قيد الاختبار .

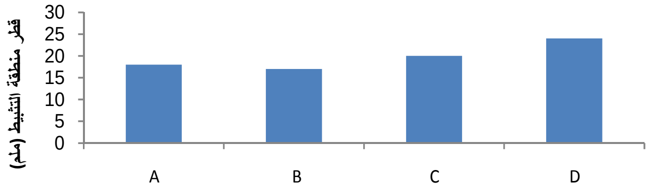


شكل (2) :الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *S.thermophilus* المركز تجاه البكتريا المرضية
A-S.aureus B-Klebsiella* spp. *C- E.coli D-P.aeruginosa

يتضح من النتائج اعلاه امتلاك راشح بكتريا *S.thermophilus* غير المركز فعالية تثبيطية تجاه البكتريا المرضية ، ويمكن ان يعزى التأثير التثبيطي للراشح لما يحتويه من مواد مثبطة ولاسيما الحوامض والبكتريوسين [20] بينت النتائج زيادة الفعالية التثبيطية للراشح لدى تركيزه ، اذ تزداد الفعالية التثبيطية لرواشح بكتريا حامض اللاكتيك بشكل واضح لدى تركيزها [21] وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع آراء الباحثين حول الفعالية التثبيطية لبكتريا *S.thermophilus* ، اشار [3] ان بكتريا *S.thermophilus* لها تأثير تثبيطي تجاه *Klebsiella pneumonia* و *P.fluorescens* و *E.coli* و*S. aureus* كما اشار[11] الى قدرة بكتريا *S.thermophilus* على تثبيط البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام. كما لاحظ [22] امتلاك راشح بكتريا *S.thermophilus* فعالية تثبيطية واسعة تجاه البكتريا الموجبة لصبغة كرام قيد دراسته.

أستخلاص البروتين من الراشح المركز لبكتريا *S.thermophilus* ودراسة فعاليته التثبيطية تجاه البكتريا المرضية

أستخدم الترسيب بكبريتات الامونيوم كخطوة أولية لتنقية البروتين لما تمتاز به من قابلية عالية على ترسيب البروتينات بسبب معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والاخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما يؤدي الى انخفاض في ذوبان البروتين وبالتالي ترسيبه [23]. يعد استخدام الترسيب بكبريتات الامونيوم خطوة اولية واساسية لتنقية بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك في العديد من الطرق المستخدمة لتنقية تلك البكتريوسينات [24] .
بينت نتائج الدراسة الحالية ترسيب البروتين المنتج من بكتريا *S. thermophilus* بنسبة اشباع 80% مع امتلاكه فعالية تثبيطية عالية تجاه البكتريا المرضية قيد الاختبار ويوضح شكل (3) الفعالية التثبيطية الملحوظة لبروتين *S.thermophilus* (شبيه بكتريوسين Thermophilin) تجاه البكتريا المرضية *S. aureus* و *Klebsiella* spp. و *E.coli* و *P.aeruginosa* اذ اعطى مناطق تثبيط بلغ معدل اقطارها على التوالي (18 ، 17 ، 20 ، 24) ملم.



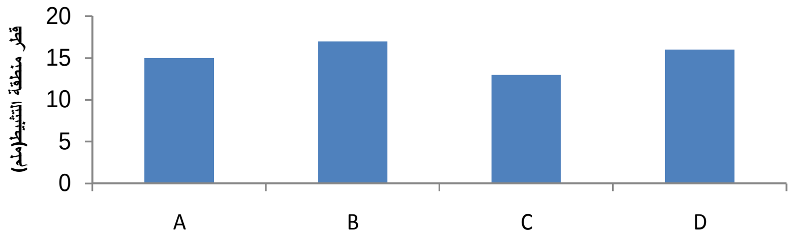
شكل (3): الفعالية التثبيطية لبروتين بكتريا *S.thermophilus* تجاه البكتريا المرضية
A-*S.aureus* B-*Klebsiella* spp. C- *E.coli* D-*P.aeruginosa*

يتضح مما تقدم أمتلاك بكتريا *S.thermophilus* القدرة على انتاج المواد المثبطة البروتينية (البكتريوسينات) وفعاليتها في تثبيط البكتريا المرضية ، وبهذا الخصوص فقد اشار [12] الى التأثير التثبيطي لبكتريوسين *S.thermophilus* تجاه بكتريا *S. aureus* و *E.coli*. كذلك لاحظ [22] ان البكتريوسين المنتج من بكتريا *S.thermophilus* له تأثير تثبيطي تجاه البكتريا الموجبة لصبغة كرام. فيما وجد [24] ان بكتريوسين Thermophilin المنتج من بكتريا *S.thermophilus* كان فعالا في تثبيط بكتريا *S. aureus* و*Pseudomonas*. وتعود فعالية البكتريوسين هذه الى امتلاكه الفعل القاتل والقدرة على الارتباط بمستلمات الخلايا المتخصصة ، اذ يعد الغشاء السايتوبلازمي الهدف الرئيسي للبكتريوسين ، وتسبب معاملة الخلايا به سرعة التدفق غير المتخصص للاحماض الامينية والايونات موجبة الشحنة وانفجار الغشاء الخلوي وبالتالي موت الخلايا الحساسة له [25] .

أستخلاص المادة الدهنية من الراشح المركز لبكتريا *S. thermophilus* وتقدير فعاليتها التثبيطية تجاه البكتريا المرضية

أختبرت الفعالية التثبيطية للطبقة الدهنية المستخلصة من الراشح المركز لبكتريا *S . thermophilus* باستخدام كلوروفورم – ميثانول (1 : 1 حجم / حجم) للكشف عن دور المادة الدهنية المنتجة من قبل البكتريا اعلاه في تثبيط نمو البكتريا المرضية قيد الاختبار . بينت النتائج وجود فعالية تثبيطية للمادة الدهنية المستخلصة من راشح بكتريا *S . thermophilus* تجاه البكتريا المرضية *S . aureus* و*Klebsiella* spp. و*E . coli* و *P . aeruginosa* وبمعدل اقطار تثبيط تراوحت بين 13- 17 ملم و كانت بكتريا *Klebsiella spp* الاكثر تأثراً عندما بلغ معدل قطر التثبيط 17ملم فيما كانت بكتريا *E . coli* الاقل تأثراً بالمادة الدهنية شكل (4) .

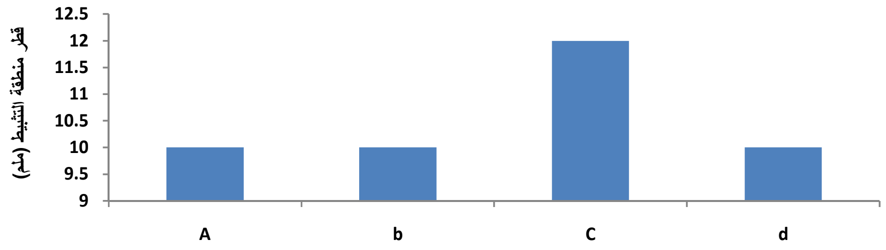
يتضح من نتائج الدراسة الحالية وجود فعالية تثبيطية للمادة الدهنية المنتجة من بكتريا *S .thermophilus* والمستخلصة من راشحها تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وهذا يتفق مع [26]. بوجود فعالية تثبيطية لبكتريا المعززات الحيوية تعود لجزيئات دهنية موجودة في رواشح تلك البكتريا ولها دور في اختزال حيوية البكتريا المرضية مثل *Salmonella typhimurium* ، *E. coli* ، *pseudotuberculosis Yersinia* ، *S . aureus* ، *Klebsiella pneumonia*. لاحظ [17] وجود مواد دهنية مضادة للبكتريا في رواشح سلالات بكتريا *Bifidobacterium* لها فعلا مثبطا لنمو بكتريا *S. typhimurium* فضلا عن دورها في تثبيط غزو الخلايا بتلك البكتريا. يعد انتاج المواد الدهنية المضادة للبكتريا واحده من الأليات التي يعود لها فعل المعززات الحيوية في تثبيط التصاق البكتريا المرضية بالخلايا [27].



شكل (4) : الفعالية التثبيطية للمادة الدهنية المستخلصة من بكتريا *S . thermophilus* تجاه البكتريا المرضية .
A- *S . aureus* B-*Klebsiella* spp. C- *E . coli* D- *P . aeruginosa*

تقدير الفعالية التثبيطية للمستحلب الحيوي Biosurfactant المنتج من بكتريا *S. thermophilus* في نمو وتكوين الغشاء الحيوي للبكتريا المرضية .

درست الفعالية التثبيطية للمستحلب الحيوي Biosufactant المنتج من بكتريا *S . thermophilus* تجاه البكتريا المرضية . ويوضح شكل (5) تأثير المستحلب الحيوي في تثبيط بكتريا *S . aureus* و *Klebsiella* spp. و *P . aeruginosa* عندما اعطى مناطق تثبيط بلغ معدل اقطارها (10) ملم لكل منها ، فيما بلغ معدل قطر التثبيط تجاه بكتريا *E . coli* 12ملم .



شكل(5) : الفعالية التثبيطية للمستحلب الحيوي Biosurfactant المنتج من بكتريا *S. thermophilus* تجاه البكتريا المرضية
A- *S . aureus* B- *Klebsiella* spp. C- *E . coli* D- *P . aeruginosa*

من جانب اخر درست فعالية المستحلب الحيوي (Biosurfactant) المنتج من بكتريا *S . thermophilus* في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من قبل البكتريا المرضية ، وذلك من خلال التحري عن تكوين الغشاء الحيوي قبل وبعد معاملة البكتريا المرضية بالمستحلب الحيوي ولفترات حضن مختلفة و تبين النتائج في جدول (1) عدم وجود اي تأثير للمستحلب الحيوي على تكوين الغشاء الحيوي لجميع البكتريا المرضية قيد الاختبار لفترات الحضن 24 , 48 ساعة فيما كان التأثير التثبيطي للمستحلب الحيوي واضحاً تجاه بكتريا *S. aureus* و *E .coli* بعد فترة الحضن 72 ساعة ولم يلاحظ اي تأثير تثبيطي له تجاه بكتريا *P . aeruginosa* و *Klebseilla sp* لفترات الحضن الثلاثة . وهذا يتفق مع [28] من امتلاك Biosurfactanat المنتج من بكتريا *S . thermophilus* القدرة على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بعد فترة حضن 72 ساعة كما لاحظ أمتلاك المستحلب الحيوي المنتج من هذه البكتريا فعالية تثبيطية لنمو بكتريا *S . aureus* و *S . epidermidis* وخميرة *Candida tropicalis* ووصف Biosurfactant بالمادة المثبطة للمايكروبات والتي يختلف تاثيرها تبعاً لنوع الكائن المجهري المعامل بها . واشار [14] ايضاً الى التأثير التثبيطي للمستحلب الحيوي المنتج من بكتريا *S. thermophilus* في تكوين الغشاء الحيوي من قبل البكتريا والخمائر . كذلك وصف المستحلب الحيوي المنتج من بكتريا حامض اللاكتيك بكونه فعال في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *E . coli* و *S . aureus* و *L . monocytogenes* و *salmonella arizonae* [29] . ومما تقدم نلاحظ ان نتائجنا الحالية اتفقت مع الدراسات اعلاه في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *E . coli* و *S . aureus* من قبل الـ Biosurfactant ويعزى تأثير المستحلب الحيوي المنتج من بكتريا *S . thermophilus* في تثبيط تكوين الغشاء

الحيوي الى امتلاكه قابلية التأثير على التصاق المايكروبات من خلال تأثيره على القابلية الكارهة للماء لسطوح الخلايا الداخلية بعد امتصاصها للمستحلب الحيوي [15].

جدول (1): قابلية البكتريا المرضية على تكوين الغشاء الحيوي بغياب ووجود المستحلب الحيوي Biosurfactant المنتج من بكتريا *S . thermophilus*

البكتريا المرضية	تكوين الغشاء الحيوي					
	بوجود Biosurfactant			بغياب Biosurfactant		
	فترة الحضن (ساعة)					
	24	48	72	24	48	72
S . aureus	+	+	-	+	+	+
Klebsiella spp.	+	+	+	+	+	+
E . coli	+	+	-	+	+	+
P.aeruginosa	+	+	+	+	+	+

+ ظهور خلايا ملتصقة على جدران انابيب الأختبار

-عدم ظهور خلايا ملتصقة على جدران انابيب الأختبار

مما تقدم من نتائج دراستنا الحالية يمكن الاشارة الى امتلاك بكتريا *S . thermophilus* الفعالية التثبيطية تجاه البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام , وان الفعل التثبيطي لرواشحها يعود الى المواد المثبطة البروتينية (البكتريوسين) والحوامض الدهنية . كما تمتلك بكتريا *S. thermophilus* القدرة على انتاج Biosurfactant ذو التأثير التثبيطي لنمو البكتريا المرضية فضلاً عن تأثيره في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبعض البكتريا المرضية .

لذا فمن الاهمية تنقية المواد المثبطة المنتجة من بكتريا *S . thermophilus* تنقية كلية وتوصيف تلك المواد ولاسيما البكتريوسينات لاستخدامها في المجالات الطبية وفي مجال حفظ الاغذية فضلاً عن تنقية وتوصيف الـ Biosurfactant المنتج من هذه البكتريا بشكل كامل لاستخدامه كمادة وقائية لأعاقة تكوين الغشاء الحيوي على مواد القسطرة وبالتالي التقليل من حدوث الاصابات في المستشفيات دون الحاجة الى استعمال المزيد من الادوية والمواد الكيمياوية .

References:

1. Hardie, J.M and Whiley, R.A. (1995). The Genus *Streptococcus*. In:The Genera of Lactic Acid Bacteria.Edited by Wood,B.J. and Holzapfel,W.H.

2. Robinson, R. K., Tamime, A. Y. and Wszolek, M. (2002). Microbiology of Ferment Milks. In: Dairy Microgiology Hand book, 3th ed, edited by Robinson, R. K. Wiley – Interscience, inc.

3. Akpinar, A., Yerlikaya, O. and Kiliç, S. (2011). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. African J.of Microbiol Res. 5(6): 675-682.

4. الخفاجي ، زهرة محمود. (2008). التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزيئية) ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا . جامعة بغداد . بغداد . العراق . ص442 .

5. Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc, A, Habjanič K, Matošić S. (2010). Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technol. Biotechnol. 48(3): 296-307.

6. Vuyst, L. De and Leroy, F. (2010) Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria:Production, Purification, and Food Applications J Mol Microbiol Biotechnol.13:194–199.

7. Ukeyima, M. T., Enujiugha, V. N. and Sanni, T. A. (2010). Current applications of probiotic foods in Africa. African J. of Biotechnol. 9 (4): 394-401.

8. Petti S, Tarsitani G. and Simonetti D'Arca A. (2008). Antibacterial activit of yoghurt againts viridans streptococci *in vitro*. Arch. Oral Biol. 53: 985-990.

9. FAO and WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London Ontario, Canada.

10. الخفاجي، زهرة محمود. (2008). الأحياء العلاجية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا . جامعة بغداد . بغداد . العراق .

11. Nurhajati, J., Chrysanti, I., Indrawati, I. and Syaftika, N. (2008). Antibacterial Activity of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* Soygurt Cultures., Proc ASEAN Congr Trop Med Parasitol. 3:51-8.

12. Aslam, M., Shahid, M., Rehman, F. U., Naveed, N. H., Batool, A. I., Sharif, S. and Asia, A. (2011). Purification and characterization of bacteriocin isolated from *Streptococcus thermophilus*. African J. of Microbiol. Resear. 5(18): 2642-2648.

13. Hassam , A. N and Frank, J.F. (2001). Starter cultures and their use In: Applied Dairy Microbiology . 2ed Edit by Marth, E . hand steele, L . J, Marcel Dekker, In c. U. S. A

14. Rodrigues, L., Van Der Mei, H., Banat, I.M., Teixeira, J. and Oliveira, R. (2006). Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus*, FEMS Immunology & Medical Microbiol. 46(1):107-112.

15. Rodrigues, L.R., Jos´e, A., Henny, C., van der M. and Ros´ario O. (2006). Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus*. Biointerfaces. 53: 105–112.

16. Forbes, B.A., Saham, D.F and weissfeld, A.S. (2002). diagnostic Microbiology. 10thed. Mosby. Inc. U.S.A.

17. lievin,V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F. and Servin, A.L. (2000). *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity.Gut. 47(5):646-652.

18. Gupta, U., Radramma, Rati, E.R. and Joseph, R. (1998). Nutritional Quality of lactic acid fermented bitter gourd and fenugreek leaves. Int. J. Food Sci. and Nutr. 94(2):101-108.

19. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bison, A. L and Beachy, H. (1982). Adherence of slime – producing strains of Staphlococcus epidermidis to smooth surfaces Infect. Immune. 37: 317 – 326.

20. Hamilton-Miller, J.M**.** (2004). Probiotics and prebiotics in the elderly, Postgraduate Medical Journal. 80:447-451.

21. Sreekumar, O. and Hosono, A. (2000). "Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture " J.Dairy Sci. 83:931- 939

22. Mezani, A., Nedjar – Arroume, chihib, N. E, Bouras, A. D. and Hornez, J. P. (2009). Antibacterial activity of some Lactic acid Bacteria isolated from an Algerian Dairy product. J. Environmental and public Health: 67:8495.

23. الشيخلي ، ظمياء محمود ابراهيم. (1999). دراسة البكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا حامض اللاكتيك. اطروحة دكتوراه . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

24. Aktypis, A. and Kalantzo poulos, G. (2003). Purification and Characterization of thermophilus ST-1, anovel acteriocin produced by Streptococcus thermophilus ACA-DCOOOI. Lait. 83: 365 – 378.

25. Mishra, C. and Lambert,J. (1996). Production of antimicrobial substance by probiotics. Asia pacific. J.Clin. Nutr. 5:20-24.1996.

26. Ohland,C.L. and MacNaughton,W.K. (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. AJP - GI, vol. 298 (6): 807-819.

27. Liu,C., Zhang, Z.Y., Dong, K. and Guo, Z.K. (2010). Adhesion and immunomodulatory effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 on intestinal epithelial cells INT-407. World J Gastroenterol.16 (18): 2283–2290.

28. Rodrigues, L., Van Der Mei HC, Teixeira, J. & Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prosthesis. Appl Environ Microbiol. 70: 4408 – 4410.

29. Fracchia, L., Mcavallo, M., Allegrone, G. and Martinotti, M.G. A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. Applied Microbiol. and Microbial. Biotech.(ed)