دراسة بكتريولوجية لصفة انتاج الساليفاريسين من بكتريا *Streptococcus salivarius* المعزولة من الفم

Bacteriological Study of salivaricin production from *treptococcus salivarius* isolated from the oral cavity

ابتهال عبد الهادي مجيد عبد الكريم عبد الرزاق القزاز مؤيد صبري سحر عبد الوهاب
قسم التقنيات الاحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد

Ibtihal AbdulHadi Majeed Abdulkareem Al-Kazaz, Moayad Sabri, Sahar Abdul-Wahab
Dept. of Biotechnology/ College of Science / University of Baghdad

المستخلص

جمعت 115 عينة (مسحات من التجويف الفمي) من اشخاص اصحاء امكن الحصول على 68 عزلة تعود للنوع *Streptococcus salivarius* ، وذلك بعد اجراء الاختبارات المجهرية والمزرعية والكيموحيوية والمصلية . تم التحري عن انتاج الساليفاريسين عن طريق اختبار الفعالية التثبيطية للعزلات المحلية من بكتريا *Streptococcus salivarius* قيد الدراسة تجاه بعض عزلات البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام . اظهرت 26 عزلة قابليتها على انتاج الساليفاريسين الذي اظهر فعالية تثبيطية اتجاه بعض عزلات البكتريا الموجبة لصبغة غرام خاصة النوع *Streptococcus pyogenes* بينما لم تلاحظ اي فعالية تثبيطية اتجاه عزلات البكتريا السالبة لصبغة غرام . انتخبت العزلة *Streptococcus* IS9 *salivarius* لكفاءتها وتاثيرها التثبيطي اتجاه عدد من بكتريا الاختبار قيد الدراسة . اختبرت الفعالية التثبيطية للعزلة المنتخبة تجاه 68 عزلة من بكتريا *S. Salivarius* الاخرى قيد الدراسة وقد اظهرت العزلة المنتخبة تاثيرا تثبيطيا اتجاه 45 عزلة في حين لم تتاثر 23 عزلة بذلك .

Abstract

A total of 115 samples (oral cavity swabs) were collected from healthy individuals. Sixty eight isolates were identified as *Streptococcus salivarius* using microscopical, biochemical and serotyping tests. The ability of *Streptococcus salivarius* local isolates to produce salivaricin was detected by testing the inhibitory activity against gram positive bacteria and gram negative bacteria. Results showed that only 26 isolates were capable of producing salivaricin and showed inhibitory activity against some gram positive isolates especially *S. pyogenes*, while no inhibitory effect was noticed towards the gram negative isolates that were used in this study. *S. salivarius* IS9 was selected according to its efficiency of inhibiting activity against a number of tested bacteria.The results of determination of antagonistic effect of IS9 against all local isolates of *S. salivarius* showed that 45 isolates of *them* were affected, while 23 isolates were not affected.

المقدمة

لقد ادى الاستعمال الواسع والعشوائي لمضادات الحياة ، و حدوث تطور في المقاومة لها الى عدم قدرة الصناعة الدوائية على تطوير مضادات فعالة وسريعة المفعول مما دفع الباحثين للاتجاه نحو استعمال بكتريا النبيت الطبيعي التي لها القابلية على انتاج البكتيريوسين والتاثير في وجود الانواع البكتيرية الممرضة [1] .

بكتريا النبيت الطبيعي هي البكتريا التي توجد بشكل طبيعي في اماكن مختلفة من جسم الكائن الحي و تجهز حواجز مهمة ضد الغزو بالممرضات ولبكتريا النبيت الطبيعي للفم ، والمجرى التنفسي العلوي القدرة على تثبط الممرضات التي تصيبها [2] ويحدث التثبيط بوساطة المنتجات الايضية مثل : الامونيا ، والاحماض العضوية ، وبيروكسيد الهيدروجين ، ومضادات الحياة ، و البكتيريوسينات [3] . تعد بكتريا *Streptococcus salivarius* المستعمر

الاول والدائم للطبقة المخاطية للفم ، ولا تسبب امراضا لكونها خالية من عوامل الضراوة [4] وتنتج انواعا من البكتيريوسينات التي تكون لها فعالية تثبيطية ضد الانواع القريبة الصلة بها وخاصة بكتريا *Streptococcus pyogenes* [5] .

تعرف البكتيريوسينات بانها مركبات ذات طبيعة بروتينية تصنع رايبوسوميا لها القدرة على تثبيط او قتل العديد من انواع البكتريا و تنتمي البكتيريوسينات المنتجة من بكتريا *Streptococcus salivarius* الى مجموعة الـ Lantibiotic ، وهي ببتيدات تحمل تسلسلات لاحماض امينية محورة بعد عملية الترجمة [6] .

وقد جاءت هذه الدراسة للاهمية التطبيقية لبكتريا *Streptococcus salivarius* بوصفها معززا حيويا (Probiotic) وذلك لما تنتجة من بكتيريوسينات مختلفة ولانعدام الدراسات المحلية التي تتطرق الى عزل الـ Salivaricin المنتج من بكتريا *Streptococcus salivarius* .

طرائق العمل

1. العزلات البكتيرية

جمعت العينات بأخذ مسحات من الفم لـ 115 شخص من الاصحاء تراوحت أعمارهم بين 6 أشهر الى 60 سنة من كلا الجذسين للمدة من تشرين الثاني 2006 ولغاية ايار 2007 ، تركزت المسحات المأخوذة على سطح اللسان واللعاب والبلعوم والصفيحة الجرثومية للاسنان ، زرعت المسحات على وسط مرق نقيع القلب والدماغ وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37م باستعمال Candle Jar.

نقلت العينات النامية على مرق نقيع القلب والدماغ الى وسط Mitis Salivarius Agar ، وحضنت بدرجة 37م لمدة 48 ساعة باستعمال Candle Jar ، ثم انتقاء المستعمرات المشكوك بكونها *Streptococcus salivarius* ونشطت بزرعها على وسط اكار نقيع القلب والدماغ ، وحضنت بدرجة 37م لمدة 24 ساعة باستعمال Candle Jar.

اجريت الفحوصات التجريبية لبكتريا *Streptococcus salivarius* اعتماداً على مصنف Bergey's [7 ، 8] .

2. الغربلة الكمية لعزلات بكتريا *S. salivarius* المنتجة للساليفاريسين

لغرض التحري عن قابلية العزلات على انتاج الساليفاريسين اتبعت عدة طرق اذ استخدمت طريقة اقراص الاكار وحسب الطريقة المذكورة في [9] و طريقة **Deferred antagonism** حسب الطريقة المتبعة في [3] و طريقة **Patch Test (Simultaneous Antagonism Test)** وحسب الطريقة الموصوفة من قبل [10] .

وتم تقدير الفعالية التثبيطية في الوسط السائل حسب الطريقة الموصوفة في [11] .

3. الفعالية التثبيطية لعزلات بكتريا *Streptococcus salivarius* اتجاه بعضها البعض

درس التداخل بين العزلة المنتخبة من بكتريا *Streptococcus salivarius* مع العزلات المحلية الاخرى قيد الدراسة وتم اعتماد طريقة اقراص الاكار المذكورة سابقا باستثناء وضع الاقراص الحاوية على الذمو البكتيري للعزلة المنتجة والمراد دراسة فعاليتها التثبيطية على سطح الوسط المذشور عليه مزروع من بكتريا *Streptococcus salivarius* الاخرى قيد الاختبار والحضن بدرجة 37 م باستعمال Candle Jar لمدة 24 ساعة .

النتائج والمناقشة

1- العزلات البكتيرية

جمع العينات

جمعت 115 عينة مختلفة شملت مسح من الفم والبلعوم ، وبعد دراسة الصفات المظهرية من شكل المستعمرات وشكل الخلايا البكتيرية واجراء الاختبارات الكيموحيوية ، اثبتت هذه الفحوصات عائدية 68 عزلة الى بكتريا *Streptococcus salivarius* ، اذ بلغت اعلى نسبة عزل تم الحصول عليها من اللسان 39 عزلة ، و12 عزلة من البلعوم ، و17 عزلة من اللعاب و0 عزلة من الصفيحة للاسنان وكما مبين في الجدول (1) .

جدول (1): الاعداد والنسب المئوية لعزلات بكتريا *Streptococcus salivarius* من اجزاء الفم المختلفة

مصدر العزل	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزل الاجمالي و النوعي (%)		*نسبة عزلها من العينات المعتمدة لكل مصدر %*
			* الاجمالي	**النوعي	
اللسان	50	39	33.91	57.4	*78*
البلعوم	30	12	10.43	17.6	*40*
اللعاب	25	17	14.78	25	*68*
الصفيحة الجرثومية للاسنان	*10*	*0*	*0*	*0*	*0*

*** النسبة المئوية من عدد العينات الكلي (115)**

**** النسبة المئوية من مجموع العزلات الكلي (68)**

وهذا يتفق مع [12] الذي اشار الى ان اعلى نسبة عزل لبكتريا *Streptococcs salivarius* كانت من اللسان اذ بلغت 67% ، اذ يعد اللسان المكان الاكثر وجوداً لبكتريا *Streptococcus salivarius* لكون هذه البكتريا لها القدرة على الالتصاق بالخلايا الظهارية للسان لامتلاكها لبيفات زغبية مغطية لسطحها [13] ، في حين بلغت نسبة عزلها من اللعاب 25% ، في حين اشار [14] الى ان نسبة وجود عزلات بكتريا *Streptococcus salivarius* في اللعاب (33.3 - 39.6) % ، بينما بلغت نسبة العزلات الماخوذة من البلعوم 17.6% و هذا يتفق لما اشارت اليه بعض الدراسات حول امكانية عزل هذه البكتريا من البلعوم [15] و يتضح من الذتائج المبينة في الجدول (1) عدم التمكن من عزل هذه البكتريا من الصفيحة الجرثومية للاسنان ، وهذا يتفق مع ما توصل اليه [16] الى ان نسبة وجودها في الصفيحة الجرثومية قليلة 1% بسبب ميل هذه البكتريا على الالتصاق بالطبقة الظهارية للفم وعدم مقدرتها على الالتصاق بالسن .

تشخيص العزلات

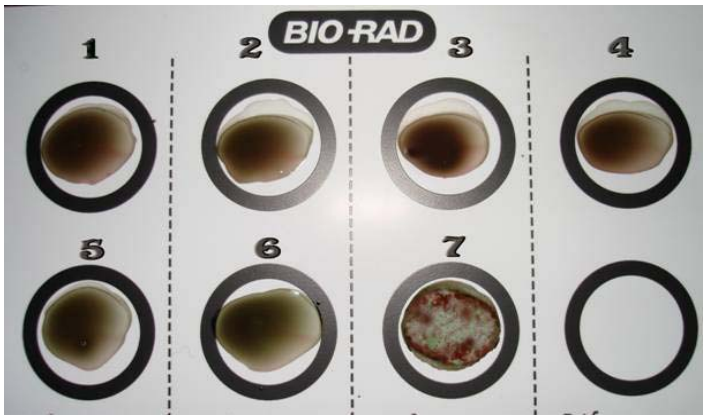
اظهرت المستعمرات المعزولة على وسط Mitis Salivarius Agar المجهز بـ 1% توليريت البوتاسيوم (Potassium tellurite) ذات شكل دائري محدب كبير، وبقطر (2-5) ملم زرقاء شاحبة ، وملساء او خشنة ، و لزجة تشبة قطرة الصمغ (Gum drop) [3] . ويعد هذا الوسط المستعمل انتقائيا لمجموعة المكورات المسبحية والمعوية لاحتوائه على توليريت البوتاسيوم وصبغة البلورات البنفسجية التي تعمل على تثبيط نمو البكتريا السالبة لصبغة غرام واغلب البكتريا الموجبة لصبغة غرام ماعدا المكورات المسبحية [8].

اخضعت العزلات النامية جميعها على الوسط الانتقائي الى الفحوصات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا *Streptococcus salivarius* ، ويتضح من الجدول (2) ان العزلات جميعها كانت غير منتجة لانزيم الكاتاليز [17] و كذلك امتازت بعدم قدرتها على النمو بدرجة حرارة (45 ، 10) م ورقم هايدروجيني 9.6 ، وعدم تحمل الملوحة العالية التي تصل الى 6.5 % كلوريد الصوديوم و اظهرت العزلات عدم القابلية على تحليل الحامض الاميني الارجنين ، وذلك لعدم امتلاكها انزيم Arginin Deaminase ، كما اظهرت العزلات القابلية على تحليل الاسكيولين بوساطة انزيم Esculinase والذي يعمل على تحليل جزيئة الـ Esculin الى جزيئتي سكر وجزيئة Esculetin ، والذي بدوره يتفاعل مع ايونات الحديديك الموجودة في الوسط مكونا معقدا ذا لون بني غامق الى اسود [8] كما امتازت العزلات بكونها غير محللة للدم γ–hemolysis على وسط اكار الدم اذ ظهرت بشكل مستعمرات بيضاء رمادية دائرية الشكل ذات تحدب قليل ملساء بقطر حوالي 1 مليمتر، كذلك اظهرت العزلات تباينا في قابليتها على تخمير السكريات المختلفة فقد اظهرت العزلات جميعاً القابلية على تخمير اللاكتوز ، والرافينوز ، في حين كانت العزلات غيرمخمرة للمانتول ، والسوربتول ، بينما اظهرت 61 عزلة اي بنسبة (89.7)% القدرة على تخمير الانيولين و 48 عزلة بنسبة (70.5)% القدرة على تخمير الرافينوز، ولم تتمكن العزلات المتبقية من ذلك وهذا يتفق مع ما ذكره [18] ومن الاختبارات التاكيدية لتشخيص النهائي للعزلات المنتجة للبكتيريوسين 26عزلة استعمال نظام التشخيص Strept– 20 Api والذي يتضمن 20 اختبارا كيموحيويا .

جدول (2) الاختبارات التشخيصية والكيموحيوية للعزلات المحلية لبكتريا *Streptococcus salivarius*

الاختبار		النتيجة
اختبار الكاتليز		-
النمو بدرجة 10 م و45 م		-
النمو بتركيز ملحي NaCl 6.5		-
النمو في الرقم الهيدروجيني 9.6		-
تحلل الارجنين		-
تحلل الاسكيولين		+
انتاج الهيمولايسين		γ
تخمر اللاكتوز		+
تخمر الرافينوز		+
تخمر المانتول		-
تخمر السوربتول		-
تخمر الانيولين	+	61 عزلة
	-	7 عزلة
تخمر التريهالوز	+	48 عزلة
	-	20 عزلة

اذا اظهرت العزلات التابعة جميعاً لجنس المكورات المسبحية فحصا موجبا لاختباري LAP ، والفوكس بروسكاور وسالبا لاختبار الانزيمات α-GAL وβ-GUR وPal واختباري PYRA و HIP ، اما المصادر الكاربونية فقد كانت العزلات جميعاً مخمرة للاكتوز، والرافينوز ، وغير مخمرة للكلايكوجين ، والسوربتول ، والمانتول ، والاربينوز ، والرايبوز ، فضلا عن كون العزلات جميعها محللة للاسكيولين وغير محللة للارجنين . ولدى مقارنة نتائج الاختبارات الكيموحيوية والاختبارات الواردة في هذا النظام كانت النتائج متطابقة للعزلات جميعاً التي شملتها الدراسة . كما اجري فحص التلازن الحبيبي للعزلات المنتجة كاحد الفحوص التشخيصية باستعمال المصول المضادة المتوافرة لمجاميع (A,B,C,D,G,F) . واظهرت النتائج ان العزلات لاتنتمي لاي نوع من هذه المجاميع ، وهذا يتفق مع ما ذكره [8] شكل (1) .



شكل (1): فحص التلازن الحبيبي لبكتريا *Streptococcus salivarius* وبكتريا *Streptococcus pyogenes* بين مستضد العزلة البكتيرية والضد الخاص بها

1- ضد مجموعة A من مجموعة لانسفيلد ومستضد بكتريا *Streptococcus salivarius* (عدم حصول تلازن حبيبي) .
2- ضد مجموعة B من مجموعة لانسفيلد ومستضد بكتريا *Streptococcus salivarius* (عدم حصول تلازن حبيبي) .
3- ضد مجموعة C من مجموعة لانسفيلد ومستضد بكتريا *Streptococcus salivarius* (عدم حصول تلازن حبيبي).
4- ضد مجموعة D من مجموعة لانسفيلد ومستضد بكتريا *Streptococcus salivarius* (عدم حصول تلازن حبيبي).
5- ضد مجموعة G من مجموعة لانسفيلد ومستضد بكتريا *Streptococcus salivarius* (عدم حصول تلازن حبيبي).
6- ضد مجموعة F من مجموعة لانسفيلد ومستضد بكتريا *Streptococcus salivarius* (عدم حصول تلازن حبيبي).
7- ضد مجموعة A من مجموعة لانسفيلد ومستضد بكتريا *Streptococcus pyogenes* (حصول تلازن حبيبي)

2- التحري عن البكتيريوسين

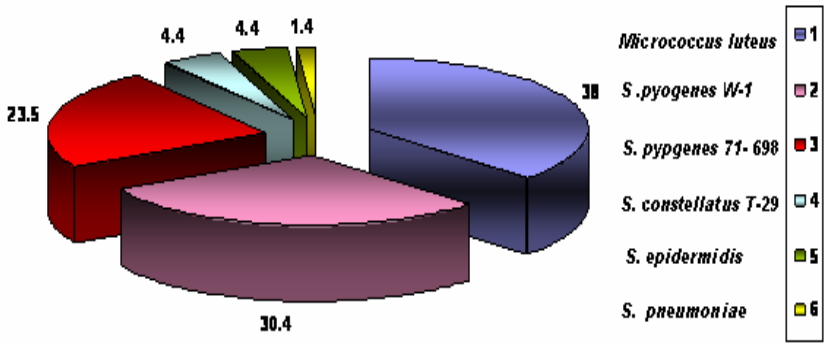
لاختبار قابلية عزلات بكتريا *Streptococcus salivarius* على انتاج الـ Salivaricin في الوسط الصلب ، استعملت طريقة الـ Patch test واقراص الاكار Cup Agar وطريقة Deferred antagonism ، اذ استعملت عزلات مختلفة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام لتقدير مدى استجابتها للبكتيريوسين المنتج من العزلات قيد الدراسة ، وقد اظهرت عزلات بكتريا *Streptococcus salivarius* المنتجة للساليفاريسين تباينا في التاثير التثبيطي اتجاه بكتريا الاختبار، اذ ترواح قطر الثبيط ما بين (7 – 23) مليمتراً بالنسبة لطريقة اقراص الاكار جدول(3) شكل (2) ، اما طريقة Patch test فقد تراوح قطر التثبيط ما بين (7 – 16) مليمتر جدول (4) شكل(3) فضلا عن عدم وجود تاثير تثبيطي للعزلات المحلية اتجاه اغلب عزلات بكتريا الاختبار السالبة لصبغة غرام مثل : بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، وبكتريا *Klebsiella pneumoniae* ، و بكتريا *E.coli* كما لوحظ تباينا في التاثير التثبيطي للعزلات نفسها في تلك الطريقتين السابقتين اذ اظهرت العزلات IS13 و IS17 و IS28 و IS63 منطقة تثبيط واسعة وواضحة في طريقة اقراص الاكار في الوقت الذي لم تستطع العزلات نفسها من الانتاج بطريقة الـ Patch test وتتفق هذه النتائج مع النتائج المستحصلة من قبل [19] عند استعمالهم طرائق عدة في التحري عن انتاج البكتيريوسين اذ اكدو كفاءة طريقة اقراص الاكار للكشف عن الفعالية التثبيطية للبكتيريوسين .

اما بالنسبة لطريقة Deferred antagonism للتحري عن انتاج الساليفاريسين اذ تستعمل هذه الطريقة اما لتحديد نموذج (P –type) لفعالية BLIS لبكتريا الاختبار او لمقارنة الحساسية لعزلات بكتيرية مختلفة اتجاه الـ BLIS المنتج على وسط الاكار ، ولعدم توافر جميع العزلات المستخدمة بوصفها دلائل فقد استخدمت اربع عزلات فقط لمعرفة الفعالية التثبيطية للساليفاريسين المنتج من بكتريا IS9 *Streptococcus salivarius* قيد الدراسة شكل (4).

ولدراسة الفعالية التثبيطية لراشح الـ Salivaricin المنتج من العزلات المحلية لبكتريا *Streptococcus salivarius* فقد اختبرت رواشح المزارع السائلة لهذه العزلات بطريقة Well Diffusion Method و لم تظهراي من العزلات فعالية تثبيطية ضد بكتريا الاختبار بهذه الطريقة .

من النتائج المذكورة يتضح لنا قابلية بعض العزلات على انتاج الـ Salivaricin في الاوساط الصلبة افضل قياساً بالاوساط السائلة ، وهذا جاء متفقا مع ما اشار اليه [20] الى ان الكائن المنتج في الوسط الصلب ليس بالضرورة ان يكون منتجاً في الوسط السائل ، كذلك اكد الباحث [21] الى اقتصار عزلات بكتيريا حامض اللاكتيك على انتاج البكتيريوسين في الوسط الصلب وعزى [22]عدم كفاءة بعض العزلات المنتجة للبكتيريوسين في اظهار فعاليتها في الوسط السائل الى افتقار الوسط السائل الى بكتريا الاختبار التي تعمل على تحفيز افراز البكتيريوسين تشير النتائج الموضحة في شكل (5) ان هنالك تفاوتا في نسبة تاثير عزلات بكتريا الاختبار بالساليفاريسين المنتج من العزلات المحلية لبكتريا *Streptococcus salivarius* فقد اظهرت 38% من العزلات تاثيرا مثبطا اتجاه بكتريا *Micrococcus luteus* و 30.4% تجاه بكتريا (I7) *Streptococcus pyogenes* w-1 و 23.5% ضد بكتريا (I8) *Streptococcus pyogenes* 71-698 و (4.4 ،4.4 ، 1.4)% ضد بكتريا (I3) *Streptococcus constellatus* T-29، وبكتريا *Staphylococcus epidermidis* ، و بكتريا *Streptococcus pneumoniae* على التوالي .

ولم تظهر اي من العزلات قيد الدراسة من بكتريا*Streptococcus salivarius* فعالية تجاه عزلات بكتريا الاختبار السالبة لصبغة غرام ، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [20] الى ان بكتريا *Micrococcus luteus*تكون حساسة لعدد كبير من بكتيريوسينات بكتريا *Streptococcus salivarius* مثل: الـ Salivaricin A ، و Salivaricin B فيما بين [4] ان بكتريا *Streptococcus constellatus*تكون حساسة لـ Salivaricin Bالمنتج من بكتريا *Streptococcus salivarius K12* ولا تكون حساسة لـ Salivaricin A . فيما اكدت العديد من الدراسات ان البكتيريوسين المنتج من بكتريا *Streptococcus salivarius* له فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Streptococcus pyogenes* ، اذ اشارالباحثين [23] الى ان البكتيريوسين Streptococcin sal-p المنتج من



شكل (2): النسبة المئوية لاعداد عزلات بكتريا الاختبار المثبطة بالسالفاريسين المنتج من عزلات بكتريا *Streptococcus salivarius*

جدول (3) : قابلية عزلات بكتريا Streptococcus salivarius المنتجة للساليفاريسن ضد عزلات الاختبار بطريقة اقراص الاكار (Cup Agar)

العزلات المحلية لبكتريا *Streptococcs salivarius*	*Micrococcus luteus* I1	*S .constellatus* I3	*S .pyogenes* I7	*S .pyogenes* I8	*S.aureus*	*S.epidermidis*	*S . pneumoniae*	*K.pneumoniae*	*L.monocytogenes*	*P.aeroginosa*	*E.coli*	*Salmonella*
IS2	19	_	20	18	_	_	_	_	_	_	_	_
IS6	8	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS7	18	_	16	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS9	23	11	20	19	_	_	8	_	_	_	_	_
IS11	14	_	12	12	_	_	7	_	_	_	_	_
IS13	8	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS15	16	_	15	18	_	_	_	_	_	_	_	_
IS17	20	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS20	19	11	18	18	_	8	_	_	_	_	_	_
IS23	12	_	11	12	_	_	7	_	_	_	_	_
IS25	15	_	12	12	_	_	_	_	_	_	_	_
IS28	12	_	10	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS30	12	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS35	19	_	17	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS38	9	_	8	8	_	_	_	_	_	_	_	_
IS45	13	_	12	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS46	15	_	8	9	_	_	_	_	_	_	_	_
IS47	18	9	16	16	_	_	_	_	_	_	_	_
IS49	6	_	5	5	_	_	_	_	_	_	_	_
IS50	18	_	16	16	_	_	_	_	_	_	_	_
IS54	9	_	8	9	_	_	_	_	_	_	_	_
IS58	15	_	12	13	_	_	_	_	_	_	_	_
IS61	12	_	11	11	_	_	_	_	_	_	_	_
IS63	19	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS66	7	_	7	_	_	_	_	_	_	_	_	_
IS68	*12*	_	*11*	*7*	_	_	_	_	_	_	_	_

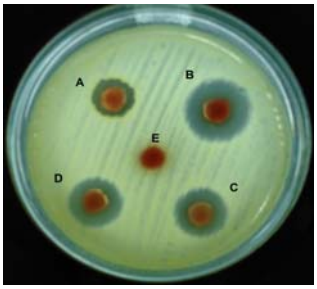
الفعالية التثبيطية ضد عزلات بكتريا الاختبار (قطر منطقة التثبيط بالمليمتر mm)

بكتريا *Streptococcus salivarius* strain p له فعالية تثبيطية ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام خاصة المكورات المسبحية مثل: بكتريا *Streptococcus pyogenes* وبكتريا *Streptococcus sanguis* ، ولكن ليس له فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Streptococcus mutans* اومجموعة D من المكورات المسبحية ، في حين

اوضح [24] ان البكتيريوسين المنتج من بكتريا *Streptococcus salivarius* له فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Streptococcus pneumoniae* ، كذلك اشار [25] ان البكتيريوسين المنتج من بكتريا *Streptococcus salivarius* يثبط نمو البكتريا التي تتطلب الـ Pantothenate مثل : بكتريا *Streptococcus* و *Lactobacillus* ، وبعض انواع بكتريا *Staphylococcus* ، وبكتريا *Proteus morganii* حيث يستخدم الـ Pantothenate في تخليق الـ Coenzyme A و Acyl carrier protein التي تساعد في الحفاظ على الغشاء الخلوي وفي حالة كبح ايض الـ Pantothenate يؤدي الى موت الخلايا . في حين لم تكن لـبكتريا *Streptococcus salivarius* قيد الدراسة اية فعالية تذكر ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام ، وهذاجاء متفقا مع ما ذكره كل من [6،25] ومن هذا نستدل ان اغلبية العزلات من بكتريا *Streptococcus salivarius* المنتجة لـ Salivaricin 26 عزلة قيد الدراسة قد اتصفت بتاثيرها ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام بمدى تثبيط مختلف وتاثير منعدم ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام .

جدول (4): قابلية عزلات بكتريا *Streptococcus salivarius* المنتجة للساليفاريسين ضد عزلات الاختبار بطريقة Patch culture

العزلات المحلية لبكتريا *Streptococcs salivarius*	*الفعالية التثبيطية ضد عزلات بكتريا الاختبار (قطر منطقة التثبيط بالملمتر mm)*											
	Micrococcus luteus I1	*S.constellatus* I3	*S.pyogenes* I7	*S.pyogenes* I8	*S.aureus*	*S.epidermidis*	*S. pneumoniae*	*K.pneumoniae*	*L.monocytogenes*	*P.aeroginosa*	*E.coli*	*Salmonella*
IS2	12	–	14	12	–	–	–	–	–	–	–	–
IS6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS7	10	–	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS9	16	9	15	15	–	–	8	–	–	–	–	–
IS11	9	–	8	8	–	–	9	–	–	–	–	–
IS13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS15	11	–	10	10	–	–	–	–	–	–	–	–
IS17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS20	15	8	13	13	–	8	–	–	–	–	–	–
IS23	10	–	12	8	–	–	10	–	–	–	–	–
IS25	12	–	10	10	–	–	–	–	–	–	–	–
IS28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS30	6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS35	15	–	15	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS38	12	–	7	7	–	–	–	–	–	–	–	–
IS45	8	–	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS46	11	–	15	10	–	–	–	–	–	–	–	–
IS47	16	11	10	11	–	–	–	–	–	–	–	–
IS49	7	–	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS50	13	–	11	12	–	–	–	–	–	–	–	–
IS54	17	–	15	16	–	–	–	–	–	–	–	–
IS58	12	–	9	9	–	–	–	–	–	–	–	–
IS61	8	–	10	8	–	–	–	–	–	–	–	–
IS63	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS66	–	–	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–
IS68	*7*	–	*7*	*9*	–	–	–	–	–	–	–	–

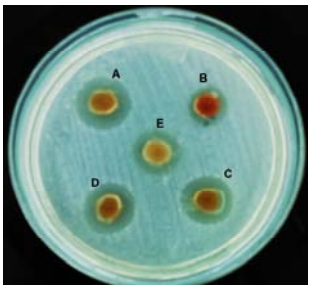


A: *S . salivarius* IS 61
B: *S . salivarius* IS 9
C: *S . salivarius* IS 47
D: *S . salivarius* IS 19
E: *S . salivarius* IS 8

أ

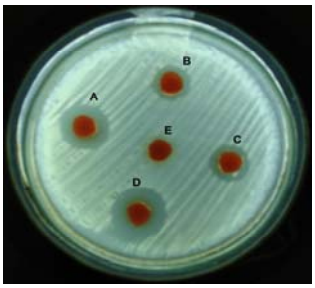
A: *S . salivarius* IS 15
B: *S . salivarius* IS 9
C: *S . salivarius* IS 20
D: *S . salivarius* IS 66
E: *S . salivarius* IS 58

ب



A: *S . salivarius* IS 9
B: *S . salivarius* IS 58
C: *S . salivarius* IS 35
D: *S . salivarius* IS 20
E: *S . salivarius* IS 47

ج

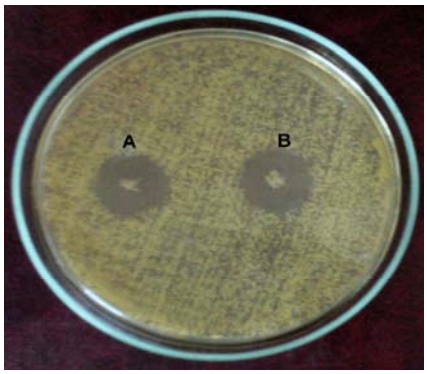


A: *S. salivarius* IS 15
B: *S. salivarius* IS 25
C: *S. salivarius* IS 23
D: *S. salivarius* IS 9
E: *S. salivarius* IS 24

د

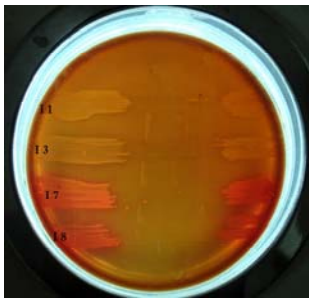
شكل (2): الفعالية التثبيطية للساليفارسين المنتج من بعض عزلات بكتريا *Streptococcus salivarius* باستخدام طريقة Cup Agar اتجاه بكتريا الاختبار

أ- *M .luteus* ب- *S. constellatus* ج- *S . pyogenes w-1* د- *S. pyogenes 71-698*



الشكل (3) الفعالية التثبيطية بطريقة الـ Patch test لعزلتين من بكتريا *Streptococcus salivarius* اتجاه العزلة الحساسة *Micrococcus luteus*

A: *S .salivarius* IS 9
B: *S .salivarius* IS 47



الشكل(4): الفعالية التثبيطية للساليفاريسين المنتج من العزلة *Streptococcus salivarius* IS 9 باستخدام طريقة Deferred Antagonism اتجاه الانواع البكتيرية:

Micrococcus luteus **: I1**
Streptococcus constellatus T-29 **: I3**
***Streptococcus pyogenes* W-1** **: I7**
***Streptococcus pyogenes* 71-698** **: I8**

3-الفعالية التثبيطية للعزلة المنتخبة *Streptococcus salivarius* IS9 اتجاه العزلات العائدة لبكتريا *Streptococcus salivarius* الاخرى

انتخبت العزلة IS9 لكفاءتها وتاثيرها التثبيطي ضد عدد كبير من بكتريا الاختبار باسخدام الطرق المختلفة لاجل اعتمادها في اختبار الفعالية التثبيطية اتجاه العزلات الاخرى من بكتريا *Streptococcus salivarius* ، وقد بلغت الفعالية التثبيطية للعزلة المنتخبة تجاه 45 عزلة اي بنسبة 66% ، في حين لم تتاثر 23 عزلة اي بنسبة(44)% بالبكتيريوسين المنتج من العزلة IS9 وكما موضح بالجدول (5) ، وتميزت العزلات IS46 ، وIS17 ، و IS54 ، وIS28 ، وIS6 بانها منتجة للبكتيريوسين لكن حساسة للبكتيريوسين المنتج من العزلة IS9 ، وقد يرجع ذلك الى انتاجها بكتيريوسين من نوع اخر او حصول طفرة في جين المناعة . اما العزلات IS56 و IS32 وIS37 فقد كانت غير منتجة للبكتيريوسين الا انها قاومت الفعالية التثبيطية للعزلة IS9 ، وقد يعود ذلك الى ان هذه العزلات تمتلك مواقعاً تشفر لانتاج البكتيريوسين والتمنيع ضده لكن حصلت طفرة في الجينات البنائية ادت الى توقف التعبير عن انتاجه ، اذ اشار[26] الى ان العزلة *Streptococcus salivarius MPS* فقدت انتاج الـ SalA بسبب حدوث طفرة مفردة (Single-bp mutation) في الجين التركيبي (*salA*) Structural gene وكذلك بين امكانية حصول طفرة انغرازية (16-bp) في الجين البنائي *salA* للعزلة H16H نتج منه طفره Fram-shift mutation مما ادى الى توقف انتاج الـ SalA ، بينما اشار الباحث [3] الى احتمال حصول انغراز لترانسبوزون (Transposon) في موقع انتاج الـ SalA للعزلة K33 *Streptococcus salivarius* نتج منه توقف انتاجه.

جدول (5): الفعالية التثبيطية للعزلة *Streptococcus salivarius* IS9 اتجاه العزلات الاخرى من بكتريا *Streptococcus salivarius*

المجموعة	العزلات	قطر منطقة التثبيط (مليمتر)
1	IS1,IS12,IS18,IS48	10
2	IS3,IS31,IS44,IS28	7
3	IS4,IS5,IS55	12
4	IS8,IS16,IS65,IS67	11
5	IS10,IS46,IS33,IS6	9
6	IS21,IS24	20
7	IS22,IS34,IS52,IS26,IS43,IS57,IS17	8
8	IS29,IS51,IS60	22
9	IS36,IS41,IS54	13
10	IS39,IS59	16
11	IS14,IS19,IS27,IS40,IS42,IS53,IS62	19
12	IS64,IS25	21
13	IS2,IS7,IS9,IS11,IS13,IS15,IS20,IS23 IS30,IS37,IS47,IS49,IS50, IS32,IS35,IS38,IS45, IS56 IS58,IS61,IS63,IS66,IS68	–

المصادر :

1. **Jack ,** R.W.; Tagg, J.R. and Ray, B. (1995). Bacteriocin of gram – positive bacteria Microbiol. Rev., 59(2):171-200.
2. **Walls, T**; Power, D. and Tagg , J.R. (2003) .Bactericin – like inhibitory substance (BLIS) production by the normal flora of the nasopharynx : potential to protect against otitis media . J. Med. Microbiol. , 52: 829-833.
3. **Dierksen** , K.P. ; Moore , C.J.; Inglis , M. ; Wescombe , P.A. and Tagg , J. R. (2007). The effect of ingestion of milk supplemented with salivaricin A – producing *streptococcus salivarius* on the bacteriocin – like inhibitory activity of streptococcal population on the tongue. FEMS Microbiol.Ecol.59:584-591.
4. **Wescombe** , P.A. ; Upton , M. ; Dierksen , K.P. ; Ragland , N.L. ; Sivabalan , S. ; Wirman , R.E. ; Inglis , M.A.; Moore, C.J. ;Walker ,G.V.; Chilcott , C.N. ; Jenkinson , H.F. and Tagg, J.R. (2006b) . Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by presence in human saliva. Appl. Environ. Microbiol. , 72: 1459- 1466.
5. **Tagg** , J.R. (2004) .Prevention of *Streptococcus salivarius* by anti – *Streptococcus pyogenes* bacteriocin like inhibitory substance (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius* . Indian J.Med. Res., 119: 13-16.
6. **Heng** , N.C .K. ; Wescombe , P.A.; Burton , J.P.; Jack , R.W. and Tagg, J.R. (2007) . The diversity of bacteriocin in gram – positive bacteria. In: Bacteriocin Ecology and Evolution by Riely, M.A. and Chavan, M.A. Springer – Verlag, Berlin. Heidelberg.
7. **Holt,** J.G.; Krieg, N.R.; Sneath , P.H. ; Staley , J.T. and Williams , S.T. (1994). Bergy's manual of determinative bacteriology .9th (ed.).William and Wilkins,Baltimore.London.
8. **Dworkin** ,M. ; Falkow, S.; Rosenberg ,E. ;Schleifer ,K .and Stackebrandt, E.(2006).The Prokaryotes: A Handbook on the Biology .3th(ed.) Sprnger Science +Business Media, LLC**.**
9. **Vinderola** ,C.G; Mocchlutti ,P and Relnhelmer ,J .A.(2002).Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products .J .dalry Sci., 85:721-729
10. **Campo** , R. ; Tenorio, C. ; Jimenez-Diaz , R. ; Rubio , C. ; Gomez-Lus , R. ; Baquero , F.and Torres , C.(2001). Bacteriocin production in Vancomycin Susceptible *Enterococcus* Isolates of different origins. J. Antimicrob. Agents Chemother ., 45:905-912
11. **Gupta** , U.; Radramma, A.; Rati, E.R .and Joseph, R .(1998). Natritional quality of lactic acid fermentel bitter international .J. Food. Sci. and Nutrition.49 (2):101-108
12. **Gibbons** ,R .J.(1964).Bacteriology of dental caries . J. Dent. Res. 43:1021-1028
13. **Handley**,P. S. ;Carter , P. L.and Fielding , J . (1984) . *Streptococcus salivarius* Strain Carry Either Fibrils or Fimbriae on the Cell Surface.J.Bacteriol., 157(1):64-72.
14. **Isogal, E**.; Isogal , H.; Sawada H .; Kaneko , H . and Ito, N.(1985) .Microbial ecology of plaque in rats with naturally occurring gingivitis.Infect.Immun.,48:520-527.

15. **Gonzalez,** B.; Glaasker , E.; Kunji , E.R.S.; Driessen , A.J.M.; Suarez , J.E. and Konings , W.N.(1996). Bacteriocidal mode of action of plantaricin C .Appl. Environ. Microbiol., 62: 2701-2709.
16. **Houte** , J .;Gibbs, G. and Butera, C.(1982).Oral flora of children with " Nursing Bottle Caries" .J. Dent Res.,61(2):382-385.
17. **Doran**, A.; Kneist, S.; Verran , J. (2004). Ecological control: Invitro Inhibition of Anaerobic bacteria by oral *Streptococci*. Microbiol. Ecology in health and Desease. 16:23-27.
18. **Facklam** , R. (2002) . What Happened to streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev. 15 (4): 613-630.
19. القندلا ، نهى جوزيف نجيب . (2006) . انتاج وتنقية وتوصيف الانتروسين المنتج من بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة محليا من مصادر سريرية مختلفة ، اطروحة دكتوراة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية .
20. **Ross,** K. F.; Ronson , C.W. and Tagg , J. R. (1993). Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gen sal A from *Streptococcus salivarius* 20p3 . Appl.Environ. Microbiol ., 59:2914-2021.
21. **Cintas** , L.M. ; Casaus , M.P.; Herranz , C. ; Nes , I.F. and Hernandes , P.E. (2001).Review : Bacteriocins of lactic acid bacteria . Food Sci. Tech. Int.7: 281-305.
22. **Pugsley** ,A. P.(1983).Auto induced synthesis of colicin E2 . Mol. Gen.Genet.190:379-383.
23. **Tagg** ,J .R. and Russell ,C. (1981).Bacteriocin production by Streptococcus salivarius strain P. Can.J.Microbiol. 27(9):918-23.
24. **Johanson**,W .G .;Blackstock, R. and Pierce, A. K.(1970).The role of bacterial antagonism in pneumococcal colonization of the human pharynx.J.Lab.Clin.Med.,75:946-952.(Abs.).
25. **Sanders**, C. C .and Sanders, W.E.(1982) . Enocin: An Antibiotic produced by *Streptococcus salivarius* that may contribute to protection against infection due to group A *Streptococci*. J. Infect . Dis., 146(5):683-690.
26. **Tagg**, J.R.; Wescombe, P. and Burton, J. (2006). Oral *Streptococcal* BLIS: Heterogeneity of the effector molecules and potential role in the prevention of *Streptococcal* infection. International Congress Series. , 1289: 347- 350.