Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.8/ NO.1 Year: 2016/ Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

دراسة تأثير البكتريوسين الخام المنتج من بكتريا *Bifidobacterium spp* على الغشاء الحيوي Biofilm لبكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسلين MRSA

أنغام نجاح الخفاجي
أ.م.د. سهام جاسم الكعبي
كلية التربية للبنات/ جامعة الكوفة

الخلاصة:

جمعت 100 عينة مختلفة المصدر لعزل أنواع بكتريا *Bifidobacterium* spp و50 عزلة سريرية لبكتريا*Staphylococcus aureus* في محافظة النجف الأشرف وللفترة من 2013/10/10 ولغاية 2014/1/2، بينت النتائج عائدية 13 عزلة لبكتريا*Bifidobacterium* spp اعتماداً على الخصائص المظهرية والزرعية والفحوصات الكيموحيوية والفحص الجزيئي بأستخدام mRNA والجين *lm26⁄lm3* . ولتمييز الانواع التابعة لبكتريا*Bifidobacterium* spp أجري أختبار تخمر المصادر الكاربوهيدراتية وقد أظهرت النتائج سيادة النوع *B.bifidum* ، اما بقية الانواع الأخرى فقد تمثلت بـ *B.thermoacidophilum, B.adolescentis, B.breve, B.longum*.

أجري أختبار حساسية بكتريا *Staphylococcus aureus* للمضادات الحياتية بأستعمال طريقة أنتشار قرص المضاد الحياتي والتي أوضحت بأن عزلات *S.aureus* المقاومة للمثيسلين شكلت حوالي 70 % وأن 30% من العزلات كانت حساسة للمضاد نفسه، كما تم التحري عن قابلية عزلات *S.aureus* المقاومة للمثيسلين لإنتاج الغشاء الحيوي Biofilm بأستخدام طريقت الأنبوبة ، بعدها أختبرت 10 عزلات لبكتريا المكورات العنقودية اعتماداً على المقاومة للمثيسلين وقابليتها العالية على أنتاج الغشاء الحيوي. وأختبرت قدرة عزلات *Bifidobacterium* spp عن قابليتها على أنتاج البكتريوسين الخام ضد بكتريا الأختبار MRSA بتقنية الانتشار بالحفر، وكانت العزلة $B.bifidum_3$ الأعلى أنتاجاً للبكتريوسين الخام، كما درس تأثير البكتريوسين الخام المنتج من *Bifidobacterium* spp في تثبيط نمو وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm، وبينت النتائج وجود فعالية تثبيطية للبكتريوسين الخام تجاه MRSA.

المقدمة:

تعد بكتريا Bifidobacteria بأنها لاهوائية النمو موجبة لصبغة غرام غير متحركة وغير مكونة للسبورات وغير منتجة للغاز سالبة لفحص الكاتليز ومقاومة للحوامض (Sgorbati *et al.*,1995). فقد تتواجد بأشكال مختلفة تتضمن عصيات منحنية قصيرة أو طويلة غير منتظمة الشكل أو بشكل قضبان مشقوقة ومتفرعة وبشكل حرف Y أو V (Biavati and Mattarelli, 2001). تنمو الـBifidobacteria المعزولة من الانسان بمديات من الحرارة تتراوح من (37-41°م) والأس الهيدروجيني pH يتراوح بين 6.5-7 باستثناء *B. thermacidophilum* تنمو بدرجة حرارة (49.5 °م) والاس الهيدروجيني 4 (Dong *et al.*, 2000). كما تتميز بعدم قدرتها على تكوين المستعمرات تحت الظروف الهوائية aerobic التي تتطلب 20% من الاوكسجين oxygen لذلك وصفت بأنها بكتريا لاهوائية النمو anaerobic (Kawasaki *et al.*, 2006).

تعرف البكتريوسينات Bacteriocins بأنها ببتيدات أوبروتينات تخلق رايبوسومياً تنتج من قبل البكتريا وتمتلك فعالية أما مثبطة bacteriostatic أوقاتلة bactericidal ضد الأنواع البكتيرية الأخرى (Balciunas *et al.*, 2013). أن Meghrous *et al.*, (1990) هم أول من أظهروا أن الـ Bifidobacteria لها القدرة على أنتاج مواد تضادية ضد الانواع الاخرى من البكتريا الموجبة لصبغة غرام والمتمثلة بالبكتريوسين. من جانب أخر أنتاج البكتريوسين من قبل البكتريا الموجبة لصبغة غرام سوف يعمل على الالتصاق بالغشاء الخارجي وبالتالي يؤدي الى تحطم الخلايا البكتيرية (Brook, 1999). وتمتلك البكتريوسينات فعالية تضادية واسعة الطيف لقتل السلالات البكتيرية لنفس النوع أو لأنواع أخرى عائدة لها (Klaenhammer, 1993). وتستخدم في عدة مجالات ليس فقط كمادة حافظة غذائية ولكن استخدمت في الطب كمادة تضادية لتثبيط الممرضات بدون أن تؤثر على النبيت الطبيعي Normal flora (Gillor *et al.*, 2008).

تتميز بكتريا *Staphylococcus aureus* بأنها موجبة لصبغة غرام لاهوائية اختياريه، كما تعرف المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلين MRSA بأنها البكتريا الممرضة تسبب الاصابات المكتسبة عن طريق المستشفيات Nosocomial في مختلف دول العالم (Kaya, 2009). وقد تنتقل بين الأنسان والحيوانات عن طريق التماس المباشر (Aspiroz, 2010). لذلك فأن *S.aureus* سببت أمراضية

للأشخاص للراقدين في المستشفيات لظهور مقاومتها ليس فقط لنوع واحد من المضادات ولكن ما يقارب جميع المضادات المعروفة وتعتبر MRSA هي المسبب الرئيسي للإصابات في كلا الجلد والانسجة الرخوة SSTI (Ellis *et al.*, 2009).

يعرف الغشاء الحيوي biofilm بأنه تجمعات مايكروبية معقدة والتي ترتبط بالأسطح الصلبة أو تلتصق extracellular matrix (Gotz, 2002; O'Gara, 2007). يغلف الغشاء الحيوي متعدد الطبقات وذلك لالتصاق الكائنات المجهرية بسطحها أو مع أحد أوجهها الداخلية وقد تتحكم الظروف البيئية لتكوين الغشاء الحيوي والمتمثلة بالمواد الغذائية وتوفير الاوكسجين ويتمثل Biofilm بكونه مهم لتحديد الاصابة المزمنة (TuQuoc *et al.*, 2007). ويعتبر مصدر لاستمرار الاصابة من قبل العديد من الميكروبات الممرضة وهذا مسؤول عن الاصابات Nosocomial والتي ترتبط بالعديد من الادوات الطبية المتضمنة indwelling medical device واللويحة السنية dental plaque والقناة التنفسية العليا upper respiratory tract وإصابات الجهاز البولي urogenital infection (Costerton *et al.*, 1999) وتعد المكورات العنقودية من البكتريا الممرضة الأكثر شيوعآ ولها القدرة على الألتصاق بالأجسام الغريبة والاصابات المتعلقة بالأليات الطبية medical device المغروسة في الجسم يتبع ذلك تضاعف الطبقة المخاطية لتكوين الغشاء الحيوي متعدد الطبقات، إذ تبدي البكتريا في الأغشية الحيوية درجة عالية من المقاومة للعوامل المضادة للبكتريا وجهاز مناعة المضيف وهذا عامل رئيسي للمساهمة في مثل هذه الاصابات (Lim *et al.*, 2004).

بالنظر لما تبديه بكتريا المكورات العنقودية من مقاومة مستمرة للعديد من المضادات الحياتية المستخدمة ولاسيما تلك المقاومة للمثيسلين وما تمتلكه من عوامل ضراوة متمثلة بالغشاء الحيوي وغيرها من العوامل لذا ارتأينا الى، دراسة تأثير البكتريوسين الخام المنتج من بكتريا *Bifidobacterium* spp كونها أحدى الأجناس غير المرضية لكي يتم استبدال المضادات الحياتية بمواد مايكروبية لاتؤثر على صحة المريض وفي نفس الوقت لا توجد ضدها مقاومة من قبل المكورات العنقودية.

المواد و طرائق العمل Materials and Methods

جمع العينات

جمعت 100عينة مختلفة المصادر لعزل الأنواع التابعة لبكتريا *Bifidobacterium* تضمنت {50} عينة لخروج الاطفال من عمر 5 ايام الى 5 أشهر و{20} عينة من تسوس الاسنان وبأعمار مختلفة و {20} عينة من مسحات المهبل وعينتان من كل من حليب الام وحليب الابقار ولبن الاكتيفيا والترب الحيوانية والمخلالات ، كما جمعت 50 عينة سريرية مختلفة المصدر لعزل بكتريا *Staphylococcus aureus* تضمنت عينتان من كل من مسحات المهبل ومسحات الاذن والسائل المنوي و10 عينات من الحروق والجروح و15 عينة من الادرار و 19 عينة من مسحات أنفية وللفترة من (2013/10/10 ولغاية 2014/1/20) في محافظة النجف الأشرف. وتم تشخيص العينات الخاصة بأنواع *Bifidobacterium* spp على وسط modified-Man Regosa Sharpe الصلب ووسط Man Regosa Sharpe السائل ثم حضنت بظروف لاهوائية anaerobic jar بحرارة 37 ºم لمدة 48-72 ساعة، أما بالنسبة للعينات الخاصة ببكتريا *Staphylococcus aureus* فقد زرعت على وسط Mannitol salt agar ثم حضنت بحرارة 37 ºم لمدة 24 ساعة للحصول على المستعمرات، ثم نقلت وتمَّ تنقيتها إلى مستعمرات منفردة.

تشخيص بكتريا الـ*Bifidobacterium* spp بأستعمال تقنية PCR

تم أستخلاص الـDNA البكتيري وفق عدة الفحص المجهزة من شركة VioGene (Taiwan) وأستعملت تقنية PCR للكشف عن الجين *lm26/lm3* الموجود في جميع عزلات *Bifidobacterium* spp بأستعمال البادئ المذكور من قبل (Kaufmann *et al.*, 1997) والمجهزة من شركة Bioneer (Korea) .

Forward 5`-GATTCTGGCTCAGGATGAACG-3`
Reverse 3`-CGGGTGCTNCCCACTTTCATG-5`

اجري تفاعل الـ PCR باستعمال جهاز المدور الحراري Thermocycler وتم برمجة ظروف التضخيم كما مبين في الجدول (1) وكالاتي:.

URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
http://iasj.net/iasj?func=issues&jId=129&uiLanguage=en
http://www.drji.org/JournalProfile.aspx?jid=2073-8854
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq

جدول (1): ظروف تفاعل PCR

اسم البادئ Gene	المسخ الاولي Initial denaturation	Cycles			الاستطالة النهائية Final elongation
		المسخ Denaturation	التصالب Annealing	الاستطالة Elongation	
		35 دورة			
lm26 lm3	94˚C for 4min	94˚C for 30 sec	45˚C for 30 sec	72˚C for 2min	72˚C for 4 min

كما حملت عينات الـ DNA بمقدار(10 µl) في هلام الاكاروز وحمل الدليل DNA ثم وضع الـ Tray في خزان الترحيل وغمر الخزان بمحلول TBE تركيزه (1X). أجريت عمليه الترحيل الكهربائي بفولتية 80V ولمدة ساعة واحده ثم فحص هلام الاكاروز باستعمال وحدة الاشعة فوق البنفسجية وصور الهلام باستعمال كاميرا تصوير نوع digital (Mishera *et al*., 2010).

أستخلاص البكتريوسين الخام من بكتريا الـ*Bifidobacterium* spp

أستخدمت عزلات بكتريا الـ*Bifidobacterium* جميعها لأستخلاص البكتريوسين الخام المنتج منها كل على حدا وكالتالي:

زرعت بكتريا *Bifidobacterium* على وسط MRS السائل ذي الأس الهيدروجيني 2±5.5 وحضنت الانابيب بدرجة 37 °م لمدة 48-72 ساعة تحت ظروف لاهوائية ، نبذت بعدها أنابيب النمو في جهاز الطرد المركزي (6000 دورة/دقيقة ولمدة 30 دقيقة) ثم أخذ الراشح وأهمل الراسب وتم معادلة pH الى7 بأستخدام (1N) من NaOH للتخلص تماماً من الفعالية التضادية للحوامض العضوية بعدها عقم السائل من خلال مرشحات Millipore بقطر0.22 µm وبعدها حفظت بحرارة 4 °م لحين الاستخدام Zinedine (& Faid, 2007).

دراسة عوامل الضراوة المنتجة من بكتريا *Staphylococcus aureus*

1- اختبار حساسية *S.aureus* للمضاد الحياتي Methicillin

تم إجراء أختبار حساسية *S.aureus* للمضاد الحيوي Methicillin إذ أستعمل وسط Muller Hinton agar وذلك بتعقيم الوسط وتبريده إلى درجة حرارة 50°م ثم صب في أطباق بتري معقمة بواقع 20 مل لكل طبق ولقح الوسط الزرعي بإضافة 0.3 مل من المزروع البكتيري بعمر 18 ساعة ونشر على سطح الوسط الزرعي بواسطة الناشر Spreader بصورة متجانسة وتركت الأطباق لمدة 10-20 دقيقة لتمام امتصاص المزروع بعدها وضع القرص الحاوي على المضاد الحياتي Methicillin على سطح الوسط الزرعي بواسطة ملقط Forceps معقم مع الضغط الخفيف على سطح القرص لتثبيته على سطح الوسط الزرعي وحضنت الأطباق هوائيا بحرارة 37 °م لمدة 24 ساعة بعدها قرأت النتائج وحددت منطقة التثبيط (التي هي عبارة عن منطقة شفافة محيطة بقرص المضاد الحياتي محسوبا معها قطر قرص المضاد الحياتي نفسه) بواسطة مسطرة مدرجة وتعد البكتريا مقاومة للمضاد بالاعتماد على المواصفات الواردة في (CLSI, 2014).

2- أنتاج الغشاء الحيوي Biofilm من بكتريا *Staphylococcus aureus*

استعمل وسط Brain Heart Infusion broth (BHI suc) للتحري عن قابلية البكتريا لإنتاج biofilm والذي وصف من قبل (Mathur *et al*., 2006) تضمن الأتي:.

- ♣ أخذ 10 مل من brain heart infusion broth المحضر مع أضافة سكروز بتركيز 2% لقح ببكتريا *S.aureus* وحضن بحرارة 37 °م لمدة 24 ساعة.
- ♣ سكبت محتويات الوسط وغسل باستخدام Phosphate Buffer Saline ذو أس هيدروجيني pH7.2 .
- ♣ جففت الأنبوبة وصبغت بصبغة crystal violet بتركيز 0.1% لمدة 10 دقائق بعد ذلك أزيلت الصبغة من الانبوبة تم غسلها بأستعمال deionized water.
- ♣ جففت الأنبوبة وتم قلبها لمشاهدة تكوين biofilm في قعرها.
- ♣ تكوين biofilm تعد نتيجة إيجابية عند ملاحظة تكوين طبقة film حول جدار قعر الأنبوبة.

أختبار تأثير البكتريوسين الخام على تكوين Biofilm لبكتريا *Staphylococcus aureus*

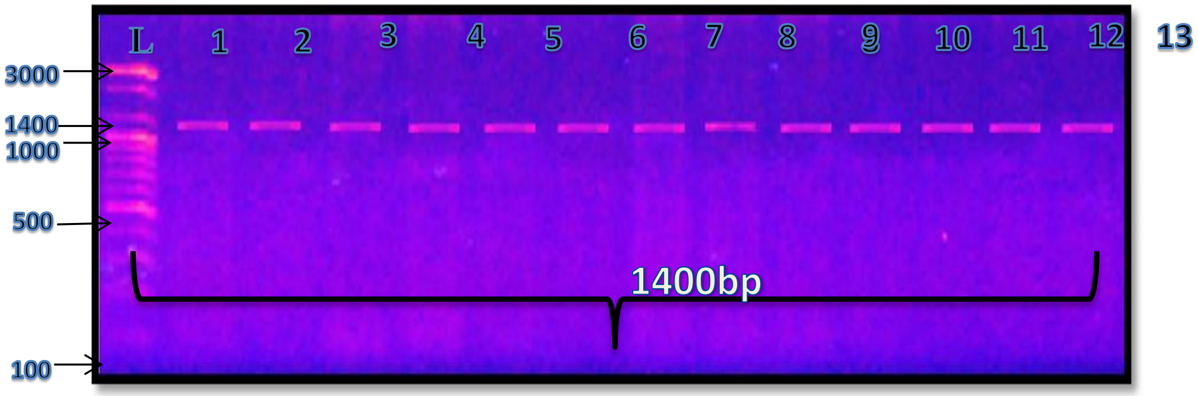
أختيرت العزلة (*B.bifidum* $_3$) أفضل عزلة لإنتاج البكتريوسين الخام

- ❖ حضر المعلق الميكروبي لبكتيريا *S.aureus* بعد زراعتها على وسط Brain Heart Infusion broth (BHI suc) بحرارة 37 °م لمدة 24 ساعة.
- ❖ أخذ 1.5 مل من المعلق لبكتيريا *S.aureus* بتركيز 1.5×10^8 خلية/مل مع 1.5 مل من البكتريوسين الخام المستخلص من *Bifidobacterium* المحضر سابقاً ثم حضنت بحرارة 37 °م لمدة 24 ساعة.
- ❖ سكبت محتويات الوسط وغسل بأستخدام Phosphate Buffer Saline ذو أس هيدروجيني pH 7.2.
- ❖ جففت الأنبوبة وصبغت بصبغة crystal violet بتركيز 0.1% لمدة 10دقائق بعد ذلك أزيلت الصبغة من الانبوبة تم غسلها بأستخدام deionized water.
- ❖ جفف الأنبوب وتم قلبه لمشاهدة فقدان الغشاء الحيوي في قعره.

النتائج والمناقشة Results and Discussion

ظهر لون المستعمرات لـ*Bifidobacterium* spp عند تنميتها في وسط الـm-MRS agar في ظروف لاهوائية ذات لون غير شفاف وذات شكل محدب دائري ، معظم المستعمرات قريبة مـن السطح وقليل منها تحت السطح وبحجم اصغر وهذا يطابق وصف(DuBey and Mistry,1996). كما أوضحت نتائج الفحص ألمجهري للشرائح المحضرة من مستعمرات *Bifidobacterium* وباستخدام التصبيغ بصبغة غرام أنها عصيات قصيرة موجبة لصبغة غرام اتخذت شكل حرف Yأو V، وكما تم تشخيصها بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية التي أظهرت أن جميع عزلات *Bifidobacterium* spp تميزت بكونها سالبة لاختبار الكاتليز والاوكسديز واليوريز وهذا يتفق مع ما ذكره (Leahly et al, 2005). بينما كانت سالبة لآختبار السترات والاندول في حين كانت موجبة لأختبار أحمر المثيل وهذا لايتفق مع ما ذكره (Venkatesan et al, 2012).

أجري تفاعل PCR للتحري عن وجود أو غياب الجين *lm26/lm3* لتشخيص بكتريا الـ *Bifidobacterium*وباستخدام بادئ متخصصة يستهدف تتابعاً نوعياً لجين واحد متواجد في هذه البكتريا، والتأكد من عائديه العزلات قيد الدراسة إلى هذا النمط الجيني ، إذ أظهرت النتائج مماثلة للحجم المتوقع تقريبا عند استعمال البادئات نفسها التي تم اعتمادها في الدراسة التي أجريت من قبل (Kaufmann *et al.*, 1997) عند اختبار 100 سلالة من سلالات بكتريا *Bifidobacterium* spp. يلاحظ من خلال نتائج الدراسة والموضحة في الشكل (1) تم الحصول على 13 عينة تعود لـ *Bifidobacterium* جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع الدراسات الاخرى التي أشارت الى قابلية أستخدام البادئ بأختبار تتابع تسلسل القواعد النتروجينية في 16S-23SrDNA والتي يتضمن جميع أنواع *Bifidobacterium* المتواجدة في أمعاء الانسان وكذلك في براز الاطفال الرضع حديثي الولادة (Germond *et al.*, 2002). كما أكدت دراسة أخرى أحتواء بعض السلالات المعزولة من المواد الغذائية على الجين *Lm26/Lm3* مع تواجده في أغلب السلالات المعزولة من براز الاطفال والحيوانات (Masco *et al.*, 2005).



شكل (1): الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الـDNA لعزلات بكتريا*Bifidobacterium* spp باستعمال البادئ المتخصص على هلام الاكاروز وبفرق جهد 80 فولت ولمدة ساعة تحت أشعة U.V بعد التصبيغ بصبغة الاثيديوم بروميد.

المسار L: الدليل الحجمي 100bp

المسار : 1-13 دنا عزلات الـ *Bifidobacterium* spp المعزولة من مصادر مختلفة

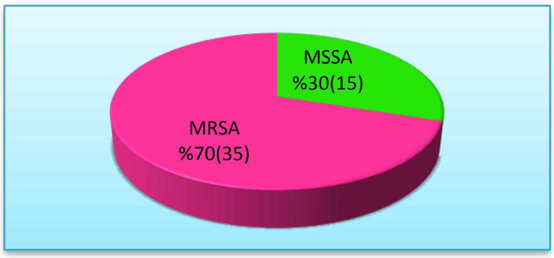
URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
http://iasj.net/iasj?func=issues&jId=129&uiLanguage=en
http://www.drji.org/JournalProfile.aspx?jid=2073-8854
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq

كما تعد الاختبارات الكيموحيوية التفريقية مهمة في تشخيص عزلات بكتريا الـ *Bifidobacterium* spp عن غيرها من البكتريا، وتأتي قدرة هذه البكتريا على تخمر وتمثيل المصادر الكاربوهيدراتية في مقدمة الصفات المهمة للتمييز بين أنواع *Bifidobacterium*، وقد أستعمل هذا الاختبار لإيضاح قدرة *Bifidobacterium* spp على استهلاك المصادر الكاربوهيدراتية حيث استعمل وسط تخمر السكريات والمضافة إليه الكاربوهيدرات المراد اختبار قدرة البكتريا على تخميرها واعطت العزلات تباينا وتنوعاً واضحاً في قدرتها على تخمير الكاربوهيدرات، فقد أظهرت النتائج أن بكتريا *Bifidobacterium bifidium* تميزت بقدرتها على تخمر سكر Arabinose والمتمثلة بالعزلات (Bif_4, Bif_1, Bif_{10})، في حين بكتريا *Bifidobacterium longum* كانت مخمرة لسكر Sucrose والتي شملت العزلات (Bif_5, Bif_7, Bif_{12} Bif_{11})، بينما بكتريا *Bifidobacterium bréve* تميزت بقدرتها على تخمر سكر Ribose في العزلتين (Bif_3, Bif_8) وهذه النتائج تتفق مع (Mahmoudi *et al*, 2013). بينما تميزت بكتريا *Bifidobacterium adolescentis* بقدرتها على تخمر سكر Mannitol والمتمثلة Bif_2, Bif_9, (Bif_{13})، وهذه النتائج تتفق مع (Toure *et al*, 2003). في حين أظهرت البكتريا *Bifidobacterium thermoacidophilum* عدم قدرتها على تخمر سكر Lactose في العينة (Bif_6)، وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره (Dong *et al*, 2000b). أما بالنسبة لبكتريا *Staphylococcus aureus* فقد أوضحت النتائج بأن *S.aureus* تنمو هوائيا على وسط Mannitol salt agar بتغيير لونه من الأحمر إلى الأصفر نتيجة لقدرتها على تخمير سكر المانتول وبعض العزلات لم يتغير لون الوسط لعدم قدرتها على تخمير سكر المانتول وهذا يتفق مع ماذكره العالم (Schleifer and Bell, 2009). بينما اظهر الفحص المجهري لـ*S.aureus* بأن خلاياها كروية موجبة لصبغة غرام متجمعة بصورة ثنائية أو رباعية أو على هيئة عناقيد غير منتظمة Bunches of grapes وهذا يتفق مع ما ذكر عن صفاتها المظهرية في (Benson, 2002). فقد استعملت الاختبارات الكيميوحية في تشخيص عينات *Staphylococcus aureus* تميزت بكونها موجبة لاختبار الكاتليز وذلك لأنها جراثيم هوائية أو لاهوائية اختيارية والتي تتمكن من خلال هذه الصفة من إنتاج إنزيم الكاتليز الذي يحميها من التأثير السام لمادة بيروكسيد الهيدروجين المنتج خلال العمليات الايضية وعدم قدرتها على انتاج انزيم الاوكسديز وهذا يتفق مع ما ذكرة (Mack *et al*., 2006; Schneewind and Missiakas, 2009). كما أظهرت نتيجة موجبة لأنزيم مختثر بلازما الدم Coagulase.

قابلية بكتريا *Staphylococcus aureus* على إنتاج عوامل الضراوة

1- حساسية المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلين MRSA للمضادات الحياتية

تم التحري عن صفة المقاومة للمثيسلين لجميع عزلات *Staphylococcus aureus* باستعمال أختبار اقراص الحساسية الدوائية للمثيسلين، أن الغاية الأساسية من هذا الاختبار هو دراسة العلاقة بين المقاومة والحساسية للمضادات الحياتية، ومدى إمراضية *S.aureus* متعددة المقاومة للمضادات الحياتية وذلك من خلال دراسة مدى التشابه والاختلاف في نمط المقاومة بين العزلات للبكترياالتي عزلت من مصادر مختلفة. أن ارتفاع مستويات المقاومة للـMethicillin بنسبة (35) 70% في حين أن (15) 30% كانت حساسة للمثيسلين كما موضح في الشكل (2) .



شكل(2): النسب المئوية لعزلات *Staphylococcus aureus* المقاومة والحساسة للمثيسلين

وهذه النتائج تتفق تقريبآ مع دراسة Al-Maliki, (2009) التي سجلت نسبة المقاومة حوالي 80.3% في حين كانت 16.4% من العزلات متوسطة المقاومة ، بينما كانت حساسة بنسبة 3.3%. كما بين -Al Geobory, (2011) أن نسبة المقاومة بلغت حوالي 90.90%. كما أوضح Al-Dahbi and Al-Mathkhury, (2013) بأن نسبة المقاومة بلغت حوالي 94.3%. وهذه النتائج لا تتفق مع Peck *et al*, (2009) إذ وجدوا أن حوالي 51.4% من العزلات كانت مقاومة للـMethicillin في حين 48.6 % كانت حساسة لها . وقد يعود التفاوت في نسب المقاومة في الدراسة الحالية والدراسات الأخرى الى تنوع المصادر المعزولة منها بكتريا المكورات العنقودية والى التغير الحاصل في جينات المقاومة للمثيسلين للبكتريا نفسها.

وقد تم أختبار 10 عزلات مقاومة للمثيسلين من حيث كفاءتها في تكوين أعلى مناطق تثبيط له لأختبار حساسيتها للمضادات الحياتية الأخرى المستعملة في الدراسة.

تعمل مضادات البيتالاكتام على تثبيط عملية تصنيع الجدار الخلوي للجراثيم من خلال تداخلها مع عملية تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان، وربما تعود أسباب هذه المقاومة إلى إفراز البكتريا لأنزيم البيتالاكتميز والذي قد يكون بلازميدي أوكروموسومي المنشأ الذي يعمل على إبطال فعالية مضادات البيتالاكتام عن طريق كسر لحلقة البيتالاكتام في مجموعة البنسلينات و السيفالوسبورينات (Kolář *et al.*, 2010). كما ان سبب المقاومة قد يعود الى وجود الجين *mecA* وهذا يقلل من الفة ارتباط المضادات الحيوية بالبروتينات المسؤولة عن متانة الجدار الخلوي التي تسمى بالبروتينات المرتبطة بالبنسلينات Penicillin binding Proteins (Ekrami, 2010). كما بينت دراسات أخرى أن سلالات Community-Acquired -MRSA (CA-MRSA) تمتلك القدرة على أنتشار مستعمراتها أكثر من سلالات Healthcare- Associated - (HA-MRSA)MRSA أن هذا التغاير يعود الى أمتلاك CA-MRSA للجين *psm-mec* المسؤول عن أنتشار المستعمرات وبالتالي يسبب الضرر (Omae *et al.*, 2014) .

2- قابلية البكتيريا *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسلين على إنتاج الغشاء الحيوى Biofilm

تم الكشف عن قابلية 10 عزلات من MRSA على أنتاج الغشاء الحيوي، فقد أوضحت النتائج ان 6 عزلات كانت منتجة للغشاء الحيوي في حين لم تبدي 4 عزلات تكوينها للغشاء الحيوي . كما أن أغلب العزلات تمتلك القابلية على الالتصاق بجدران الانبوبة الزجاجية التي تصطبغ بصبغة البنفسج البلوري مقارنة مع انبوبة السيطرة التي كانت تحتوي على الوسط الغذائي الغير ملقح بالبكتريا.

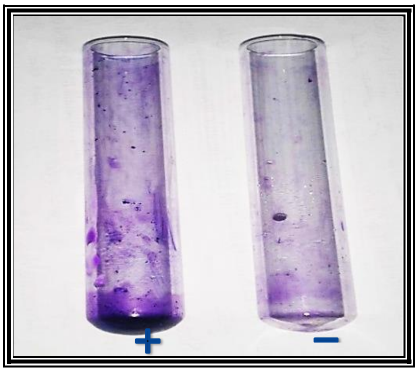
كما تظهر البكتريا التي لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي اختلافات مظهرية متنوعة عن السلالة الأصلية التي تنمو في المزرعة بشكل حر وتشمل هذه الاختلافات تغيرات في الحركة وزيادة إنتاج السكريات المتعددة الخارج خلوية أحيانا وزيادة المقاومة للمضادات الحيوية (Jesaitis *et al.*, 2003) .ويعتمد الالتصاق بدرجة كبيرة على الظروف البيئية والتغير في الوسط الزرعي (Wang, 2008).

جاءت نتائج التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي في عزلات *S.aureus* متوافقة مع العديد من الدراسات التي أكدت قابلية بكتيريا *S.aureus* على إنتاج الغشاء الحيوي. فقد بين Mathur *et al.*, (2006) قابلية عزلات الـ *S.aureus* على إنتاج الغشاء الحيوي. كما بينت دراسات أخرى أن قابلية بكتريا MRSA على الانتشار في الاسطح الصلبة وبالتالي تؤدي الى تكوين الغشاء الحيوي Biofilm (Tsompanidou *et al.*, 2013).

تأثير البكتريوسين الخام على الغشاء الحيوى Biofilm لبكتريا *Staphylococcus aureus*

تم أختيار العينة الكفوءة المنتجة للبكتريوسين الخام والمتمثلة بـ(*B.bifidum*3) ذات الفعالية التثبيطية العالية مقارنتاً بالعزلات الاخرى كما تم أختيار عزلة واحدة من بكتريا ألاختبار اعتماداً على حساسيتها للـ*Bifidobacterium* والبكتريوسين الخام إضافة الى مقاومتها لجميع أنواع المضادات وكذلك أنتاجها عوامل ضراوة. من جانب اخر درست فعالية البكتريوسين الخام المنتج من بكتريا الـ*Bifidobacterium* في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من قبل البكتريا المرضية MRSA وذلك من خلال التحري عن تكوين الغشاء الحيوي قبل وبعد معاملة بكتريا MRSA بالبكتريوسين الخام ولفترة 24 ساعة فقد كان التأثير التثبيطي واضحاً تجاه بكتريا MRSAإذ اظهرت النتائج تأثير واضحاً للبكتريوسين على عزلات MRSA التي تمتلك القابلية على الالتصاق بجدران الانبوبة الزجاجية التي تصطبغ بصبغة البنفسج البلوري مقارنة مع انبوبة السيطرة التي كانت تحتوي على بكتريا MRSA بدون أضافة البكريوسين له ، كما موضح في الشكل (3). كذلك وصف البكتريوسين المنتج من بكتريا حامض اللأكتيك LAB بكونه فعال في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S. aureus* وأنواع البكتريا الاخرى السالبة لصبغة غرام (Fracchia *et al.*, 2010). كما أن هذه النتائج لاتتفق مع Nawaz *et al.*, (2009) الذين بينوا أن البكتريوسين يمتلك فعالية قليلة ضد MRSA من خلال تجاربه الذي وجد أن البكتريوسين يؤثر على سلالة واحدة فقط من أصل خمسين سلالة. كما أكدت دراسات أخرى أن البكتريوسين وخصوصاً النايسين Nisin يكون أكثر فعالية من antibiotics ويستخدم لمنع وعلاج الاصابات المسببة من قبل بكتريا MRSA المرتبطة بتكوين Biofilm (Okuda *et al.*, 2013).

URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
http://iasj.net/iasj?func=issues&jId=129&uiLanguage=en
http://www.drji.org/JournalProfile.aspx?jid=2073-8854
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq



شكل(3): الفعالية التثبيطية للبكتريوسين الخام تجاه الغشاء الحيوي لبكتريا الاختبار *S.aureus*
(+) ظهور خلايا ملتصقة على جدران انابيب الأختبار
(-) عدم ظهور خلايا ملتصقة على جدران انابيب الأختبار بعد معاملتها بالبكتريوسين الخام

لذا نستنتج بأن البكتريوسين الخام المنتج من بكتريا *Bifidobacterium* spp له دور في التأثير على الغشاء الحيوي المنتج من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلين MRSA وبالتالي فمن الممكن أن يستعمل في خفض إمراضيه هذا النوع البكتيري.

References:

Al-Geobory, H.A.H.(2011).Comparative study between Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), and detect the antimicrobial effects of some plant extracts on them. Msc. Thesis. College of Science/ Baghdad University. Iraq.

Al-Maliki, A.A.A.(2009). AStudy of some Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and (MRSE) isolated from Baghdad hospital patients. M.Sc.Thesis. College of Science. AL-Mustansiriya University.

Aspiroz, C.; Lozano, C.; Vindel, A.; Lasarte, J.; Zarazaga, M.; Torres, C. (2010). Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg. Infect. Dis*. 16(1):157-9.

Balciunas, EM.; Martinez, FAC.; Todorov, SD.; de Melo Franco, BDG.; Converti, A.; de Souza Oliveira, RP.(2013).Novel biotechnological applications of bacteriocins. *Rev. Food. Control*. 32:134-142.

Benson, J.H.(2002). Microbiological applications: Laboratory manual in general microbiology. 8thed. McGraw Hill companies. New York.

Biavati, B. and P. Mattarelli (2001). The family *Bifidobacteriaceae*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.), The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community, 3rd ed. release 3.7. *Springer*. New York.

Brook, I.(1999). Bacterial interference .*Crit. Rev. Microbiol*. 25: 155-172.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement .M100-S24.

Costerton, J.W.; Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Sci*. 284: 1318-1322.

Dong, X.; Cheng, G. and Jian, W. (2000a). Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Syst. Appl. Microbiol*. 23: 386-90.

Dong, X.; Xin, Y.; Jian, W.; Liu, X. and Ling, D. (2000b). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* .50: 119-125.

DuBey, U.K. and Mistry, V.(1996).Growth characteristics of Bifidobacteria in infant formula. *J.Dairy .Sci*. 79: 1146-1155.

Ekrami, A.; Samarbafzadeh, A.R.; Alavi, M.; Kalantar, E. and Hamzeloi, F. (2010). Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus* sp isolated from burn patients in a burn center, Ahvaz, Iran. Jundishapur. *J. Microbiol*. 3: 84-91.

Ellis, M.W.; Griffith, M.E.; Jorgensen, J.H.; Hospenthal, D.R.; Mende, K.; and Patterson, J.E. (2009). Presence and Molecular Epidemiology of Virulence Factors in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing and Infecting Soldiers. *J. Clin. Microb. Bio*. 47 (4): 940-945.

Fracchia, L.; Cavallo, M.; Allegrone, G. and Martinotti, M.G. (2010). A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. Current Research, Technology and education topics in. *J. Appl. Microbial. Microbial. Biotechnol.* 828-839.

Germond, J.; Mamin, O. and Mollet, B. (2002). Species specific identification of nine human *Bifidobacterium* spp. in feces. System. *Appl. Microbiol*. 25:536-543.

Gillor, O.; Etzion, A. and Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 81:591-606.

Gotz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol*. 43(6):1367-1378.

Jesaitis, A.J. ; Franklin, M. J. ; Berglund, D. (2003). Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J. Immunol.* 171: 4329-4339.

Kaufman, P.; Pfeffernkorn, A.; Teuber, M. and Meile, L. (1997). Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol*. 63:1268-1273.

Kawasaki, S.; Mimura, T.; Satoh, T.; Takeda, K. and Niimura, Y. (2006). Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and B. *thermophilum*, to oxygen. *Appl .Environ. Microbiol*. 72: 6854-8.

Kaya, E. G.; Karakoç, E.; Yagci, S. and Yücel, M. (2009). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus. J. Afri. Microbiol. Res*. 3(12): 925-929.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev*. 12:39-85.

Kolář, M.; Bardoň, J.; Hanulík, V.; Sauer, P.; Babák, V. and Schlegelová, J. (2010). Resistance to Methicillin in Coagulase-negative *Staphylococci* and Its Detection. *Acta. Vet. Brno*.79:261-267.

Leahy, S.C.; Higgins, D.G.; Fitzgerald, G.F. and van Sinderen, D. (2005). Getting better with Bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol* .98:1303-1315.

Lim, Y.; Jana, M.; Luong ,T.T. and Lee, C.Y. (2004). Control of Glucose- and NaCl -Induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. 186(3):722-729.

Mack, D.; Horskotte, M.A.; Rohde, H. and Knobloch, J.K-M. (2006) .Coagulase negative *Staphylococci*. In: Biofilms, infection, antimicrobial therapy. Pace, J.L. Rupp, M.E. and Finch, R.G. 109-132. Taylor and Francis. New York.

Mahmoudi, F.; Miloud, H.; Bettache, G. and Mebrouk, K.(2013). Identification and Physiological Properties of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Different Origin. University of Oran El-menaouer. *J. Food. Sci . Engine* .3 :196-206.

Masco, L.; Huys, G.; De Brandt, E.; Temmerman, R. and Swings, J. (2005). Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic product's claimed to contain Bifidobacteria. *Int. J. Food. Microbiol*. 102:221-230.

Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.J.; Fatma, T. and Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An Evaluation of Three Different Screening Methods. Indian .*J. Med. Microbiol*. 24(1):25-29.

Meghrous, J.; Euloge, P.; Junelles, A.M.; Ballongue, J. and Petitdemange, H. (1990). Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnol. Lett*. 12:575–580.

Mishera, V.; Nag, V.L.; Tandon; R. and Awsthi, S. (2010). Response surface Methodology-Based Optimization of Agarose Gel Electrophoresis for screening and electropherotyping of Rotavirus. *Appl. Biochemi. ND. Biotech*.160(8):2322-31.

Nawaz, S.K.; Riaz, S.; Riaz, S. and Hasnain, SH. (2009). Screening for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteriocin producing bacteria. African .*J. Biotechnol*. 8 (3): 365-368.

O'Gara, JP. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulationin *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus. FEMS. Microbiol. Lett*. 270: 179-188.

Okuda, K.; Zendo, T.; Sugimoto, S.; Iwase, T.; Tajima, A.; Yamada, S.; Sonomoto, K. and Mizunoe, Y. (2013). Effects of Bacteriocins on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother*. 57(11):5572.

Omae, Y.; Sekimizu, K. and Kaito, C. (2014). Identification of *Staphylococcus aureus* Colony-Spreading Stimulatory Factors from Mammalian Serum. *PLoS ONE* .9(5): 1-9.

Peck, K. R.; Baek, J. Y.; Song, J-H. and Ko, K. S. (2009). Comparison of genotypes and enterotoxin genes between *Staphylococcus aureus* isolates from blood and nasal colonizers in Korean hospitals. *J. Korean. Med. Sci*.24:585-591.

Schleifer, K. and Bell, J. A. (2009).*Staphylococcus*. In Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Parte, A. C., Whitman, W. B., Vos, P. De, G. M. Garrity, Dorothy Jones, Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer K. and Whitman ,W. B. ed. Biological Sciences Building University of Georgia Athens, GA -USA. p:392-420.

Schneewind, O. and Missiakas, D. (2009). *Staphylococcus aureus* and Related *Staphylococci*. in:Goldman E. and Green L.H.(ed). Practical handbook of microbiology. 2nd ed. CRC Press, New York.p.39.

Sgorbati, B.; Biavati, B. and Palenzona, D. (1995). `The Genus *Bifidobacterium'* in The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria. (Wood, B.J.B, Holzapfel, W.H., eds).*Blackie Academic, London*. 2(8): 279-306.

Toure, R.; Kheadr, E.; Lacroix, C.; Moroni, O. and Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by Bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. University of Alexandria, Egypt. *J .Appl. Microbiol*. (95): 1058-1069.

Tsompanidou, E.; Denham, E.L;. Becher, D.; de Jong, A.; Buist, G;. van Oosten, M. Manson, W.L .; Back, J.W.; van Dijl ,J.M. and Dreisbach, A. (2013). Distinct Roles of Phenol-Soluble Modulins in Spreading of *Staphylococcus aureus* on Wet Surfaces. *Appl. Envir. Microbiol*. 79(3): 886-895.

TuQuoc, P.H.; Genevaux, P.; Pajunen, M.; Savilahti, H.; Georgopoulos, C.; Schrenzel, J. and Kelley, W.L. (2007). Isolation and Characterization of Biofilm Formation-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun*. 75(3):1079-1088.

Venkatesan, S.; Kirithika, M.; Roselin, I.; Ganesan, R. and Muthuchelian, K. (2012). Comparative *In vitro* and *In vivo* Study Of Three Probiotic Organisms, *Bifidobacterium* sp. *Lactobacillus* sp. *S.cerevisiae* and Analyzing Its Improvement With The Supplementation Of Prebiotics . Periyar University,

Salem, Tamil Nadu, India. *Int. J. Plant, Animal and Environmental. Sci* .2:94-106.

Wang, X. (2008). "Characterization of *Escherichia coli* Colonizing the Gastrointestinal Tract and Urinary Tract Catheters ". Karolinsk Institute, Stockholm, Sweden. P. 58.

Zinedine, A. and Faid, M. (2007). Isolation and characterization of strains of *Bifidobacterium* with probiotic proprieties *In vitro*. *Worl. J. Dairy .food. sci*. 2: 28 -34.

Abstract:

This study included the investigation of *Bifidobacterium* spp antagonistic activity against *Staphylococcus aureus* isolates, and the effect of these antimicrobial agent on virulence factors produce by MRSA (Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*) such as Biofilm and Slime layer .

One handered different samples were collected to isolate *Bifidobacterium* spp and 50 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens in AL-Najaf AL-Asharaf governorate during the period of (10/10/2013-20/1/2014) by the cultural characteristic colonies, microscopic for cells, biochemical tests and polymerase chain reaction PCR technique to detect 16SrDNA, the results showed that 13 isolates belong to *Bifidobacterium* spp and there are divergent gene content between these isolates and they have been bearing *lm26*/ *lm3* gene. Carbohydrate fermentation test was used to distinguish the species of *Bifidobacterium*, the results revealed that the *B.bifidum* is more predominant than the other species; *B.thermoacidophilum, B.adolescentis, B.breve, B.longum*.

Antibiotics susceptibility test to *Staphylococcus aureus* using antibiotic disc diffusion assay showed that Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* formed 70% and 30% of isolates were sensitive to the same antibiotics, also the ability of MRSA isolates to produce Biofilm was investigated by tube method, then 10 isolates of *Staphylococcus aureus* were selected as efficient isolates according to the resistance of Methicillin and the high ability to produce biofilm, and the ability of bacteriocin production of *Bifidobacterium* spp against MRSA have been conducted by well diffusion broth method, *B.bifidum*$_3$ was greater than other species in producing bacteriocin, Furthermore the impact of bacteriocin production to inhibit the development and formation of biofilm was investigated, the results showed that the bacteriocin has ahigh activity against MRSA.