

## تأثير راشح بكتريا *Lactobacillus salivarius* في نمو بعض الأحياء المجهرية المرضية وتكوينها الغشاء الحيوي

حمزية علي عجة

نبراس نزار محمود  
جيهان عبد الستار سلمان

خولة جبر خلف

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية

استلام البحث 2015 /3/9

قبول النشر 2015 /6/15



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

### الخلاصة :

درس التأثير التثبيطي لراشح بكتريا *Lactobacillus salivarius* غير المركز والمركز تجاه نمو بعض الأحياء المجهرية المرضية والتي شملت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella spp.* و *Escherichia coli* وخميرة *Candida albicans*. بينت النتائج امتلاك راشح بكتريا *L. salivarius* المركز وغير المركز فعلا تثبيطيا تجاه البكتريا المرضية وبأقطار تثبيط تراوحت بين (13-17) ملم فيما ابدى الراشح المركز فعلا تثبيطيا تجاه خميرة *C. albicans* بقطر (8) ملم. من جهة اخرى تم اختبار تأثير الراشح السابقة تجاه تكوين الغشاء الحيوي للأحياء المجهرية قيد الاختبار، إذ اظهر الراشح المركز تثبيط لتكوين الغشاء الحيوي ولجميع العزلات وبنسب مئوية تراوحت بين (28 و 29) % تجاه بكتريا الاختبار و 23% تجاه خميرة *Candida albicans*.

الكلمات المفتاحية: الغشاء الحيوي، البكتريا المرضية، *Lactobacillus salivarius*

### المقدمة :

اصابات المجاري البولية التناسلية [9] فضلا عن استعمالها لحماية الدواجن من الأصابة ببكتريا *Salmonella* ويعود دورها هذا الى قدرتها على انتاج المواد المثبطة [10]. هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن فعالية راشح بكتريا *Lactobacillus salivarius* المركز وغير المركز تجاه نمو بعض الأحياء المجهرية المرضية وتكوينها للغشاء الحيوي.

### المواد وطرائق العمل :

#### بكتريا *Lactobacillus salivarius*:

تم الحصول على بكتريا *L. salivarius* المعزولة من امعاء الاسماك المحلية من مختبر الدراسات العليا / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية وتم التأكد من تشخيصها باعتماد الفحوصات الزرعية والكيموحيوية الواردة عن [11].

#### الأحياء المجهرية المرضية:

تم الحصول على الأحياء المجهرية التي شملت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella spp.* و *Escherichia coli* وخميرة

يعود النوع *Lactobacillus salivarius* الى الجنس *Lactobacillus* التابع لمجموعة بكتريا حامض اللاكتيك، وتتصف بكونها عصوية، موجبة لصبغة كرام، لاهوائية اختيارية، توجد في فم الإنسان ولاسيما اللعاب وفي القناة الهضمية للإنسان والحيوان وتصنف هذه البكتريا على انها معزرات حيوية [1]. تعرف المعزرات الحيوية بانها تلك المنتجات الحاوية على الخلايا الميكروبية الحية باعداد كافية والتي تؤدي عند تناولها تأثيرات مهمة في صحة المضيف [2]. تستعمل بكتريا *Lactobacillus* معزرات حيوية ليس بوصفها غذاء فقط وانما عامل سيطرة بايولوجية [3]، تعد بكتريا *L. salivarius* بكتريا واعدة في مجال المعزرات الحيوية [4]. إذ تمتلك دورا مهما في اختزال اعداد البكتريا المرضية في القناة الهضمية وذلك من خلال قدرتها على خفض الرقم الهيدروجيني والتنافس على المغذيات وانتاج البكتريوسينات [5،6]. تؤدي هذه البكتريا دورا في تثبيط بكتريا *E. coli* و *Salmonella typhimurium* و *Clostridium perfringens* [7]. وتستعمل بكتريا *L. salivarius* في الحماية من او اختزال الأمراض الالتهابية [8] والحماية من

الميكروبي كلا على حدة ، ومُلئت الحفرة الثالثة ب(100) مايكروليتر من الراشح المركز و(100) مايكروليتر من وسط نقيع القلب والدماغ السائل الحاوي (2%) سكروز والملح بالمزروع المايكروبي. تمت تغطية الطبق بالParafilm وحضن بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة سُكبت بعدها محتويات الحفر وغُسلت بالماء المقطر وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة (15) دقيقة، ثم أُضيف (200) مايكروليتر من صبغة الكريستال البنفسجية الى الحفر وتركت لمدة (20) دقيقة، غُسلت الحفر فيما بعد لعدة مرات بالماء المقطر ثم تركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة (15) دقيقة، ثم أُضيف (200) مايكروليتر من الكحول الايثيلي بتركيز (95%) لكل حفرة، ثم قُرئت الكثافة الضوئية للحفر على طول موجي 630 نانوميتر بأستعمال جهاز ELISA Reader [14, 15] حُسبت النسبة المئوية لتكوين الغشاء الحيوي للبكتريا بتطبيق المعادلة الواردة عن [15].

$$1 - \frac{\text{الكثافة الضوئية (O.D) بوجود الراشح}}{\text{الكثافة الضوئية (O.D) لمعاملة السيطرة}} \times 100 = \text{النسبة المئوية لتكوين الغشاء الحيوي}$$

### النتائج والمناقشة :

**تقدير الفعالية التثبيطية لبكتريا *L.salivarius* :**  
 قدرت الفعالية التثبيطية لرواشح بكتريا *L.salivarius* غير المركزة والمركزة لمرتين ونصف تجاه الاحياء المجهرية المرضية التي شملت بكتريا *P. aeruginosa* و *Klebsiella spp.* و *E. coli* وخميرة *C.albicans*. بينت النتائج امتلاك راشح بكتريا *L.salivarius* غير المركز فعالية تثبيطية تجاه الاحياء المجهرية المرضية قيد الأختبار عندما بلغت اقطار مناطق التثبيط (13،15،14) ملم تجاه بكتريا *P. aeruginosa* و *E. coli* و *Klebsiella spp.* على التوالي .  
 فيما لم يظهر اي تأثير تثبيطي تجاه خميرة *C. albicans*، ولوحظ زيادة الفعالية التثبيطية للراشح بعد تركيزه زيادة ملحوظة تجاه بكتريا *P. aeruginosa* وبقطر تثبيط بلغ 17 ملم . وامتلك الراشح المركز ايضا فعالية تثبيطية تجاه خميرة *C.albicans* وبقطر تثبيط بلغ (8) ملم في الوقت الذي لم يظهر تأثير تثبيطي لدى استعمال الراشح غير المركز جدول(1).

**جدول (1) : الفعالية التثبيطية(ملم) لرواشح بكتريا *L.salivarius* تجاه الاحياء المجهرية المرضية**

الراشح المركز (ملم)	الراشح غير المركز (ملم)	المعاملة الاحياء المجهرية
17	14	<i>P. aeruginosa</i>
16	15	<i>E. coli</i>
13	13	<i>Klebsiella spp.</i>
8	-	<i>C.albicans</i>

*Candida albicans* من مختبر الدراسات العليا / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

### تحضير راشح بكتريا *L.salivarius* :

حضر راشح المزرعة السائلة بتنمية بكتريا *L.salivarius* في انابيب اختبار حاوية على وسط MRS (Man Rogosa Sharp) السائل بنسبة لقاح 2%(10<sup>8</sup> خلية/مل) وحضنت بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة . نبذت مركزيا بسرعة (10000) دورة / دقيقة لمدة (10) دقائق للحصول على الراشح. تم قياس الرقم الهيدروجيني للراشح (pH=4) ثم رشح خلال مرشحات دقيقة Millipore filters بقطر (0.22) مايكروميتر، بعدها تم تركيز الراشح باستعمال جهاز vacuum vaporator [12].

### تقدير الفعالية التثبيطية لبكتريا *L.salivarius* :

تم تقدير الفعالية التثبيطية لرواشح بكتريا *L.salivarius* والتي شملت الراشح دون تركيز والراشح المركز ، استعملت طريقة الانتشار في الحفر (Well-diffusion) [13] للكشف عن الفعالية التثبيطية للمعاملات السابقة، اذ زرعت الأطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي بنشر (0.1) مل من مزروع الاحياء المجهرية المرضية قيد الأختبار والتي شملت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella spp.* و *Escherichia coli* و خميرة *Candida albicans*، واستعمل ثاقب فلين لعمل ثقب قطرها (5) ملم على سطح الوسط. ملئت كل حفرة ب (50) مايكروليتر من الراشح دون تركيز والراشح المركز كلا على انفراد، وحضنت بعدها الأطباق بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة وقيست مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت المعاملة مع السيطرة الحاوية على وسط MRS السائل دون لقاح بكتيري .

### تأثير رواشح بكتريا *L.salivarius* في تكوين الغشاء الحيوي لبعض الاحياء المجهرية المرضية

دُرست فعالية رواشح بكتريا *L.salivarius* والتي شملت الراشح دون تركيز والراشح المركز في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي للاحياء المجهرية المرضية قيد الدراسة بأستعمال أطباق المعايرة الدقيقة المسطحة Flat bottomed Microtitration plates وذلك بملئ حفر تلك الاطباق بثلاث معاملات تضمنت الحفرة الاولى: (180) مايكروليتر من وسط نقيع القلب والدماغ السائل الحاوي على (2%) سكروز و(20) مايكروليتر من مزروع الاحياء المجهرية المرضية قيد الأختبار وعدت معاملة سيطرة للتجربة. فيما ملئت الحفرة الثانية ب(100) مايكروليتر من الراشح دون تركيز و(100) مايكروليتر من وسط نقيع القلب والدماغ السائل مضافاً له (2%) سكروز الحاوي على المزروع

بكتريا *L.salivarius* على تثبيط خميرة *C. albicans* [5]  
 تأثير رواشح بكتريا *L.salivarius* في تكوين الغشاء الحيوي لبعض الاحياء المجهرية المرضية :  
 ادى المركز من راشح بكتريا *L.salivarius* الى زيادة فعاليتها التثبيطية تجاه عزلات البكتريا المرضية والخميرة المنتجة للغشاء الحيوي قياسا بفعالية الراشح غير المركز ، اذ درست فعالية الراشح المركز وغير المركز لبكتريا *L.salivarius* في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella spp.* و *Candida albicans* و خميرة *Escherichia coli* باستعمال طريقة اطباق المعايرة الدقيقة ، وتعد الادق والافضل في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي والتصاق البكتريا [22] .  
 بينت النتائج قدرة الراشح المركز على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي للبكتريا المرضية *P. aeruginosa* و *Klebsiella spp.* و *E. coli* (28 ، 28.8 ، 29) % على التوالي، بينما كانت الخميرة *C. albicans* اقل تحسسا اذ بلغت نسبة التثبيط 23% . اما بالنسبة للراشح غير المركز ، فلم يظهر تأثيرا تثبيطيا لتكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *Klebsiella spp.* (8.5- ) % ، بينما بلغت نسبة التثبيط (9 ، 8.5 ، 4) % لكل من الخميرة *C. albicans* و بكتريا *E. coli* و *P. aeruginosa* على التوالي . وكما في الجدول (2) .

يمكن ان تعزى الفعالية التثبيطية الى احتواء راشح بكتريا *L.salivarius* على خليط من الحوامض العضوية والبكتريوسين والذي ادى الى تثبيط نمو الاحياء المجهرية قيد الاختبار . تنتج بكتريا *Lactobacillus* العديد من المواد المثبطة منها الحوامض العضوية والبكتريوسين [8]. لوحظ ان لبكتريا *L.salivarius* القدرة على تثبيط نمو بكتريا *E. coli* و *Salmonella* [16] ، كما ولوحظ امتلاك راشح بكتريا *L.salivarius* الحامضي المركز وغير المركز فعالية تثبيطية تجاه نمو بكتريا *S.aureus* [17] و تنتج الانواع التابعة لجنس *Lactobacillus* مواد مثبطة وقاتلة لبكتريا *E. coli* متمثلة بالدرجة الاساس بانتاج الحوامض العضوية والقدرة على خفض الرقم الهيدروجيني [18]. ويعود التأثير التثبيطي للحوامض العضوية الى قدرتها على اختراق الاغشية الخلوية واعاققة نقل المواد الغذائية لما تمتلكه الحوامض العضوية من خاصية الذوبان في الدهن لتصبح سريعة الانتشار بصورة حرة خلال الغشاء البلازمي البكتيري الى الساييتوبلازم [19]. اشير الى امتلاك رواشح بكتريا *Lactobacillus* فعالية تثبيطية تجاه خميرة *Candida spp.* وتكون تلك الفعالية قليلة او متوسطة بفعل المواد المثبطة التي تثبط نمو الخميرة والمتمثلة بالحوامض العضوية وبيروكسيد الهيدروجين والداي اسيتيل [20 ، 21] ، ولاسيما قدرة

## جدول (2) النسب المنوية لتثبيط تكوين الغشاء الحيوي للاحياء المجهرية قيد الاختبار باستعمال الرواشح المركزة وغير المركزة لبكتريا *L.salivarius*

الكثافة الضوئية (O.D) 630 نانوميتر					
النسب المنوية للتثبيط %	الراشح غير المركز	النسبة المنوية للتثبيط %	الراشح المركز	معامل السيطرة	الاحياء المجهرية
4	0.098	28	0.074	0.102	<i>P. aeruginosa</i>
8.5-	0.102	28.8	0.067	0.094	<i>pp. Klebsiella</i>
8.5	0.098	29	0.077	0.0107	<i>E. coli</i>
9	0.076	23	0.064	0.083	<i>C. albicans</i>

انزيماتها فضلا عن خصائص الجدار الخلوي ، جميع هذه العوامل متحدة يمكن ان تؤثر في التداخل بين جزيئات البروتينات المثبطة والمستقبلات السطحية للخلايا فضلا عن عدد ونوع المستقبلات المتاحة التي قد تختلف بين العزلات [24]. وهذا مما قد يشير الى بعض خواص المعزز الحيوي في داخل الجسم الحي اذ انه يثبط المرض من خلال اختزال الكثافة العددية له ويمتلك قابلية على انتاج مواد مزارع الاساس بالمجموع *Quarum Sensing substances* مما يعزز بدوره من مناعة المضيف حيال المرض .

### المصادر:

- [1] Caralampopoulos, D. and Rastall, R. A. 2009. Prebiotics and Probiotics Science and Technology. Springer. 1<sup>st</sup>.

يمكن الاستنتاج مما تقدم من نتائج الدراسة الحالية امتلاك الراشح المركز لبكتريا *L.salivarius* القدرة على تثبيط الغشاء الحيوي للاحياء المجهرية وهذا يتفق مع ملاحظته [23] في ان الراشح المركز المنتج من بكتريا *Lactobacillus* له فعالية مضادة لتكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *E. coli* و *Klebsiella spp.* قد يعزى الاختلاف في مدى حساسية الاحياء المجهرية المكونة للغشاء الحيوي للرواشح المنتجة من بكتريا *L.salivarius* تبعاً لعوامل عديدة تتضمن موقع العزل (والتي تتأثر بلاشك بالانواع *species* ونوع السلالة الموجودة)، الظروف البيئية الدقيقة (*niche*) التي ربما تحدث تغييرات مظهرية في العزلات ، الفعالية الفسلجية لكل عذلة التي تعود الى الاختلاف في تركيبها الجيني والتي بدورها تنعكس على فعاليتها الابضية ونشاط

- Strain. Appl Environ Microbiol. 65(12): 5631–5635.
- [10] Nouri, M.; Rahbarizadeh, F.; Ahmadvand, D.; Moosakhani, F.; Sadeqzadeh, E.; Lavasani, S. and Vishteh, V. KH. 2010. Inhibitory effects of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus crispatus* isolated from chicken gastrointestinal tract on *Salmonella enteritidis* and *Escherichiacoligrowth*. Iranian Journal of Biotechnology., 8(1):32-37.
- [11] Hammes, W. P. and Vogel, R. F. 1995. The Genus *Lactobacillus*. In: The Lactic Acid Bacteria, the Genera of Lactic Acid Bacteria. Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (Eds.). Vol. 2, Blackie Academic and Professional, London.PP: 19-54.
- [12] 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.
- [13] Devi, M.; Rebecaa, L. J. and Sumathy, S. 2013. Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus delbreukii* Isolated from Yoghurt. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences., 4(2):1429.
- [14] Mireles, J. R.; Adam, T. and Rsaika, M. H. 2001. *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Swarming Mutants with Altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Biofilm Formation. J. of Bacteriology., 183(20) : 5848–5854.
- [15] Ali, O. A. 2012. Prevention of *Proteus mirabilis* Biofilm by Surfactant Solution. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci., 4(1): 1- 8.
- [16] Otte, J. M and Podolsky, D. K. 2004. Functional modulation of enterocytes by gram positive and gram-negative microorganisms. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 286: G613-G626.
- Dordrecht HeideIberg London New York.pp:1273.
- [2] Tamime, A. 2005. Probiotic Dairy Products. Blackwell publishing Ltd. 1<sup>st</sup>. UK.pp:234.
- [3] Ghanbari, M.; Rezaei, M.; Nazari, R. M. and Jami, M. 2009. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species from intestinal contents of beluga [Husohuso] and Persian sturgeon [Acipenser persicus]. Iranian Journal of Veterinary Research., 10 (2): 152-157 .
- [4] Vijayabaskar, P. and Somasundaram, S. T. 2008. Isolation of bacteriocin producing Lactic Acid Bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. Biotechnology., 7: 124-128.
- [5] O'Shea, E. F.; O'Connor, P. M.; Raftis, E. J.; O'Toole, P. W.; Stanton,; Cotter, P. D. Ross, R. P. and Hill, C. 2011. Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of *Lactobacillus salivarius*. J. Bacteriol.; 193(24): 6973–6982.
- [6] Ocana, V.S and Nader-Macias, M.E. 2002. Vaginal lactobacilli: self- and coaggregating ability. Br J Biomed Sci., 59:183-190.
- [7] Murry Jr, A. C; Hinton Jr, A. and Morrison, H. 2004 Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. Int J Poultry Sci., 3: 603-60.
- [8] Peran, L. et al. 2005. Preventative effects of a probiotic, *Latobacillus. Salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. World J Gastroenterol., 22 :5185-5192.
- [9] Ocana, V. S.; Holgado, A. A. P. and Nader-Macias, M. E. 1999. Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius*

- [21] 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 Applied Microbiology and Microbial Biotechnology., 827-837.
- [22] 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 Journal of Medical Microbiology., 24(1):25-29.
- [23] Brozozowski, B.; Bednarski, W. and Golek, P. 2011. The adhesive capability of two *Lactobacillus* strains and physiochemical properties of their synthesized biosurfactants. Food Technol Biotechnology., 49(2):177-186.
- [24] Rorigues, L. R.; Van der Mei, H. C.; Teixeira, J. A. and Oliveira, R. 2004. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilm on voice prosthesis. Appl. Environ. Microbiol., 70 :4408-4410.
- [17] Salman, J. A. S. 2014. Effect of *Lactobacillus salivarius* metabolites against *Staphylococcus aureus* producing Phenol-Solubel Modulins (PSMs) .International Journal of current Microbiology and Applied Sciences., 3(8): 178-184.
- [18] Ogawa, M.; Shimizu, K.; Nomoto, K.; Tanaka, R.; Yamasaki, S.; Takeada, T. and Takeda, Y. 2001. Inhibition of *In vitro* growth of Shiga toxin – producing *E.coli*O157: H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. Intern. J. Food. Microbiol., 68 : 135 – 140 .
- [19] Ogawa, M.; Shimizu, K.; Nomoto, K.; Takahashi, M.; Tanaka, R.; Tanaka, T.; Yamasaki, S. and Takeda, Y. 2001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain shirota on shiga toxin – producing *E. coli*O157: H7 infection in infant Rabbits. Infect and Immun., 69(2): 1101 – 1108.
- [20] Ogunshe, A. O. A; Omotoso, M. A and Bello, V. B. 2011. The In Vitro Antimicrobial Activities of Metabolites from *Lactobacillus* Strains on *Candida* Species Implicated in *Candida Vaginitis*. Malays J Med Sci., 18(4): 13–25.

## Effect of *Lactobacillus salivarius* supernatant against growth and biofilm formation of some pathogenic microorganisms

*Khawlah J. Khalaf*  
*Hamzia A. Ajah*

*Nibras N .Mahmood*  
*Jehan A. S. Salman*

Department of Biology, College of Science, AL-Mustansirya University

Received 9/3/ 2015

Accepted 15/6/ 2015

### **Abstract:**

The Inhibitory effect of cocentrated and non-cocentrated supernatant of the probiotic *Lactobacillus salivarius* against growth of some potential pathogenic microorganisms which included *Pseudomonas eruginosa*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The results were diffusion assay revealed that concentrated and non-concentrated supernatant had inhitory effect against pathogenic bacteria with inhibition zone renged between 13-17mm while inhibition effect of concentrated supernatant against *C.albicans* was inhibition zone 8mm. On the other hand, the effect of these suprnatant against biofilm formation of the tested microorganisms was studied. The result showed that the concentrated supernatant had inhibitory effect on biofilm formation for all tested microorganisms with percentage (28-29)% against tested bacteria and (23)% against *C.albicans*.

**Key words:** *Lactobacillus salivarius*, pathogenic microorganisms, biofilm