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

استخلاص وتنقية جزئية للبروتينات المثبطة المعزولة من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* (Packmaya) وفعاليتها في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لبكتريا المكورات العنقودية

فاطمة رمضان عبدل[1] و نهاد عبد طاهر[2] و فراس نبيه جعفر[3] وليث باسم علي[4]
(1 و2) مدرس(3) مدرس مساعد ، قسم علوم الحياة /كلية العلوم – الجامعة المستنصرية
(4) مدرس مساعد ، قسم علوم الحياة / كلية العلوم -جامعة الكوفة

الخلاصة

تعتبر خميرة *Saccharomyces cerevisiae* من اهم المعززات الحيوية التي تمتاز بامتلاكها عدة آليات متنوعة لإظهار فعاليتها الحيوية، مما يعطيها قوة علاجية ووقائية في الوقت نفسه. يهدف هذا البحث إلى دراسة دور البروتينات المثبطة المنتجة من هذه الخمائر في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي للبكتريا المرضية . وبناءا على ذلك فقد جمعت 30 عزلة من بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات مرضية مختلفة تم الحصول عليها من بعض مختبرات مستشفيات بغداد, تم تقصي تكوين الغشاء الحيوي المنتج من قبل *S. aureus* باستعمال طريقة اطباق المعايرة الدقيقة Microtitration plates method (MTP) . اذ بلغت نسبة العزلات المكونة للغشاء الحيوي بقوة 56.7% و الضعيفة 26.6% , في حين كانت نسبة العزلات الغير مكونة للغشاء الحيوي 16.7%. استعملت خميرة الخبز الجافة المستوردة (Packmaya) *Saccharomyces cerevisiae* التركية المنشأ والمتوافرة في الاسواق المحلية. أدت تنقية البروتين المثبط باستعمال الترسيب بسلفات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين 30 الى 70% لترسيب البروتينات الموجودة في وسط النمو للعزلة *S. cerevisiae* PY، تلاها اجراء التنافذ الغشائي الى إعطاء نتيجة بلغت 0.511 ملغم / مل بروتين, وكان للبروتين المثبط والمنقى جزئياً فعلاً مضاداً لتكوين الغشاء الحيوي تجاه بكتريا *S.aureus* ، وبلغ التركيز المثبط الادنى للبروتين المنقى جزئياً (64) ملغرام/ ملليلتر تجاه معظم العزلات . وتباينت فعالية البروتين المثبط والمنقى جزئيا المضادة لتكوين الغشاء الحيوي على عزلات بكتريا *S.aureus* , وكانت العزلة الاكثر تحسسا هي المعزولة من الانف, فيما كانت البكتريا المعزولة من الجروح الأقل تحسساً له.

المقدمة

تعود خميرة *S. cerevisiae* إلى صنف الفطريات الكيسية Ascomycetes، رتبة Endomycetales، عائلة Saccharomycetaceae، جنس Saccharomyces ونوع cerevisiae ، وتتميز بكونها كائنات مجهرية وحيدة الخلية حقيقية النواة خلاياها الخضرية بيضوية أو كروية أو مخروطية الشكل ومتطاولة تظهر بشكل مفرد أو مرتبة بشكل مجاميع صغيرة مكونة مستعمرات ذات لون ابيض أو كريمي بشكل دائري صغير الحجم ذات حافات منتظمة وسطح محدب ولها قوام لزج (1)، تعد هذه الخميرة من المعززات الحيوية التي تساهم في المحافظة على انتظام عمل الأمعاء فضلا عن أبقاء مستوى النبيت الطبيعي للكائن الحي بشكل متوازن ، واستعملت الخميرة بشكل واسع كبديل للمضادات الحيوية في الدواجن لفعاليتها العالية في منع التصاق الخلايا المرضية في جدران الخلايا المعوية (2)، تمتلك هذه الخميرة تأثيرات فعالة ضد السموم الميكروبية التي تنتجها الكائنات الممرضة وذلك من خلال تثبيط فعل أو اختزال تأثير هذه السموم فضلاً عن قدرتها في تغليف السموم الجرثومية ومنع وصولها الى مستقبلات الخلايا الطلائية المعوية (3) .

تمتلك سلالات بكتريا *S.aureus* القابلية على انتاج العديد من الذيفانات والانزيمات التي لها تأثيرات مؤذية على خلايا المضيف، ويعود لها السبب في العديد من الامراض ، منها السلالات التي تنتج ذيفان متلازمة الصدمة السمية (TSST-1) والسلالات التي تنتج الذيفان الخارجي المقشر(Exfoliatin) A اوB ، ولها قابلية ايضاً على انتاج ذيفانات حالة للدم منها ذيفانات alpha -hemolysin الذي يمتلك قابلية اختراق أغشية الخلايا حـــقيقية النواة و ذيفانات β -hemolysin. من جانب آخر تمتلك معظم سلالات *S.aureus* القابلية على انتاج انزيمات منها Proteases , Collagenases , Lipases الوظيفة الرئيسية لهذه الانزيمات هو تحويل انسجة المضيف الى مواد مغذية للخلية البكتيرية (5,4). تعد قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) من أحد عوامل الضراوة المهمة للبكتريا ، حيث يساعدها على البقاء حية في الظروف القاسية ، ويعد مسؤولاً عن 65% من الاصابات المرضية ، ومن تلك الاصابات التهاب الاذن الوسطى والاصابات المتعلقة بالأدوات الطبية واصابات المجاري البولية المرافقة لاستعمال ادوات القثطرة والتهاب اللثة وتسوس الاسنان (6,7). يمثل الغشاء الحيوي مشكلة رئيسية في العديد من المجالات مثل انظمة تصنيع المياه وتصنيع الاغذية ، فضلاً عن المجالات الطبية (8).

المواد وطرائق العمل

العزلات البكترية : استخدمت في هذه الدراسة 30 عزلة من بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات مرضية مختلفة التي شملتها الدراسة وعلى النحو الاتي: (11) عزلة من اخماج الجروح ورمز لها (W) ،(6) عزلات من دمامل الجلد (SK) ، (6) عزلات من التهاب اللوزتين (TH), (4) من أصابات الانف (N) و (3) عزلات من التهاب الآذن الوسطى (OM) , اذ تم الحصول على العينات من مختبرات بعض المستشفيات في بغداد (الكندي التعليمي , الشهيد الصدر العام, ومستشفى الامام علي العام و المختبرات التعليمية في مدينة

الطب) , تم تشخيص العزلات باستخدام الفحوصات المجهرية، الصفات الزرعية والاختبارات البايوكيمياوية. تم تأكيد التشخيص باستخدام نظام الفايتك Vitek 2Compact (Bio Merieux France).

1- اتبعت الطريقة الواردة في (9) للتحري عن قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm وهي طريقة اطباق المعايرة الدقيقة Microtitration plates method , استخدمت القيم التالية في الجدول (1) للتمييز بين العزلات قيد الدراسة على اساس قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي.

الجدول (1): تحديد القدرة على تكوين الغشاء الحيوي حسب الامتصاصية

O.Dالامتصاصية	القدرة على الالتصاق	تكوين الغشاء الحيوي
<0.120	لا يحدث التصاق	لا يكون
0.240- 0.120	ضعيف	ضعيف
0.240>	قوي	قوي

(9) قدرت درجة تكوين الغشاء الحيوي حسب المعادلة الاتية

قدرة تكوين الغشاء الحيوي = معدل طيف الامتصاص لنموذج الاختبار – معدل طيف الامتصاص لمعاملة السيطرة

قسمت العزلات حسب الامتصاصية موجبة , ضعيفة وسالبة لتكوين الغشاء الحيوي.

عزلات خميرة *S. cerevisiae*: جمعت نماذج من الخميرة الجافة (PY) Packmaya التركية المنشأ. المستوردة من الاسواق المحلية .

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

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

B: تشخيص عزلات خميرة *S. cerevisiae*: شخصت عزلات الخميرة اعتمادا على خصائصها المجهرية والزرعية والكيموحيوية وحسب ما ذكر من قبل (11).

استخلاص وتنقية المواد المثبطة

تحضير واستخلاص راشح خلايا الخميرة: نميت الخميرة المشمولة بهذه الدراسة في ظروف نمو مثالية وكما يأتي: لقحت الخميرة في وسط Yeast Extract Glucose Peptone Broth (YEGPB) بعد أن ضبط الرقم الهيدروجيني في الوسط إلى 5.5، ثم حضنت بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة، بعدها وضع 100 مليلتر من الوسط نفسه في دوارق سعة 250 مليلتر ولقح بـ 3 مليلتر من الخميرة 1×10^6خلية/مليلتر، وبعد أن ضبط الرقم الهيدروجيني إلى 5.5، حضنت بحاضنة هزازة بدرجة حرارة 30م وبسرعة 125 دورة/ دقيقة ولمدة 24 ساعة. فصلت الخلايا بالنبذ المركزي المبرد بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4 م. عقم الراشح بمرشحات دقيقة Millipore ذات قطر0.22 مايكرومتر.

الترسيب بكبريتات الأمونيوم

استعمل الترسيب بكبريتات الامونيوم للحصول على تنقية جزئية للراشح، وكما يأتي:

1. نميت الخميرة المنتجة للمواد المثبطة في وسط YEGP السائل، وبعد أن ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5.5 وحضنت بدرجة حرارة 30م ولمدة 24 ساعة.
2. أجريت عملية النبذ المركزي المبرد بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4م، ثم أخذ الراشح وأضيف له كبريتات الأمونيوم بشكل متدرج في حمام ثلجي مع التحريك المستمر للحصول على نسبة إشباع 30 الى 70% وذلك بحسب جدول الإشباع الخاص بترسيب البروتينات، وبعدها ترك المحلول بدرجة حرارة التبريد حتى اليوم التالي(12).
3. نبذ المحلول بعد ذلك بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4م، وأهمل الرائق فيما أذيب الراسب في 10 مليلتر من دارئ Tris-HCL بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.4. ، تم تقدير تركيز البروتين الكمي للراشح (الخام والمنقى جزئيا) بطريقة (13).

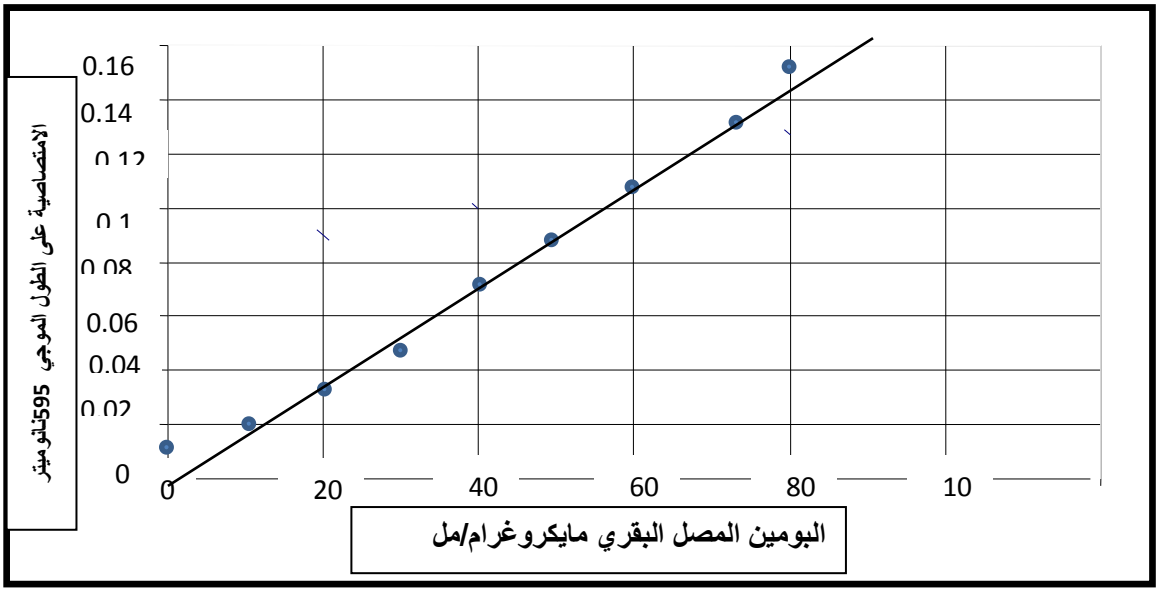
Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.8 / NO.1 / Year: 2016
Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

التنافذ الغشائي

تم ازالة كبريتات الأمونيوم المستعملة لتركيز المحلول البروتيني باستعمال اكياس التنافذ الغشائي ذات معدل فصل (cut-off) 8 كيلودالتون الى 12 كيلو دالتون التي تم إجراءها ضد دارئ Tris-HCL بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.4 لمدة 24 ساعة مع مراعاة تبديل المحلول الدارئ لمرات عدة لزيادة كفاءة عملية التنافذ الغشائي.

المنحنى القياسي لتقدير البروتين

استعملت طريقة (13) في تقدير تركيز البروتين.



الشكل(1) المنحني القياسي لألبومين المصل البقري لتقدير تركيز البروتين

فعالية البروتين المثبط المنقى جزئياً المضاد لنمو بكتريا *S. aureus* المنتجة للغشاء الحيوي

1-تحديد التركيز المثبط الادنى للبروتين المثبط المنقى جزئياً

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى للبروتين المثبط المنقى جزئياً تجاه (6) عزلات لبكتريا *S. aureus* المكونة للغشاء الحيوي ،اتبعت طريقة Broth dilution وحسب ما جاء في . (14)

2- فعالية البروتين المثبط المنقى جزئياً في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S. aureus*

دُرست فعالية البروتين المثبط المنقى جزئياً المنتج من خميرة *S. cerevisiae* (PY) في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S. aureus* باستخدام أطباق المعايرة الدقيقة المسطحة Flat bottomed Microtitration plates (15). حُسبت النسبة المئوية لتثبيط التصاق البكتريا المرضية بتطبيق المعادلة الواردة عن (16) .

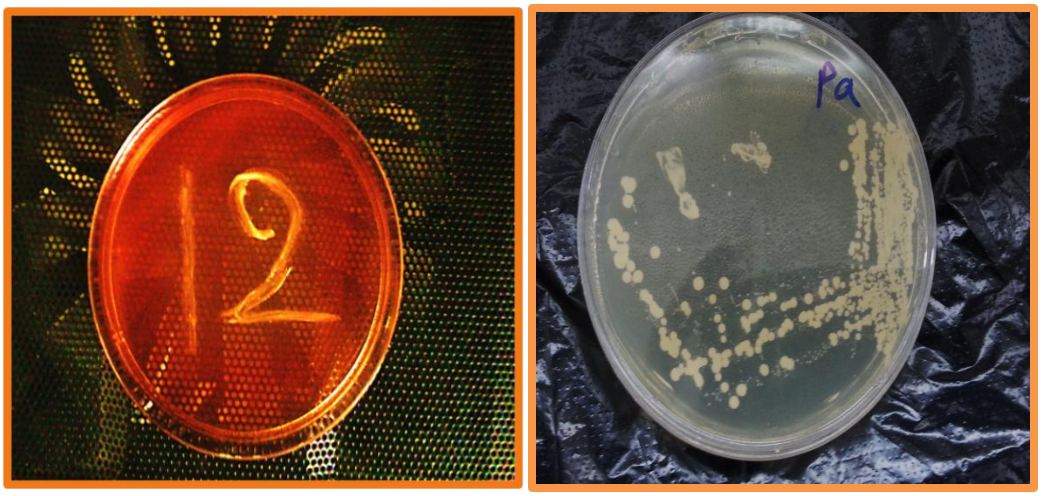
$$\text{النسبة المئوية لتثبيط الغشاء الحيوي} = 1 - \frac{\text{الكثافة الضوئية (O.D) بوجود البروتين المثبط}}{\text{الكثافة الضوئية (O.D) لمعاملة السيطرة}}$$

النتائج والمناقشة

شخصت عزلات الخميرة والبكتريا اعتمادا على خصائصها الزرعية والمجهرية والكيموحيوية, وذلك بعد ان اخضعت العزلات الى الاختبارات اللازمة لذلك, متضمنة القدرة على النمو في وسطي المانيتول الملحي والسابروبد الصلب كما ورده في (5 ,11), واكدت تشخيص العزلات البكتيرية باستعمال منظومة فايتك 2 شكل رقم (2).

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

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



(A) نمو خميرة *S. cerevisiae* PY على وسط السابرويد الصلب (B) نمو بكتريا *S. aureus* على وسط المانيتول الملحي

الشكل (2) يوضح مستعمرات خميرة الخبز وبكتريا المكورات العنقودية على الاوساط الصلبة

الجدول (2) نتائج اختبار الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي لعزلات بكتريا *S. aureus*

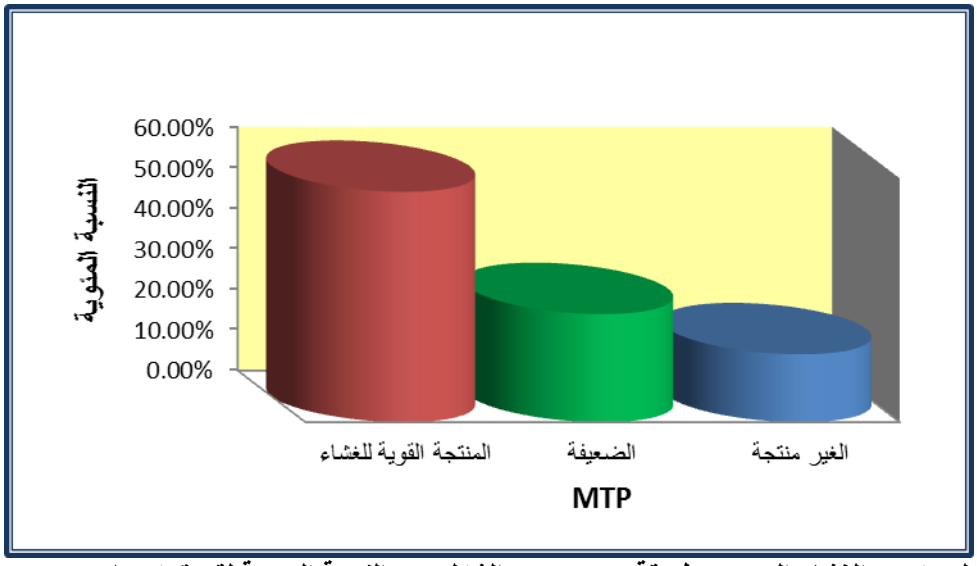
العزلات	معدل الكثافة الضوئية	معدل الكثافة الضوئية ـ معدل كثافة السيطرة
Control (negative)	0.127	0.127
S. aureus 1	0.243	0.117
S. aureus 2	0.490	0.363
S. aureus 3	0.591	0.464
S. aureus 4	0.453	0.326
S. aureus 5	0.293	0.146
S. aureus 6	0.481	0.354
S. aureus 7	0.622	0.495
S. aureus 8	0.385	0.258
S. aureus 9	0.311	0.184
S. aureus 10	0.174	0.047

0.456	0.583	*S. aureus* 11
0.318	0.445	*S. aureus* 12
0.084	0.211	*S. aureus* 13
0.302	0.429	*S. aureus* 14
0.106	0.233	*S. aureus* 15
0.192	0.318	*S. aureus* 16
0.317	0.444	*S. aureus* 17
0.442	0.569	*S. aureus* 18
0.451	0.578	*S. aureus* 19
0.062	0.189	*S. aureus* 20
0.598	0.725	*S. aureus* 21
0.380	0.507	*S. aureus* 22
0.174	0.301	*S. aureus* 23
0.562	0.689	*S. aureus* 24
0.375	0.502	*S. aureus* 25
0.238	0.365	*S. aureus* 26
0.141	0.268	*S. aureus* 27
0.241	0.241	*S. aureus* 28
0.336	0.463	*S. aureus* 29
0.117	0.244	*S. aureus* 30

- **الاحمر**: منتجة قوية للغشاء الحيوي
- **الاخضر**:منتجة ضعيف للغشاء الحيوي
- **الازرق**:غير منتجة للغشاء الحيوي

يوضح الجدول (2) نتائج اختبار تكوين الغشاء الحيوي حسب طريقة اطباق المعايرة الدقيقة Microtitration plates method , لعزلات *S. aureus* بعد فترة الحضن بان 83.3% من العزلات ابدت نتيجة موجبة لتكوين الغشاء الحيوي شملت كل من المنتجة القوية وكانت نسبتها (56.7%), اما المنتجة الضعيفة للغشاء الحيوي فكانت نسبتها (26.6%) , في حين بلغت نسبة العزلات السالبة

16.7% , ويبين الشكل (3) مقارنة بين النسب المئوية للنتيجة الموجبة القوية والضعيفة والسالبة لهذه الطريقة . استخدمت هذه بوصفها تقنية قياسية لسرعة التصاق الخلايا وتكوين الغشاء الحيوي في مختلف انواع الاحياء المجهرية كما في البكتريا السالبة لصبغة كرام او الموجبة لصبغة كرام او الخمائر , اذ ترتبط الصبغة المستخدمة مع الجزيئات سالبة الشحنة على سطح الخلية البكتيرية من سكريات متعددة فتعطي كامل القياس لتكوين الغشاء الحيوي . بينت دراسة (17) ا ن طريقة MTP تعد الاكثر حساسية وسهولة للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي , وان الكشف عن انتاج المادة المخاطية يعتمد على عوامل عديدة مثل طريقة التحري المستخدمة , نوع الوسط المســـتخـــدم وظروف الحضن .



الشكل (3):النسبة المئوية لقدرة بكتريا *S. aureus* على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة MTP

التنقية الجزئية للمواد البروتينية المثبطة المنتجة من خميرة *S.cerevisiae*

تم تنقية المواد البروتينية المثبطة باستعمال طريقة الترسيب بفعل الاملاح (Salting out) وهي كبريتات الامونيوم الصلبة . ان اختيار ترسيب البروتينات باستخدام كبريتات الامونيوم يعود لما تتمتع به هذه المادة من مزايا كذائبيتها العالية وكثافتها غير العالية اذ انها لا تتداخل مع ترسيب البروتينات عند نبذها فضلا عن توفرها وكلفتها المناسبة كما انها لا تسبب مسخا للبروتينات, أن سبب ترسيب البروتينات هو معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل ظاهرة التمليح الخارجي للبروتين , اذ تقوم ايونات الملح بسحب جزيئات الماء من البروتين وتنفصل البروتينات عند تعادل شحنات ايونات الملح مع شحنات جزيئات البروتين مما يؤدي الى انخفاض ذوبان البروتين وبالتالي ترسيبه (18).

اذ يبين الجدول (3) تركيز البروتين الكمي مقدرا بطريقة (13) لكل من الراشح الخام للخميرة والمنقى جزئيا بطريقة الترسيب والتنافذ الغشائي .

الجدول (3) تركيز البروتين ملغم /مل لراشح خميرة *S.cerevisiae* PY والمقدر بطريقة Bradford (1976)

تركيز البروتين ملغم /مل	الـــــــــــــراشـــــــح
0.148	راشح خميرة خام
0.511	الراشح المنقى جزئيا بالترسيب والتنافذ الغشائي

فعالية البروتين المثبط المنقى جزئياً المضاد لنمو بكتريا *S. aureus* المنتجة للغشاء الحيوي

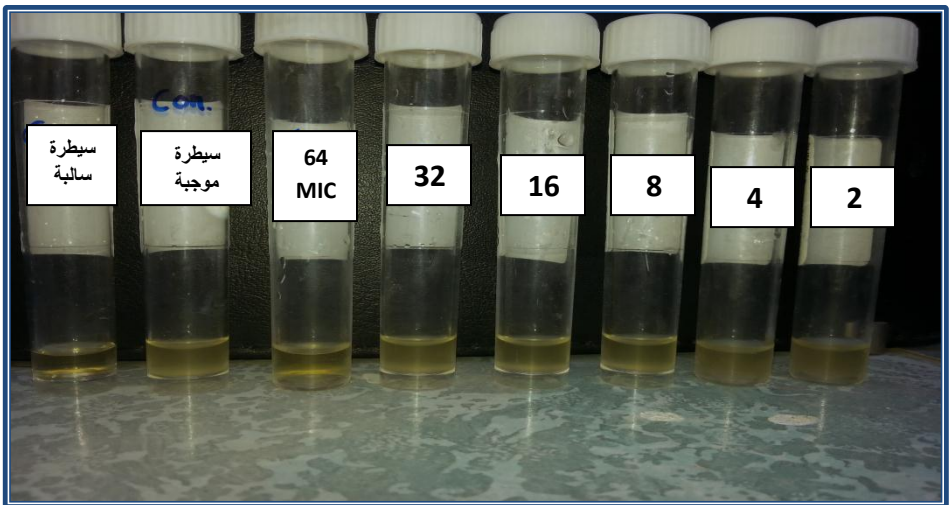
انتخبت خمس عزلات بكتيرية من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بحيث ضمت جميع الحالات المرضية المشمولة بالدراسة والمكونة للغشاء الحيوي .

تحديد التركيز المثبط الادنى للبروتين المثبط المنقى جزئيا وتأثيره على نمو بكتريا *S. aureus*

قـــدرت الـــفعالية الـــتثـــبيطية لـــلـــبروتين الـــمـــثبط المـــنقـــى جـــزئيا المنتج من عزلة الخمـــيرة *S.cerevisiae* PY تجاه (5) عزلات من بكتريا *S. aureus* من خلال تحديد التركيز المثبط الادنى بطريقة التخافيف,

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

وبينت امتلاك البروتين المثبط المنقى جزئيا فعالية تثبيطيه لنمو البكتريا قيد الاختبار , وبلغ التركيز المثبط الادنى تجاه البكتريا المزولة من الجروح(128) ملغرام /ملليلتر . فيما كان تركيز(64) ملغرام /ملليلتر التركيز المثبط الادنى تجاه البكتريا المعزولة من التهاب الاذن الوسطى والجلد والانف , كما موضح في الشكل (4), في حين كان التركيز المثبط الادنى للبكتريا المعزولة من اللوزتين (32) ملغرام /ملليلتر. هنالك دراسات عديدة حول التأثير التثبيطي لنمو المايكروبات للبروتينات المثبطة المكونة من الخمائر لكن الدراسات حول تأثير البروتين المثبط المنتج من خميرة *S.cerevisiae* تجاه بكتريا المكورات العنقودية المكونة للغشاء الحيوي تعد قليلة . فقد اشارت دراسات عديدة على قدرة رواشح الخمائر على تثبيط نمو الممرضات البكتيرية من خلال التأثير التضادي المباشر خارج الجسم مثل تثبيط نمو بكتريا*Salmonella typhimurium* و *E.coli* و *Shigella flexneri* و *Staphylococcus aureus* و *Clostridium difficile* وخميرة *Candida albicans* و *Candida krusei* و*Candida tropicalis* (20,19).



الشكل(4): الفعالية التضادية للبروتين المثبط المنقى جزئيا في نمو بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بطريقة الانابيب

تأثير البروتين المثبط المنقى جزئيا بتركيز Sub MIC على تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا المكورات العنقودية

درست فعالية البروتين المثبط المنقى جزئيا المنتج من عزلة الخميرة *S.cerevisiae* PY لتثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S. aureus* باستعمال طريقة اطباق المعايرة الدقيقة وتعد الطريقة الادق والافضل في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي والتصاق البكتريا (21).بينت النتائج في الجدول (4) امتلاك البروتين المثبط المنقى جزئيا القدرة على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي على العزلات البكتيرية قيد الدراسة , مع تباين التأثير التثبيطي ، وكانت بكتريا *S.aureus* المعزولة من الانف الأكثر تحسساً له تليها بكتريا *S.aureus* المعزولة من دمامل الجلد ومن ثم البكتريا المعزولة من التهاب اللوزتين ،عندما بلغت نسبة التثبيط (30 و17 و12)% على التوالي. فيما لم يظهر تأثير تثبيطي لتكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S.aureus* المعزولة من الجروح والاذن الوسطى.

جدول (4) النسب المئوية لتثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S. aureus* باستعمال البروتين المثبط المنقى جزئيا

العزلات البكتيرية	الكثافة الضوئية (O.D)		النسبة المئوية للتثبيط(%
	معاملة السيطرة	البروتين المنقى جزئيا	
S. aureus W	0.178	0.274	- 54
S. aureus N	0.248	0.173	30
S. aureus TH	0.263	0.231	12
S. aureus SK	0.308	0.257	17
S. aureus OM	0.223	0.298	- 34

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

سيطرة : بغياب البروتين المثبط
القيمة السالبة: دلالة على عدم وجود تثبيط
اشار(22) الى دور مستخلص خميرة *S.cerevisiae* في تثبيطها لالتصاق بكتريا المكورات الذهبية بالخلايا Endothelialcells في الانسان من خلال ارتباطها بمواد بروتينية ذات وزن جزيئي عالى يقدر(220) كيلو دالتون, كما لوحظ التأثير التثبيطي لخميرة *S.cerevisiae* ضد التصاق بكتريا *Salmonella typhimurium* و *E.coli* و *Shigella flexneri* و *Proteus mirabilis* بالخلايا الطلائية لجدران الامعاء(24,23) .

المصادر

1. **Stefanini,** I.; Dapporto, L.; Legras, J. L.; Calabretta, A.; Paola, M. D.; Filippo, C. D.; Viola, R.; Capretti, P.; Polsinelli, M.; Turillazzi, S. and Cavalieri, D. (2012). Role of social wasps in Saccharomyces cerevisia ecology and evolution. PNAS. 109(33): 13398–13403 .

2. **Shareef**, A. M. and Al-Dabbagh, A. S. A. (2009). Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of broiler chicks. Iraqi Journal of Veterinary Sciences. 23(1): 23-29.

3. **Vandenplas** ,Y.; Thierry, D. and Hauser, B. (2008). Efficacy of *Saccharomyces boulardii* in Acute Childhood Diarrhea Unit for Pediatric Gastroenterology. Universitair Ziekenhuis Kinderen. Brussels.

4. **Jawetz** Melnick and Adelberg,s; Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A.(2004). Medical Microbiology. 23th ed. Appelton & Longe. Coliforina Woodford N. Biological counterstrike: Antibiotic resistance mechanisms of gram-positive cocci. *Clin Microbiol Infect*. (2005); 11 Suppl 3: 2-21.
5. **Forbes**, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S.(2002). Baily and Scott's Dignostic Microbiology. 11th ed. Mosby, Inc, St. Louis. U.S.A.

6. **Ansari**,S.A. ; Baqai,R. ; Memon,M.R. ; Aziz,M. and Khan,M.K.(2011). Biofilm Formation and Isolation Of *Staphylococcus aureus* From blood Cultures Of Dental Patients Undergoing Oral Surgical Procedures. J.Pak.Dent.Assoc., 20(03):181-184.

7. **Hola**,V. and Ruzicka,F. (2011). The Formation of Poly-Microbial Biofilms on Urinary Catheters. in Urinary Tract Infections. Edited by Tenke,P. InTech. China.,Pp:153-172.

8. **Manijeh,**M. ; Mohammad,J. and Roha,K.K.(2008). The Assessment of Biofilm Formation in Iranian Meat Processing Environments. Research Journal of Microbiology., 3(3): 181-186.

9. **Bose,**S.,Khodke,M.,Basak,S.and Mallick,S.K.(2009).Detection of biofilm producing Staphylococci: need of the hour.J.Clin. Diag.Res.,3:1915-1915.
10. **Herrero,** M. B.; de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1999). Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. Biology of Reproduction. 61: 575-58.
11. **Ellis**, D. H. (1994). Clinical Mycology. The Human Opportunistic Mycosis. Gillingham Printers PTY Ltd.
12. **Zhu**, H.; Bussey, H.; Thomas, D. Y.; Gagnon, J. and Bell, A. W. (1987). Determination of the carbosyl termini of the α and β subunits of yeast KI killer toxin. J. Bio. Chem. 262: 10728-10732.

13. **Bradford** ,M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of Microgram quanities of protien –dye binding .Anal.Biochem.72:248-254.

14. **Morello,**J.A.; Granato, P.A. and Mizer, H.E. (2003). Laboratory Manual and Workbook in Microbiology:Applications to patient Care. 17th edition. The Mc Grow-Hill Companies: 97-99.

15. **Ali**,O.A.(2012). Prevention of *Proteus mirabilis* Biofilm by Surfactant Solution. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci., 4(1): 1- 8.

16. **Gudina** ,E.J. ; Teixeira,J.A. and Rodrigues,L.R.(2010). Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces ,76 : 298-304

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

18. **Sattayasai** ,N .(2012).Protein purification, Chemical Biology, ISBN.,51: 953-978.

19. **Zbinden,** R.; Gonczi, E. E. and Altwegg, M. (1999). Inhibition of *Saccharomyces boulardii* (nom.inval.) on cell invasion of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. Microb. Ecol. In Health. Dis. 11: 158-162.

20. **Brandao**,R.L.;Castro,I.M.;Bambirra,E.A.;Amaral,S.E.;Fietto,L.G.;Tropia ,M.J.M . ;Neves,M.J. ;Santos,R.G.D. ;Gomes,N.C.M. and Nicoli ,J.R. (1998). Intracellular singal triggered by cholera toxin in Saccharomyces boulardii and Saccharomyces cerevisiae .Appl. Environ .Microbiol.,64(2):564-568.

21. **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.

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

23. **Auclair**,E.(2001) .Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species In: Feed manufacturing in the Mediterranean region. Brufau J.(ed.) Zaragoza : CIHeam-IAMZ,pp.45-53.

24. **Czerucka**,D.;Dahan,S.;Mograbi,B.;Rossi,B. and Rampal,P. (2000). Saccharomyces boulardii preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic Escherichia coli-infected T84 cells. Infect . Immun . , 68(10):5998-6004.

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

Extraction and Partial Purification of Inhibitory Proteins of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Packmaya) and their Activity Against *Staphylococcus aureus* Biofilm formation

ABSTRACT

The yeast *S. cerevisiae* consider of the most important probiotic Which characteristic that has many mechanisms to appear their bioactivity which give it prophylaxis and therapeutic force in the same time .The aim of this search to study the role of the inhibitory proteins producer from these yeasts against the pathogenic bacteria biofilm formation, So that thirty isolate of *S. aureus* were collected from different clinical specimens from some hospitals in Baghdad. The ability of the isolates to produce biofilm were tested detected using microtiter plates method (MTP) , Dry imported bakery yeast that is available in locally markets were used to obtain isolate of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (packmaya), (Turkish origin). Purification steps for inhibitors proteins included use of ammonium sulfate 30-70 % saturated to precipitate the proteins that are found in the growth medium for *S. cerevisiae* PY isolate, followed by an concentrated dialysis give the yield reaching 0.511 mg /ml protein . The MICs of partial purified inhibitory protein showed inhibitory effect against most bacterial growth at concentration (64)mg/ml. Partial purified inhibitory protein showed different effect on *S. aureus* biofilm formation , the isolate was more sensitive to partial purified inhibitory protein (*S. aureus* N) and the less sensitive was (*S. aureus* W).