Effect of *Lactobacillus acidophilus* Supernatant on the Biofilm Formation of Some Pathogenic Bacteria

Khitam Ali Obaid

University of Mustansiriya, College of Science, Department of Life Sciences

khitamalkhezali@uomustansiriyah.edu.iq

ARTICLE INFO
Submission date:31/1/2019
Acceptance date: 29/4/2019
Publication date: 29/5/2019

Keywords: Biomembrane, CRA medium, Microtiter dish, Gram positive and negative bacteria, Lactobacillus acidophilus.

Abstract

This study included the investigation of the ability of some gram positive and gram negative bacterial species to produce viscous layer which play a role in biofilm formation and complication of pathogenic infections and resistance to antibiotic therapy.

Forty five bacterial isolates were used in this study, they include: *Escherichia coli*(13 isolates), *Staphylococcus aureus*(10 isolates), *Acintobacter baummanni* (10 isolates), *Klebsiella pneumonia* (7 isolates) and *Enterobacter aerogines* (5 isolates).

Two methods were used to detect biofilm production which include: Congo red agar medium (CRA) and Microtiter (MTP) method.

The results showed that Microtiter plate method was more sensitive for slime layer detection as the rate of production was 48.88% from all isolates as compared with 42.22% positive results in Congo red agar method. There are clear differences in moderate and negative results for both methods.

Also study resistance isolates to antibiotics, The results showed that

all isolates were 100% sensitive to Imipenem and Amikacin, while the isolates were resistance 28.8% to Tobramycin, whereas Norfloxacin resistance was only by *Acintobacter baummanni*, with 22.2%, While the ratio of resistant of isolates to gentamicin was 31.1%.

تأثير راشح المعزز الحيوي*Lactobacillus acidophilus* على الغشاء الحيوي المكون من بعض انواع البكتريا المرضية

ختام علي عبيد

الجامعة المستنصرية, كلية العلوم , قسم علوم الحياة

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية التحري عن قدرة بعض الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام على إنتاج المادة المخاطية التي تلعب دورا مهما في تكوين الأغشية الحيوية وتؤدي إلى تفاقم الإصابة المرضية ومقاومة المضادات الحياتية، تضمنت الأنواع البكتيرية قيد الدراسة 45 عزلة بكتيرية شملت*Escherichia coli* (13 عزلات) و *Staphylococcus aureus* (10 عزلات) و *Acintobacter baummanni* (10 عزلات) و *Klebsiella pneumoniae* (7عزلات), *Enterobacter aerogines*(5 عزلات). استخدمت في هذه الدراسة طريقتين للتحري عن إنتاج الغشاء الحيوي وهي طريقة وسط اكار الكونغو الأحمر (CRA) Congo red agar وطريقة طبق Microtiter (MTP). أظهرت النتائج ان طريقة طبق Microtiter (MTP) كانت الأكثر حساسية في التحري عن إنتاج المادة المخاطية إذ بلغت نسبة العزلات الموجبة في هذه الطريقة 48.88%

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBAS) by University of Babylon is licened under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. 2018.

مقارنة بطريقة Congo red agar (CRA) التي كانت نسبة العزلات الموجبة فيها 42.22%. في حين تباينت نسب النتائج الضعيفة والسالبة في كلتا الطريقتين.

كما تمت دراسة مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية واظهرت النتائج ان العزلات قيد الدراسة كانت حساسة 100% لمضادي Imipenem وAmikacin , اما مضاد Tobramycin فكانت نسبة المقاومة له 28.8% , فيما كانت مقاومة مضادNorfloxacin من قبل بكتريا *Acintobacter baummanni* فقط اذ بلغت نسبة المقاومة 22.2%, فيما كانت نسبة المقاومة لمضادGentamicin 31.1%.كما بينت النتائج امتلاك راشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* فعلا تثبيطيا تجاه البكتريا المرضية وبأقطار تثبيط تراوحت بين (7-24) ملم.

الكلمات الدالة: الغشاء الحيوي, وسط CRA , طبق Microtiter , البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام, *Lactobacillus acidophilus* .

المقدمة

الغشاء الحيوي(Biofilm): هو نظام معقد من الخلايا المتجمعة [1] ,[2] وتركيب فائق التعقيد يتكون من تجمعات من الخلايا متراصة فيما بينها محاطة بطبقة متعدد السكريد الخارجي(EPS) Exopolysccharide وهذه الطبقة تتشكل من البروتينات والكربوهيدرات والاحماض النووية مثل DNA والايونات مثل الكالسيوم والحويصلات الغشائية والدهون السكرية و عناصر الشد السطحي (Surfactants), تعمل كل هذه المكونات ركيزه لدعم الغشاء الحيوي[3], مكونه تركيباً ضمن حشوة (Matrix) من متعدد السكريد (Polysacchride) [4]. ان الحشوة هي كتلة حيوية (Biomass) مكونة على الاغلب من EPS اذ ان جزيئات هذه الطبقة تكون منتظمة في الحشوة ومعتمدة على التفاعلات بين المركبات والمواد البوليمرية الخارج خلوية (Extracellular polymeric substances) والتي تحدد ايضا الخصائص الميكانيكية والفعاليات الفيزيائية المنتظمة للخلايا داخل الغشاء الخلوي, كما تحتوي الحشوة على مكونات غير ذائبة مثل amyloids و الاهلاب (Fimbriae) والاهداب(Pili) والاسواط (Flagellae) [5], كما تتكون مسامات وقنوات بين الخلايا المكونة للغشاء الحيوي تعمل على تسهيل مرور السوائل والمواد الغذائية بين الخلايا المكونة للحشوة مما يوضح نظام تدوير العناصر والمركبات بين الخلايا المكونة للغشاء الحيوي [6].

ان الحشوة اوالخلايا المصفوفة المكونة للغشاء الحيوي تلعب دورا رئيسا في تركيب ووظيفة الغشاء اذ انها تعمل على ترطيب المواد الخارج خلوية والسيطرة على المصادر والقدرة على الهضم والحماية من المواد المضادة للبكتريا Antimicrobial اضافة الى تسهيل التفاعلات الداخل خلوية وبذلك تستطيع تحسين ايض الخلايا داخل الـــ Biofilm ومقاومة المواد المضادة للبكتريا.[7] .

ان الاسواط والاهداب والاهلاب والبولي سكريد من العوامل التي تساعد البكتريا على الالتصاق و التي تعلب دورا مهما في هذه العملية, و تساعد على نقل الغذاء والجينات بالاقتران البكتيري كما ان هنالك ظروفاً بيئية تكون مؤثرة على تكوين الغشاء الحيوي مثل الحرارة و pH و والمغذيات والاوكسجين [8].

هنالك اشارات كيميائية تدعى بالمحفزات الذاتية(Auto inducers) تتولد بين البكتريا داخل الغشاء الحيوي للتواصل فيما بينها وتدعى عملية التواصل بظاهرة النصاب الحسيsensing (Quorum)[9] , اذ بتغير البيئة الخارجية يحدث التغير في الغشاء الحيوي[10].

ان اغلب الاصابات الحالية ناتجة عن تكوين البكتريا للغشاء الحيوي مما يزيد من ضراوتها وطول مدة بقائها داخل المضيف ومنها الاصابات الناتجة عن تلوث الادوات الجراحية المستخدمة في العمليات والاصابات المزمنة غير المرتبطة بالاجهزة الطبية[11].

يعمل Biofilm على حماية الخلايا النامية من المؤثرات الخارجية والتي بدورها تتبادل جينيا حيث تحصل عملية التعبير الجيني فيما بينها لانتاج خلايا تكون اكثر مقاومة للظروف .كما ان الخلايا البكتيرية الملتصقة مباشرة بالسطوح تحرر مستضدات وتحفز انتاج الاضداد ولكنها لا تسبب قتل البكتريا وانما تسبب ضرراً مناعياً يحيط بالنسيج[12] .

ان البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام كلاهما تتمكن من تكوين الغشاء الحيوي[10], اذ ان تكون الغشاء الحيوي من اجناس بكتيرية مختلفة تجعله اكثر مقاومة فيما لو تكون من بكتريا تعود لجنس واحد , اذ وجد ان الغشاء الحيوي المتكون من عدة اجناس من البكتريا يكون اسمك واكثر استقرارا من Biofilm المتكون من جنس بكتيري واحد [13], وكذلك كلما تكون من بكتريا تعود لسلالات مختلفة كلما كانت مقاومته اكثر من امتلاكه لبكتريا تعود لنفس السلالة.

ان البكتريا المكونة للغشاء الحيوي تكون مقاومة للمضادات الحياتية التي تكون مثبطة للبكتريا بشكلها الحر [1]. اذ بين[14] وجماعته ان الغشاء الحيوي لبكتريا *P. aeruginosa* يحميها من دفاعات المضيف ويزيد مقاومتها للمضادات الحياتية.

كما وجد ان حدوث الطفرات الوراثية في الجينات يؤدي الى حدوث تطور سريع في مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية وخلال مدة قصيرة من استعمال هذه المضادات في العلاج ,لذا يتطلب البحث عن بدائل لعلاج الاصابات الناجمة عن البكتريا المكونة للغشاء الحيوي.

ونظرا للدور الكبير الذي تلعبه عملية الالتصاق(Adhesion) في احداث امراضية وبقاء الاحياء المجهرية واكتسابها عوامل مقاومة لكثير من المواد ومنها المضادات الحياتية برز اتجاه جديد للسيطرة على انتشار وتكاثر الميكروبات وذلك بتثبيط او اعاقة عملية الالتصاق وذلك باستخدام احياء مجهرية حية عند اعطائها بكميات محدودة تضيف فائدة صحية للمضيف يعرف بالمعزز الحيوي(Probiotic) [15]. اذ يمتاز جنس

عصيات الحليب *Lactobacillus*المتواجد في الاغذية المتخمرة(Fermented foods)بامتلاكه للعديد من الصفات التي تجعله معززاً حيوياً مؤثراً كالالتصاق ببطانة الامعاء واستيطانه السريع في القناة المعديه المعوية (Gastrointestinal tract) وكونه جنساً يشكل جزءاً من الاحياء المجهرية المتواجدة طبيعيا في مناطق مختلفة من الجسم كالفم والامعاء والمسالك البولية[16].

تعد المعززات الحيوية (Probiotics) النظام الدفاعي الاكثر اهمية عندما تصبح المضادات الحيوية عديمة الفائدة في تثبيط البكتريا . من اهم المعززات الحيوية بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus spp.* وهي عصيات واسعة الانتشار في بيئات مختلفة ومنها جسم الانسان مثل القناة التناسلية والبولية والهضمية.

هناك العدد من الدراسات التي تبين قدرة *Lactobacillus spp.* الرائعة على تثبيط نمو الاحياء الاخرى من خلايا فعاليتها القاتلة للبكتريا وانتاجها لحامض اللاكتيك كنواتج ثانوية في عملية الايض [17], اثبتت هذه البكتريا قابليتها على تثبيط نمو بعض الاحياء المجهرية نتيجة افرازها بعض المواد البروتينية التي يطلق عليها البكتيروسينات Bacteriocines, فضلا على قابليتها على الحد من عملية الالتصاق الجرثومي بسطوح خلايا الهدف عن طريق افرازها لمواد خارج خلوية تعرف بعوامل السطح الفعالة الحيوية Biosurfactants اذ تعمل بوصفها مستقبلات متوافقة او مضاهية للمستقبلات الحقيقية لهذه الجراثيم [18].

كما وجد ان المعززات الحيوية (Probiotics) لها دور في الاقصاء التنافسي(Competitive exclusion) ضد الممرضات اذ تتميز الاحياء العلاجية Probiotics بقدرتها التنافسية مع الكائنات الممرضة على موقع الالتصاق وتمنع تجمعها [19].

تمتلك بكتريا *Lactobacillus acidophilus* مواصفات المعززات الحيوية (Probiotics), اي انها خلايا مايكروبية لها تأثير مفيد في جسم الانسان , لانها تمتلك العديد من العوامل المثبطة للنمو المايكروبي ولها تأثير مثبط للبكتريا المرضية , ومن المواد التي تمتلكها هذه البكتريا المفيده حامض اللاكتيك وبيروكسيد الهيدروجين وحامض الخليك والايثانول وحامض الفوريك والبكتريوسينات والداي استيل والحوامض الدهنية [20], [21], اذ تكون هذه البكتريا فعالة ضد العديد من الامراض المتسببة نتيجة الاصابة بالبكتريا المرضية. لذا تتمكن هذه البكتريا من انتاج العديد من المواد المثبطة ومعالجة اصابات الجهاز الهضمي والحد من مشاكل سوء الهضم.

هدفت هذه الدراسة الى التحري عن فعالية راشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* تجاه نمو بعض الأحياء المجهرية المرضية وتأثيره في بعض عوامل الضراوة كالاغشية الحيوية لتلك البكتريا المرضية.

المواد وطرائق العمل

استخدمت في هذه الدراسة 45 عزلة من البكتريا الممرضة الموجبة والسالبة لصبغة كرام والمعزولة في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية للفترة من تشرين الاول 2017 لغاية كانون الثاني 2018 من عينات مرضية مختلفة تم تشخيصها استنادا إلى الطرائق المجهرية والزرعية والاختبارات البايوكيميائية الملائمة واعتمادا على[22] , وشملت كلاً من: *Escherichia coli*(13 عزلات), *Staphylococcus aureus* (10 عزلات), *Acintobacter baummanni* (10 عزلات), *Klebsiella pneumoniae* (7عزلات), *Enterobacter aerogines*(5 عزلات). كما ان عند اجراء اي فحص من الفحوصات الخاصة بالبكتريا المرضية يتم تنشيط البكتريا المذكورة على الاوساط المستعمله قيد الدراسه ولمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37°م.

الأوساط

1- وسط Congo red agar medium (CRA): يتكون من أكار نقيع القلب الدماغ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) 52 غرام, سكروز 36 غرام، صبغة الكونغو الأحمر 0.8 غرام في لتر من الماء المقطر، حضر وسطBHIA وعقم بالموصدة لوحده, كما عقمت صبغة CR بالموصدة بوصفها محلولاً مائياً مركزاً, وعقم السكر بالترشيح وبعد تبريد وسط BHIA الى 50° م أضيف إليه السكر وصبغة CR [23].

2- طبق Microtiter (MTP): تم استخدام طبق Microtiter (MTP) المعقم ذات قعر مسطح flat bottom المكون من 96 حفرة, ووسط Brain Heart Infusion Broth (BHIB)) و محلول دارئ الفوسفات بأس هيدروجيني pH= 7.2 و محلول مائي من صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet بتركيز0.1 % وايثانول بتركيز95 % [24] .

3- وسط Man-Regosa Sharpe (MRS) لعزل بكتريا *Lactobacillus acidophilus*.

4- وسط Muller Hinton agar لإجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية.

طرائق العمل: للتحري عن انتاج الأغشية الحيوية استخدمت طريقة وسط أكار الكونغو الأحمرCongo Red Agar Medium (CRA) وطريقة طبق الحفر Microtiter plate method (MTP).

طريقة عمل CRA:

لقحت العزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط Congo Red Agar Medium (CRA) وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة, بعد انتهاء التحضين تم تحديد النمط المظهري لإنتاج الأغشية الحيوية وقسمت العزلات إلى ثلاثة اقسام وهي كالآتي: عزلات منتجة للأغشية الحيوية بغزارة (Strong positive) تظهر بشكل مستعمرات سوداء ذات تألق بلوري و عزلات منتجة للأغشية الحيوية بشكل ضعيف Weak or (Moderate) تكون مستعمراتها بنية ذات اسوداد في مركزها و عزلات غير منتجة للأغشية الحيوية (Negative) تظهر بشكل مستعمرات حمراء أو وردية[10].

طريقة Microtiter plate method (MTP) :

حضر وسط Brain Heart Infusion Broth (BHIB) وعقم بواسطة جهاز Autoclave, ثم حضر سكر الكلوكوز وعقم بجهاز Autoclave لمدة عشر دقائق, بعد ذلك تم وزن 2 غرام من السكر في 100 مل من وسط BHIB بعد تبريد الوسط ثم وزع في انابيب معقمة , بعد ذلك وضع في كل حفرة 180 مايكروليتر من وسط BHIB و20 مايكروليتر من البكتريا وبذلك يكون المجموع الكلي في الحفرة 200 مايكروليتر, مع استخدام حفر سيطرة سالبة حاوية على وسط زرعي فقط في ثلاثة مكررات بكمية 200 مايكروليتر, بعد التلقيح وضعت Microtiter plate في الحاضنة لمدة 24 ساعة . في اليوم الثاني بعد الحضن ازيلت محتويات الحفر من المزروع البكتيري بواسطة ال Pipette, وغسلت كل حفرة 3 مرات بمحلول دارئ الفوسفات (phosphate buffer saline) (200) ماكروليتر لكل حفرة, اذ تغسل الحفر بال phosphate buffer saline ثلاث مرات لازالة الخلايا البكتيرية الطافية الحرة . ثم تركت لتجف بالهواء لمدة 15 دقيقة, ثم صبغت بصبغة الكريستال البنفسجي(Crystal violet) (0.1%) 200 ماكروليتر لكل حفرة لمدة 20 دقيقة, بعد ذلك غسلت الحفر بالمحلول الفسلجي(N.S.) 200 مايكروليتر لكل حفرة ثلاث مرات وجففت لمدة 15 دقيقة , وبذلك يمكن تقدير قابلية البكتريا على الالتصاق كمياً من خلال ملاحظة كمية الصبغة الملتصقة في الحفر, ولتقدير قدرة البكتريا على انتاج الغشاء الحيوي نوعياً تم استخلاص الصبغة الملتصقة بالحفر بإضافة كحول الايثانول 95% لكل حفرة بمقدار 200 مايكروليتر وازيل مباشرة , وقبل قراءة الامتصاصية تم إضافة الكحول مرة ثانية لكل حفرة 200 مايكروليتر لقراءة النتيجة بجهاز Microplate reader(LT-400) اذ قيست الامتصاصية عند الطول الموجي 630 نانوميتر .[24] , وبعد قياس الامتصاصية للحفر طرحت قيمة السيطرة السالبة من كل القراءات وقسمت العزلات حسب الامتصاصية الى موجبة وضعيفة وسالبة لإنتاج الغشاء الحيوي(Biofilm) .[26],[25]

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

درست حساسية العزلات باستعمال اقراص المضادات الحيوية على وسط Muller Hinton agar واعتماداً على طريقة [27]. استعملت المضادات الحيوية الآتية وهي من انتاج شركة Bioanulys (Turkey) لاجراء اختبار البكتريا لها Amoxicillin + Clavulanic (AMC) acid و Ciprofloxacin(CIP) و Gentamicin(CN) و Norfloxacin(NOR) و Ampicillin(AM). أجري اختبار حساسية المضادات الحيوية لجميع العزلات على وسط مولر – هنتون الصلب باعتماد طريقة [27] وتسمى طريقة الانتشار Diffution method، بنقل مستعمرة بعمر 24 ساعة بواسطة swab معقمة الى(5) مليلتر من المحلول الفسيولوجي (Normal saline) ورجت جيدا بتحريكها بالمازج (Vortex)فورنت عكورة النمو مع عكورة محلول ثابت العكورة القياسي (0.5).No ، بعدها نقل (100) مايكروليتر من العالق البكتيري ثم نشر بواسطة مسحة قطنية(Swab) معقمة في وسط اكار مولر – هنتون وتركت الاطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة(10 – 15) دقيقة، ومن ثم وضعت اقراص المضادات بملقط معقم الى الاطباق بواقع (4- 5) اقراص للطبق الواحد، حضنت الاطباق بدرجة (37) م° لمدة (24) ساعة . قرئت النتائج بقياس مناطق التثبيط حول الاقراص حسب ما جاء في[28] ،واستخدمت 5 انواع من المضادات الحيوية وهي Amoxicillin (AMC) Clavulanic acid + و Ciprofloxacin(CIP) و Gentamicin(CN) و Norfloxacin(NOR) و Ampicillin(AM).

تم الحصول على بكتريا *Lactobacillus acidophilus* من الالبان وتم التأكد من تشخيصها باعتماد الفحوصات الزرعية والكيموحيوية الواردة عن [29] بتوفير ظروف لاهوائية (5% من Co2), وحضنت في الحاضنة بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة.

راشح بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria filtrate

لقح وسط MRS(Man-Regosa Sharpe) السائل بلقاح (1%) من بكتريا حامض اللاكتيك , ثم حضن لا هوائيا بدرجة (37م) لمدة (24) ساعة [30],بعد الحضن تم نقل المزروع الى جهاز الطرد المركزي ونبذه بقوة 6000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة , اخذ الرائق وعدل الاس الهيدروجيني للراشح عند دالة الحموضة6.5=PH باستخدام NaOH . ثم تم ترشيح السائل الرائق(Supernatant) خلال مرشحات دقيقة Millipor filters بقطر (0.22 Mm) لغرض فصل المواد التي تفرزها البكتريا عن الخلايا[31].

طريقة الانتشار بالحفر Well-diffusion

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر Well-diffusion التي وصفها[32] للكشف عن الفعالية التثبيطية للراشح لبكتريا *Lactobacillus acidophilus*, اذ زرعت الاطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي الصلب بنشر (0.1) مل من مزروع البكتريا المرضية قيد الاختبار باستخدام

ناشر معقم, واستعمل ثاقب الفلين(cork porer) لعمل ثقوب قطرها (5) مليمتر على سطح الوسط. ملئت كل حفرة بـــــــــــ 50 مايكروليتر من راشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus*, حضنت بعدها الاطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة. وقيست مناطق التثبيط حول الحفر ثم قورنت مع معامل السيطرة الحاوي على وسط MRS السائل فقط دون لقاح بكتيري.

النتائج والمناقشة

قسمت العزلات حسب الامتصاصية للحفر الى موجبة وضعيفة وسالبة لإنتاج الغشاء الحيوي(Biofilm) ,اذ طرحت قيمة السيطرة السالبة من كل القراءات وكما مبين في الجدول(1) [25],[26] .

الجدول(1) تحديد القدرة على الالتصاق وانتاج الغشاء الحيوي(Biofilm) حسب الامتصاصية

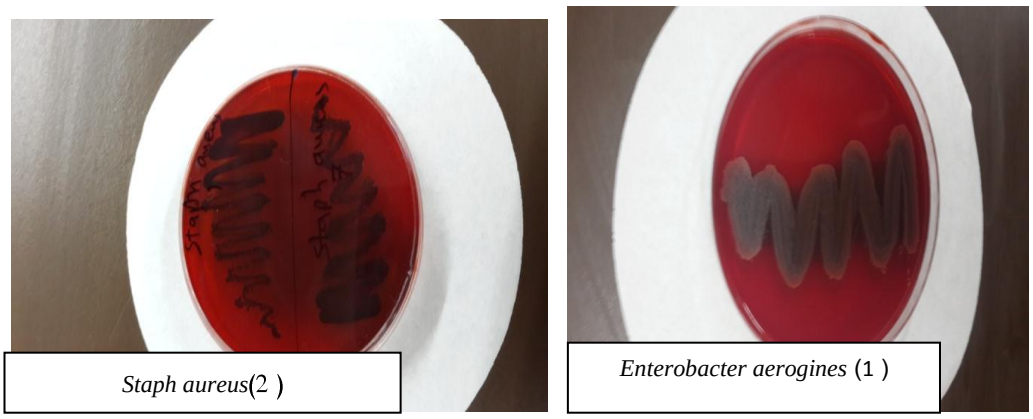
الامتصاصية O.D	القدرة على الالتصاق	انتاج الغشاء الحيوي
<0.120	**لا يحدث التصاق**	**لا تنتج**
0.240-0.120	**ضعيف**	**ضعيف**
>0.240	**قوي**	**قوي**

بينما يوضح الجدول (2) نتائج اختبار الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm باستخدام وسط CRA . اذ تبين من النتائج المبينة في الجدول ان 42.22 % من العزلات أبدت مستعمرات سوداء ذات تألق بلوري وكانت بكتريا *Enterobacter aerogines* و *Klebsiella pneumonia* أعلاها نسبة, اما العزلات الضعيفة لانتاج وتكوين الغشاء الحيوي فقد بلغت نسبتها 6.66 %, اذ شملت بعض عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* فقط, اما العزلات السالبة لانتاج وتكوين الغشاء الحيوي فقد بلغت نسبتها 51.11 اذ شملت كل عزلات *Acinetobacter* واغلب عزلات *E. coli* وبعض عزلات *Staphylococcus aureus* كما موضح في الأشكال(1 و2 و3و4 و5 و6 و7).

الجدول (2) نتائج اختبار الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقتي CRA و MTP

العزلات	CRA			**MTP**		
	+ve	Moderate	-ve	+ve	Moderate	-ve
Enterobacter aerogines1	+			+		
Enterobacter aerogines 2	+			+		
Enterobacter aerogines 3	+				+	
Enterobacter aerogines 4	+				+	
Enterobacter aerogines 5	+					
Klebsiella pneumonia **1**	+					+
Klebsiella pneumonia 2	+					+
Klebsiella pneumonia 3	+				+	
Klebsiella pneumonia 4	+					+
Klebsiella pneumonia 5	+				+	
Klebsiella pneumonia 6	+				+	
Klebsiella pneumonia 7	+					+
Acintobacter baummanni 1			+		+	
Acintobacter baummanni 2			+	+		
Acintobacter baummanni 3			+		+	
Acintobacter baummanni 4			+	+		
Acintobacter baummanni 5			+	+		
Acintobacter baummanni 6			+		+	
Acintobacter baummanni 7			+	+		

	+		+			*Acintobacter baummanni 8*
		+	+			*Acintobacter baummanni 9*
	+		+			*Acintobacter baummanni 10*
		+			+	*Staphylococcus aureus 1*
		+			+	*Staphylococcus aureus 2*
		+		+		*Staphylococcus aureus 3*
		+			+	*Staphylococcus aureus 4*
		+	+			*Staphylococcus aureus 5*
	+		+			*Staphylococcus aureus 6*
	+				+	*Staphylococcus aureus 7*
		+		+		*Staphylococcus aureus 8*
		+		+		*Staphylococcus aureus 9*
	+				+	*Staphylococcus aureus 10*
		+	+			*E.coli 1*
		+	+			*E.coli 2*
		+	+			*E.coli 3*
	+				+	*E.coli 4*
+					+	*E.coli 5*
		+	+			*E.coli 6*
	+		+			*E.coli 7*
	+		+			*E.coli 8*
		+	+			*E.coli 9*
	+		+			*E.coli 10*
		+	+			*E.coli 11*
		+	+			*E.coli 12*
+			+			*E.coli 13*
6	17	22	23	3	19	المجموع = 45
13.33	37.77	48.88	51.55	6.66	42.22	النسبة المئوية %

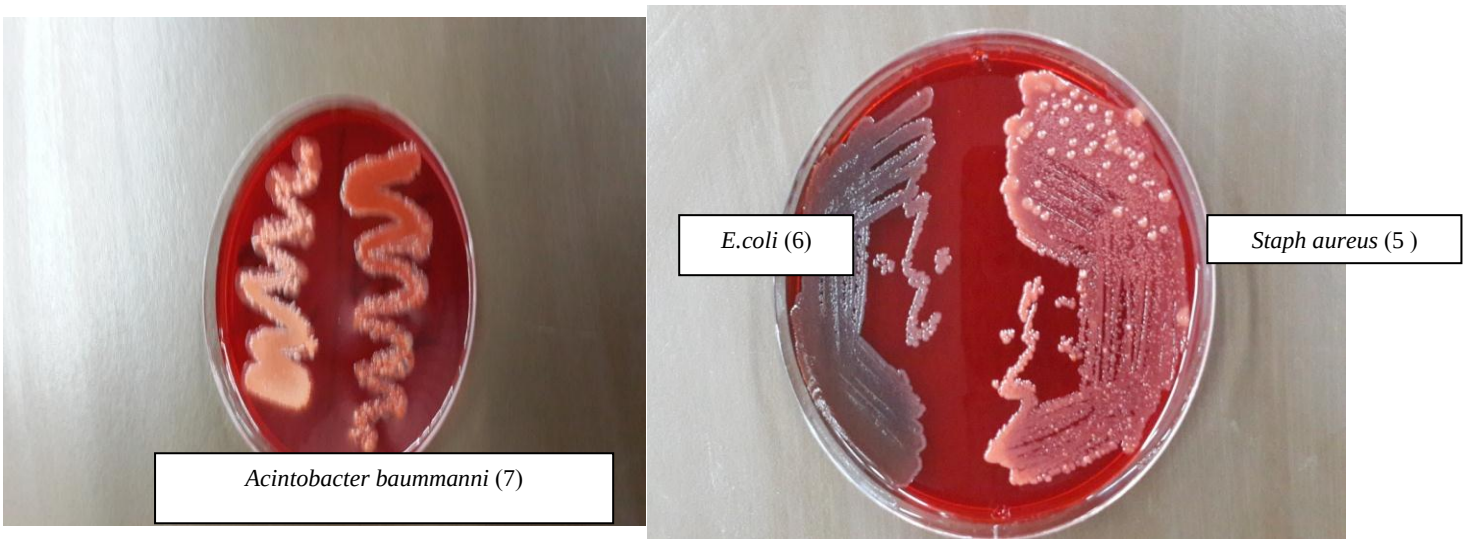


Staph aureus(2)

Enterobacter aerogines (1)

شكل (1 و2) النتيجة الموجبة لإنتاج الغشاء الحيوي (الانتاج بشكل قوي)

شكل (3 و4) *E.coli* انتاج الغشاء الحيوي ,الانتاج الضعيف



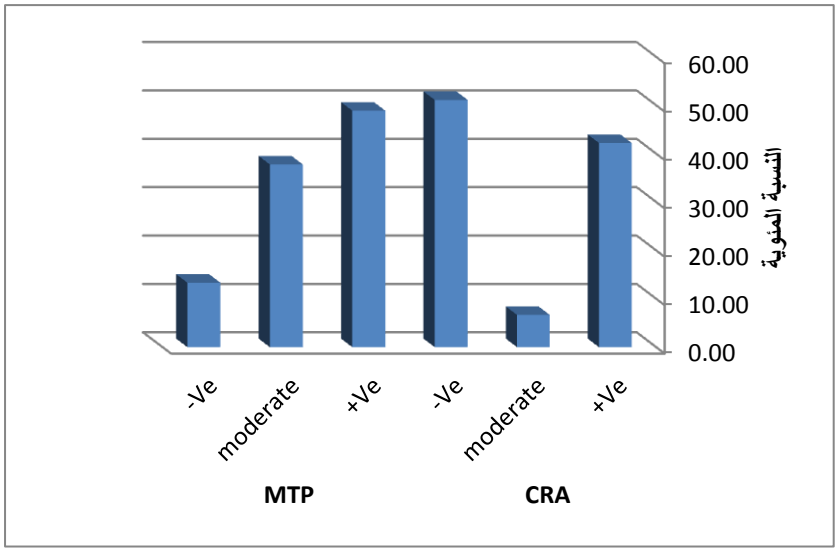
شكل (5 و 7) النتيجة السالبة لانتاج الغشاء الحيوي

شكل (6) النتيجة الضعيفة لانتاج الغشاء الحيوي

بينت نتائج الجدول (2) طريقة طبق MTP بعد طرح قيمة معدل قراءة السيطرة السالبة من معدل قراءات الامتصاصية للعزلات, بينت النتائج ان 48.88% اعطت نتيجة موجبة لتكوين الغشاء الحيوي, وشملت اغلب عزلات *Staphylococcus aureus* و7 عزلات من بكتريا *E. coli* و 5 عزلات من بكتريا *Acinetobacter*, و3 عزلات من بكتريا *Enterobacter aerogines* , اما العزلات المنتجة والمكونة للغشاء الحيوي ولكن بشكل ضعيف فكانت نسبتها 37.77 % اذ شملت 5 عزلات من بكتريا *Acinetobacter* و4 عزلات من بكتريا *E. coli* و3 عزلات من بكتريا *Staphylococcus aureus* و3 عزلات من بكتريا *Klebsiella pneumonia* وعزلتين من بكتريا *Enterobacter aerogines*., اما نسبة العزلات غير المنتجة للغشاء الحيوي بهذه الطريقة فكانت 13.33 %, اذ شملت 4 عزلات من بكتريا *Klebsiella pneumonia* وعزلتين من بكتريا *E. coli* , يبين الشكل شكل(8 و9) التقدير الكمي لالتصاق البكتريا بعد صبغها بصبغة الكريستال البنفسجي وغسلها على طبق Microtiter.

شكل(8و9) التقدير الكمي لالتصاق البكتريا بعد الصبغ بصبغة الكريستال البنفسجي وغسلها على طبق Microtiter

من النتائج تبين ان طريقة MTP كانت اكثر حساسية في الكشف عن الغشاء الحيوي مقارنة بطريقة CRA اذ أعطت هذه الطريقة اعلى نسبة موجبة لانتاج الغشاء الحيوي 48.88% مقارنة بطريقة CRA والتي كانت نسبة الانتاجية الموجبة فيها 42.222 %, كما بينت النتائج ان العزلات المنتجة بشكل ضعيف كانت 37.77 بطريقة MTP فيما كانت نسبتها 6.66% بطريقة CRA, اما نسبة العزلات غير المنتجة بطريقة MTP كانت 13.33% بينما كانت نسبتها عالية جدا بطريقة CRA 51.11%, كما نلاحظ ان النسبة الكلية لانتاج الغشاء الحيوي بشكليه القوي والضعيف بلغت 86.65 % بطريقة طبق MTP, ومن هذه المقارنة بين الطريقتين نلاحظ ان طريقة MTP اكثر دقة وسهولة في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي.يبين الشكل (10) النسب المئوية للنتيجة الموجبة والضعيفة والسالبة لكلا الطريقتين والمقارنة بينهما.



الشكل(10) النسب المئوية لنتائج طريقتي CRA وMTP

عند إجراء فحص التحري عن تكوين الاغشية الحيوية بطريقة اكار الكونغو الاحمر على 45 عزلة من البكتريا المرضية تبين ان 100 % من عزلات بكتريا *Enterobacter aerogines* و *Klebsiella pneumonia* قادرة على تكوين الغشاء الحيوي بهذه الطريقة , بينما بكتريا *Acintobacter baummanni* لم تكن قادرة على تكوين الغشاء الحيوي وبنسبة 100% بهذه الطريقة , فيما تباينت بقية العزلات ,اذ نجد بكتريا *S.aureus* 50% موجبة لأنتاج الغشاء الحيوي و30% منتجة بشكل ضعيف و20 % غير منتجة للغشاء الحيوي بهذه الطريقة, اما بكتريا *E.coli* فكانت 15.38% منتجة بشكل قوي للغشاء و 84.61% منتجة بشكل ضعيف للغشاء, كما مبين في الجدول (3).

الجدول :3 نسبة تكوين الأغشية الحيوية في عزلات البكتريا المدروسة بطريقةCongo red agar

انواع البكتريا	العدد الكلي	العزلات المكونة للاغشية الحيوية بشكل قوي		العزلات المكونة للاغشية الحيوية بشكل ضعيف		العزلات المكونة للاغشية الحيوية غير منتجة	
		العدد	%	العدد	%	العدد	%
Enterobacter aerogines	**5**	**5**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**
Klebsiella pneumonia	**7**	**7**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**
Acintobacter baummanni	**10**	**0**	**0**	**0**	**0**	**10**	**100**
S.aureus	**10**	**5**	**50**	**3**	**30**	**2**	**20**
E.coli	**13**	**2**	**15.38**	**11**	**84.61**	**0**	**0**

اما عند اجراء طريقة MTP للتحري عن الاغشية الحيوية كانت النسب مختلفة نوعا ما فقد ظهرت 60% من عزلات بكتريا *Enterobacter aerogines* منتجة بشكل قوي و40% منتجة بشكل ضعيف, اما بكتريا *Klebsiella pneumonia* فقد اظهرت نتائج مغايرة تماما بهذه الطريقة اذ تبين من النتائج ان 42.857% من العزلات منتجة بشكل ضعيف و57.14% غير منتجة للغشاء الحيوي بهذة الطريقة , وكذلك نجد ان بكتريا *Acintobacter baummanni* أبدت نتائج مغايرة تماما حين تبين ان 50% منتجة للغشاء الحيوي بشكل قوي و50% منتجة للغشاء بشكل ضعيف وهذا يناقض النتيجة التي ظهرت بطريقة Congo red agar, فيما بينت نتائج بكتريا *E.coli* قدرة لتكوين الغشاء الحيوي في 53.846% من عزلاتها وبشكل قوي و 30.769% وبشكل ضعيف اما الغير قادرة على ذلك فقد شكلت 15.38% وهذه النتائج موضحة في الجدول(4).

الجدول :4 نسبة تكوين الأغشية الحيوية في عزلات البكتريا المدروسة بطريقةMTP

انواع البكتريا	العدد الكلي	العزلات المكونة للاغشية الحيوية بشكل قوي		العزلات المكونة للاغشية الحيوية بشكل ضعيف		العزلات المكونة للاغشية الحيوية غير منتجة	
		العدد	%	العدد	%	العدد	%
Enterobacter aerogines	**5**	**3**	**60**	**2**	**40**	**0**	**0**
Klebsiella pneumonia	**7**	**0**	**0**	**3**	**42.857**	**4**	**57.14**
Acintobacter baummanni	**10**	**5**	**50**	**5**	**50**	**0**	**0**
S.aureus	**10**	**7**	**70**	**3**	**30**	**0**	
E.coli	**13**	**7**	**53.846**	**4**	**30.769**	**2**	**15.38**

من نتائج الدراسة الحالية نلاحظ ان هنالك تفاوتاً في القدرة على تكوين الاغشية الحيوية من قبل البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام بطريقتي Congo red agar و MTP, وقد يعود هذا التفاوت الى التباين في حساسية كلتا الطريقتين وهذا ما أكدته العديد من الدراسات فقد أشار الباحث [10] وجماعته ان بكتريا *S.aureus* كونت الاغشية الحيوية بنسبة 35.2% بطريقة Congo red agar بينما نجد ان بكتريا *E.coli* كونت الغشاء الحيوي بنسبة 46.6% وبكتريا *Enterobacter* اعطت نتيجة موجبة بنسبة 16.6 % نجد ان هذه النتائج لم تتفق مع دراستنا الحالية التي اجريت بطريقة Congo red agar.

تختلف نتائج الطرق المستخدمة للكشف عن انتاج الغشاء الحيوي وتشمل بصورة رئيسية طريقة Congo red agar و MTP . واظهرت دراسة [33] ان طريقة MTP اكثر دقة وحساسية وسهولة في الكشف عن انتاج الغشاء الحيوي. وافضل طريقة في التقدير الكمي للمادة المخاطية الملتصقة على سطوح وقعر الحفر, كما ذكر [33] عدم وجود علاقة بين نتائج الطريقتين.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج [10] بطريقة CRA اذ كانت البكتريا الغير منتجة للغشاء الحيوي نسبتها اكثر(90%) والمنتجة بشكل ضعيف للغشاء نسبتها قليلة (6.3), اما نسبة العزلات المنتجة بشكل جيد كانت قليلة جدا (3.6 %) وهذا لم يتفق مع دراستنا الحالية. كما بين ان

نسبة البكتريا المنتجة للغشاء بشكل قوي كانت 22.7% بطريقة MTP و41 %بشكل ضعيف و 36.3% غير منتجة. كما ذكر [10] ايضا ان هنالك مقاومة للمضادات الحيوية من قبل البكتريا المكونة للغشاء الحيوي مقارنة بالغير مكونةٌ له, و ان اضافة السكر بطريقتي CRA و MTP تساعد على تكوين Biofilm.

اتفقت دراستنا مع ما جاء به [34] والذي بين ان نسبة انتاج الغشاء الحيوي بطريقة MTP كانت اعلى من نسبتها بطريقة CRA اذ كانت 42 % بينما بطريقة CRA كانت 26 %. ان تكوين الغشاء الحيوي بطريقة MTP يختلف حسب السلالة المستخدمة والوسط المستخدم للنمو[35]. عند دراسة المراحل المبكرة في تكوين الغشاء الحيوي ممكن ان تعتمد طريقة MTP لان هذه الطريقة تستخدم ظروفا ثابتة ولذا يمكن ان تستخدم في دراسة العديد من العوامل الضرورية لتكوين الغشاء الحيوي مثل الاسواط والاهلاب واللاصقات والانزيمات والاهداب وغيرها, فضلا عن الجينات التي تلعب دورا مهما في انتاج السكريات المتعددة الخارجية.

تلتصق البكتريا غير المتحركة على قعر الحفر فيما تلتصق البكتريا المتحركة على الجدران وكذلك على قعر الحفر[36].

اوضحت دراسة[37] وجود اختلاف في نتائج الطريقتين وان طريقة CRA كانت الأكفأ في التحري عن انتاج الغشاء الحيوي.

اما دراسة [38] واخرين فقد اظهرت عدم وجود علاقة بين الطريقتين(CRA و MTP) وان طريقة MTPهي الاكثر حساسية.

ان عملية التحري عن تكوين الغشاء الحيوي يعتمد على عوامل عديدة مثل نوع الوسط و طريقة الكشف المستعملة وظروف التحضين فضلا عن نوع السطح المستعمل لتلك العملية اذ يرجع الاختلاف في تكوين الغشاء الحيوي على اطباق المعايرة الدقيقة (Microtiter plate (MTP على نوعية التركيب السطحي للمواد التي يتكون عليها الغشاء الحيوي مثلا الغشاء المتكون على سطح البوليسترين (Polystyrene surface) لاطباق المعايرة الدقيقة يكون اكثر تأثرا من سطح السيليكون (Silicone surface) لانبوبة القثطرة [39] ان طريقة الكونغو تعد طريقة واقعية لتمييز النمط المظهري للبكتريا المكونة للغشاء الحيوي ذات الضراوة العالية, قد يساعد هذا النمط في التمييز بين المنتجات القوية والضعيفة للغشاء الحيوي الذي يعكس حدة الاصابة ويساعد في تحديد العلاج الاولي , كما ان الاختلاف في درجة انتاج الغشاء الحيوي يعزى إلى الاختلاف في انتاج اللاصقات متعددة السكرايد Polysaccharide adhesion ويعكس التغيير الجيني[40] .

طريقة الكونغو الاحمر الصلب طريقة سهلة الاستعمال وتعتمد على تعزيز انتاج عديد السكرايد الخارجي باستعمال وسط غني ولكنها طريقة قليلة الحساسية والتخصص نتيجة الاختلافات التي قد تحدث في تكوين الصبغة السوداء للمستعمرات , قد يؤثر الاختلاف في الوسط الزرعي المستعمل في نتائج هذه الطريقة [41].

درست حساسية عزلات البكتريا قيد الدراسة تجاه (5) مضادات حياتية لمعرفة مدى الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة النتائج مع ما ورد في [28] Gentamicin(CN) و Norfloxacin (NOR) و Tobramycin(TOB) وimipenem (IMP) و Amikacin (AK)

أظهرت النتائج ان العزلات كانت حساسة وبنسبة 100% لمضادي Imipenem و Amikacin, اما بالنسبة لمضاد Tobramycin فقد ابدت بعض العزلات مقاومة لهذا المضاد وبنسبة 28.8%, اما مضاد Norfloxacin فقد ظهرت نسبة مقاومة له 22.2% من قبل بعض العزلات اذ تبين من النتائج ان جميع العزلات كانت حساسة له ما عدا بكتريا *Acintobacter baummanni* التي كانت مقاومة له بنسبة 100%, اما مضاد Gentamicin فقد كانت كل من بكتريا *Staphylococcus aureus* و*E.coli* و *Klebsiella pneumonia* حساسة له وبنسبة 100%, اما بكتريا *Acintobacter baummanni* كانت مقاومة له بنسبة 100%, وبكتريا *Enterobacter aerogines* كانت مقاومتها له بنسبة 80%, ولذا كانت نسبة المقاومة الكلية لهذا المضاد 31.1%.

اتفقت دراستنا مع [42]اذ ذكر ان بكتريا *Staphylococcus aureus* كانت حساسة لمضاد Gentamicin , كذلك اتفقت دراستنا مع ما جاء به [17] من ان بكتريا *Klebsiella pneumoniae* كانت اغلبها مقاومة لمضاد Tobramycin و حساسة لمضاد Amikacin. كما ذكر ان استجابة الخلايا للعوامل المضادة للميكروبات تختلف حسب موقع هذه الخلايا في مجتمع الغشاء الحيوي.

تطابقت هذه النتيجة مع ما سجله [43]من ان بكتريا *E.coli* كانت حساسة لمضاد Imipenem . بالنسبه لمضاد Gentamicin اظهرت العديد من الدراسات نسبة مقاومةً عاليةً لهذا المضاد من قبل بكتريا *Acintobacter baummanni* ومنها دراسة [44] . ان مقاومة مجموعة الامينوكلايكوسايد شائع في بكتريا *Acinetobacter* وهذه المقاومة ناتجة في المقام الأول من عدم فعالية المضاد بواسطة الانزيمات المحورة المتخصصة.البكتريا الموجودة داخل حشوة عديد السكريد تبقى محافظة على حيويتها ضد المضادات و تعمل بوصفها بؤرة لاعادة الاصابة بشكل دوري[45] .

تأتي مقاومة بعض الانواع البكتيرية لمضادات الحياة وكما هو موضح في النتائج قد يعود السبب في ذلك وكما اشارت بعض الدراسات الى ان بعض الانواع تنتج كميات كبيرة من المخاط (Slime) بشكل يشبه المحفظة الواقية ومن ثم تكون اقل حساسية للمضادات الحياتية من تلك المنتجة للمخاط بكميات اقل كما يضيف ذلك مقاومة مظهرية لتلك الانواع التي تعمل على تكوين غشاء حيوي يحيط بها [46] . كما اظهرت النتائج حساسية بعض الانواع غير المنتجة للمخاط بكميات كبيرة مثل *E.coli* بالمقارنة مع غيرها من البكتريا قيد الدراسة وذلك بطريقة CRA , يتوافق

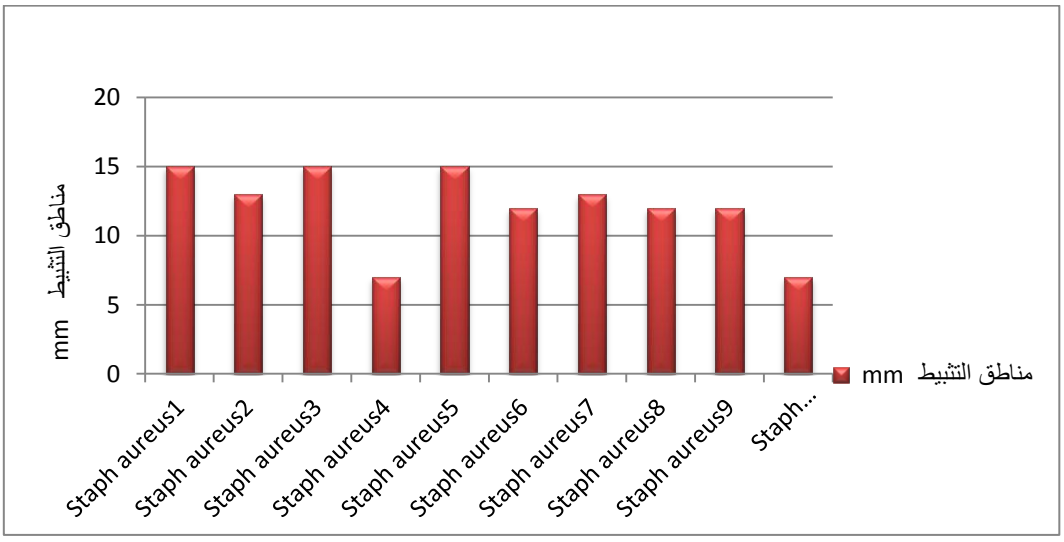
ذلك مع الدراسات التي تبين ان المخاط والمتكون من سكريات متعددة خارجية يثبط قدرة الاختراق لدى المضاد الحيوي بالاضافة الى ان البكتيريا الموجوده ضمن المادة الاساس للغشاء الحيوي يمكنها ان تعطي مستويات مختلفة من التنافس الايضي والتي من الممكن ان تظهر مقاومة بكتيرية وان كانت قليلة او محدودة[47].

الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا ال *Lactobacillus acidophilus* ضد البكتريا المرضية

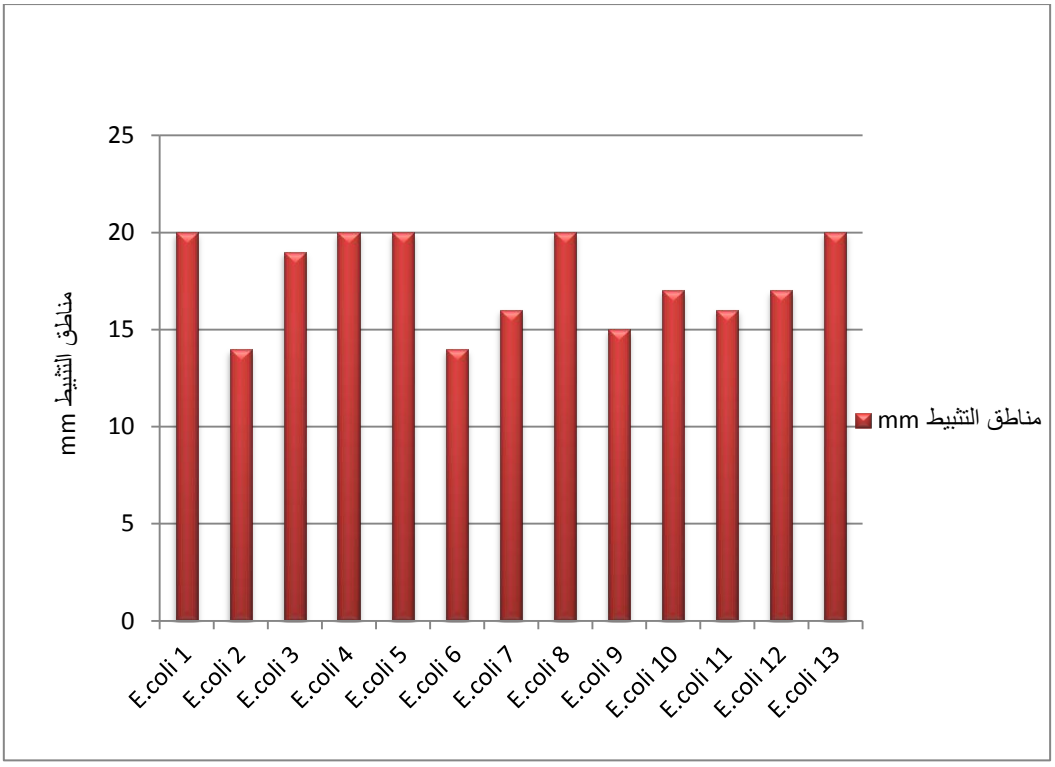
درست الفعالية التثبيطية لراشح المعزز الحيوي(*Lactobacillus acidophilus*) تجاه البكتريا المرضية المستخدمة قيد الدراسة.

بينت نتائج الدراسة الحالية وجود تأثير تثبيطي لراشح بكتريا حامض اللاكتيك المحبة للحموضة *L. acidophilus* على نمو الانواع البكتيرية قيد الدراسة , مما يؤدي الى تثبيط تكوين الغشاء الحيوي للبكتريا المرضية المستخدمة.

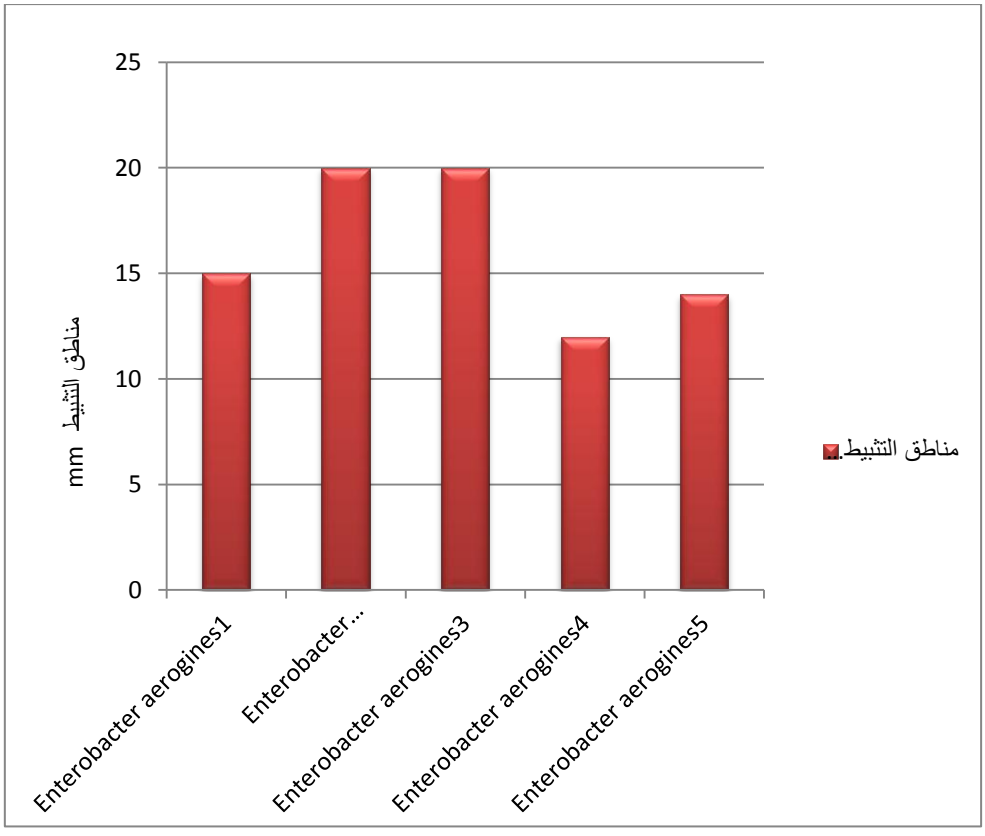
وقد كان هذا واضحا من خلال نتائج التثبيط واقطار التثبيط . كما تفاوتت البكتريا المرضية في قدرتها على تحمل تأثير راشح المعزز الحيوي, وكما هو مبين في النتائج, اذ تبين من خلال التجارب ان كل العزلات البكتيرية المرضية قيد الدراسة كانت حساسة لفعالية راشح بكتريا ال *Lactobacillus acidophilus* , بينت النتائج ان هناك فعالية جيدة لراشح بكتريا حامض اللاكتيك ضد بكتريا *Staph aureus*, وكما موضح في الشكل(11), اذ ان اقطار مناطق التثبيط تراوحت بين (7-15) mm, كما بينت النتائج ان هناك فعالية جيدة لراشح بكتريا حامض اللاكتيك ضد بكتريا *E.coli* كما موضح في الشكل (12), اذ ان اقطار مناطق التثبيط تراوحت بين (14-20) mm, كما بينت النتائج ان هناك فعالية جيدة لراشح بكتريا حامض اللاكتيك ضد بكتريا *Enterobacter aerogines* كما موضح في الشكل(13), اذ ان اقطار مناطق التثبيط تراوحت بين (12-20) mm, , كما بينت النتائج ان هناك فعالية جيدة لراشح بكتريا حامض اللاكتيك ضد بكتريا *Klebsiella pneumonia* كما موضح في الشكل(14), اذ ان اقطار مناطق التثبيط تراوحت بين (7-22) mm, , كما بينت النتائج ان هناك فعالية جيدة لراشح بكتريا حامض اللاكتيك ضد بكتريا *Acintobacter baummanni* كما موضح في الشكل(15), اذ ان اقطار مناطق التثبيط تراوحت بين (17-24) mm, وكما موضح في الاشكال(11و 12 و 13 و 14و 15).



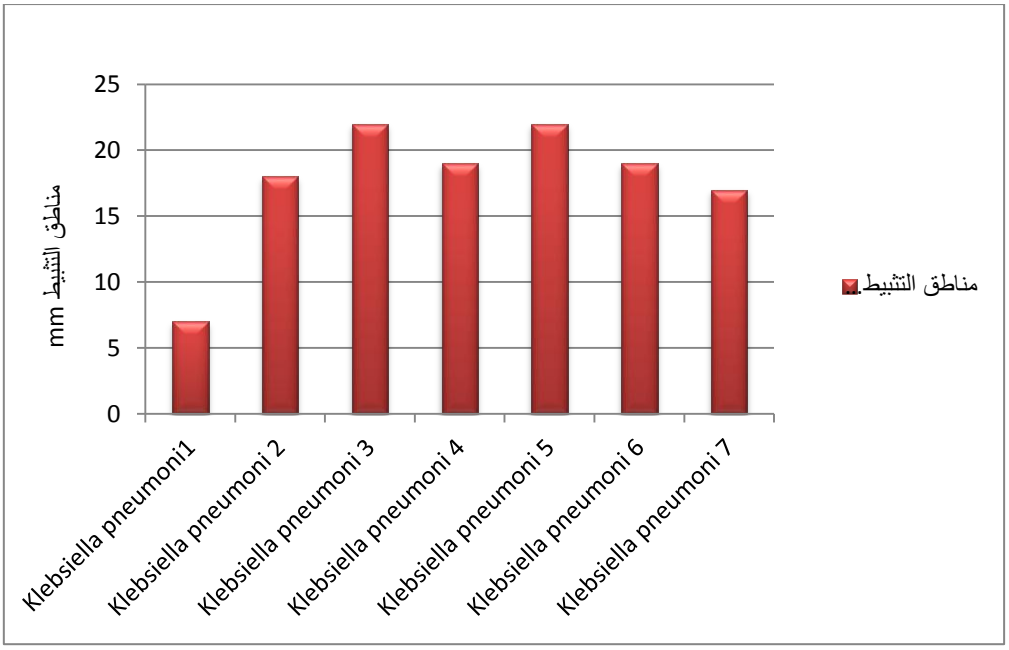
شكل(11) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *Staph aureus*



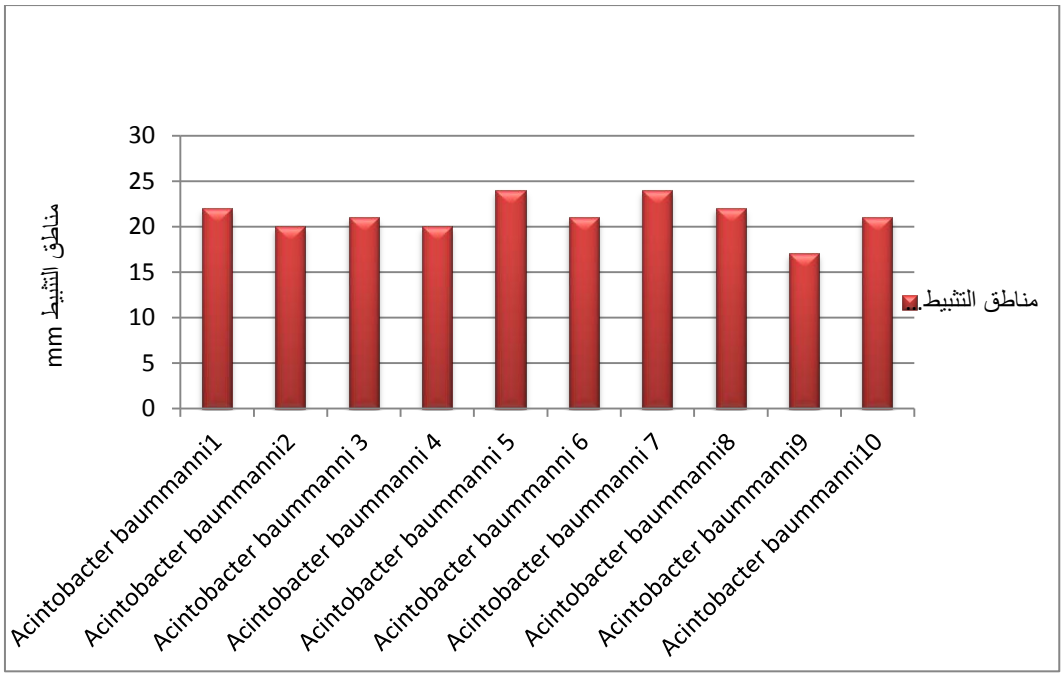
شكل(12) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *E.coli*



شكل(13) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *Enterobacter aerogines*



شكل(14) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *Klebsiella pneumoni*



شكل(15) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *Acintobacter baummanni*

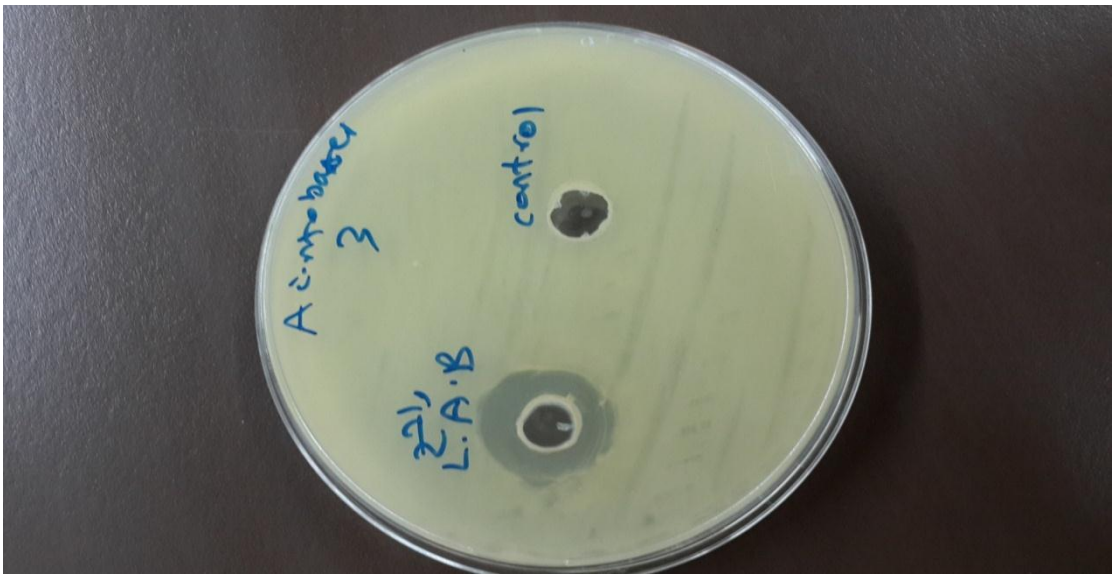
إذ إن كل البكتريا المرضية أبدت استجابة لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ,كما موضح في الاشكال (16 و17 و 18 و 19 و 20), و قد يرجع السبب في ذلك الى البيئة الحامضية التي توفرها بكتريا حامض اللاكتيك والتي قد تكون غير مفضلة من قبل اغلب البكتريا المرضية.

هناك عدة عوامل تمتلكها بكتريا المعززات الحيوية مثل *Lactobacillus acidophilus* كالبكتريوسينات وحامض اللاكتيك وبيروكسيد الهيدروجين واحماض عضوية كما تمتلك بروتينات قاتلة للبكتريا اضافة الى ذلك تنتج مواد ذات اوزان جزيئية صغيرة مثل surfactant التي تعمل على تثبيط التصاق البكتريا المرضية على السطوح الحية او الغير الحية[48], و بذلك تحد من تكوين الغشاء الحيوي, مما جعلها تمتلك تأثيرات ايجابية للحفاظ على الصحة العامة ضد البكتريا المرضية [49].

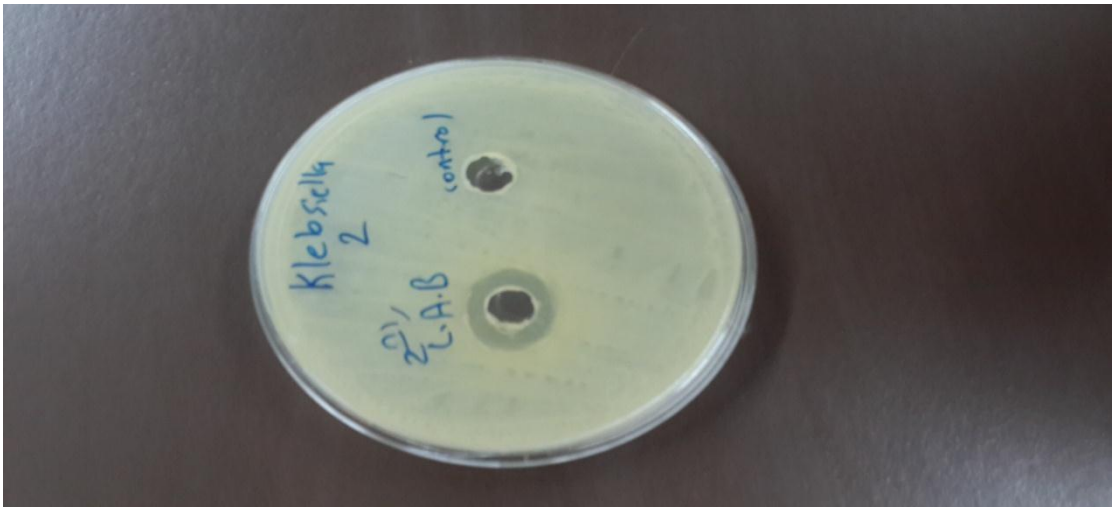
وبذلك تستطيع بكتريا المعززات الحيوية ان تتنافس مع البكتريا المرضية للالتصاق بالخلايا الطلائية المحيطة بالقناة البولية التناسلية او المعوية لامتلاكها مواد الشد السطحي Surfactant [50].

كل هذه العوامل قادرة على جعل بكتريا *Lactobacillus acidophilus* تستعمل معززاً حيوياً والذي استعمل في العديد من الاغراض مثل مواد حافظة للاغذية وبدائل للادوية ونكهة للاطعمة وغيرها[51].

شكل(16) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *E.coli*

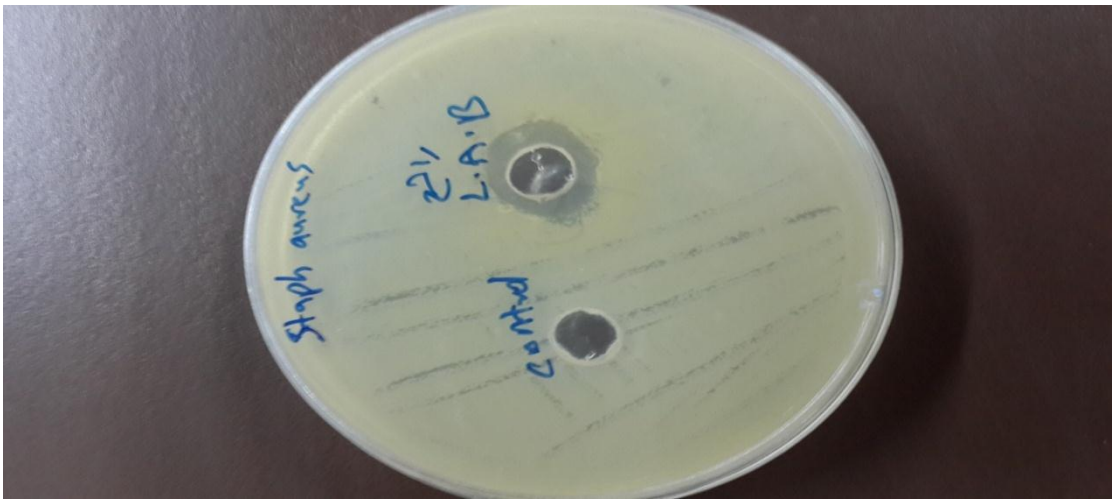


شكل(17) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *Acintobacter baumanni*



شكل(18) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *Klebsiella pneumoni*

شكل(19) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *P. aeruginosa*



شكل(20) الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا *Lactobacillus acidophilus* ضد *Staph aureus*

جاءت نتائج اختبار الفعالية الضد ميكروبية لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* متوافقة مع العديد من الدراسات التي بينت ان المواد المنتجة من قبل بكتريا *Lactobacillus* ولاسيما البكتريوسينات لها القابلية على تثبيط نمو العديد من الاحياء المجهرية المرضية مثل *P.aeruginosa, K.pneumoniae, E.coli, E.faecalis* [52].

كما بين [53] وجماعته ان بكتريا *Lactobacillus* تمتلك قدرة رائعة على تثبيط نمو الاحياء الاخرى من خلال فعاليتها القاتلة ومن خلال انتاجها لحامض اللاكتيك كناتجا ايضيا ثانوياً, من ناحية اخرى بينت بعض الدراسات ان بكتريا *Lactobacillus* تمتلك نشاطا ضد ميكروبيا تجاه العديد من البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام ويعزى ذلك اما إلى انتاجها عدة انواع من المضادات الحيوية ذات التأثير القاتل للاحياء المجهرية الاخرى (bacteriocidal effect) [54], او قد يعود السبب الى قدرة بكتريا *Lactobacillus* على انتاج مركبات عديدة مثل الاستيل الديهايد وثنائي الاستيل التي تمتلك قدرة تثبيطية ضد عدد من الاحياء المجهرية[55].

او قد يعود السبب الى انتاج غاز CO2 في أثناء عملية التخمر والذي يعمل على توفير ظروف لاهوائية مما يعيق نمو الاحياء الهوائية الاجبارية[56] .

او قد يعزى الفعل التثبيطي لهذه البكتريا الى الفعل التآزري للبكتروسين المنتج من قبل البكتريا ولحامض اللاكتيك. او قد يعزى لحامض اللاكتيك المنتج والرقم الهيدروجيني المنخفض واللذين يعملان على زيادة نفاذية الغشاء الخارجي خصوصا في البكتريا السالبة لصبغة كرام مما يجعلها ضعيفة وتتأثر بالبكتروسين المنتج [57] . اتفقت نتائج دراستنا الحالية مع ما جاء به [58] اذ ان راشح بكتريا *Lactobacillus* عمل على تثبيط كل من بكتريا *E. coli* و *Staph aureus* وباقطار تثبيطية تراوحت (13-17).

ان لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* قدرة عالية على تقليل وتثبيط نمو الانواع البكتيرية بعد الحضانة لمدة 24 ساعة ويأتي ذلك متفقا مع ما ذكره [59] من ان بكتريا *L.acidiphilus* تمتلك قدرة عالية على تثبيط مدى واسع من الانواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام .

بالرغم من ان عصيات (LAB) *Lactobacillus* تنتج بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide وجد ان سلالات هذه البكتريا لا تتأثر ببيروكسيد الهيدروجين الذي يؤثر في البكتريا المرضية يعزى ذلك لانتاجها انزيم البيروكسيديز Peroxidase الذي يوفر لها الحماية من هذا المركب [60].

ان راشح بكتريا حامض اللاكتيك يمتلك تاثيرا مثبطا تجاه التصاقية الانواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام بالخلايا الطلائية على حد سواء, كما ان لراشح بكتريا حامض اللاكتيك النامية في الوسط السائل تاثيرا مثبطا واسع الطيف تجاه البكتريا الموجبة مثل *Bacillus spp.* و *Staphylococcus spp.* والبكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *Proteus mirabilis* و *klebsiella spp.* و *E.coli* [32], يعود هذا التاثير الى افراز مواد مثل Lactocidin و Plantracin و Acidophilin , كما ذكر [61] قدرة بكتريا حامض اللاكتيك على تنظيف مناطق الحواف وبذلك تمنع التصاق العديد من الخلايا البكتيرية بمستقبلاتها, كما ذكر[62] بان التغطية المسبقة لسلالات حامض اللاكتيك تقلل من ارتباط بكتريا المكورات العنقودية السالبة لانزيم التخثر وبكتيريا *E.coli* المرضية الى 8 بكتيريا /خلية.

كما بينت النتائج دور المعزز الحيوي في تقليل اعداد الانواع التابعة للعائلة المعوية وهذا يتفق مع ما وجده[63] عند استعمال محلول راشح بكتيريا *L. acidophilus* .

يعود السبب في ذلك الى ما ذكره[64] الى قدرة المواد الايضية المفرزة من قبل بكتيريا حامض اللاكتيك كالبكتيريوسينات على البقاء مستقرة في درجات حرارة عالية كما في البكتيريوسين Plantracin الذي يتحمل درجة حرارة 100م° لمدة اكثر من نصف ساعة , كما يقاوم البكتيريوسين Acidolin المفرزمن قبل بكتيريا *L. acidophilus* درجة 121 م° لمدة 15 دقيقة كما يمتلك هذا البكتيريوسين فعالية تضادية ضد البكتريا المعوية والبكتيريا المكونة للسبورات [65] ,[66] ونتيجة للخطورة الناجمة عن البكتريا المرضية التي تكون الغشاء الحيوي جاءت فكرة دراسة تأثير راشح بكتريا العصيات اللبنية المحبة للحموضة *Lactobacillus acidophilus* ولاهميتها في تثبيط التصاق الاجناس البكتيرية المختلفة, وبوصفها بدائل للعلاج لمقاومة ومنع تكوين الغشاء الحيوي.

CONFLICT OF INTERESTS

There are no conflicts of interest.

المصادر

1-Bueno, J "Anti-biofilm drug susceptibility testing methods: looking for new strategies against resistance mechanism" .*J Microbial Biochem Technol*, vol.4,no.10,pp. 1948-5948, May 2014.

2- Balzer, M., Witt, N., Flemming, H.-C. & Wingender, J. "Accumulation of fecal indicator bacteria in river biofilms". *Water Sci. Technol, vol.* 61,no.1 pp. 1105–1111 2010.

3- Soto, S. M."Importance of biofilms in urinary tract infections: New therapeutic approaches". *Hindawi Publ. Corp. Advan. Bio* .vol. 4, no. 3, pp.1-13. 2014.

4- Gowrishankar S, Duncun Mosioma N, Karutha Pandian S. "coral associated bacteria as a promising antibiofilm agent against methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus biofilms". *Evid Based Complement Alternat Med*. Vol. 10, no. 16, Pp.2012:862374. July 2012.

5- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E. & Stanley-Wall, N. R. "Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes". *FEMS Microbiol. Rev.* vol**.** 39, no.2, pp. 649–669, 2015.

6- Karimi, A., Karig, D., Kumar, A. & Ardekani, A. M. "Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods". *Lab Chip.* Vol. 15, no.14, pp. 23–42, 2015.

7-Flemming ,H, C,*Wingender , J,zewzyk , U , Steinberg , P , Rice , S , A ,*

Kjelleberg , S "Biofilms: an emergent form of bacterial life".Naturereviews Microbiology, vol. 14,no.18, pp. 563. , September 2016.

8- Van, R., & Michiels, C. W. "Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface". *Journal of applied microbiology*, vol.*109*. no. 4, pp.1117-1131, April 2010.

9- Song, T., Duperthuy, M., & Wai, S. "Sub-optimal treatment of bacterial biofilms". *Antibiotics*, vol. *5*, no. 2, pp. 23,June 2016.

10- Afreenish H, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. "Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates". *Braz J Infect;* vol. 15, no.4, pp.305-311, Dis 2011

11- Ponnusamy, P., Natarajan, V. and Sevanan, M. "In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern". *Asian Pac. J. Trop.Med*.vol. 5,no.3, pp. 210-213, 2012.

12- Cortés, M. E., Bonilla, J. C., & Sinisterra, R. D." Biofilm formation, control and novel strategies for eradication". *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv*, *2*, 896-905. 2011.

13- Sutherland, I. W." Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework". *Microb. Uk* .vol.147, pp.3-9, 2001.

14- Zubair, M.; Malik, A.; Ahmad, J.; Rizvi, M.; Farooqui, K.; Rizvi, M."A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients". *J. Bio. Med.*vol. 3, no.2, pp.147-157. 2011.

15- Collado M. C. , Meriluoto J. "Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains". *Eur Food Res Technol* ,vol. 10, no.226, pp.1065–1073. , 2008.

16- Reid G."The scientific basis for Probiotic strains for *Lactobacillus"* . *J.Appl. Environ. Microbial*.vol. 65, pp.3763 – 3766, 1999.

17- AL- Mathkhury H. J.F., Abed Assal S. D."Inhibitory effect of *Lactobacilli* filtrate on *Klebsiella Pneumoniae* Biofilm" *The Iraqi Postgraduate Medical Journal*. vol.11, no.2, pp. 168-179, 2012.

18- Satpute, S. K. Kulkarni, G. R. Banpurkar, A. G. Banat, I. M. Mone, N. S. Patil, R. H. and Cameotra, S. S."Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications". *J. Basic Microbiol*., vol.56, pp.1–19, 2016.

19- Chenoll E. "A novel probiotic Bifidobacterium bifidum CECT 7366 strain active against the pathogenic bacteria *Helicobacter Pylori". Appl. Environ. Microbiol*. Vol.77, pp.1335–1343, 2011.

20- Vuyst, L. De and Leroy, F. "Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria:Production, Purification, and Food Applications" *J Mol Microbiol Biotechnol*.vol.13, pp.194–199, 2010.

21- Ukeyima, M. T., Enujiugha, V. N. and Sanni, T. A. "Current applications of probiotic foods in Africa". *African J. of Biotechnol*. Vol.9, no. 4, pp. 394-401. 2010.

22- Forbes, B.A. ;Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S.,*Baily and Scott´s .Diagnostic microbiology*, .12thed .Mosby Elsevire .p:371 – 378 , 2007.

23- Eftekhar, F. ; Dadaei, T. "Biofilm formation and detection of IcaAB genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*". *Iranian J. Basic Med. Vol.*14, no. 2, pp.132-136. 2011.

24- Lotfi, G. ; Hafida, H. ; Nihel, K. ; Abdelmonaim, K. ; Nadia, A.; Fatima, N. and Walte, Z, "Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen". *J. Bacteriol*. vol.6,no. 1, pp. 1-6, 2014.

25- Bose, S. ; Khodke, M. ; Basak, S. ; Mallick, S. K. "Detection of biofilm producing Staphylococci : need of the hour". *J. Clin. Diag. vol.* **3**, pp.1915-1920, 2009.

26- Lachachi,M; Hassaine, H; Nayme,K; Bellifa,S; M'hamedi,I; Terki,I.K.and Timinoun M." Detection of biofilm formation, icaADBC gene and investigation of toxin genes in Staphylococus spp. strain from dental unit waterlines, University Hospital Center (UHC) Tlemcen Algeria" Vol. 8,no.6, pp. 559-565. 2014.

27- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Turck, M. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". *Am.J. Clin. Pathol*. Vol.15, pp. 493-496, 1966.

28- National Committee for Clinical Laboratory Standards "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing ; Twelfth Informational Supplement . M100-S12. *NCCLs* . Pennsyl vania, 2002.

29- Hammes , W.,P. and Vogel,R.F. "The Genus *Lactobacillus* In:The Genera of Lactic Acid Bacteria 1st ed.Edited by Wood , B . J . and Holzapfel, W.H.LondonLTD

.pp.20-28, 1995.

30- Lews, C. B. ; Kaiser. A. and Montville, T. J. "Inhibition of food borne bacterial pathogens by Bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat". *J. Appl. Environ. Microbial*., vol.57, pp.1683 – 1688, 1991.

31-Sousa, R., *et al.* "Effect of *Lactobacillus acidophilus* supernatants on body weight and leptin expression in rats". *BMC Complement Alternative Medicine*,vol.8, pp.5-9, 2008.

32- Gupta, U., Radramma, Rati, E.R. and Joseph, R. "Nutritional Quality of lactic acid fermented bitter gourd and fenugreek leaves". Int. *J. Food Sci. and Nutr*. Vol. 94, no.2, pp.101- 108, 1998.

33- Triveda L. and Gomathi S. "Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Enterococci: An evaluation of three different screening methods" *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*., vol.5, no.3, pp. 643-650, 2016.

34-Neeli V, H, Parvathi T,Krishna P, B. "Study of Biofilm Production and Anti-microbial susceptibility Pattern of bacterial and fungal isolates from urinary catheters".*International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* vol.5, no. 2, pp.415-424. 2016.

35-Patel, J. ; Sharma, M. "Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves". *Inter. J. Food Microbiol.*,vol. 139,pp. 41-47. 2010.

36- O'Toole, G.A."Microtiter dish biofilm formation assay".*J.Visualized Exper*., vol.47no.2437,pp.1-2.2011.

37Dadawala,A.L.,Chauhanm,H.C.,Chandelm,B.S.,Ranaware,P.;Patel,S.S.;Khushboo,S.;Ratod,P.H.;Shah,N.M.and Kher,H.N. "Assessment of Escherichia coli isolates for in vitro biofilm production". *Vet.World*, vol.3,no.8, pp.364-366, 2010**.**

38- Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.J.; Fatma, T.; and Rattan, A. "Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods". *Indian J. Med. Microbiol*. Vol. 24,no.1, pp.25-29, 2006.

39- Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D. and Kicia, M. Entacyclic triterpenes combined with ciprofloxacin help to eradicate the biofilm formed in vitro by *Escherichia coli. Indian J. Med. Res*. Vol.141,no.3, pp. 343–353, 2015.

40- Seif El-Din, S. S. ; El-Rehewy, M. S. ; Ghazaly, M. M. ; Abd-Elhamid, M.H. "Biofilm formation by blood stream Staphylococcal isolates from febrile pediatric cancer patients at south Egypt cancer institute". *J.American Sci.* vol.7, no.1, pp. 674-686, 2011.

41-Murugan S, Devi PU and John PN. "Antimicrobial susceptibility patterns of biofilm producing *E. coli* of urinary tract infections". *Curr.Res. Bacteriol*.vol.4, no.2, pp.73-80, 2011.

42- Onwubiko, N. E. and Sadiq, N. M." Antibiotic sensitivity pattern of Staphylococcus aureus from clinical isolates in a tertiary health institution in Kano, Northwestern Nigeria" *Pan African Medical Journal*.vol. 8, no.4, ISSN 1937-8688. 2011.

43-Anago, E.; Ayi-Fanou, L.; Akpovi, C. D. ; Hounkpe, W. B. ; Tchibozo, M. A. D.; Bankole, H. S. and Sanni, A. "Antibiotic resistance and genotype of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nosocomial infections in Cotonou, Benin". *Ann. Clin. Microb. Anti*.vol. 14, no.5, 2015.

44- Li,J.;Rayner, C.R.; Nation, R.L.; Owen, R.J.; Spelman, D.; Tan, K.E.; and Liolios, L, "Heteroresistance to colistin in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*". *Antimicrob. Agents Chemother*. Vol.50, no.9, pp 2946-2950, 2006.

45- David, G. and Gardner, D. ,*Greenspan's basic & clinical endocrinology* (9th ed.). New York: McGraw-Hill Medical. Chapter 17. ISBN 0-07-162243-8. 2011.

46- Souli, M. & Giamarellou, H. "Effects of Slime produced by clinical isolates of coagulase negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents". *J.Antimicrob Agents Chemother* , vol.42, pp.939 – 941, 1998.

47- Anwar, H.; Dasgupta, K. and Lam, K. "Tobromycin resistance of mucoid *Pseudomonas auroginosa* biofilm grown under iron limitations". *J. Antimicrob. Chemothe*., vol. 24, pp.647 – 655,1989.

48- Gupta V.Garg R "Probiotics". *Indian J Med Microbiol*. Vol.27, pp.202-209, 2009.

49-Hamilton-Miller, J.M**.** "Probiotics and prebiotics in the elderly", *Postgraduate Medical Journal*.vol. 80, pp.447-451,2004.

50- Ali, O. A. "Prevention of *Proteus mirabilis* Biofilm by Surfactant Solution. Egypt". *Acad. J. Biolog. Sci*., vol.4,no.1,pp.1- 8, 2012.

51- Jafarei, P and Ebrahimi,M. T." Lactobacillus acidophilus cell structure and application" *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5, no.24, pp. 4033-4042. 2011.

52- Saranya, S. and Hemashengam, N." Purification and characterization of bacteriocin production by different *Lactobacillus* species isolated from fermented food . *Int.J,Micr.* Vol.5,no.1, pp.341-348. 2013.

53- Westbroek, M. L., Davis, C. L., Fawson, L. S. and Price, T. M. "Interactions of *Lactobacilli* with Pathogenic *Streptococcus pyogenes*". *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*.,pp 289-743. 2010.

54- العجيلي, اسامة عبد الكاظم مهدي .(2003). تأثير راشح مستنبتات بكتريا حامض اللاكتيك على بعض انواع البكتريا المعوية. رسالة ماجستير . كلية العلوم – الجامعة المستنصرية.

55- AL-Zoubaidy , L. A. "Characterization and selection of *Lactobacillus* species to eradicate pathogenic bacteria causing urinary tract infection". *Appl. Env. Microbiol*.vol.71, no.3, pp.1-13, 2008.

56- Khalid, F.; Siddiqi, R. and Mojgani, N."Detection and aduced by aclinical isolate of *Lactobacilli*" .Karachi 75270, Paskistan, 1999.

57- Milos, B. and Michele, D. "Antimicrobial Agent ". *Inter. J.* vol.4, pp.127-134, 2012.

58- Hindal, A. S., & Ali, S. A." Estimating the inhibitory effect of Lactobacillus isolated from vagina against some pathogens of genital infections in group of women". *Iraqi Journal of Science*, *vol.56*, no.2, pp.1588-1593, 2015.

59- حميد, علي حسن علي .(2004).استخدام النواتج الايضية لبكتريا حامض اللاكتيك العلاجية لحفظ منتجي الجبن الطري والقشطة المحليين . رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة بغداد.

60- Furtado, D .N .; Todorov, S .D .; Chiarini, E.; Destro, M .T .;Landgraf, M .;Gombosy de Melo Franco, B .D . "Goat milk and cheese may be agood source for antilisterial bacteriocin- producing lactic acid bacteria .*J .Biotechnol*.

Vol.5,no.17, pp. 775-778, 2009.

61-Gaon, D, ; Garmendia, C. ;Murrielo, N. O. ; Games, A. D. ; Cerchio, A. ; Quintus, R. ; Gonzales, S. N. and Oliver, G."Effects of Lactobacillus strains *(L. casei* and *L. acidophilus*. strains(ERELA) on bacterial overgrowth – related chronic diarrhea". *Medicina*. Vol.62,no.2, pp.159-163, 2002.

62- Hawthorn, L. A. and Reid, G. "Exclusion of Uropathogen adhesion to polymer surfaces by *Lactobacillus acidophilus*". *J. Biomed. Mater. Res*. Vol.24, pp.39-46, 1995.

63- Al – Khozai, Ziad, M. "Inhibitory effects of probiotic on growth and adhesion of some gram negative pathogenic bacteria". *Journal of Karbala University*, vol.7, no.1, P.P:34 – 38, 2009.

64-Daeschel, M. A.; Mckenney, M. C. and McDonald ,L. C." Abstracts of the Annual Meeting of the American Society of Microbiology". *ASM. Washington*, D.C.P.133. 1986.

65- Hamdan, I. T. & Mikolojeik, E. M."Acidolin: An antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*". *J. Antibiot.* 27:631, 1974.

66- S Oh, SH Kim, RW Worobo"Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC)". *J Dairy Sci* vol.83, pp.2747–2752. 2000.