In vitro efficiency of Biosurfactant extracted from *Bifidobacterium spp* in the phagocytosis process

أختبار كفاءة المشتت الحيوي السطحي خارج الجسم الحي المعزول من بكتريا *Bifidobacterium spp* على عملية البلعمة

*بتول شاكر عبد المجلاوي أ.م. د. هيام عبد الرضا كريم العواد
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة /قسم علوم الحياة
د. علي رحيم حنظل الهامل/ مستشفى الإمام الحسين (ع) التعليمي

*بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

المستخلص:

أجريت هذه الدراسة لأجل التعرف على تأثير المشتت الحيوي السطحي Biosurfactant المستخلص من بكتريا *Bifidobacterium spp* المعزولة من الالبان وتقييم كفاءة البلعمة خارج الجسم الحي .وفي هذه الدراسة تم عزل وتشخيص بكتريا *Bifidobacterium spp* من منتجات الالبان المستوردة ، جمعت 45 عينة من منتجات الالبان المستوردة والمحلية ،وتم الحصول على 5 (11.11%) عينة موجبة لبكتريا *Bifidobacterium spp* لمنتوج البان كاله سفن ،صنع الجمهورية الإسلامية الإيرانية ،بعد تشخيصها بالفحوصات المظهرية و المجهرية والكيموحيوية ومقارنتها بالعزلة القياسية، حيث تم استخلاص المشتت الحيوي السطحي من بكتريا *Bifidobacterium spp* واختبار كفائته في اختبار كفاءة البلعمة خارج الجسم الحي ،فقد بلغت النسبة المئوية للبلعمة لمجموعة السيطرة 40.9 % و للمجموعة التجريبية 64.8 % ، ونظرا لاهمية بكتريا *Bifidobacterium spp* العلاجية ونظرا لعدم وجود دراسة محليه عن فعالية المشتت الحيوي السطحي لهذه البكتريا في اختبار كفاءة البلعمة في بلدنا جاءت هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية: *Bifidobacterium spp* ، المشتت الحيوي السطحي ، البلعمة

Abstract

This study was conducted to known the effect of Biosurfactant extracted from *Bifidobacterium spp* bacterium which isolated from yoghurt and evaluate efficiency of phagocytosis *in vitro*, in this study was to isolate and diagnose the bacteria *Bifidobacterium spp* of imported yoghurt products,

A total of 45 samples were randomy collected from deferent imported and domestic dairy products source, 5 (11.11%) positive sample of *Bifidobacterium spp* were obtained from yoghurt product (Kaller seven dairy product) supplied from Islamic Republic of iran ,several methods were used in the diagnosis of bacterium Represented as microscopic and biochemical tests , in addition its compared with standard isolate.

Biosurfactant was extracted from *Bifidobacterium spp* bacteria and test its efficacy in efficiency phagocytosis *in vitro* has reached the percentage of phagocytosis 40.9% for the control group and 64.8% of the experimental group ,because of therapeutic importance of *Bifidobacterium spp* bacteria and the absence of a local study on the effectiveness of biosurfactant of these bacteria to test the efficiency of phagocytosis in our country this stady was came.

Keywords: *Bifidobacterium spp*, Biosurfactant, phagocytosis

المقدمة :

عزلت جراثيم *Bifidobacterium* لأول مرة من قبل Henry Tisser عام 1899 من براز اطفال الرضاعة الطبيعية ،سميت *Bacillus bifides* عندما لاحظ انخفاض حالات الاسهال ،توجد أعداد كبيرة منها في براز الاطفال الاصحاء ،استخدمت في علاج حالات الاسهال المعوية (3,2,1) .

يعتقد ان العدد الهائل لجراثيم *Bifidobacterium* في براز الاطفال الرضع يعود الى خصائص تحفيز ما في حليب الأم (7,6,5,4)

تشير التجارب الى عمليات عد عالية لجراثيم *Bifidobacterium* ، وانخفاض حالات التهاب المعدة والامعاء في اطفال الرضاعة الطبيعية مقارنة في اطفال الرضاعة الصناعية (9,8) .

أن جراثيم العصيات اللبنية هي عصيات موجبة لصبغة غرام ، وخلاياها ذات اشكال متنوعة بين عصيات قصيرة الى عصيات طويلة shapedrod– club ، متفرعة ، المستعمرات تكون ناعمة حافاتها محدبة تماما ، متألقة ، غير مكونة للأبواغ ،غير متحركة ، لا هوائية ، لكن بعض انواعها تتحمل الاوكسجين بوجود CO2 ، سالبة لأختبار الكتاليز واليوريز ، غير منتجة للغاز ، مقاومة للحامض والتخمر ، سالبة لاختبار النترات وغير منتجة للاندول (10) ، وغير منتجة للأمونيا او H2S من الاحماض الامينية (11) ، تكون نسبة الكوانين والسايتوسين لمادتها الوراثية (DNA G + C) 42 – 67 % ،درجة الحرارة المثلى للنمو 37-41 ، قيمة pH المثلى للنمو 7.0-6.5 (12).

اشار(13) ان العديد من الاطباء يوصي بأستخدام هذه الجراثيم كمعزز حيوي Probiotics اما بشكل حبوب او كبسول او مستحضرات مجفدة ، لذا أثبت دوراختيار المعززات الحيوية Probitics كبديل للعلاج في العديد من الدراسات في أستخداماته العديدة في الناحية الغذائية والصحية (14).

تساهم جراثيم *Bifidobacterium* في تطوير المعززات الحيوية التجارية ،كونه الاكثر امانا ، اذ تحاول العديد من شركات الغذاء والدواء ايجاد طرائق جديدة ومبتكرة للحصول على *Bifidobacterium* في متناول اليد، والشكولاتة وقد اطلقت مصطلح المعزز الحيوي لحليب الاطفال (15).

المواد وطرائق العمل :

جمعت 45 عينة من منتجات الالبان والاجبان المستوردة والمحلية والشرش من الاسواق المحلية في محافظة كربلاء المقدسة ،ثم زرعت العينات بعد نقلها الى المختبر وذلك بأخذ جزء من المنتج بوساطة عروة الناقل وزرعت مباشرة على الوسط الصلب MRS – L- Cystiene المحضر حسب تعليمات الشركة بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بظروف لاهوائية باستخدام حاويه لاهوائية Anaerobic Jar وعدة توليد الغاز(gas pak) بدرجة حرارة 37° م لمدة 48 ساعة.

بعد ظهور المستعمرات المزروعة على الوسط المغذي الصلب MRS – L- Cystiene ،اذ لوحظ حجم المستعمرات النامية مثل شكلها، لونها ، قوامها وبعد نمو الجراثيم تم عمل مسحات جرثومية وصبغها بصبغة غرام وشخصت بالفحوصات المظهرية والمجهرية والكيموحيوية حسب الطرائق التشخيصية المعتمدة في (18,17,16).

أُتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (21,20,19) مع بعض التحوير في استخلاص المشتت السطحي الحيوي Biosurfactant المنتج من بكتريا *Bifidobacterium spp* .

حيث، اذ لُقح وسط MRS– L-Cysteine السائل بمزرعة بكتريا *Bifidobacterium* Spp ،حُضنت لاهوائيا ،بحاضنة هزازة 120/rpm بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة ، نُبذت مركزياً بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4° م بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد ،أخُذ الراشح البكتيري ورشح من خلال مرشحات دقيقة Millipore filter بقطر 0.22 مايكروميتر وحفظ بدرجة 4° م لحين الاستعمال ،غُسلت الخلايا مرتين بماء مزال الأيونات Deionized water ،أُعيد تعليق الخلايا بمحلول بفر phosphat buffer saline(PBS)(pH (7.0 ،ثم تُركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة 3-4 ساعات مع الاهتزاز بهدوء بجهاز magnetic stirrer لتحريرالمشتت الحيوي السطحي ، نُبذت الخلايا مركزياً للتخلص من بقايا الخلايا بعدها رشح السائل من خلال مرشحات دقيقة Millipore filter بقطر 0.22 مايكروميتر للحصول على المشتت الحيوي السطحي ،أستخدم جهاز التجفيد Lyophilizer لتجفيف المشتت الحيوي السطحي والراشح ثم حفظ بدرجة 4° م لحين الاستعمال .

اجري فحص كفاءة البلعمة Phagocytosis خارج الجسم الحي *in vitro* حسب طريقة (22) حيث تم تحضير العالق الجرثومي وتشخيص بكتريا *Staphylococcus aureus* من عدة القسطرة القلبية (القسطرة التشخيصية والعلاجية) في مستشفى الامام الحسين (ع) التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة ، ثم حضر عالق البكتريا، نميت البكتريا على وسط Manitol salt agar(Oxoid) وحضت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، حصدت البكتريا المنماة وغسلت مرتين بدارئ الفوسفات الملحي PBS المعقم بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة /دقيقة ، ولمدة عشرة دقائق لترسيبها ،بعد ذلك حضرعالق البكتريا مع محلول دارئ الفوسفات الملحي PBS المعقم بتركيز(10^8 *1) خلية/مل وحفظ بدرجة حرارة 4° م لحين الاستعمال ،

اعتمد فحص كفاءة البلعمة على سحب 1مل من الدم من الاشخاص الاصحاء ووضع في انبوبة EDTA منعا لتخثر الدم وحفظ بدرجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال .اضافة الى تحضير المشتت الحيوي السطحي حيث اخذت كمية من المشتت الحيوي السطحي وعقم من خلال مرشحات دقيقة Millipore filter بقطر 0.22 مايكروميتر وحفظ بدرجة 4° م لحين الاستعمال .

ثم متابعة طريقة (23) لإجراء اختبار كفاءة البلعمة ضد بكتريا *S.aureus* من خلال نقل 1مل من الدم المسحوب الى plain tube واضيف اليه 100 مايكروليتر من عالق البكتريا ليكون التركيز النهائي 10:1 ، ثم اضيف اليه 100 مايكروليتر من المشتت الحيوي السطحي ذا تركيز 25% مع الرج ، وبواقع مكررين لكل انبوبة مع استخدام انابيب السيطرة ،حضن الدم والبكتريا والمشتت الحيوي السطحي بدرجة حرارة 37 مْ لمدة ساعة ونصف ، اخرجت الانابيب من الحاضنة بعد الانتهاء مدة الحضن ورجت

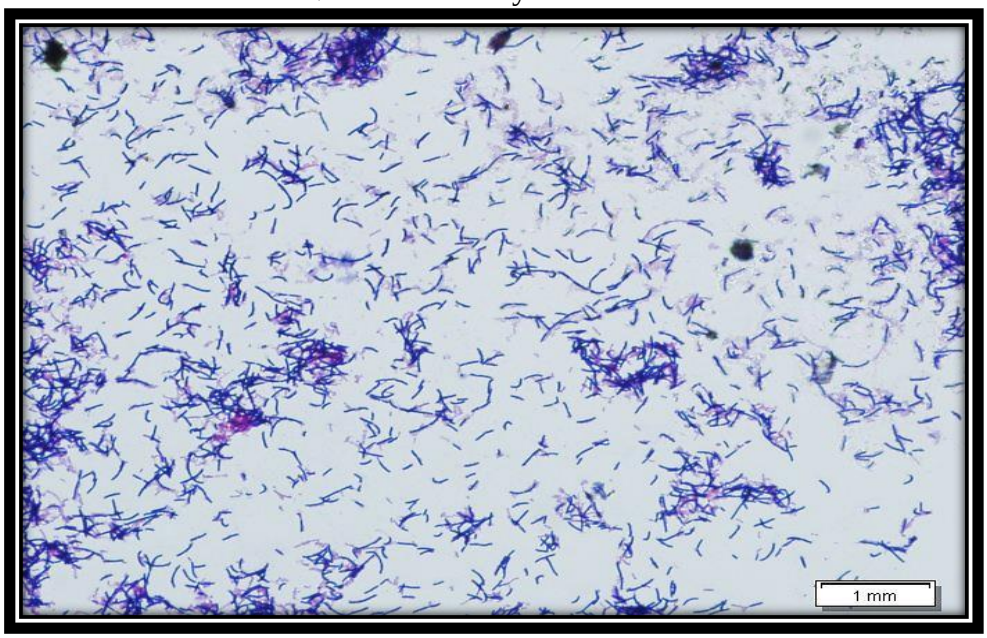
جيدا وضع بحدود 2-3 قطرات من خليط الدم والبكتريا والمشتت الحيوي السطحي على شريحة نظيفة لعمل عدد من المسحات Smears وكذلك من انابيب السيطرة ،بعدها تركت الشرائح الزجاجية لتجف بدرجة حرارة الغرفة وصبغت بصبغة لشمان Leishman stain وجففت الشرائح وفحصت الخلايا بواسطة المجهر بالعدسة الزيتية X100 ، تم استخدام مجموعتين احداهما تجريبية والاخرى سيطرة اضيف لها تركيز 25 ملغم/مل من المشتت الحيوي السطحي وتم حساب عدد الخلايا الملتهمة وغير الملتهمة لكلا المجموعتين ،وحسبت النسبة المئوية للبلعمة حسب المعادلة التالية المتبعة من قبل (23).

$$\text{النسبة المئوية للبلعمة} = \frac{\text{عدد الخلايا البلعمية الملتهمة للبكتريا}}{\text{عدد الخلايا البلعمية الكلي}} \times 100$$

النتائج والمناقشة :

اتضحت النتائج بعد العزل على وسط MRS-L-Cystiene –HCL بـأن بكتريا *Bifidobacterium spp* ذات مستعمرات كريمية اللون محدبة دائرية الشكل كما في صورة (1) ، في الظروف اللاهوائية (17) اما صفاتها المجهرية عصوية قصيرة وبعضها منحنية وقسم منها بشكل حرف Y ، تكون مفردة او ثنائية التجمع الصورة (2)، موجبة لصبغة غرام سالبة لاختبار KOH غير متحركة غير مكونة للسبورات ، لاهوائية ،تنمو في درجة حرارة من 35 – 45° م ولا تنمو في درجة حرارة 5 ° م و 15°م ، غير محللة للجيلاتين والنشأ والكازئين واللسيثين واللايبيز وسالبة لأنتاج الامونيا من الأرجنين والكاتاليز والأوكسديز واليوريز وغير منتجة للأندول من التربتوفان وسالبة لأنتاج النترات والغاز وهذه مطابقة مع ماجاء بموسوعة (17) الجدول (1) ،

صورة (1) يمثل السهم مستعمرات بكتريا *Bifidobacterium spp* على وسط MRS-L Cysterin –HCL الصلب .



صورة (2) خلايا بكتريا *Bifidobacterium spp* تحت المجهر الضوئي (100 X) وبأستخدام صبغة غرام .

جدول (1) الاختبارات المظهرية والكيموحيوية وتخمر السكريات لتشخيص بكتريا الـ *Bifidobacterium spp* المعزولة من الالبان :

الاختبـارات المظهرية والكيموحيوية	النتيجة	نتيجة العزلة المستوردة
Gram stain	+	+
KOH	-	-
Growth Aerobic	-	-
Growth Anerobic	+	+
Growth temperature	45-35	45 - 35
Morphology rods	+	+
Spore forming	-	-
Motility test	-	-
Catalase	-	-
Oxidase	-	-
Indole	-	-
Citrate Utilization	-	-
Gelatinase	-	-
Urease	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Ammonia from arginine	-	-
Nitrate Reduction	-	-
Gas production	-	-
Gasein hydrolysis	-	-
Lecethinase	-	-
Lipase	-	-

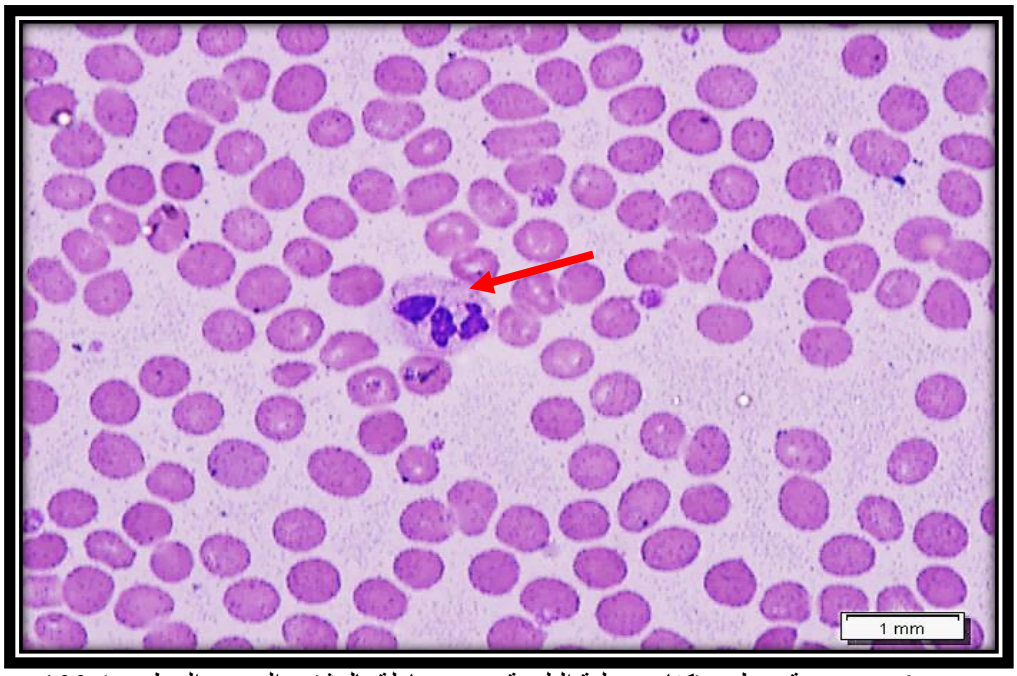
بعد تشخيص بكتريا *Bifidobacterium spp* استخلصت مركباتها ذات السطح الحيوي النشط Biosurfactant ، وذلك بتنميتها في وسط MRS – Lcysteins السائل ، حسب الطريقة المذكورة (21,20,19) مع التحوير، جمع وجفد بجهاز Lyophilizer لغرض الحصول على باودر ،بينت الدراسة الحالية ان المشتت الحيوي السطحي ذات لون ابيض مائل للاصفرار كما في صورة (3) .

صورة (3) المشتت الحيوي السطحي لبكتريا *Bifidobacterium spp* بعد التجفيد بجهاز Lyophilizer.

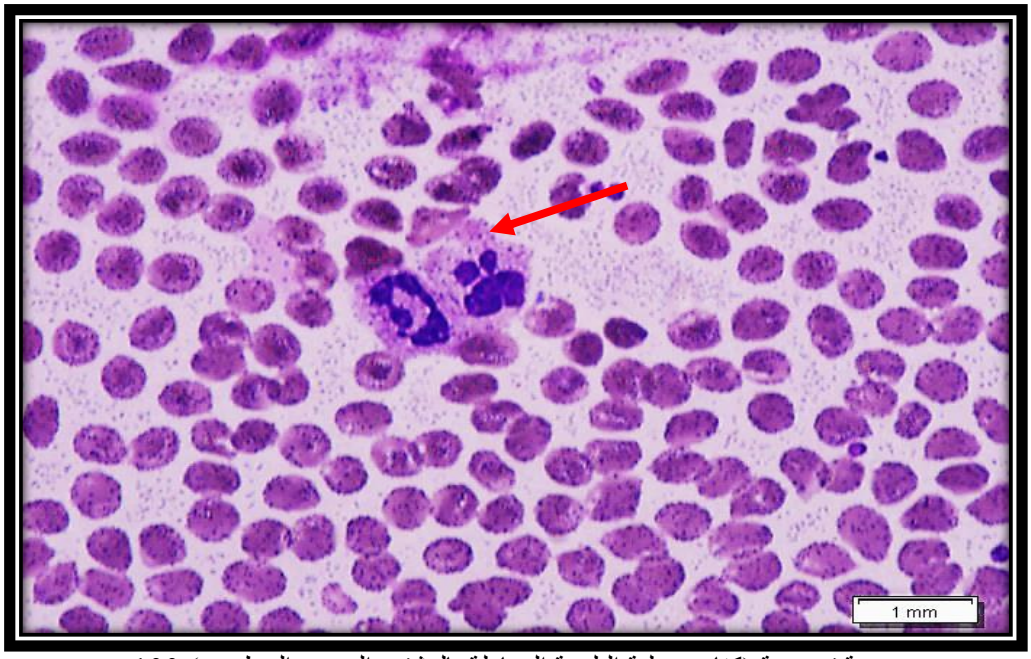
جاءت هذه النتائج مشابهه لما توصلت اليه دراسة (24) اذ استخلص منشطات السطوح الحيوية الراميونوليبد Rhaminolipids المنتج من *Pseudomonas aeruginosa* ، وكذلك هذه الدراسة مشابهه لدراسة (25) الذي افاد بأن بكتريا *Lactobacillus* تنتج glycosyldiglyceriodes كمشتتات حيوية Biosurfactant عبارة عن خليط من مكونات مختلفة تظهر مضادة للميكروبات ومثبطة لالتصاق البكتريا الممرضة (26).

لاحظ (21) ان المشتتات الحيوية ذات فعالية عالية في خفض نسبة البكتريا المسببة للأمراض دون ان يؤثر على نمو الخلايا الطبيعية، مما اكد تداخل مباشر يحدث على سطح البكتريا من خلال هذه التغيرات في التوتر السطحي وشحنة جدار الخلية البكتيرية ، بينما (27) اكد اهمية المشتتات السطحية في تضخيم التداخل بين خلية وخلية اخرى وبين خلية وسطوح الخلايا المختلفة

لغرض اختبار كفاءة المشتت الحيوي السطحي لبكتريا *Bifidobacterium spp* أجري اختبار كفاءة البلعمة Phagocytosis خارج الجسم الحي *invitro* ضد بكتريا *S.aureus* ، صورة (4) .



A ـ مجموعة سيطرة (كفاءة عملية البلعمة بدون معاملة بالمشتت الحيوي السطحي) X100



B ـ مجموعة تجريبية (كفاءة عملية البلعمة المعاملة بالمشتت الحيوي السطحي) X100

صورة (4) عملية البلعمة المعاملة وغير المعاملة بالمشتت الحيوي السطحي بأستخدام صبغة ليشمان وعلى قوة تكبير X100.

فقد بلغت النسبة المئوية للبلعمة لمجموعة السيطرة 40.9% اما المجموعة التجريبية 64.8% ، لوحظ ارتفاع في اعداد الخلايا الملتهمة في المجموعة التجريبية عن مجموعة السيطرة في حين انخفضت انخفاضاً واضحاً اعداد الخلايا غير الملتهمة في المجموعة التجريبية مقارنة بمجموعة السيطرة مما يؤكد كفاءة المشتت الحيوي السطحي Biosurfactant في زيادة الخلايا الملتهمة ضد *S.aureus* .

ان نتائج الدراسة اتفقت مع (28) الذي يبين ان تركيز العسل 1% يحفز الاستجابة المناعية للإصابة بالأمراض المزمنة .

نعتقد ان الزيادة الكبيرة في عدد الخلايا الملتهمة بعد المعاملة بالمشتت الحيوي السطحي الذي يجعل مهمة الخلايا البلعمية سهلة في القضاء على البكتريا .

كما اتفقت مع نتائج دراسات (30,29) اثناء معاملتهم بالسالسيلات حيث زادت من قابلية التهام خلية الدم البيض متعددة اشكال النوى ضد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* .

حسب اعتقادنا قد يعزى دور الخلايا في البلعمة وقتلها خارج الجسم الى دور المواد المثبطة الفعالة التي يحويها Biosurfactant والتي تعمل كعوامل جذب الخلايا chemotaxis نحو البكتريا ثم الالتصاق بها ، ويمكن عد دور Biosurfactant محفز للخلايا لمساعدتها في التهام البكتريا وافراز الانزيمات الحالة عليها .

Refernces

1. Scaradovi, V. (1986). The genus *Bifidobacterium* in Bergey's Manual of Systematic bacteriology .Second Edition. Williams and Wilkin, Co.1418-1434.
2. Biavati. B. M. Vescovo; S. Torriani & Bottazzi, V. (2000) . "Bifidobacteria History, Ecology, Physiology and Applications," Annals of Microbiol., 50 (2) : 117-131.
3. Doré, J. & Corthier, G.(2010). The human intestinal microbiota. Gastroenterol. Clin. Biol. *34 1: 7-15.*
4. Dai, D., & Walker, W. A. (1999). Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. Adv. Pediatr., 46:353
5. Mountzouris, K. C.; McCartney, A. L. & Gibson, G. R..(2002). Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. Br. J. Nutr. ,87:405–420.
6. Chierici, R.,; Fanaro, S.; Saccomandi, D. & Vigi, V. (2003). Advances in the modulation of the microbial ecology of the gut in early infancy. Acta Paediatr. 91:56–63.
7. Thibault, H., C. Aubert ,J. & O. Goulet.(2004). Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 39:147–152
8. Collins, M. D., & Gibson ,G. R.. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am. J. Clin. Nutr., 69:1052S–1057S.
9. Christensen, H. R.; Larsen, C. N.; Kaestel, P.; Rosholm, L. B.; Sternberg, C., Michaelsen K. F. & Frokiaer. H. (2006). Immunomodulating potential of supplementation with probiotics: a dose-response study in healthy young adults. *FEMS Immunol.* Med. Microbiol. 47:380–390.
10. Braun, O.H. (1981). Gastroenterology and Nutrition in France. Raven Press, New York, USA.
11. Tamura, Z. (1983). Nutriology of *Bifidobacteria. Bifidobacteria and Microflora,* 2: 3-16.
12. William, B. W.(2012).Bergeys manual of systematic bacteriology . E ^{sd} 171-190.
13. Baron, J.M.; Schepper, Luc.De. Domingue, G.; Huges, H.; Mattam, L.;Everett, B.; Lee W.H.; Mcabe, E.; Trenev, N.; Ray , K. R. (1989). friedly bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterim.The Scientific Basis*.:210-224.
14. Gobbato, N.; Galdeanno, C.M. & Perdig, G. (2008). Study of some of mechanisms involved in the prevention against *Salmonella enteritidis* serovar typhimurium infection by lactic acid bacteria. *Food and agricultur immunology*., 19:11-23.
15. Sanders,M,E.. (2007) . The Pros of Probiotics. California Dairy Dispatch.
16. Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneeth, P. H.; Staley, G. T. & Williams; S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore, illiams and Wilkins Com., USA.
17. William, B. W.(2012).Bergeys manual of systematic bacteriology . E ^{sd} 171-190
18. Forbes, B.A. ; Daniel, F.S& Alice, S.W.(2007).Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology . 12th ed. ,Mosby Elsevier company . USA . formulations. *Lett. Appl. Microbiol*., 45: 330-335.

19. Velraeds, M.C.; van der Mei, H.C.; Reid, G.& Busscher, H.J.(1996). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl .Environ. Microbiol.,* 62:1958–63.
20. Lievin , V. ; Peiffer , I. ; Hudault , S. ; Rochat , F. & Servin , A.L.(2000). *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity . *GUT*.,47 (5): 646-652 .
21. Rodrigues, L., Van Der Mei, H., Banat, I.M., Teixeira, J. & Oliveira, R. (2006a) . Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus*, FEMS Immunology & Medical Microbiol., 46(1):107-112.
22. MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
23. Mackie &Mc-Cartney .(1995).Practical medical microbiology 4th ed. edited by Colle.New York .USA.p:650-651.
24. Salleh, S. M.; Md Noh, N. A. & Yahya, A.R.M.(2011). Comparative study: Different recovery techniques of rhamnolipidbproduced by *Pseudomonas aeruginosa* USMAR-2.
25. Gerson, D.F.(1993).The biophysics of microbial surfactants: growth on insoluble substrates. In N. Kosaric (Ed.). Biosurfactants- Production, Properties, Applications. M. Dekker, New York.:269-286.
26. Gudin, E. J.; Rocha, V.; Texeira, J. A. & Rodrigues, L. R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Lett. Appl. Microbiol*. 50: 419–424.
27. Walencka ,E.; Różalska, S.; Sadowska, B.& Różalska ,B. (2008).The Influence of *Lactobacillus acidophilus* derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol.*,53:61–66.
28. Tonks , A; Cooper, R.A ;Price, A.J; Molan ,P.C.& Jones, K.P.(2001). Stimulation of TNF-alpha release in monocytes by honey. *Cytokine* .14(4): 240-242.
29. Domenico, P.1.; Salo, R.J.; Straus, D.C.; Hutson, J.C.& Cunha B.A.(1992). Salicylate or bismuth salts enhance opsonophagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection* ,20(2):66-72.
30. Salo, R.J.; Domenico, P.;Tomás, J.M.; Straus, D.C.; Merino, S.; Benedí ,V.J.&Cunha, B.A.(1995). Salicylate-enhanced exposure of *Klebsiella pneumoniae* subcapsular components. *Infection* ,23(6):371-7.