دراسة الفعالية التثبيطية للرامنوليبد المنتج من بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* ضد بعض انواع البكتيريا الممرضة خارج الجسم الحي

ندى صباح رزوقي مها هاني توفيق

قسم علوم الحياة / كلية علوم للبنات /جامعة بغداد

Doctor_nada2003@yahoo.com

الخلاصة

تم عزل 49 عزلة لبكتريا *Pseudomonas spp.* منمصادرمتنوعةمرضية (حالاتسريريةمرضية وغيرمرضية (تربةملوثةوغيرملوثة) وشخصت21 عزلةمنهاعلىانها *P. aeruginosa*.تم انتخاب العزلتين البكتيرية PP8 *P.aeruginosa* وPS14 *P.aeruginosa* لانتاج الرامنوليبد الاولى من العزلات المرضية والثانية من عزلا ت التربة، شخص الرامنوليبد بتقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة وتبين ان العزلتين تنتج ثلاثة انواع هي الاحادي والثنائي الرامنوليبدورامنوليبدA.وكذلك شخص بطريقة كروموتوغرافيا السائل ذي الأداء العاليHPLC. اختبرت كفاءة الفعاليةالتثبيطيةللرامنوليبدضد البكتيريا وذلك بقياس اقطار مناطق التثبيط حول الحفر و كانت ذات فعالية تثبيطية عالية للبكتيريتين *Bacillus cersus* و *P.aeruginosa* تليهما *Staphylococcus aeraus* وتليها *Escherichiacolli* على التوالي.تم في هذه الدراسة ايضاتحديد قيمه التركيزالمثبط الادنى MIC وقيمه التركيز القاتل الادنى MBC للمنشطات السطوح الحيوية تباينت النتائج تبعا لاختلاف نوع منشط السطح الحيوي و نوع البكتريا حيث إن اقل قيمه MBC و MIC لمنشط السطح الحيوي المنتج من PS14 *P. aeruginosa* على نمو بكتريا *Bacillus cereus* وصلتالى32مايكروغرام\مل.

الكلمات المفتاحية: *P. aeruginosa*، الرامنوليبد ،الفعالية التثبيطية للبكتيريا.

المقدمة

تمتاز منشطات السطوح الحيوية biosurfactants بكونها مركبات امفوتيرية تحتوي على طرف محب للماء hydrophilic واخر كاره للماء hydrophobic اذ تتمكن من التجمع بين الأسطح وخفض الشد بينها وكذلك الشد السطحي،وهي تنتج على الأسطح الحيه كأسطح الخلايا الميكروبية او خارج الخلايا (Karanth*etal*., 1990).تتميز منشطات السطوح الحيوية بخصائص متميزة مما جعلها تستخدم في كثير من المجالات الصناعية، كالاستحلاب والتصوبن وتكوين الرغوة Foaming والترطيب Wetting والتشتيت Dispersing والاذابة Solubilization (Gautam and Tyagi, 2005). وهي مجموعة متنوعة من الجزئيات ذات النشاط السطحي تتكون من تراكيب كيميائية مختلفة مثل الدهون السكرية Glycolipid و الببتيدات الدهنية lipopeptides والبروتينات الدهنية Lipoproteinوالاحماض الدهنية Fatty acids والدهون المتعادلة Neutral lipids والدهون الفوسفاتية Phospholipids و Polymeric particulate structure(Van Hamme*etal*.,2006; Banat*et al*. 2010).

وتعد الدهون السكرية (Glycolipid) من اهم منشطات السطوح الحيوية التي تم دراستها بشكل كبيربسبب استخداماتها الكثيرة ولإمكانية الحصول على انتاجية عالية منها، باستخدام مصادر كثيرة من السكريات والهيدروكاربونات كمصادر لانتاج هذه المركبات مقارنة مع بقية منشطات السطوح الحيوية الاخرى.منشطات السطوح الحيوية يمكن ان تنتج من اوساط غذائية رخيصة او من النفايات على عكس منشطات السطوح الكيميائية التي تشتق من النفط كمادة اولية (Banat*et al*., 2000). وهناك العديد من منشطات السطوح الحيوية المنتجة في الوقت الحاضر مثل Rhamnolipids المنتج من *P. aeruginosa*و surfactin المنتج من*Bacillussubtilis*و emulsanالمنتج من *Acinetobactercalcoaceticus* وsophorolipidsالمنتج من *Candida bombicola* و(MELs) mannosylerythritol lipids المنتج من *Pseudozyma yeasts*(Benincasa*et al*., 2002;Nitschke and Coasta, 2007;Muthusamy*et al*., 2008;Banat*et al*., 2010;Marchant and Banat,2012) . ذكرت العديد من المصادر امتلاك منشطات السطوح الحيوية الفعالية التثبيطيةضد عدد من المكروبات(Cameotra and Makkar, 2004).ومنهم الرامنوليبد اظهر فعالية تثبيطيه اتجاه العديد من الاحياء المجهرية مثل *Clostridium perfringens*و*Enterobacteraerogenes*و *Escherichia coli*و*Salmonellatyphimurium*و *Phytophthorainfestans*و *Phytophthoracapsici* و *Botrytis cinerea*و*Fusariumgraminearum*و *Mucor*

spp.(Buchanan*et al*., 1974; Haba*etal*. .2003; Sha*et al*. 2011)

هدفت الدراسة الحالية قياس الفعالية التثبيطية للرامنولبيد المنتج من قبل بكتيريا*P. aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية مرضية ومن التربة باستخدام زيت فول الصويا كمصدر للكاربون ضد انواع من البكتيريا الممرضة خارج الجسم الحي.

المواد وطرائق العمل

تمّ الحصول على 25 عينة مرضية من مستشفى الحروق التخصصي والمختبرات التعليمية في محافظة بغداد و24عينة غير مرضية من التربة من مناطق مختلفة من محافظة بغداد من شباط 2013 ولغاية حزيران 2013 شخصت عزلات *P. aeruginosa* ،بالاعتماد على كل من (Forbes *e t al*., 2007; Jawets*et al*., 2010)،كما استخدم نظام التشخيص API 20NE لزيادة تأكيد تشخيص هذه البكتريا كونه يضم عددا من الاختبارات الكيميوحيوية المهمة التي تساعد في تأكيد تشخيصها.

البكتيريا المستعمله

تم استعمال اربع عزلات مشخصة ومفحوصة في مختبر الاحياء المجهرية /قسم علوم الحياة /كلية العلوم للبنات /جامعة بغداد .وشملت *Bacillus cereus* و *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*.

استخلاص منشطات السطوح الحيوية

استخلص المركب حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Folch*et al*. 1957)لاستخلاص المركبات الدهنية من الجزيئات الحيوية ،حيث تم نبذ وسط الزرع البكتيري لبكتيريا *P. aeruginosa* التي تم جمعها من مصادر مرضية وغير مرضية وتشخيصها حسب المفاتيح التصنيفية المعتمدة من قبل (Forbes*et al*. 2002)في جهاز الطرد المركزي الالماني الصنع والمجهز من شركة Hermle بسرعة 8000 دورة\الدقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4 مئوية ،وبعد ذلك أستخلص المركب بالمذيبات كلوروفورم_ميثانول بنسبة 1:2 حجم \حجم ،بحيث اصبح نسبة الكلوروفوم_الميثانول_الماء (الراشح الخالي من الخلايا البكتيرية) (3:4:8)، ثم بخر المذيب وتم الحصول على منشط السطح الحيوي بشكل مسحوق.

فصل وتنقية منشطات السطوح الحيويه بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

اجريت عمليتي الفصل والتنقيةلمنشطات السطوح الحيوية باستخدام 20 غم من هلام السليكا 60 المصنع من قبل شركة BDH البريطانية لكل غرام من مستخلصمنشطات السطوح الحيوية. وذلك بعد نقع هلام السليكا 60 بالكلوروفورم لمدة ساعة وتهيئة عمود من هلام السليكا60 بابعاد (40×2) سم داخل عمود زجاجي طوله 60 سم وقطره ٢ سم من الخارج ثم اضيف اليه ٢ غم من مستخلص منشط السطح الحيوي المذاب باربعه مل من الكلوروفورم وبعدها شطف بالكلوروفورم لغرض ازالة اللون الاصفر ، وجمع السائل الخارج من العمود في انابيب

سعة ٥ مل وبعدها شطف بالكلوروفورم ـ الميثانول بنسبة (2:5) على التوالي وجمع السائل الخارج من العمود في انابيب سعة ٥ مل، ثم بخر المذيب وتم الحصول على منشط السطح الحيوي بشكل مسحوق(Petrikov*et al*., 2013).

الكشف عن الرامنولبيد بوساطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

Detaction,of Rhamnolipid by Thin layer chromatography (TLC)

اتبعت تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)بأستعمال صفائح Thin layer chromatography هلام السليكا (20×20) سموبسمك0.25ملمالمجهزة من شركةMerekلتشخيصالرامنولبيد،استعملنظام المذيب المكون من الكلوروفورم : الميثانول : ماء(2:15:65) (حجم:حجم:حجم) تبعا لطريقة (Abbasi*et al*., 2012) لتحديد عدد ومواقع البقع وتحديد مكوناتالمركب.

تشخيص منشطات السطوح الحيوية بطريقة كروموتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC

أستخدم في هذه التجربـة جهـاز HPLC الياباني الصنـع والمجهز من شركة Shimadzu والمزود بمضختين متماثلتين من نوع Shimadzu LC-10 ATVP،استخدم الرامنوليبد القياسي والمجهزمن شركة Sigma Chemical، وأستخدم العمـود C18 بأبعـاد (4.6 × 50) ملم والمجهـز مـن شركـةShimadzu ياباني الصنع، وكُشف عن (RA) على طول موجي مقداره 262 نانومتر،و الطور الناقل (Mobile Phase) من 0.2% (A) حامض الفورميك في ماء خالي من الايونات و(B) سيانيد المثيل خاص بـ HPLC . بلغت سرعة جريان الطور الناقل 1.4 مل/دقيقة ودرجة حرارة 35 مئوية.

إختبار الفاعلية التثبيطية للرامنولبيد المنتج خارج الجسم الحي

حضر معلق لعدد من العزلات البكتيرية الممرضة شملت *B. cereus*, ,*E. coli**P.aeruginosa*و*S aureus*بنقل (3 – 5) مستعمرة فتية ونقية الى انابيب حاوية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ وحضنت الانابيب بدرجة 37 م ° لمدة 16 – 18 ساعة ومن ثم قورنت عكرة النمو البكتيري في الانابيب مع عكرة محلول ثابت العكرة القياسي ماكفرلاند 0.5مسبقاً لاعطاء عدد تقريبي للخلايا الحية مساويا 1.5×10^{8} خلية/ 1 مليلتر ، ثم نقل 0.1 مليلتر من العالق البكتيري ونشر بشكل متجانس على وسط اكار المولرهنتون ، ترك الطبق لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة ليجف ،أستعمل ثاقب الفلين المعقم لعمل حفر بقطر (6) ملم وبواقع ثلاثة حفر في كل طبق من الاطباق المحضرة.

حضرت تراكيزمختلفة لمنشطات السطوح الحيوية قيد الدراسة بأذابتها بثنائي مثيل اكسيد الكبريت Dimethylsulfoxide (DMSO) وأضيف 30 مايكرولترمن التراكيز

المحضرة30,20,10 ملغم \مل لمنشطات السطوح الحيوية ،وبوساطة ماصة دقيقة وتحت ظروف معقمة، ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة(Bauer*et al*., 1966).

تحديد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز القاتل الادنى MBC

قدر التركيز المثبط الادنىMIC للمنشطات السطوح الحيوية التي اظهرت تأثيرًا ضد الجراثيم ، اذ اخذ التركيز 10 ملغم /مل وحضرت منه التخافيف 0.065 ، 0.125 ، 0.25 ، 0.5 ،1 ، 2 ، 4 ، 8 ، 16 ، 32 ، 64 ، 128 ، 256 ، 512 لمنشطات السطوح الحيويةقيد الدراسة ،بتحضير معلق من العزلات الفتية بنقل (3 – 5) مستعمرة فتية ونقية الى انابيب حاوية على وسط مولر هنتون السائل الحاوي على Mg^{2+} , Ca^{2+} وحضنت الانابيب بدرجة 37 م ° لمدة 12 ساعة ومن ثم قيست الامتصاصية للمعلق عند طول موجي 650نانوميتر،استخدمت الصفيحة المعيارية المايكروية ذات 96 حفرة ذات القعر المدور،اضيف في الحفره الاولى معلق بكتري بدون المنشطات السطوح الحيوية كسيطره موجبه واضيف في الحفره الثانية وسط مولر هنتون السائل الحاوي على , Ca^{2+} Mg^{2+} فقط كسيطرة سالبة ،وبعد ذلك اضيف 100مايكروليترمن كل تركيزمن منشطات السطوح الحيوية (0.0625 - 512) مايكروغرام\مل وبعد ذلك اضيف 5 مايكروليتر من معلق البكتري لكل حفرة وحضنت الصفيحة بدرجة حرارة 37م° لمدة 18 ساعة (Woods and Washington, 1995).

النتائج والمناقشة

عند اجراء الفحص المجهري للمسحات البكتيرية المصبوغة بصبغة كرام، ظهرت البكتريا سالبة لهذه الصبغة على شكل عصيات مفردة اوسلاسل قصيرة وهذا يتفق مع (Forbes *et al*.,2007;Jawets *et al*., 2010) واظهر الفحص المظهري للمستعمرات النامية على الوسط المكونكي بشكل مستعمرات شاحبة لكنها لم تخـــمر سكر الـلاكتـــوز ،اختيرت مستعمرة مفردة من كل عزلة، زرعت على وسط الدم الصلب وهو وسط اغنائي تنشيطي لتحديد قابلية البكتريا على تحليل الدم وتحديد نوع التحلل وكانت محللة للدم تحللا تاما β- hemolysis اذ ظهرت هالة شفافة حول المستعمرة ثم متابعة نمو البكتريا عند (42)مº اذ زرعت البكتريا على وسط المغذي الصلب وحضنة بدرجة حرارة (42)مº ، اظهرت النتائج قدرة جميع العزلات على النمو بدرجة حرارة (42)مº وهي صفة تشخيصية مهمة للنوع *P. aeruginosa* عن باقي انواع جنس *Pseudomonas*وهذا يتفق مع (Todar, 2004). ثم نميت العزلات على وسط Citrimide agar ووسط King A agarوهما وسطان انتقائيان لنوع *P.aeruginosa* ،واتصفت المستعمرات النامية على هذين الوسطين بشكلها الدائري المنتظم وانتاجها لصبغات Fluorescein و pyocyania. كما شخصت العزلات الجرثومية المعزولة بالاعتماد على نتائج الاختبارات الكيموحياتية والموضحة في جدول (1) .

جدول (1) نتائج الاختبارات الكيموحياتية المستخدمة في تشخيص بكتيريا*P.aeruginosa*

الاختبارات	صبغة غرام	اختبار انزيمالاوكسيداز	اختبار انزيم الكتاليز	اختبار الاندول	استهلاك السترات	TSI و انتاج H_2S	اختبار انزيم اليوريز	اختبار الحركة	النمو بدرجة 42 م	استهلاك الجيلاتين
النتيجة	-	+	+	-	+	K/K--	+	+	+	+

Tripal sugar iron = (AcidTSI) = (A) (+) = نتيجة موجبة

Alkaline = (K) (-) = نتيجة سالبة

وتم تاكيد التشخيص باستخدم نظام التشخيص API 20NE لزيادة تأكيد تشخيص هذه البكتريا كونه يضم عددا من الاختبارات الكيميوحيوية المهمة التي تساعد في تأكيد تشخيصها والموضحة في جدول (2).

جدول(2) نتائج تشخيص عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة لفحص Api20NE

العزلة البكتيرية / الفحص	*P.aeruginosa*PP8	*P.aeruginosa*PS14
	+	+
TRP	-	-
GLU	-	-
ADH	-	-
URE	-	-
ESC	+	-
GEL	+	+
PNG	-	-
GLU	+	+

ARA	-	-
MNE	-	-
MAN	+	+
NAG	+	+
MAL	-	-
GNT	+	+
CAP	+	+
ADI	+	+
MLT	+	+
CIT	+	+
PAC	-	-
OX	+	+

تم استخلاص مركبات منشطات السطوح الحيوية المنتجة من قبل العزلات *Pseudomonas aeruginosa* PS14 و *Pseudomonas aeruginosa* PP8 التي تم جمعها خلال هذة الدراسة وذلك بعد تنميتها في وسط فول الصويا والاملاح المعدنية باستخدام طريقة FLOCH وذلك باضافة المذيبات كلوروفورم – ميثانول بنسبة (1:2حجم/حجم) ،استخدمت طريقة خليط المذيبات لإعطائها كميات كبيرة(Salleh*et al*. 2011). اذ تم الحصول على 15.45 غم و18.25 غم في اللتر من العزلتين البكتيريتنPP8و PS42 .ان منشطات السطوح الحيوية المنتجة من قبل العزلات المنتخبة ذات لون بني مائل الى الصفار كما في الشكل (1) ولزجة في درجة حرارة الغرفة، وجاءت هذه النتائج متفقة مع النتائج التي تم الحصول عليها في دراسة(جمعة، Salleh*et al*. 2011;2007) وبعد ذلك اجريت عمليتي الفصل والتنقية لمنشطات السطوح الحيويةبحيث ان منشطات السطوح الحيوية المنقاة والمفصولة المنتجةمن قبل العزلات المنتخبة ذات لون عسليوكما في الشكل (1- B) . شخصت منشطات السطوح الحيوية المنتجةوالتي تم الحصول عليها في هذه الدراسة باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على صفائح هلام السليكا وتبين النتائج بان المركبات المنتجة مكونة من جزء دهني وجزء

سكري، فقد تم الحصول على نتيجة موجبة مع الكاشف الفا نفثولα- Naphthol الخاص بالكشف عن الدهون السكرية، فظهرت البقع بلون وردي مزرق، كما ظهرت البقع بلون بني مع كاشف (فينول – حامض الكبريتيك) الخاص بالكشف عن السكريات الموجودة في الدهون. كما لوحظ ظهور البقع في ثلاث مواقع مختلفة مما يشير الى ان المستحلب مكون من ثلاث معقدات يختلف احدهما عن الاخر بالوزن الجزيئي. فقد اظهرت النتائج ان قيمة الحركة النسبية (Rf) للمركب الاول ذي الوزن الجزيئي الاكبر كانت مساويا" الى (0.3) وللمركب الثاني ذي الوزن الجزيئي الاقل كانت مساويا" الى (0.6) وللمركب الثالث الاقل منهما وزنا جزئيا كانت مساويا الى (0.82) بالنسبة للعزلة PS14.

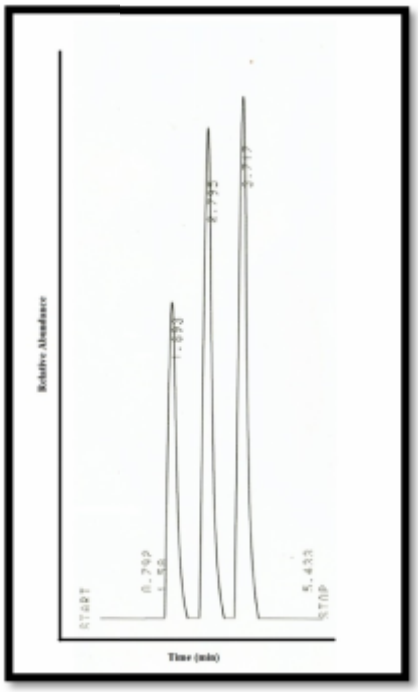
(A) (B)

الشكل (1) منشطات السطوح الحيوية المنتجة من قبل العزلات المنتخبة من بكتيريا *P. aeruginosa*

(A) منشط سطح حيوي خام (B) منشط سطح حيوي منقى

اما العزلة PP8 فكانت قيم الحركة النسبية مساوية الى (0.28) و (0.59) و(0.83) وحسب الترتيب.وهي مقاربة لقيم الحركة النسبية (Rf) المستحصلعليهامن دراسات اخرى باستعمال النظام المذيب نفسه (كلوروفورم :ميثانول :ماء 2:15:65 حجم/حجم/حجم) (Abbasi*et al.* 2012). ومن خلال التفاعلات للكشف عن المجاميع المكونة للمعقدات الثلاثة، بينت النتائج انها تمتلك طبيعة دهنية وتحتوي على مجموعة سكريات .وعند استخدام تقنية كروموتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي لتشخيص منشطات السطوح الحيوية التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة تم حقن جهاز HPLC بـ 0.02 مل من مادة نقية واستعمالها في استخراج المنحنى القياسي لـ RAكما في الشكل(2).حيث أظهرت نتائج التحليلات ان المستخلصين لمنشطات السطوح الحيوية يحتوي كل منهما على ثلاث معقدات هي احادي الرامنوليبد

وثنائي الرامنولييدورامنولييدa وبتراكيز مختلفة ،فقد كانت التراكيز للمستخلص المنتج من العزلة *P.aeruginosa* PS14 هي احادي الرامنوليبد 42.93مايكرو غرام/ مليلتر وثنائي الرامنوليبد 20.42 مايكروغرام/ مليلتر والرامنولبيد a 44.36 مايكرو غرام/ مليلتر، اما بالنسبة لمستخلص المنتج من العزلة *P.aeruginosa*PP8 كانت التراكيز (29.19- 20,69 - 27.64) مايكرو غرام/ مليلتر على التوالي كما موضح في الشكلين (3) و (4).

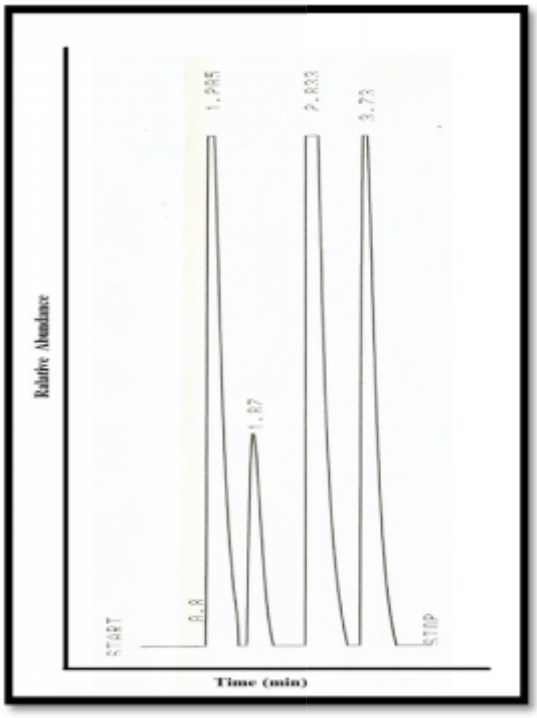


الشكل (2) المنحني القياسي لمركب الرامنولبيد القياسي

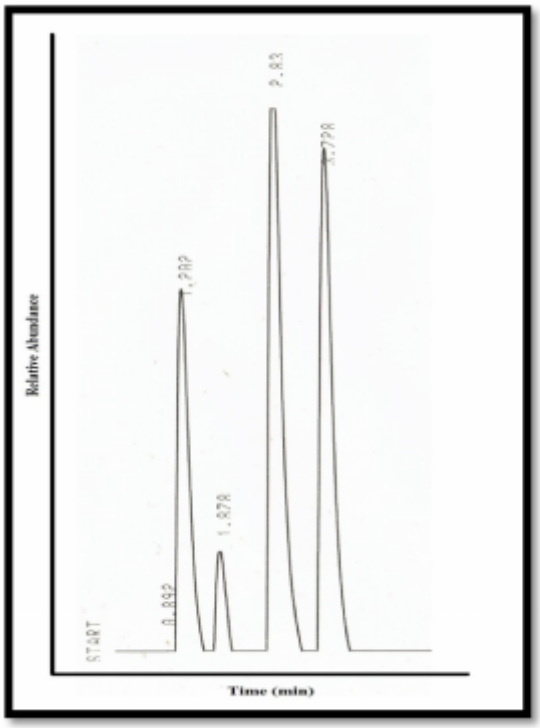
القمة (1) = تمثل المعقدR1

القمة (2) = تمثل المعقدR2

القمة (3) = تمثلالمعقدR3



الشكل (3) تحليل HPLCالرامنوليبد المنتج من بكتيريا *P.aeruginosa* PS14



كما اختبرت الكفاءة التثبيطية لمنشطات السطوح الحيوية (الرامنوليبد) ضد بعض البكتيريا الممرضة خارج الجسم الحي.اظهرت النتائج ان لمنشطات السطوح الحيوية (الرامنوليبد) المنتجة من عزلتيّ بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*PP8 و *Pseudomonas aeruginosa*PS14لهما تأثيراتثبيطياً ضد بعضالعزلات البكتيرية الممرضة والمستعملة في هذه الدراسة بكونها ذا فعالية تثبيطيهمن خلال قياس قطر الهالة الشفافة الناتجة عن تثبيط النمو البكتيري كما مبين في الجدول (1)و قد اعطت افضل تأثيرتثبيطي ضد نمو العزلتان البكتيريتان *Bacillus cereus*و *Pseudomonas aeruginosa* تليهما *Staphylococcus aureus* وتليها *Escherichia coli* ،تتفق نتائج دراستنا

الشكل(4) تحليلHPLCالرامنوليبدالمنتجمنبكتيريا *P. aeruginosa*PP8

مع (Abalos*et al*., 2001; Haba et al., 2003; Benincasa*et al*., 2004; Swapnil*et al*., 2014)حيث ذكروا ان الرامنوليبد المنتج من*P.aeruginosa*ذا تأثير مثبط لنمو البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام وبدرجات متفاوتة ، وتختلف الفعالية التثبيطية حسب نوع البكتيريا ،في حين ذكرت مصادر اخرى (Kitamoto et al., 1993; Nitschke*et al*., 2010; Karkera*et al*., 2012; Lotfabad*et al*. 2013)أن الرامنوليبد المنتج من*P.aeruginosa* ذا تأثير مثبط لنمو البكتيريا الموجبة لصبغة غرام ،ولايمتلك فعالية تثبيطيه ضد البكتيريا السالبة لصبغة غرام ،اما(Yilmaz and Sidal, 2005)امتلاك الرامنوليبد لفعالية تثبيطيه ضد البكتيريا موجبة

لصبغة غرام اكثر فعلا مما لديه ضد البكتيريا السالبة لصبغة غرام .وقد اظهرت النتائج المبينة في الجدول (3)بان منشطات السطوح الحيوية (الرامنوليبد) المنتجة من العزلة البكتيريةPS14*P.aeruginosa* كانت الاكثر تثبيطا على جميع انواع البكتريا المستعملة حيث اظهرت البكتيريا حساسيةاعلى لها مقارنة بمنشطات السطوح الحيوية (الرامنوليبد) المنتجة من العزلة *P.aeruginosa*PP8 التي اظهرت فعلا تثبيطياً اقل تجاه البكتيريا المستعملة، والذي قد يعود الى اختلاف السلالة البكتيريةالمنتجة ، ومصدر الكربون المستخدم، حسب ما بينته بعض الدراسات (Lang and Wullbrandt, 1999; Al-Tahhan*et al*., 2000; Dézie*let al*., 2000; Lotfabad*et al*., 2013)وقد ذكر(Sotirova*et al*., 2009) ان الرامنوليبد في فعله التثبيطي تجاه العزلات البكتيريةالى كونه يهاجم جدار الخلية البكتيرية مباشرة،بحيث يفقد معقد(LPC) Lipopolysaccharride من جدار الخلية عند معاملتها مع الرامنوليبد بتركيز واطئ مما يسبب زيادة خاصية نفور الجزئيات المكونة لجدار الخلية للماء .وقد ذكر(Baron and Fingold, 1990) ان الرامنوليبديسبب تقليل نسبة LPCالمكون لجدار الخلية البكتيرية مما يغير في بروتينات الغشاء الخارجي للبكتيريا وهذه التغيرات تؤثر مباشرة في شكل جدار الخلية.

الجدول (3) معدل اقطار مناطق التثبيط(ملم) لنمو عدد من العزلات البكتيرية الممرضة بفعل منشطات السطوح الحيوية (الرامنولبيد) المنتج من *P. aeruginosa* PS14 و *P. aeruginosa* PP8

ت	العزلات البكتيرية	تركيز منشط السطح الحيوي المنتج من *p. aeruginosa* PS14 مليغرام \مل			تركيز منشط السطح الحيوي المنتج من *p. aeruginosa* PP8 مليغرام \مل		
		10	20	30	10	20	30
1	*B. cereus*	26	30	34	20	25	30
2	*S.aureus*	21	26	30	11	17	22
3	*P.aeruginosa*	25	30	33	23	27	30
4	*E. coli*	20	22	30	15	18	20

ايضاً تم تعيين التركيزالمثبط الأدنى(MIC) والذي هو اقل تركيز من المادةالمضادة Antibacterial agentالتي تثبط نمو المستعمرات البكتيرية باكثر حد ممكن و التركيز القاتل الادنى (MBC) الذي يحسب كاقل

تركيز من المادة المضادة التي تقلل عدد المستعمرات بمعدل % 99.9 من المزروع البكتيري الاصلي(Hamburger and Hostettmann, 1991)عن طريق مزج منشطات السطوح الحيوية بتراكيز المختلفة مع الوسط الزرعي السائل المزروع بمخفف العالق البكتيري وقد اظهرت النتائج زيادة الفعالية المضادة لمنشطات السطوح الحيوية بزيادة تركيزه،وأنقيمةMIC وقيمةMBC تتفاوت اعتماداًعلى تركيز تراكيب منشط السطح الحيوي ونوع السلالةالبكتريةالمنتجة له والمتأثرة به كماموضح في الجدول(4)وقد سجلت اقل قيمه للـ MIC لمنشط السطح الحيوي المنتج من بكتيرياPS14*P.aeruginosa*وهي 8 مايكرو غرام\مل وكانت على نمو بكتريا*B. cersus*بينما كانت اقل قيمه لمنشط السطح الحيوي المنتج من بكتيريا PP8*P. aeruginosa* هي32 مايكرو غرام\ملوكانت على نمو بكتريا *B. cersus* ايضاً.

جدول (4) التركيزالمثبط الادنى والتركيزالقاتل الادنى لمنشطات السطوح الحيوية (الرامنولبيد) المنتج من *P. aeruginosa* PS14 و PP8*P. aeruginosa* ضد بعض العزلات البكتيرية الممرضة قيد الدراسة

ت	العزلاتالبكتيرية	تركيز منشط السطح الحيوي المنتج من *p. aeruginosa* PS14مايكروغرام \مل		تركيز منشط السطح الحيوي المنتج من *p. aeruginosa* PP8مايكروغرام \مل	
		MIC	MBC	MIC	MBC
1	*B. cereus*	8	32	32	64
2	*S. aureus*	16	32	128	256
3	*P. aeruginosa*	128	256	256	256
4	*E. coli*	64	256	128	128

المصادر

جمعة، ناظم حسن حيدر (2007). معالجة الملوثات النفطية بعزلات محلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المنتجة للمستحلبات الحياتية.اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم،جامعة بغداد.

Abalos, A.; Pinazo,; Infante,A. M.R.; Casals, M.; Garcia, F. and Manresa, A. (2001).Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. Langmuir, 17.1367–1371.

Abbasi,H.; Hamedi, M.M.; Lotfabad, T.B.; Zahiri, H.S.; Sharafi, H. ; Masoomi, F.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Ortiz, A.; Amanlou, M. and Noghabi, K.A. (2012) Biosurfactantproducing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. J. Biosci. Bioeng., 113: 211–219.

Al-Tahhan, R.A.; Sandrin, T.R.; Bodour, A.A.and Maier. R.M.(2000).RhamnolipidUinduced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl. Environ. Microbiol., 66, 3262–3268.

Banat, I.M.; Makkar, R.S. and Cameotra, S.S.(2000). Potential commercial applications of microbial surfactants.Applied Microbiology and Biotechnology, 53: 495–508.

Banat, I.M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.;Bestetti, G.; Martinotti, M.G.;Fracchia, L.;Thomas, S. and Marchant R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. ApplMicrobiolBiotechnol., 87:427–444.

Baron, E.T. and Fingold, S.M. (1990). Bailey and Scotts

A.W. and Stainer, R.Y.(1974). Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1246 p.

Cameotra, S.S.andMakkar R.S. (2004). Recent applications ofbiosurfactants as biological and immunological molecules, Current Opinion in Microbiology, 7: 262-266

Collee, J.G. ;Fraser, A.G.; Marmion B.P. and Simmons, A.(1996). " Mackie and McCartney practical medical microbiology . 14th ed. Churchill living stone, New York, pp.413-423.

Déziel, E.; Lépine, F.; Milot, S. and Villemur, R.(2000).Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. Biochimica et BiophysicaActa (BBA) - Mol Cell Biol Lipids, 1485(2-3):145-52.

Folch, J.; Lees, M. and Stanley, GHS. (1957) A simple method for the DiagnosticMicrobiology. 8th.ed. C.V. Mosby London

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J ClinPathol., 45(4):493-496.

Benincasa, M.; Contiero, J.; Manresa, M.A.; and Moreaes I.O.(2002). Rhampolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. J Food Eng., 54:283–288

Benincasa, M.; Abalos, A.; Oliveira, I.; Manresa, A.(2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. Antonie Van Leeuwenhoek, 85:1–8.

Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E.; Cowan, S.T.; Holt, T.G.; Liston, J.; Murry, R.G.;Niven, C.F.; Ravin,

Jawetz, M. A. ; Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2010). Medical microbiology. 25th ed., Lang medical, McGraw-Hill, USA.

Karanth, N. G.; Deo, P.G. and Veenandig, N.K. (1990). Microbial production of biosurfactant and their importance. Pesticide residue Abatment Lab, food protectants and infestation control department.

Karkera, K.; Pendse, A., and Aruna, K. (2012) Studies of Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* R2 isolated from oil contaminated soil sample. Appl. . Asian Journal of Bio Science, 7(2):123-129.

Kitamoto, D.; Yanagishita, H.; Shinbo, T.; Nakane, T.; Kamisawa, C.and Nakahara, T.(1993). Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by Candida antarctica. J Biotechnol., 29(1-2):91-6.

isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 226:497–509.

Forbes , B.A.; Saham, D.F. and Weissfeld, A.S.(2002). Baily and Scott's : Diagnostic Microbiology (11th edition) . Mosby, Inc. Baltimore, USA.P:384-398.

Gautam, K.K. and Tyagi, U.K. (2005). Microbial surfactants. A review. J. Oleo Sci., 55(4): 155-166.

Haba, E.; Pinazo, A.; Jauregui, O.; Espuny, M.J.; Infante, M. R., and Manresa, A. (2003).Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40 044, Biotechnology and Bioengineering, 81:316- 322.

Hamburger, H. and Hostettmann, K. (1991). The link between phytochemistry and Medicine. Phytochemistry, 30: 3864-3874.

Trends Food Sci. Technol., 18:252–259.

Nitschke, M.; Costa, S.G.; Contiero, J.(2010) Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. Appl. Biochem. Biotechnol., 160: 2066–2074.

Petrikov, K.; Delegan, Ya.; Surin, A.; Ponamoreva, O.; Puntus, I.; Filonov, A. and Boronin, A.(2013). Glycolipids of Pseudomonas and Rhodococcus oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure. Process Biochemistry, 48:931–935

Sha, R.; Jiang,L.; Meng, Q.; Zhang, G. and Song, Z.(2011). Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. Journal of Basic Microbiology, 51 ,1-9.

Salleh, S. M.; Md Noh, N. A. and Yahya, A.R.M.(2011). Comparative study: Different recovery techniques of rhamnolipidbproduced by

Lang, S.andWullbrandt, D. (1999). Rhamnose lipids--biosynthesis, microbial production and application potential. ApplMicrobiolBiotechnol. 51(1):22-32.

Lotfabad, T. B.; Shahcheraghi, F. and Shooraj, F. (2013). Assessment of Antibacterial Capability of Rhamnolipids Produced by Two Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* Strains. Jundishapur J Microbiol., 6(1): 29-35.

Marchant, R. and Banat, I. M..(2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnology. 30(11):558-565.

Muthusamy, K.; Gopalakrishnan, S.;Ravi, T.K. and Sivachidambaram P..(2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Current science., 94(6): 736-747.

Nitschke, M. and Coasta S.G.(2007). Biosurfactants in food industry.

http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html

Van Hamme, J.D.; Singh, A. and Ward, O.P.(2006).Physiological aspects: Part1 ina series of papers devoted to surfactants in microbiology andbiotechnology, Review Article Biotechnology Adv., 24: 604-620.

Woods, GL. and Washington, JA. (1995). Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press, p. 1327−41.

Yilmaz, ES. and Sidal, U.(2005).Investigation of antimicrobial effects of a *Pseudomonas*-originated biosurfactant. Biologia–Bratislava,60:723-731.

Pseudomonas aeruginosa USMAR-2. IPCBEE, vol.18

Swapnil, P.; Anuradha, P. and Aruna K. (2014) .Studies on optimization of biosurfactant production by *Pseudomonasmaeruginosa* F23 isolated from oil contaminated soil sample.Int.J.Curr.Biotechnol., , 2(4):20-30.

Sotirova, A.; Spasova, D.; Vasileva-Tonkova, E.; Galabova, D. (2009).Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Res., 164, 297–303.

Todar ,K. (2004). Textbook of Bacteriology.University of Wisconsin Madison- department for microbiology. Toder'sonline.available on:

Study of inhibitory activity for rhamnolipid produced by *Pseudomonasaeruginosa* against some types of pathogenic bacteria in *vitro*

Nada Sabah Rezoki Maha Hani Tawfeeq

Biology department/ College of science for women

University of Baghdad

Abstract

49 isolates for *Pseudomonas spp.* Bacteria from different sources: pathological (clinically diseased cases) and non-pathological (from contaminated and non-contaminated soil. 21isolates was diagnosed as *P. aeruginosa*. Then 2 bacterial isolates was selected (*P. aeruginosa* PP8 and *P. aeruginosa* PS14) for rhamnolipidproduction, first one was from pathological isolates and second was from soil isolates. The rhamnolipid was identified by Thin-layer Chromatography (TLC) and show that the two bacterial isolates produced 3 types of rhamnolipids (mono-, di-rhamnolipid and rhamnolipid A). As well as they diagnosed by High-performance Liquid Chromatography (HPLC). The efficiency of rhamnolipid was tested for bacterial inhibitory activity by measuring the diameter of inhibition zone and its bacterial inhibitory activity was high against *Bacillus cersus* and *P. aeruginosa* followed by *Staphylococcus aeraus*than *E. coli* respectively. This study also determine the values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for biosurfactants and the results was varied depending on the different type of biosurfactant and type of bacteria with lowest values of MIC and MBC for biosurfactant produced by *P. aeruginosa* PS42 on the growth of *B. cereus* bacteria that reached 16 microgram/ml.