



دراسة تأثير بكتريوسين من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* الحياتية ضد بكتريا الإسهال

[http://dx.doi.org/10.28936/jmraepc11.1.2019.\(6\)](http://dx.doi.org/10.28936/jmraepc11.1.2019.(6))

عزيز¹ جيهان عبد الستار² عمر عبد الحسين^{3*}

¹ استاذ دكتور، قسم العلوم/كلية التربية الأساسية/الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق، ragaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

² استاذ دكتور، قسم علوم الحياة/كلية العلوم/الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق، Dr.jehan@uomustansiriyah.edu.iq

³ ماجستير، قسم العلوم/كلية التربية الأساسية/الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق، xxxxxxx@yahoo.com

تاريخ قبول النشر: 2019/4/14

تاريخ استلام البحث: 2019/3/12

جمع عينات من الحليب البقري الخام وذلك لعزل بكتريا *Leuconostoc* وزرعت العينات على *De-Man Rogosa Sharpe-Vancomycin* وتم انتقاء المستعمرات النامية النقية وأخضعت للفحوص الزرعية والمجهرية وعلى وفق ذلك تم الحصول على 25 عزلة بكتيرية، وأخضعت العزلات صات الكيمائية حيوية وبينت نتائج تلك الفحوصات الحصول على 12 *Leuconostoc* 25 عزلة بكتيرية، وأستعمل التشخيص بنظام Vitek 2 خطوة تكميلية ولوحظ من خلال نتائج التشخيص الحصول على 9 *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* زلتين تعود لتحت النوع *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* ومن جهة أخرى جمعت 15 عزلة بكتيرية مسببة للإسهال وأخضعت للفحوصات الزرعية والمجهرية والكيمائية الحيوية Vitek 2 لتشخيص تلك العزلات، وبينت نتائج التشخيص أن بكتريا *Escherichia coli* 9 عزلة، في حين كانت 3 عزلات تابعة لبكتريا *Shigella group* وعزلتان تابعة لبكتريا *Salmonella ser. paratyphi A* وعزلة واحدة لبكتريا *Vibrio cholerae* والعزلات المنتخبة لفحص الحساسية تجاه احد عشر حيوي وبينت النتائج أن جميع العزلات مقاومة لمضاد *Imipeneme* أجريت غريلة لعزلات بكتريا *L. mesenteroides ssp. cremoris* *Ampicillin* باستعمال طريقة الانتشار في الحفر من أجل انتخاب الع في إنتاج البكتريوسين، وقد أظهرت النتائج أن العزلة *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) تثبيط تجاه بكتريا *Vibrio cholerae* *Salmonella ser. paratyphi A* *Shigella group* *E. coli* 12 12 12 13 ملم على التوالي فيما يتعلق بالعزلة *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) الذي كانت فيه مناطق التثبيط 11 12 12 13 ملم على التوالي فيما يخص العزلة *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) درس التأثير التآزري بين البكتريوسين للعزلتين *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) مع المضادات الحيوية تجاه العزلات البكتيرية المسببة للإسهال *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) المقاومة المتعددة، ولوحظ وجود تأثير بين البكتريوسين المنتج من العزلتين أعلاه والمضادات الحيوية، فعالية بعض المضادات الحيوية بوجود البكتريوسين مثل مضادات *Trimethoprim-Tetracycline* *Cefixime* تجاه بكتريا *Ampicillin sulfamethoxazole* *E. coli* *Trimethoprim-Cefixime* *Shigella group* *Cefotaxime* *Ceftriaxone sulfamethoxazole* *Trimethoprim-Cefixime* *Salmonella ser. paratyphi A* *sulfamethoxazole* *Trimethoprim-Cefixime* *Salmonella ser. paratyphi A* *sulfamethoxazole* *Vibrio cholerae* *Ampicillin sulfamethoxazole* الكلمات المفتاحية: بكتريوسين، التأثير التآزري، الإسهال، المضادات الحياتية، البكتريا المرضية.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث.



STUDY OF THE SYNERGISTIC EFFECT OF BACTERIOCIN PRODUCED FROM *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* With Antibiotics Against Multi Resistance Diarrheal Bacteria

Raghad A. Aziz¹, Jehan Abdul Sattar Salman², Omar A. H. Hachim³

¹Prof. PhD. Department of Science, College of Basic Education, Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq. ragaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

²Department of Biology, College of Science, Mustansiriyah University, Baghdad-Iraq. Dr.jehan@uomustansiriyah.edu.iq

³Department of Science, College of Basic Education, Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq. xxxxxxx@yahoo.com

ABSTRACT

The study included the collection of samples of raw cow milk to isolate *Leuconostoc* bacteria, samples were sub cultured on De-Man Rogosa Sharpe-Vancomycin medium, the pure colonies were selected and subjected to the cultural and microscopically tests, according to that 25 cocci bacterial isolates were obtained, then isolates were subjected to biochemical tests. Result of tests showed that 12 isolates belong to the genus *Leuconostoc* out of 25 cocci bacterial isolates, Vitek2 system was used as a supplementary step. Results of final identification showed that 3 sub species were obtained included *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* 9 out of 12 isolates, while it was 2 isolates of *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* and one isolate *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum*. The study included the collection of 15 isolate of diarrhea causative bacteria which subjected to cultural and microscopically, biochemical tests and Vitek 2 system, about the results of identification, 9 isolates out of 15 isolates belonged to *Escherichia coli*, 3 isolates of *Shigella* group, 2 isolates of *Salmonella ser. paratyphi A* and one isolate of *Vibrio cholerae*, the selected isolates were tested to Antibiotic sensitivity test against 11 antibiotics, the results showed that all isolates were resistant to Ampicillin and sensitive to Imipeneme. Screening of *L. mesenteroides ssp. cremoris* isolates was done to select the more efficient isolate producing bacteriocin by using well diffusion method, the result showed that *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) and *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) isolates gave the highest inhibition against *E. coli*, *Shigella* group, *Salmonella ser. paratyphi A* and *Vibrio cholerae*, the diameters were 13, 12, 12 and 12 mm respectively for the *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) isolate, while the *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) isolate diameters were 13, 12, 12 and 11mm respectively. The synergistic effect between bacteriocin of both isolates *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) and *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) with antibiotics was studied against multidrug resistant diarrhea causative bacteria. Synergistic effect between bacteriocin of both isolates with antibiotics was observed. The activity of antibiotics with bacteriocin was increased, like Cefixime, Tetracycline, Trimethoprim-sulfamethoxazole, Ampicillin antibiotics against *E. coli*, and Cefotaxime, Ceftriaxone, Trimethoprim-sulfamethoxazole, Cefixime antibiotics against *Shigella* group, and Trimethoprim-sulfamethoxazole antibiotic against *Salmonella ser. paratyphi A* and Ampicillin, Trimethoprim-sulfamethoxazole, Cefixime antibiotics against *Vibrio cholerae*.

Key words: Bacteriocin, Synergistic effect, Diarrhea, Antibiotics, Pathogenic bacteria.

INTRODUCTION

تكون البكتيريوسينات عبارة عن مواد مثبطة بروتينية خارج خلوية تنتج من قبل بكتيريا حامض اللاكتيك ومن ضمنها بكتيريا *Leuconostoc* ولها تأثير فعال مثبط أو قاتل للعديد من الكائنات المقربة لها و ضد مسببات الأمراض



المنقولة بالأغذية من خلال تثبيط بناء بروتينات الغشاء البلازمي وتثبيط الأحماض النووية للخلايا (Patel et al., 2015)، وفي الوقت الحاضر أصبح المصطلح أكثر اتساعاً ليشتمل على مواد مشابهة تعمل على مدى واسع من الأجناس ولديها جزيئات وظيفية أخرى مثل الكربوهيدرات والدهون، ويمكن إنتاج البكتريوسين من أنواع مختلفة من الكائنات الحية سواء أكانت حقيقية النواة أم بدائية النواة، وتتميز تلك المواد باحتوائها على جزيئات تعمل على النظام الدفاعي للعديد من الكائنات الحية مثل البكتيريا والفطريات والطفيليات والفيروسات (Bali et al., 2016)، وأصبحت هذه المكونات مهمة للغاية بسبب الزيادة في مقاومة الأحياء المجهرية للمضادات الحيوية المعتادة، إلا أنها من الجانب الآخر تتأثر بشكل عال بالظروف الفيزيوكيميائية، إذ تعزز الظروف المثالية لاسيما درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وتركيز مصادر الكربون والنتروجين القدرة الإنتاجية لها (Patel et al., 2015)، ويتميز البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا حامض اللاكتيك بكونه آمن صحياً ويمكن استعماله في مجال الصناعات الغذائية بوصفه مواد حافظة حيوية (Benmechernene et al., 2013).

توصف خلايا بكتريا *Leuconostoc* بكونها موجبة لصبغة غرام، صغيرة، منتظمة، مكورة بيضوية الشكل تظهر بشكل أزواج أو سلاسل قصيرة، غير متحركة وغير مكونة للسبورات، محبة للبرودة والحامضية، ودرجة الحرارة المثلى لنموها تتراوح بين 14 إلى 30م، فضلاً عن قابليتها على النمو في درجة حرارة أقل من 4م وهي صفة محددة لسلاسل *L. carnosum* و *L. gasicomitatum* و *L. inhae*، ومن خصائصها الأخرى هي المقاومة لمضاد Vancomycin ومقاومة النقص في L-arginine dihydrolase وأنشطة الكاتاليز، إلا أنها حساسة لمضادات Clindamycin و Erythromycin، كما وتتميز في قدرتها على إنتاج الديكستران من السكروز (Holzapfel et al., 2009)، وقد أظهر جنس *Leuconostoc* قدرته على النمو في وجود أملاح الصفراء لمدة 3 ساعات، ومقاومة لمضاد Imipenem، كما وجد أن بكتريا *L. mesenteroides* المعزولة من الحليب تمتلك القابلية على تثبيط نمو السلالات المرضية من بكتريا *Listeria spp.* بسبب فعاليتها التثبيطية العالية تجاه هذه البكتريا التي تعد إحدى الملوثات المرضية في الأغذية، فضلاً عن قدرتها في التأثير على مسببات المرضية الأخرى مثل *S. aureus* التي تتواجد في الأغذية بسبب إنتاجها نوعاً من البكتريوسينات المثبطة تسمى leucocin وهذا يمكن تلك المواد من استعمالها بشكل فعال في حفظ الأغذية (Benmechernene et al., 2013).

يعرف الإسهال بأنه زيادة في السيولة أو انخفاض اتساق البراز، وترتبط عادة مع زيادة في وتيرة البراز والوزن وهو أحد الأسباب المرضية الرئيسية بين الأطفال في البلدان النامية، ويعد السبب الرئيسي الثاني لوفيات الأطفال في جميع أنحاء العالم، إذ كان مسؤولاً عن 0.8 مليون حالة وفاة للأطفال الذين تقل أعمارهم عن خمس سنوات، وهو ما يمثل 10.5% من مجموع الوفيات ضمن هذه الفئة العمرية (Liu et al., 2012)، إذ تكون أعراض الإسهال على شكل إصابة معدية معوية سببها مدى واسع من الممرضات، وتتضمن البكتريا والفيروسات والطفيليات، وهناك عدد من الكائنات الحية تكون السبب لمعظم الحالات الحادة لإسهال الأطفال مثل Adeno virus و Rota virus، إذ تكون السبب المؤدي إلى الإسهال الحاد في العالم، وهو السبب في 40% من حالات دخول الأطفال إلى المستشفيات بسبب الإسهال تحت سن الخامسة، والجزء الأكبر يتضمن البكتريا المرضية مثل *Clostridium* و *V. cholera* و *Salmonella* و *Campylobacter* و *Shigella* و *E. Coli* (De Vrese & Marteau, 2007)، ويتعرض الأطفال في البلدان النامية إلى مجموعة من الكائنات الحية المسببة للإسهال، وقد بينت الدراسات وجود علاقة معقدة بين بكتريا القناة الهضمية ومرض الإسهال، وإن الأطفال الذين يعانون من مرض شديد تميل البكتريا إلى أن تكون أقل تنوعاً وغلبة لأجناس معينة من الكائنات الحية التجارب السريرية عن دور بعض بكتريا *Lactobacillus spp.* في علاج الإسهال المعدي، وحددت أن هذه الكائنات يمكن أن توفر فائدة في علاج حالات الإسهال المائي الحادة والمعدية في الأطفال الرضع والصغار (Fung et al., 2011)، لذا فقد هدف البحث إلى دراسة تأثير بكتريوسين من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* عليه من دراسة سابقة مع المضادات الحيوية بكتريا لإسهال

:Materials and methods

عزل البكتريا Isolation of bacteria

تم تلقيح كل عينة من عينات الحليب البقري الخام في وسط MRS أسائل بنسبة 1% وحضنت بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة في ظروف لاهوائية وباستعمال الحاوية اللاهوائية، ثم أجريت سلسلة من التخفيف العشرية للعينات المزروعة باستعمال المحلول الملحي الفسلجي، وقد تم نشر 0.1 مللتر من التخفيف الرابع على سطح وسط MRS Vancomycin الصلب، ثم حضنت بعدها بدرجة حرارة 30م لمدة 24-48 ساعة تحت ظروف لاهوائية، ثم نقلت المستعمرات المعزولة على وسط MRS الصلب لتتقنتها بطريقة التخطيط، وحضنت لاهوائياً في درجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة، ثم نقلت المستعمرات المفردة النامية إلى وسط MRS السائل وحضنت في الظروف نفسها وفقاً لما أشار إليه Benmechernene et al. (2013).

جمع العزلات البكتريا المسببة للإسهال Collection of isolates of bacteria causing diarrhea



جمعت 15 عزلة من حالات الإسهال للأطفال دون سن الخامسة من مستشفى الكاظمية التعليمي ومستشفى الطفل المركزي، وزرعت على الأوساط الزرع الانتقائية المكوني الصلب والايوسين مثيلين الأزرق والسالمونيلا-الشيكيلا الصلب.

الفحوصات الكيموحيوية Biochemical test

تم استعمال الفحوصات الكيموحيوية حسب طريقة (2009) Goldman & Lorrence والفحص بنظام Vitek 2 كخطوة تأكيدية.

عن قابلية عزلات بكتريا *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* البكتريوسين

Detection of *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* in the production of bacteriocin

تحضير الراشح Preparation of filtrate

حضر الراشح للمزارع السائلة بتسمية عزلات بكتريا *L. mesenteroides ssp. cremoris* على انفراد في أنابيب اختبار حاوية على وسط MRS السائل ونسبة لقاح 2% (10×9 خلية/مل)، حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة وتحت ظروف لاهوائية، ثم نبذت مركزيا بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة للحصول على راشح الخلايا الحرة للمزرع، تم تعديل الرقم الهيدروجيني للراشح إلى 6.2 مولار باستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH وذلك لإلغاء تأثير الحوامض العضوية في الراشح وفقا لم بينه (1996) Gupta.

تركيز الراشح Concentration of filtrate

ركزت رواشح العزلتين المنتخبتين (*L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) و *L. mesenteroides ssp.* (*Lc4*) باستعمال Polyethylene glycol 20000، واستعملت طريقة الانتشار في الحفر وفقا لما وصفه (1996) Gupta للكشف عن الفعالية التثبيطية للرواشح المركزة، وقورنت تلك الفعالية مع الفعالية التثبيطية للرواشح قبل التركيز.

الكشف عن الفعالية التثبيطية Detection of inhibitory activity

استعملت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion للكشف عن الفعالية التثبيطية لرواشح العزلات قيد الدراسة كما وصفها (2009) Gupta.

التأثير التآزري Synergistic effect

اتبعت الطريقة الواردة عن (2010) Roy et al. مع التحوير وذلك بغمر المضادات الحيوية Ampicillin و Cefixime و Cefotaxime و Ceftriaxone و Tetracycline و Trimethoprim-sulfamethoxazole في محلول البكتريوسين لدراسة التأثير التآزري للبكتريوسين المنتج من العزلتين (*L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) و *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) مع المضادات الحيوية ضد بكتريا الاسهال ذات المقاومة المتعددة.

:Results and discussion

عزل بكتريا *Leuconostoc spp.* وتشخيصها Isolation & identification of *Leuconostoc spp.*

جمعت عينات من الحليب البقري الخام لعزل بكتريا *Leuconostoc spp.* منها، زرعت العينات على وسط MRS-Vancomycin، تم انتقاء المستعمرات النامية النقية وأخضعت للفحوص الزرع والمجهرية وعلى وفق ذلك تم الحصول على 25 عزلة بكتيرية مكورة، أخضعت العزلات إلى الفحوص الكيموحيوية الخاصة بجنس بكتريا *Leuconostoc* وبينت نتائج تلك الفحوصات الحصول على 12 عزلات تعود لجنس *Leuconostoc* من مجموع 25 عزلة بكتيرية مكورة حيث كانت العزلات جميعها سالبة لفحص الكاتاليز والاكسيديز وإنتاج الامونيا من الارجنين، ولها القدرة على النمو بدرجة حرارة 10م وجميعها منتجة لثاني اوكسيد الكربون CO₂ من تخمر الكلوكوز وقادرة على النمو بدرجة حرارة 45م، وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره (2015) Abbas من أن معظم عزلات بكتريا *Leuconostoc spp.* التي تم عزلها من الحليب الخام شخضت على أنها *L. mesenteroides ssp. cremoris*، في حين ذكر Benmechene et al. (2013) إمكانية عزل بكتريا *Leuconostoc spp.* من حليب الجمل الخام، ولاحظ (2012) Bao et al. أن 40% من بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من منتجات الحليب الخام تعود لجنس *Leuconostoc spp.*

تشخيص عزلات البكتريا المسبب للإسهال Identification of bacterial isolates causing diarrhea

أخضعت 15 عزلة بكتيرية مسببة للإسهال للفحوصات عند تنميتها على الأوساط الزرع الاختيارية والتفريقية، إذ ظهرت مستعمرات بكتريا *E. coli* على وسط المكوني الصلب صغيرة الحجم ذات لون وردي لامع وذلك لقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط، وتميزت مستعمرات *Salmonella spp.* بكونها شاحبة عديمة اللون على وسط المكوني وذلك لعدم تخميرها لسكر اللاكتوز، ولكنها تكون ذات لون اصفر تحوي نقطة سوداء في المركز على وسط السالمونيلا-شيكيلا الصلب بسبب قدرتها على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H₂S، أما مستعمرات *Shigella spp.* فكانت شاحبة صفراء اللون على وسط المكوني لكونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز، وتكون صفراء وعدم احتوائها على نقطة



سوداء في المركز على وسط السالمونيلا-شيكبلا الصلب بسبب عدم قدرتها على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين، وكانت مستعمرات *Vibrio spp.* عديمة اللون على وسط المكوني لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز، وتكون المستعمرات على وسط TCBS الأخضر بلون أصفر لامع وذلك بسبب قدرتها على تخمير السكر في الوسط (Mercy et al., 2014).

أشارت نتائج الفحوصات أن جميع عزلات *E. coli* موجبة لفحص الاندول و لفحص الأحمر مثيل موجبة لإنتاج الكاتاليز كانت النتيجة سالبة عند تنمية البكتريا على وسط MR-VP والاكسيديز، كانت بكتريا *Shigella spp.* موجبة لفحص الأحمر مثيل ولفحص الاندول واختبار الكاتاليز والاكسيديز، وسالبة لفحص السترات واختبار فوكس بروسكاور، في حين كانت بكتريا *Salmonella spp.* موجبة لفحص الأحمر مثيل والكاتاليز ولفحص استهلاك السترات، لكن البكتريا كانت سالبة لفحص الاوكسيديز وفحص الاندول، واختبار فوكس بروسكاور، أما بكتريا *Vibrio cholerae* فقد كانت موجبة لفحص الاوكسيديز والكاتاليز، وفحص استهلاك السترات، ولفحص فوكس بروسكاور والاندول، لكنها سالبة لفحص الأحمر مثيل (Oyedjeji et al., 2013)، وبينت نتائج فحص Vitek 2 الحصول على 9 عزلات تعود للنوع *E. coli* من مجموع 15 عزلة أي بنسبة 60% أما بكتريا *Shigella group* بلغ عدد عزلاتها 3 عزلات أي بنسبة 20% فيما تم الحصول على عزلتين تعود للنوع *Salmonella ser. paratyphi A* أي بنسبة 13.3% وعزلة واحدة تعود للنوع *Vibrio cholera* أي بنسبة 6.66%.

توصل (Al-Misri (2002) إلى أن نسبة عزل بكتريا *E. coli* بلغت 39.6%، وذكر (Al-Khaki (2007) في الدراسة التي أجراها على بكتريا *E. coli* المعزولة من الأطفال المصابين بالإسهال من بعض مستشفيات بغداد أنها بلغت 64.3%، وأشار (Ibrahim (2010) إلى أن نسبة عزلات *E. coli* كانت 40.25%، وبين (Abdul Jabek (2010) أنها كانت بنسبة 36%، وذكر (Attia (2013) أن نسبة عزلات *Shigella group* بلغت 18.18%.

(1): فعالية المواد المثبطة المنتجة من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* خلال مراحل

التنقية.

قطر منطقة التثبيط ()

عزلات البكتريا المرضية			
(Lc4)	(Lc3)	(Lc4)	(Lc3)
11	12	10	10
16	13	13	11
16	18	12	12
17	18	11	11
16	19	12	13
12	12	10	11
15	18	13	12
16	19	12	12
14	14	11	11
17	14	12	10
18	18	11	12
16	14	12	11
15	15	12	12
16	14	12	11
20	25	11	12

Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris :Lc

أشار (Kwon et al. (2002) إلى أن بكتريوسينات الصنف الثاني قادرة على تثبيط البكتريا السالبة لصبغة غرام منها *Shigella sp.* و *Salmonella sp.* و *Pseudomonas sp.* و *Shigella flexneri*، ولاحظ (Xiraphi et al. (2006) زيادة في الفعالية التثبيطية أثناء عملية تنقية البكتريوسين وذلك لوجود المواد المثبطة في المراحل المبكرة من التنقية، وذكر (Maurya & Thakur (2012) أن البكتريوسين المنتج من بكتريا *Leuconostoc* تثبط العديد من الممرضات والبكتريا المسببة لتلف الأغذية، إذ كان التأثير التثبيطي تجاه بكتريا *S. aureus* المقاومة للـ Methicillin و *Salmonella typhi* و *Klebsiella pneumonia*.

التأثير التآزري للبكتريوسين المنقى مع المضادات الحيوية

Synergistic effect of purified bacteriocin with antibiotics



لوحظ التأثير التآزري للبكتريوسين المنقى والمنتج من العزلة *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) مع المضادات الحيوية ضد العزلات البكتيرية المسببة للإسهال ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي أظهرت مقاومة تجاه المضادات الحيوية لدى استعمالها وحدها فيما لوحظ زيادة الفعالية التثبيطية للمضادات الحيوية عند خلطها مع البكتريوسين (الشكل، 1)، إذ أصبحت عزلات بكتريا (*E. coli* (E2) (E4) (E6) (E7) حساسة لمضادات Tetracycline و Cefixime، فيما أصبحت عزلات بكتريا (*Shigella group* (Sh2) (Sh3) حساسة لكل من Cefixime و Trimethoprim-sulfamethoxazole و Cefotaxime و Ceftriaxone، فيما زادت فعالية مضاد Trimethoprim-sulfamethoxazole تجاه بكتريا *S. ser. paratyphi A* (Sa2) و *V. cholerae* (V1) حساسة لمضاد Cefixime و Trimethoprim-sulfamethoxazole بعد أن كانت مقاومة لها (الجدول، 2).

كما لوحظ التأثير التآزري للبكتريوسين المنقى والمنتج من العزلة *L. mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) مع المضادات الحيوية ضد العزلات البكتيرية المرضية التي أظهرت مقاومة تجاه المضادات الحيوية وحدها، إذ أن عزلات بكتريا (*E. coli* (E2)(E4)(E6)(E7) أصبحت حساسة للمضادات Tetracycline و Cefixime (الشكل، 2)، وأصبحت بكتريا (*Shigella group* (Sh2)(Sh3) حساسة لمضاد Ceftriaxone و Tetracycline و Trimethoprim-sulfamethoxazole و Cefixime (الشكل، 3)، وأصبحت بكتريا *Salmonella ser. paratyphi A* (Sa2) حساسة لمضاد Trimethoprim-sulfamethoxazole، فيما أصبحت بكتريا *V. cholerae* (V1) حساسة لمضادات Trimethoprim-sulfamethoxazole و Cefixime (الجدول، 2 و 3).

أشارت الدراسات السابقة إلى أن الجرعة العالية من Imipenem وحدها أو بشكل متحد مع بكتريوسين Colistin تكون فعالة ضد بكتريا *E. coli* المتعددة المقاومة (Lin et al., 2010)، كما لوحظ عند مزج بكتريوسين Colistin مع بكتريوسين Niacin A أو Pediocin PA-1/AcH أن هناك تأثير تآزري ناتج من مزج مضادين للميكروبات وإمكانية تثبيط بكتريا EHEC O157:H7، كما وجد أن هناك تأثير تآزري عند خلط Pediocin أو Niacin مع Polymyxin E ضد العزلات البكتيرية، إذ إن الخليط المكون من Niacin و Pediocin ثبت نمو بكتريا *E. coli* المقاومة للـ Polymyxin، إلا أن الخليط المكون من Niacin و Pediocin كان فعالا ضد بكتريا *Listeria monocytogenes* (Naghmouchi et al., 2013).

(2) التأثير التآزري للبكتريوسين المنتج من العزلة *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) مع المضادات الحيوية ضد البكتريا ذات المقاومة المتعددة.

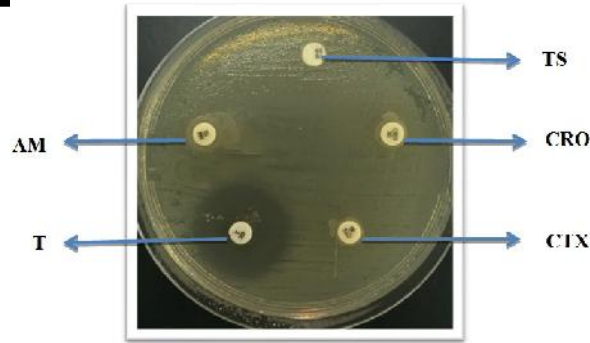
T+B	T	TS+B	TS	AM+B	AM	CFM+B	CFM	CRO+B	CRO	CTX+B	CTX	البكتريا المرضية
R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> (E2)
S	R	-	-	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> (E4)
R	R	-	-	R	R	S	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> (E6)
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> (E7)
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>Shigella group</i> (Sh2)
-	-	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	<i>Shigella group</i> (Sh3)
R	R	S	R	R	R	-	-	R	R	R	R	<i>Salmonella ser. paratyphi A</i> (Sa2)
-	-	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	<i>Vibrio cholerae</i> (V1)

AM (Ampicillin) :CFM (Cefixime) :CTX (Cefotaxime) :CRO (Ceftriaxone) :T (Tetracycline) :TS (Trimethoprim-) :R (sulfamethoxazole) :S :B (البكتريوسين - لم تختبر لحساسيتها للمضاد).

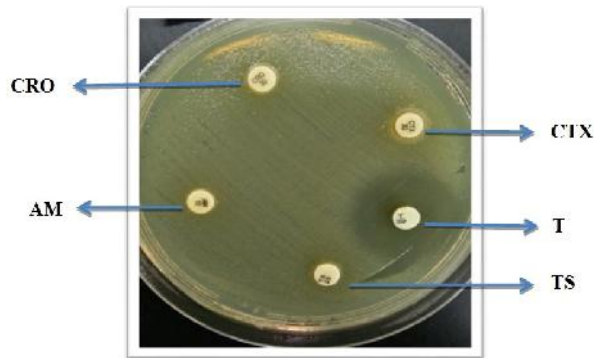
(3) التأثير التآزري للبكتريوسين المنتج من العزلة *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) مع المضادات الحيوية ضد البكتريا ذات المقاومة المتعددة.

T+B	T	TS+B	TS	AM+B	AM	CFM+B	CFM	CRO+B	CRO	CTX+B	CTX	البكتريا المرضية
R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> (E2)
S	R	-	-	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> (E4)
R	R	-	-	R	R	S	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> (E6)
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>E. coli</i> (E7)
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>Shigella group</i> (Sh2)
-	-	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	<i>Shigella group</i> (Sh3)
R	R	S	R	R	R	-	-	R	R	R	R	<i>Salmonella ser. paratyphi A</i> (Sa2)
-	-	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	<i>Vibrio cholerae</i> (V1)

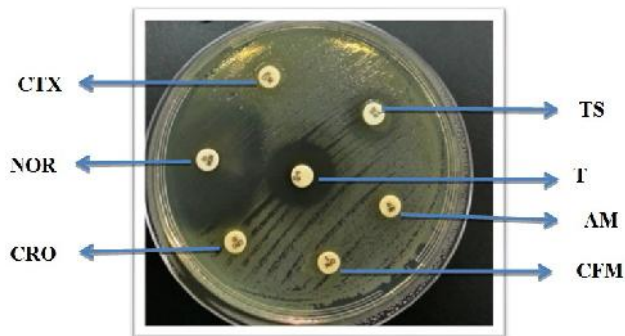
AM (Ampicillin) :CFM (Cefixime) :CTX (Cefotaxime) :CRO (Ceftriaxone) :T (Tetracycline) :TS (Trimethoprim-) :R (sulfamethoxazole) :S :B (البكتريوسين - لم تختبر لحساسيتها للمضاد).



(1): التأثير التآزري التنبيطي للمضادات الحيوية مع البكتريوسين المنتج من العزلة *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* (Lc3) ضد بكتريا *E. coli*.
AM (Ampicillin) :CTX (Ceftriaxone) :CRO (Cefotaxime) :T (Tetracycline) :TS (Trimethoprim-sulfamethoxazole).



(2): التأثير التآزري التنبيطي للمضادات الحيوية مع البكتريوسين المنتج من العزلة *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) ضد بكتريا *E. coli*.
AM (Ampicillin) :CTX (Ceftriaxone) :CRO (Cefotaxime) :T (Tetracycline) :TS (Trimethoprim-sulfamethoxazole).



(3): التأثير التآزري التنبيطي للمضادات الحيوية مع البكتريوسين المنتج من العزلة *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* (Lc4) ضد بكتريا *Shigella group*.
AM (Ampicillin) :CFM (Cefixime) :CRO (Cefotaxime) :CTX (Ceftriaxone) :T (Tetracycline) :TS (Trimethoprim-sulfamethoxazole) :Nor (Norfloxacin).

:Conclusions



وجود تأثير تآزري ما بين المضادات الحيوية والبكتريوسين المنتج من العزلة *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* تجاه البكتريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية والمسببة للاسهال.

:References

- I. Abbas, A. Y. (2015). *Effect of Biosurfactant Produced by Locally Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris in Pathogenic Bacteria Isolated from Catheters and Urinary Tract Infections*. MSc. Thesis. Mustansiriyah University. Iraq.
- II. Abdul Jabek, S. I. (2010). *Study of Some Virulence Factors of Escherichia coli, A Pathogen Isolated from Acute Diarrhea in Infants in Babel Province*. MSc. Thesis. College of Science, University of Babylon, Iraq.
- III. Al-Khaki, S. N. H. (2007). *A Comparative Study Using Polymerase Chain Reaction Technique for Shigella Toxin and Semi Shigella Toxin That Produced From Shigella dysenteriae 1 and Escherichia coli O157: H7 Isolated From Diarrhea Samples in Children*. PhD. Thesis, College of Science, Mustansiriyah University, Iraq.
- IV. Al-Misri, M. F. S. (2002). *Bacteriological and Hereditary Epidemiological Study of Some Diarrheal Colitis of Children in Some Aden Hospitals*. PhD Thesis, College of Science, Mustansiriyah University, Iraq.
- V. Attia, A. M. (2013). *Effect of some inhibitory proteins produced from yeast Saccharomyces cerevisiae against some intestinal bacteria*. MSc. Thesis, College of Basic Education, Mustansiriyah University, Iraq.
- VI. Badia, R.; Zanello, G.; Chevaleyre, C.; Lizardo, R.; Meurens, F.; Martinez, P.; Brufau, J. & Salmon, H. (2012). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and β -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). *Veterinary Research*, 43, 4-15.
- VII. Bali, V.; Panesar, P. S. & Bera, M. B. (2016). Trends in utilization of agro industrial byproducts for production of bacteriocins and their bio preservative applications. a Biotechnology Research Laboratory. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 204-214.
- VIII. Bao, Q.; Yu, J.; Liu, W.; Qing, M.; Wang, W.; Chen, X. & Zhang, H. (2012). Predominant lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk products in the Sichuan Province of China. *Dairy Science and Technology*, 92(3), 309-319.
- IX. Benmechernene, Z.; Chentouf, H. F.; Yahia, B.; Fatima, G.; Quintela-Baluja M.; Calomata, P. & Barros-Velázquez, J. (2013). Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *BioMed Research International*, 2(3), 1-14.
- X. De Vrese, M. & Marteau, P. R. (2007) Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *Journal of Nutrition*, 137(3), 803-811.
- XI. Fung, W.; Lye, H.; Lim, T.; Kuan, C. & Liong, M. (2011). *Roles of Probiotic on Gut Health*. In: *Probiotics, Biology, Genetics and Health Aspects*. (Ed., Min-Tze Liong), Vol. 21. Springer, Berlin, Germany. 39-142.
- XII. Goldman, E. & Lorrence, H. G. (2009). *Practical Handbook of Microbiology*. 2nd ed., CRC Press, USA.
- XIII. Gupta, S. (2009). *The Short Text Book of Pediatrics*. 11th ed., Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. USA.



- XIV. Holzapfel, W. H.; Björkroth, J. & Dicks, L. M. T. (2009). *Genus I. Leuconostoc van Tieghem 1878, 198AL emend mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66AL*, In P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K. Schleifer, W.B. Whitman (Eds.), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3. Springer, New York, USA.
- XV. Ibrahim, A. M. (2010). *A Diagnostic and Genetic Study of Some Escherichia coli Isolates That Cause Diarrhea in Children*. MSc. Thesis, College of Science, Mustansiriyah University, Iraq.
- XVI. Kwon, D. Y.; Koo, M. S.; Ryoo, C. R.; Kang, C. H.; Min, K. H. & Kim, W. J. (2002). Bacteriocin produced by *Pediococcus* sp. in kimchi and its characteristics. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 96-105.
- XVII. Lin, K. H.; Chuang, Y. C.; Lee, S. H. & Yu, W. L. (2010). In vitro synergistic antimicrobial effect of imipenem and colistin against an isolate of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. *Journal of Microbiology, Immunology & Infection*, 43(4), 317-22.
- XVIII. Liu, L.; Johnson, H. L.; Cousens, S.; Perin, J. & Scott, S. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379, 2151-2161.
- XIX. Maurya, A. P. & Thakur, R. L. (2012). Inhibition spectrum, purification and characterization of bacteriocin from *Leuconostoc* NT-1. *Current Science*, 103(12), 1405-1407.
- XX. Mercy, N.; Mohamed, A. A.; Zipporah, N.; Chowdhury, G.; Pazhani, G. P.; Ramamurthy, T.; Boga, H. I.; Kariuki, S. M. & Joseph, O. (2014). Phenotypic and genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolated from various regions of Kenya between 2007 and 2010. *Pan African Medical Journal*, 19(8), 2496-2500.
- XXI. Naghmouchi, K.; Baah, J.; Hober, D.; Jouy, E.; Rubrecht, C.; Sané, F. & Drider, D. (2013). Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 57(6), 2719-2725.
- XXII. Oyediji, K. S.; Niemogha, M.; Nwaokorie, F. O.; Bamidele, T. A. *et al.*, (2013). Molecular characterization of the circulating strains of *Vibrio cholerae* during 2010 cholera outbreak in Nigeria. *Journal of Health Population and Nutrition*, 31(2), 178-184.
- XXIII. Patel, S. J.; Maithri, M.; Dharani, P. Praneetha, V. A. & Yashaswini, D. (2015). Production, purification and characterization of bacteriocins from lactic acid bacteria. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 3(1), 236-240.
- XXIV. Roy, A. S.; Parveen, A.; Kuppakar, A. R. & Prasad, M. N. N. A. (2010). Effect of nano-titanium dioxide with different antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 1, 37-41.
- XXV. Xiraphi, N.; Georgalaki, M.; Driessche, G. V.; Devreese, B.; Beeumen, J. V. & Tsakalidou, E. (2006). Purification and characterization of curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89, 19-26.