Received: 10/11/2019 **Accepted: 11/12/2019** **Published: June 2020**

دراسة التأثير التآزري للبكتريوسين المنقى والمنتج من بكتريا lactis ssp. lactis Lactococcus مع بعض المضادات الحيوية ضد انواع من البكتريا المرضية

[a] علاء حسين هامل، [b] جيهان عبد الستار سلمان ، رغد أكرم عزيز
[a] ماجستير، قسم العلوم، كلية التربية الأساسية، الجامعة المستنصرية، العراق
Aliredaalaa79@gmail.com
[b] استاذ دكتور ،قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، العراق
Dr.jehan@uomustansiriyah.edu.iq
[c] استاذ دكتور ،قسم العلوم، كلية التربية الأساسية، الجامعة المستنصرية، العراق
Regaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة تأكيد تشخيص ثمانية عزلات من بكتريا Lactococcus lactis ssp. lactis بالاعتماد على الفحوص الزرعية والمجهرية والكيموحيوية فضلاً عن التأكد من تشخيصها بنظامVITEK2، فيما جمعت ستة عزلات من البكتريا المرضية شملت كلاً من بكتريا Pseudomonas aerouginosa , Staphylococcus epidermidis ,Saphylococcus aureus و Enterobacter clocae ,Escherichia coli و Serratia marcescens والتي تم التأكد من تشخيصها اعتماداً على الفحوص الزرعية والمجهرية والكيموحيوية فضلاً عن التأكد من تشخيصها بنظام VITEK 2، اختبرت حساسية عزلات البكتريا المرضية قيد الدراسة لتسعة من المضادات الحيوية وبينت النتائج ان جميع العزلات قيد الدراسة كانت مقاومة لمضاد السيفتازديم وحساسة لمضادات السبروفلوكساين والامبينيم والميروبنيم والاميكاسين فيما تباينت مقاومتها لبقية المضادات ، اجريت غربلة للعزلات بطريقة الانتشار بالحفربينت النتائج أن العزلة(Lc4) L. lactis ssp. lactis المعزولة من امعاء الاسماك كانت هي الاكفأ في إنتاج البكتريوسين ، كما لوحظ زيادة الفعالية التثبيطية لراشحها بزيادة تركيزه وأن تركيز الراشح لمرتين كان الأفضل في الحصول على اقطار تثبيط أعلى مقارنة مع المركز لمرة واحدة ، شملت خطوة تنقية البكتريوسين تركيز الراشح الخام ، ثم اجراء التنافذ الغشائي و الترشيح الهلامي باستعمال هلام الـ Sephacryl S-200 ،أضهرت النتائج عند دراسة مرحلة التنقية ارتفاع نسبة الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنقى مقارنة مع الراشح المركز لمرة واحدة ولمرتين قبل التنقية، كما لوحظ وجود تأثيراً تآزرياً بين البكتريوسين المنتج من L. lactis ssp. lactis (Lc4) وبعض المضادات الحيوية كمضاد Cefotaxime, Aztreoname, Tetracycline, Vancomycin و Ceftazidimeإذ زادت فعالية هذه المضادات بوجود البكتريوسين المنقى.

الكلمات المفتاحية: التأثير التآزري ،بكتريوسين، Lactococcus lactis ssp. lactis ، المضادات الحيوية ، البكتريا المرضية .

*بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول ا

1-المقدمة Interoduction :

تهدد البكتريا الممرضة بشكل دائم صحة الإنسان والحيوان **(Hashium et al.,2010)**، ولكن مع اكتشاف ألكسندر فليمنج للبنسلين في عام 1928 وظهور المضادات الحيوية بدأت حقبة جديدة سميت بالعصر الذهبي للمضادات الحيوية، وبدأ الأمل في القضاء على جميع الأمراض الرئيسة التي تسببها البكتريا ولكن سرعان ما لوحظ ظهور سلالات مقاومة بعد إدخال البنسلين مباشرة **Sarmah ; (Hassanet al., 2012et al., 2017)** لذا اقترح Metchnikoff فكرة المعززات الحيوية Probiotic في حين أستخدم المصطلح لاول مرة فى عام 1965 من قبل العالمين Lilly وStillwell وعرفت على أنها احياء مجهرية صديقة تعمل على تحسين صحة المضيف من خلال تحسين النظام المناعي وتحسين التوازن المايكروبي للقناة الهضمية، إذ تثبط نمو المايكروبات غير المرغوب فيها وتعزز من نمو النبيت الطبيعي المتواجدة في الجسم من خلال خلق أليات تنافسية **Acharya et al.,2016)**، لذلك حاول الباحثين دراسة التأثير التضادي لبعض الاحياء المجهرية الذي يؤدي دوراً مهماً في السيطرة الاحيائية ومن المجاميع البكتيرية التي نالت قسطاً كبيراً من الاهتمام بكتريا حامض اللاكتيك التي تنتج جزيئات مضادة للبكتريا لاسيما المرضية منها مثل بيروكسيد الهيدروجين، الاحماض العضوية، ثنائي الاستيل**(Loh et al., 2017)**، فضلاً عن انتاجها البكتريوسينات التي لها القدرة في تثبيط البكتريا الموجبة والبكتريا السالبة لصبغة كرام **(Mitra et al.,2019)** ، وتعد بكتريا Lactococcus احد الاجناس التابعة لبكتريا حامض اللاكتيك وأحد المعززات الحيوية والتي لديها القدرة على انتاج البكتريوسينات ومثالها النايسين المنتج من بكتريا lactis ssp. lactis Lactococcus والذي ثبت كونها مادة أمنة معترف بها من قبل منظمة الصحة العالمية لذا أستعملت في حفظ الأغذية **(Tidona et al., 2018)** وامكانية استعمالها للأغراض العلاجية مثل التهاب الجلد التأتبي (إلاكزيما) **(Preet et al., 2015)** والتهاب الامعاء والتهابات الجهاز التنفسي وقرحة المعدة المرتبطة في أغلب الأحيان ببكتريا Helicobacter pylori **(Shin et al., 2015)**، وتحفيز الاستجابة المناعية وتحسين مقاومة الامراض **(Ringo et al.,2018)** ينطوي الاسلوب الاساسي لعمل بكتريوسينات هذا الصنف على ارتباطه بـ LipedII لتثبيط تخليق جدار الخلية وتشجيع تكوين المسام في الأغشية البكتيرية **(Aziz et al.,2015)**، تسبب البكتريا المرضية العديد من الامراض مثل اخماج المسالك البولية واصابات الجهاز التنفسي و اصابات الحروق و الجروح واصابات الأذن الوسطى **(Pedersen,2018)**، وكعوامل مسببة للتسمم الغذائي للأطعمة **et al., 2017) Castellano)** ونظراً لظهور سلالات ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية، وطول مدة العلاج وتصاعد تكاليفه، لذا تم تطبيق استعمال بعض الببتيدات البكتيرية ذات الفعالية المضاده للميكروبات والتي تعد في الوقت الحاضر بديلاً مناسباً للمضادات الحيوية بسبب مؤشراتها العلاجية العالية وطبيعتها غير السامة **(deCosta et al.,2019)**، لذلك هدفت هذه الدراسة الى دراسة التأثير التآزري بين البكتريوسين المنقى والمنتج من بكتريا L.lactis ssp. lactis مع بعض المضادات الحيوية.

2 ـ المواد وطرائق العمل Material and Method:

2.1ـ عزلات بكتريا Lactococcus:

أمكن الحصول على ثمانية عزلات تعود لبكتريا L.lactis ssp. lactis سبعة منها (Lc8 ، Lc7، Lc5، Lc4، Lc3، Lc2، Lc1) معزولة من أمعاء الأسماك فيما عزلت Lc6 من الحليب الخام، تم الحصول على هذه العزلات من مختبر الدراسات العليا في الجامعة المستنصرية/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة ، تم التأكد من تشخيصها بالاعتماد على الفحوص الزرعية والمجهرية

والكيموحيوية وحسب ماجاء به **Green&Goldman (2015)** فضلاً عن التأكد من تشخيصها باستعمال نظام VITEK 2 لغرض استعمالها في إنتاج البكتريوسين .

2-2-عزلات البكتريا المرضية:

جمعت ثلاثة عزلات من البكتريا المرضية المشخصة لحالات سريرية مختلفة من الجروح و الدم والحروق من بعض مستشفيات بغداد (مستشفيات مدينة الطب ومستشفى الطفل المركزي) شملت على التوالي كلاً من بكتريا S. epidermidis , S.aureus و P. aeruginosa، فيما تم الحصول على ثلاثة عزلات من البكتريا المرضية المعزولة من اصابات المجاري البولية من مختبرات الجامعة المستنصرية/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة تضمنت كل من E.coli, E.clocae و S.marcescens والتي تم التأكد من تشخيصها فيما بعد باعتماد الفحوص الزرعية والمجهرية والكيموحيوية وحسب ماجاء به **Goldman & Lorrence(2009)** فضلاً عن التشخيص بنظام VITEK 2 .

3-2-فحص حساسية عزلات البكتريا المرضية لبعض انواع المضادات الحياتية:

أتبعت الطريقة التي ذكرها **Joseph et al., (2013)** لأختبار حساسية العزلات لبعض انواع المضادات الحيوية كمضاد Aztreoname, Meropenem ,Cefotaxime , Tetracycline, Imipenem, Amikacin , Ciprofloxacin, Vancomycin و Ceftazidime و بأستعمال الوسط الزرعي المغذي الصلب.

4-2- التحري عن انتاج البكتريوسين لعزلات بكتريا L.lactis ssp .lactis:

1-4-2- تحضير الراشح:

حضر راشح عزلات L. lactis ssp. lactis بالاعتماد على ما جاء به كل من **(Loh et al., 2017)** و **(Garsa et al., 2014).**

2-4-2- تقدير الفعالية التضادية لراشح عزلات بكتريا L. lactis ssp.lactis المنماة في وسط MRS broth:

أستعملت طريقة الانتشار بالحفر well diffusion method للتحري عن الفعالية التضادية لرواشح عزلات بكتريا L. lactisssp.lactis وكما وصفها **Gupta (1996).**

3-4-2- تركيز الراشح :

ركز راشح العزلة الأكثر إنتاجا للبكتريوسين لمرة واحدة ولمرتين باستعمال التبخير وقدر تركيز البروتين الكمي للراشح (غير المركز، المركز لمرة واحدة، المركز لمرتين) بطريقة **Bradford (1976)** ثم أستعملت طريقة الانتشار في الحفر للتحري عن الفعالية التثبيطية للرواشح المركزة لمرة واحدة ومرتين ومقارنتها مع الفعالية التثبيطية للراشح بعد التنقية.

4-4-2- تنقية البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا L. lactis ssp. lactis بإستعمال المرشح الهلامي Sephacryl S-200 :

تم تحضير عمود الترشيح الهلامي حسب تعليمات شركة Pharmeacia Fine chemical السويدية، غسل المرشح الهلامي لمحلول الموازنة بدارئ الفوسفات، ثم عبأ الهلام بالعمود بعد عملية إزالة الهواء Degassing ليعطي هلاماً بابعاد (1.5×60) سم وبهدوء لتفادي تكوين الفقاعات الهوائية، وعند الوصول إلى الأبعاد المطلوبة، أجريت عملية موازنة للعمود لمدة 24 ساعة للتأكد من الانضغاط المطلوب لمادة الفصل، وبعد حساب سرعة الجريان المطلوبة وتهيئة العمود وضع الانموذج، ثم جمعت الاجزاء المنفصلة بواقع 3 مللتر /جزء وكانت سرعة الجريان 18مللتر /ساعة، بعدها قيست

امتصاصية الاجزاء المنفصلة بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 280 نانومتر، وتم تقدير تركيز البروتين الكمي للقمم المنفصلة وقدرت الفعالية التثبيطية.

2-4-5 الترحيل الكهربائي:

أستعملت طريقة **(Laemmli ,1970)** لمتابعة عمليات التنقية وبوجود العوامل الماسخة (-SDS PAGE) للتاكد من نقاوة البكتريوسين.

2-6- التأثير التأزري للبكتريوسين المنقى والمنتج من بكتريا L. lactis ssp. lactis مع المضادات الحيوية ضد انواع من البكتريا المرضية:

اتبعت الطريقة التي وصفها **(2010), Roy et al.** مع التحوير وذلك بعد تحديد المضادات الحيوية التي أبدت العزلات المرضية قيد الدراسة مقاومة لها، إذ غمرت اقراص المضادات الحيوية في محلول البكتريوسين المنقى لمدة 10 دقائق لغاية التشبع، بعدها قدرت حساسية العزلات البكتيرية المرضية وذلك بقياس اقطار مناطق التثبيط التي احدثتها المضادات الحيوية لوحدها و اقطار مناطق التثبيط التي احدثتها المضادات الحيوية بوجود البكتريوسين المنقى واقطار مناطق التثبيط اقراص اوراق الترشيح المغمورة بالبكتريوسين المنقي (سيطرة موجبة) واقراص اوراق الترشيح المغمورة بالماء المقطر المعقم (سيطرة سالبة).

3- النتائج والمناقشة Results and Discussion:

3-1- تشخيص عزلات L.lactis ssp.lactis

بينت نتائج الفحوص الزرعية للمستعمرات النامية على وسط MRS الصلب بكونها ذات لون ابيض مائل الى الأصفر أو الكريمي، ذات حافات محدبة، ملساء لماعة وتشابهت هذه الصفات مع ماذكره **Willeyet al., (2008)** ، فيما بينت نتائج الفحص المجهري بإستعمال المجهر الضوئي بأن خلايا هذه البكتريا والمصبوغة بصبغة كرام هي كروية، بيضوية الشكل متجمعة بصورة منفردة، ثنائية، أو بهيأة سلاسل قصيرة، وهي موجبة لصبغة كرام، فيما بينت نتائج الفحوص الكيموحيوية التي اعتمدت في تشخيص بكتريا L.lactis ssp. lactis ان جميع عزلات هذه البكتريا سالبة لفحص الكاتاليز و الاوكسديز و لها القدرة على النمو بدرجة حرارة 40 م وأتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره كل من **Zhang& Cai(2014)** فيما يخص بكتريا Lactococcus وأكد التشخيص بنظام الفايتك ان جميع العزلات قيد الدراسة تعود الى تحت النوع L.lactis ssp. lactis.

3-2- تشخيص عزلات البكتريا المرضية:

قد تم التشخيص الأولي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة اعتماداً على صفات المستعمرات المظهرية، وذلك عند تنميتها على الأوساط الزرعية الاختيارية والتفريقية، إذ ظهرت مستعمرات بكتريا S.aureus على وسط المانيتول الملحي (Mannitol salt agar (MSA الصلب دائرية صغيرة ذات لون اصفر ذهبي **(Brooks et al., 2013)** ، فيما ظهرت مستعمرات بكتريا S.epidermidis النامية على هذا الوسط بيضاء، فيما تميزت مستعمرات كلاً من بكتريا S.aureus و S. epidermidis النامية على وسط الدم الصلب بكونها بيضاء اللون توافقت هذه الصفات مع ما ذكره **Levinson(2016)**، فيما تميزت مستعمرات بكتريا E.coli النامية على وسط الدم الصلب بكونها ذات لون ابيض مائل الى الحليبي ، اما مستعمراتها النامية على وسط الماكونكي الصلب فتميزت بكونها ذات لون وردي لماع توافقت هذه الصفات مع ما ذكره **,Brooks et al.), 2013)** فيما تميزت مستعمراتها البكتيرية النامية على وسط الايوسين المثيل الازرق(EMB) Eosin Methylene Blue والذي يعد من الاوساط التفريقية بظهور مستعمرات بلون ازرق مسود ذات بريق معدني اخضر Green Metallic Sheene **(Levinson ,2016)** ، اما بكتريا .P

aeruginosa فتميزت بأنها ذات لون أخضر مزرق غامق مع تكوين طبقة لماعة على سطح المستعمرات عند تنميتها على وسط الدم الصلب، وتميزت على وسط الماكونكي الصلب بأنها شاحبة اللون وعلى وسط سترمايد Cetremide Agar بأنها كبيرة الحجم، لزجة، لماعة ذات لون اصفر مخضر وتظهر هذه الصبغة واضحة أيضاً عند تنمية هذه البكتريا على الوسط المغذي الصلب**Bachoon &Wendy(2008)** ، فيما تميزت مستعمرات بكتريا S. marcescens على وسط الدم الصلب بكونها ذات لون برتقالي و ظهرت هذه البكتريا باللون الاحمر عند تنميتها على وسط المغذي الصلب ووسط الماكونكي الصلب بدرجة حرارة 25م وهذا يعود إلى امتلاك هذا النوع البكتيري صبغة Prodigiosin الحمراء **(Mendoza et al., 2019)**، فيما كانت مستعمرات بكتريا E.clocae على وسط الدم الصلب رمادية اللون، فيما تميزت بكونها ذات لون وردي على وسط الماكونكي الصلب تشابهت هذه الصفات مع ما ذكره **Levinson (2016)** .

أظهرت نتائج الفحص المجهري بأستعمال المجهر الضوئي أن الخلايا البكتيرية المصبوغة بصبغة كرام لكلاً من بكتريا S. aureus و S.epidermidis بإنها ذات خلايا كروية، عنقودية الترتيب متجمعة بصورة ثنائية أو رباعية أو على هيأة سلاسل قصيرة، فيما تميزت مستعمرات كلاً من بكتريا E.clocae, P.aeruginosa E.coli و S.marcescens بكونها عصوية سالبة لصبغة كرام، توافقت هذه الصفات مع ماذكره كل من **Brown& Smith (2014).**

وقد أجريت سلسلة من الفحوص الكيموحيوية التاكيدية المتبعة لتشخيص عزلات البكتريا المرضية، بينت النتائج أن جميع عزلات البكتريا المرضية قيد الدراسة قادرة على أنتاج أنزيم الكاتاليز اي أنها موجبة لهذا الاختبار توافقت هذه النتيجة مع ماذكره **Thille (2016)** ، فيما أظهرت جميع عزلات البكتريا المرضية قيد الدراسة نتيجة سالبة لأختبار الاوكسيديز بأستثناء P. aeruginosa التي كانت موجبة لهذا الاختبار الذي يعد صفة تشخيصية مهمة لهذا النوع تطابقت هذه النتيجة مع ما ذكره **Garcia (2010).** كما يلاحظ من خلال الجدول **(1)**أهم الفحوص الكيموحيوية التي اجريت لكلاً من بكترياP. aeruginosa S. marcescens ,E clocae, E.coli و S.marcescen .

جدول (1): نتائج الاختبارات الكيموحيوية لبعض عزلات البكتريا المرضية قيد الدراسة

الاختبار / العزلات		E. coli	P .aeruginosa	E. clocae	S. marcescens
الاوكسديز		-	+	-	-
الكاتليز		+	+	+	+
الأندول		+	-	-	+
المثيل الاحمر		+	-	+	-
استهلاك السترات		-	+	+	+
فوكس بروسكاور		-	-	-	-
TSI	Slant	A	K	A	A
	Butt	A	K	A	A
	H_2S	-	-	-	-
	أنتاج الغاز	+	-	+	+
OF		F	O	F	F
الحركة		+	+	+	+

(+): نتيجة موجبة (-): نتيجة سالبة Acid :(A) Alkaline :(K) (F): تخمر (O): الاكسدة

فيما يعد اختبار أنزيم التجلط Coagulase واحد من اهم الاختبارات التشخيصية لتمييز أنواع المكورات العنقودية، إذ أظهرت نتائج هذا الاختبار أن بكتريا S.aureus كانت موجبة لهذا الاحتبار

اما بكتريا S.epidermidis فقد كانت سالبة، توافقت هذه النتيجة مع ماذكره**(2015) .et al Talaiekhozani** ومن الجدير بالذكر أن Coagulase يعد بروتين يتفاعل مع البروثرومبين Prothrombin الموجود في الدم والمعقد الناتج من هذا التفاعل يسمى Staphylothrombin الذي يؤدي بدوره الى تخثر الدم وبذلك يتحول الفايبرينوجين الى فايبرين الذي يرتبط احيأنا بسطح البكتريا ويغيطها بالليفين مما يجعل البكتريا مقاومة للبلعمة **(Becker et al ., 2014).**

3-2-2- التشخيص بجهاز VITEK 2 :

تمثل الاختبارات الكيموحيوية المدخل الاساسي في تشخيص البكتريا فيما أن الحاجة قد تكون ملحة في بعض الاحيان للاستعانة بأنظمة تشخيص متطورة تعطي نتائج عالية الدقة ، لذا جاءت خطوة التشخيص بجهاز VITEK 2 لتأكيد تشخيص العزلات ، وبينت نتائج التشخيص ان العزلات تعود الى S .aureus , E.coli, S.marcescens, S.epidermidis, E.clocae و P.aeruginosa نظراً لما يتمتع به هذا الجهاز من سهولة وسرعة في الأستعمال والتحضير والتشخيص الدقيق للأنواع البكتيرية، إذ يوفر هذا الجهاز 64 اختباراً كيموحيوياً فضلاً عن اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للعزلات المراد تشخيصها وبنسبة تشخيص عالية تتراوح بين 95 الى 99 ٪ وبوقت يتراوح من 5 الى 8 ساعات، فيما أكد(2012) **Mulla Khalil** أن تشخيص العزلات البكتيرية بوساطة جهاز الفايتك يؤكد نتائج التشخيص الأولي وبنسبة تشخيص عالية تصل إلى 98% إذ أستعمل جهاز الفايتك في تشخيص البكتريا المعزولة من المصادر السريرية .

3-3- حساسية العزلات البكتيرية المرضية تجاه بعض المضادات الحيوية:

أختبرت حساسية ستة عزلات بكتيرية والتي شملتها الدراسة تجاه تسعة مضادات حيوية وتم تحديد النتائج بوصف البكتريا مقاومة (R) أو حساسة (S) شملت مضادات البيتالاكتام التي أستعملت في هذه الدراسة مجموعة السيفلوسبورينات ، ومضادات البيتالاكتام احادية الحلقة Monocyclic Monobactams، مضادات الكاربينم Carbapenem، يتضح من خلال الجدول (3) مقاومة وحساسية عزلات البكتريا المرضية قيد الدراسة تجاه بعض المضادات الحيوية، أذ أظهرت كلاً من بكتريا S.aureus و S.epidermidis مقاومة لأربعة مضادات حيوية شملت كلا من Cefotaxime ,Ceftazidime Tetracycline و Aztreoname، فيما أظهرت بكتريا P.aeruginosa المستعملة في الدراسة مقاومة لخمسة مضادات حيوية شملت Cefotaxime ,Ceftazidime ,Tetracycline ,Aztreoname,و Vancomycin، فيما أظهرت بكتريا E.coli مقاومة لمضادين وهما Ceftazidime و Vancomycin، اما بكتريا S. marcescens فقد أظهرت مقاومة لثلاثة مضادات حيوية شملت كل من مضاد Ceftazidime Vancomycin, و Tetracycline فيما أظهرت بكتريا E.clocae مقاومة لثلاثة مضادات حيوية شملت كلاً من Ceftazidime Vancomycin, و Tetracycline. أن ميزة أنتاج أنزيمات البيتالاكتام لا تعد ميزة مطلقه لكافة العزلات المرضية، لذا تلجأ البكتريا الى أليات متعددة لمقاومة المضادات الحيوية فمثلا تلجأ الى احداث تغيرات في الغشاء البلازمي المحيط بالخلية البكتيرية، إذ يحوي هذا الغشاء على قنوات بروتينية **(Lee&Im , 2018)**، إذ تعمل بعض أنواع البكتريا غير القادرة على أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز الى تقليل عدد قنوات او تجعل اقطارها صغيرة جداً بحيث يتم منع مرور المضاد الى داخل الخلية **(Misra& Bavra, 2009)** .

جدول(2): حساسية ومقاومة عزلات البكتريا المرضية قيد الدراسة تجاه بعض المضادات الحيوية

العزلات المرضية	المضادات الحيوية								
	CIP	CTX	CAZ	IPM	MEM	AK	TE	ATM	VA
S. aureus	S	R	R	S	S	S	R	R	S
S. epidermids	S	R	R	S	S	S	R	R	S
P. aeruginosa	S	R	R	S	S	S	R	R	R
E. coli	S	S	R	S	S	S	S	S	R
S. marcescens	S	S	R	S	S	S	R	S	R
E .clocae	S	S	R	S	S	S	R	S	R

(S) حساسية (R) مقاومة

Ciprofloxacin(CIP) :(CTX) Cefotaxime :(CAZ) Ceftazidime :(IPM) Imipenem : Meropenem (MEM) :(AK) Amikacin :(TE) Tetracycline :(ATM) Aztreoname :(VA) Vancomycin

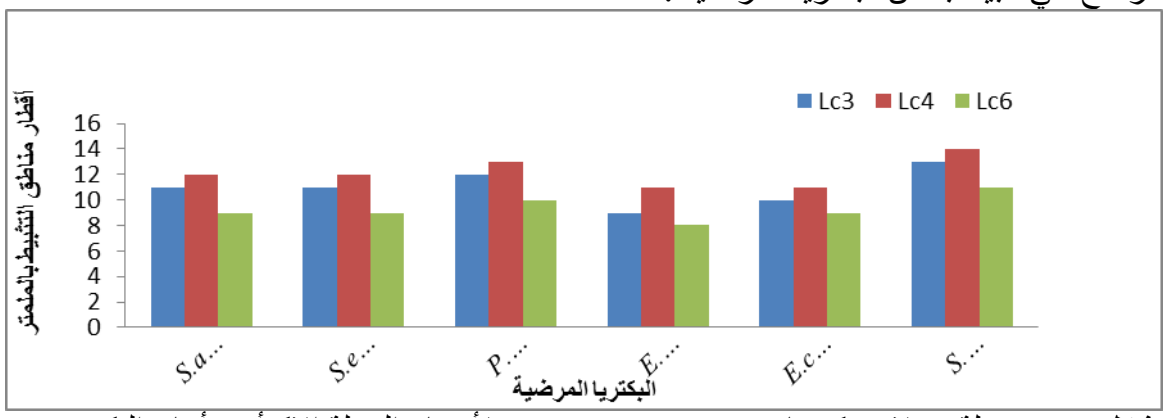
فضلاً عن نظام الدفق النشط effux pumps الذي يعمل على تقليل تراكم المضاد داخل الخلية البكتيرية **(Patel &Bonomo,2011).**ويمكن أيضاً أن يعزى سبب مقاومة البكتريا الى مقدرتها على التحوير في مواقع الهدف للارتباط بالمضادات وقد تحدث الطفرات نتيجة الأستعمال المتكرر للمضادات ، مثلاً الطفرات التي تؤدي الى تحوير أنزيم DNAgrase إذ يعمل هذا الأنزيم على فتح الحلزون المزدوج لشريط الـ DNA في الخلية البكتيرية **(Wang , 2004).** ذكرت **Jebur (2018)** أن بكتريا P.aeruginosa المعزولة من الجروح كانت مقاومة 100% لكلاً من المضادات Cefotaxime ,Imipenem Ceftazidimeو Meropenem فيما اشارت (2015) **Alnuaimi** أن عزلات P. aeruginosa المعزولة من الحروق كانت مقاومة لكلاً من مضاد Tetracyclineومضاد Ciprofloxacin بنسبة 100%. اشارت **Sezaee (2015)** أن بكتريا E. cloacaeالمعزولة من حالات سريرية مختلفة كانت مقاومة لمضادات Cefotaxime ,Amikacin و Ciprofloxacin بمعدل 61.5%، فيما اشارت **Salim (2019)** أن بكترياعزلات S.marcescens كانت حساسة بمعدل 100% الى مضاد Imipenem و Meropenem ومقاومة للمضاد Aztreoname و Tetracycline بمعدل 54% و 86%، فيما **ذكر Rajaram (2013) et al.,** أن عزلاته كانت حساسة للمضادCiproflaxin ، فيما اشار **Alak Qassim (2016) &Al-** أن عزلات S. aureus المعزولة من الحروق والجروح كانت مقاومة للمضاد Aztreonameبمعدل 60 % .

فيما ذكر **Hassan &Obaid(2017)** أن عزلات بكتريا S.aureus كانت مقاومة للمضاد Cefotaximeبمعدل 16.66%، فيما اشارت **Issa (2019)** أن عزلات S. aureus كانت مقاومة لمضاد Aztreoname بمعدل 42.5%، فيما كانت نسبة مقاومتها لمضاد Vancomycin 0%. ذكرت **Fadhel(2013)** أن عزلات بكتريا S.epidermidis كانت مقاومة للمضاد Tetracycline بمعدل 50% وحساسة للمضاد Vancomycin بنسبة 100%، فيما اشارت **Yaseen (2015)** أن

بكتريا E.coli المعزولة من التهابات المجاري البولية أظهرت مقاومة للمضاد Ceftazidime بمعدل 58.38% وأظهرت حساسية عالية للمضاد Imipenem و Meropenem.

4.3- غربلة عزلات بكتريا L. lactis ssp. lactis المستعملة في الدراسة:

اختبرت قابلية ثمانية عزلات بكتيرية عائدة الى تحت النوع لبكتريا L. lactis ssp. lactis على انتاج البكتريوسين بعد تنميتها على وسط MRS السائل وتحت ظروف لاهوائية ومن ثم التحري عن فعالية الراشح في تثبيط بعض البكتريا المرضية .



شكل(1) : غربلة عزلات بكتريا L. lactis ssp. lactis لأختيار العزلة الاكفأ في أنتاج البكتريوسين من خلال مقارنة اقطار التثبيط التي تحدثها رواشحها المركزة لمرة واحدة في البكتريا المرضية.

Lc3 الفعالية التثبيطية للعزلة L. lactis ssp. lactis معزولة من امعاء الاسماك.

Lc4 الفعالية التثبيطية للعزلة L. lactis ssp. lactis معزولة من امعاء الاسماك.

Lc6 الفعالية لبتثبيطية للعزلة L. lactis ssp. lactis معزولة من الحليب الخام.

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1). أن العزلة L.lactis ssp. lactis (Lc4) هي الاكفأ في أنتاج البكتريوسين ، إذ امتلك راشحها المركز لمرة واحدة أعلى قطر تثبيط تجاه العزلات S.aureus ,S.epidermids P.aeruginosa ,E.coli E .clocae و S.marcescens بأقطار بلغت(14,11,11,13,12,12) ملم على التوالى، فيما تلاها العزلة L.lactis ssp. lactis (Lc3) التي أعطت اقطار تثبيط تجاه العزلات S.aureus ,S.epidermids ,P.aeruginosa, E.coli ,E.clocae و S.marcescens بأقطار تثبيط بلغت (13,10,9,12,11,11) ملم على التوالى، فيما أظهرت العزلة L.lactis ssp. lactis (Lc6) فعالية تثبيطية تجاه العزلات S.aureus ,S.epidermids ,P.aeruginosa, E.coli ,E.clocae و S.marcescens بأقطار بلغت (11,9,8,10,9,9) ملم على التوالى، فيما أعطت باقي العزلات فعالية تثبيطية قليلة تجاه البكتريا المرضية . أن سبب تباين عزلات بكتريا L .lactis ssp. lactis في فعاليتها التثبيطية قد يعزى الى اختلاف الفعالية الفسلجية لكل عزلة وهذا يعود الى الاختلاف في تركيب الجينات والذي ينعكس بدوره على نشاط الأنزيمات والفعاليات الأيضية إذا أن أنواع السلالات التابعة لبكتريا L .lactis ssp. lactis يمكن أن تنتج أنواع مختلفة من النايسين و بتراكيز مختلفة والذي ينعكس بدوره على الفعالية التثبيطية التي يمكن أن تحدثها رواشح عزلات بكترياهذه البكتريافي البكتريا الاختبارية. أختلفت الدراسات السابقة حول حساسية ومقاومة البكتريا للبكتريوسينات المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك، إذ أن آلية المقاومة للبكتريوسين لم تفسر بصورة كاملة ولكن بصورة عامة يعتقد أن سبب مقاومة البكتريا للبكتريوسين قد يعزى الى التغييرات الحاصلة في الغشاء الحيوي والتي قد تتضمن توقف

الجينات المسؤولة عن تشفيير أنزيم Phophotranferase الذي يعمل على أنتاج ATP مصدر الطاقة او تغيير في تركيب الأحماض الدهنية المكونة الغشاء.

3-5- تأثير تركيز راشح بكتريا L. lactis ssp. lactis في الفعالية التثبيطية :

اوضحت النتائج أن الراشح المنتج من بكتريا L.lactis ssp.lactis أثر في تثبيط العزلات البكتيرية الاختبارية بعد أن تم تركيزه كماهو موضح في الجدول (3)

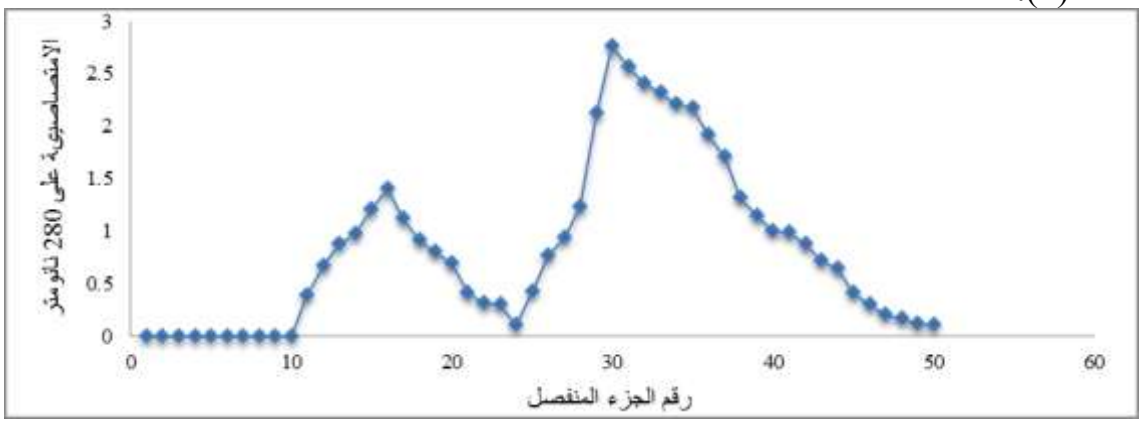
جدول (3): التأثير التثبيطي للراشح المركز لمرة ولمرتين المنتج من بكتريا L. lactisssp. Lactis تجاه البكتريا المرضية قيد الدراسة

عزلات البكتريا المرضية	قطر مناطق التثبيط (ملم)	
	الراشح المركز لمرة واحدة للعزلة (Lc4)	الراشح المركزلمرتين للعزلة (Lc4)
S. aureus	12	18
S. epidermidis	12	19
P. aeruoginosa	13	20
E. coli	11	16
E. clocae	11	17
S. marcescens	14	21

يتضح من خلال الجدول(2) أن الفعالية التثبيطية لراشح بكتريا L. lactis ssp. lactisازدادت بزيادة تركيزه وأن تركيز الراشح لمرتين كان الأفضل في الحصول على أعلى اقطار تثبيط تجاه البكتريا المرضية مقارنة مع المركز لمرة واحدة، اشار **Brashear et al. (2003)** أن البكتريوسينات تنتج من قبل العديد من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك ولكن بكميات ضئيلة، لذا فمن الضروري تركيز الراشح الخام المنتج من السلالات والذي يحتوي على عوامل مثبطة للميكروبات في خطوات متعددة للحصول على أعلى فعالية. كما أظهرت النتائج بأن العزلات البكتيرية المرضية قيد الدراسة أبدت تفاوتاً في مدى استجابتها لراشح بكتريا L. lactis ssp. lactis المركز لمرتين، إذ بلغ أعلى تاثير له على بكتريا S.marcescens (21) ملم ثم تدرج في التأثير ، وقد يعزى ذلك الى ألية عمل البكتريوسين في التأثير على العزلات الحساسة له الذي يرجع الى امتلاك البكتريا المستهدفة مستقبلات متخصصه للبكتريوسين او حدوث تغير في غشاء الخلية وجدرانها، أظهرت الدراسات السابقة التي اجريت على النايسين المنتج من بكتريا L. lactis بأنه يمنع التخليق الحيوي للببتيدوكلايكون **(Hansen et al.,2009)**، تعتمد ألية ادخال النايسين على وجود الفوسفولبيد في طبقة الدهون الاحادية والثنائية وهذا ما يفسر لنا سبب الاختلافات الواضحة في الأنواع والسلالات البكتيرية الحساسة للنايسين إذ لاتحدث النفاذية الا في حالة ادخال النايسين في طبقه الدهن وهذا لايحدث إلا في حالة وجود الفوسفوليبد **(Wiedemann et al., 2001)** وعموماً فأن النايسين وجميع البكتريوسينات المنتجة من الصنف الأول المسمى Lantibiotics تحتوي على أحماض امينية موجبة الشحنة غير محبة للماء تحتاج إلى مركبات سالبة الشحنة للتجاذب معها في حالة غياب الفوسفولبيد لابد من وجود النايسين بتراكيز عالية جداً لتشكيل الثقوب في السياتوبلازم وبالتالى اضهار الفعالية التثبيطية **(Ennahar et al.,2000).**

6.3- تنقية البكتريوسين بوساطة الترشيح الهلامي :

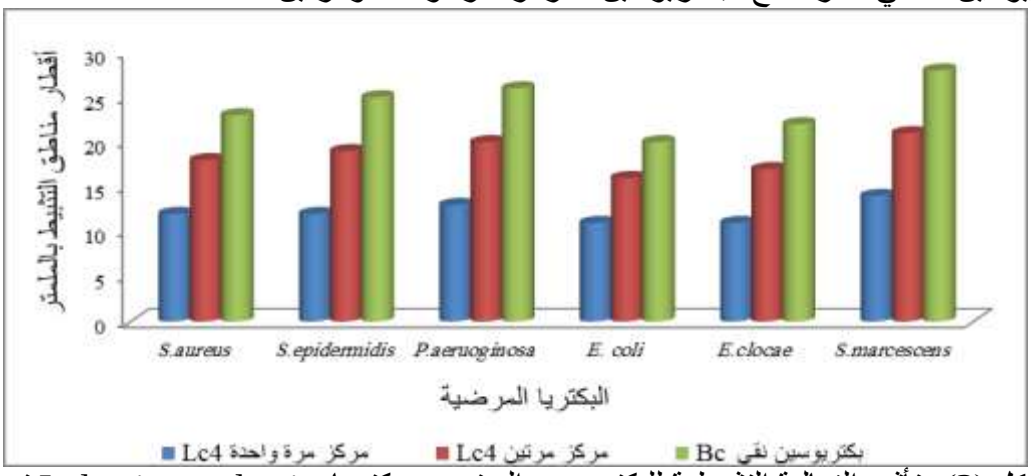
للحصول على بروتين يحقق درجة عالية من النقاوة أستعمل لأجل ذلك هلام السيفاكريل Sephacryl S-200 في تنقية البكتريوسين المنتج من بكتريا L. lactis ssp. lactis، لما يمتاز به من خواص جيدة، إذ يحتوي على الأكريلاميد فضلاً عن الدكستران، مما يعطيه صلابة جيدة ومقاومة عالية للأنضغاط بالإضافة إلى الفصل الجيد وسرعة الجريان وسهولة التحضير وامتلاكها ثباتية لمدة طويلة، كما يمكن من خلاله تقدير الوزن الجزيئي للبروتين بغض النظر عن الشحنة التي يحملها **(Janson &Ryden, 1998)** ، جاءت خطوة الترشيح الهلامي بعد عملية تركيز الراشح المستحصل عليه من بكتريا L. lactis ssp. lactis ((Lc4) لمرتين. إذ أضيف الأنموذج الى عمود الترشيح الهلامي ذو أبعاد (1.5× 60) سم، أظهرت النتائج ظهور قمتين للبروتين من الاجزاء المستردة من الهلام بوساطة محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم الملحي بتركيز (0.5) مولاري ورقم هيدروجيني (6.5) عند قياس الاجزاء المستردة على طول موجي مقداره 280 نأنومتر كما في الشكل(2).



شكل (2) : تنقية البكتريوسين من العزلة L. lactis ssp. lactis على عمود كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي Sephacryl S- 200 وبابعاد 1.5×60 وبسرعة جريأن مقدراها 18 مللتر وبواقع 3مللتر/جزء، وتم الاسترداد بوساطة محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم وبتركيز 0.5 مولاري.

قيست بعدها الفعالية التثبيطية للقمم المفصولة بطريقة الأنتشار في الحفر، إذ كانت الفعالية التثبيطية متمركزة في القمة الثانية، اما القمة الأولى فكانت خالية تقريباً من الفعالية تجاه البكتريا الاختبارية، جمعت أجزاء القمة الثانية وركزت مرة أخرى ثم اعيد اضافتها الى عمود الترشيح الهلامي نفسه في خطوة ثانية وتحت ظروف مماثلة للفصل الأول، تم من خلال هذه الخطوةالحصول على قمة واحدة تطابقت مع القمة الثانية المتحصل عليها في الخطوة الأولي، مما يدل على نقاوة البروتين وأن المواد البروتينية المثبطة قد رشحت خلال الاجزاء النافذة، فيما اختلف تركيز البروتين في الأجزاء المستردة من الترشيح الهلامي تبعاً لاختلاف تركيز المواد المثبطة، إذأعطت فعالية تثبيطية عالية وبأقطار تثبيط متفاوتة تجاه البكتريا الاختبارية. أستعملت طريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الأكريلامايد وبوجود العوامل الماسخة للتأكد من دقة عملية التنقية للبروتينات المفصولة، اوضحت النتائج المستحصل عليها أن استمرار عملية التنقية للراشح يؤدي إلى تناقص في مقدار الحزم البروتينية، مما يؤكد نجاح عملية التنقية في الحصول على بروتين وبأعلى درجة من درجات النقاوة ليتم توصيف ذلك

البروتين وتقدير فعاليته التثبيطية بصورة دقيقة بالرجوع الى قياس الفعالية التثبيطية للاجزاء المستردة من هلام Sephacryl S-200 يلاحظ من خلال الشكل (3) والشكل (4) أزدياد اقطار مناطق التثبيط للعزلات البكتيرية إذ بلغت S.aureus ,S.epidermids ,P.aeruginosa ,E.clocae ,E.coli و S.marcescens (28,22,20,26,25,23) ملم على التوالي، مما يعني زيادة فعالية البكتريوسين المنقي مقارنة مع البكتريوسين المركز لمرة واحدة ومرتين.



شكل (3): تأثير الفعالية التثبيطية للبكتريوسن المنتج من بكتريا L. lactis ssp. lactis تجاه البكتريا المرضية قيد الدراسة خلال مراحل التنقية.

- Lc4الفعالية التثبيطية للراشح المنتج من العزلة L. lactis ssp. lactis مركز لمرة واحدة .
- Lc4الفعالية التثبيطية للراشح المنتج من العزلة L. lactis ssp. lactis مركز مرتين.
- BC بكتريوسين منقى .

يلاحظ من الجدول (4) أن تركيز البروتين يبدأ بالأزدياد خلال مراحل التنقية مع ازدياد اقطار مناطق التثبيط، مما يدل على أنه خلال مراحل التنقية قد تم التخلص من المركبات والمواد الأخرى المرافقة للبروتين وتحريره، وهذا مايؤكد كفاءة الطريقة المتبعة في تنقية البكتريوسينات وفصلها.

جدول (4) : تركيز البروتين خلال مراحل التنقية

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	البروتين الكلي (ملغم/مل)	حصيلة %
الراشح الخام	80	0.032	25.6	100
الراشح المركز مرة واحدة	40	0.106	4.24	16.56
الراشح مركز مرتين	20	0.343	6.86	26.79
الترشيح الهلامي	18	0.653	11.75	45.89

3-7- التأثير التآزري للبكتريوسين المنقى من بكتريا L.lactis ssp. lactis(Lc4) وبعض انواع المضادات الحيوية:

درس التأثير التآزري للبكتريوسين المنقى والمنتج من بكتريا(L.lactis ssp. lactis (Lc4 مع تلك المضادات التي ابدت البكتريا المرضية مقاومة لها، وقد أظهرت نتائج الدراسة بأن عزلات البكتريا المرضية أظهرت مقاومة عالية تجاه بعض المضادات عند أستعمالها لوحدها، فيما ازدادت الفعالية التثبيطية للمضادات الحيوية عند خلطها مع البكتريوسين المنقى، إذ قورنت اقطار مناطق

التثبيط التي احدثتها المضادات الحيوية لوحدها والمضادات الحيوية المخلوطة مع البكتريوسين المنقى مع اقطار مناطق تثبيط اقراص أوراق الترشيح المغمورة في البكتريوسين المنقى(سيطرة موجبة) والماء المقطر المعقم (سيطرة سالبة)وتم تحديد النتائج بوصف البكتريا مقاومة (R) أو حساسة (S) وكما هو موضح في الجدول (5) والشكل (4).

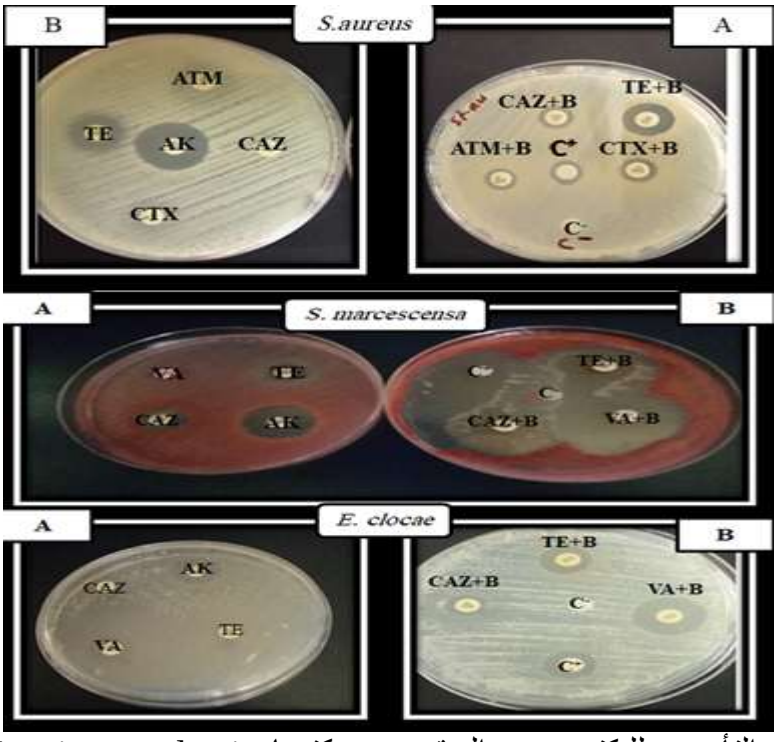
جدول (5) :التأثير التآزري للبكتريوسين المنتج و المنقى من العزلة L.lactis ssp. lactis (Lc4) مع بعض انواع المضادات الحيوية ضد البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية

العزلات المرضية	المضادات الحيوية									
	CTX	CTX + B	CAZ	CAZ + B	TE	TE + B	ATM	ATM + B	VA	VA + B
S .aureus	R	R	R	R	R	S	R	R	/	/
S. epidermidis	R	S	R	S	R	S	R	S	/	/
P. aeruoginosa	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
E .coli	/	/	R	S	/	/	/	/	R	S
S. marcescens	/	/	R	S	R	S	/	/	R	S
E. clocae	/	/	R	R	R	S	/	/	R	S

(CAZ) Cefotaxime :(IPM) Ceftazidime :(TE): Tetracycline :(ATM): Aztreoname (VA) Vancomycin (S): حساسة (R)مقاومة: (B): البكتريوسين(/) لم يجري لها اختبار كونها حساسة للمضاد.

يتضح من خلال الجدول إن بكتريا S. aureus اصبحت حساسة تجاه المضاد Tetracycline ، فيما اصبحت بكتريا S. epidermidis حساسة تجاه المضاد Ceftazidime,Cefotaxime ,Aztreoname ,Tetracycline، أما بكتريا P.aeruginosa فقد اصبحت حساسة للمضاد Cefotaxime, Vancomycin, Aztreoname ، أما بكتريا E.coli فقد اصبحت حساسة للمضاد Vancomycin و Ceftazidime، فيما أصبحت بكتريا E.clocae حساسة للمضاد Vancomycin و Tetracycline، وأصبحت بكتريا S. marcescens حساسة للمضاد Tetracycline, Ceftazidime و Vancomycin بعد ان كانت مقاومة لها، أن أهم الستراتيجيات الحديثة للتغلب على مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية هو أستعمال مزيج من المركبات والمضادات الحيوية لزيادة فعاليتها تجاه البكتريا المرضية، إذ لوحظ وجود تأثير تآزري فعال عند اتحاد Artocarpin مع Norfloixacin ضد بكتريا E.coli، ووجد أيضاً أن Artocarpin زاد من الفعالية التثبيطية لمضادات Norfloixacin Tetracycline, وAmpicillin ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام **(Septama&Panichiyupakarunant,2016)** ، كما لوحظ أن هنالك تأثيراً تأزرياً عند خلط Nisin أو Pediocin مع Polymyxin تجاه البكتريا المرضية، إذ أن الخليط المكون من Nisin و Pediocin يثبط نمو بكتريا E.coli المقاومة Polymyxin، إلا أن الخليط

المكون من Nisin و Pediocinكان فعالاً ضد بكتريا L. Monocytogenes المسببة للتلف الأغذية **(Naghmouchi et al.,2011)**، كما وجد أن هنالك تأثيراً تآزرياً بين بكتريوسين Colistinمع بكتريوسين Nisin يؤدي إلى تثبيط نمو بكتريا E.coli **(Naghmouchi et al., 2013)** ، أنسجمت تلك النتائج مع ماوجده وآخرون **Draper et al., (2013)** أن هنالك تأثيراً تآزرياً عند خلط Lcticin 3147 وPolymyxin B في تثبيط الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام. وجد أن Polymyxin والذي ينتج من بكتريا Bacillus polymxa المستعمل في علاج الكثير من الحالات السريرية والمعروف بأسم كوليستين، إذ يتحد مع الدهون في طبقة متعددة السكريات الدهني للخلية البكتيرية مما يؤدي الى زياده نفاذية الخلية ولكن وجوده بتراكيز عالية في العلاج له تاثيراً سام وخطير على الجهاز الكلوي والعصبي، لذلك **Filed(2016)** أن تحديد الحد الادنى المثبط من Polymyxin وخلطه مع Lcticin 3147 كان له تاثيراً تآزرياً ضد عدد من الأنواع السالبة لصبغة كرام مع أنخفاض سمية الكولستين . فيما وجد **Gicomette(1999)** أن للنايسين تأثيراً تآزرياً مع Polymyxin E وClamithromycin في تثبيط بكتريا P. aeruginosa، كما أشار **Ahire & Dicks (2015)** أن هنالك تأثيراً تآزرياً بين النايسين وثنائي هيدروكسيد البنزويك 2-3-Dihydroxbenzoic acid (DHBA) ودمجها في اليياف نانوية محضره من بولي لاكتيد(PDLLA) D-L-Lctide و متعدد اوكسيد الايثيلين Poly ethylene oxide(PEO) إذ أن له تاثير تثبيطي على تكوين الغشاء الحيوي في المكورات العنقودية الذهبية المقاومه للميثيسيلين، كما وجد **Che & Holo(2018)** أن هنالك تأثيراً تآزرياً عند خلط Nisin المنتج من L.lactis و GarvicinKS المنتج من L. garvieae مع Polymixin و Farnesol في تثبيط كلاً من بكتريا E. coli ,P. aeruginosa و S. aureus ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، فيما دمج بكتريوسين النايسين مع مادة تحتوي على السليلوز مثل hydroxyl poly metheyl cellulose وذلك بادخال النايسين الى محلول مادة السليلوز لتكوين غشاء صالح للأكل وفعال ضد البكتريا **(Coma et al.,2001)**، فيما اشارت **Aziz at el., (2019)**الى وجود تأثيراً تآزرياً بين البكتريوسين المنقى والمنتج من بكتريا Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris والمضادات الحيوية التي أظهرت عزلات البكتريا المسببة للأسهال مقاومة لها، إذ لوحظ زيادة الفعالية التثبيطية لبعض تلك المضادات الحيوية المخلوطة مع رائق البكتريوسين المنقى تجاه تلك العزلات.



شكل(4): التأثير التآزري للبكتريوسين المنقى من بكتريا L. Lactis ssp. lactis مع بعض المضادات الحيوية تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام: (C^-) سيطرة سالبة قرص ورقة ترشيح مغمور في ماء مقطر معقم(C^+)أنموذج مقارنة ورقة ترشيح مغمورة بالبكتريوسين النقي (A)،حساسية ومقاومة عزلات البكتريا المرضية تجاه المضادات الحيوية (B)التأثير التآزري بين البكتريوسين المنقى واقراص المضادات الحيوية.

(CAZ):Ceftazidime ; (TE): Tetracycline; (VA) :Vancomycin
;(CTX):Cefotaxime; (ATM):Aztreoname; (AK) :Amikacin
(CAZ+B):Ceftazidime+Bacteriocin; (CTX+B):Cefotaxime+Bacteriocin;
(TE+B): Tetracycline+Bacteriocin; (ATM+B) :Aztreoname +Bacteriocin;
(VA+B):Vancomycin + Bacteriocin

References:

1. Acharya, Sonu .(2016) . Probiotics: Curr knowl update. 1(2):79-83.

2. Ahire, J. and Dicks, L. (2015) Nisin incorporated with 2,3dihydroxybenzoic acid in nanofibers inhibits biofilm formation by a methicillin-resistant strain of Staphylococcus aureus. Probiotics Antimicrob Proteins 7, 52 –59.

3. Al-Alak, Sh., KH. And Qassim, D., K. (2016) Molecular identification of 16S rDNA gene in Staphylococcus aureus isolated from wounds and burns by pcr technique and study resistance of fusidic acid. Iraqi JCancer and Medical Genetics, 9(1): 25-29.

4. Alfred, E.B. (2007). Benson's microbiological applications in laboratory manual in general microbiology. 10th ed. McGraw-Hill companies. New York.

5. Alnuaimi, Ula Abdul Kareem Kadom .(2015).Study the Effect of Probiotic on Biofilm Formation and Production Protease Enzyme by Pseudomonas aeruginosa Isolated from Contaminated Burns and Wound. MSC thesis. College of Basic Education Al- Mustansiriya University. Iarq.

6. Aziz ,Khalid Esmahel .(2015) .Biological, Molecular characteristics and antimicrobial activity of Nisin produced by Lactococcus lactis subsp. lactis Isolated from Raw Milk. Ph.D Thesis. College of Science-Al-Mustansiriyah University.Iarq.

7. Aziz,Raghad Akram ,Salman, Jehan Abdul Sattar and Hachim, Omar Abdul Hussain.(2019) .Study of the Synergistic effect between produced bacteriocin from Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris Against Multi Resistance Diarrheal Bacteria.J.I.Mark.Res.C.Prot.(1):11

8. Bachoon, D. S. and Wendy, A.(2008). Microbiology Laboratory Manual. Ed. Michael Stranz. Mason, OH: Cengage Learning. Exercise 8, "Selective and Differential Media for Isolation."

9. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

10.Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S.; Morse, S.A. and Mietzner, T.A. (2013). Jawetz , Melnick and Adelbergs medical microbiology . 26th ed. McGraw-Hill. United States.

11.Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C., Vignolo, G.,) 2017(. Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid Bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments. Microorganisms. 5: 38.

12.Chi H and **Holo** H.(2018).Synergistic Antimicrobial Activity Between the Broad Spectrum Bacteriocin Garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. Curr Microbiol. 75(3):272–277. doi:10.1007/s00284-017-1375-y.

13.CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute.(2017). standards for antimicrobial susceptibility Testing; Twenty-Second informational supplement. CLSI Document M100S26.Wayne,PA:Clinical and Laboratory Standards Institute.

14.Coma, V.; Sebti, J.; Pardon , P.; Deschamps, A. and Pichavant, F.H. (2001) Antimicrobial edible Packaging based on cellulosic, ether, Fatty acids

and nisin in corporation to inhibit Listeria innocua and Staphylococcus aureus. JFood Protection , 64: 470-475.

15.deCosta ,RogerJ.; Voloski ,avia L.S.; . Mondadori , RafaelG2.; Duval,Eduarda H. and Fiorentini, Angela M.(2019). Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. J.Food Quality. ID 4726510, 12 pages.

16.Ennahar, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocin biosyntheses , structure and activity. FEMS Microbiol Rev. 24: 85-106.

17.Fadhel, Ayah Natiq .(2013). Comparative Study on Pathogenicity of Techoic Acid Extracted From Methicillin Resistance Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. , M.Sc. Thesis, College of Science - University of Baghdad ,Iraq.

18.Field, D., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. (2015) Bioengineering of the model lantibiotic nisin. Bioengineered 6, 187–192.

19.Garsa, A. K; Kumariya, R. ; Sood, S. K. ; Kapila,S. and Kumar, A. (4102) .Bacteriocin Production and Different Strategies for Their Recovery and Purification. Probiotics & Antimicro. Prot. 6:47–5.

20.Giacometti, A., O. Cirioni, F. Barchiesi, M. Fortuna, and G. Scalise. (1999). In-vitro activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against Pseudomonas aeruginosa. J. Antimicrob. Chemother. 44:641–645.

21.Goldman, E., H.,Green, Lorrence.(2015). Practical Handbook of Microbiology, Third Edition.

22.Goldman, E., H.G., Lorrence. (2009) . Practical Handbook of Microbiology .2nd. Ed. Taylor and Francis Group.

23.Gupta, S. S. ; De Witt, N. D. ; Allen, K. E. and Slayman C, W. (1998), Evidence for a salt bridge between transmembrane segment and 6 of the yeast plasma - membrane H + ATPase, J. Biol. Chem. 328-334.

24.Hashium, Abdulkareem Jasim ;Hamza, Subhi Jawad ;Aldujaili, Nawfal Hussein .(2010). Antimicrobial Activity of Bacteriocin Produced by Weissella cibaria NRIC0136 . JKufa University.(2)(1):1-10.

25.Hassan , M; Kjos,M.; Nes,I.F .; Diep,D.B. and F. Lotfipour .(2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria:characteristics and potential applications to fight against .J.Appl Microbiology:723-736.113.

26.Hassan,Suzan Saadi and Obaid,Kattam Ali.(2017).Study the effect some Antibiotics on bacteria Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus isolated flames of wounds and burns.J.U.B.(1):25.

27.Issa ,Issraa Hamza Yassin.(2019). Genotyping study of Methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from wounds and burns. . Ibn Al-Haitham - University of Baghdad as a partial .Iarq.

28.Janson, J. C. and Rydén, L. (1998) . Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications. New York: John Wiley and Sons.

29.Jebur ,Marwa Lafta.(2018) .Molecular study of imipenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from different clinical samples. MSC Thesis. Ibn Al-Haitham - University of Baghdad as a partial .Iarq.

30.Joseph, N. M .; Sistla, S .; Dutta, T. K .; Badhe, A. S .; Rasitha, D. and Parija, S. C. (2011). Reliability of Kirby-Bauer disk diffusion method for detecting meropenem resistance among non-fermenting gram- negative bacilli. Indian J. Pathol. Microbiol. 54: 556-560.

31.Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4Nature. 227(5259):680–285.

32.Lee, J. and Im, W. (2018). Modeling and simulation of outer membrane proteins in Pseudomonas aeruginosa outer membranes. Biophysical Journal. 114(3): 241a.

33.Levinson, W. (2016). Review of medical microbiology and immunology. 14th ed., McGraw-Hill Education, USA.

34.Loh JY, Lim Y.Y and Ting A S Y, .(2017).Bacteriocin-like substances produced by Lactococcus lactis subsp. lactis CF4MRS isolated from fish intestine: Antimicrobial activities and inhibitory properties. IntFood Res J; 24(1): 394-400.

35.Mendoza, Remilyn & K Baybay, Z & Fernando, Lilia & Montecillo, Andrew & Ilag, Leodevico & Villegas, Lucille. (2019). Characterization of gold nanoparticles produced by biogenic synthesis using Serratia marcescens NBL1001. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 230.

36.Misra, R. and Bavro, V.N. (2009). Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)Proteins and Proteomics. 1794(5): 817-825.

37.Mitra, Dipika; Yadav, Amitabh; Prithyani, saurabh; John, Ligi Elsa; Rodrigues, Silvia; Shah, Rohit;. (2019). The antiplaque efficacy of lantibiotic Nisin ectract mouthrinse. Jindian Society of Periodonotology, 23, pp. 31-34.

38.Mulla Khalil,Ammar Khaled Shihab .(2012).Isolated and diagnosed some wounds infection and study effect of laser on these causes. . MSC thesis. College of Science- Tikrit University. Iarq.

39.Naghmouchi, K.; Baah, J.; Hober , D.; Jouy, E.; Rubrecht , C.; Sané , F. and 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 .J. Antimicrob Agents Chemother.. 57(6): 2719–2725.

40.Naghmouchi, K.; Belguesmia, Y.; Baah, J.; Teather, R. and Drider, D. (2011). Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of Listeria monocytogenes and Escherichia coli. Res. Microbiol. 162:99–107.

41.Patel, G. and Bonomo, R.A. (2011). Status report on carbapenemases: challenges and prospects. Expert Review of Anti-infective Therapy. 9(5): 555-570.

42. Pedersen , S. S; Hoiby, N.; Espersen, F. and Koch, C.H. (2018). Role of alginate in inhibition with mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Thorax. 47: 6-13.

43.Preet, S., Bharati, S., Panjeta, A., Tewari, R. and Rishi, P. (2015) Effect of nisin and doxorubicin on DMBA-induced skin carcinogenesis - a possible adjunct therapy. Tumour Biol 36:1 –8.

44.Rajaram, T.; Panjatcharam, V. and Abirami, G. (2013). Inhibitory Effect of Different Antibiotics on Nosocomial Pathogen Serratia Marcescens. Int J P Appl Zoology. 1:(1).

45.Roy, A.S.; Parveen, A.; Kuppakar, A.R. and Prasad, M.N.N.A.(2010).Effect of nano-titanium dioxide with different antibiotics against methicillin resistant Staphylococcus aureus. J.Biomat Nanobiot. 1:37-41.

46.Salim, Zahraa Kareem.(2019) . Identification of Serratia marcescens isolated from neonatal sepsis using some typing methods, M.Sc. Thesis, University of Mustansiriyah ,Iraq.

47.Sarmah P, Dan MM, Adapa D.(2017).Antimicrobial Resistance: A Tale of the Past becomes a Terror for the Present. Electronic Journal of Biology, Vol.13(4): 420-426.

48.Septama, A.W. and Panichayupakaranant, P. (2016). Synergistic effect of artocarpin on antibacterial activity of some antibiotics against methicillin resistant Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Escherichia coli. Pharm Biology J . 54(4):686691.

49.Sezaee, Tiba Ayad Ahmed.(2019) .Molecular study of some virulence factors of Enterobacter cloacae and the effect of alcoholic extract of chili

pepper. MSC Thesis. Ibn Al-Haitham - University of Baghdad as a partial .Iarq.

50.Shin,J.M.; Gwak,J. W.; Kamarajan,P.; Fenno,J.C.; Rickard,A.H. and Kapila,Y.L.(2015). Biomedical applications of nisin . J.Appl Micr. 120:1449–1465.

51.Suárez, A. M.; Azcona, J. I.; Rodríguez, J. M.; Sanz, B. and Hernández, P. E. (1997) Onestep purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. Applied and Environmental Microbiology, 63(12):4990–4992.

52.Tidona, Flavio ;Meucci, Aurora ;Povolo, Milena; Pelizzola ,Valer ;Zago ,,Miriam ;Contarini, Giovanna ;Carminat, Domenico ;Giraffa, Giorgio .(2014) .Applicability of Lactococcus hircilactis and Lactococcus laudensis as dairy cultures .Int J.Food Microbiol.0-2: 420.

53.Wang, M(2004).Activites of news Quinolones against Escherichia coli and Klebsiella Pneumona Containing the plasmid – Mediated qauinolone resistantdeterminate. J. Clin . Med 48(4) : 140.`

54.Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. Prescott, Harley. (2008). Klein's microbiology. 7th.Ed. In: Mouni, F., Aissi, E., Hernandez, J., Gorocica, P., Bouquelet, S., lenteno, E., Lascurain, R., Garfias, Y (2009). "Effect of Bifidobacterium bifidum DSM 20082 cytoplasmic traction on human immune cells". Immunological Investigations. 2009. Vol. 38. p. 104-115.

55.Yaseen ,Najlaa Nabhan.(2015). Effect of β-lactam resistance genes on physiological factors in uropathological Escherichia coli isolates, Ph.D. Thesis, College of Science -University of Baghdad .Iarq.

56.Zhang H.;and Cai ,Y.(2014). Lactic Acid Bacteria, Springer Science DOI: 10.1007/978-940178841-0 8.

Study of the Synergistic effect between purified and produced bacteriocin from bacteria Lactococcus lactis ssp. lactis Against Species of Pathogenic bacteria

Alaa Hussein Hamel[a] , Jehan Abdul Sattar Salman [b], Raghad Akram Aziz [c],
a. M.Sc.College of Basic Education- Mustansiriyah University- Baghdad, Iraq.
b. Prof. PhD. College of Science -Mustansiriyah University- Baghdad, Iraq.
c. Prof. PhD. College of Basic Education -Mustansiriyah University- Baghdad, Iraq.

Abstract:

This study confirmed the diagnosis of eight isolates of Lactococcus lactis ssp. lactis based on cultural ,microscopical, biochemical tests and as well as Confirm the diagnosis with VITEK 2 system,While six isolates were collected from the pathogenic bacteria, including both bacteria Saphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aerouginosa ,Escherichia coli , Enterobacter clocae and Serratia marcescens these isolates were identified by cultural ,microscopical, biochemical tests as well as VITEK 2 system. Antibiotic susceptibility of isolates was tested against (9) of antibiotics.Results showed that all isolated were resist to ceftazidime and all of them were sensitive to ciprofloxacin ,Imipenem ,Meropenem and Amikacin ,While variable in resistance against other antibiotics. Screening from isolates L. Lactis spp. lactis was done by the well diffusion method , The results showed that L. lactis ssp. lactis (Lc4) was the most efficient in producing bacteriocin as well observed inhibitory activity increased by increasing its concentration and that the concentration of the filtrate twice was better in obtaining higher inhibition diameters compared to the one- fold concentration The concentrated bacteriocin was purified using the gel filtration column and Sephacryl S-200. The results showed the high inhibitory activity of the bactericin purified compared to the one-fold concentration and two-fold before purification. Synergistic effect between purified bacteriocin and the product of isolation L. lactis ssp. lactis (Lc4) with some the antibiotics as anantibiotic Cefotaxime, Tetracycline, Aztreoname, Vancomycin and Ceftazidime was observed, as the effectiveness of these antibiotics increased with the presence of purified bacteriocin.

Keywords: Synergistic effect, bacteriocin, .Lactococcus lactis ssp. lactis, antibiotics, Pathogenic bacteria**.**