Assiut University web-site: www.aun.edu.eg

DETERMINATION THE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS PYOCYANIN DYE PRODUCED FROM BACTERIA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

BUTHINA ABDULHAMEED ABDULLAHA

Assistant Professor of Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology

Received: 31 March 2016; **Accepted:** 30 April 2016

ABSTRACT

This study was conducted from the beginning of the month November to the end of the month of December 2013. The sample was obtained from the Faculty of Science / University of Tikrit, the sample has been confirmed by using biochemical tests. And also conducted extracted DNA from bacteria *P.aeruginosa* to know the gene responsible for the production of pyocyanin and an electrophoresis that has led to the emergence of packages specific prefixes that indicate the presence of specific gene for pyocyanin in chromosome of P.aeruginosa. The results showed that isolated sample has produced the highest amount of the pyocyanin (23.41µg/ml). We studied the effect of pyocyanin on the growth of some types of bacteria and the results showed that the pyocyanin an effective impact on the inhibition of the growth of bacterial species including, Escherichia coli, E.faecalis Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, and also had an impact on bacteria P.aeruginosa.

Key words: *Biological, Effectiveness, Pyocyanin Dye Produced, Pseudomonas, Aeruginosa.*

تحديد الفعالية البيولوجية صبغة Pyocyanin المنتجة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

بثينة عبد الحميد عبد الله

(فرع الادوية والفسلجة) جامعة تكريت - كلية الطب البيطري

E-mail: buthinaabad67@yahoo.com Assiut University web-site: www.aun.edu.eg

اجري العمل بالبحث للفترة من بداية شهر تشرين الثاني الى نهاية شهر كانون الأول لعام ٢٠١٣ إذ تم الحصول على العينة من كلية العلوم جامعة تكريت وقد تم تأكيد العينة باستخدام الفحوصات البيوكيمياوية.

كما تم أيضا استخلاص DNA لبكتريا *P.aeruginosa* لمعرفة الجين المسؤول عن انتاج pyocyanin واجراء الترحيل الكهربائي الذي أدى الى ظهور حزم للبادئات المخصصة التي تشير الى وجود الجينات المخصصة عن pyocyanin في كروموسوم *P.aeruginosa*.

وقد أظهرت النتائج أن العزلة قد أنتجت أعلى كمية من ال pyocyanin والتي تبلغ (23.41µg/ml).

كما تم دراسة تأثير ال pyocyanin على نمو بعض أنواع البكتريا وأظهرت النتائج أن للبايوسيانين تأثير فعال على تثبيط نمو أنواع بكتيرية منها *Escherichia coli, E.faecalis Staphylococcus aureus, Salmonella typhi,* وأيضاً كان له تأثير على بكتريا *P.aeruginosa* .

المقدمـة
INTRODUCTION

تـعد بـكتريا *Pseudomonas aeruginosa* مـن المسببـات المـرضية الانتـهازيـة (Opportunistic Pathogens) التي نادرا ما تسبب المرض في الأشخاص الأصحاء ، ولكنها تشكل خطرا حقيقيا للمرضى الراقدين في المستشفيات ،إذ تعد أهم الأنواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالإصابة المكتسبة في المستشفيات (Nosocomial infection) إذ تتمكن من أن تتواجد على أرضية ردهات المستشفيات وصالات العمليات ، والأدوات الجراحية وغيرها ، كما تمتلك القدرة على البقاء في المواد المطهرة وبعض أنواع المعقمات (Greenwood *et al.*, 2007).

Corresponding author: BUTHINA ABDULLAHA
E-mail address: buthinaabad67@yahoo.com
Present address: Assistant Professor of Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology

توصف بكتريا *P.aeruginosa* بأنها متعددة البراعات (Versatility) إذ يمكنها استخدام أنواع مختلفة من المواد الأولية كمغذيات وذلك لامتلاكها أنزيمات متعددة ومتنوعة تمكنها من إنجاز عمليات أيضية مختلفة في أعضاء مختلفة في الجسم إذ تتمكن من إصابة ذوي المناعة المثبطة، وإصابات المستشفيات والجروح والحروق ومرضى زراعة الأعضاء وغيرها، كما تعرف بأن لها قدرة على التكيف للظروف غير الطبيعية ومنها.

امتلاكها مستوى عالياً من المقاومة لمعظم أنواع المضادات الحيوية (Balch and Smith, 1994; Lyczak *et al*., 2000 and Doring, 1993)

تتصف بكتريا *P.aeruginosa* بأنها من الميكروبات الشائعة والواسعة الانتشار (Ubiquitous) إذ توجد في الترب والمياه وكفلورا جلدية وفي معظم البيئات الصناعية ، ولهذا فهي تستعمر العديد من البيئات الطبيعية والصناعية ، إذ يمكن الكشف عنها في البيئات غير الحية مثل خزانات المياه الملوثة بفضلات الإنسان أو الحيوان وفي فضلات مياه المستشفيات ولأنها تفضل البيئات الرطبة فهي لذلك توجد ملوثة للأجهزة الطبية ومن ضمنها القاطرCatheters مسببة إصابات مختلفة عند استخدامها (Willey *et al*.,2008; Lyczak *et al*., 2000)

تتمكن سلالات P.aeruginosa من إنتاج أنواع من الصبغات وهي صبغة البايوسيانين Pyocyanin التي تتصف بأنها صبغة زرقاء مخضرة تذوب في الماء والكلوروفورم ، وصبغة الفلورسين Fluorescen الأصفر المخضر التي تذوب في الماء ولاتذوب في الكلوروفورم، وصبغة البايوروبين Pyorubin التي يكون لونها أحمر داكناً، والبايوميلانين Pyomelanin ذات اللون الأسود (Todar, 2004). إن أهم أنواع الصبغات المنتجة هي البايوسيانين (Hassan, H.M. and Fridovich, I 1980) أن للبايوسيانين فعالية مضادة لأنواع بكتيرية وفطرية مختلفة (Antibacterial) وهو قاتل لأنواع عديدة من البكتريا (bacteriocidal) منها :-

Escherichia coli,Staphylococcusaureus تلاحظ فعاليته القاتلة على أطباق الأكار كمنطقة شفافة حول مستعمرة البكتريا المقاومة وهذه الفعالية تسمح للبكتريا المنتجة له بالتنافس مع البكتريا الأخرى التي تشغل نفس المكان. إضافة لذلك فإن للبايوسيانين تأثيراً علاجياً متنوعاً على خلايا حقيقية وبدائية النواة ، إضافة لذلك فإن للبايوسيانين تأثيراً علاجياً متنوعاً على خلايا حقيقية وبدائية النواة (Saha *et al*., 2008).

المواد وطرائق العمل
MATERIALS AND METHODS

المواد Materials:

الأدوات والأجهزة المختبرية Equipments and apparatus:

جدول رقم (2-1) الأدوات والأجهزة المختبرية المستخدمة في البحث.

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة وبلد المنشأ
1	Autoclave الموصدة	Gallenkamp/England
2	Centrifuge جهاز الطرد المركزي	Hettich EBH.20/German
3	Incubator حاضنة	Memmert/Germany
5	Microscope مجهر ضوئي	Olympus/Japan
6	pH meter مقياس الرقم الهيدروجيني	Hanna/Porlugal
7	Electric balance ميزان كهربائي حساس	Hangping JA 1003/Japan
9	spectrophotometer عداد المطياف الضوئي	Cecil/France
11	Millipore filter(0.45) أوراق ترشيح	Germany
13	Digital Camera كاميرا رقمية	Sony/Japan
14	Refrigerator ثلاجة	Ishtar/Iraq
15	flasks Volumertric دوارق حجمية	Jlassco (India)

المواد الكيمياوية والبايولوجية Chemicals and biological materials

المواد الكيمياوية :جدول (2-3) المواد الكيمياوية المستخدمة في الدراسة

ت	المواد الكيمياوية Materials	المنشأ (Company)
1	كلوروفورم Chloroform	Chloroform
2	حامض الهيدروكلوريكHCl	BDH/England
3	كبريتات البوتاسيوم K2SO4	BDH/England
4	كلوريد المغنيسيوم MgCl2	BDH/England
5	Peptoneببتون	Microbiologie/ Germany

الأوساط الزرعية الجاهزة :

حضرت الأوساط الزرعية المذكورة أدناه بحسب تعليمات الشركة المصنعة لها والمثبتة على العبوات الخاصة بكل منها.

جدول (3-3) الأوساط الزرعية والغرض من استخدام كل الوسط.

ت	الوسط الزرعي Medium	الشركة المصنعة وبلد المنشأ	الغرض من استخدامه
1	وسط الدم الصلب Blood agar base	Himedia/India	للتحري عن قابلية البكتريا على تحلل الدم وتحديد نوع التحلل.
3	وسط الماكونكي Mac Conkey agar	Himedia/India	لتنمية البكتريا السالبة لصبغة جرام وقابليتها على تخمير سكر اللاكتوز.
4	وسط مولر هنتون الصلب Muller Hinton agar	Oxoid/England	لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيويه.
5	الوسط المغذي الصلب Nutrient agar	Himedia/India	للتعرف على الصفات المظهرية للمستعمرات ولحفظ العزلات لفترة قصيرة باستخدام المائل Slant .
6	الوسط المغذي السائل Nutrient broth	Himedia/India	لتنشيط البكتريا وتحضير التخافيف البكتيرية.
7	وسط أجار اليوريا الأساس Urea agar base	Himedia/India	للتحري عن قابلية البكتريا في أنتاج أنزيم اليوريز Urease
8	وسط سيمون ستريت Simmon Citrate	Himedia/India	للكشف عن قابلية البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون

المضادات الحيوية Antibiotic discs

جدول (3-4): المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار حساسية عزلات بكتريا *P.aeruginosa*

ت	اسم المضاد	الرمز العالمي	التركيز مايكروغرام/ قرص	الشركة المصنعة
1	Amikacin	AK	30	Bioanalyse (Turkey)
3	Amoxicillin Clavulanic-acid	AMC	30	
4	Cefotaxime	CTX	30	
5	Ciprofloxacin	CIP	5	
6	Chloramphenicol	C	30	
7	Neomycin	N	30	

العزلات البكتيرية

جدول (3-5) العزلات البكتيرية المستخدمة في البحث ومصادرها.

ت	العزلات البكتيرية	المصدر	تأكيد التشخيص
1	*E.coli* -	تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة تكريت	تم تأكيد تشخيصها اعتماداً على الصفات الزرعية والفحص المجهري والتشخيص الكيموحيوي وكما جاء في Cruickshank وآخرون عام (1975)، Collee وآخرون (1996) و Suhouen وآخرون عام (1999) .
2	*S.aureus* +		
3	*S.typhi* -		
4	*P.aeruginosa* -		
5	*E.faecalis* +		

طرائق العمل:

الأوساط الزرعية المحضرة:-

تم تحضير الاوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المنتجة وتم تعديل الرقم الهيدروجيني باستخدام NaOH (0.1 N) أو (0.1 N) HCl .

وسط أجار الدم الصلب Blood Base Agar
بعد تحضير وزن معين من وسط أجار الدم الصلب حسب تعليمات الشركة المصنعة وتعقيمه بدرجة حرارة121° م وضغط 15 باوند /أنج لمدة 15 دقيقة ، ترك ليبرد بدرجة حرارة 50° م وأضيف إليه الدم البشري المعقم بنسبة 10% ووزع على أطباق بتري معقمه.

وسط اختبار الحركة Motility test medium
استخدم للتحري عن قابلية البكتريا على الحركة ،حضر بإضافة 0.5% من الاجار- أجار إلى الوسط المغذي السائل ،عقم بالموصدة (Autoclave) ، ووزع على أنابيب اختبار ثم لقح بالحقن (Cruickshank *et al* ., 1975 and Collee *et al*.,1996).

وسط اليوريا الصلب urea media
بعد تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة وتعقيمه بالموصدة (Autoclave) ترك ليبرد وأضيف إليه (20%) يوريا معقمة بالترشيح ، صب في أنابيب معقمة بشكل مائل وحفظ بدرجة 4°م لحين الاستخدام (Collee *et al* ., 1996) .

وسط ماكونكي أجار MacConkey agar
ببيتون 17 g - بروتيوز بيبتون 3 g - لاكتوز 10 g - املاح الصفراء 1.5 g - كلوريد الصوديوم 5 g - الأحمر المحايد 0.03 g - اجار 13.5 g - ماء - يضاف ليصل المجموع ١ لتر ،ويعدل اس هيدروجينيإلى 7 ويعقم فى الاتوكلاف ثم يوزع فى أطباق بترى معقمة.

وسط Pseudomonas broth (PB)
حضر من أذابة 20 غم ببتون peptone و1.4غم كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ و10غم كبريتات البوتاسيوم $K2SO_4$ في لتر من الماء المعقم ماء وضبط الاس الهايدروجيني عند 7.2-7.4 باستخدام NaOH (1N).(Essar *et al*., 1990)

وسط اختبار الأندول Indol test
استخدم الوسط للتحري عن أيض التربتوفان في البكتريا ،حضر من إذابة 20 غم من الببتون و5 غم NaCl في لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.4 قبل التعقيم بالموصدة (Cruickshank *el al*., 1975 and Collee *et al*., 1996)

الكواشف والمحاليل :-
كاشف كتاليز Catalase
استخدم للتحري عن إنتاج البكتريا لأنزيم Catalase، وقد حضر بتركيز3 % (Collee *et al*., 1996)

كاشف الاوكسيديز Oxidase
استخدم للتحري عن قابلية البكتريا عن إنتاج أنزيم Oxidase ، وقد حضر بتركيز 1% بعد أن تم إذابة 0.1 غم من كاشف (Tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride) في 10مللتر من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة، واستعمل آنيا (Collee *et al*., 1996).

كاشف كوفاك Kovac
حضر بإذابة 5 غم من P-dimethyl aminobenzaldehyde في 75مللتر كحول أيزوأميلي ثم أكمل الحجم الى 100مل باستخدام حامض الهيدروكلوريك المركز ببطء ليصبح لون الكاشف أصفر شاحباً وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام (Cruickshank *et al*., 1975 and Collee *et al*., 1996).

كاشف المثيل الأحمر Methyl Red (MR)
حضر بإذابة 0.1 غم من المثيل الأحمر في 300 مل كحول أثيلي (95%) ثم أكمل الحجم إلى 5.0مل باستخدام ماء مقطر (Cruicshank *et al*., 1975 and Collee *et al*., 1996)

محلول كاشف Voges-Proskauer (VP)
يتكون من محلولين:
أ- كاشف ألفا-نافثول 5% :حضر بأذابة 5غم من ألفا-نفثول وأكمل الحجم إلى 100مل باستخدام كحول أثيلي (99%).
ب- كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم 40% : حضر بإذابة 40 غم من KOH في 100مل من الماء المقطر
(Cruickshank *et al*., 1975 and Collee *et al*., 1996)

التعقيم Sterilization
التعقيم الرطب (Autoclaving) wet sterilization :
عقمت الأوساط الزرعية باستخدام التعقيم الرطب واستعملت فيه الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة121°م وضغط 15 باوند/أنج[2] ولمدة 15-20 دقيقة عدا الأوساط التي احتاجت إلى طرق تعقيم أخرى والتي ذكرت في فقرة تحضيرها (Cruickshank *et al*., 1975) .

حفظ السلالات البكتيرية وإدامتها :
حفظت العزلات البكتيرية بعد تشخيصها على أوساط زرعيه مائلة Slants من الأجار المغذي Nutrient agar في الثلاجة بدرجة 4°م واستمرت عملية الإدامة بشكل دوري شهرياً من خلال تجديد زرعها على أوساط جديدة لضمان بقائها نشطة طيلة مدة الدراسة، وهذا الحفظ يعد قصير الأمد. أمكن إدامة العزلات البكتيرية مزروعة على أطباق حاوية على Nutrient Agar وحفظت في الثلاجة بدرجة 4°م لعدة أسابيع.

الحصول على العينات Obtain samples
تم الحصول على العينات من كلية العلوم جامعة تكريت وكانت معزولة بشكل تام.

زرع العينات
تم زرع العينات على وسط MacConkey agar وحُضِنَتْ في درجة 37° م لمدة 24 ساعة ثم نقلت المستعمرات المفردة غير المخمرة لسكر اللاكتوز التي تبدو شاحبة pale على الوسط.

التشخيص Identification :
تم تشخيص العزلات النامية باستخدام الاختبارات المظهرية والمجهرية والكيموحيوية وفق ماورد في Cruickshank وآخرون (1975) ، Collee وآخرون (1996) ،

اختبار Catalase
تم إجراء الاختبار بأخذ مستعمرة مفردة باستخدام الناقل (Loop) ومزجت مع بضع قطرات من كاشف H_2O_2 بتركيز 3 % ولوحظت النتيجة الموجبة بظهور فقاعات على الشريحة الزجاجية.
(Cowan and Steel's.1993)

اختبار Oxidase
تم إجراء الاختبار بوضع بضع قطرات من كاشف Oxidase على ورقة ترشيح ثم نقلت مستعمرة مفردة باستخدام عود خشبي ووضعت على موضـــع القطـــرة. إن ظهـــور اللـــون الأزرق الارجواني بعد 5-10 ثـــوانٍ دلالـــة على إيجابيـــة الاختبار. (1993 (Cowan, and Steel's

اختبارات IMViC
A– اختبار الأندول Indol test
لقح ماء الببتون بمزروع العزلة المراد اختبارها ثم حضنت عند درجة حرارة 37° م لمدة 24-48 ساعة وأضيفت 0.5 مللتر من كاشف Kovac ،عُدّت نتيجة الاختبار موجبة عند ظهور حلقة حمراء على سطح الوسط . (Cowan and Steel's. 1993).

B- اختبار المثيل الأحمر Methyl red test
لقح ماء الببتون بمزروع العزلات البكتيرية وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 -48 ساعة ، ثم أضيف إليه خمس قطرات من كاشف المثيل الأحمر، إنَّ تحول الوسط إلى اللون الأحمر دلالة على النتيجة الموجبة .(Cowan and Steel's. 1993)

C– اختبار Voges Proskauer test
لقح ماء الببتون بمزروع العزلات البكتيرية وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة ، ثم أضيف 1مل من كاشف هيدروكسيد الصوديوم و 3 مللتر من كاشف إلفا-نافثول (5%) ، عدت النتيجة موجبة بظهور اللون الأحمر بعد5 دقائق .(Cowan and .1993 Steel's

D- اختبار استهلاك السترات Cirate Utilization test
لقح وسط أكار سيمون السترات الحاوي على مادة بروموثايمول الزرقاء Bromothymol blue بمستعمره فتية وحضن عند 37°م لمدة 24 ساعة. عُدّت النتيجة موجبة من خلال تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق. (Cowan and Steel's.1993)

اختبار الحركة Motility test
لقح وسط الحركة شبه الصلب Semi-Solid media بالطعن Stabbling وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة. إن ظهور منطقة ضبابية حول خط الطعن دليلٌ على النتيجة الموجبة. (Cowan and Steel's 1993)

اختبار إنتاج اليوريز Urease test
لقح وسط اليوريا الصلب بالتخطيط وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة ، لوحظت النتيجة الموجبة بتحول لون الوسط الى الوردي .(Cowan and Steel's1993)

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية:
*حُضِّرَ وسط مولر هنتون الصلب وصب في أطباق معقمة بحيث لا يقل ارتفاع الوسط عن 4 ملمتر وتُرك ليتصلب.

*حضر اللقاح البكتيري بأخذ عدة مستعمرات من مزرعة حديثة بوساطة الناقل Loop ونقلت الى أنبوبة اختبار تحتوي على 5 مللتر من الوسط المغذي السائل بحيث تكون عكارتها مساوية لعكارة المحلول القياسي ماكفرلاند الذي استعمل للمقارنة لإعطاء عدد تقريبي للخلايا الجرثومية والذي يبلغ حوالي $1.5x\ 10^8$ خلية/ مليلتر

*نشر o.1 من محلول البكتريا على سطح الوسط الزرعي بواسطة المسحة القطنية المعقمة (Steril swab).

*تركت الأطباق لمدة 3-5 دقائق لتجف .

*نقلت أقراص المضادات الحيوية المذكورة في الجدول رقم (3-4) باستخدام ملقط معقم ووزعت على الأطباق المزروعة بالبكتريا بواقع 5 أقراص/طبق.

*حضنت بدرجة حرارة 37ْم لمدة 16-18 ساعة.

(Clinical and Laboratory Standards Institute [M7-A7], 2006).

إنتاج واستخلاص وتنقية البايوسيانين:-

إنتاج صبغة البايوسيانين

زُرِعَتْ العزلات المختارة والتي أعطت أغمق لون للصبغة على وسط Pseudomonas broth (pB) المشجع لإنتاج صبغة البايوسيانين بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 48 ساعة إذ تم ملاحظة تغير لون الوسط من اللون الأبيض إلى اللون الأخضر المزرق ، بعدها عرضت أنابيب الاختبار التي تم زرع البكتريا فيها إلى مصدر ضوئي وبدرجة حرارة الغرفة ولمدة 24 ساعة إذ تعمل على تشجيع البكتريا على زيادة إنتاج الصبغة لتحول الوسط إلى اللون الأزرق الداكن، أجريت التجربة كما ورد في Essar وآخرون عام (1990).

استخلاص البايوسيانين

استخلص البايوسيانين من راشح المزارع الجرثومية وتم تقدير فعاليته اعتماداً على ما جاء في Essar وآخرون عام (1990) إذ رسبت المزرعة النامية في 5 مل من وسط PB باستخدام جهاز الطرد المركزي عند سرعة 3000 rpm لمدة 10 دقائق ثم نقل الراشح إلى أنبوبة أخرى وأضيف إليه3 مل من الكلوروفورم ومزج جيداً ثم أزيلت الطبقة العليا وأضيف لها 1مل من حامض HCl ذي عياريه (1N) لحين تحول اللون الوردي إلى الأحمر الغامق ، فصل المحلول بعد وضع الأنبوب في جهاز الطرد المركزي عند سرعة 3000 rpm لمدة 5 دقائق ثم نقلت الطبقة العليا إلى Cuvette tube وقيست امتصاصية المحلول عند 520 nm باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer .ثم تم حساب التركيز والذي يعبر عن كل مايكروغرام من البايوسيانين المنتج/مليلتر من راشح المزارع وذلك بضرب الكثافة البصرية عند ٥٢٠nm (OD_{520}) في 17.072. كما مبين في الشكل (3-1) الذي يوضح خطوات أستخلاص وتنقية البايوسيانين.

تنقية البايوسيانين Purification of pyocyanin

تم تنقية البايوسيانين المستخلص والمقاس كميا في الفقرة السابقة اعتماداً على ماجاء في Saha وآخرون عام (2008). تم تنمية عزلة واحدة من عزلات الأذن الوسطى والجروح والحروق والقشع والإدرار المنتجة لصبغة البايوسيانين كلاً على حدة في دوارق تحتوي على وسط (PB) بمقدار 300 مل لكل دورق للحصول على كمية أكبر من البايوسيانين وحضنت بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 48 ساعة، كررت نفس خطوات الاستخلاص مع حذف خطوة قياس الامتصاصية وإضافة منظم borate-NaOH(0.4M) ذي الرقم الهيدروجيني 10إلى البايوسيانين المستخلص إلى أنتغير اللون إلى الأزرق ، كررت هذه الخطوات لعدة مرات لحين الحصول على محلول أزرق صافٍ من البايوسيانين مذابا في الكلوروفورم.

ولإنتاج أكبر كمية من صبغة البايوسيانين زرعت هذه العزلات على وسط Pseudomonas broth (PB) الذي يحوي في تركيبه على العناصر وتراكيزها المشجعة على إنتاج صبغة البايوسيانين ولإنتاج أكبر كمية قمنا بتنمية عزلة واحدة من كل من المصادر المختلفة كلاً على حدة في دوارق ذات حجم 500 مليلتر وبمقدار 300 مليلتر من وسط (PB) وقد حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37ْم وهي الدرجة المثلى لإنتاج أكبر كمية من البايوسيانين من العزلات المرضية لبكتريا *P.aeruginosa* لمدة 48 ساعة، ثم تم تنقيته وبعد تبخير الكلوروفورم جمع البايوسيانين من مصادر الإصابات الخمسة المذكورة سابقاً كلاً على حدة في حاويات معقمة ونظيفة وحفظ بدرجة 20-ْم لحين الاستخدام، الشكل (3-1) .

تقدير نسبة الرطوبة في مسحوق البايوسيانين

قدرت نسبة الرطوبة في مسحوق البايوسيانين اعتماداً على ماجاء في AOAC عام (2002) ، إذ وضعت كمية من البايوسيانين في فرن حراري عند 105ْم لحين ثبات وزن العينة وقدرت نسبة الرطوبة من خلال الفرق بين وزن العينة قبل التجفيف وبعده.

تقييم فعالية البايوسيانين كمضاد مايكروبي مختبرياً

تم تقييم فعالية البايوسيانين المعزول والمنقى من من بكتريا *P.aeruginosa* تجاه أنواع من البكتريا السالبة لصبغة جرام *P.aeruginosa, E. coli ,S.typhi*- والموجبة لصبغة جرام من الأنواع *S.aureus, E. faecalis* .

تم إعداد معلق بكتيري من أنواع البكتريا وتم مقارنة محاليل المعلق مع محلول ماكفرلاند القياسي (0.5) لتثبيت الأعداد عند $1.5x\ 10^8$خلية / مليلتر، ثم نقل 0.1 مل من كل من العوالق إلى سطح الوسط الزرعي مولر هنتون الصلب وتم نشرها على السطح وتركت لمدة 30 دقيقة ثم نقل 100 مايكروليتر من البايوسيانين بتركيز (0.2%) إلى حفر معدة على نفس الوسط ثم حضنت عند 37ْم لمدة 24 ساعة وبعدها أخذ قياس قطر منطقة التثبيط لكل نوع.

استخلاص DNA من بكتريا *P.aeruginosa*

- عمل طرد مركزي مالا يزيد عن ٣ ملليتر من serum بقوة (4000xg) لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة
- سحب الطبقة العليا واهمالها .
- اضافة 100 مايكرو ليتر من محلول الاذابة (TE buffer) ثم نمرر النماذج على جهاز الدوام لإكمال المزج واذابه الاجسام الصلبة .
- إضافة 10 مايكرو ليتر من (lysozyme) .
- حضن بدرجه 37 لمده 10 دقائق .
- اضافه 100 مايكرو ليتر من (BTL Buffer) و 20 مايكرو ليتر من (proteinase k) ثم مزج بجهاز الدوام (Vortex)
- حضن بدرجة حرارة 55 لمدة ساعة مع التحريك كل 20 دقيقة
- طرد المركزي بقوة (10000 xg) لدقيقتين لإتمام هضم المواد غير المهضومة .
- سحب الطبقة العليا ووضعها في انبوب جديد سعة 1.5ml بدون التماس مع الطبقة السفلى
- أضافة 220 مايكرو لتر من محلول BDL ثم مزج بجهاز الدوام (Vortex)
- حضن بدرجه حرارة 65 لمدة 10 دقائق
- اضافة 220 مايكرو ليتر من الايثانول (96_100%) ثم مزج بالدوار لمدة 20 ثانيه بأعلى سرعه لإتمام المزج واذا ظهرت فقاعات يتم سحبها بالماصة الدقيقة
- وضع (Hi Bind DNA mini column) (انابيب خاصة بالطقم الجاهز والتي تحتوي على مرشح filter) في انابيب سعه 2 ml (collection tube)
- نقل النماذج من انبوب 1.5 ml الى الانابيب الخاصة بالطقم
- طرد مركزي بقوة (10000 xg) لمدة دقيقة واحدة
- اهمال الانبوب 2 ml والراشح الذي ترشح عبر الفلتر من الانبوب الخاص
- وضع الانبوب الخاص في انبوب 2 ml جديد
- اضافه 500 مايكرو ليتر من HB Buffer
- طرد المركزي بقوه (10000 xg) لمده دقيقه واحده
- اهمال الراشح عبر المرشح مع الاحتفاظ بالأنبوب 2 ml
- اضافه 700 مايكرو ليتر من محلول الغسل ثم طرد مركزي بقوة (10000 xg) لمدة دقيقة واحدة
- اهمال الراشح عبر المرشح مع الاحتفاظ بالأنبوب 2 ml
- اعاده الخطوات الخاصة بالغسل اي اعاده الغسل
- وضع الانابيب الفارغة الخاصة بالDNA بجهاز الطرد المركزي بسرعه (10000 xg) لمدة 2 دقيقه لتجفيف الانابيب
- وضع الانابيب في انابيب سعه 1.5 مل جديده
- أضافه 50-100 مايكرو ليتر من (Elution buffer) المسخن مسبقاً بدرجة حرارة 65
- حضن لمدة ٥ دقائق بدرجة حرارة الغرفة (25°)
- طرد مركزي بقوة (10000 xg) لمدة دقيقة واحدة
- اعادة عمليه (Elute) مرة أخرى
- حفظ Eluted DNA بدرجه حراره - 20

تقدير تركيز DNA المستخلص ونقاوته:

تم تقدير تركيز الـDNA عن طريق وضع ١ مايكرو ليتر من العينة المستخلصة في جهاز (Nano drop) وتراوحت نقاوة العينة من 1.82- 1.6 .

تخفيف البرايمرات

تم تخفيف البرايمرات حسب مواصفات الشركة المصنعة والمجهزة من شركة (Bioneer) .

البادئات المخصصة specific Primers

البادئ المخصص	الوزن الجزيئي
Phenazine biosynthetic operon (phzABCDEFG) PHZP F 5' CCGTCGAGAAGTACATGAAT 3' PHZP R 5' CATAGTTCACCCCTTCCAG 3'	448 bp
Phenazine – specific methyltransferase(phz M) PHZP F 5' AACTCCTCGCCGTAGAAC 3' PHZP R 5' ATAATTCGAATCTTGCTGCT	313 bp
Flavine containing Monooxygennase (phzS) PHZP F 5' TGCGCTACATCGACCAGAG 3' PHZP R 5' CGGGTACTGCAGGATCAACT 3'	664 bp

جهاز PCR (Polymerase chain reaction)

تم نبذ المزيج في جهاز Microcenterfuge لفترة (٧) ثانية لإتمام مزج مكونات التفاعل ، مع مراعاة أن يكون العمل داخل Hood معقم وارتداء القفازات ووضع الأنابيب داخل عبوة ثلج ثم تطبيق البرنامج الآتي:

دورة واحدة لمدة 5 دقائق على درجة حرارة (94)^O للمسخ الأولي لشريط DNA ثم تليها (30) دورة تضاعف تتضمن كل دورة 30 ثانية بدرجة حرارة (94)^O لمسخ الشريط المزدوج و 30 ثانية بدرجة حرارة (60)^O لارتباط البادئ DNA القالب 30 ثانية بدرجة حرارة (72)^O لاستطالة البادئ ثم بعد ذلك دورة أخيرة لمدة 10 دقائق وعلى درجة حرارة (72)^O لاستكمال مرحلة الاستطالة .

النتائج والمناقشة
RESULTS AND DISCUSSION

عزل وتشخيص Isolation and Identification of *P.aeruginosa*

أجريت الاختبارات التشخيصية الزرعية والكيموحيوية بالاعتماد على Baron و Finegold عام (1990) ، Holt وآخرون عام (1994) ، Collee وآخرون عام (1996) ، Prescott وآخرون عام (2005) ، و Willey وآخرون عام (2008) لغرض عزل وتشخيص جرثومة *P.aeruginosa* وقد أثبتت العزلة قدرتها على النمو على وسط ماكونكي الصلب وهو وسط اختياري تفريقي لاحتوائه على أملاح الصفراء (Bile salts) وصبغة البنفسجي البلوري (Crystal violet) المثبطة لمعظم البكتريا الموجبة لصبغة جرام ، وتفريقي لأنه يميز بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز لذلك كان ظهور مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* على الوسط شاحباً (Pale) لأنها غير مخمرة لسكر اللاكتوز.

ولدراسة الصفات المظهرية للمستعمرات ، زرعت مستعمرة مفردة نقية من كل عزلة على الوسط المغذي الصلب ، فظهرت المستعمرات ذات تحدب قليل وحافات مسطحة، وأظهرت العزلة قدرتها على إفراز صبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة عند النمو ، وكان لجميع العزلة رائحة مميزة تشبه رائحة العنب grape-like لوجود مادة aminoacetophenone.

وقد تم اختيار مستعمرة مفردة لكل عزلة وزرعت على وسط الدم الصلب ، وهو وسط غذائي تنشيطي لتحديد قابلية البكتريا على تحلل الدم ونوع التحلل ، وكانت العزلة محللة للدم تحللاً كاملاً إذ ظهرت هالة شفافة حول المستعمرة .وعند إجراء الفحص المجهري للمسحة البكتيرية المصبوغة بصبغة جرام، ظهرت بكتريا *P.aeruginosa* سالبة لهذه الصبغة وعلى شكل عصيات مفردة أو سلاسل قصيرة.

وقد أظهر التشخيص أن العزلة أعطت نتيجة موجبة لاختبار إنتاج الأوكسيديز Oxidase وهو من الاختبارات التشخيصية المهمة

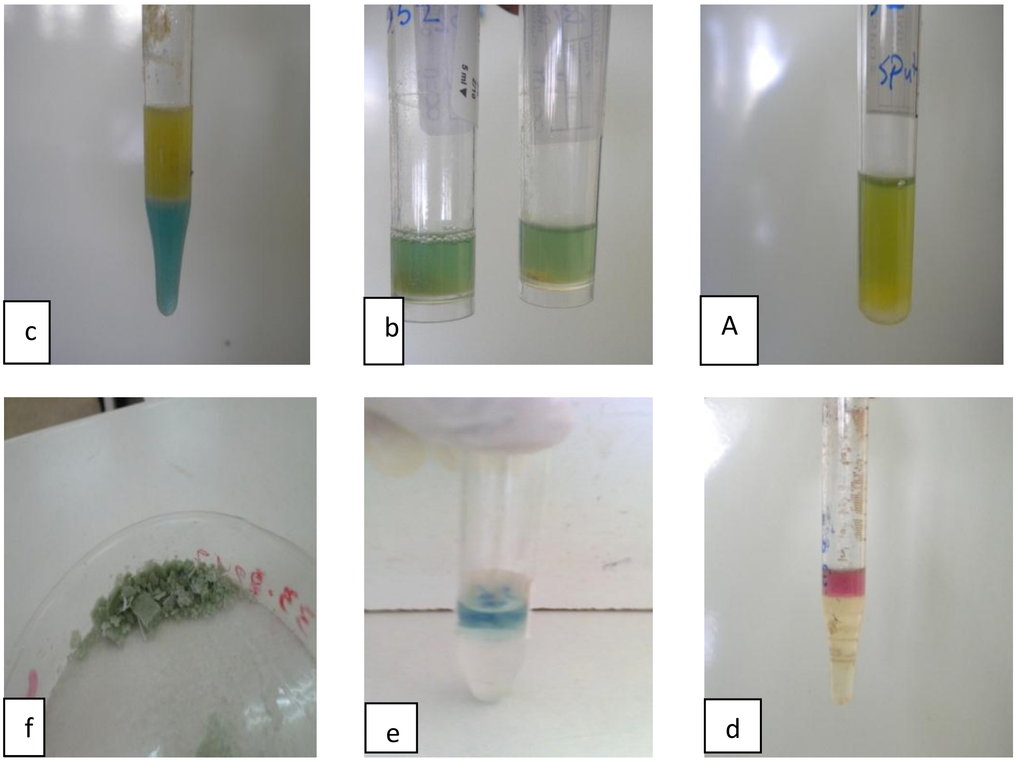
كما أظهرت فحصاً موجباً لاختبار الكتاليز Catalase. كما وأجرية فحص IMViC وكانت النتيجة سالبة اختبار الأندول Indole

وعند إضافة الكاشف كانت النتيجة سالبة لاختبار فوكس بروسكور ، وهو اختبار يستخدم للتحري عن قابلية البكتريا للتخمر الجزئي لسكر الكلوكوز، إن العزلة كانت سالبة لهذا الاختبار.

وأظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة عند تنميتها على وسط (Simmon citrate) الذي يستخدم للتحري عن قابلية البكتريا لاستهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون، وذلك بتحول لون الوسط إلى الأزرق وكما أوضحت نتيجة لأنزيم اليوريز ان النتيجة كانت الموجبة تحول لون الوسط من اللون الأصفر إلى الوردي .

3- إنتاج واستخلاص وتنقية البايوسيانين

كانت العزلة مفرزة للصبغة بشكل وفير للبايوسيانين ، إذ يتباين إنتاج الصبغة من سلالة إلى أخرى ومن ثم تم استخلاص البايوسيانين بالكلوروفورم بالاعتماد على الطريقة الموصوفة من قبل Essar وآخرون عام (1990) لأنه يذيب البايوسيانين فقط على عكس الماء الذي يذيب البايوسيانين والفلورسين معاً واللذين يختلفان في تركيبهما الكيميائي وبهذه الطريقة تم تحديد كمية البايوسيانين المنتجة باستخدام جهاز المطياف الضوئي ، ولإنتاج أكبر كمية من صبغة البايوسيانين زرعت هذه العزلات على وسط Pseudomonas broth (PB) الذي يحوي في تركيبه على العناصر وتراكيزها المشجعة على إنتاج صبغة البايوسيانين وبعد تبخير الكلوروفورم باستخدام الحاضنة وعلى درجة 40ْم لمدة 48 ساعة وتم حفظ مسحوق البايوسين في حاويات نظيفة ومعقمة في درجة حرارة 20-ْم لحين استخدامه.

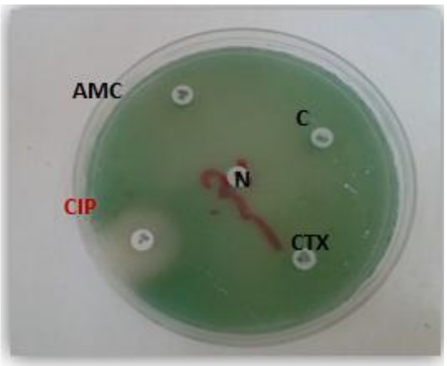


حساسية العزلة للمضادات الحيوية :-

استخدم اختبار انتشار الأقراص القياسي لتحديد حساسية بكتريا *P.aeruginosa* تجاه أنواع متعددة من المضادات الحيوية وقورنت أقطار التثبيط مع القيم القياسية لتحديد درجة أو حالة مقاومة العزلة اعتماداً على NCCL عام (2002). تضمنت المضادات الحيوية الأنواع الآتية:- Amoxicillin-Clavulanicacid (AMC), Cefotaxime (CTX), Ciprofloxacin (CIP), Chloramphenicol (C) Neomycin (N) ,

بينت النتائج كما في الصورة (2-4) أن عزلة البكتريا كانت حساسة لمضاد Ciprofloxacin .

وأثبتت النتائج الحالية أن أكفأ المضادات في علاج الإصابات بالـ *P.aeruginosa* هو مضاد Ciprofloxacin وهو من مجموعة الفلوروكوينولون، وإن تطور المقاومة للمضادات تُعَدّ مشكلة علاجية كبيرة يمكن أن توضح بالرجوع إلى بعض الفرضيات منها الاستخدام المفرط أو استخدام المضاد الحيوي غير الملائم (Sotto *et al*., 2001).



صورة (3-1): حساسية بكتريا *P.aeruginosa*
اللون الأحمر الحساسية للمضاد / اللون الأسود المقاومة للمضاد.

التقدير الكمي للبايوسيانين المستخلص من *P.aeruginosa*:-

قدرت كمية البايوسيانين المستخلص بالاعتماد على تقدير الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجي 520nm. الصورة (3-4) توضح خطوات استخلاص وتنقية البايوسيانين.

إن كمية الانتاج كانت من بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة كانت بمقدار (23.41µg/ ml) وإن الاختلاف في كمية البايوسيانين المنتجة قد يعود إلى حالة تنظيم الإفراز المعتمد على تجمع الخلايا البكتيرية .

التركيز المثبط الأدنى (MIC) للبايوسيانين على أنواع بكتيرية مرضية:

أظهرت النتائج إن التركيز المثبط الأدنى للبايوسيانين المنقى تجاه أنواع بكتيرية شملت *E.coli*،*S.aureus*، *S.typhi*، *P.aeruginosa* ،*E.faecalis* كان0.005 غم/ مل وعلى جميع الأنواع البكتيرية.

فعالية البايوسيانين في التثبيط المايكروبي :

بعد أن تم تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للبايوسيانين ضد الأنواع المايكروبية المختلفة والذي كان عند 0.005غم/مل فقد تم تقييم فعاليته التثبيطية ضد أنواع بكتيرية موجبة وسالبة لصبغة جرام.

ومن ثم تم رفع تركيز البايوسيانين لملاحظة التثبيط بصورة أوضح على أطباق الأكار إذ أظهرت النتائج أن التركيز(0.2) غم /مل من البايوسيانين

جدول 1-3: الفعالية التثبيطية للبايوسيانين المنقى من *P.aeruginosa* مقدرةً بالملم

ت	الأنواع البكتيرية	الفعالية التثبيطية (بالملم)
١	*P.aeruginosa*	25
٢	*S.aureus*	21
٣	*E.faecalis*	23
٤	*S.typhi*	22
٥	*E.coli*	22

أقطار التثبيط ضد النوع *P.aeruginosa* فكانت (25) ملم .

صورة (3-3) الفعالية التثبيطية للبايوسيانين بتركيز (0.2%) المستخلص من بكتريا *P.aeruginosa* على بكتريا *P.aeruginosa*. بعد 24 ساعة من التحضين على وسط (Muller Hinton agar).

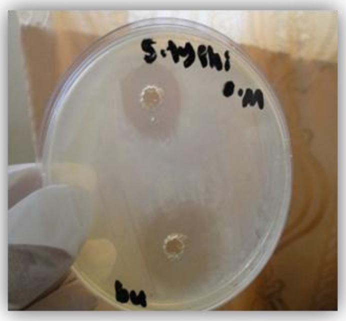
وعلى النوع *S.aureus* كانت (19) ملم كما في الصورة .

صورة (3-4) الفعالية التثبيطية للبايوسيانين بتركيز (0.2%) المستخلص من بكتريا *P.aeruginosa* على بكتريا *S.aureus* بعد 24 ساعة من التحضين على وسط (Muller Hinton agar)

والنوع E.faecalis (23) كما في الصورة .

صورة (3-5) الفعالية التثبيطية للبايوسيانين بتركيز (0.2%) المستخلص من بكتريا*P.aeruginosa*على بكتريا *E.faecalis* . بعد 24 ساعة من التحضين على وسط (Muller Hinton agar).

والنوع *S.typhi* كانت (22) ملم كما في الصورة .



صورة (3-6) الفعالية التثبيطية للبايوسيانين بتركيز (0.2%) المستخلص من بكتريا *P.aeruginosa* على بكتريا *S.typhi* بعد 24 ساعة من التحضين على وسط (Muller Hinton agar).

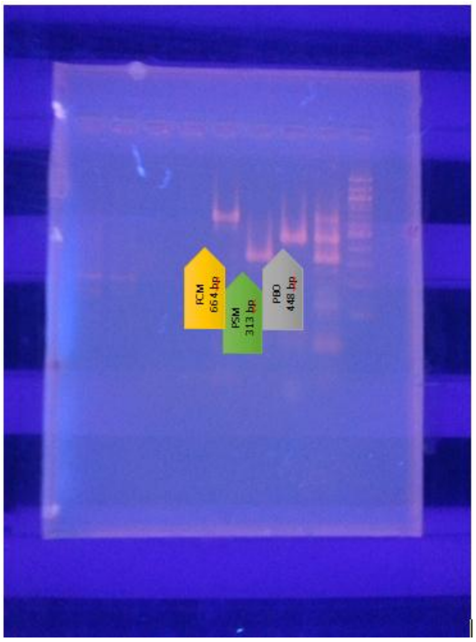
وبكتريا E.coli بأقطار تثبيطية (21) ملم.

صورة (3-7) الفعالية التثبيطية للبايوسيانين بتركيز (0.2%) المستخلص من بكتريا*P.aeruginosa* على بكتريا *E.coli* بعد 24 ساعة من التحضين على وسط (Muller Hinton agar).

وقد أظهرت النتائج ان اعلى فعالية تثبيطية للبايوسيانين كان على بكتريا *P.aeruginosa* حيث كان معدل التثبيط 25 ملم وهذا يدل على ان البايوسيانين فعال جدا ضد بكتريا *P.aeruginosa* وتليها بكتريا *E.faecalis* حيث كان معدل التثبيط *23 ملم* ومن ثم بكتريا *S.typhi* و *E.coli* حيث كان معدل التثبيط 22 ملم ويدل هذا على انها قليلة المقاومة للبايوسيانين، اما بكتريا *S.aureus* حيث أظهرت انها اكثر مقاومة للبايوسيانين حيث كان معدل التثبيط 21 ملم.

البادئات المخصصة (Phenazine biosynthetic operon ،Phenazine – specific methyltransferase، Flavine containing Monooxygennase)

استخدمت البادئات للتعبير عن انتاج البايوسيانين من بكتريا *P.aeruginosa* تبين التضاعف باستخدام تقنية PCR والترحيل الكهربائي أدى الى ظهور حزم عند وزن جزيئي لكل من البادئات المخصصة عند (Phenazine biosynthetic operon ،Phenazine – specific methyltransferase، Flavine containing Monooxygennase)
والتي تشير الى قدرة النوع البكتيري *p.aergenusa* على انتاج البايوسيانين وان التفسير على انتاجه يكون من خلال جينات في كروموسوم البكتريا . كما في الصورة (3-8).



صورة (3-8) تشير الى قدرة النوع البكتيري على انتاج البايوسيانين من خلال جينات في كروموسوم البكتريا

المراجـع
REFERENCES

AOAC (Association Of Official Analytical Chemises) (2002): Official method of Analysis. 4th. ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Virginia. USA.

Balch, A. and Smith, R. (1994): Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment. Informa Health Care. Pp. 83-84

Baron, EJ. and Finegold, SM. (1990): Baily and Scott`s Diagnostic Microbiology. 8th ed. C.V. Mosby Co. USA.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2006): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. Seventh edition. Clinical and Laboratory Standard Institute Document, M7-A7, Wayne, Pennsylvania.

Collee, JG.; Fraser, GA.; Marmion, PB. and Simmons, A. (1996): Practical Medical Microbiology.4th. Churchill Livingstone, New York.p.413-418.

Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (1993): 3rd Edition. Ed. G. I. Barrow and R. K. A. Feltham.Cambridge University Press, Cambridge, New York.

Cruickshank, R.; Duguid, JP.; Marmion, BP. and Swain, RH. (1975): Medical Microbiology. 12th. New York. Churchill Livingstone.

Essar, DW.; Eberly, L.; Hadero, A. and Crawford, IP. (1990): Identifcation and Characterization of genes for second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the

two anthranilate synthases and evolutionary implications. Journal of bacteriology. 172(2): 884-900.

Greenwood, D.; Finch, R.; Davey, P. and Wilcox, M. (2007): Antimicrobial chemotherapy. Oxford University Press, New York.

Hassan, H.M. and Fridovich, I. (1980): Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. J. Bacteriol., 141: 156-163.

Holt, J.G.; Krieg, NR.; Sneath, PH.; Staley, JT. and Williams, ST. (1994): Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams, and Wilkins, USA.

Lyczak, JB.; Cannon, CL. and Pier, GB. (2000): Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbs Infect. 2: 1051-1060.

Mouget, JL.; Dakhama, A.; Lavoie, M. and de la Noue, J. (1995): Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved.?FEMS Microbiology Ecology. 18: 35-44.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2002): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement. M100-S12, NCCLS, Pennsylvania.

Prescott, LM.; Harley, JP. and Klein, DA. (2005): Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York.

Saha, S.; Thavas, R. and Jayalakshmi, S. (2008): Phenazine Pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. Research J.Microbiol. 3(3): 122-128.

Sotto, A.; de Boever, CM.; Fabbro-Peray, P.; Gouby, A.; Sirot, D. and Joudan, J. (2001): Risk factors for antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with Urinary Tract Infection: a Prospective study. J. Clinical Microbiol. 39: 438-444.

Todar, K. (2004): Pseudomonas and related bacteria. Todar’s Online Textbook of Bacteriology. Available online at: http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html. Accessed 5th July 2006.

Willey, JM.; Sherwood, LM.andWoolverton, CJ. (2008): Prescott, Harley and Klein’s Microbiology, 7th Ed., McGraw-Hill Company, Inc., USA. pp.