تحديد دور البلازميدات في إنتاج البكتريوسين من الكلبسيلا المرضية

محمد مهدي الزبيدي نوريه عبد الحسين علي

معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد

الاستلام 2011/11/15 القبول 2012/1/23

الخلاصة

جمعت125عينة(50عينة حروق وجروح و75عينة دم) من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفيات (إبن البلدي والكندي) في بغداد وللفترة2010/11/1 إلى2011/03/1.عزلت 40 عزلة بكتيرية منها 18عزلة أعطت صفات مشابهة لبكتريا الكلبسيلا إعتماداً على الصفات المظهرية والتشخيص الكيموحيوي وإستعمال نظام AP1 E20مع إستعمال نظام VITEK2. تم غربلت جميع العزلات المشخصة في قابليتها على إنتاج البكتريوسين بإتباع طريقة أقراص الاكار. حيث كانت نتائج إستعمال طريقة أقراص الاكار 7عزلات من مجموع 18 عزلة ذات قابلية في إنتاج البكتريوسين. درس المحتوى البلازميدي لجميع عزلات بكتريا الكلبسيلا المنتجة للبكتريوسين والبالغ عددها 7عزلات. أظهرت النتائج إحتواء بعض العزلات على حزمة كروموسومية وأخرى بلازميدية إما البعض الأخر فقد إحتوى على حزمة كروموسومية فقط. ولغرض تحديد دور البلازميدات في إنتاج البكتريوسين فقد أنتخبت عزلتين لإجراء عملية تحييد البلازميدات وهما 6 *Klebsiella terrigena* و 7 *Klebsiella terrigena* الأكثر إنتاجا للبكتريوسين وبإستعمال صبغة بروميد الاثيديوم. أظهرت النتائج أن صبغة بروميد الاثيدويوم بتركيز 512 مايكروغرام/مليلتر قد ساعدت على إزالة البلازميد من العزلتين المنتخبتين إضافة إلى فقدان قابليتهما على إنتاج البكتريوسين، مما يدل على إن ألجين المسؤول عن إنتاج البكتريوسين هو بلازميدي الموقع ولتأكيد هذه النتيجة فقد أجريت عملية التحول الوراثي وذلك بنقل البلازميد المستخلص من العزلة 7 *Klebsiella terrigena* إلى عزلة *E.coli MM 294rif* $^{+}$ الخالية من البلازميدات. أظهرت النتائج إن العزلة *E.coli MM 294rif* $^{+}$ أصبحت مقاومة للامبسلين بعد أن كانت حساسة له إضافة إلى أنها أصبحت منتجة للبكتريوسين. مما يؤكد أن البلازميد يحمل الجين المسؤول عن إنتاج البكتريوسين.

DETERMINATION OF PLASMIDS ROLE IN BACTERIOCIN PRODUCTION FROM PATHOGENIC *KLEBSIELLA*

Mohammed M. Al-Zubaidi **Norrya A. Ali**

Biotechnology Department, Genetic Engineering and Biotechnology institute for postgraduate studies, Baghdad University

Received15/11/2011 Accepted 23/1/2012

ABSTRACT

One hundred and twenty five sample were collected as(50 Burne+wound and75 blood samples)from hospital patients (Ibn Albalady and Alkindy Hospital in Baghdad at period Nov .2010. to March. 2011). 40 bacterial isolates were isolated of which 18 isolates showed similar characteristic to *Klebsiella* depending on phenotypic characterization and biochemical test and using with AP1 20E system and VITEK 2. Agar disc were used to screen the isolates for their ability of bacteriocin production. The result showed that7isolates had the ability of bacteriocin production specially *Klebsiella terrigena* that show the highest production. Plasmid content was studied for *Klebsiella* isolates .Results showed that some isolates has plasmid and genomic DNA. To determine the role of plasmid in bacteriocin production, two highest isolates were selected (*Klebsiella terrigena* 7 and *Klebsiella terrigena* 6)to perform plasmid curing experiment using Ethidium bromide. Result showed that the plasmid has been cured at 512 mg /ml Ethidium bromide. the cured cells lost their ability of bacteriocin production which proved the bacteriocin gene is located on plasmid. To confirm this result, transformation experiment was performed by transferring the plasmid the extracted from *Klebsiella terrigena* 7 to the standard strain *E.coli MM 294rif* $^{+}$ which is free of plasmid and have no resistance to Ampicillin (Amp), the result showed that, the *E.coli MM 294rif* $^{+}$ strain become Amp resistant in addition it had the ability to produce the bacteriocin.

Key words: *Klebsiella*, Bacteriocin

المقدمة

تعد بكتريا *Klebsiella* من الممرضات الانتهازية (Opportunistic pathogens) السالبة لصبغة غرام التي تعود إلى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) . ويمكن عزلها من النماذج المرضية المختلفة إذ تسبب كثير من الإصابات منها التهاب المجاري البولية والتهاب القناة التنفسية والهضمية وهي ثاني مسبب للالتهابات للإنسان بعد بكتريا *E.coli* . تصيب هذه البكتريا الأطفال الرضع والأطفال حديثي الولادة والأشخاص المسنين وكذلك الأشخاص الذين يعانون من كبح مناعي (immunocompromised)(1). تمتلك بكتريا *Klebsiella* عدداً من عوامل الضراوة التي تشترك بإمراضيتها من ضمنها مستضدات المحفظة، وعوامل الالتصاق المتمثلة بالخمل، وإنتاج الذيفانات الداخلية مثل متعدد السكريد الشحمي. فضلاًعن مقاومتها التأثير القاتل للمصل، ونظام الحصول على الحديد(2) . لقد نالت البكتريوسينات في الآونة الأخيرة إهتماماً كبيراً من قبل الباحثين فقد أشارت الدراسات الحديثة إلى أن البكتريوسين المنتج من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* يمتلك فعالية ضد البكتريا المرضية الملوثة للغذاء (3). نظراً للأهمية التطبيقية للبكتريوسين وقدرته على التأثير على عدد من الإحياء المجهرية وكذلك إستعماله لحفظ الأغذية.

إذ أشار(4) إلى أن البكتريوسين المنتج من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* يسمى Klebocin والبكتريوسين المنتج من بكتريا *Serretia marcescens* يسمى Marcescens والبكتريوسين المنتج من بكتريا *Enterobacter cloacae* يسمى Cloacins والبكتريوسين المنتج من بكتريا *Pseudomonas* يسمى Pyocin (5). تشفر لإنتاج البكتريوسينات جينات وتحمل عادة على بلازميد مكون من ثلاثة جينات أولها جين إنتاج البكتريوسين (Bacteriocin gene) ثم جين يشفر لبروتين المناعة (Immunity gene) لمنع تأثر الخلية بالبكتريوسين المنتج من قبلها فضلاًعن جين التحلل (Lysis gene)الذي يشفر لبروتين محلل يساعد في عملية تحرر البكتريوسين من الخلية المنتجة(7,6). يتأثر إنتاج البكتريوسين بعدة عوامل بيئية مختلفة منها عوامل كيميائية وأخرى فيزيائية، وتعد درجة الحرارة عاملاً مؤثراً على معظم الفعاليات الحيوية كالنمو والإنتاجية فهي تؤثر في مختلف النشاطات الأنزيمية في الخلية (8).

للبكتريوسين أهمية تطبيقية كبيرة منها إستعماله كمادة حافظة للأغذية في العديد من الصناعات الغذائية ومنتجات الألبان الصناعية (9). كما انه يستعمل في التنميط كإحدى الطرائق التصنيفية للبكتريا، ولاسيما تلك التي يصعب تصنيفها إعتماداً على الصفات المصلية فقد تحدد الحساسية للسلالات المراد تنميطها إلى البكتريوسين المنتج من قبل سلالات مناسبة، ومثال على ذلك البايوسين المنتج من بكتريا *P.aeruginosa* ويطلق عليه Pyocin-typing (10).

مواد وطرق العمل

جمع العينات

جمعت 125 عينة مرضية (75 دم و 50 عينة مسحة حروق وجروح) من المرضى الراقدين أو المراجعين لمستشفى إبن البلدي ومستشفى الكندي، وللفترة من 2010/11/1 إلى غاية 2011/3/1. جمعت عينات الجروح والحروق من المرضى الراقدين في مستشفى الكندي التعليمي في بغداد حيث جمعت العينات بوساطة مسحات معقمة ونقلت إلى أطباق أكار الدم ووسط نقيع القلب والدماغ لغرض تنشيطها. بعد حدوث النمو نقلت إلى وسط الماكونكي وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 18-24 ساعة وبعدها تم تمييز البكتريا السالبة لصبغة غرام من خلال تصبيغها بصبغة غرام وفحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي حيث أوضحت النتائج أنها عصيات سالبة لصبغة غرام إتخذت هيئة مفردة أو مزدوجة.

أما عينات الدم فقد جمعت عينات الدم من الأطفال الرضع المشكوك بأنهم مصابين بتجرثم الدم الراقدين في مستشفى إبن البلدي للأطفال وقد تم إستعمال جهاز BACT / ALERT 3D لغرض التأكد من وجود أو عدم وجود بكتريا في الدم. وكما يلي: عقمت المنطقة المراد أخذ الدم منها بطريقة جيدة لان التلوث يؤثر على نتيجة الفحص، أخذ من الدم 4 -5 مليلتر ثم وضعت مباشرة في قناني التحميل والذي يحتوي على الوسط الزرعي مرق نقيع القلب والدماغ الصلب، سجلت البيانات الموجودة على القنينة (رقم القنينة، إسم المريض، العمر، تاريخ أخذ العينة) بواسطة معطيات الإدخال وتحفظ بيانات المريض داخل الجهاز، وبعد 3-5 أيام تظهر النتيجة على شاشة الجهاز حيث أن النتيجة الموجبة تعني أن العينة مصابة بالبكتريا إما النتيجة السالبة فتعني أن العينة سليمة، حيث يتغير لون القنينة في العينة الموجبة إلى اللون الأصفر مما يدل على تلوثه بالبكتيريا، بعدها زرعت العينة الموجبة على وسط الماكونكي أو الاكار المغذي لغرض تشخيصها بواسطة جهاز VITEK2.

تشخيص البكتريا

شخصت البكتريا بإستعمال جهاز VITEK2 المجهز من شركة Bio Merieux والذي يتضمن64 إختبار من الاختبارات الكيموحيوية التي تستعمل في تشخيص البكتريا بحيث تصل درجة دقة التشخيص بهذا الجهاز إلى98%. وقد أتبعت طريقة العمل المعتمدة من قبل الشركة المجهزة.

الكشف عن عزلات البكتيريا المنتجة للبكتريوسين

أستعملت طريقة أقراص الاكار حسب الطريقة المذكورة في القصاب والخفاجي(11) وكالآتي. زرعت بكتريا *Klebsiella* spp. المنماة مسبقاً في وسط مرق نقيع القلب والدماغ وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط أكار Tryptic soy agar، ثم حضنت الإطباق في درجة حرارة 37 م° مدة 24 ساعة.

وبعد الحضن أقتطعت أقراص من هذا الوسط بإستعمال ماصة باستور ثم وضعت على سطح الاكار المغذي والمنشور عليه بالناشر مقدار 0.1 مليلتر من مزروع كل من عزلات الاختبار البكتيرية (*E. coli* , *Enterobacter cloacae*) المعزولة من الإدرار، وقد ثبت عدد الخلايا المزروعة بمقدار 10^8 خلية/مليلتر بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي المحضر ثم حضنت الإطباق بدرجة حرارة 37 م° مدة 24 ساعة، بعدها قيس قطر منطقة التثبيط حول الأقراص.

إستخلاص البكتريوسين من بكتريا *Klebsiella* spp المنتجة

أستعملت الأوساط الزرعية الصلبة والسائلة لتنمية العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسين، من الأوساط السائلة Brain Heart infusion broth و Nutrient broth و Trypton soy broth مضافاً إليه 1% من خلاصة الخميرة و أيضاً إستعمل وسط Trypton soy broth مضافاً إليه المايتوسين C بتركيز 10 مليغرام/مليلتر. أما الأوساط الزرعية الصلبة المستخدمة للكشف عن البكتريوسين فهي ثلاثة Nutrient agar و Brain Heart infusion agar و Trpton soy agar .

استخلاص البلازميدات

أستعملت عدة Pure Yield Plasmid Miniprep System و Promega Kit لغرض الاستخلاص.

الترحيل الكهربائي لـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز:

أتبعت طريقة الترحيل الكهربائي المذكورة في (12) Sambrook *et al.*.

تحييد البلازميدات

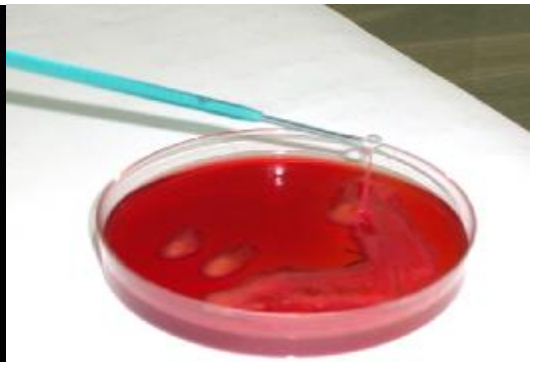
أجريت عملية التحييد للبلازميدات بواسطة إستعمال صبغة بروميد الاثيديوم بالتراكيز التالية (256,128,64,32,16, 512, 1024, 2000, 2500, 3000 مايكرو غرام /مليلتر) و حسب ما جاء (13). Elbanna *et al*.

التحول الوراثي

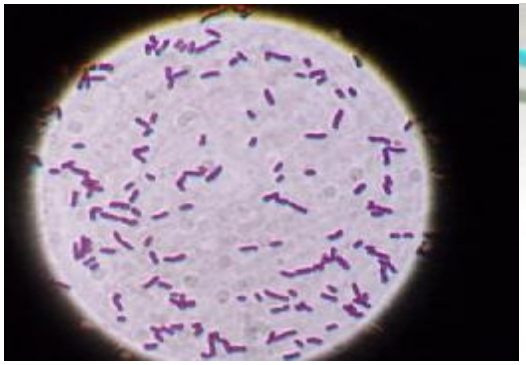
أجريت عملية التحول الوراثي حسب ما جاء في طريقة (12). Sambrook *et al*.

النتائج والمناقشة

تم الحصول على 125 عينة (50 مسحة حروق وجروح، 75 دم) من المرضى المراجعين والراقدين في المستشفيات (إبن البلدي، ومستشفى الكندي التعليمي). زرعت العينات في البداية على وسط الماكونكي لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م°. وأجري بعد الحضن فحص نظري للعزلات المزروعة على وسط الماكونكي حيث تمتاز بكتريا *Klebsiella* بنموها على الوسط بأنها مستعمرات وردية براقة ذات قوام مخاطي (شكل1) وهي صفة مميزة لهذه البكتريا وكذلك إمتازت بأنها مخمرة للاكتوز، وبعدها أجري فحص مجهري للعينات بإستعمال صبغة غرام. وأوضحت النتائج أنها عصيات سالبة لصبغة غرام وأتخذت هيئة مفردة أو مزدوجة (شكل2)، هذه النتيجة جاءت متطابقة لما توصل إليه;(14). Holt *et al*، (15) Goodyear *et al*.



شكل(1): الصفات المظهرية لبكتريا *Klebsiella* spp باستخدام وسط MacConkey agar



شكل(2):الفحص المجهري لبكتريا *Klebsiella* spp باستخدام صبغة غرام

أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية والتشخيص بإستعمال أشرطة AP1 20E للعزلات التي كانت مستعمراتها وردية اللون براقة ذات قوام مخاطي و سالبة لصبغة غرام أنها تعود لبكتريا *Klebsiella* spp وفقاً لما جاء في(1)Podschun and Ullmann ، كما أستعمل لتأكيد التشخيص جهاز الـ VITEK 2 لغرض تشخيص بكتريا *Klebsiella* spp بدقة عالية جداً ولغرض التأكد بشكل نهائي من صحة تشخيص البكتريا حيث يشخص هذا الجهاز البكتريا بدقة تصل إلى 93-98%.

إذ أستعمل جهاز VITEK 2 الداخل حديثاً إلى مستشفى إبن البلدي للأطفال لغرض تشخيص عالي الدقة للعزلات. وأظهرت نتائج التشخيص بإستعمال جهاز VITEK 2 الحصول على 18 عزلة. توزعت كلآتي: الحصول على 5 عزلات من *K. pneumoniae* ، و7 من *K. terrigena* ، و 2 عزلة *K.oxytoca* ، 4 عزلات من *K.planticola* ، ويبين جدول(1) إعداد ونسب بكتريا *Klebsiella* المعزولة.

جدول (1): إعداد ونسب بكتريا *Klebsiella* SPP في العزلات السريرية

Klebsiella spp	عدد العزلات	النسبة المئوية من مجموع عزلات *Klebsiella*
Klebsiella pneumoniae	5	27.7%
Klebsiella terrigena	7	38.8%
Klebsiella planticola	4	22.2%
Klebsiella oxytoca	2	11.1%

كما يبين جدول(2) الفحوصات الكيموحيوية المستخدمة لتشخيص بكتريا *K . pneumoniae* بإستعمال

جهاز VITEK 2.

جدول(2): بكتريا *K. pneumoniae* مشخصة بإستعمال جهاز VITEK 2

APPA	_	AGLTp	_	BXYL	+	SAC	+	SUCT	+	CMT	+
ADO	+	dGLU	+	BAlap	+	dTAG	_	NAGA	_	BGLUR	+
PyrA	+	GGT	_	ProA	_	dTRE	+	AGAL	+	O129R	+
IARL	+	OFF	+	LIP	_	CIT	+	PHOS	+	GGAA	_
dCEL	+	BGLU	+	PLE	+	MNT	+	GlyA	_	IMLTa	_
BGAL	+	dMAL	+	TyrA	+	5KG	_	ODC	+	ELLM	_
H2S	_	dMAN	+	URE	+	ILATK	+	LDC	+	ILATa	_

*** + الاختبار موجب 95% _ 100% ; V إختبار موجب 6% _ 94% ; _ الاختبار سالب وقد تصل النسبة إلى** 5%

أظهرت النتائج (جدول3) أن عدد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* في عينات الدم هو 5 من بين عدد عزلات بكتريا *Klebsiella* spp المعزولة والبالغ عددها 18، أما بالنسبة لعينات الحروق والجروح فكانت أعلى نسبة لبكتريا *Klebsiella terrigena* وكان عددها 7، أما بكتريا *Klebsiella planticola* فكان عددها 4 ، وبالنسبة لبكتريا *Klebsiella oxytoca* في عينات الحروق والجروح فقد كانت أعدادها 2.

جدول(3):أعداد و نسب وجود أنواع بكتيريا *Klebsiella* في العزلات السريرية

العزلات السريرية	عدد عزلات بكتريا *K. pneumoniae* (النسبة المئوية لها)	عدد عزلات بكتريا *K. terrigena* (النسبة المئوية لها)	عدد عزلات بكتريا*K.oxytoca* (النسبة المئوية لها)	عدد عزلات بكتريا *K.planticola* (النسبة المئوية لها)
الجروح والحروق	_	(38.8%) 7	(11.1%) 2	(22.2%) 4
الدم	(27.7%)5	_	_	_

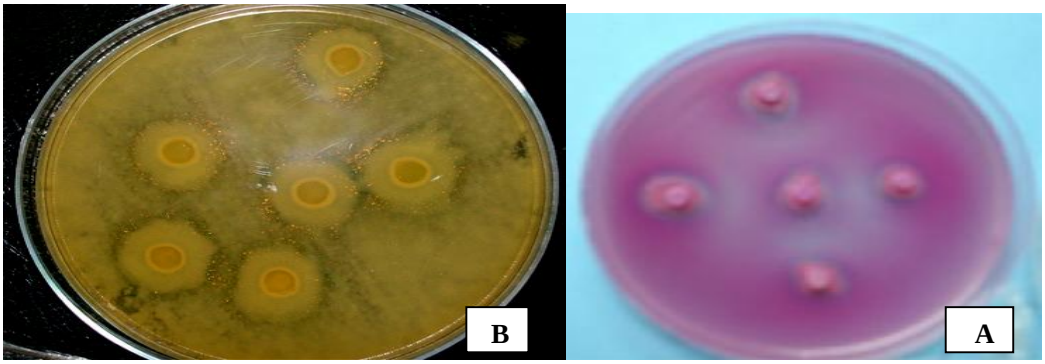
غربلة بكتريا *Klebsiella* spp المنتجة للبكتريوسين

أظهرت نتائج إستعمال طريقة أقراص الاكار (Cup disc) لغرض الكشف عن البكتريوسين أن عزلات بكتريا *K. terrigena* أكثر إنتاجاً للبكتريوسين من باقي عزلات بكتريا *Klebsiella* spp المعزولة جدول(4)، فقد تم الحصول على 4 عزلات منتجة للبكتريوسين من أصل 7 عزلات (شكل 3 A) بإستعمال وسط MacConkey agar، بعدها جاءت بكتريا *K. pneumoniae* حيث بلغ عدد العزلات المنتجة 2 من أصل 5 عزلات، وأخيراً جاءت بكتريا *K .oxytoca* حيث بلغ عدد العزلات المنتجة عزلة واحدة فقط (شكل3 B) بإستعمال وسط Brain Heart infusion agar . كما وجد أن أكثر عزلات بكتريا *Klebsiella* إنتاجاً للبكتريوسين هي عزلات *K . terrigena* وكان مصدرها الحروق والجروح، ثم يأتي بعدها بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من مختلف المصادر وخصوصا البكتريا المعزولة من الدم، وتليها بكتريا *K.oxytoca*.

إن إختلاف نسب العزلات المنتجة بين دراسة وأخرى يعتمد على العزلات البكتيرية الدالة بصورة أساسية، وقد تكون العزلة الدالة متحسسة لنوع معين من البكتريوسين لكن إظهار الفعالية القاتلة يعزى إلى افتقارها

للمستقبلات الخاصة بنقله، أو قد ينتج ولكن بكميات قليلة لا تتمكن من قتل الخلية الحساسة وهذا ما أشار إليه Tagg *et al.* (16)، كما قد تتعرض البكتريا إلى طفرات معينة لسبب أو لآخر مما قد ينتج عنه فقدان المستقبلات الخاصة للبكتريوسين وبالتالي تصبح العزلة الدالة مقاومة للبكتريوسين.

فقد أشار Cursino *et al.* (17) إلى أن حدوث تحوير المستقبلات الخاصة للبكتريوسين نتيجة حدوث طفرات تؤدي إلى أن تكون العزلات مقاومة.



شكل (3) الكشف عن البكتريوسين بطريقة أقراص الاكار

A) الكشف عن البكتريوسين بطريقة أقراص الاكار باستخدام وسط MacConkey agar

B) الكشف عن البكتريوسين بطريقة أقراص الاكار باستخدام وسط Brain Heart infusion agar

إستخلاص البكتريوسين من بكتريا *Klebsiella* spp المنتجة

تباينت نتائج إنتاج البكتريوسين بالنسبة للأوساط الزرعية المستخدمة نتيجة لإختلاف مكوناتها ومدى إحتوائها على مواد ممكن إن يكون تأثيرها سلبياً على إنتاج وفعالية البكتريوسين، وبالنسبة للأوساط السائلة كان وسط Trpton soy broth مضافاً إليه المايتوسين C بتركيز 10 مليغرام/مليلتر أفضل أنواع الأوساط المستخدمة وذلك بالاعتماد على قطر منطقة التثبيط حول العزلة المنتجة بإستعمال طريقة أقراص الاكار(جدول4) ومن ثم يليه وسط Trypton soy broth مضافا إليه 1% من خلاصة الخميرة وكان هذا الوسط أفضل من وسط Nutrient broth وهذا جاء متفقاً مع ما توصل إلية(18). Riley *et al* حيث أشار إلى أن المايتوماسين C يعد المادة الأفضل لحث إنتاجية البكتريوسين، كذلك أشار إلى أن إضافة خلاصة الخميرة تزيد من إنتاجية البكتريوسين. أما بالنسبة للأوساط الصلبة فقد كان وسط Trypton soy agar مضافا إلية 1% خلاصة الخميرة هو الأفضل إذ كان قطر منطقة التثبيط حول العزلة المنتجة 30 ملم وتفسير ذلك أن مكونات هذا الوسط أكثر ملائمة لإنتاج البكتريوسين من مكونات الأوساط الأخرى، وهذا ما أشار إلية الباحث Todorov (19) ، كما أشار Sarika *et al.* (20) في دراسة أجراها حول تأثير إختلاف الظروف الزرعية في إنتاج البكتريوسين من بكتريا*Lactobacillus rhamnosus* وأضاف بأن إختلاف الظروف الزرعية يؤثر سلباً أو إيجاباً في إنتاج البكتريوسين وإن إضافة بعض المواد قد تؤثر سلباً على إنتاج البكتريوسين. أما بالنسبة للأوساط الصلبة الأخرى فقد كان وسط Brain Heart infusion agar بإستعمال طريقة أقراص الاكار أفضل من وسط Nutrient agar إذ لم تظهر فيه نتائج واضحة.

وبالمقارنة بين الأوساط الزرعية الصلبة والأوساط السائلة المستعملة فقد كانت الأوساط الصلبة أفضل من الأوساط السائلة، وهذه النتيجة جاءت متوافقة مع ما توصل إليه Al-Charrakh (21) *et al.* الذي أشار الى أن الأوساط الزرعية الصلبة أفضل من الأوساط السائلة في دراسة أجراها حول تأثير عمل مضادات الحيوية على بكتريا *Klebsiella* spp المعزولة محلياً.

جدول(4):غربلة عزلات بكتريا *Klebsiella* spp تحت الاختبار في قابليتها على إنتاج البكتريوسين باستخدام طريقة أقراص الاكار

التسلسل	النوع	مصدر العينة	قطر منطقة التثبيط بالملم
1	*K. terrigena*	الجروح والحروق	-
2	*K . terrigena*	الجروح والحروق	12 ملم
3	*K. terrigena*	الجروح والحروق	–
4	*K. terrigena*	الجروح والحروق	10 ملم
5	*K. terrigena*	الجروح والحروق	-
6	*K. terrigena*	الجروح والحروق	20 ملم
7	*K. terrigena*	الجروح والحروق	30 ملم
8	*K.oxytoca*	الجروح والحروق	–
9	*K.oxytoca*	الجروح والحروق	9 ملم
10	*K.planticola*	الجروح والحروق	–
11	*K.planticola*	الجروح والحروق	–
12	*K.planticola*	الجروح والحروق	–
13	*K.planticola*	الجروح والحروق	–
14	*K. pneumoniae*	الدم	–
15	*K. pneumoniae*	الدم	–
16	*K. pneumoniae*	الدم	–
17	*K. pneumoniae*	الدم	9 ملم
18	*K. pneumoniae*	الدم	14 ملم

التحري عن البلازميدات في عزلات بكتريا *Klebsiella* المنتجة للبكتريوسين

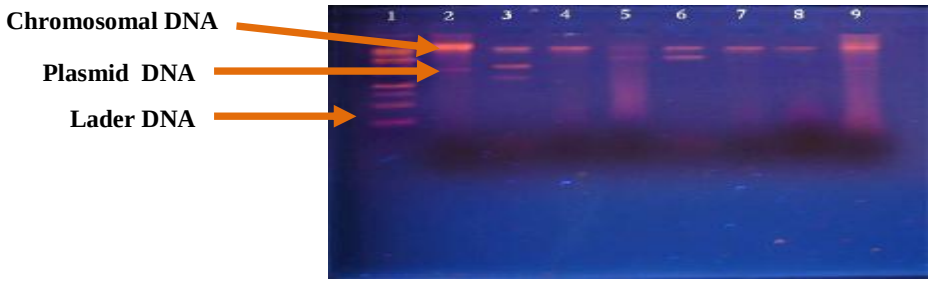
أظهرت نتائج دراسة المحتوى البلازميدي للعزلات البكترية المنتجة للبكتريوسين والبالغ عددها 7 عزلات، أن بعض عزلات *Klebsiella* spp المنتجة للبكتريوسين تحتوي على بلازميد كما أن هناك بعض العزلات لا تحتوي على بلازميد، وقد وجد أيضاً أن هناك بعض العزلات تحتوي على أكثر من بلازميد

بينما عزلات أخرى تحتوي على بلازميد واحد وذلك عند إجراء ترحيل كهربائي للبلازميدات المستخلصة من العزلات المنتجة للبكتريوسين (شكل 4).

كما أظهرت النتائج أن الاستخلاص بواسطة Pure Yield Plasmid Miniprep System أفضل من الاستخلاص بواسطة Promega Kit ، إذ أن نتائج الترحيل الكهربائي للعزلات المستخلصة باستعمال عدة Pure Yield Plasmid Miniprep System وأوضحت ظهور حزم بلازميدية فقط دون ظهور حزمة DNA كروموسومي مقارنة بتلك العزلات المستخلصة بواسطة Promega Kit والتي سببت ظهور حزمة الـ DNA الكروموسومي مع الحزمة البلازميدية.

إن نتائج هذه التجربة لا تعطي دليل واضح على موقع الجينات المشفرة لإنتاج البكتريوسين سواء كانت بلازميدية أو كروموسومية. ولأجل تحديد دور البلازميدات في إنتاج البكتريوسين فقد تم إختيار عزلتين من خلال إجراء المقارنة بين العزلات البكترية المنتجة للبكتريوسين والموضحة في جدول(4).

ومن خلال إجراء الترحيل الكهربائي للعزلات تم انتخاب العزلات التي عدت كفوءة في إنتاجيتها حيث تم انتخاب العزلة رقم (6) *K. terrigena* التي مصدرها الحروق والجروح لأنها كانت ذات فعالية تثبيطية عالية من خلال إعطائها مناطق منع نمو كبيرة وواضحة بلغت (20) ملم وكذلك أنها إحتوت على بلازميدين، كما تم إختيار العزلة رقم (7) *K. terrigena* التي كانت الفعالية التثبيطية لها عالية جداً إذ بلغت (30) ملم وأيضاً إحتوت على بلازميد واحد بعد إجراء الترحيل الكهربائي لها.



شكل(4): ترحيل كهربائي للعينات المستخلصة باستخدام Promega Kit

***(الترحيل الكهربائي باستعمال 1% هلام الاكاروز للبلازميدات المستخلصة بإستعمال Geneaid Kit لعدد من عزلات بكتريا*spp *Klebsiella* المنتجة للبكتريوسين .5 فولت/سم^2 ومدة 1 ساعة، المسار الأول Lader DNA ، المسار الثاني المحتوى البلازميدي لعزلة *K. terrigena* رقم 6، المسار الثالث المحتوى البلازميدي لعزلة*K. terrigena* رقم 7، المسار الرابع المحتوى البلازميدي لعزلة *K. terrigena* رقم 1، المسار الخامس المحتوى البلازميدي لعزلة *Klebsiella pneumoniae* رقم 17، المسارالسادس المحتوى البلازميدي لعزلة *Klebsiella pneumoniae* رقم 18).**

تحييد DNA البلازميدي

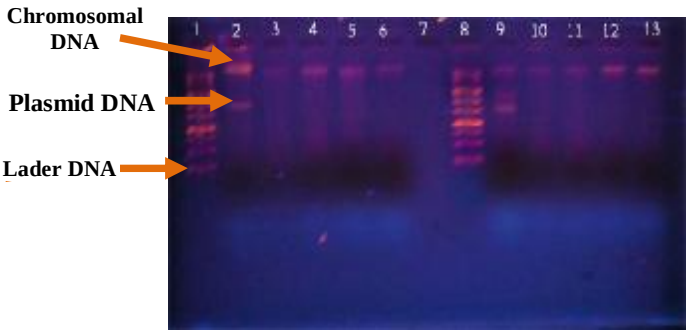
تم إختيار العزلة رقم (6) و العزلة رقم (7) لغرض إجراء عملية تحييد البلازميدات.

تحييد البلازميدات بواسطة صبغة (Ethidium bromide)

أظهرت نتائج إضافة صبغة بروميد الاثيديوم إن جميع مستعمرات بكتريا *K. terrigena* المحيدة

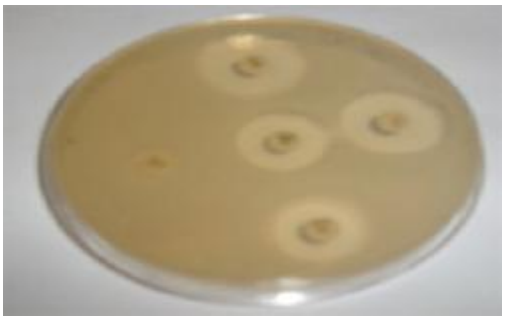
أصبحت غير قادرة على إنتاج البكتريوسين عند تركيز 512 مايكروغرام/مليلتر (شكل5) بعد ذلك أجري التحري عن البلازميدات لغرض التأكد من إن البلازميد هوالمسؤول عن إنتاج البكتريوسين إذ أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للعزلات المحييدة أنها قد فقدت الحزمة البلازميدية التي كانت تحويها قبل إجراء التحييد ما يدل أن البلازميد هو المسؤول عن إنتاج البكتريوسين كما في شكل(6)، كما أظهرت نتائج فحص الحساسية لمضادات الحيوية إن نسبة 75%من بين المستعمرات التي أجري لها الفحص أصبحت حساسة لمضادات الحيوية التي كانت في الأصل مقاومة لها قبل إجراء عملية التحييد، فقد كانت بعض المستعمرات التي أجري لها فحص الحساسية حساسة لجميع أنواع المضادات مما يدل على إن صفة المقاومة لهذه المضادات كلها محمولة على البلازميد كما أظهرت النتائج إن المستعمرات الأخرى كانت حساسة لبعض المضادات ومقاومة للبعض الأخر وهذا يدل على إن جينات المقاومة للمضادات محمولة على الكروموسوم (شكل7) .هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما توصل إليه Patwardhan *et al.* (22) حيث أشار في دراسة أجراها على عينات الإمراض المكتسبة في المستشفيات إن بكتريا الإمراض المكتسبة قد فقدت قدرتها على مقاومة مضادات الحيوية عند إستعمال صبغة Ethidium bromide بتركيز (512-1024) مايكروغرام/مليلتر كمادة محيَدة، وفي دراسة أخرى أجراها (23) Lee *et al.* أشار إلى إن سلالات *Rhodobacter* فقدت القدرة على إنتاج البكتريوسين عند إستعمال صبغة Ethidium bromide كمادة محيَدة، وعند إجراء الترحيل الكهربائي وجد أ جميع عزلات بكتريا *Rhodobacter* فقدت الحزم البلازميدية التي كانت تمتلكها قبل التحييد مما يدل على أن البلازميد هو المسؤول على إنتاج البكتريوسين. في حين أشار الباحث Chin *et al.* (24) في دراسة أجراها على بكتريا *Lactobacillus* وجد أنها لم يحصل بها تحييد للبلازميدات عند إستعمال صبغة Ethidium bromide وهذا مخالف للنتائج التي توصلنا إليها.

شكل(5) :مستعمرات *Klebsiella terrigena* بعد التحييد



شكل (6):ترحيل كهربائي للعينات المحيدة بواسطة صبغة Ethidium bromide

*(الترحيل الكهربائي باستعمال 1% هلام الاكاروز للبلازميدات المستخلصة بعد إجراء عملية التحييد للعزلات المنتجة للبكتريوسين باستعمال صبغة Ethidium bromide 5 فولت/سم ومدة 1 ساعة ، المسار الأول Ladder DNA ، المسار الثاني المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 6 قبل التحييد Control، المسار الثالث المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 6 بعد التحييد بواسطة (EB) مستعمرة رقم 1، المسار الرابع المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 6 بعد التحييد بواسطة (EB) مستعمرة رقم 2، المسار الخامس المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 6 بعد التحييد بواسطة (EB) مستعمرة رقم 3، المسار السادس المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 6 بعد التحييد بواسطة (EB) مستعمرة رقم 6، المسار الثامن Ladder DNA ، المسار التاسع المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 7 قبل التحييد Control، المسار العاشر المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 7 بعد التحييد بواسطة (EB) مستعمرة رقم 1، المسار الحادي عشر المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 7 بعد التحييد بواسطة (EB) مستعمرة رقم 2، المسار الثاني عشر المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 7 بعد التحييد بواسطة (EB) مستعمرة رقم 3، المسار الثالث عشر المحتوى البلازميدي للعزلة رقم 7 بعد التحييد بواسطة (EB) مستعمرة رقم4).



شكل(7): إختبار الحساسية لمضادات الحيوية بعد إجراء التحييد

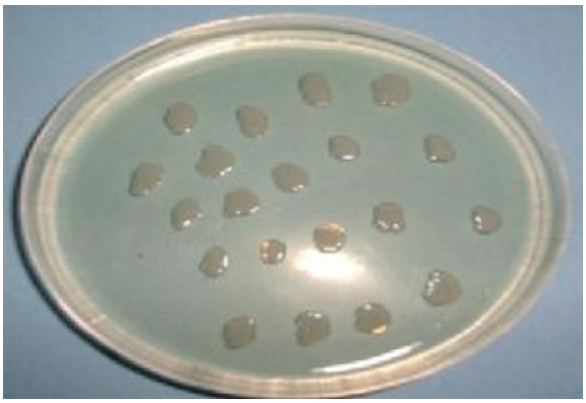
التحول الوراثي Transformation

أظهرت نتائج التحول الوراثي لبكتريا *E. coli MM 294rif* إنه أمكن الحصول على مستعمرات متحولة

(Transformant) على الأوساط الانتخابية الصلبة التي تحتوي على المضادات (Amp ,rif^+)، إذ تمكنت بكتريا *E. coli MM 294rif* $^+$ المتحولة من النمو على وسط SOB الصلب الذي يحتوي على المضاد الأمبسلين التي كانت حساسة له وهذا يعني أنه حصل التحول الوراثي وإكتسبت البكتريا المتحولة صفة المقاومة للأمبسلين (شكل8). وعند إستخلاص الـ DNA البلازميدي من الخلايا المتحولة، أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي لكل من السلالة الواهبة و السلالة المتحولة إن لها نفس الوزن الجزيئي، ويدل هذا إن الـ DNA البلازميدي لبكتريا *Klebsiella terrigena* قد تحول إلى بكتريا *E.coli MM 294rif*$^+$.

بعد هذا أجري فحص الكشف عن البكتريوسين للخلايا المتحولة إذ أستعملت طريقة أقراص الاكار لغرض الكشف. أظهرت النتائج أن البكتريا المتحولة أصبحت قادرة على إنتاج البكتريوسين التي لم تكن تتمكن من إنتاجه من قبل، ومن النتائج المتحصل عليها مما قد ثبت قطعاً أن البلازميد هو المسؤول على إنتاج البكتريوسين. هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما توصل إليه (25) Goren *et al.* في دراسة أجراها حول إنتقال صفة المقاومة لمضاد Carbapenem المحمول على البلازميد من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* ST258 إلى بكتريا *E. coli* عن طريق التحول الوراثي حيث أصبحت بكتريا *E.coli* مقاومة لمضادات الحيوية وهذا يثبت إنتقال صفة المقاومة مع إنتقال البلازميد.

كذلك أشار الباحثان Raja and Selvam (26) في دراسة أجريت لدراسة دور البلازميد في مقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لمضادات الحيوية، فقد أثبتت إنتقال صفة المقاومة للمضاد (AM) من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* إلى بكتريا *E.coli* عند إجراء تجربة التحول الوراثي. كذلك أثبت بعد إجراء الترحيل الكهربائي للبلازميد المستخلص من *E.coli* أن حجمه يقارب حجم بلازميد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.



شكل (8):بكتريا *E.coli* المحولة وراثيا والمنماة على وسط SOB الحاوي على Ampicillin بتركيز 10 ملي غرام/مليلتر

المصادر

1- Podschun, R.; and Ullmann. V.(1998). Klebsiella spp. As Nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing method, and Pathogenicity, factors.

Clin. *Microbiol. Rev*. 11(4): 589 -603.
2- Keynan, Y. and Rubinstein E. (2007).The changing face of Klebsiella pneumoniae infection in the community. Int. *J. Antimicrob. Agents*.30:385-389.
3- Karthikeyan, V.; and Santhosh, S. W (2009). Study of Bacteriocin as a Food Preservative and the *L. acidophilus* Strain as Probiotic .*J. Nutrition*, 8(4):335-340.
4- Riley, M. and Chavan. (2007). Bacteriocins Ecology and Evolution Springer-Verlag, London, United kingdom.
5- Singh, J. and Banerjee, N. (2008). Transcriptional Analysis and Functional Characterization of a Gene Pair Encoding Iron-Regulated Xenocin and Immunity Proteins of *Xenorhabdus nematophila. J. Bacteriology*,Vol.190(11):pp.3877-3885.
6- Gillor, O.; Etzion , A . and Riley, A (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. Appl. *Microbiol Biotechnol*, 81:591-606.
7- Riley, M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annu. Rev. Genet.,32: 255–278.
8- Hechard, Y.; Pelletier, C.; Cenatiempo, Y. and Frère, J. (2001). Analysis of σ^{54}-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII^{man}) is involved in sensitivity to a bacteriocin mesentericin Y105. *Microbiology*, 147: 1575–1580.
9- O'Sullivan, L.; Ryan, M. P.; Ross, R. P. and Hill, C. (2003). Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics Lacticin 3147 and Lacticin 481. Appl. Environ. *Microbio*l.,69(6): 3681–3685.
10- Govan, J. R. W. (1974). Studies on the pyocin of *pseudomonas aeruginosa*. Morphology and mode of action of contractile pyocins. *J. Gene. Microbiol*., 80:1–15.
11- القصاب، عبد الجبار عمر والخفاجي، زهرة محمود (1992). تأثير الظروف المختلفة على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية تجاه البكتريا المعوية المسببة للإسهال. كلية العلوم الزراعية العراقية. مجلد (123). العدد (7):18-26.
12- Sambrook, J.; Fritgah, E. and Maniatis, T. (1989). Molecular coloing, alabratory manual, cold spring Harbory. New York.
13- Elbanna, K.; Hassan, G.; Khider, M. l . and Mandour, R. (2010). Safe Biodegradation of Textile Azo Dyes by Newly Isolated Lactic Acid Bacteria and Detection of Plasmids Associated With Degradation . *J. Bioremed and Biodegrad* , Vol .1:2-6.
14- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and Williams, S. T.(1994). Bergey's manual of determinable bacteriology 9th ed. William and Wilkins, Baltimore.
15- Goodyear, N.; Kim, S.; Reeves, M. and Michael, L.(2006). A 2-Year Study of Gram Stain Competency Assessment in 40 Clinical Laboratories. *J. Clin Pathol*.,

125:28-33.
16- Tagg, S. R.; Dajani, A. S. and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocin of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev*., 40: 722–756.
17- Cursino, L.; Smarda, J.; Chartone, E. and Nascimento, A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae**.** Braz. *J. Microbiol*.,33:196-217.
18- Riley, M. A.; Goldstone, C. M; Wertz, J .E and Gordon .D.(2003). A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *J. EVOL.* BIOL.16:690-697.
19- Todorov, S. D.(2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*- Production, Genetic Organization and mode action . *J . Microbiology*,40:209-221.
20- Sarika, A. R.; Lipton, A .P .and Aishwarya, M .S. (2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. *J . Food Science and Technology*, 2(5):291-297.
21- Al-Charrakh, A .H.; Yousif, S .Y .and Al- Janabi, H .S.(2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* isolates from Hilla/Iraq. *J. Microbiol*,Vol. 2,Nu .5:1-11.
22- Patwardhan, R.B.; Dhakephalkar, P. K.; Niphadkar, K. B. and Chopade, B. A. (2008). A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acineobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *J. Med res.*128:178-187.
23- Lee, S. S.; Oh, T .J.; Kim, J.; Kim, J. B . and Lee, H. S .(2009) .Bacteriocin from Purple Nonsulfur Phototrophic Bacteria, *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriology and Virology*, Vol .39 :269 -276.
24- Chin, S.C.; Abdullah, N.; Siang, T. W. and Wan, H .Y.(2005). Plasmid Profiling and Curing of Lactobacillus Strains isolated from the Gastrointestinal Tract Chicken. *J. Microbiology*, Vol .43,Nu.3 ,:pp. 25 -256.
25- Goren, M .G.; Carmeli, Y.; Schwaber, M . J.; Chmelnitsky, I.; Scchechner, V. and Venezia, S. N (2010). Transfer of Carbapenem - Rasistant Plasmid from *klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. DOI. 1:p.1-9.
26- Raja, C. E and Selvam, G . S (2009). Plasmid profile and curing analysis of Pseudomonas aeruginosa metal resistant. *J. Environ.*, 6(2):259-266.