Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

Tolerance of E.coli bacteriophage isolated from kasa so in Kirkuk to different temperature degrees and different concentration of NaCl and its effect on many other types of bacteria

Najat abdul-kadir zaman

Department of Biology College of Science ,University of Kirkuk

Ada71566@yahoo.com

Abstract

In this study E.coli bacteriophe isolated from kasa sou .Host range of this bacteriophage have been studied on both isolates turbid and clear plugs .Bacteriophage tolerance of temperature indicated that the isolated phage able to laysis host cells until 40C .bacteriophage tolerance to NaCl salt also included in this study the highest salt concentration that the phae unable to lyse host cell was 2.0 %

Key words : bacteriophages ,E.coli ,Temperature ,NaCl .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

تحمل عاثيات الـ E.coli المعزولة من مياه خاصة صو في مدينة كركوك بدرجات حرارية وتراكيز من NaClالمختلفة ودورها في اصابة انواع اخرى من البكتريا

الدكتور : نجاة عبد القادر زمان

جامعة كركوك –كلية العلوم – قسم علوم الحياة

Ada71566@yahoo.com

الخلاصة :

خلال الدراسة الحالية تم عزل العاثي البكتيري الخاص ببكتريا *E.coli* من ماء خاصة صو في كركوك وتم دراسة مدى المضيف لهذا العاثي البكتيري من خلال القابلية على تحليل الخلايا البكتيرية المضيفة للعاثي وبالاضافةالى دراسة القدرة التحملية للعاثي البكتيري لدرجات حرارية مختلفة وكذلك تحمل العاثي لتراكيز مختلفة من ملح الطعام(NaCl) وتبين من خلال الدراسة ان العاثي البكتيري يظهر بقع تحلل بكتيري بنمطين رائق وعكر وان سعة المضيف اوسع للعاثي المعزول من البقع العكرة مقارنة بالعاثي المعزول من البقع الرائقه اما ما يخص تحمل العاثي البكتيري للحرارة فتبين من خلال الدراسة ان العاثي البكتيري يفقد القدرة على تحليل الخلايا البكتيرية الضيفة بعد الدرجة الحرارية ٤٠ درجة مؤية .وقد تم دراسة تحمل العاثي البكتيري لملح الطعام(NaCl) وتبين انها تفقد القدرة على تحليل الخلية المضيفة عند التركيز الملحي% 2.0 .

الكلمات الدالة : عاثيات البكتريا , E.coli, درجة الحرارة ,NaCl,

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

المقدمة : Introduction

عاثيات البكتريا Bacteriophages هي فايروسات لبدائية النواة Prokaryotes (١) تم أ كتشافها من قبل Frederich W Twort في سنة ١٩١٥ (2) . لعاثيات البكتريا القابلية على تحطيم الخلية البكتيرية (الخلية العائل) وذلك خلال تضاعف العاثي داخل الخلية البكتيرية مستخدما اليات الخلية البكتيريه الخاصة بالتضاعف والنمو وبعد تحطم الخلية البكتيرية المصابة بالعاثي تخرج العاثيات المتضاعفة لتهاجم خلايا جديده (3) .

تصنف العاثي البكتيري الى عوائل منها (Siphoviridea , myovirideae , cystovirideae) وتمتلك احماض نووية على شكل (dsDNA,ssDNA, ssRNA) حيث تتمكن جسيمة العاثي الفايروسي virion Particle من البقاء خارج الخلية البكترية الى ان تصل الى خلية بكتيريه حية وتبدأ التضاعف في داخل الخلية (٤) . تشير الدراسات الى ان عملية تضاعف العاثي البكتيري يتطلب وجود مستقبلات على الخلية البكتيرية المضيفة (3,4) ان عملية التضاعف للعاثي البكتيري تبدا بالادمصاص Adsorbtion حيث يحدث ارتباط بين الالياف الموجودة في نهاية العاثي مع مستقبلات على الخلية البكتيرية المضيفه وبعدها يتم حقن الحامض النووي للعاثي الى داخل الخلية البكتيرية penetration وثم عملية تضاعف العاثي replication من خلال تضاعف الحامض النووي للعاثي وثم بناء الاغلفة البروتينية من خلال عمليتي الاستنساخ والترجمة Transcription and Translation وكل هذه العمليات ينتج عنه تحلل الخلية المضيفه لتنطلق العاثيات الجديدة لتصيب خلايا بكتيريه اخرى ويطلق على هذا النوع ب lytic cycle اما النمط الاخر الذي يكون للعاثي البكتيري دور في نقل بعض العوامل الوراثية بين البكتريا الحية مثل عوامل الضراوة او المقاومة للمضادات الحيوية ويطلق عليها lysogeny .

(6,5) عاثيات البكتريا تم عزلها من خلال العديد من المياه سواء مياه عذبة او مياه مجاري او مياه البحر في بعض الاحيان (7) لعاثيات البكتريا دور مهم ومرغوب فيه في مجالات الصناعات الغذائية والدوائية حيث يؤثر بشكل سلبي على تحليل الخلايا البكتيرية او الفطرية (ما يخص العاثي الفطري mycophages) في المخمرات الصناعية مسببا خسارة اقتصادية (8) لقد تم اكتشاف البنسلين من قبل Fleming سنة ١٩٢٨ واستعمل بشكل واسع بعد ذلك مما ادى الى ظهور المقاومة لهذا المضاد الحيوي من قبل بعض البكتريا .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

ان استخدام العاثيات كعلاج ضمن الجيش الروسي كانت من قبل dr . Herelle وذالك لعلاج الاسهال والغرغرينا (dysenteria and gangrene) (9) يستخدم حاليا في اوروباالعاثي البكتيري لعلاج الحروق او منع تلوثها ببكتريا(*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) (10) ان من المزايا الحسنة من استخدام العاثي البكتيري في العلاج هو انه بديل جيد للمضادات الحيوية حيث انها لاتؤثر الا بالخلايا البكتيرية دون خلايا المريض procaryotes not eucaryotes effect only كما انها حل للمقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية التي ظهرت نتيجة للاستخدام الغير علمي للمضادات الحيوية (11)

المواد وطرق العمل : Materials and Methods

العزلات البكتيرية : Bacterial Isolates

تم الحصول على عينات من نهر خاصة صو في كركوك من مواقع متعدده حيث جمعت العينات في اواني معقمة لحين ايصالها الى المختبر وتم تصفية العينات للتخلص من الشوائب من خلال شاش طبي معقم ولقحت العينات على الاوساط الزرعية (Blood agar , MacConkey Agar , Nutrient agar) بطريقة النشر Spread plate method . حضنت الاطباق على درجة ٣٧ درجة مؤية لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة تم تشخيص وعزل البكتريا النامية من خلال التعرف عليها اعتمادا على شكل المستعمرات البكتيرية والاختبارات البايوكيميائية حسب المقاييس المعتمدة في Bergys Manual.

العاثي البكتيري Bacteriophages

تم الحصول على العاثي البكتيري حسب (12,13) حيث تم تحضير ٥ مل من المرق المغذي المعقم بالموصدة Autoclave وتم تلقيحها بالعزلات البكتيرية المستحصل عليها من عينات خاصة صو وحضنت لمدة ٢٤ ساعة على درجة ٣٧ درجة مؤية.مزارع الـ ٥ مل المحضنة لمده ٢٤ ساعة تم اضافتها الى دوارق ذات سعة ١٥٠ مل حاوية على المرق المغذي المعقم وتم رجها كل ١٥ دقيقة ولمدة ٢ -٣ ساعة وثم اضيف ٢٠٠ مل من ماء خاصه صو الى الدوارق حيث اصبح الحجم (١٥٠ +٥+٢٠٠) وتم تحضين الدوارق مع الرج كل ١٥ دقيقه ولمدة ٢- ٣ ساعة ثم

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

تركت العينات في الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة بدرجة ٣٧ درجة مؤية . تم عمل طرد مركزي للخليط الموجود بالدوارق على سرعة ٥٠٠٠ rpm لمدة ٣٠ دقيقة واخذ الرائق من الانابيب لترشيحه

من خلال مرشحات تعرف ب Millipore membrane filter ذات حجم 0.22 ul وتم جمع الراشح الذي يحتوي على العاثيات البكتيرية فقط في قناني معقمة ومعتمة .تم مزج جزء من الراشح الاخير ١٠٠ مايكروليتر بوسط شبه صلب ٣ مل Trypticase soy broth (ph=7). مضاف اليها العزلات البكتيرية وتم صبها على اطباق تحتوي اوساط صلبه معقمة لتكوين طبقة ثنائية lawne للتحري عن البقع الخاصه بالعاثي (٣)

دراسة مدى المضيف والخصائص الفسلجيةللعاثيات البكتيرية physiological properties Studying E.coli and host range

دراسة مدى المظيف للعاثي Studying *E.coi* host range

من خلال الدراسه والحصول على العاثي البكتيري الخاص ببكتريا E. *coli* تم دراسه مدى قابلية اصابة هذا العاثي لانواع بكتيرية اخرى من خلال نقل العاثي من البقع الرائقة او العكره clear pluqes or tubid pluqes الى وسط زرعي يحتوي عينات بكتريا ال *E. coli* وتحضيها لغرض تنشيطها وانمائها وثم اظافه قطره منها الى اوساط شبه صلبة تحتوي مزارع بكتيرية اخرى وسكبها على اوساط صلبة معقمة للحصول على lawne ومتابعة النتائج ومقارنتها باطباق سيطرة مزروع عليها بكتريا *E . coli*

استقراريةالعاثي البكتيري للحراره Stability of Bacteriophage to temp

بتقنية الطبقة المزدوجة Double -Layer Technique تم الحصول على العاثي البكتيري الخاص ب *E . coli* وتم دراسة استقرارية هذه العاثيات البكتيرية تجاة التغير بدرجات الحرارة ٢٥ و٣٥ ,30 , 37 ,درجة ,40,45,50,55 درجة مؤية وذالك من خلال تحضينها في حمام مائي باستخدام وسط Trypticase soy broth (ph=7). مع مقارنتها بعينات سيطره حضنت بدرجة٣٧ درجة مؤية (١٥)

استقراريةالعاثي البكتيري للملح Stability of Bacteriophage to NaCl

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

باستخدام نفس التقنية الطبقة المزدوجة Double -Layer Technique) تم دراسة استقراريةالعاثي البكتيري لتحمل التراكيز المختلفة من NaCl بتراكيز

(0.2%,0.4%,06%, 0.8%, 1.0% , 1.2%, 1.4 % ,1.6%, 1.8% 2.0%)

وذاك باضافةهذة التراكيز من الملح الى انابيب تحتوي ١٠٠ مايكرو ليتر من المحلول الحاوي على العاثي المضاف الى انبوبة تحتوي على العزلات البكتيرية في وسط Trypticase soy broth (ph=7) مع مقارنتها بعينات سيطره بدون اضافة الملح .(13,14)

النتائج : Results

من خلال دراسة مدى المضيف host range للعاثي البكتيري تبين ان العاثي البكتيري الخاص ببكتريا *E.coli* له القدرة على اصابة بعض البكتريا السالبة لصبغة جرام(Enterobacter sp , pseudomonas Sp) بالاضافة الى *E.coli* المعزولة من عينات سريرية هذا مايخص العاثي البكتيري ذي البقع العكرة Turbid pluqes اما العاثي ذي البقع الرائقهclear pluqes فاظهرت قابلية اصابة فقط لبكتريا *E.coli* المعزولة من عينات سريرية كما موضح في الجدول رقم (١). اما بخصوص تحمل العاثي لدرجات الحراره تبين ان العاثي الخاص ببكتريا *E.coli* المعزولة من خاصة صو اظهرت تحملها للحراره لغاية ٤٠ درجة لكلا العزلات ذي البقع الرائقة والعاثي ذي البقع العكرة ولم تظهر التحلل بعد هذه الدرجة كما موضح في جدول (٢) . اما ما يخص تحمل العاثي الخاص ب *E.coli*المعزولة من خاصة صو لملح الطعام NaCl تبين ان العزلة لها القابلة على التحمل لتركيز ٢,٠ % ويفقد العاثي القابلة على تحليل البكتريا المضيفة في تراكيز اكبر من هذا في كلا العزلتين من عاثي ال *E.coli* ذي النمط الرائق والعكر كما موضح في الجدول رقم (٣) .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

جدول رقم (١): يبين مدى المضيف للعاثي البكتيري *E.coli* bacteriophage .

العاثي البكتيري	Lysis ability of bacteriophage				
	Types of bacteria				
	Pseudomonas aeroginasa	*Enterobacter sp*	*E.coli*	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcus pyogenes*
E.coli – Phage (turbid Pluqe)	Lysis	Lysis	lysis	No- lysis	No- lysis
E.coli – Phage (Clear Pluqe)	No- lysi	No- lysis	lysis	No- lysis	No- lysis

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

جدول رقم (٢): يبين تحمل العاثي البكتيري *E.coli* bacteriophage للحرارة .

العاثي البكتيري	Lysis ability of bacteriophage					
	Temperature					
	25Cº	30Cº	35Cº	40Cº	41Cº	45Cº
E.coli – Phage (turbid Pluqe)	Lysis	lysis	lysis	No-Lysis	No-Lysis	No-Lysis
E.coli – Phage (Clear Pluqe)	Lysis	lysis	lysis	No- Lysis	No-Lysis	No-Lysis

جدول رقم ٣٢) : يبين تحمل للعاثي البكتيري *E.coli* bacteriophage للتراكيز المختلفة من ملح الطعام NaCl .

العاثيالبكتيري	Lysis ability of bacteriophage									
	NaCl concentration									
	0.2 %	0.4%	0.6%	0.8%	1.0%	1.2%	1.4%	1.6%	1.8%	2.0%

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

E.coli – Phage (turbid Pluqe)	**lysis**	**Lysis**	**lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**No-Lysis**
E.coli – Phage (Clear Pluqe)	**Lysis**	**lysis**	**lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**Lysis**	**No-Lysis**

المناقشة :

هناك العديد من الدراسات الجزيئية للتحلل البكتيري الناتج من قبل العاثي البكتيري للسيطرة على الضراوة البكتيرية في اصابات الانسان والحيوان [young } (١٦) ومن الممكن ان نلخص ان تحلل الخلية المظيفة هوالناتج النهائي للعدوى من قبل العاثي البكتيري) wang (١٧) تعتبر الحرارة احد العوامل المهمة ي السيطرة على النظام الحيوي والتغيرات الحاصلة على المستوى العالمي او المحلي له الدور الكبير في التاثير على الانماط الاحيائية في المنطقة في البحث الحالي تم دراسة تحمل العاثي البكتيري الخاص ببكتريا *E.coli* لدرجات الحرارة وتبين انها لا تتحمل اكثر من 40درجة مؤية وانها تحلل بصورة جيدة بين الدرجات الحرارية 25-37 وهذا يتوافق مع نتائج لبحث taj الذي وجدان العاثي T-4 bacteriophage قادر على تحليل البكتريا المظيفةفي درجات 25-37وكذالك يشابه البحث Groman1962 وعدم تحلل البكتريا من قبل العاثي في بحثنا بدرجات حرارية فوق 40 درجةمؤية يشابه بحث pollard 1964 واما البحث المنشور من قبل Basdew and Laing 2014الذي يذكرفيه ان زيادة الحرارة تقلل من الفعالية الفايروسية للعاثي البكتيري لتحليل الخليةالبكتيرية المضيفة حيث بينت الدراسة ان الزيادة في نسبة تحليل الخلايا البكتيرية عند الحرارة 37ولغاية ٣٩ . دراسة من قبل Harold Brussow ذكرت ان دراسة تحمل العاثي للحراره في الظروف الجافة dry condition بينت ان العاثي تحمل الحرارة لغاية ٥٥ درجة مؤية وان العاثي يحتفظ بقدرته على احداث الاصابة بخلايا المضيف الخاص به عند معاملته بعملية التجفيد لغاية ١٤ شهر . (٢٠) من خلال الدراسةالحالية لمدى مضيف العاثي البكتيري تبين ان العاثيالبكتيري *E .coli* phageالمعزول من بقعة عكرة قادر على اصابة بكتريا سالبة لصبة جرام حتى وان كانت معزوله من عينات مرضية وغير قادرة على بكتريا موجبة لصبغة جرام اما بخصوص العاثي المعزول من بقع رائقة لم تظهر احداث اصابة في كلا النوعين البكتريا السالبة والموجبة المعزولتين من عينات مرضية (١٨) ان قابلية عاثيات البكتيرية *E.coli* – phage ذي البقع العكرة Turbid Pluqes على اصابة اكثر من جنس بكتيري قديعود إلى

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

الطفرات في هذا النوع حيث هناك دراسة من قبل Mizogi اشارت إلى ان بعضالطفرات التي تحدث في العاثي البكتيري ويزيد من مدى مظيف العاثي (١٩)ان وجود بقايا الخلايا المتحللةمن ال *E.coli* لم يسبب اي تفاعلات غير مرغوبة بها لدى المريض عند استخدامه عن طريق تناوله بالفم. وان قابلية نمو البكتريا *E.coli* على اوساط رخيصة يجعل عملية انماء العاثي سهلا .دراسة اخرى من قبل Slopek et al في سنة ١٩٨٧ من بولندا عن علاج حالات انتنان الدم الناتج بشكل خاص من قبل البكتريا *E.coli* حيت بينت الدراسة ان ٩٠% من الحالات اعطت نتائج جيدة بخصوص المرضى الذين لم يكن لديهم استجابة للمضادات الحيوية (١٩)

المصادر:

[1] Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J.G. Antimicrob. Agents therapy Chemother.1999; 45: 649-659.

[2] Geoffrey William Hanlon Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections International Journal of Antimicrobial Agents (2007): 118–128

[3] Lawrence G , Stephen T. A Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: Application of phage therapy to industry . 2003, Vol. 53, No. 6

[4] Douglas J. Borris Nelson, D., Loomis, L., and Fischetti, A.. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc. Nat.Acad. Sci. 2001;98(7):4107-12.

[5] Drake, J. H. and Ripley, L. S.. Mutagenesis. In: Karam, J. D. Molecular Biology of Bacteriophage T4. Washington: ASM Press. 1994; p 98-124.

[6] Ranquet C, Toussaint A, de Jong H, Maenhaut-Michel G, Geiselmann J. Control of bacteriophage mu lysogenic repression. J Mol Biol .2005;353:186–95.

[7] Birge, E.A., 2000. Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4th ed Springer, New York.

[8] Braun V, Teuber M, Geis A, Hertwig SJR, Neve H (1989 Taxonomic differentiation of bacteriophages of Lactococcus lactis by electron microscopy, DNA-DNA hybridization and protein profiles. J Gen Microbiol 1352551–2560

[9] Jack F S , Wim Hoogenboezem ,S Majid Hassanizadeh .Modeling removal bacteriophages MS2 and PRD1 by dune recharcge at Castricum ,Netherlands .Water resources research ,2005;Vol 35 ,NO 4 : 1101-1111

[10] Amin, M. K., Mahmoud, A. A., Mahgoub E. I., and Amina A. H. Characterization of transducing temperate phage isolated from sewage. Zag, J. Agric. Res. 2004; 31: 1533-1550.

[11] yang R I , Wang N I ,Roof W D .Phages will out : Straegies of host cell lysis .Trends .Microbiol.2008 ;120-128.

[12] Wang I N ,Smith L D, yang R I .The Holins .the protein clocks of phage concentration on the inhibition of planktonic bacterial

[13] M. K. Amin .Isolation and characterization of *Pseudumonas aeuroginosa* bacteriophage from agriculture drain water . Egyptian J virol .2006; Vol(3), NO (1) :p 19-34.

[14] James G. Cappuccino and Natalia Sherman . Microbiology a laboratory manual . 3 th ed , 1992; :p 219- 221.

[15] Mahadevan M . Sunder ,Naganada G. S, Arijit Das , Sourav Bhattacharya and Sandeep Suryan . :Isolation of host specific bacteriophage from sewag against human pathogens . Asian Journal Biotechnology .2009.;VOL(1) ,NO(4) :.P 163-170.

[16] Steven Hagens and Martin J . Lessner .:Application of bacteriophage for detecation and control of foodborn pathogens . Appl. Microbial Biotechnol. 2007; P:1031-8.

[17] Groman N B .Temperature and the reproduction of lamda – phage mutants .Journal bacterial .2008; 84 :438-45

[18] Besdew I H, Lating M D .Stress sensitivity assays of bacteriophages associated with Staphylococcus aureus , causal organism of bovine mastitis .2014; African J Microbiol Res ., 8(8):200-210.

[19] Pollard E ,Woodyatt S .The effect of temperature on the formation of T1 and T2 bacteriophage. Biophy J 2007;4 :367-385 .

[20] Slopek S , Weber –Dabrowska , M , .Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infection in years in years 1981-1986. Arch immunol Ther Exp: 1987; 35 , 569-583.

[21] Harald Brussow .Phage therapy : the E.coli experience .Microbiology ":2005 ;151:2133-2140.