Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(1-10)
ISSN 1992 – 0849

Detection of enterococci ability to produce bacteriocin and evalution of it's inhibition effect on some bacteria

Shara Najmalddin Abdullah [1] *, Hager Ali Shareef* [2]

[1]Kirkuk University/ College of Science - biology Dept.
[1]junaid_kameran@yahoo.com
[2]Kirkuk University/ College of Science - biology Dept.
[2]Alihajar19@yahoo.com

RECEIVED DATE:10/12/2014 ACCPTED DATE:11/1/2016

ABSTRACT

The study was conducted for detection of bacteriocin production ability in isolates of enterococcus spp in urine sample by disc assay method . results showed all isolates of E. faecium and some of E.faecalis have the ability to produce bacteriocin . these bacteriocines showed high inhibitory effect against gram positive bacteria than gram negative.
Key Word : Enterococcus ,Bacteriocines , E.faecium , E.faecalis

الكشف عن قابلية جراثيم المكورات المعوية على انتاج البكتريوسين وتقييم تأثيره على منع نمو بعض الجراثيم

Shara Najmalddin Abdullah [1] *, Hager Ali Shareef* [2]

[1] جامعة كركوك/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة
[1]junaid_kameran@yahoo.com
[2] جامعة كركوك/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة
[2]Alihajar19@yahoo.com

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(1-10)
ISSN 1992 – 0849
تاريخ قبول البحث:2016/1/11 تاريخ استلام البحث:2014/12/10

الملخص

اجريت هذه الدراسة للكشف عن قابلية انتاج العزلات المكورات المعوية للبكتريوسين بأستخدام طريقة اقراص الاكار (disc assay) ومعزولة من عينات الادرار في دراسة سابقة والتي تم تأكيد تشخيصها بأعتماد على مواصفات المستعمرات والفحوصات البايوكيميائية ، بينت النتائج قابلية جميع العزلات E.faecium وبعض عزلات E.faecalis على انتاج البكتريوسين ، أظهرت البكتريوسينات المنتجة فعالية تثبيطية اكثر ضد الجراثيم الموجبة لصبغة كرام مقارنة بالجراثيم السالبة لصبغة كرام.

كلمات دالة: المكورات المعوية، البكتريوسينات ، E.faecium ، E.faecalis

1.المقدمة (Introduction) :-

تعد جراثيم المكورات المعوية *Entrococcus* جزء من النبيت الطبيعي في القناة المعدية المعوية Gastrointestinal tract كما وتعد من المستوطنات الطبيعية في التجويف الفمي والجهاز التناسلي الانثوي لكل من الانسان والحيوان ، كما توجد هذه الجراثيم في العديد من البيئات اذ توجد بالتربة والمياه وعلى النباتات والاطعمة المتخمرة [1,2]. البكتريوسينات Bacteriocines عبارة عن بروتينات او ببتيدات تمتلك فعالية الضد المايكروبية، تصنع رايبوسوميا وتتحرر الى خارج الخلية وتستخدمه البكتريا المنتجة لها في قتل او تثبيط نمو الانواع القريبة منها وراثيا والانواع الاخرى المختلفة من النوع نفسه، وتشبه عمل البكتريوسينات عمل المضادات الحيوية الأ انها اكثر تخصصا منها[3]. تنتج البكتريوسينات من قبل العديد من السلالات التابعة لانواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك (LAB) Lactic acid bacteria ، ومن ضمنها المكورات المعوية وكذلك تنتج من قبل البكتريا القديمة Archaea والعديد من البكتريا الاخرى ، الا ان البكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا حامض اللبنيك ومن ضمنها المكورات المعوية ينظر اليها على انها حالات أمنة Generally Regarded As Safe (GRAS) Status ، قد تلقت اهتماما تصاعديا كون لها تطبيقات فعالة في الزراعة وصناعة الأغذية والأدوية [4] ،اذ انها تستخدم كمعززات حيوية Probiotics في حفظ الاغذية ، وطبيا تستخدم كبدائل او مشتقات تضاف للمضادات الحيوية في علاج الامراض المعوية المتسببة عن البكتريا

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(1-10)
ISSN 1992 – 0849

والطفيليات والفطريات والفايروسات [5]. وتؤثر البكتريوسين على خلية الهدف من خلال تكوين ثقوب حيوية في الغشاء السايتوبلازمي للخلية عن طريق تكوين تركيب حلزوني من الببتيدات الملتفة عشوائيا للبكتريوسين والتي هي بتماس مع الغشاء الخلوي ، اذ ينغرس هذا التركيب الحلزوني ويمتد الى الغشاء مكونا ثقوب مما يؤدي الى تبديد الغشاء ونضوح ايونات البوتاسيوم +K وتثبيط امتصاص الاحماض الامينية مما ينتج عنه اختلال توازن الخلية ومن ثم موتها [6,7]. وتساعد البكتريوسينات المنتجة من قبل عزلات المكورات المعوية في استعمار قناة الامعاءوالسيطرة والمنافسة مع المستوطنات الطبيعية الموجودة في الامعاء [8].

2.المواد وطرائق العمل (Materials and Methods):–

* **العينات:**– تم أستخدام جميع العزلات من جراثيم المكورات المعوية والبالغة عددها 39 عزلة والتي تتضمن 31 عزلة من *E.faecalis* و5 عزلات من *E.faecium* و2 ،1 عزلة من كل من *E.gallinarum* و*E.durans* على التوالي، والعائدين الى مجموعة D من مجاميع لانسفيلد المصلي، والتي تم عزلها محليا من 605 عينة ادرار للمرضى الوافدين الى مستشفى ازادي التعليمي وكركوك العام في مدينة كركوك والذين يشك بأصابتهم بالتهابات المجاري البولية، وتم تشخيص هذه العزلات بملاحظة الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على الاوساط الزرعية الاتية (Azid bile esculine agar , MaCconkey agar , Azid blood agar) المجهزة من قبل شركة (Oxoid(England)) بعد زرعها خلال فترة زمنية اقل من ساعة وبأستخدام الاختبارات الكيموحيوية والتشخيص المصلي بطريقة لانسفيلد ، ودعمت نتائج التشخيص بأستخدام نظام API 20 –strep، وحدد نوع الجراثيم بأستخدام نظام Vitek 2 Compact ، وذلك لتحري عن العزلات المنتجة للبكتريوسين ودراسة تأثير وفعالية البكتريوسين المنتج تجاه العزلات غير المنتجة لها من المكورات المعوية وكذلك تجاه بعض الممرضات الجرثومية من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام .

* **الكشف عن انتاج البكتريوسين** :– تم استخدام طريقة اقراص الاكار (disc assay) للتحري عن العزلات المنتجة للبكتريوسين والعزلات الحساسة له . اذ تم استخدام عزلات *E.faecalis* كعزلات منتجة ، كما استعملت العزلات كافة كعزلات حساسة و اجري الاختبار كالاتي :–

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(1-10)
ISSN 1992 – 0849

1-زرعت العزلات الجرثومية المراد التحري عن إنتاجها للبكتريوسين في وسط مرق نقيع القلب والدماغ كل منهما على انفراد، وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18 ساعة .

2 -أخذ 0.1 مل من المزروع الجرثومي أعلاه وزرع بطريقة النشر على سطح وسط اكار نقيع القلب والدماغ ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18 – 24 ساعة .

3-لقح وسط مرق نقيع القلب والدماغ بالعزلات قيد الدراسة في خطوة رقم 1 وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 3-4 ساعات ، ثم أخذ 0.1 مل منه ونشر على سطح وسط اكارنقيع القلب والدماغ ، ترك الوسط بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 10 دقائق .

4-عملت أقراص بقطر (15) مليمتر من اطباق الآكار النامية عليها الجراثيم المنتجة للبكتريوسين في الخطوة الثانية بوساطة ثاقب فليني معقم ، نقل قرصان من كل عزلة إلى سطح الوسط الملقح بالسلالات المراد اختبار الحساسية له وحضنت بدرجة حرارة (37) مْ لمدة (24) ساعة.

5-سجلت النتائج الموجبة بظهور مناطق شفافة حول قرص الآكار الحاوي على العزلة المنتجة، وتم قياس قطر منطقة التثبيط [9,10].

3.النتائج والمناقشة (Results and Discussion):-

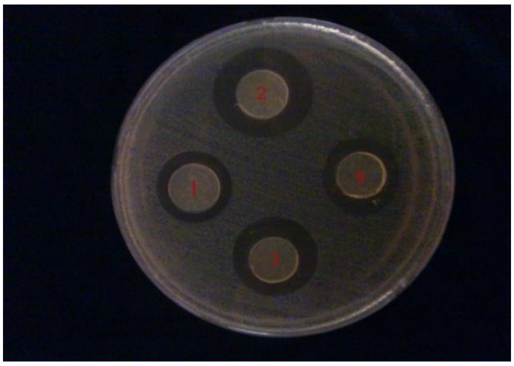
اجريت العديد من الدراسات حول عزلات المكورات المعوية المنتجة للبكتريوسينات في بلدان مختلفة وبطرق مختلفة ، وفي الدراسة الحالية تم استخدام 39 عزلة من الجراثيم (*E.faecalis* , *E.faecium* ,*E.gallinarum* , *E.durans*) والتي عزلت في دراسة سابقة وقد تم التاكد من تشخيصها اعتمادا على مواصفات المستعمرات والفحوصات البايوكيميائية والتي كانت تتوافق مع [11] كما تم الكشف عن القابلية العزلات قيد الدراسة على انتاج البكتريوسين بطريقة اقراص الاكار، واظهرت النتائج قابلية (17) عزلة وبنسبة (43.58%) على انتاج البكتريوسين ، ولوحظ من خلال النتائج ان جميع عزلات *E.faecium* كانت منتجة للبكتريوسين, في حين استطاعت (12) (38.709%)عزلة من عزلات *E.faecalis* من انتاج البكتريوسين بينما لم تتمكن عزلات *E.gallinarum* وعزلة *E.durans* من انتاجها . جاءت هذه النتائج متفقة مع دراسة [12,13] اذ اشاروا الى ان عزلات *E.faecium* هي اكثر انتاجا للبكتريوسين وان عزلات *E.gallinarum* غير منتجة للبكتريوسين ، وانخفضت نتائج الدراسة الحالية بمقدار (34.42%) عما سجله الباحث [14] اذ بلغت نسبة العزلات المنتجة للبكتريوسين في دراسته (78%) .كما وتمت دراسة تأثير وفعالية البكتريوسين المنتج

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(1-10)
ISSN 1992 – 0849

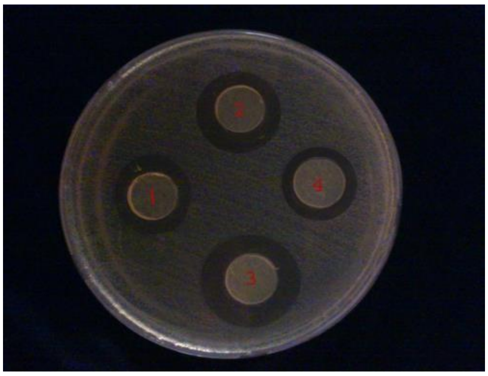
من قبل عزلات المكورات المعوية على عزلتين من المكورات المعوية البرازية *E.faecalis* ، وعلى احدى عزلتيي *E.gallinarum* و *E.durans* وغير المنتجين للبكتريوسين ، واظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4-13) والصور (4-15) و (4-16) و(4-17) و (4-18)، أن العزلات الاربعة كانت حساسة للبكتريوسين المنتج من العزلات المدروسة .

جدول(4-13):- التأثير التثبيطي للبكتريوسين المنتج من قبل بعض عزلات *E.faecalis* و*E.faecium* تجاه بعض عزلات المكورات المعوية الاخرى غير المنتجة للبكتريوسين.

العزلات المنتجة	قطر منطقة تثبيط النمو (بالمليمتر)			
	E.gallinarum	***E.durans***	***E.faecalis***	***E.faecalis***
E.faecalis	18	15	15	15
E.faecalis	15	22	20	22
E.faecium	20	17	24	17
E.faecium	17	19	18	19

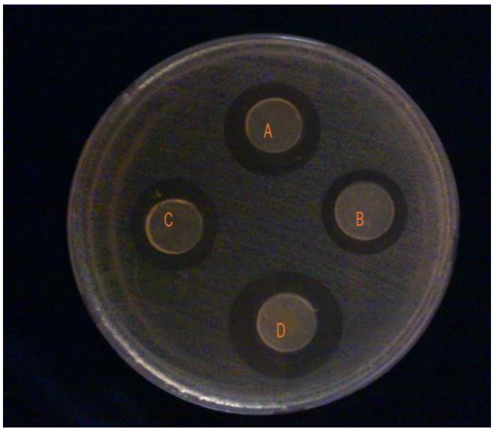


صورة (4-15) :- تأثير بكتريوسين عزلتي *E.faecalis* و*E.faecium* في تثبيط نمو عزلة *E.gallinarum* .

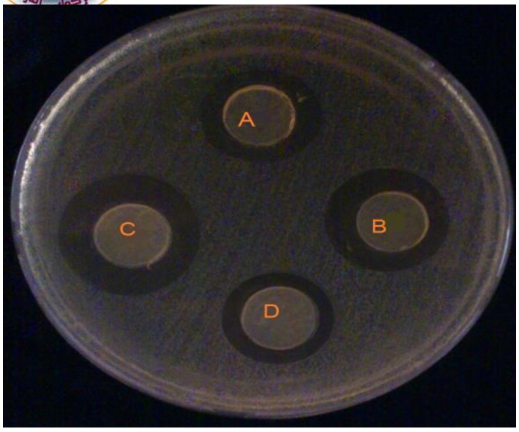


صورة (4-16) :- تأثير بكتريوسين بعض عزلات المكورات المعوية في تثبيط نمو عزلة *E.durans*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(1-10)
ISSN 1992 – 0849



صورة (4-17):- تأثير بكتريوسين عزلتي *E.faecalis* و*E.faecium* في تثبيط نمو عزلة *E.faecalis* .



صورة (4-18):- تأثير بكتريوسين عزلتي *E.faecalis* و*E.faecium* في تثبيط عزلة *E.faecium*

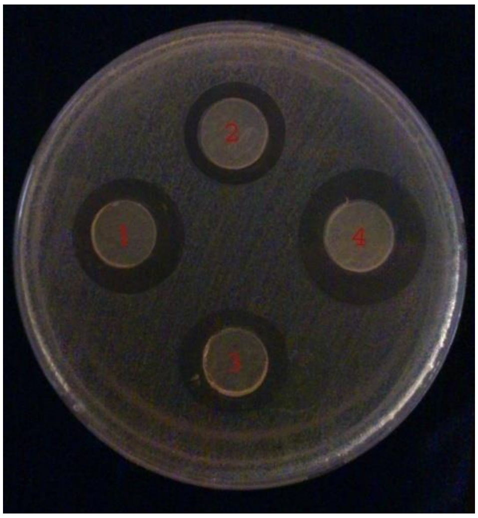
كما وتمت دراسة تأثير وفعالية البكتريوسين المنتج من قبل عزلات المكورات المعوية تجاه بعض الممرضات الجرثومية الاخرى واوضحت النتائج أن البكتريوسين المنتج من قبل *E.faecalis* و *E.faecium* ذو فعالية تثبيط عالية لعزلات الجراثيم الموجبة لصبغة الكرام(*Staphylococcus aureus*) و (*Streptococcus pyogens*) اذ تراوحت الاقطار التثبيطية بين (15-21) ملم كما هو مبين في الجدول (4-13) الصورة (4-19).، الجدول (4-14).أما بالنسبة للجراثيم السالبة لصبغة الكرام (*E.coli*) و(*Psedomonas aeroginase*) فقد اظهرت العزلة *E.faecalis* B30 المعزولة من الدم والعزلة *E.faecium* V35 المعزولة من مسحات المهبل فعالية تنثيطية ضد جرثومة *E.coli* فقط، اذ كانت القطر التثبيطي لهم (15)و(20) ملم على التوالي، وكما هو موضح في الجدول(4-14) والصورة(4-20).

جدول(4-14):الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنتج من قبل عزلات المكورات المعوية تجاه الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة الكرام.

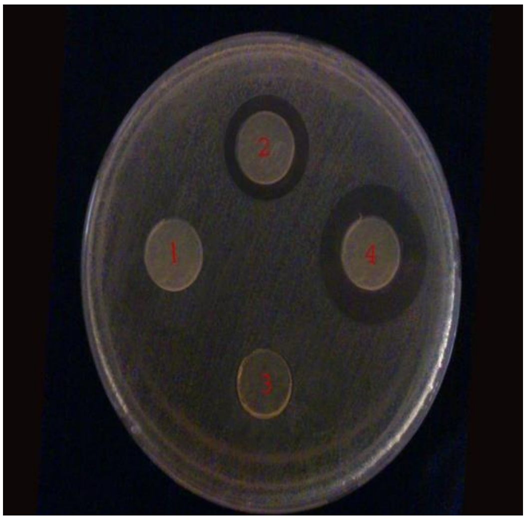
العزلات المحلية للمكورات المعوية	قطر منطقة التثبيط بالمليمتر (mm)			
	جراثيم موجبة لصبغة كرام		جراثيم سالبة لصبغة كرام	
	Staphylococcus aures	***Streptococcus pyogens***	***Echerichia coli***	***Pseudomonas aeroginose***
E.faecalis	15	18	0	0
E.faeca	21	19	15	0

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(1-10)
ISSN 1992 – 0849

				lis
0	0	22	17	E.faeci um
0	20	16	19	E.faeci um



صورة (4−19) :− تأثير البكتريوسين المنتج من قبل عزلتي *E.faecalis*و*E.faecium* في تثبيط نمو عزلات *.Streptococcus pyogenes*



صورة (4−20) :− تأثير البكتريوسين المنتج من قبل عزلتي *E.faecalis* و *E.faecium* في تثبيط نمو عزلة *E.coli*

وجاءت هذه النتائج متفقة مع دراسة [15] , كما تتفق مع العديد من الدراسات المحلية والعالمية التي اشارت الى قدرة عزلات المكورات المعوية على انتاج البكتريوسينات والفعالية التثبيطية العالية لهذه البكتريوسينات ضد الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وفعالية اقل ضد الجراثيم السالبة لصبغة كرام , [16,17,18,19, ,5] اشار الباحث [5] الى حساسية الجراثيم الموجبة لصبغة الكرام للبكتريوسينات تعزى الى تركيب الجدار الخلوي اذ يحتوي على طبقة الببتيدوكلايكان فقط وهو يعتبر حاجز نفاذي غير مؤثر مما يجعله حساسا جدا. بينما الجراثيم السالبة لصبغة الكرام تحتوي في جدارها ، فضلا عن الطبقة الرقيقة من الببتيدوكلايكان ، على الغشاء الخارجي المكون من طبقة الفوسفولبيد الثنائية والتي تحمل المكونات التركيبية لطبقة متعددة السكريد الشحمي (LPS) مما يجعل الجدار اكثر تعقيدا وغير نافذ للمواد المضادة للجراثيم وبالتالي تكون الجراثيم اقل حساسية مقارنة بالجراثيم الموجبة لصبغة الكرام و للعوامل المضادة للجراثيم . واوضح الباحثون ان الية عمل

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(1-10)
ISSN 1992 – 0849

البكتريوسين على العزلات الحساسة هي تحفيز بعض انزيمات التحلل الذاتي Autolyasine المرتبطة بالاحماض الدهنية التي تدخل في تركيب الجدار الخلوي والتي تعمل على تحطيم اغشية الخلايا البكتيرية تحت الظروف غير الطبيعية من خلال تكوين قنوات ايونية تؤدي الى ازالة القطبية للاغشية الخلوية Depolorization. أما مقاومة العزلات للبكتريوسينات فيعزى الى امتلاكها للجين الذي يشفر للمقاومة ضد البكتريوسين اوالى حدوث بعض التغيرات في تركيب اغشية وجدران هذه الجراثيم او يعزى الى عدم امتلاكها للمستقبلات الخاصة بهذه البكتريوسينات [20] .

4.المصادر (Reference):−

[1] J. A. Mohamed and D. B. Huang, Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol* ,56, (2007),pp. (1581–1588).

[2] S Sreeja, PRS Babu and AG Prathab, The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in the tertiary care hospital, J. Clin. Diagn. Res. 6 , (2012), 9, pp.(1486-1488).

[3] Y Belguesmia, K Naghmouchi, N Chihib,and D Drider , Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In: Djamel Drider, Sylvie Rebuffat, editors. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. 1st ed. New York., (2011), NY: Springer Science+Business Media, LLC. pp 95-171.

[4] O.B Chahad, M.E Bour, P Calo-Mata, A Boudabous,and J Barros-Velàzquez, Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. Research in Microbiology 163, (2012). PP(44-45).

[5] S.K. Panda, L. Padhi and A.K Bastia , Antibacterial Efficacy of Selected from Traditional Rice Beverage (Handia).Universal Journal of food an Nutrition Science ,1 (2013). 2 pp (22-28).

[6] Y. Hechard and H. G Sahl, Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84, **(**2002), pp. (545–557).

[7] A. S. Motta, F. S .Flores, A. A. Souto, and A. Brandell, Antibacterial activity of a bacteriocin – like substance produced by *Bacillus sp* . P34 that targets the bacterial cell envelope). Antonie van Leeuwenhoek, 93 ,(2008). PP (275 – 284) .

[8] S .Saeed, SA. Rasool, S . Ahmed, T Khanum, MB. Khan, A. Abbasi,and SA. Ali , New insight in staphylococcin research: bacteriocin and/or bacteriocin-like inhibitory substances produced by S. aureus AB188. World J. Microbiol. .Biotechnol. 22 (2006). PP (713-732).

[9] 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.

[10] J. E. Line, E. A. Svetoch , B. V. Eruslanov , V. V. Perelygin , E. V. Mitsevich , P. MitsevichI, V. P. Levchuk , O. E. Svetoch , B. S. Seal , G. R. Siragusa, and N. J Stern, Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria). *Antimicrob. Agents Chemother*.52,.(2008). PP (1094–1100).

[11] Facklam, R.R. ;and Collins, M.D.(1989). (Identification *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme) . J. Clin. Microbiol. 27:731-734 .

[12] خضير ، بسام كريم . حسن ، مهدي (2012). دراسة بكتريولوجية لبكتريا المكورات المعوية المعزولة من حالات مرضية مختلفة . العراقية مجلات الاكاديمية العلمية. المجلة (4). العدد(1) : 123–164 .

[13] X .Liu, JC. Vederas, RM .Whittal, J. Zheng, ME. Stiles,and D .Carlson, Identification of an N-Terminal Formylated, Two-Peptide Bacteriocin from Enterococcus faecalis 710C). J Agric Food Chem. 59, (2011), 10, PP (5602–5608).

[14] M. Hussain , M.T Khan , A.Wajid ,and S.A.Rasool, Technology Characterization of indigenous Enterococcal Population for Probiotic Poteintial) . *Pak . J. Bot* .40,(2008). (2)PP(867-875).

[15] A.J. Hala, R.K. Shrooq,and M.K. Khalil, Study the Bacteriocin Production from Enterococcus faecium Isolated from Clinical Sources . Al-Mustansiriyah) .J.Sci. 23,(2012). 3,PP (1-9).

[16] S. Al-Barzangi, A genetic study on bacteriocin-producing *E.faecalis)*. M.Sc thesis , college of science, Univ. of Baghdad. 2001.

[17] السعدي ، فاطمة صبيح علي (2007) . دراسة مقاومة بكتريا *Enterococcus faecalis* المسببة لإلتهابات المجاري البولية لبعض المضادات الحيوية وإنتاجها لإنزيمات β – Lactamase . رسالة ماجستير ، كلية العلوم / الجامعة المستنصرية.

[18] KI. Al_Khafaji, S,F . Samaan ,and M.S. Al-saeed . Virulence factors of Enterococcus faecalis , medical journal of Babylon, 7, (2010). (43) PP(579-583).

[19] حسن ، عباس ياسين (2012) .عزل وتشخيص بكتريا *Enterococcus faecalis* من مصادر مرضية مختلفة ودراسة امراضيتها في الفئران التجريبية . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة تكريت .

[20] B., Jett. M., Huycke .and M. Gilmore , Virulence of enterococci. Clin. Microbiol. Rev. 7 ,(1994) .PP (462-478).