Extraction of Pyocyanin Pigment from *Pseudomonas aeruginosa* and its Effect on the Growth of some Human Pathogenic Bacteria.

Dr. Asmahan Zinab*
Maya Slami**

(Received 30 / 10 / 2019. Accepted 29 / 4 /2020)

□ ABSTRACT □

Antibiotic-resistant bacteria are a common widespread health problem. Chemical drugs used in the manufacture of commercial antibiotics have negative side effects on human health. This is the reason why we try to look for new, effective materials against various antibiotic-resistant bacteria.

Pyocyanin were extracted from liquid bacterial cultures of *Pseudomonas aeruginosa* using the organic solvent chloroform. *Pseudomonas aeruginosa* cultures were isolated from samples obtained from the laboratories of Tishreen University Hospital. Its effect on microbial growth was studied using disk diffusion test. the results showed that pyocyanin has an antibiotic effect on gram-positive bacteria (*Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus*) and gram-negative bacteria(*Escherichia coli*) with growth inhibition zones of (25 mm), (28 mm), (10 mm) respectively.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Pyocyanin, Chloroform extract, Human pathogenic bacteria.

***Professor, Department of Botany, Faculty of Science, Tishreen university, Syria.**
****Postgraduate Student – Faculty of Science – Tishreen university – Syria.**

استخلاص صباغ البيوسيانين من جراثيم عصيات القيح الأزرق وتأثيره في نمو بعض الجراثيم الممرضة البشرية.

د. أسمهان زينب*

مايا سلامي**

(تاريخ الإيداع 30 / 10 / 2019. قبل للنشر في 29 / 4 / 2020)

□ ملخّص □

تعد الجراثيم الممرضة المقاومة للصادات الحيوية مشكلة صحية عامة منتشرة حول العالم، كما أن الأدوية الكيميائية التي تستخدم في صناعة الصادات الحيوية التجارية لا تكاد تخلو من التأثيرات الجانبية السلبية في صحة الإنسان، وهذا يدفعنا للبحث عن مواد جديدة فعالة تجاه الجراثيم المتعددة المقاومة للصادات المعروفة.

تم استخلاص البيوسيانين من مزارع جرثومية سائلة لعصيات القيح الأزرق *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من عينات مرضية مأخوذة من مخابر مستشفى تشرين الجامعي، باستخدام المذيب العضوي (كلوروفورم). تمت دراسة تأثير البيوسيانين في نمو الجراثيم بطريقة الانتشار باستخدام الأقراص و أظهرت النتائج أن البيوسيانين يملك تأثيراً صاداً تجاه نمو الجراثيم الممرضة إيجابية صبغة غرام: المكورات العقدية الرئوية *Streptococcus pneumoniae* ، العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* والجراثيم سالبة صبغة غرام: الإيشرشيا المعوية *Escherichia coli* بأقطار تثبيط نمو (25 mm)، (28 mm)، (10 mm) على التوالي.

الكلمات المفتاحية: جراثيم عصيات القيح الأزرق، البيوسيانين، خلاصة الكلوروفورم، الجراثيم الممرضة البشرية.

* أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

** طالبة ماجستير في قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مقدمة:

تعد الجراثيم المقاومة للصادات الحيوية من أكثر الأخطار التي تهدد الصحة العامة، فرغم التطور في صناعة أدوية صادة للجراثيم إلا أن هذه الجراثيم طورت مقاومة حيوية تجاه هذه الأدوية وذلك بسبب سوء استخدامها، كما أن هذه الأدوية تملك الكثير من الآثار الجانبية التي تؤثر في صحة الانسان وبالنتيجة أصبحت الكثير من الإصابات الجرثومية غير قابلة للعلاج وحتى قاتلة (Lai *et al.*,2012).

هذا ما دفعنا للبحث عن مركبات جديدة فعالة تجاه الجراثيم المتعددة المقاومة للصادات التجارية المعروفة للحد من نموها وانتشارها.

تحظى الجراثيم اليوم باهتمام كبير بسبب الكم الهائل من المواد الفعالة التي تنتجها بعمليات الاستقلاب الغذائية الثانوية وخاصة الأنواع الجرثومية ذات المقاومة الشديدة للصادات الحيوية (Isnansetyo&Kamel,2009)، وأهمها عصيات القيح الأزرق *Pseudomonas aeruginosa* وهي إحدى الجراثيم الانتهازية، عصوية الشكل، سالبة صبغة غرام، متحركة، وحيدة السياط، عديمة الأبواغ، يتراوح عرضها بين(0.5–1) ميكرومتر، وطولها بين(1–5) ميكرومتر (Kumar *et al.*,2015).

تنمو هذه العصيات على الأوساط الصلبة والسائلة: الأغار المغذي Nutrient Agar بسهولة (تعطي مستعمرات كبيرة الحجم، لونها كريمي، ذات حواف غير منتظمة مخاطية و تلون الوسط باللون الأخضر المزرق)، وسط Mackoncy Agar (تعطي مستعمرات صغيرة الحجم، بيضاء اللون ومخاطية) ، وسط الآغار الدموي Blood Agar (تعطي مستعمرات متوسطة الحجم، رمادية اللون، مخاطية وبعض سلالاتها حالة للدم) و تنمو بشكل خيوط مخاطية بيضاء اللون على الأوساط السائلة، تعطي عكارة مع تشكل راسب، كما تلون الوسط باللون الأخضر المزرق (Ansaruzzaman *et al.*,2009).

تعد عصيات القيح الأزرق من مسببات الانتانات المكتسبة في المشافي من التهابات رئة، إصابات دم والعدوى بعد الجراحة فهي تمتلك عوامل فوعية كالذيفانات الخارجية ومواد سامة خلوية تلعب دوراً في الإمراضية وتشكيل الانتان (Nester&Anderson,2001)، وتعود فوعة إمراضيتها العالية لما تفرزه من مستقلبات ثانوية فعالة تبلغ 795 مركباً منها 610 مركبات لها خصائص صادة Antibiotics تجاه بعض الأحياء الدقيقة الأخرى ومن هذه المستقلبات البيوسيانين Pyocyanin (Saha *et al.*,2008).

البيوسيانين: هو مستقلب ثانوي من مجموعة Phenazine، ينتج بواسطة *Pseudomonas aeruginosa* خارج الخلايا بلون أخضر مزرق قابل للانحلال بالماء، ذو نشاط أكسدة إرجاع ويملك صفات صادة حيوية تجاه مختلف الأحياء الدقيقة (El–fouly *et al.*,2015)، وهو مركب حلقي يتركب كيميائياً من الكربون والهيدروجين والأوكسجين والآزوت (El–shouny *et al.*,2011).

علاوة على ذلك يعد البيوسيانين Pyocyanin المنتج من جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* هاماً في مجال التقانة الحيوية ويستخدم بشكل واسع في التطبيقات الصناعية، مثل الدوائية والغذائية والجلدية والمطاطية Saha (*et al.*,2008).

لقد أظهرت بعض الدراسات التأثيرات التي تقوم بها صبغة البيوسيانين، إذ أنها تثبط نمو الأحياء الدقيقة الحساسة لها، حيث أنها تثبط عمليات الأكسدة والإرجاع تحت ظروف التنفس الهوائي وبالتالي تثبيط النمو الجرثومي (Das&,Manefied,2012).

أهمية البحث وأهدافه:

- عزل جراثيم عصيات القيح الأزرق *Pseudomonas aeruginosa* من عينات مرضية مأخوذة من مخابر مستشفى تشرين الجامعي.
- استخلاص البيوسيانين من جراثيم عصيات القيح الأزرق بالمذيب العضوي (كلوروفورم).
- دراسة تأثير البيوسيانين تجاه بعض الجراثيم الممرضة إيجابية وسالبة صبغة غرام.

طرائق البحث ومواده:

عزل جراثيم *Pseudomonas aeruginosa*:

تمّ عزل جراثيم عصيات القيح الأزرق من العينات المرضية وذلك بواسطة ماسحة جرثومية على وسط آغاري صلب ثم تم حضنها في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 3 أيام للحصول على مستعمرات نقية والتأكد من انتاجها للصبغة، وإجراء دراسة كيميائية حيوية بالاختبارات المناسبة ومقارنتها مع دليل Bergey، وحفظت المزرعة النقية ضمن أنابيب مائلة على وسط Nutrient agar في البراد بدرجة+4 ْم (Garrity *et al.*,2004)

أنجز البحث في مخبر الجراثيم التابع لقسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم خلال عام 2019 م.

استخلاص البيوسيانين بالمذيب العضوي الكلوروفورم:

تم نقل مستعمرة من المزرعة النقية لجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* المزروعة على وسط الآغار المغذي إلى وسط Pepton water (ببتون 10غرام، Nacl 5 غرام، أضيف إلى ليتر ماء مقطر، وزع في أيرلنمايرات وعقم بالأوتوغلاف بدرجة حرارة 121 ْم وضغط جوي 1.5 كغ/سم^2 لمدة 15 دقيقة)، ثم وضع في حاضنة هزازة بدرجة 37 ْم مدة 24 ساعة وبمعدل 150 هزة /د (Saha *et al.*,2008).

وبعد انتهاء فترة الحضن، تم تثفيل المعلق الجرثومي لمدة 10 دقائق، ثم نقل السائل الطافي إلى زجاجة أيرلنماير جديدة، وتم التخلص من الراسب، تم بعدها إضافة المذيب العضوي (كلوروفورم) بنسبة 1/2 وذلك لاستخلاص البيوسيانين من السائل الطافي، وتم فصل الجزء المائي (الطبقة العليا) عن جزء الكلوروفورم (الطبقة السفلى) باستخدام قمع الفصل، وأعيد استخلاص الطبقة السفلى بإضافة 1 مل من حمض كلور الماء 0.2 N، وتم تكرار الاستخلاص بالكلوروفورم مرتين حتى الحصول على محلول بلون أزرق واضح للبيوسيانين، ثم حفظ في البراد لحين الاستخدام واختبار فعاليته الصادة تجاه الجراثيم الممرضة (Saosoong *et al.*,2009,Ozyorek *et al.*,2016).

الجراثيم الممرضة البشرية:

تم عزل الجراثيم الممرضة البشرية من عينات مأخوذة من مخابر مستشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، وذلك بعد زراعتها على أوساط خاصة (تفريقية وانتقائية) وتحديد خصائصها الكيميائية الحيوية (اختبارات الأوكسيداز، الكاتلاز والقدرة على تفكيك الكريات الحمر في الدم)، تم توضيحها في الجدول (1) ونوع العينة المرضية المعزول منها.

جدول (1) الجراثيم الممرضة البشرية ونوع العينة.

الجراثيم الممرضة	نوع العينة المعزول منها
Streptococcus pneumonia	مفرزات بلعوم
Staphylococcus aureus	دم
Escherichia coli	بول
Pseudomonas aeruginosa	بول

اختبار الفعالية الصادة لمستخلص البيوسيانين:

اختبرت الفعالية الصادة لمستخلص البيوسيانين تجاه الجراثيم الممرضة بطريقة الانتشار بواسطة الأقراص (Barker *et al.*,1995)، حيث شربت أقراص ترشيح قطر 6 ملم(Whatman, No.1, 6 mm) بمستخلص البيوسيانين بمقدار 10 ميكروليتر لكل قرص وتركت لتجف في درجة حرارة المختبر، واستخدمت أقراص ترشيح مشربة بالمذيب العضوي الكلوروفورم كشاهد سلبي للاختبار.

بعدها أخذت عدة مستعمرات من المزارع الجرثومية الممرضة النامية في وسط Nutrient Agar عمرها 24 ساعة. ووضعت في محلول فيزيولوجي بحيث تعطي عكارة 0.5 ماكفرلاند McFarland Standard مايعادل 1.5 10^5xخلية /مل، أخذت 100 ميكروليتر من المعلق الجرثومي ووضعت فوق وسط Mueller Hinton Agar وفرشت على السطح، تركت الأطباق 15 دقيقة في درجة حرارة المختبر ثم وزعت أقراص الترشيح المشربة بمستخلص البيوسيانين وأقراص الشاهد المشربة بالمذيب العضوي الكلوروفورم فوق سطح الوسط بملقط معقم وحضنت في الدرجة 37°م لمدة 24 ساعة، ويعد ظهور مناطق التثبيط Inhibition zones في الآغار حول الأقراص دليل واضح على تثبيط النمو الجرثومي، سجلت أقطار التثبيط بعد انتهاء الحضن بالمليمتر بواسطة مسطرة مدرجة. أعيدت التجربة ثلاثة مكررات، وتم حساب المتوسط (Saosoong *et al.*,2009).

النتائج والمناقشة :

نتائج استخلاص البيوسيانين:

تم استخلاص المستقلب الثانوي من المزرعة السائلة لجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* بالمذيب العضوي (الكلوروفورم)، والذي يأخذ لوناً أخضر مزرق.

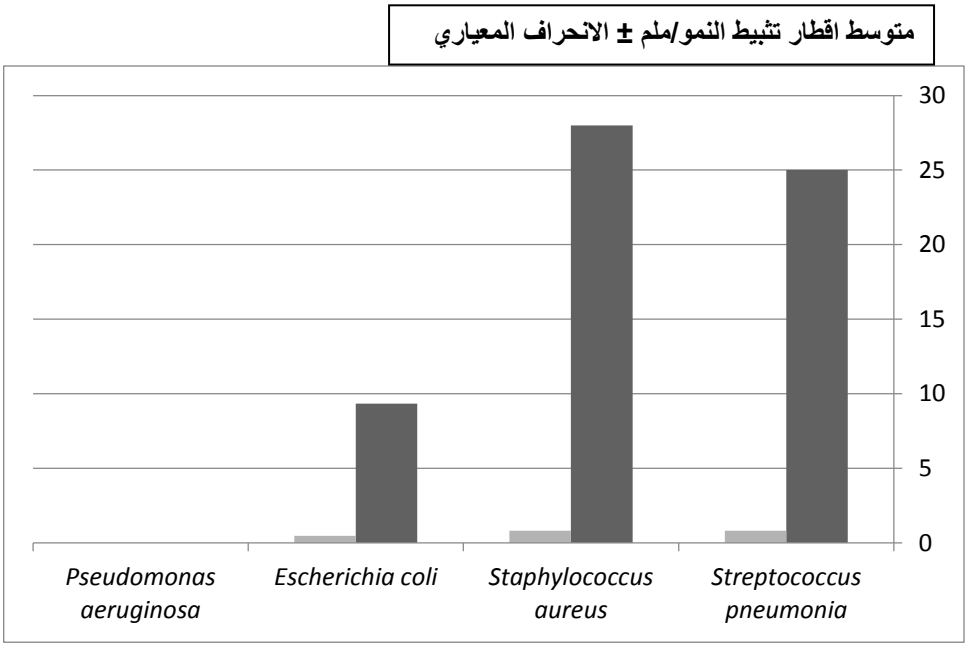
نتائج اختبار الفعالية الصادة للبيوسيانين تجاه الجراثيم الممرضة البشرية:

يبين الجدول (2) والشكل (1) نتائج الفعالية الصادة للمستقلب الثانوي البيوسيانين المستخلص من جراثيم عصيات القيح الأزرق تجاه بعض الأنواع الجرثومية الممرضة موضحة بمتوسط أقطار حلقات التثبيط حول الأقراص المشربة بالبيوسيانين مقاسة بالمليمتر ومقارنة مع الشاهد السلبي.

جدول (2) متوسط أقطار حلقات تثبيط البيوسيانين تجاه الجراثيم الممرضة البشرية.

الجراثيم الممرضة	*المتوسط mean ± الانحراف المعياري SD
Streptococcus pneumonia	0.816 ±25
Staphylococcus aureus	0.816 ± 28
Escherichia coli	0.471 ± 9.33
Pseudomonas aeruginosa	0
الشاهد السلبي (المذيب العضوي)	0

*= mean ± SD Standard deviation (المتوسط ± الانحراف المعياري)



الشكل (1) أقطار حلقات التثبيط لمستخلص البيوسيانين تجاه الجراثيم الممرضة البشرية بطريقة الانتشار بالقرص.

يلاحظ من الشكل(1) أن البيوسيانين يمتلك فعالية تثبيطية تجاه الجراثيم إيجابية صبغة غرام المدروسة: العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* والعقديات الرئوية *Streptococcus pneumoniae* بمتوسط أقطار تثبيط 28 ملم و25 ملم على التوالي أكثر من الجراثيم سالبة صبغة غرام المدروسة: الإيشرشيا المعوية *E.coli* التي تحسست بشكل أضعف للبيوسيانين بمتوسط أقطار تثبيط لا يتجاوز 9.67 ملم، بينما لم يظهر أي تأثير للبيوسيانين في عصيات القيح الازرق *Pseudomonas aeuginosa*.

إن تأثير البيوسيانين في الجراثيم إيجابية غرام أكثر وضوحاً من تأثيره في الجراثيم سالبة الغرام المدروسة (*E.coli*) التي تحسست بشكل ضعيف للبيوسيانين، اتفقت هذه النتائج مع عدة دراسات (Sweedan,2010،Agrawal&Chauhan,2016).

بينما أشارت دراسات أخرى إلى أن البيوسيانين يمتلك فعالية صادة عالية تجاه الجراثيم إيجابية الغرام كالعنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* والجراثيم سالبة الغرام مثل الايشرشيا المعوية *E.coli* (Ozyorek *et al*.,2016).

يعود السبب وراء الاختلاف في الحساسية تجاه البيوسيانين بين الجراثيم إيجابية الغرام والجراثيم سالبة الغرام إلى الاختلاف في محتوى اللبيدات في الجدار الخلوي بين الجراثيم إيجابية وسالبة الغرام (Norman *et al*.,2004).

تمتلك المركبات الفعالة الصادة المنتجة في مزارع جراثيم عصيات القيح الأزرق آليات متعددة في التأثير في الجراثيم: إذ يؤثر بعضها في الغشاء الخلوي الجرثومي، ويسبب بعضها تحلل الخلية الجرثومية، ويعمل بعضها كمثبط لأنزيمات التنفس الجرثومية (Das&Manefied,2012).

كانت الخلايا الجرثومية المنتجة للبيوسيانين مقاومة للصبغة، وتعزى هذه المقاومة ربما إلى الخصائص الجزيئية للجرثومة المنتجة *Pseudomonas aeruginosa* حيث تنتج معدلات عالية من أنزيمات الأكسدة أكثر من الجراثيم الهوائية الأخرى (Norman *et al*.,2004).

تتأثر كمية البيوسيانين المتشكلة ضمن الخلية الجرثومية بالمصدر الغذائي الكربوني في الوسط المستخدم لزراعة جراثيم عصيات القيح الأزرق، ودرجة pH، ومدة الحضن، ومصدر العينة المعزول منها الجراثيم (Agrawal&Chauhan,2016).

كما يعتمد تأثير البيوسيانين في الجراثيم على الفرق الكموني في الأغار(Giweli *et al*.,2013)، كما تتعلق حساسية الجراثيم لهذه الصبغة ومقاومتها لها بمعدلات أنزيم الكاتالاز الموجودة في الوسط (Norman *et al*.,2004).

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن البيوسيانين المستخلص من عصيات القيح الأزرق *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من عينات مرضية بالمذيب العضوي (الكلوروفورم) يمتلك فعالية صادة تجاه الجراثيم إيجابية الغرام أكثر من الجراثيم سالبة الغرام المدروسة، لذا يمكن أن يكون لهذا المستقلب الثانوي دوراً فعالاً تجاه أنواع العقديات والعنقوديات الممرضة إيجابية الغرام .

التوصيات:

- تطبيق البيوسيانين تجاه جراثيم أخرى إيجابية وسالبة الغرام.
- تحديد مردود البيوسيانين المنتج من مزرعة جراثيم العصيات الزرق وعلاقته بمصدر العينة.
- عزل مركبات أخرى من عصيات القيح الأزرق غير البيوسيانين ودراسة تأثيرها في نمو الجراثيم الممرضة البشرية.

Reference:

1- AGRAWAL, A. A. and CHAUHAN, B. P. *Effect of Cultivation Media Component in Antimicrobial Property*. International Journal of Current Advanced Research,vol.5,2016,829-833.

2- ANSARUZZAMAN, N.; NAIR, G. B.; ENDRZ, H. P. *Antibacterial Substance Produced Pseudomonas aeruginosa With High In-vitro Antimicrobial Activity against Vibrio Cholera O1 and O139*. Scientific Session,2009.1 February. www.sciencedirect.com

3- BARKER, G. A.; KEHOE, E. *Assessment of disk diffusion method for susceptibility testing of Aeromonas salmonicida*. Aquaculture,Vol.134,1995,1-8.

4- DAS, T. and MANEFIELD, M. *Pyocyanin promotes extracellular, DNA release in Pseudomonas aeruginosa*. POLOS ONE, Vol.7,2012,646-718.

5- EL-FOULY, M.,Z.; SHARAF, A. M.; *SHAHIN, AA. M.;EL-BIALY, H. A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by Pseudomonas aeruginosa*. J. Radiat. Res. Appl. Sci, vol.3,2015,36-48.

6- EL-SHOUNY, A. W.; AL-BAIDANI, H. R.; HAMZA, W. T. *Antimicrobial Activity of pyocyanin produced by Pseudomonas aeruginosa Isolated from surgical wound-Infection*. International Journal of Pharmacy and Medical Science, vol.1,2011,1

7- GARRITY, G. M.; BELL, J. A. and LILBURN, T. G. *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey Manual of Systemic Bacteriology*. 2nd Edition, Springer, New York Berlin-Heidelberg,2004,401.

8- GIWELI, A.; DZAMIC, M.; SOKOVIC, M,; RISTIC, S.; JJANACKOVIC, P.; MARIN, D. *The chemical composition, Antimicrobial and Antioxidant Activist of the Essential oil of Salvia fruticosa Growing wild in Libya*. Arch. Biol. Sci. Belgrade, vol.65(1),2013,321-329.

9- ISNANSETYO, A. and KAMEL, Y. *Bioactive Substances produced by marine isolated of Pseudomonas aeruginosa*. J. Industrial Microbiology & Biotechnology. Vol.36(10),2009,1239-1248.

10- KUMAR, T. S.; KUMAR, S. S.; PREETHA, D. *Screening of Pathogenic strains of Pseudomonas aeruginosa from clinical sample using lactuca sativa as aplant model.* International Journal of current Microbiology and Applied Sciences, vol.4(12),2015,566-577.

11- LAI, B.; TEIXEIRA, G.; MOREIRA, I.;ORREIA, I. A.; DUARTE, A.; MADUREIRA, M. A. *Evaluation of the antimicrobial activity in species of aprotnguese ecosystem against multigrug resistant pathogens*. Journal of Medicinal plants Research. Vol.6(12),2012,2381-2387.

12- NESTER, E. W. and ANDERSON, D. G. *A human perspective in microbiology, MCGRAE-Hil companies*. Harper&Row, New Jersey, USA,2001.

13- Norman, R. S.; Moeller, D.; Mcdonald, T. and Morris , P. J. *Effect of pyocyanine on a crude-oil-degrading microbial community* . Applied andEnvironmental microbiology, VOL.20,2004,4004-4011.

14- OZYOREK, B. S.; GUR, D. S.; BILKAY, S. L. *Investigation of Antimicrobial Activity of pyocyanin produced by Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Different clinical Specimens*. J. Biol&Chen, vol.44,2016,1-6.

15- SAHA, S.; THAVAS, R. and JAYALAKSHIMI, S. *Phenazine pigments from Pseudomonas aeruginosa and their application as antibiotic agent and food colourants*. Res.J.Microbial. vol.3,2008,122-128.

16- SAOSOONG, K.; WONGPHATHANKUL, W.; POASIRI, C. and RUANGVIRIYACHAL, C. *Isolation and analysis of antibacterial substance produced from Pseudomonas aeruginosa*. TISTR781. Sci.J. VOL.37,2009,163-172.
17- SWEEDAN, E. G.; *Study the effect of antibiotics on pyocyanin production from Pseudomonas aeruginosa and pyocyanin as antibiotic against different pathogenic bacteria*. University of Anbar for pure scince, Vol.4,2010.