Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Diyala

College of science

Molecular Study of Antimicrobial Effect of Bacteriocin Isolated from *Lactobacillus plantarum* on Some Urinary Tract Pathogens

A Thesis

Submitted to council of College of Science/ University of Diyala as a Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree of Science in Biology

Presented By

Noor Ali Faleh Abed
(B. Sc. in Biology, 2019)
College of Science/ Diyala University

Supervised By

Assist. Prof. Dr. Abbas Mohei Mozher

2023 A.D. *1444 A.H.*

1.Introduction

Bacteriocins, defined as biologically active proteins or peptides, are found in almost every bacterial species. Bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB), especially, have drawn special attention due to their potential application as natural food preservatives in the food industry (Ramu *et al.*, 2015). At present, a wide attention on LAB as an antimicrobial with a broad spectrum has been constantly highlighted. (Aureli *et al.*, 2011).

Most of urinary tract infections (UTI) caused by bacteria, fungal and viral infections (Amdekar *et al*., 2011), in which 90% of UTI caused by gram-negative bacteria while gram-positive bacteria only cause 10% (Weekes, 2015). *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen. It has a limited nutritional requirements and it can adapt to a wide range of environmental conditions. Because of the high propensity of this pathogen to establish resistance, treatment of *P. aeruginosa* infections with antibiotics is difficult (Tacconelli *et al*., 2017).

Yeast of the genus *Candida* is frequent colonizers of the skin and mucous membranes of animals and are widespread in nature and normally found in the mouth, gastrointestinal tract and vagina, as well as on the skin. *Candida* is part of the normal flora of bacteria and fungi that live in or on the human body and causes health problems only when there is an overgrowth (CATIE, 2001). *C. albicans* has a specialized set of proteins (adhesins) which mediate adherence to other *C. albicans* cells to other microorganisms, to abiotic surfaces and to host cells. (Garcia *et al*., 2011). Arguably the best studied *Candida albicans* adhesions are the agglutinin-like sequence (ALS) proteins which form a family consisting of eight members (Als1–7 and Als9). Because interaction of *C. albicans* with different host sites might result in differential expression of the various ALS genes, studying gene expression would be useful in grouping the various Als proteins into

potentially different functions or establishing a hierarchy of importance for Als proteins at different host sites or across different disease states (Aysha Ali *et al.*, 2015).

Pseudomonas aeruginosa secrete exopolysaccharides (EPS) with 3 molecular components, including *Pel* (pellicle), alginate, and *Psl* (polysaccharide synthesis locus) (Mann and Wozniak , 2012). Both *Psl* and *Pel* are important for the EPS initiation process follows by the production of alginate-rich polymer to develop the biofilm maturation. Accordingly, *Psl* not only increases biofilm rigidity but also induces bacterial cell aggregation and promotes the chronic stage of infection, while alginate-dominant biofilms might be formed in the earlier phase of infection (Jones, and Wozniak., 2017).

Aim of study:

This study aims to detect the molecular effect of lactic bacteriocin on some microbial uropathogenic causes (*Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*). by following the next steps:

1. Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum*,*Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* using differential culture media and different biochemical tests.
2. Extraction and purification of the bacteriocin compound in *Lactobacillus* using ion exchange and gel filtration.
3. Investigating the sensitivity of microbial isolates (*Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*) towards some antibiotics
4. Investigation of the minimum inhibitory concentration of bacteriocin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albican.*
5. Molecular investigation of the effect of bacteriocins on biofilm formation of isolates (*Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*) by gene expression (RT-qPCR).

الخلاصة

جمعت خمسين عينة من الزبادي ومسحات مهبلية لفحص النشاط الضد ميكروبي للعصيات اللبنية التي تنتج بكتريوسين ضد خميرة المبيضات البيضاء *Candida albicans* وبكتيريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* جمعت من ١٠٠ عينة بول من إناث يترددن على مستشفى البتول التعليمي بأعمار مختلفة تتراوح بين ١٩-٤٠ سنة. تم جمع العينات تحت إشراف استشاري أمراض النساء وبمدة من تشرين الثاني ٢٠٢١ الى شباط ٢٠٢٢. تم إخضاع العزلات المعزولة من العصيات اللبنية و المبيضات و الزوائف الزنجارية للاختبارات الميكروسكوبية والعيانية واختبارات الكيميائية الحيوية. علاوة على ذلك، تم إجراء فحص لأفضل عزلة منتجة للبكتريوسين. تم التحقيق في الكشف عن إنتاج البكتريوسين من *Lactobacillus* بواسطة تقنيات الفرز الأولية والثانوية وتنقيته بثلاث خطوات باستخدام ترسيب كبريتات الأمونيوم ٨٠٪، والتبادل الأيوني و Sephadex-s-1000 للترشيح الهلامي.

اظهرت النتائج أن الزبادي كان أفضل مصدر لنشاط البكتريوسين مع قدرة عالية على التثبيط ضد الميكروبات المختبرة. تم اختبار العزلات الميكروبية لاختبار الحساسية للمضادات الحيوية ومضادات الفطريات وقدرتها على تكوين غشاء حيوي باستخدام طريقة لوحة .Microtiter Plate. تم التقاط العزلات المقاومة والعزلات المكونة للغشاء الحيوي والأعلى لاختبار التركيز المثبط الأدنى للبكتريوسين. عند تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط للبكتريوسين ضد المبيضات والزائفة الزنجارية، وجد أن تركيز البكتريوسين ٥,١٢ مجم / مل و٦.٢٥ مجم / مل على التوالي هو أقل تركيز يثبط نمو البكتيريا والفطريات.

أدت معاملة الأغشية الحيوية التي كونتها الزوائف والمبيضات بالبكتريوسين الخام والمنقى إلى انخفاض الامتصاص (أي سماكة الأغشية الحيوية) وصل إلى ٢٥٩.٠ ± ١٤٢.٠نانومتر بالنسبة إلى الزوائف و١٣١,٠ ± ١٣٢,٠ نانومتر للمبيضات، مقارنة بمتوسط التحكم (١١٧,٠) نانومتر. استخدمت تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي للنسخ العكسي (RT-qPCR) لمقارنة التعبير الجيني (الطي) لجينات *ALS1* و*PS1A* و*PA-ss* والغرض من هذه الخطوة هو قياس التعبير عن جينات الضراوة (*PA-ss* و*PS1A*) بالنسبة للجينات الزائفة الزنجارية و (*ALS1*) لجينات المبيضات البيضاء (تعبير الغشاء الحيوي) ومقارنة التعبير الجيني قبل وبعد المعاملة بالبكتريوسين. أظهرت النتائج أن تعبير هذه الجينات قد انخفض بعد المعاملة بالبكتريوسين مما يعني أن البكتريوسين يثبط التعبير الجيني لتكوين الأغشية الحيوية للفطريات البيضاء والزائفة الزنجارية. في الختام، البكتريوسين من بكتيريا العصيات اللبنية له