ISSN: 1991-8941

التحري عن قابلية بكتيريا *Proteus mirabilis* المعزولة من اخماج الجروح والحروق على تكوين الانثيال ودراسة عامل الضراوة وراثيا.

عمر نعمه فليح ليث مصلح نجيب رنا كاظم محمد
جامعة الانبار - كلية العلوم
جامعة بغداد - كلية العلوم

الخلاصة

صممت هذه الدراسة للتحري عن قدرة بكتيريا *Proteus mirabilis* والمعزولة من اخماج الجروح والحروق على إنتاجها لعامل الضراوة الانثيال و تضمنت العينات المنتخبة العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية وبواقع (4) عزلات من بكتيريا *Proteus mirabilis* والتي شخصت اعتمادا على الصفات الكيموحيوية فضلا عن إنتاجها لظاهرة الانثيال. تم استخدام الحرارة كعامل محييد للبلازميدات أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي فقدان صفة بلازميدات في العزلات المنتخبة فضلا عن فقدان في تكوين العزلات لظاهرة الانثيال إشارة إلى دور بلازميدي في تكوين تلك الصفة.

الكلمات المفتاحية: *Proteus mirabilis* ، الانثيال، البلازميدات

المقدمة

الانثيال وهي حركة البكتيريا بشكل أمواج والتي تبدأ من حافة المستعمرة الأصلية بواسطة الاسواط Flagella، ويمتاز جنس المتقلبات Proteus بهذه الظاهرة عن بقية أجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae ويمكن ملاحظة هذه الظاهرة على الأسطح الصلبة الاعتيادية[1]وهي ناتجة عن هجرة الخلايا البكتيرية بعد تمايزها في الوسط مكونة طبقة رقيقة لحلقات ممتدة المركز[2]، ويمكن أن توفر هذه الحركة الاستمرارية للجراثيم في الظروف البيئية المختلفة ويمكن أن تنافس وبنجاح مع غيرها من الجراثيم في البيئات المختلفة سواء كانت مناسبة أو غير مناسبة لنموها[3]، إن امتلاك الجراثيم المسوطة نظام متطور ومتميز للحركة في السائل أو على السطوح وهذا التميز له دور مهم في الاستجابة للنمو على مختلف الأسطح أو السوائل اللزجة و إن لظاهرة الانثيال دور أساسي في توسيع مساحة الانتشار أو الاستعمار البكتيري إذ يسهم في تكوين الغشاء الحيوي على السطوح المختلفة[4]،[5]، إن الجراثيم غير المسوطة تكون غير قادرة على تكوين ظاهرة الانثيال والتي تدعى أيضا بظاهرة دينس (Dienes phenomenon) والتي استخدمت في تصنيف أنواع جراثيم المتقلبات Proteus [6]. إن معرفة التركيب الوراثي والأساس الجزيئي للبكتيريا الممرضة والمكونة للانثيال يساعد في تشخيص الجينات و الطفرات والمركبات المضادة لفعالية تلك الظاهرة[7]، تحتوي البكتيريا على عناصر وراثية تسمى البلازميدات Plasmidsوالتي تكون بشكل تراكيب حلقية دائرية من شريط مزدوج من الDNA وتستطيع هذه العناصر أن تتضاعف وبصورة مستقلة عن الكرموسوم البكتيري تستطيع أن تتوارث بثبات وتنتشر في الخلايا البكتيرية بين النوع الواحد والأنواع البكتيرية[8]. تستطيع هذه البلازميدات أن تشفر لعدد كبير من عوامل الضراوة منها مقاومة المضادات الحيوية وإنتاج السايدفورات والهيمولايسين وهي مختلفة في الحجم فمنها ما يكون ذو وزن جزيئي كبير وأخرى أوزانها الجزيئية صغيرة ويكون وجودها غير ضروري للمضيف إلا أن وجود هذه البلازميدات يعطيها صفات تمكنها من العيش في ظروف قاسية أو استثنائية إلا أن هناك بلازميدات قد لا يكون لها أي اثر على الصفات في البكتيريا لذلك تدعى بالبلازميدات الخفية[9].تهدف الدراسة إلى التحري عن قابلية بكتيريا *Proteus mirabilis* المعزولة من اخماج الجروح والحروق على تكوين الانثيال ومعرفة دور البلازميدات في إنتاج تلك ألظاهرة.

المواد وطرائق العمل

1-عزل البكتيريا والتشخيص. استخدمت في هذه الدراسة (4) عزلات من بكتيريا *P. mirabilis* و المعزولة من اخماج الجروح والحروق من مستشفى الرمادي التعليمي وقد شخصت العزلات اعتمادا على ما ورد في [10] إذ شخصت المستعمرات مبدئيا اعتمادا على الصفات المظهرية وتضمنت إنتاجها للانثيال وشكل المستعمرات ولونها وقوامها ورائحتها وحجمها على وسط أكار الماكونكي واكار الدم وأخضعت العزلات إلى الفحص ألمجهري باستخدام صبغة كرام للتعرف

على شكل البكتيريا وترتيبها وتفاعلها مع صبغة كرام واستخدمت الفحوصات الكيموحيوية المختلفة مثل فحص الاوكسديز ،الكاتليز ،الاندول ،احمر المثيل ،الفوكس بروسكار ،استهلاك السترات ،الحركة واليوريا وتم تأكيد التشخيص باستخدام عدة التشخيص Api 20E Kit وبجهاز الفايتك 2.

2-استخلاص المحتوى الوراثي . DNA Extraction

تم استخلاص المحتوى البلازميدي للعزلات حسب ما جاء في **[11]** حيث تم الاستخلاص بالغليان والتبريد للعزلات الخمسة.

3-تحييد البلازميدات باستخدام الحرارة. Plasmid Curing Experiment

تم أتباع طريقة [12]في تحييد المحتوى البلازميدي باستخدام الحرارة كعامل محييد وكالاتي حيث تم تلقيح 5 مل من المرق المغذي بمستعمرة مفردة من أنواع البكتيريا المعزولة والمستخدمة في الدراسة الحالية ، حضنت المزرعة الجرثومية لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 مْ. بعد انتهاء فترة التحضين اخذ 0.1 مل من المزرعة أضيف إليها 10 مل من المرق المغذي وحضن الوسط الغذائي الملقح عند درجة حرارة 37 مم ولمدة (2-1) ساعة ولكل عزلة على حدا، فضلا عن ذلك فقد اخذ 0.1 مل من المزرعة وأضيف لها 10 مل من المرق المغذي وبواقع نموذجين لكل عزلة وحضنت المزرعة عند درجة حرارة 37 مْ للنموذج الأول لاستخدامه كنموذج سيطرة لملاحظة التحييد التلقائي مع النموذج الثاني والذي تم حضنه عند درجة حرارة 44 مْ ولمدة 24 ساعة للحصول على التحييد التلقائي. تم تنمية العزلات التي تم حضنها لمدة (2-1) ساعة وبدرجة 37مْ إلى درجات حرارية عالية ومختلفة (54-66) مْ ولمدة زمنية 10 دقائق لكل درجتان حرارية مختلفة أعلى للوصول إلى نسبة قتل 93%.

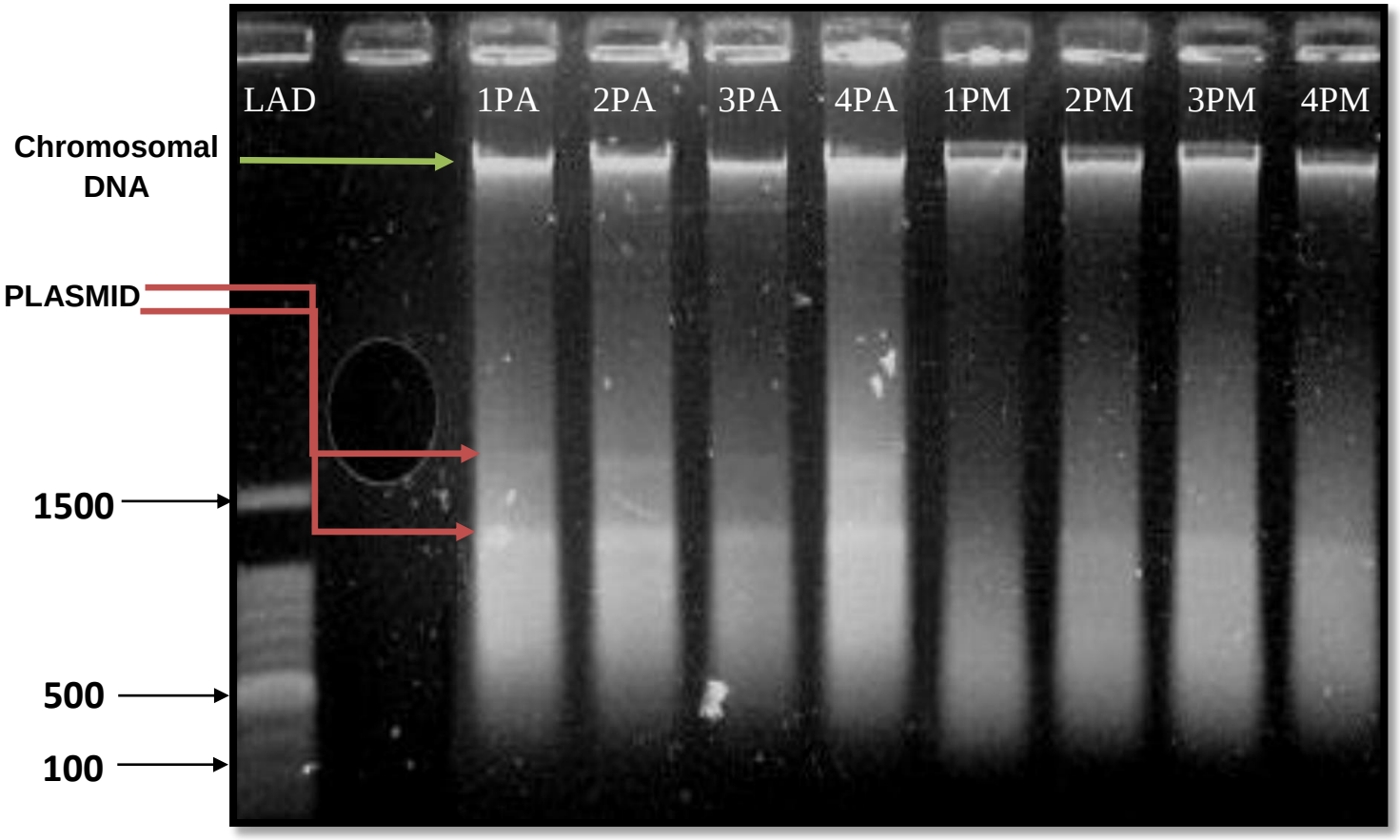
4- الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز Agarose Gel Electrophoresis.

تم الترحيل الكهربائي حسب ما جاء في [13] وبتركيز 0.8 للعزلات التي تم أجراء التحييد لها و للعزلات الأصلية .

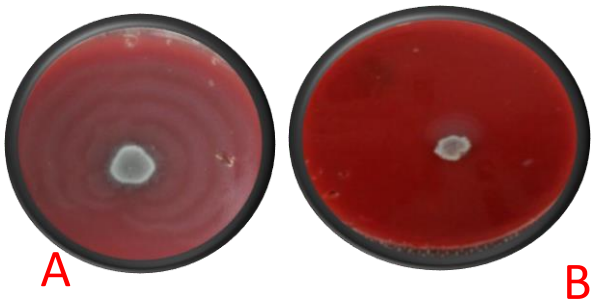
النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة نمو عزلات الـ *Proteus mirabilis* على وسطي أكار الدم ووسط Nutrient agarعلى تكوين حلقات متحدة المركز ومتجه نحو حافة الطبق نتيجة لظاهرة الانثيال وغير محلله للدم ولجميع العزلات وبنسبة (100%) وتطابقت النتيجة مع توصل إليه[14] عندما قام بتنمية بكتيريا *Proteus mirabilis* على وسط زرعي حاو على (1.5) أكار لاحظ ظاهرة الانثيال لجميع العزلات من قبل البكتيريا، كما واتفقت مع نتائج [15] الذي وجد إن 17 عزلة وبنسبة (100%) قادرة على إحداث الحركة التموجية. أظهرت نتائج استعمال الحرارة كعامل محييد للبلازميدات فروقا في مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية لبعض المضادات كما وأظهرت نتائج الكشف حزم الـ DNA البلازميدي على هلام الأكاروز للعينات المدروسة اختفاء قسم من الحزم البلازميدية في العزلات المحيدة ، وجد[16]إن الدرجة الحرارية المترفعة واستخدامها كعامل محييد للمحتوى البلازميدي تؤدي إلى تحييد البلازميدات وجاءت الدراسة متفقة مع نتائج الدراسة الحالية حيث أعطى التحييد باستخدام الحرارة المرتفعة نسب تحييد للبلازميدات عالية من عزلات بكتيريا *Proteus mirabilis*حيث بينت نتائج الترحيل الكهربائي في الصورة رقم (1) للعزلات المنتخبة من *P. mirabilis* قبل وبعد التحييد إذ تميزت هذه العزلات بظاهرة الانثيال قبل استخدام الحرارة وفقدانها لهذه الظاهرة بعد معاملتها بالحرارة كعامل محييد للبلازميدات فضلا عن امتلاكها صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ، احتوت العزلات الأصلية قبل التحييد على بلازميدين صغيرة الحجم إما بعد التحييد فقد أظهرت العزلات اختفاء لأحد البلازميدات مع اختفاء لظاهرة الانثيال للعزلات قيد الدراسة وكما موضح بالصورة (2) إي إن الصفة قد تكون محمولة بلازميديا وهذا ما أشار إلية باحتواء بكتيريا *P. mirabilis* على بلازميدات صغيرة ذات وزن يحمل الجينات المشفرة لأغلب عوامل الضراوة ومقاومة المضادات الحيوية ، كما وأشار [17] و[18] إلى احتواء النوع البكتيري من *P. mirabilis* إلى بلازميد واحد يحمل الجينات المسئولة عن عوامل الضراوة ومنها عامل الانثيال وهذا ما اتفق مع الدراسة الحالية حيث يلاحظ من الصورة (1) فقدان احد البلازميدات من جميع العزلات فضلا عن فقدان كلا البلازميدين في العزلة رقم (1)(2) بعد التحييد.

تتفق الدراسة أيضا مع ما جاء في [19]حيث أشار إلى فقدان صفة ظاهرة الانثيال في العزلات المجيدة وأشار إلى الدور البلازميدي في تلك الصفة وفقدان بلازميد صغير الحجم.إن فقدان الحزم البلازميدية المتوافق مع فقدان عامل الضراوة المتمثل بظاهرة الانثيال يعطي دليلا واضحا على إن جينات عامل الضراوة قد يكون محمول على تلك البلازميدات.ومما تجدر الإشارة إلية إلى إمكانية تعبير بلازميدات المتقلبات في بكتيريا الـ *E.coli* فقد أشار[20] إلى إن جينات المقاومة المتعددة ومعظم عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتيريا المتقلبات محمولة على بلازميدات صغيرة الحجم وان هذه البلازميدات ذات كفاءة عالية في الانتقال وتحويل الأنواع الأخرى من البكتيريا منها*E.coli* و *S.typhi*ويعد ذلك من الأسباب الرئيسية لانتشار المقاومة المكتسبة للمضادات الحيوية وضراوة البكتيريا.



صورة (1): الترحيل الكهربائي للـ DNA البلازميدي على هلام الاكاروز بتركيز 0.8 % وفولتية 5 فولت / سم لمدة ثلاث ساعات لبكتيريا الـ *Proteus mirabili* حيث يمثل المسار 1PA,2PA,3PA,4PA العزلة الأولى والثانية والثالثة والرابعة قبل التحييد وتمثل 1PM,2PM,3PM,4PM العزلة الأولى والثانية والثالثة والرابعة بعد التحييد .



صورة (2) توضح ظاهرة الانثيال

بعد التحييد B قبل التحييد ، A

المصادر

1- Gue, M., Dupont, V., Dufour, A., & Sire, O. (2001). Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of. Proteus mirabilis, 11938-11945.

2- Al- Mansouri, S. ; Amari, A. and Asad, A. G. (2005). Inhibition effect of some assay specific for Staphylococcus and application to direct detection from

Benjamin Cummings publishing Company. PP. 91-92.

3- Almarjani, M.F.(2000). Multiple antimicrobial resistance and some virulence factors of *Proteus* SPP.

4- Gavín, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J. G., & Tomás, J. M. (2003). Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by Aeromonas spp. FEMS

13- Dillon JA, Nasim A & Nestmann E (1985) Recombinant DNA Methodology. John Wiley & Sons Inc., Mississauga, Ontario, Canada.
14- Ali, Omar Abd Ulkareem. "Prevention of *Proteus mirabilis* biofilm by surfactant solution." Egypt Acad J of Biol Sci 4 (2012): 1-8.
15- Al-Dulaimi .Abbas A."Inhibition of swarming and some virulence factors expression i n *Proteus mirabilis* by amikacin in vitro".Diala , Jour , Volume , 32 , 2009.
16- Raja, C.E. and Selvam, G. S.(2009). Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* asmetal resistant, Int. J. Environ. Sci. Tech., 6 (2), 259-266.
17-Girlich , D.;Naas,T.;Beuars,S.; Poirel , L.; Karrim, A.and Nord mann ,P.(2000). Biochemical Gentic of expression of Acc-1- like . chromosomeborne cephalosporine from Hafnia alvei. J. Antimicrob .Agent .Chemother . 44: 1478.
18-Ramesh, S., Monivasagan, P, Ashokkumar, S., Ragaram, G. and Mayayvau, P. (2010).Plasmid profiling and multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteriaisolatesd from Muthupettai Mangrove environment, southeast coast of India. Curr.Res. Bacteriol. 3 (4):227-237.
19-Wasan W. Al-Bassam and Abdul-K. Al-Kazaz (2012)." Genetic Study On Swarming Phenomenon Andadherence Capacity Of Proteus Mirabilis" Iraqi J. Biotech.11(2):537 -549.
20-Mandal, S., Mandal, M. D. and Pal, N. K. (2004). Plasmid-encoded multidrug resistanceof Salmonella typhi and some enteric bacteria in and around Kolkata, India. 4 (3): 1-7.
microbiology letters, 224(1), 77-83.Gemski, P. J. and Formal, S. B. (1995). Shigellosis: an invasive infection, of gastrointestinal.
5- Harshy,R.M. (2003). Bacterial motility on a surface : many ways to acommon goal.Annu.Rev.Microbiol.57:pp.249-273.
6- Sosa, V., Schlapp, G., & Zunino, P. (2006). Proteus mirabilis isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. Microbiology, 152(7), 2149-2157.
7- Benoit, M. R. ; Conant, C. G. ; Lonescu-Zanetti, C, A. 2010. New device for high - throughput viability screening of flow biofilms. App. Envir. Microbiol., 76(13), (4136-4142).
8- Gerdes, K.; Rasmussen, P. B. &Molin, S. 1986. Uniguetype of maintenance functionpostegregational killing of plasmid free cells. Proe. Natl. Acad. Sci. USA., 38: (3116-3120).
9-Martina, F.; Francois, J. P. & Menard, P. H. 2002. Development of a rapid PCRassay specific for Staphylococcus and application to direct detection from urine sample. J. Clin. Microbiol., 9(38): (3280-3284).
10-Holt,J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; and Williams, S.T.(1994). Bergy, s Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed. Williams & Wilkins.
11- Singh, Harkanwaldeep, et al. (2011): "Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of Campylobacter jejuni in food and faecal samples." Brazilian Journal of Microbiology 42.1 181-186.
12- Trevors, J. T. (1986). Plasmid curing in bacteria. FEMS microbiology reviews,32(3), 149-157.

Investigating the Portability Bacteria *Proteus mirabilis* Isolated From Wounds and Burns Infections to Form Swarming and Study the Virulence Factor Genetically.

Omer N. Flaih Laith M. Najeeb Rana K. Mohammed

E.mail: dean_coll.science@uoanbar.edu.iq

Abstract: This study was designed to investigate ability of the bacteria *Proteus mirabilis* isolated from wounds and burns infections to production of virulence factor swarming and samples elected included the most antibiotic-resistant isolates and by (4) isolates of the bacterium *Proteus mirabilis* diagnosed depending on the biochemical test as well as the production of the phenomenon swarming. The use of heat as a factor curing of plasmids electric deportation results showed a loss of status in the plasmids isolates were elected as well as the loss in the formation of the phenomenon of isolates swarming referring to plasmids role in the formation of such status.