

نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* وإنتاج حال الدم (hemolysin) في أوساط من مخلفات نباتية وحيوانية مختلفة

شذى سلمان حسن

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم/ جامعة بغداد، بغداد، العراق

القبول 2007/12/11

الاستلام 2007/5/8

الخلاصة

استعملت أربعة أوساط محضرة من مخلفات نباتية وحيوانية وهي نخالة الرز وكسبة زهرة الشمس وقشور البطاطا وعظام الدجاج فضلاً عن الوسط التجاري نقيع القلب والدماع Brain Heart Infusion لتنمية *Staphylococcus aureus* وإنتاج حال الدم (الهيمولايسن). حضرت الأوساط بشكلين صلب (مضافاً له الاكار والدم) وسائل بتركيزين 5% و10%. زرعت البكتريا في هذه الأوساط ولوحظت كثافة النمو ومناطق تحلل الدم في الوسط الصلب، وتم قياس النمو وفعالية حال الدم في الأوساط السائلة. نمت البكتريا في هذه الأوساط وأنتجت حال الدم، وقد أعطى الوسط المحضر من نخالة الرز أعلى نمو للبكتريا بتركيزه 5% و10% كما أعطى أعلى فعالية لحال الدم بتركيز 10% تلاه وسط كسبة زهرة الشمس ثم مستخلص عظام الدجاج وأخيراً الوسط المحضر من قشور البطاطا، وكان النمو في الأوساط المحضرة بتركيز 10% أعلى مما عليه بتركيز 5% في غالبيتها، أما حال الدم فكانت فعاليته متقاربة في التركيزين في معظم الأوساط إلا أن فعاليته كانت أعلى في تركيز 10% نخالة الرز مما عليه في تركيز 5%. يتضح من هذه النتائج أن المخلفات النباتية والحيوانية المستعملة في هذه الدراسة ملائمة لتنمية البكتريا وإنتاج حال الدم عموماً، وأن وسط نخالة الرز هو الأفضل لهذا الغرض ويمكن أن تستعمل مثل هذه الأوساط بديلاً عن الأوساط التجارية المكلفة مما يحقق فائدة عملية وإقتصادية.

GROWTH OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND PRODUCTION OF HEMOLYSIN IN DIFFERENT PLANT AND ANIMAL WASTES MEDIA

Shatha S. Hassan

Department of Biology, College of Science, Baghdad University, Baghdad, Iraq

Received 8/5/2007

Accepted 11/12/2007

ABSTRACT

Four different media prepared from plant and animal wastes included rice bran, sunflower meal, potato peels and chicken bones, further more Brain Heart Infusion was used as commercial medium. The media was prepared as solid media (with agar and blood) and liquid media in two concentrations 5% and 10%. The media were cultured with *S. aureus*, growth and hemolysin were detected in solid media and quantitatively estimated in liquid media. *S. aureus* grew and produced hemolysin in all these media. The highest growth was observed in 5% and 10% rice bran. Hemolysin activity in 5% rice bran was more than in other media, followed by sunflower meal, chicken bones and potato peels respectively. The bacterial growth in 10% concentration was more than in 5% in most media, while hemolysin activity was nearly equal in the two concentrations, except in rice bran in which hemolysin in 10% was more than in 5%. These results indicated that the plant and animal wastes used are suitable for bacterial growth and hemolysin production, rice bran is the best one for this purpose.

Key words: *Staphelococcus aureus*, growth, hemolysin, waste media

المقدمة

تعد بكتيريا *S. aureus* من الكائنات المجهرية ذات الأهمية في المجال الطبي والغذائي إذ أنها إحدى المسببات المرضية للعديد من الأصابات مثل أخماج الجلد والجهاز التنفسي والبولي، نظراً لما تمتلكه من عوامل ضراوة Virulence factors عديدة، كما أنها يمكن أن تنمو في أنواع من الأغذية مثل اللحوم ومنتجات الألبان وتفرز سمومها مما يؤدي إلى إصابة الأشخاص الذين يتناولون مثل هذه الأطعمة بالإسهال والقيء وغيرها من الأعراض الناجمة عن سموم البكتيريا، ومن بين أبرز هذه السموم هو حال الدم Hemolysis الذي يؤدي إلى تنخر خلايا اللبائن وإحداث إصابات مختلفة وهناك عدة أنواع من هذه السموم منها سم الفا وبيتا وكاما التي تختلف في سميتها لخلايا اللبائن (1،2).

يتأثر نمو البكتيريا وإنتاجها للمواد الأيضية بضمنها السموم بعدة عوامل أبرزها نوع الوسط الذي تنمو فيه البكتيريا والظروف المزرعية الأخرى. تختلف مكونات الوسط أو البيئة التي تعيش فيها البكتيريا في طبيعتها كأن تكون صلبة أو سائلة أو متجانسة أو غير متجانسة فضلاً عن إختلافها في تركيز ونوع المغذيات والأملاح مما ينعكس سلباً أو إيجاباً في نمو البكتيريا وإنتاجها للمواد الأيضية، فالوسط الذي يحتوي على مواد بروتينية عموماً يشجع نمو البكتيريا لأنه يزودها بما تحتاجه من مغذيات لبناء خلاياها وغالباً ما تحتوي الأوساط الزرعية (المجهزة من قبل الشركات المختصة) مواد غنية بمحتواها من البروتينات والحوامض الأمينية مثل خلاصة اللحم Meat extract و خلاصة الخميرة Yeast extract والبيتون وقد يضاف الدم لجعل الوسط إغنائياً وتحفيز البكتيريا على إنتاج إنزيمات أو بروتينات معينة يشكل بعضها عوامل ضراوة مثل الهيمولايسن (3). إن الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على مدى صلاحية بعض المخلفات النباتية والحيوانية ذات الكلفة القليلة لنمو البكتيريا وإنتاج مواد أيضية معينة مثل حال الدم وإمكانية استعمالها في تحضير أوساط بديلة عن الأوساط التجارية المكلفة لتنمية البكتيريا لتوفير أوساط اقتصادية سهلة التحضير، وتعيين العلاقة بين نمو البكتيريا وإنتاج حال الدم وتأثير نوع الوسط في هذه العلاقة ومعرفة الوسط الأفضل لنمو البكتيريا وإنتاج حال الدم.

المواد وطرائق العمل

عزلة البكتيريا

تم الحصول على عزلة البكتيريا *S. aureus* من قسم علوم الحياة - جامعة بغداد ، نميت البكتيريا على وسط الاكار المغذي Nutrient agar للتأكد من نقاوتها وصفاتها. نشطت العزلة بزرعها في وسط نقيع القلب والدماع (BHI) وحضنت بدرجة 37م لمدة 18 ساعة واستعملت هذه المزرعة لتلقيح الأوساط المختلفة.

الأوساط الزرعية

استعملت الأوساط الزرعية الآتية لتنمية البكتريا وإنتاج حال الدم بعد تعقيمها بدرجة 121م لمدة 15 دقيقة.

- 1 . وسط نقيع القلب والدماغ (BHI): حضر كما وصف من قبل الشركة المجهزة (Merk).
- 2 . أوساط المخلفات النباتية والحيوانية: استعملت مخلفات نباتية جافة تضمنت نخالة الرز وكسبة زهرة الشمس وقشور البطاطا فضلاً عن مسحوق عظام الدجاج بأعتبره من المخلفات الحيوانية.

حضرت أوساط زرعية صلبة وسائلة من هذه المواد وذلك بأخذ أوزان معينة منها وإضافتها إلى محلول الفوسفات الداريء Phosphate buffer المحضر بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7.2 للحصول على تركيزين (5% و 10% وزن : حجم) وسخنت لحد الغليان لمدة خمس دقائق، ثم رشحت من خلال قطعة قماش قطني ثم من خلال ورقة ترشيح (Whatman no.1) وأخذ الراشح. حضر الوسط الصلب بإضافة الأكار إلى الراشح بنسبة 2% وبعد تعقيمه أضيف الدم بنسبة 10% وصب في أطباق بتري معقمة، وحضر الوسط السائل من الراشح بدون أي إضافة في دوارق سعة 100 مليلتر بواقع 50 مليلتر من الوسط في كل دورق وعقم بجهاز التعقيم (الموصدة).

تحضير عالق كريات الدم الحمر

وضعت كميات معينة من دم الانسان في أنابيب تنبذت بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ثم فصلت كريات الدم الحمر المترسبة عن الرائق وغسلت عدة مرات بمحلول الفوسفات الملحي Phosphate buffer saline PBS (4).

تنمية البكتريا على الأوساط الصلبة وملاحظة تحلل الدم

زرعت الأوساط المزودة بالدم بجزء من عالق البكتريا (0.1 مليلتر) الذي نشر على سطح الوسط وحضنت الأطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة مع ملاحظة نمو ومناطق تحلل الدم حول المستعمرات.

تنمية البكتريا في الأوساط السائلة وقياس فعالية حال الدم

لحقت الأوساط السائلة بـ 0.5 مليلتر من مزرعة البكتريا المنشطة وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة، وتم متابعة النمو وإنتاج حال الدم أثناء هذه المدة وذلك بقياس الكثافة الضوئية Optical Density للمزرعة بطول موجي 550 نانوميتر بعد مدد زمنية معينة الذي يعد مقياساً للخلايا الموجودة في العالق (4)، وقدرت إنتاجية الهيمولايسين بتقدير فعاليته (5) وذلك بعد عمل نبذ للمزرعة بطرف مبردة بسرعة (5000 دورة/دقيقة) لمدة 30 دقيقة وفصل الرائق عن الراسب ورشح الرائق من خلال أغشية ترشيح قطر ثقبها 0.22 مايكرون. أضيف 5 مايكرو لتر من الراشح إلى 1 مليلتر من عالق كريات الدم الحمر بتركيز 2% وحضنت بدرجة 37 م لمدة 15 دقيقة ثم نبذ العالق بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وفصل الرائق وتم قياس الكثافة

الضوئية (OD) بطول موجي 540 نانوميتر وعدت القراءات مقياساً لفعالية حال الدم وقد عملت مكررات للتجارب آنفة الذكر.

النتائج والمناقشة

نمو *S. aureus* وإنتاج حال الدم في الأوساط الصلبة

نمت البكتريا بشكل جيد في جميع الأوساط المحضرة من المواد النباتية (نخالة الرز وكسبة زهرة الشمس وقشور البطاطا وعظام الدجاج) فضلاً عن وسط أكار القلب والدماغ (BHI) الذي استعمل للمقارنة وظهر تحلل الدم بشكل واضح في هذه الأوساط (جدول 1).

جدول (1): نمو *S. aureus* وإنتاج حال الدم في الأوساط المختلفة

الوسط وتركيزه	نمو البكتريا	تحلل الدم
نخالة الرز	+++	β -Hemolysis β -Hemolysis
%5	+++	
%10	+++	
كسبة زهرة الشمس	++	β -Hemolysis β -Hemolysis
%5	++	
%10	++	
مستخلص عظام الدجاج	+++	β -Hemolysis β -Hemolysis
%5	+++	
%10	+++	
قشور البطاطا	++	β -Hemolysis β -Hemolysis
%5	++	
%10	++	
أكار نقيع القلب والدماغ	++	β -Hemolysis

+++ نمو كثيف للبكتريا (المستعمرات متداخلة)

++ نمو أقل كثافة

ولوحظ أن كثافة النمو في الأوساط المحضرة من نخالة الرز وعظام الدجاج كان أكثر من بقية الأوساط إذ كانت المستعمرات كثيفة في هذين الوسيطين، وقد يعود ذلك إلى إحتوائهما على المواد المغذية التي تشجع نمو البكتريا كالبروتينات والحوامض الأمينية أكثر من غيرها.

إن إضافة الدم إلى هذه الأوساط يمكن أن يجعلها أوساطاً إغناثية تصلح لنمو العديد من أنواع البكتيريا فضلاً عن الإستدلال على قدرة البكتيريا في إنتاج حال الدم عند وجوده في الوسط، وقد كانت مناطق التحلل حول المستعمرات واضحة في هذه الأوساط.

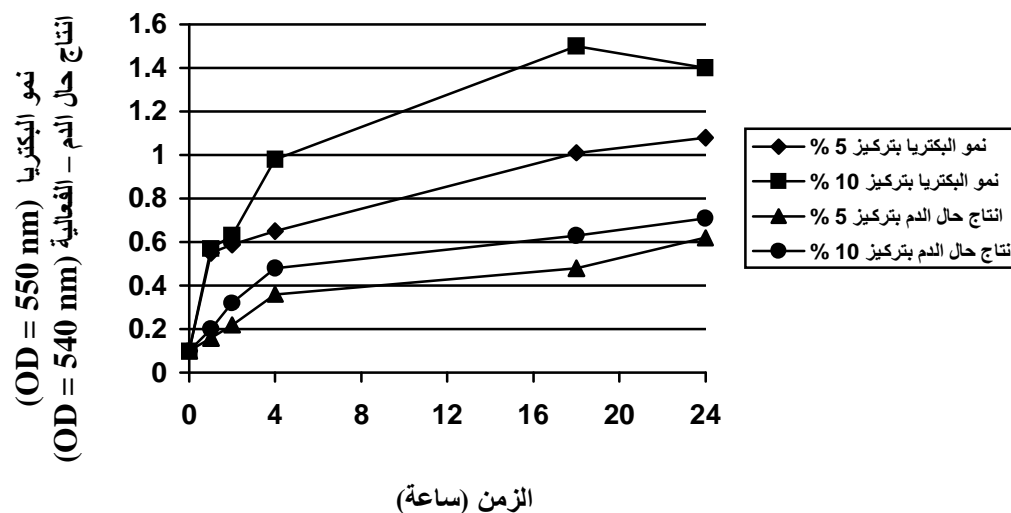
نمو *S. aureus* وإنتاج حال الدم في الأوساط السائلة

لغرض التمييز بين الأوساط المستعملة في الدراسة الحالية في دعمها لنمو *S. aureus* وإنتاج حال الدم بشكل أوضح، زرعت البكتيريا في الأوساط السائلة المحضرة من المواد المذكورة آنفاً وتم قياس النمو وإنتاج حال الدم خلال 24 ساعة.

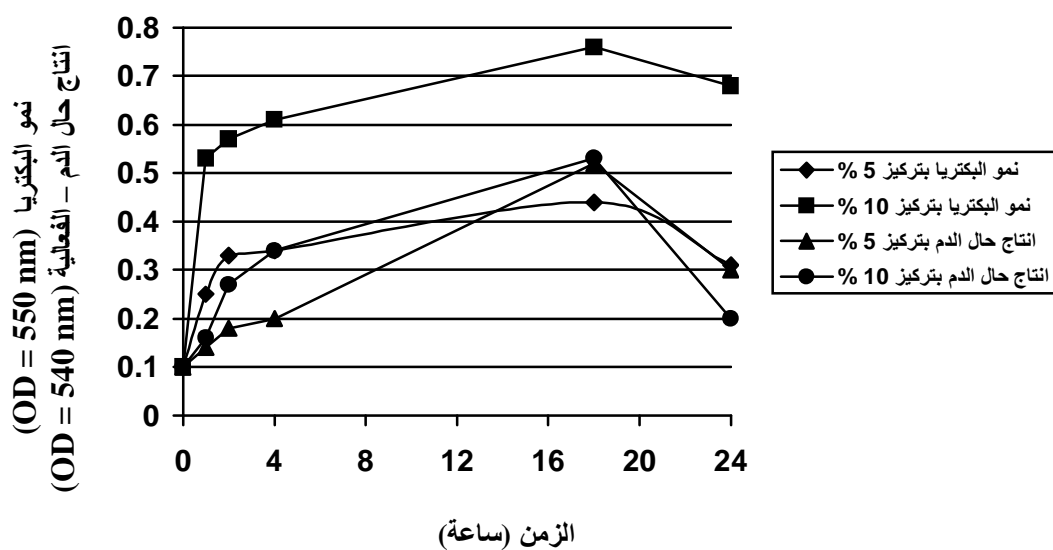
بينت النتائج أن نمو البكتيريا وإنتاج حال الدم في هذه الأوساط يترافقان في الزيادة والنقصان خلال هذه المدة عموماً، ففي الوسط المحضر من نخالة الرز بتركيز 5% و10% استمرت الزيادة في النمو وإنتاج حال الدم خلال 24 ساعة (شكل 1)، ولوحظ أن الكثافة الضوئية (كثافة النمو) بعد 24 ساعة بلغت تقريباً ضعف كثافة النمو الحاصل بعد ساعة واحدة من زرع البكتيريا، أما حال الدم فقد تضاعف 4 مرات بعد 24 ساعة في الوسط المحضر بتركيز 5% وتضاعف بمقدار 35 مرة قياساً بالساعة الأولى في الوسط المحضر بتركيز 10%. استمرت الزيادة في كثافة النمو في وسط كسبة زهرة الشمس لغاية 18 ساعة في كلا التركيزين وكذلك حال الدم إذ وصلت أقصى انتاجية له بعد 18 ساعة ثم إنخفضت، ولوحظ أن كثافة النمو في الوسط المحضر بتركيز 10% كانت أعلى مما هي عليه في الوسط المحضر بتركيز 5% خلال مدة الحضانة، أما حال الدم فكانت فعاليته في الوسط المحضر بتركيز 10% أعلى مما عليه بتركيز 5% خلال الأربع ساعات الأولى، وأصبحت القرائتان متقاربتين بعد 18 ساعة إذ بلغت 0.53 و 0.52 في هذين التركيزين على التوالي (شكل 2).

كان النمو في وسط قشور البطاطا في التركيزين متقارباً وكذلك بالنسبة لحال الدم (شكل 3)، وتشير هذه النتائج إلى أن مضاعفة تركيز هذا الوسط من 5% إلى 10% لا يؤدي إلى زيادة النمو أو حال الدم بدرجة واضحة ويكفي تحضير الوسط بتركيز 5% لتنمية البكتيريا وإنتاج حال الدم ويتحقق من هذه النتيجة فائدة اقتصادية إذ أنها تعني إختزال كمية المادة الأساس المستعملة في الإنتاج. أستعمل في هذه الدراسة وسط محضر من عظام الدجاج بأعتبرها من المخلفات الحيوانية غير المكلفة والمتوفرة على مدار السنة وهي من النواحي الإيجابية مفيدة في النطاق الصناعي. لوحظ في هذا الوسط استمرار الزيادة في كثافة النمو خلال 24 ساعة في كلا التركيزين 5% و 10% إلا أن فعالية حال الدم استمرت في الزيادة لغاية 18 ساعة ثم بدأت بالإنخفاض (شكل 4)، وربما يعود هذا الإنخفاض إلى تحلل بروتين حال الدم بفعل الانزيمات المحللة للبروتينات (proteases) التي تنتجها البكتيريا (6). الوسط الآخر الذي أستعمل في هذه الدراسة هو وسط نقيع القلب والدماغ بأعتبره من الأوساط التجارية الشائعة الإستعمال في المختبرات والدراسات لتنمية البكتيريا لإنتاج العديد من المواد الأيضية بضمنها حال الدم، فضلاً عن كونه وسطاً إغناثياً يحتوي على مستخلصات حيوانية (القلب والدماغ) نمت البكتيريا بشكل جيد في هذا الوسط وأنتجت حال الدم وكانت الزيادة في كثافة النمو مستمرة خلال 24 ساعة إلا أن حال الدم

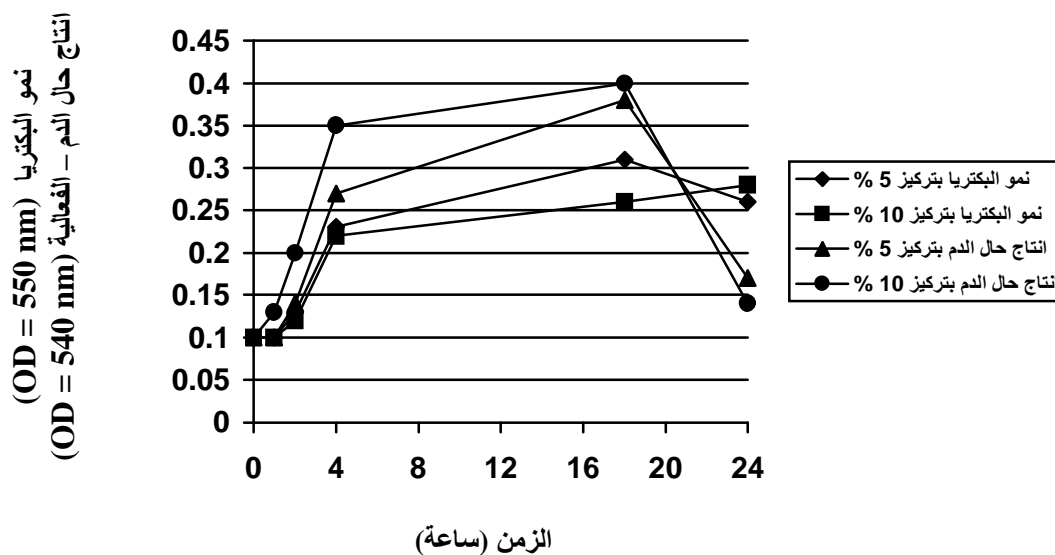
سجلت أعلى قيمة له بعد 18 ساعة ثم انخفضت فعاليته (شكل 5)، إلا أن النمو وإنتاج حال الدم في هذا الوسط لم تكن أفضل مما في الأوساط الأخرى المستعملة في هذه الدراسة بل كان بعضها متفوقاً عليه في دعمها للنمو وإنتاج حال الدم .



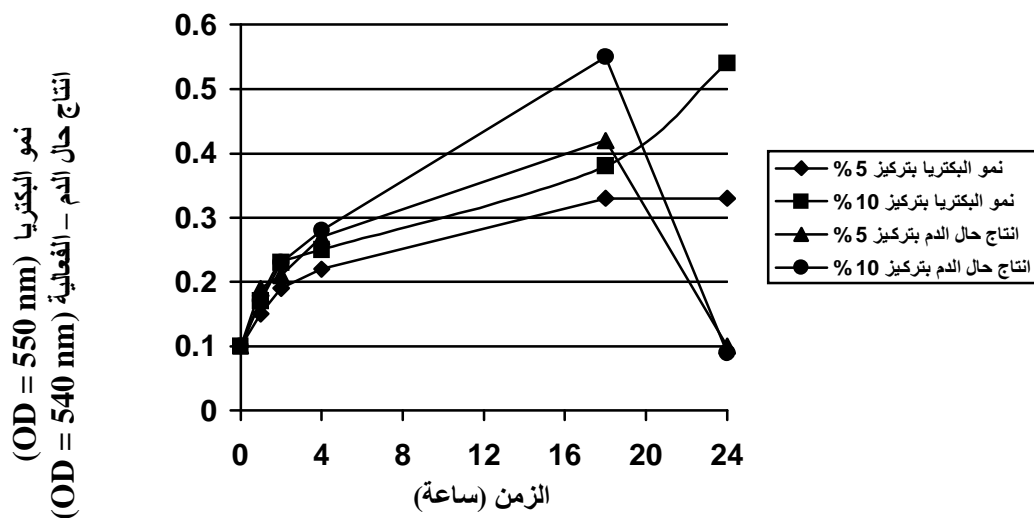
شكل (1) : نمو بكتريا *S. aureus* وإنتاج حال الدم (الهيمولايسين) في وسط نخالة الرز المحضر بتركيزين 5 % و 10 %



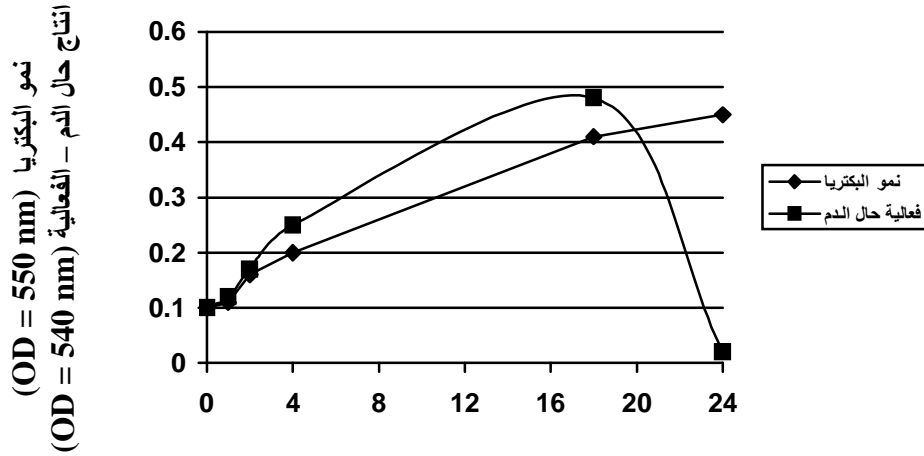
شكل (2) : نمو بكتريا *S. aureus* وإنتاج حال الدم (الهيمولايسين) في وسط كسبة زهرة الشمس المحضر بتركيزين 5 % و 10 %.



شكل (3) : نمو بكتريا *S. aureus* وانتاج حال الدم (الهيمولايسين) في وسط قشور البطاطا المحضر بتركيزين 5% و 10%.



شكل (4) : نمو بكتريا *S. aureus* وانتاج حال الدم (الهيمولايسين) في وسط عظام الدجاج المحضر بتركيزين 5% و 10%.

شكل (5) : نمو بكتريا *S. aureus* وإنتاج حال الدم في وسط نقيع القلب والدماغ

Brain Heart Infusion

لتوضيح التمايز بين الأوساط في مدى ملائمتها للنمو وإنتاج حال الدم وأفضلية أحدهم على الآخر، قورنت النتائج في هذه الأوساط بعد 18 ساعة من زرع البكتريا (جدول 2،3). بينت النتائج أن وسط نخالة الرز يعطي نمواً للبكتريا أعلى مما في بقية الأوساط بتركيز 5% و 10% ، يليه وسط كسبة زهرة الشمس، وكان النمو في الوسط الأخير المحضر بتركيز 10% أعلى من تركيز 5% إذ كانت القراءة 0.76 و 0.44 في كلا التركيزين على التوالي، أما الوسط الذي أعطى أقل نمو فكان وسط قشور البطاطا وربما يعود السبب الى أنها فقيرة بمحتواها البروتيني وأغلب محتوياتها هي مواد نشوية وسليولوزية التي تعد من المواد المعقدة التي تحتاج الى انزيمات متخصصة لتفكيكها الى مواد أبسط لكي يتمكن الكائن من الإستفادة منها لتغذيته ونموه (7).

جدول (2): نمو *S. aureus* في الأوساط المختلفة السائلة بعد 18 ساعة من الحضانة بدرجة 37 م

كثافة النمو (OD=550 NM)		الوسط
تركيز الوسط 10%	تركيز الوسط 5%	
1.15	1.06	نخالة الرز
0.76	0.44	كسبة زهرة الشمس
0.26	0.31	مستخلص عظام الدجاج
0.38	0.33	قشور البطاطا
	0.41	نقيع اللب والدماغ*

• الوسط محضر وفقاً لتعليمات الشركة المنتجة

جدول (3): فعالية حال الدم (hemolysin) في الأوساط السائلة المختلفة بعد 18 ساعة من الحضانة بدرجة 37 م.

الوسط	فعالية حال الدم (O.D 540) تركيز الوسط 5%	فعالية حال الدم (O.D 540) تركيز الوسط 10%
نخالة الرز	0.48	0.63
كسبة زهرة الشمس	0.52	0.53
قشور البطاطا	0.38	0.40
عظام الدجاج	0.42	0.55
نقيع القلب والدماغ	0.48	

كان النمو في الوسط المحضر من عظام الدجاج في التركيزين 5 % و 10 % متقارباً إلا أنه أقل من وسط نخالة الرز وكسبة زهرة الشمس.

تشير هذه النتائج إلى أن المخلفات النباتية والحيوانية المشار إليها في أعلاه تصلح لنمو البكتريا ويتفوق الوسط المحضر من نخالة الرز على بقية الأوساط في هذه الناحية. ويلاحظ ان فعالية حال الدم في وسط نخالة الرز بتركيز 10% كانت أعلى من بقية الأوساط، وتأتي هذه النتيجة متناسقة مع نمو البكتريا في الوسط نفسه اذ كان النمو أعلى من غيره، وأعطى الوسط المحضر من قشور البطاطا أوطاً فعالية لحال الدم بتركيزه وكانت النتائج متقاربة لبقية الأوساط.

أن الأوساط المستعملة لتنمية *S. aureus* وإنتاج حال الدم معظمها أوساط جاهزة مصنعة من قبل شركات خاصة وقد تحضر أوساط تركيبية في بعض الدراسات وغالباً ما تحتوي هذه الأوساط على مواد بروتينية وأملاح ومصادر كربونية، ولم نجد بين هذه الأوساط أوساط مماثلة للأوساط المستعملة في هذه الدراسة، من الأوساط التي استعملت لتنمية *S. aureus* وإنتاج حال الدم وسط متحلل الكازاين (1)، كما أستعمل هذا الوسط مضافاً إليه مستخلص الخميرة لتنمية *Aeromonas hydrophila* وإنتاج حال الدم (8).

تناولت إحدى الدراسات عزل وتنمية *S. aureus*، تم فيها مقارنة النمو في أوساط إغنائية تضمنت 20 تركيبة كان أساس مكوناتها وسط نقيع القلب والدماغ ووسط تربتون الصويا وأكار المانيتول الملحي وأضيف لهذه الأوساط بعض المواد المدعمة للنمو كالمصل والدم والثايمين والبايوتين، أثبتت النتائج ملائمة هذه الأوساط لتنمية البكتريا وإنتاج حال الدم (9)، كما تناولت إحدى الدراسات تأثير 17 وسطاً لتنمية *A. hydrophila* وإنتاج حال الدم كانت أغلبها أوساط محلية تحتوي على مصادر كربونية و نيتروجينية مختلفة وبعضها احتوى على البلازما أو الدم فضلاً عن وسط trypticase soy broth ونقيع القلب والدماغ (BHI) والمرق المغذي Nutrient broth ، وقد أعطى مرق الصويا بتركيز المزود بمستخلص الخميرة أعلى إنتاجية (10).

يمكن الإستنتاج من نتائج هذه الدراسة أن المخلفات النباتية والحيوانية المذكورة تصلح لتحضير أوساط ملائمة لنمو البكتريا وإنتاج حال الدم، وأن وسط نخالة الرز يعطي أعلى نمو وإنتاجية لحال الدم ويتراقف النمو وحال الدم اثناء مدة الحضان ويصلان إلى أعلى قيمة لهما بعد 18 ساعة من الحضان بدرجة 37 م .

المصادر

- 1- Mahon, F. and Mannaelis, K. (2000). Medical Microbiology. Mosby- Yestr Book – Europ.
- 2- Arbuthnott, J.P. (1970). Staphylococcus Toxin In: Microbial Toxins.(eds. T.C. Honti ; S. Kadis and S. J. Ajl).vol.3 Academic Press. New York.
- 3- Stanier, R.Y.; Ingrahm, J. L.; Wheelis, M.L. and Painter, P. R. (1989). General Microbiology. Macmillan Education LTD.
- 4- Atlas, R.; Briwa, A.E. and Park, L.C. (1995). Experimental Micobiology. Mosby- Yestr Book, Inc. USA.
- 5- Senior, B.W. and Hughes, C. (1987). Production and properties of hemolysins from clinical isolates of the Proteus. *J. Med. Microbiol.*
- 6- محمود, ولاء شاكر (2006). دراسة العلاقة بين إنتاج الهيمولايسين والبروتياز من بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من نماذج سريرية مختلفة.رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.
- 7- Rose, A. H. (1980). Microbial enzyme and bioconversions . Academic Press, Inc: New York.
- 8- Wrellind, B. and Heden, L. (1973). Formation of extra cellular hemolysin by *Aeromonas hydrophila* in relation to Protease and Staphylolytic enzyme *J. Gene. Microbial.*, 78: 57 – 65.
- 9- العبادي, منيرة جلوب اسماعيل (2003). دراسة البكتريا الشائعة في التهاب قرنية العين القبحي في العراق. اطروحة دكتوراه.كلية العلوم .الجامعة المستنصرية.
- 10- Muslim, S. N. (2005). Biochemical and genetic studies on hemolysin production by *Aeromonas hydrophila* isolate from diarrhea patient and from surface water. Ph.D. Thesis. Colleg of Science. Al – Mustansiriya University.