Effect of Virulen Factor on Hydrophobicity cell wall of *Saphylococcus* and it's Attached on Meat

دراسة تاثير بعض عوامل الضراوة على الخاصية الراهبة للماء Hydrophobicity لجدار بكتريا *Staphylococcus* والالتصاق باللحوم

ا.م.د. لمى عبد الهادي ا.م. د. اسراء عبد الجبار م. انعام عبد القادر
قسم علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة -ابن الهيثم /جامعة بغداد

المستخلص

شملت الدراسة الحالية جمع 35 عزلة بكتيرية Staphylococcusمن مستشفى الكاظمية والنعمان ومختبر الاحياء المحهرية في كلية التربية ابن الهيثم وانتخب منها 10 عزلات مشخصة ودرست انتاجها لانزيم Hemolysin و Coagulase و urease فضلا عن تخمرها لسكر Mannitol . واختبرت الخاصية الراهبة للماء لجدار البكتريا بطريقة hydrocarbon adherence , وقابلية البكتريا على الالتصاق في اللحم واشارت النتائج الى ارتفاع الخاصية الراهبة للماء للعزلات المنتجة لانزيم Hemolysin ولم تلاحظ هذه الخاصية في العزلات المنتجة لانزيم coagulaseو urease . ا ما قابلية العزلات على الالتصاق في اللحم فقد اشارت النتائج ان العزلات المنتجة لانزيم Hemolysin قابلية اكثر بالالتصاق في قطع اللحم . اما العزلات المنتجة لانزيم Coagulase وurease فلم يلاحظ اي تاثير لهما على قابلية الالتصاق في اللحم .اما نتائج التحليل الاحصائي فقد لوحظ عدم وجود علاقة بين الخاصية الراهبة للماء والالتصاق في قطع اللحم اذا كانت قيمة (r= -0.870).

Summary

the study included the

collecting of 35 isolates bacteria Staphylococcus of Kadhimiya hospital, Numan hospital and microbiology labortary in Department of biology / Collage of education ibn al Haitham and selected 10 isolated . Studied enzyme production Hemolysin Coagulase and urease as well as sugar fermentation Mannitol. And tested property hydrophobic the wall of the bacteria in a way that hydrocarbon adherence, and susceptibility of bacteria to attachment to the meat .the results indicate high hydophobic property of the isolates producing enzyme Hemolysin but This increase wasnot observed in isolates producing enzyme coagulase and urease. Susceptibility of the isolates to attach to the meat, the results indicated that the isolates produced Hemolysin portability more in attached the pieces of meat. The isolates producing Coagulase and urease enzyme did not attach to the meat . Either statistical results have been observed no relationship between property hydrophilic and attach the pieces of meat if the value (r = -0.870

المقدمة

تتواجد البكتريا في كل ما يحطينا من مواد صلبة وسائلة فضلا عن تواجدها في اجسامنا بشكل طبيعي او انتهازي وذلك لقدرتها على الانتشار والالتصاق في اجسامنا بسبب امتلاكها عوامل ضراوة مثل المحفظة Capsule او الشعيرات fimbriae او الاهـــلاب Pilli او السكـــريات المتـــعددة الدهنيـــة Lipopolysaccharide وغيرها من العوامل التي تمكن البكتريا من الالتصاق بخلايا المضيف (1) في حين اشارت المصادر الى وجود صفات اخرى تحدد مدى قابلية البكتريا على الالتصاق بسطح المضيف ومن هذه الصفات هي الخصائص السطحية لجدار البكتريا والتي تشمل الخاصية الراهبة والمحبة للماء Hydrophopic and Hydrophilic والتي تساهم بشكل كبير في عملية الالتصاق (2) . اذ اشار (3) ان الخصائص السطحية تختلف من نـــوع الى اخر وايضا تختلف بين النوع الواحد اذ لاحظ ان البكتريا *Staphylococcus aureus* تمتلك خصائص راهبة للماء في حين بكتريا *Staphylococcus epidermads* تمتلك خصائص محبة للماء وذلك يعود الى امتلاكها انزيمات معينة توثر بشكل كبير في هذه الخصائص في حين اشار (3)الى ان امتلاك بكتريا *Staph . aureus* بروتين Aيؤدي الى زيادة الخاصية الراهبة للماء فضلا عن وجود انزيم Coagulase. كما اشار (4) الى ان وجود المحفظة تعمل على زيادة الخاصية المحبة للماء في حين اشار (5) الى عدم تاثير وجود المحفظة على الخاصية الراهبة للماء . كما بين (4) الى ان بكتريا *epidermidis Staphylococcus* كانت تمتلك خاصية الراهبة للماء اكثر من بكتريا *Staphylococcus saprophyticus* في حين تصبح ذات خاصية محبة للماء عند معاملة البكتريا بانزيم الببسين ولا تتاثر هذه الصفة عند المعاملة بالبنسلين . اما (6) فقد اشار الى وجود علاقة بين قابلية البكتريا على تكتل كريات الدم الحمراء والالتصاق . في حين لاحظ (2) ان البكتريا التي تمتلك عوامل

ضراوة كثيرة Highly virulent toxigenic تكون اكثر قابلية على الالتصاق من البكتريا التي لاتمتلك او تمتلك كمية قليلة من عوامل الضراوة Non or weakly virulent .

لذا هدفت الدراسة الحالية الى دراسة علاقة بعض عوامل الضراوة كانزيم hemolysin و coagulase و urease على الخصائص السطحية لبكتريا *Staphylococcus* وفي الالتصاق في اللحم .

المواد وطرق العمل

1- تم الحصول على 32 عزلة بكتيرية من مستشفى الكاظمية والنعمان ومختبر الاحياء المجهرية في كلية التربية للعلوم الصرفة وانتخبت 10 عزلا ت بكتيرية مشخصة واحريت لها الفحوصات البايوكيمياوية حسب ماذكر في (7) وفحصت قدرة العزلات على انتاج Hemolysinو انزيم Urease و Coagulase باستخدام وسط الدم Blood agar و urea agar وبلازما الدم على التوالي .

2- تحضير العالق البكتيري

نميت كل من العزلات في الوسط المغذي الصلب Nutrient agar بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة ثم غسلت بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ذو رقم هيدروجيني 6.8 ووضع المحلول في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة واهمل الرائق واضيف للراسب محلول الملحي الفسيولوجي Saline solution للحصول على عدد بكتيري مقداره 1×10^7 خلية/مل اذ قورنت كثافة نموها مع محلول ثابت العكرة القياسي (مكفرلاند) (8)

2- قياس الخاصية الراهبة للماء

اتبعت طريقة الhydrocarbon adherence التي ذكرها Dickson وKoohmaraie (9)[اذ اضيف 4 مل من عالق البكتريا (1×10^7 خلية /مل) في انبوب اختبار و 4 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ذو رقم هيدروجيني 6.8 و 1 مل من الزايلين xylene وترك الخليط لمدة 10 دقائق بدرجة 37م ثم جرى تحريك الخليط لمدة 15 دقيقة باستخدام الخلاط المغناطيسي magentic stirrer و حضن لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37م ثم فصلت الطبقة المائية لتقدير الخاصية الراهبة للماء بقياس الامتصاص الضوئي باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer للطبقة المائية على طول موجي 540 نانومتر واستخدم العالق البكتيري ومحلول دارئ فوسفات البوتاسيوم ومحلول الملحي الفسيولوجي Saline solution بدل الزايلين كمحلول سيطرة (Blank).

جرى حساب الخاصية الراهبة للماء (Hydrophobic) حسب المعادلة التالية:

$$= \frac{\text{قراءة الامتصاصية لمحلول السيطرة – قراءة الامتصاصية لمحلول المعاملة}}{\text{قراءة الامتصاصية لمحلول السيطرة}}$$

- تم طرح النتيجة النهائية من 1

3 – قياس قابلية البكتريا في الالتصاق باللحم

تم استخدام لحم طازج (2)غم وقطع الى قطع صغيرة بحجم 0.5 سم وبطرق معقمة وحفظت بدرجة حرارة -10 م لحين الاستعمال وبعد ذلك ذوبت ووضعت قي قناني معقمة واضيف اليها 2 مللتر من عالق البكتريا و 18 مللترمن دارئ الفوسفات ومزجت لمدة 5 دقائق , ثم نقلت قطع اللحم الى دورق يحتوي 99 مللتر من دارئ الفوسفات ومزجت لمدة 15ثانية وحسب عدد البكتريا بطريقة صب الاطباق pour plate والعدد يمثل البكتريا ضعيفة الالتصاق بقطع اللحم ,ثم نقلت قطع اللحم الى دورق يحتوي 99 مللتر من دارئ الفوسفات وسحقت لمدة 2 دقيقة وحسب عدد البكتريا بطريقة صب الاطباق pour plate والعدد يمثل البكتريا قوية الالتصاق بقطع اللحم

جرى حساب قوة التصاق البكتريا باللحم (**Attachment bacteria**)حسب المعادلة التالية:

$$= \frac{\text{عدد البكتريا قوية الالتصاق}}{\text{عدد البكتريا ضعيفة الالتصاق + عدد البكتريا قوية الالتصاق}}$$

النتائج والمناقشة :

انتخبت 10 عزلات بكتيرية من 32 عزلة من بكتريا Staphylococcus وشخصت ببعض الفحوصات اليايوكيمياوية ثم اختبرث قابليتها على انتاج انزيم Hemolysinو Urease و Coagulase باستخدام وسط Blood agar و urea agar وبلازما الدم على التوالي والنتائج في جدول (1)يبين بعض الصفات الخاصة ببكتريا Staphylococcus اذ ان العزلة 1 و2 و4 و7 و8 و9 تمتلك انزيم hemolysinمن نوع بيتا اما العزلات 3 و5 و6 و10 فقد اظهرت امتلاكها انزيم من نوع كاما .اما العزلة 2و3و4 و5 و6 فقد اظهرت امتلاكها لانزيم coagluase و العزلة 1 و5 و 6 و7 و8 فقد اظهرت امتلاكهما لانزيم urease .اما نتائج جدول رقم (2) فيشير الى الفة البكتريا للطور المائي وطور المذيب العضوي xyleneاعتماد على الخاصية الراهبة للماء على سطح البكتريا اذا ان انخفاض القيمة يشير الى الخاصية الراهبة للماء مما يجعلها اقل الفة للطور المائي ,اذ يبين الجدول وجود اختلافات في سطح البكتريا من حيث الخاصية الراهبة للماء فكانت العزلات 1 و2 و4 و7 و8 و9 اكثر الفة للطور المذيب العضوي اذ بلغت 0.204 و 0.250 و0.227 و0.301 و0.218 و0.259 على التوالي اي امتلاكها خاصية راهبة للماء عالية .في حين العزلات 3 و5اقل الفة للطور المذيب اذ بلغت 0.429 و 0.531 على التوالي واقلهم الفة كانت العزلة 6 اذ بلغت 0.721 .اما نتائج جدول رقم (3) فيظهر قابلية البكتريا على الالتصاق في اللحم اذا ان العزلات 1 و 2و4 و 7و 8و 9 كانت اكثر التصاق باللحم اذ بلغت 69.0 و 69.5 و 69.0 و78.2 و 74.2 و 78.2 على التوالي من بقية العزلات اذ كلما كانت القيمة عالية تشير الى قوة التصاق العزلة باللحم وعند دراسة تاثير وجود او عدم وجود بعض الانزيمات في البكتريا على قابليتها في الالتصاق في اللحم فقد اظهرت النتائج ان العزلات التي تمتلك انزيم hemolysinو كانت اكثر قابلية في الالتصاق مع اللحم مقارنة مع العزلات التي تمتلك انزيم coagulase و urease. اذا كانت هناك اختلافات بين العزلات من حيث العلاقة بين امتلاكها للانزيمات والخاصية الراهبة للماء والقابلية غلى الالتصاق في اللحم , اذ اظهرت العزلة 8 و 9 عدم امتلاكها الانزيم coagulase وامتلاكها الفة عالية للطور المذيب العضوي و قابلية عالية على الالتصاق باللحم اما العزلة 5 و6 فكانت تمتلك الانزيم ولم تظهر خاصية راهبة للماء ولا قابلية على الالتصاق في اللحم .اما انزيم urease فكانت العزلة 2 و 4 و 9 تمتاز بعدم امتلاكها الانزيم وامتلاكها قابلية عالية في الالتصاق في اللحم و الخاصية الراهبة للماء. اذا تبين النتائج ان بكتريا *Staphylococcus*تعد بكتريا ذات خصائص سطحية كارهة للماء ومن النتائج السابقة فقد تبين ان العزلات التي تمتلك انزيم hemolysin ا ظهرت ارتفاع في الخاصية الراهبة للماء وقابلية في الالتصاق في اللحم اما وجود انزيم urase و coagulase فقد تبين من النتائج ان وجود الانزيم لايؤثر على الخاصية الراهبة للماء او الالتصاق في اللحم وهذا يتوافق مع ما اشار اليه (4) الى ان تاثير انزيم coagulaseيعد غير مؤثر بشكل كبير على الخاصية الكارهة للماء. ولا يتوافق مع ما وجده (1) اذا اشار الى ان قابلية بكتريا *Staphylococcus* على تكتل البلازما الدم يزيد من الخاصية الكارهة للماء وقابلية البكتريا على الالتصاق في جدار المضيف اما العلاقة بين الخاصية الراهبة للماء وقابلية البكتريا على الالتصاق في اللحم فقد اشارت نتائج التحليل الاحصائي الى عدم وجود علاقة بين الخاصية الراهبة للماء والالتصاق اذ كانت قيمة r=0.870 وهذا يتوافق نوعا ما مع ماوجده (3) فقد بين الى وجود علاقة بين الخاصية الراهبة للماء وقابلية البكتريا على الالتصاق في اللحم ذات المحتوى الدهني العالي وعدم وجود هذه العلاقة مع اللحم قليل الدهن وقد فسر ذلك الى طبيعة الشحنات الموجودة على قطع اللحم عالية الدهن, في حين لاتتوافق النتائج مع ماشار اليه (1 و2 و4) الى ان زيادة الخاصية الراهبة للماء يزيد من قدرة البكتريا على الالتصاق في المضيف , اذ اشار (4) الى وجود علاقة بين الخصائص الراهبة للماء وقابلية البكتريا على الالتصاق في الخلايا الطلائية للأمعاء . اما (10 و 11) قد اشار الى وجود عوامل اخرى تؤثر على الخاصية الراهبة للماء والالتصاق في خلايا المضيف مثل نوعية الوسط الزرعي الذي تنمى فيه البكتريا وامتلاكها للمحفظة والاسواط .في حين اشار (12) الى تاثير درجة الحرارة على التصاق البكتريا في اللحم

جدول (1) يوضح بعض الخصائص العامة لبكتريا Staphylococcus

*البكتريا	العزلة	تخمر mannitol	وجود hemolysin	وجود coagulase	وجود urease
Staph 110	1	+	+	_	+
Staph .432	2	+	+	+	-
Staph . low	3	_	-	+	V
Staph .kty	4	+	+	+	-
Staph. Gfd	5	+	-	+	+
Staph .567	6	+	-	+	+
Staph. 67	7	_	+	-	+
Staph .rtt	8	_	+	-	+
Staph .ffd	9	+	+	-	-
Staph .cvf	10	_	-	-	-

- اعطيت هذه الرموز من قبل المستشفيات اعتمادا على المرضى

\+ منتجة للانزيم

\- عير منتجة للانزيم

جدول (2) يوضح الخاصية الراهبة للماء Hydrophobicity لبكتريا Staphylococcus

Hydrophobicity	العزلة	البكتريا
0.204	1	Staph 110
0.250	2	Staph .432
0.429	3	Staph . low
0.227	4	Staph .kty
0.531	5	Staph. Gfd
0.721	6	Staph .567
0.301	7	Staph. 67
0.218	8	Staph .rtt
0259	9	Staph .ffd
0.525	10	Staph .cvf

جدول (3) يوضح خاصية التصاق بكتريا Staphylococcus باللحوم

الالتصاق في اللحم	العزلة	البكتريا
69.0	1	Staph 110
69.5	2	Staph .432
50.2	3	Staph . low
69.0	4	Staph .kty
28.4	5	Staph. Gfd
34.2	6	Staph .567
78.2	7	Staph. 67
74.2	8	Staph .rtt
78.2	9	Staph .ffd
35.2	10	Staph .cvf

المصادر

1 -Wibawan, W. T.; Lammler, C. and Pasaribu, F. H. (1992). Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B *Streptococci* to epithelial cells. J.General microbiology 138:1237

2 -Krishna, M. M. ; Powell, N. B. L. and Borriello, S. P.(1996).Cell surface properties of *clostridium difficile*: haemagglutination, relative hydrophobicity and charge. J. Med. Micribiol. 44: 115-123

3-Reifsteck, F.; Wee, S. and Wilkinson, B. J. (1987). Hydrophobicity – hydrophilicity of Staphylococci. J. Med. Microbiol. 24: 65-73.

4- Hogt ,A.H.; Dankert, J. ; de Vries J.A.;Feijen J.(1983) . Adhesion of coagulase –negative Staphylococcus to biomaterials . J. of General Microbiology 129:2959-2968 .

5- Jonsson ,P. and Wadstrom ,t. (1983). High surface hydrophobicity staphylococcus aureus as revealed by hydrophobic interaction chromatography.Current Microbiology . 8:347-3

6-Kabir, S. and Ali, S. (1983). Characterization of surface properties of *vibrio cholerae* . Infection and Immunity. 39(3): 1048-1058.

7- Forbes,B.A;Sahm,D.F.and Weissfeld,A.S.(2007).Diagnostic microbiology .MOSBY ELSEVIER

8-Stokes, E. J. and G. L., Ridgway (1987). In Handling Clinical Specimens forMicrobiological Studies. (5th ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.

9-Dicksom, J.S. and Koohmaraie, M. (1989). Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. App. Envir. Microbiology. 55(4):832-836

10-Jain,A.;Nishad,K.K.and Bhosle,N.B.(2007).Effect of DNP on cell surface properties of marine bacteria and its implication for adhesion to surfaces.Author Version: Bifouling :23(3-4)171-177

11-Kim , H. N. ; Honr, Y. ; lee, I.; Bradford, S. A. and Walker, S.L. (2009). Surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli* O157:H7: Role of extracellular macromolecules. Biomacromolecules. 10(9): 2556-2564.

12 – zulfakar,S. White ,J. ; Ross,T.and Talplin ,ML. (2012)Bacterial attachment to immobilized extracellular matrix proteins in vitro . International J. Food Microbiology , 157 :210- 217 (ABSTRACT)