دور الحركتين الأهتزازية والسابحة في تكوين الغشاء الحيوي في جراثيم الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من عينات مرضية مُختلفة

عمر غياث محمد حياوي
جامعة الموصل / كلية التربية الأساسية / قسم العلوم العامة

أ.م.د. محسن أيوب عيسى العكيدي
جامعة الموصل /كلية العلوم/قسم علوم الحياة

(قدم للنشر في ٢٠١٨/٦/١٢ ، قبل للنشر في ٢٠١٨/٧/١٥)

ملخص البحث:

أُجري هذا البحث بهدف التحري عن نشاط الحركة الأهتزازية والحركة السابحة ودوره في قوة الغشاء الحيوي الذي تُكونه عُزلات النوع Pseudomonas aeruginosa المعزولة من مصادر مرضية مُختلفة. أظهرت النتائج أمتلاك جميع العزلات المدروسة (١٠٠%) القابلية على القيام بالحركة السابحة (swimming motility) و (٨٠%) منها القابلية على القيام بالحركة الأهتزازية (twitching motility). فيما أظهرت جميع العزلات (100%) قابلية متباينة على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام طريقة صفيحة الزرع النسيجي Tissue culture plate method (TCP) وقد توزعت النتائج ما بين موجبة قوية (٢٠%) وموجبة مُتوسطة(٤٠%) وموجبة ضعيفة (٤٠%). وقد بينت النتائج وجود علاقة نسبية بين نشاط الحركة الأهتزازية والحركة السابحة و بين درجة قوة الغشاء الحيوي الذي كونته العزلات المختبرة.

The Role of Twitching and Swimming Motilities in Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical specimens

Abstract:

This research has been conducted to investigate the role of twitching and swimming motilities activity in the biofilm strength formed by P.aeruginosa isolated from different clinical specimens. The results showed that all studied isolates (100%) and (80%) possess the ability to motile by twitching and swimming, respectively. All isolates (100%) showed the ability to form a biofilm using tissue culture plate method. These isolates were classified as: Strong positive (20%) , moderate positive (40%) and weak positive (40%). The Results showed a comparative relation between twitching, swimming motilities, and the degree of biofilm strength formed by tested isolates.

المُقدمة

تُعد جرثومة *P.aeruginosa* أحد أهم الأنواع التابعة لجنسPseudomonas وهي عُصيات سالبة لصبغة الكرام متحركة بسوط قطبي هوائية التغذية تنمو بسهولة على معظم الأوساط المختبرية بدرجة ٣٧-٤٢مْ منتجة مستعمرات مصطبغة بصبغة البايوسيانين الخضراء منتشرة في الوسط وهي ذات أشكالا مُتغايرة إلا أنها غالبا ماتكون دائرية ملساء وأحينا مُخاطية كذلك المعزولة من حالات التليف الكيسي (Nester *et al*,2007; Brooks *et al*,2013) تُعد جرثومة *P.aeruginosa* من أكثر الأنواع الجرثومية أنتشارا فهي تستعمر أنواع مختلفة من البيئات كبيئة التربة وبيئة المياه والبيئات الحية كالحيوانات والنباتات وهي تُعد من أكثر الأنواع المرضية شيوعا في الإنسان (Fischer *et al*,2016) .يعود الأنتشار الواسع لهذا النوع بصورة أساسية إلى أمتلاكه ميزات أنتقائية عن باقي الأنواع فهو يمتلك شبكة من الإشارات التنظيمية البين خلوية المُعقدة تجعله قادرا على التحول من الشكل الحر السابح "motile" إلى الشكل الساكن "sessile"متمثلا بالغشاء الحيوي والذي يكون له الدور الأبرز في التكيف والنجاح في البيئات المختلفة (Ha & Otool,2015 ; Klockgether and Tümmler,2017) على الرغم من الدور الذي تلعبه بعض القوى الناشئة بين الخلية والسطح الساند كقوى فاندروالز التجاذبية Van der Waals forces أو قوى التنافر الأليكتروستاتيكية Repulsive electrostatic forces في جذب الخلية أو دفعها في أغلب الأحيان بعيدا عن السطح إلا أن الألتصاق الناجح لجرثومة *P.aeruginosa* يعتمد على أمتلاكها لبعض التراكيب الخارجية كالشعيرات والسكريات الدهنية والسوط والتي تُمكنُها من تجاوز قوى التنافر والسباحة باتجاه السطح الساند لتتعلق به وترتبط معه. (Laverty *et al*,2013; Lee & Yoon,2017) .يمتلك هذا النوع سوط قطبي واحد يلعب دور رئيسي في حركته بالأنجذاب الكيمياوي وفي الوقت ذاته يتواسط الألتصاق الأولي للجراثيم على الدهون السكرية لخلايا المضيف الطلائية (Al-wrafy *et al*,2017) . كما تبرز من الجرثومة تراكيب خيطية نحيفة تُعرف بشعيرات النوع الرابع Type IV pili (T4p) قطرها (٥-٨ نانومتر) وهي مرتبطة بقدرة الجرثومة على القيام بحركات موضعية مُتعددة كالحركة الأهتزازية "Twitching Motility" والعج "Swarming" وهي مسؤولة كذلك عن تعلق الجرثومة على الأسطح الخلوية والأسطح الأخرى الغير حية كما تعمل على تجميع الخلايا ووصلها ببعضها البعض وتكوين الغشاء

الحيوي. (Burrows, 2012; Leighton *et al*,2015). ونظرا للأهمية الصحية والبيئية للغشاء الحيوي فقد أجري البحث الحالي بهدف دراسة دور الحركتين الأهتزازية والسابحة في تكوين الغشاء الحيوي في جراثيم الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من عينات مرضية مُختلفة

المواد وطرائق العمل

المواد:

١. الجراثيم المُستخدمة في الدراسة: شملت الدراسة (١٠) عزلات تابعة للنوع *P.aeruginosa* تم عزلها وتشخيصها من عينات مرضية مُختلفة شملت (عينات جلدية ، عينات من الجهاز التنفسي ، دم ، مسحات مهبلية) في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل.

٢. الأوساط الزرعية:

- وسط Tryptone Soya Broth (TSB) المُجهز من شركة Himedia الهندية
- وسط Twitching motility: المحضر كوسط شبه صلب بإضافة ١% أكار الى وسط ماء البيتون ١.٣% (Déziel *et al* 2001)
- وسط Swimming motility :المحضر كوسط شبه صلب بإضافة ٠.٥% أكار الى وسط ماء البيتون ١.٣% Déziel *et al* (2001)

عقمت الأوساط الزرعية باستخدام المؤصدة في ١٢١مْ لمدة ١٥ دقيقة.

٣. صبغة السفرانين بتركيز ٠.١% المُجهزة من شركة Atomic Scientific–الأنكليزية

٤. المحلول الملحي ٠.٨٥%

طرائق العمل:

أولا: دراسة قابلية جراثيم *P. aeruginosa* على الحركة

أعتمدت طريقة (Déziel *et al* 2001) في تقييم الحركة في الأنواع المدروسة وكما يلي:

الحركة السابحة Swimming Motility :

١. حضر الوسط شبه الصلب الحاوي على ٠.٣% أكار.

٢. عقم الوسط في المؤصدة ثم برد وصب في الأطباق .

٣. تركت الأطباق لتتصلب في درجة الغرفة .

٤. في اليوم التالي لقحت الأطباق باستخدام toothpick .

٥. تركت لمدة ١٨–٢٤ ساعة.

٦. تم ملاحظة انتشار البكتيريا بشكل حلقة دائرية حول مركز التلقيح.اخذت قياسات لأقطار الحلقات المتكونة.

الحركة الأهتزازية Twitching Motility:

١. حضر الوسط شبه الصلب ١% أكار.

٢. عقم الوسط في الأتوكليف. بردت وصبت في الأطباق بشكل طبقة سميكة.

٣. تركت الأطباق لتتصلب في درجة الغرفة .

٤. في اليوم التالي لقحت الأطباق بالوخز عميقا باستخدام toothpick.

٥. تركت لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

٦. تم ملاحظة الحركة المتكونة بين قعر الطبق والأكار.

ثانيا: تقدير تكوين الأغشية الحيوية باستخدام صفيحة الزرع النسيجي Tissue culture Plate Method (TCP):

استخدمت طريقة (Stepanovic *et al* 2000) المحورة وكما يلي :

١. علقت ٣-٤ مستعمرة جديدة في وسط TSB .

٢. وزع العالق على حفر البوليستيرن (٩٦) حفرة بواقع ١٥٠ مايكروليتر. غُلفت صفيحة البوليستيرين جيدا لتلافي حدوث اي تلوث.

٣. حضنت الصفيحة ٢٤ ساعة بدرجة ٣٧ْم .

٤. غسلت الحفر بعد سكب الوسط للتخلص من الخلايا غير الملتصقة باستخدام المحلول الملحي الفسلجي لثلاث مرات للتخلص من الخلايا الغير ملتصقة ثم تترك لتجف.

٥. ثُبتت الأغشية الحيوية باستخدام الحرارة ٦٠ مْ لمدة نصف ساعة ثم صُبغت بالسفرانين ٠.١% (١٥٠ مايكرليتر \ حفرة) لمدة١٠-١٥ دقيقة.(Fonseca *et al*, 2004)

٦. غسلت الحفر باستخدام الماء المقطر ثلاث مرات.

٧. لوحظت الأغشية الحيوية المثبتة على الحفر والمصطبغة بالصبغة الحمراء وهو التقييم الأولي لتكوين الغشاء الحيوي وتم تصويرها .

٨. أستخلصت الصبغة من الحفر باستخدام محلول الأسيتون\ ايثانول (١:١).

٩. تم تصوير الحفر.

١٠. تم قياس الأمتصاصية باستخدام جهاز ELIZA Reader عند ٤٩٠ نانوميتر.

١١. حُسبت قيمة Cutoff وعلى أساسها حُددت القيم الموجبة والسالبة وكما يلي:

عندما يكون معدل الأمتصاصية للعينة مساوية لقيمة Cutoff تعتبر سالبة(غير مكونة للغشاء الحيوي)

عندما يكون معدل الأمتصاصية للعينة أعلى من قيمة Cutoff تعتبر موجبة ضعيفة

عندما يصل معدل الأمتصاصية للعينة ضعف قيمة Cutoff تعتبر موجبة متوسطة

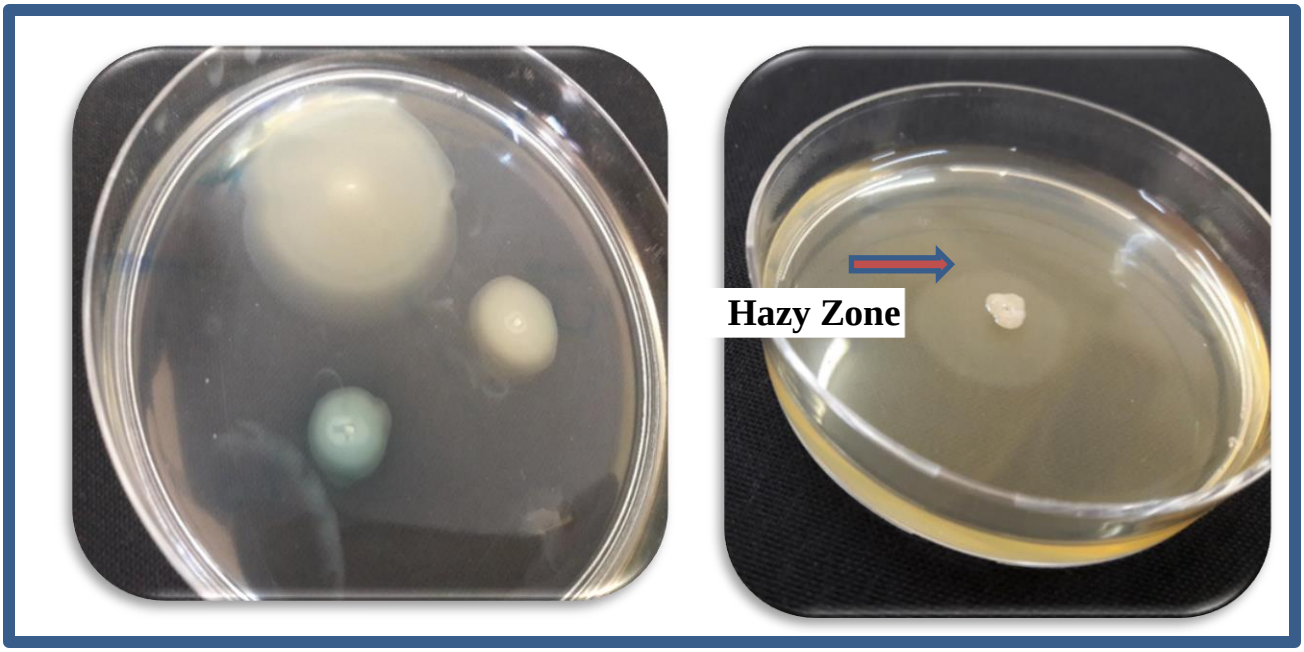
عندما يصل معدل الأمتصاصية للعينة أكثر من ٤ × قيمة Cutoff تعتبر موجبة قوية.

النتائج والمُناقشة

أثبتت الدراسة الحالية أمتلاك معظم العزلات المدروسة القابلية على القيام بنوع من الحركة تعرف بالحركة الأهتزازية Twitching Motility .على الرغم من تفاوت العزلات في قدرتها على إظهار هذه الحركة على الوسط شبه الصلب (١% أكار) إلا أن ٨٠% من العزلات المدروسة أبدت قدرتها على القيام بهذه الحركة بدلالة الطبقة الضبابية hazy zoon المتكونة في منطقة الوخز أسفل الوسط الصلب في قعر الطبق الجدول (١) الصورة (١-أ). كما أوضحت نتائج التحري عن الحركة السابحة في عزلات جرثومة *P.aeruginosa* أمتلاك جميع العزلات المدروسة القابلية على الحركة على الوسط شبه الصلب (٠.٣% أكار) وبأقطار تراوحت (٨-٣٨) ملم الصورة (١-ب). تعزى الحركة الأهتزازية الى أمتلاك عزلات هذا النوع لمايُعرف بشعيرات النوع الرابع Type IV pili (T4p) وتحديدا الصنف(T4ap) (Burrows, 2012; Leighton *et al*,2015) فيما تُعزى الحركة السابحة لأمتلاك عزلات هذا النوع لسوط واحد قطبي يُمكنه من الحركة ضمن الأوساط شبه الصلبة (Déziel *et al* 2001, Laverty *et al*,2013).

الجدول (١) أقطار الحركة الأهتزازية والحركة السابحة في عزلات النوع *P.aeruginosa* المدروسة

رقم العزلة	قطر الحركة الأهتزازية(ملم)	قطر الحركة السابحة (ملم)
١.	-ve	8
٢.	5	38
٣.	16	16
٤.	13	21
٥.	16	15
٦.	٢٠	13
٧.	7	10
٨.	-ve	10
٩.	14	10
١٠.	8	15



-أ- -ب-

الصورة (١) أنواع الحركة في جرثومة *P.aeruginosa* حيث: أ-الحركة الأهتزازية
ب- الحركة السابحة في بعض العزلات المدروسة

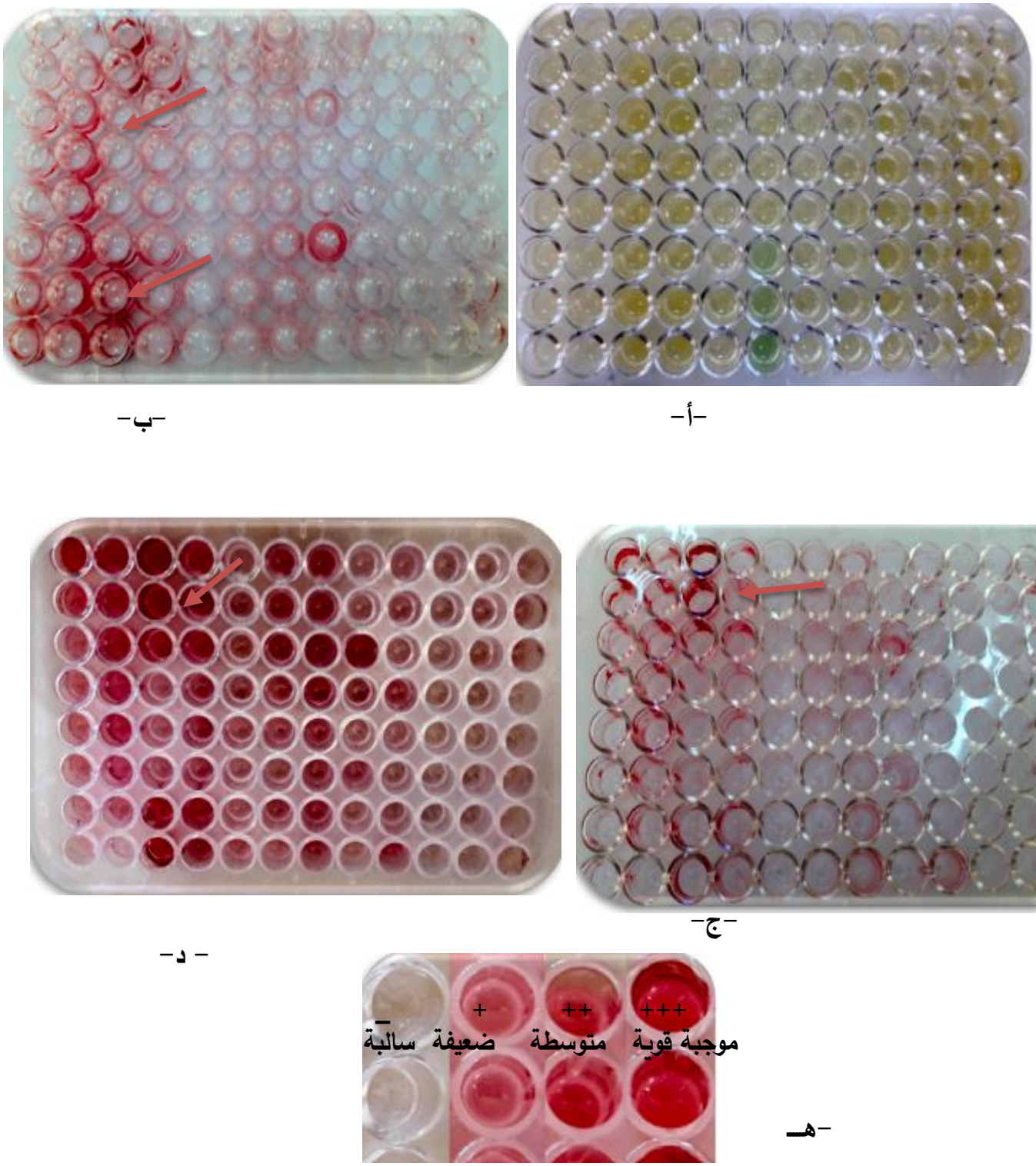
أُجري التقييم الكمي لإنتاج الغشاء الحيوي في جراثيم *P.aeruginosa* بطريقة TCP وأعتمدت الآلية المذكورة آنفا في طرق العمل في تقييم مدى قوة الغشاء الحيوي حيث حُسبت قيمة Cutoff والتي تعد الحد الفاصل بين النتائج الموجبة والسالبة وهي تُساوي (٠.١). ويوضح الجدول(٢) نتائج هذه الجرثومة فقيم الأمتصاصية التي تعد مكونة لغشاء حيوي ضعيف قد مثلت نسبة (٤٠%) بين جراثيم *P.aeruginosa* المدروسة أما القيم التي أعتبرت ذات قابلية متوسطه على إنتاج الغشاء الحيوي فقد شكلت ما نسبته 40% في حين قيم الأمتصاصية التي عدت ذات قابلية عالية لإنتاج الغشاء حيوي لوحظت في ٢٠% من العزلات المدروسة.يتضح من الجدول أن عزلات النوع *P.aeruginosa* أظهرت قابلية عالية للإلتصاق على حفر البوليستيرين. على الرغم من أن نسبة كبيرة من العزلات كانت ذات قيم متوسطة إلا أنها أخذت الحد الأعلى للقيمة المتوسطة ٠.٣-٠.٤ تقريبا (عزلات 1، 9 ، 10). وتفسر قابلية جراثيم *P.aeruginosa* على إنتاج هذا الشكل المتماسك للغشاء الحيوي الى عوامل عدة تساهم في بناء الغشاء الحيوي بمراحله المختلفة من بداية تكوينه الى حين الإنتهاء من التركيب ثلاثي الأبعاد. يعد أمتلاك الجرثومة لزوائد خارجية على سطحها أبرز وأهم عامل يساهم في جعل الجرثومة قادرة على التعلق على جدران السطح الساند كمرحلة أولى من مراحل تكوين الغشاء الحيوي. (Laverty *et al*,2013; Lee & Yoon,2017). أستنتج الباحثان (O'Toole and Kolter,1998) دور شعيرات النوع الرابع في عزلات النوع *P.aeruginosa* في لصق الخلايا مع بعضها وتكوين المستعمرات الدقيقة وكذلك أهمية السوط في إظهار الحركة والقابلية على التعلق على السطوح غير الحية.

الجدول (٢): نتائج التحري عن تكوين الأغشية الحيوية بطريقة TCP في عزلات *P.aeruginosa*

رقم العزلة	مصدر العزلة	قيمة الأمتصاصية عند 490nm	تقييم النتيجة
١.	إصابات جلدية (جروح – حروق – وأخرى)	٠.٣٩٦	موجبة متوسطة
٢.		٠.٤٥٣	موجبة قوية
٣.		٠.١٤٣	موجبة ضعيفة
٤.		٠.١٧٨	موجبة ضعيفة
٥.		٠.١٣٦	موجبة ضعيفة
٦.		٠.٦٨٥	موجبة قوية
٧.	دم	٠.٢٤٧	موجبة متوسطة
٨.		٠.١٥٠	موجبة ضعيفة
٩.	مسحة مهبلية	٠.٣١٠	موجبة متوسطة
١٠.	التهاب جيوب	٠.٤٠٧	موجبة متوسطة

الموجبة الكلية		الموجبة القوية		الموجبة المتوسطة		الموجبة الضعيفة		السالبة	
عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%
١٠	١٠٠	٢	٢٠	٤	٤٠	٤	٤٠	٠	٠

وبملاحظة و مقارنة النتائج في الجدولين (١ و٢) نجد أن جميع العزلات (١٠٠%) أمتلكت القابلية على تكوين الغشاء الحيوي وكان لها القدرة على القيام بالحركة السابحة فضلا عن أن بعض العزلات التي كونت أغشية حيوية متوسطة- قوية أبدت نشاطا واضحا على القيام بالحركة السابحة بدلالة أقطارها التي تراوحت (١٠- ٣٨ ملم). كما لوحظ أن هناك علاقة نسبية بين قابلية العزلات على القيام بالحركة الأهتزازية بدلالة أقطار الحركة التي تراوحت(٥-٢٠ملم) وبين درجة تكوينها للغشاء الحيوي فمثلا لوحظ أن أحدى العزلات (عزلة رقم ٨) التي لم تظهر القابلية على القيام بهذه الحركة أبدت قابلية ضعيفة على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة TCP بالمقابل تجد أن العزلة التي أمتلكت قابلية واضحة على الحركة الإهتزازية وهي عزلة رقم (٦) ، بقطر بلغ ٢سم (وهو أعلى قطر حركة) أعطت أعلى قيمة أمتصاصية(٠.٦٨٥) بطريقة TCP مما يدل على أهمية الحركة الأهتزازية والسابحة لهذه الجراثيم في دعم تكوين الغشاء الحيوي فيها.



الصورة (٢): نتائج دراسة الغشاء الحيوي في بعض عزلات *P.aeruginosa* بطريقة TCP حيث:أ:وسط TSB ملقح بعزلات النوع *P.aeruginosa* بعمر ٢٤ ساعة ،ب،ج: الأغشية الحيوية مصطبغة بالسفرانين تظهر ملتصقة على جدران الحفر .د:إذابة الصبغة بالإيثانول:اسيتون ، ه:النتائج الموجبة القوية، المتوسطة ، الضعيفة والسيطرة السالبة.

Referencse المصادر

Al-Wrafy F., Brzozowska E., Sabina Górska S. and Gamian A. (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* – the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *J. Postepy Hig Med Dosw* (online), 2016; 70:78-91.

Brooks G., Caroll K., Butel J. Morse S. Mietzner T. (2013). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology 26th ed. McGraw-Hill Companies, Inc.USA.

Burrows L.L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *J. Annu. Rev. Microbiol.* 66:493–520.

Déziel E., Comeau Y. and Villemur R. (2001). Initiation of Biofilm Formation by Motilities Swimming, Swarming, and Twitching Adherent Phenotypic Variants Deficient in with Emergence of Hyperpiliated and Highly *Pseudomonas aeruginosa* 57RP Correlates. *J. Bacteriol.*, 183(4):1195-1204.

Fischer S.Klockgether J., Losada P.,Chouvarine P.,Cramer N., Davenport C., Dethlefsen S.,Dorda M., Goesmann A., Hilker R.,Mielke S, Schönfelder T.,Suerbaum S., Türk O.,Woltemate S.,Wiehlmann L. and Tümmler B. (2016). Intraclonal genome diversity of the major *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14. *J. Environ.*

aeruginosa as a pathogen [version 1; referees: 3 approved]. *J. F1000 Faculty Rev*. 1261 (doi: 10.12688/f1000research.10506. 1).

Laverty G., Gorman L.G., and Gilmore, B. F. (2013). Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. J.Fut. Microbial. , 8(4), 509-24.

Lee K. and Yoon S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J. Microbiol. Biotechnol*. (2017). 27(6): 1053–1064.

Leighton T., Buensuceso R., Howell P. and Burrows L.(2015). *Microbiol. Reports*.(2016). 8(2):227–234.

Fonseca A., Extremina C.,A. F. Fonseca A and Sousa J.(2004). Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/ tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Med. Microbiol.* (2004). 53: 903–910.

Ha D. and O'Toole G. (2015). c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: A *Pseudomonas aeruginosa* review. *J. Microbiol Spectr*. 3(2): . doi:10.1128/microbiolspec

Klockgether J.and Tümmler B.(2017). Recent advances in understanding *Pseudomonas*

Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *J. Environ. Microbiol.*17(11), 4148–4163.

Nester E., Anderson D., Roberts, jr. and Nester M. (2007). Microbiology A Human Prespective 5th ed. McGraw-Hill companies. New York, America.

O'Toole G.A. and Kolter R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Mol. Microbiol.* 30(2), 295–304.

Stepanovic S.,Vukovic D., Dakic I., Savic B., Sˇvabic´-Vlahovic M.(2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*. 40 (2000) 175–179.