عزل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* واختبار قابليتها على مقاومة المضاد الحيوي الامبسيلين والكشف عن جين *oprL*

م. إيمان عبعوب مخيفي
قسم علوم الحياة ـ كلية العلوم ـ جامعة البصرة
emanaboob@yahoo.com

ملخص

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* , إذ تم الحصول على ست عزلات من تربة مدينة البصرة , أظهرت النتائج إن نسبة مقاومة العزلات للمضادات الحيوية Ampicillin (10µg) Nitrofurantion(300 µg), Chloramphenicol (30µg) بلغت 100% وكانت العزلات حساسة للمضادات الحيوي(Norfloxacin(10µg. تم الكشف عن جين *oprL* في بكتريا *P. aeruginosa* بواسطة تقنية PCR وله دور قوي ومهم في مقاومة المضاد الحيوي Ampicillin ويبلغ حجمه 504bp

الكلمات المفتاحية : عزل البكتريا , تشخيصها , عزل الدنا , المضادات الحيوية , الكشف عن *oprL*

1 - المقدمة

جميع أنواع وسلالات *P. aeruginosa* هي عصيات سالبة لصبغة كرام , هناك عدد كبير يمكن أن تنتج exopolysaccharides التي تعرف طبقات الوحل وإفراز exopolysaccharide يجعل من الصعب على البكتريا أن تحطم عن طريق خلايا الدم البيضاء. إن إنتاج الوحل يسهم أيضا في استعمار بيوفيلم التي يصعب إزالتها من السطوح . تعتبر بكتيريا هوائيةَ وتسبب أمراض انتهازية للإنسان ، أيضاً تسبب أمراض انتهازية للنباتات [1].

بكتيريا *P. aeruginosa* قادرة على النمو في التربة ، حيث أنَّها تعرف بالكائنات الحيّة المجهرية التي تستعمل الهايدروكربونِ كمصدر للطاقة *P. aeruginosa* تعُودُ إلى العائلةِ Pseudomonadaceae, وتمتاز بأنها تنتجُ أنواع من المستعمرات , الطبيعية تَعْزلُ مِنْ التربةِ أَو الماءِ ، وتكون بشكل مستعمرة خشنة rough colony إما العينات السريرية عُموماً يمكن أن تنتج نوعين من المستعمرات الملساء أو الناعمة [2].

أحد هذه المستعمرات يشبه قَلّى بيضِfried-egg إما النوع الآخر يكون بشكل طبقة مخاطية mucoid، الذي يُنْسَبُ إلى إنتاجِ هلام alginate. المستعمرات الناعمة والمخاطية لها دور في الاستعمار والشدّةِ .*P. aeruginosa* يمكن أن تنتج نوعان مِنْ الصبغات القابلة للذوبانِ ، الصبغة المشعة pyoverdin والصبغة الزرقاء pyocyanin [3]. *P. aeruginosa* هي بكتريا انتهازية تُصيبُ المنطقةَ الرئويةَ والمنطقة البولية والحروق والجروح وتُسبّبُ إصاباتَ الدمِ ومشهورة بمقاومتِها إلى المضادات الحيوية لذا تسبب أمراض خطيرة ومُخيفة جداً. إنّ للبكتيريا مقاومةُ طبيعية إلى العديد مِنْ المضادات الحيوية بسبب مانعِ النفاذية الغشائي الخارجي outer membrane LPS

الذي لا يسمح بمرور المضادات ، ميلها لاستعمار السطوحِ في الطبقة الهلامية (الكبسولة) biofilm بشكل يَجْعلُ الخلايا محصنة ضدّ مضادات التجمعَّاتِ الحيوية العلاجّيةِ , وتعتبر التربة البيئة الطبيعيةِ لنمو بكتريا *P.aeruginosa* [4] ولأهمية هذه البكتريا فقد استهدفت الدراسة إلى عزل وتشخيص بكتريا *P. aeruginosa* من تربة محافظة البصرة ودراسة مقاومتها للمضادات الحيوية ومن ضمنها الامبسيلين ثم استخدام تقنية PCR للكشف عن جين *oprL* المقاوم للمضاد الحيوي الامبسيلين.

2 - المواد وطرائق العمل

1 - وسط عزل الجرثومة

استخدم وسط Pseudomonase Agar Base (PAB) لعزل الجرثومة *P.aeruginosa* [5].

2 - جمع العينات

تم الحصول على ترب من الزبير والتنومة من 3 مواقع , وقد جمعت النماذج من سطح 1 سم إلى عمق 5 سم وحفظها في أكياس من البولي اثيلين

3- زرع العينات

تتلخص هذه الطريقة بإضافة 1 غرام من عينة التربة إلى دورق زجاجي سعة 100 مل يحتوي على 10 مل من ماء مقطر معقم . ورج العالق باستخدام الهزاز الكهربائي لمدة (2-1) ساعة ثم نقل 1 مل من العالق بوساطة ماصة معقمة إلى 9 مل من ماء مقطر معقم في أنابيب معقمة لغرض الحصول على تخافيف عشرية , بعد ذلك نقل 1 مل من الأنابيب المحتوية على تخافيف 10^{-7},10^{-6},10^{-5},10^{-4} بوساطة ماصة معقمة ووضع إلى إطباق بتري حاوية على وسط العزل Pseudomonase Agar Base (PAB)وزرعت بطريقة النشر بوساطة L-Shape وحضنت الإطباق بدرجة حرارة 30 م° لمدة 28-24 ساعة [5].

4 - فحص العينات وتشخيصها

تم الفحص الأولي لإطباق المزروعة بعد 28-24 ساعة من الحضن وتم إجراء الفحص ألمجهري بعد تصبغيها بصبغة كرام إذ لوحظ إن الخلايا مفردة ,عصوية وسالبة لصبغة كرام. بعد ذلك نقلت المستعمرات المختارة إلى وسط النمو Nutrient agar وحضنت بدرجة 30 م° لمدة 24 ساعة لكي يتم تشخيصها وتسجيل الصفات المظهرية للمستعمرات واختبار قابليتها على مقاومة المضادات الحيوية [6].

5 - تشخيص أنواع الجنس *P. aeruginosa*

تم تشخيص أنواع الجنس *P. aeruginosa* اعتمادا على Bergeys Manual of Determination Bacteriology [6].

6 - مقاومة المضادات الحيوية

استخدمت طريقة الأقراص لاختبار مقاومة البكتريا على وسط Muller Hinton Agar[1].

7 - عزل الحامض النووي DNA من جرثومة *P. aeruginosa*

تم عزل الحامض النووي DNA حسب طريقة [7].

8 - الكشف عن جين *oprL* المقاوم للمضاد الحيوي الامبسلين في جرثومة *P. aeruginosa*

مواد التفاعل المستخدمة في الكشف عن *oprL* بواسطة جهاز PCR هي

green master mix 25µl , primer forward (5' → 3') 2 µl ATGGAAATGCTGAAATTCGGC, primer reverse (3' → 5') 2 µl برنامجCTTCTTCAGCTCGACGCGACG, DNA 10 µl and nuclease water التفاعل المستخدم في الكشف عن جين *oprL*

عدد الدورات	الزمن(بالدقائق)	درجة الحرارة	رقم الخطوة
1	5	96	1
40	1	96	2
40	1	55	3
40	1	72	4
1	10	72	5

[7].

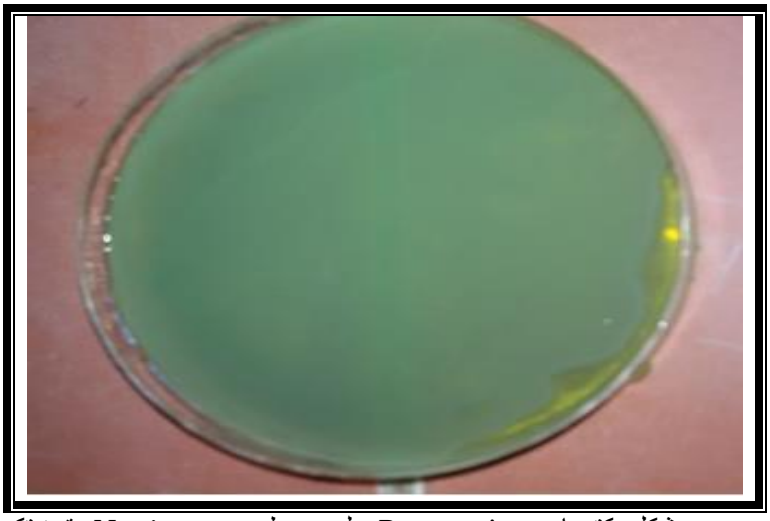
3 - النتائج

1 - عزل جنس *P. aeruginosa*

تم الحصول على ست عزلات تابعة لجرثومة *P. aeruginosa* من ترب الزبير و التنومة . شخصت اعتمادا على مفاتيح التشخيص [6].

2 - الصفات الزرعية والمظهرية لجرثومة *P. aeruginosa*

أظهرت مستعمرات الجرثومة القدرة على النمو بشكل متميز على وسط Nutrient agar إذ بدأت بتكوين صبغة ذات لون اخضر شكل (1) .



شكل (1) :يوضح شكل بكتريا *P. aeruginosa* على وسط Nutrient agar بقوة تكبير 4.1X

3 - الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص جرثومة *P. aeruginosa*

تشير النتائج الموضحة في جدول (1) ظهور الصفات الكيموحيوية لعزلات*P. aeruginosa*

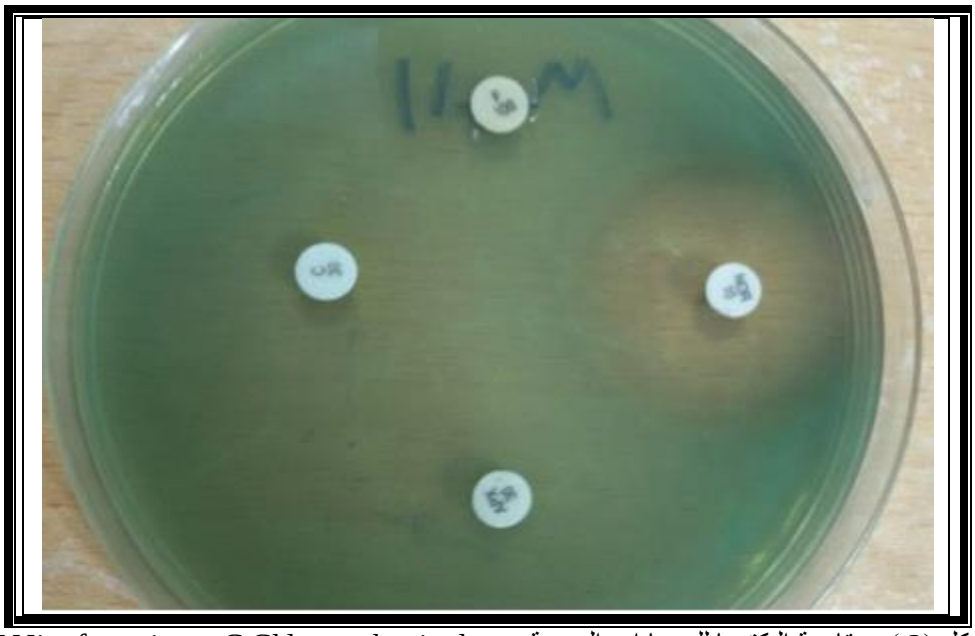
جدول (1) : الصفات الكيموحيوية لتصنيف *P. aeruginosa*

الصفات الحيوية	*P. aeruginosa*
صبغة كرام	-
نموها بدرجة 5°	-
نموها بدرجة 42°	+
اختبار الاوكسديز	+
اختبار الاندول	–
الكليسرول	+
فركتوز	+
ايثانول	+
اختزال النترات	+
اختبار الكاتليز	+

اختبار السترات	+
تحلل الكازئين	+
تحلل النشا	-
اختبار اليوريا	-
تحلل الجيلاتنين	+
تحلل الارجنينين	+

4 - اختبار قابلية بكتريا *P. aeruginosa* على مقاومة المضاد الحيوي الامبسلين

أظهرت النتائج أن نسبة مقاومة العزلات للمضادات الحيوي(Ampicillin (10µg Nitrofurantion(300 µg) , Chloramphenicol (30µg) بلغت 100% وكانت العزلات حساسة للمضادات الحيوي Norfloxacin(10µg). شكل (2)



شكل (2) : مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية , C:Chloramphenicol , F:Nitrofurantion APX:Ampicillin على وسط Muller Hinton و حساسيتها للمضاد الحيوي NOR:Norfloxacin

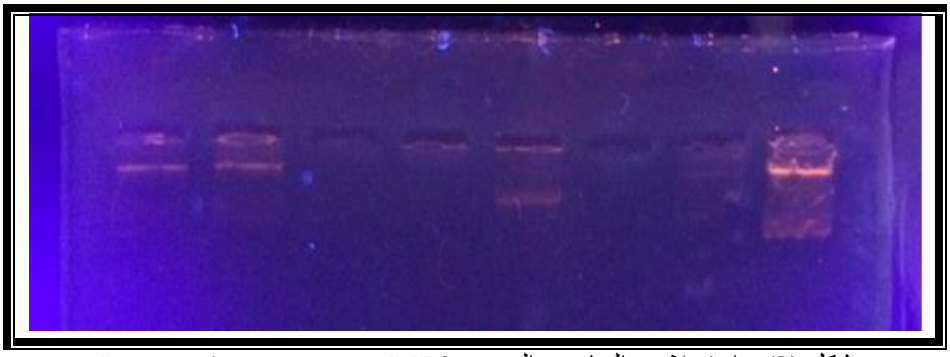
جدول (2) : مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية Ampicillin و Nitrofurantion و ChloramphenicoI حيث تمتاز بمقاومتها العالية لمجموعة ألبيتا لاكتام

المضـــــاد الحيـــــــوي	عدد العزلات	المقاوم	التأثير	قطر التثبيط (ملم)
Nitrofurantion	6	6	R	0
ChioramphenicoI	6	6	R	0
Norfloxacin	6	0	S	30
Ampicillin	6	6	R	0

حيث يرمز R إلى Resistance, S إلى Sensitive

5 - استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA

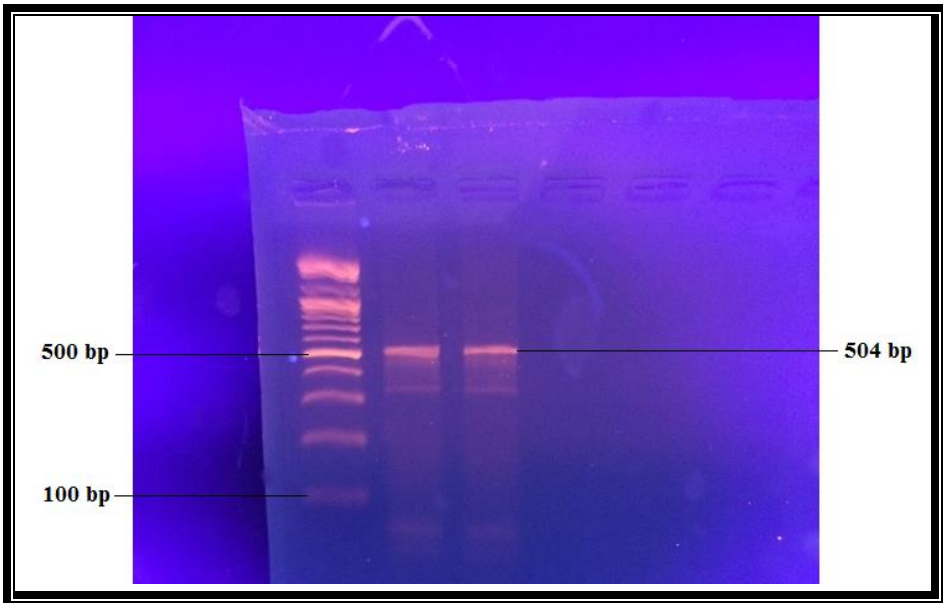
تم استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين من جينوم *P.aeruginosa* وكما موضح في الشكل (3).



شكل (3) : استخلاص الحامض النووي DNAمن جينوم *P. aeruginosa*

6 - الكشف عن *oprL* في بكتريا *P. aeruginosa* بوساطة تقنية PCR

أظهرت نتائج تضخيم البادئ الخاص ب *oprL* باستخدام تقنية PCR وجوده في بكتريا *P. aeruginosa* المقاومة للمضاد الحيوي الامبسيلين . ان *oprL* ميز باستخدام الاكاروز بتركيز 2 % وفولتية 70 فولت ونتيجة تضخيم *oprL* كان حجمه 504bp . شكل (4)



شكل (4) : تضخيم جين *oprL* في بكتريا *P. aeruginosa* باستخدام الاكاروز بتركيز 2 % وفولتية 70 فولت

4 - المناقشة

أوضحت النتائج ألمبينه في الشكل (1) ان *P. aeruginosa* منتجة لصبغة البكتيرية الخضراء المزرقة وهي عبارة عن مزيج من عمليتي ايض في البكتريا وهما بايوسيانين (الأزرق) وبايروفيردين (الأخضر) وموجودة في تربة البصرة باعتبارها كائنات متباينة التغذية heterotrophs وهي تأخذ احتياجاتها من المادة العضوية الموجودة في التربة . فعندما يموت النبات أو الحيوان تتحرر مكوناته إلى البيئة على هيئة عناصر غذائية وطاقة بواسطة الفعالية التحليلية للإحياء المهجرية حيث تعمل على تحليل هذه الأجسام إلى جزيئاتها الأساسية مثل ثاني اوكسيد الكاربون والماء والطاقة الحرارية [8] .إن وجودها ونموها في التربة يعتمد على وجود العناصر الغذائية جاهزة وان زيادة كميتها بإضافة الأسمدة العضوية يؤدي إلى زيادة إعدادها في التربة بصورة ملحوظة كونها جراثيم سلبية الغرام [1].

وقد أعطت نتائج التشخيص المبينة في جدول (1) بأنها مطابقة للنوع المذكور في موسوعة بيركي والبحوث الحديثة [6].

أوضحت النتائج ألمبينه في جدول (2) إن للبكتريا مقاومة طبيعية للبنسلين وغالبية بيتا ذات الصلة اكتام للمضادات الحيوية، إن سبب المقاومة هو نتيجة لاحتواء جدار الخلية على s. porin وبسبب وجود مضخات الهروب المسئولة عن ضخ بعض المضادات الحيوية خارج الخلية [9].

أشارت نتائج الترحيل الكهربائي الموضحة في الشكل (4) بان جين *oprL* ذو حجم متوسط يبلغ حجمه 504bp وموجود في جنس *P. aeruginosa* وهو مسؤول عن مقاومة الجرثومة للمضاد

الحيوي الامبسيلين . إن البكتريا شديدة الانتهازية واحدة من الخصائص الأكثر إثارة للقلق وتتمثل في مدى قابليتها على مقاومة عالية لعدد من المضادات هذه تعزى إلى اتخاذ إجراءات متضافرة من التشفير إلى الجينات المقاومة للمضادات الحيوية مثل جين *oprL* [7].

لقد أشار[10] إن للبكتريا دور في إحداث تغير في المضاد الحيوي، على سبيل المثال تقوم البكتيريا بإنتاج أنزيمات تسبب تكسراً في المضاد الحيوي، وبالتالي تؤدي إلى عدم فعالية الدواء وتثبيطه أوقد تحدث البكتريا تغييراً أو تطويراً في تركيب خليتها فتضلل المضاد الحيوي ولا تصبح هدفاً له أو عن طريق تغيير الطّريق الأيضيّ عن طريق تكوين مركب بارا أمينو بنزويك أسيد PABA هو عامل مهمّ لصنع حمض الفوليك والأحماض النّوويّة لدى البكتيريا. وفي بعض الأحيان تقوم البكتيريا بإفراز غشاء جديد من البروتينات يمنع دخول المضاد الحيوي إليها والتّقليل من تراكم المضادّ الحيويّ عن طريق التّقليل من نفاذيّة المضادّ الحيويّ إلى داخل الخليّة أو تسريع التّدفّق النّشط (الضّخّ إلى المحيط) للأدوية عبر الغشاء الخلويّ البكتيريّ[11].

تبين إن بكتريا *P. aeruginosa* لها إمكانية إنتاج التشفير إلى إنزيمات معينه وهذه الإنزيمات تعطيها صفه المقاومة لبعض المضادات من هذه الإنزيمات البيتالاكتميز حيث تقوم هذه الإنزيمات بتثبيط فعالية بعض المضادات مثل المضادات من نوع البيتالاكتام[12] ومن خلال أجراء اختبار المضادات تبين إن هذه البكتريا تكون حساسة للمضاد الحيوي Norfloxacin وتتكون منطقة تثبيط حول المضاد والتي تبين مدى تأثير هذا المضاد .بينما تكون مقاومه لل Ampicillin بسبب الإنزيمات التي تنتجها هذه البكتريا بحيث لا تتكون مناطق تثبيط وتبقى البكتريا حيه وفعاله حول هذه المناطق.وهذا يبين إن Ampicillin لا يمكن اعتباره علاج للإمراض التي تسببها بكتريا *P. aeruginosa*[13].

5 - المصادر

1-Hassett, D.; Cuppoletti ,J. Trapnell, B.; Lymar, S.; Rowe, J. Yoon, Hilliard ,G.; Parvatiyar, K.; Kamani, M.; Wozniak ,D.;Hwang , S.McDermott ,T. and Ochsner, U (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies. Adv Drug Deliv *Rev* and drug targets,54 (11):43-142

2- Comelis ,P.(2008).*Pseudomonas* genomics and molecular biology.Caister Academic press . 1: 233-241

3- Niederman ,M. S. (2001). Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care. Critical Care Med. 29: 14-120.

4-Amutha,R; Padmakrishnan,M.; Murugan,T. and M.P. Renuga , M.(2009). Studies on multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from pediatric population with special reference to extended spectrum beta lactamase. Indian J.of Scie. And echno.2(11): 0974- 6846

5-Al-Hinai1, A.H ; A.M. Al-Sadi, A.M ; S.N. Al-Bahry, S.N. ; Mothershaw , A.S.; Al-Said., F.A.; Al-Harthi, S.A. and Deadman M.L.(2010).Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* with antagonistic activity against *Pythium aphanideratum*.J. of plant pathology ,92(3):653-660

6-William ,B. W.; Paul ,D. V.; George, Bacteriology M. G.; Dorothy, J.; Noel, R. K. (2009) . Bergeys Manual of Determination .3(2)

7- Abdullahi, R.; Lihan, S.; Carlos, B.; Bilung, M; Mikal ,M. and Collick. (2013). Detection of *opr*L gene and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from aquaculture environment. Euro. J. ofExperimental Biology, 3(6):148-152

8- Fridkin ,S.; and Gaynes ,R. (1999). Antimicrobial resistance in intensive care units. Clinical Chest Med.20: 303-316.

9-Mehta, M. Punia ,J. and Joshi ,R. (2001) .Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various clinical specimen - aretrospective study.Indian J. Med. Microbiol. 19(4):232.

10-Navaneeth ,B .; Sridaran , D.; Sahay, D.and Belwadi ,M.(2002).A preliminary study on metallo –beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients. Indian J. Med. Res. 116: 264-267.

11- Paladino, J .A.; Sunderlin , J.L .; Price ,C.S. and Schentag ,J.(2002). Economic consequences of antimicrobial resistance. Surg. Infect.3: 259-267.

12-Jarlier ,V.; Nicolas, M. and Fourneir ,G. (1998) .Extended spectrum β-

lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev. Infect. Dis.10: 867-878.

13- Castanheira ,M.; Toleman, M. and Jones, R. (2004).Molecular characterization of beta-lactamase gene,blagim-I, encoding a new subclass of metallo-betalactamase. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 48:4564-4661.

Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* and assay ability of Ampicillin antibiotic for detection *oprL* gene

Eman Aboob Mukhaifi
Dep. Biology - College of Science
University of Basrah
emanaboob@yahoo.com

Abstract

The present study included isolation and identification of *Pseudomonas aeruginos*a from Basrah soils . six isolates obtained from Basrah soils . The results appeared resistance for Ampicillin(10 µg), Nitrofurantion(300µg), whereas sensitive to Norfloxacin Chloramphenicol (30µg) were as 100% (10µg). Detection of *oprL* in *P.aeruginos*a by BCR technology, that has important and potential role in Ampicillin resistant as molecular weight 504bp

Keywords: Isolation of bacteria, identification, antibiotics, isolation of DNA, detection of *oprL* gene.