تأثير اليوريا و الايثانول على ظـاهرة الأنثيال فـي عـزلـة محليه لبكتريا *Proteus mirabilis*

د. سهام جاسم الكعبي / مدرس أنعام جواد مطرود / مدرس مساعد
جامعة الكوفة /كلية التربية للبنات ـ علوم الحياة

الخلاصة :

عزلت بكتريا *Proteus mirabilis* من عينات إدرار من مستشفى الزهـــــراء للولادة والاطفال / النجف الاشرف ، واجريت الاختبارات الكيموحيويه للتاكد من تشخيصها . نميت العزلة على وسط الاكار المغذي Nutrient Agar والمضاف اليه (١% ، ٢% ، ٣%) من اليوريا ، كما زرعت العزلة على الوسط نفسه وعدت كسيطرة ، ثم نميت على الوسط نفسه بعد وضع بضع قطرات من الكحول ٩٠% في غطاء الطبق لدراسة تاثير اليوريا والكحول على ظاهرة الانثيـال Swarming التي تكونها هذه البكتريا ، واظهرت النتائج انخفاض معنوي بمستوى (P < ٠.٠٥) في معدل قطر دائرة الانثيال المتكونة عند (٢% ،٣%)لتراكيز اليوريا مقارنة بمعاملة السيطرة في حين لم تظهر فرقا معنويا في معدل قطر هذه الدائرة في الاطباق الحاوية على الكحول مقارنة بالسيطرة .

Effect of urea and ethanol on swarming phenomenon in local isolate of *Proteus mirabilis.*

Summary :

Proteus mirabilis **was isolated from urine specimens collected from patient admitted to Al-Zahra Maternity and Child Teaching Hospital in Al-Najif Al-Ashraf / Iraq . This isolate was diagnosed by its cultural characteristics and biochemical tests , after that , it was cultured on Nutrient agar which contain concentrations of urea (1%,2%,3%) . Isolate was cultured on Nutrient agar only as a control and then was cultured in a nutrient agar few drops of (90%) ethanol was added on the cover of cultured Petri dishes .The results showed a significant reduction in the diameter of the swarming circle in plates to which urea was added (p< 0.05) . While those which are used as a control and those with ethanol showed no reduction in swarming circle.**

المقدمة :

تعد بكتريا *Proteus mirabilis* من العصيات اللاهوائية الاختيارية السالبة لصبغة كرام وتقع ضمن العائلة المعوية Enterobacteriaceae (Holt *et al.*, 1994) ، كما انها متوطنة بصورة طبيعية في الامعاء ، وهي انتهازية ذات نمو هالي Zonal growth (Iwalokun and Akinwun , 2002). تمتلك البكتيريا العديد من عوامل الضراوة التي تتضمن انتاج عدد من الانزيمات مثل الحال لليوريا Urease ، الحال للبروتين Protease ، الحال للدم Haemolysin بروتين الفلاجيلين Flagellin المسؤول عن تكوين الاسواط (Shwv ,2000)،ولهذه البكتيريا ظاهرة مميزة هي الانثيال swarming على بعض الاوساط الصلبة وهذه الظاهرة ناتجة عن هجرة مجموعة من الخلايا البكتيرية بعد تمايزها في الوسط مكونة طبقة رقيقة لحلقات ممتدة المركز (AL-mansouri ,2005)، تعمل هذه الطبقة على تغطية الوسط الزرعي بكامله تقريبا وبالتالي تغطي بقية انواع البكتريا ان وجدت في العينات السريرية المعزولة منها ومن ثم صعوبة عزل ممرضات اخرى قد تكون مرافقة لتواجد هذه البكتيريا في نفس العينة (Subbannayya and Udayalaxmi , 2005) . الامر الذي يساهم في نشر سلالات ذات مقاومة للمضادات الحياتية المتعددة فيؤدي ذلك الى فشل معالجة الاصابات الناتجة عن مسببات بكتيرية متعددة . وقد اوضح Allison *et al.*(1992) الى ان مئات الاسواط تبنى من مادة متعددة السكريد الحامضية اللزجة والتي تساعد على حركة الخلايا المنثالة Swarm cells خلال سطح االوسط الصلب ، وان ظاهرة الانثيال ممكن ان تحدث في الاوساط السائلة وحتى داخل الجسم الحي *in vivo* .

تسبب بكتيريا *Proteus mirabilis* امراض عديدة تأتي في مقدمتها التهاب المسالك البولية Urinary tract infection ،ان قابلية هذه البكتيريا على غزو ومهاجمة الانسجة الطلائية للجهاز البولي والالتصاق والتوسع في مكان الاصابة يعود الى قدرة هذه البكتيريا على تكوين ظاهرة الانثيال ، حيث ان الخلايا النشطة لبكتيريا *Proteus* sp. تتمايز الى خلايا ذات أهداب Fimbria ومتعددة الاسواط hyper flagellated مما يساعد في الهجرة والتوسع في نسيج المضيف (Liaw *et al.*, 2000 , Latta *et al.* ,1998) .

اجري هذا البحث لمعرفة دور اليوريا في تثبيط ظاهرة الانثيال وللأستفادة من ذلك لاحقا في عزل الأنواع البكتيرية المرضية المرافقة لوجود بكتيريا *Proteus mirabilis* في المستنبتات الزرعية في المختبرات .

المواد وطرائق العمل :

الاختبارات التشخيصية التأكيدية لنوع البكتيريا :

جمعت 5 عزلات لبكتريا *Proteus mirabilis* من عينات أدرار من مستشفى الزهراء للولادة والأطفال في النجف الأشرف ، وقد تم اجراء عدد من الاختبارات التشخيصية للتأكد من نوع البكتيريا موضع الدراسة والتي شملت ما يلي:

١- الخصائص الزرعية والمظهرية Culture and phenotype

زرعت البكتيريا على وسط Blood agar لدراسة أشكال المستعمرات النامية وخصائصها الزرعية من حيث النمو وعدمه ودراسة صفاتها المظهرية بما فيها الشكل . اذ لوحظ نمو المستعمرات خلال (24-48)ساعة على وسط Blood agar ووسط Nutrient agar .

٢- الخصائص المجهرية Microscopic characters .

تم عمل مسحة على شريحة زجاجية وصبغت بصبغة كرام Gram stain وشوهدت تحت المجهر .

٣- الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests :

اجريت مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية كما جاء في MacFaddin (2000) لتشخيص العزلات البكتيرية . ولغرض التاكد من تشخيص البكتريا على مستوى النوع اخضعت العزلات قيد الدراسة الى فحص Api-20E على وفق ما ورد عن الشركة المصنعة (BioMarieux) الفرنسية ، وهو نظام كيميائي حياتي لتشخيص انواع البكتريا العائدة للعائلة المعوية .

اختيار العزلة الكفوءة :

اختيرت عزلة واحدة والتي اعطت افضل نمو و اوسع قطر انثيال Swarming ، ثم اجريت بقية التجارب التالية عليها .

اختبار الحساسية للمضادات الحياتية :-

نفذت على وفق طريقة (1966). Baure *et al* ، اذ استخدمت تسعة من المضادات الحياتية شملت Amoxicillin , Ampicillin , Cefixime , Cefotaxim , Chloramphenicol, Ciprofloxcin , Clarthromycin , Gentamicin , Penicillin ، دونت النتائج بقياس اقطار التثبيط حول كل قرص وقورنت مع اقطار التثبيط القياسية حسب ما جاء في (NCCLs , 2003) .

اختبار انتاج انزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase .

اجري الاختبار على وفق ما ورد في Bush *et al.*(1995) والمسماة طريقة اليود القياسية السريعة Rapid iodometric method .

تحضير الوسط الزرعي Medium preparation

حضر الوسط الزرعي Nutrient agar (Oxoid البريطانية) حسب تعليمات الشركة المصنعة حيث أضيف للوسط الزرعي مادة اليوريا بنسب (1% ،2 % ،3 %) وبتراكيز نهائية لمعرفة مدى تأثير مادة اليوريا في تثبيط ظاهرة الانثيالswarming في بكتيريا *Proteus mirabilis* (Iwalokun *et al.*,2004) .

تلقيح الوسط Medium inoculation

تم عمل مستنبت ثانوي للبكتيريا قيد الدراسة بأستخدام الوسط الزرعي السائل Trypticase Soya broth وحضن لمدة 24 ساعة بعد ذلك نقل منه 1مايكروليتر بأستخدام ماصة دقيقة Micropipette الى مركز الأطباق الحاوية على الوسط الزرعي المحضر سابقا ، من جهة أخرى نقلت نفس الكمية الى أطباق حاوية على الوسط الزرعي Nutrient agar . ثم أضيف الى غطاء الطبق قطرات قليلة من مادة الكحول الأثيلي 90% (Hernandez *et al.*, 1999) ، كما زرع 1مايكروليتر من المزروع البكتيري في أطباق خالية من اليوريا والكحول وعلى نفس مادة الوسط الزرعي المستخدم وعدت أطباق سيطرة Control ثم حضنت جميع الأطباق بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24ساعة ، بعدها تم قياس قطر دائرة النمو الناتجة بالمليمتر . وثبتت النتائج بجدول واجري التحليل الاحصائي باستعمال اختبار ANOVA one way كما استعمل Least significant differences (LSD) للبحث

عن وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة وعلى مستوى معنوية (5%) ثبتت النتائج بشكل (المعدل ± الانحراف المعياري) .

النتائج والمناقشة :

اظهرت نتائج الاختبارات التاكيدية لعزلات بكتريا *Proteus mirabilis* نموها بحرارة 37مْ على وسطي Blood agar ووسط Nutrient agar وبشكل مستعمرات ذات لون ابيض الى كريمي شفاف ومكونة حلقات متحدة المركزنتيجة لظاهرة الانثيال و متجهة نحو حافة الطبق وغير محللة للدم ، كما بدت البكتريا تحت المجهر بانها عصيات سالبة لملون گرام ، جاءت نتائج الفحوصات الكيموحيوية مطابقة لما جاء في (MacFaddin , 2000) كما تم التاكد من تشخيص البكتريا باستخدام نظام Api-20 E . اختيرت افضل العزلات في النمو والتي اعطت نتائج فحوصات مثالية فضلا عن انتاجها لقطر دائرة انثيال اوسع من بقية العزلات التي تم الحصول عليها وبعد ان اخضعت العزلة الى اختبار حساسيتها للمضادات الحياتية تم الحصول على النتائج الموضحة بالجدول رقم (١) . و يتضح ان العزلة التي تم الحصول عليها كانت مقاومة لاكثر من نصف عدد المضادات الحياتية المستخدمة ، وانها كانت منتجة لانزيم البيتا لاكتاميز β – Lactamase وهذا ما يؤكد مقاومتها لاربعه من المضادات الحياتيه الحاويه على حلقة البيتا لاكتام وهي (Ampicillin, Amoxicillin, Penicillin , Cefixime) .

بينت دراسة قام بها (Iwalokun *et al* ., 2003) الى ان سلالات بكتريا *Proteus* المقاومة لل Amoxicillin و Nitrofurantion اختلفت في مدى تاثر ظاهرة الانثيال فيها عند استخدام تركيز 1.25 % من اليوريا وان انتاج السلالات لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف لاعلاقة له بسعة دائرة الانثيال فيها . لقد اشار Senior (1998) الى ان المدة التي تستغرقها ظاهرة الانثيال ومساحة المنطقة الناتجة عنها تتغاير تبعا للسلالة البكتيرية وظروف الزرع ، كما لاحظ (Subbannayya and Udayalaxmi 2005) ان استخدام وسط مسحوق السمك المهروس الصلب Fishmeal agar والمضاف اليه 0.5% من NaCl يؤدي الى انعدام ظاهرة الانثيال في بكتريا *P. mirabilis* .

اوضحت نتائج زراعة البكتريا على وسط Nutrient agar والمضاف اليه (١% ، ٢% ، ٣%) يوريا وبتراكيز نهائية ان اعلى معدل لقطر دائرة الانثيال(Swarming) بلغ (١٨.٤٢) ملم ثم انخفضت هذه النسبة تدريجيا مع ارتفاع تركيز اليوريا المستخدم اذ كانت (١٣.٣٥) ملم و(٦.٥) ملم عند التركيزين ٢% و٣% على التوالي ويتضح من الجدول رقم (٢) ان هناك فروق معنوية ($P < ٠.٠٥$) بين هاذين التركيزين ومعاملة السيطرة وكما موضح في شكل رقم (١) ، وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصل اليه Iwalokun *et al* ., (2003) من ان معدل قطر دائرة الانثيال تقل بازدياد نسبة تركيز مادة اليوريا المستخدمة . كما ان اليوريا تجعل من الوسط الزرعي قاعديا مما يؤثر على اسواط هذه البكتريا وبالتالي تحد من حركتها فوق السطوح الصلبة (Senior , 1998) . في حين أشار Iwalokun *et al* .,(2004) الى ان وجود اليوريا يؤثر على الجينات المسؤلة عن ظاهرة الانثيال والتي تكون موجودة على بلازميد الخلية البكترية كما يؤثر على مستويات RNA الخلية ، الا ان الية عمل اليوريا في تثبيط ظاهرة الانثيال في بكتريا *Proteus mirabilis* لا تزال غير واضحة .

اما بالنسبة للأطباق التي استخدم فيها الكحول فان معدل قطر دائرة الانثيال لبكتريا *Proteus mirabilis* قد وصل الى (18.75) ملم وعلى الرغم من انخفاضه مقارنة بالسيطرة الا ان هذا الانخفاض لم يكن معنويا بمستوى

(P > ٠.٠٥) . لكن النتائج التي تم الحصول عليها لم تاتي متوافقه مع ما توصل اليه Hernandez *et al* ., (1999) من ان الكحول من المواد التي تمنع تكوين او تعترض تركيب ونشاط الاسواط وان استخدام الكحول بنسبة ٩٠% قد ادى الى خفض ظاهرة الانثيال لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من تقرحات الجهاز الهضمي والافات الجلدية ، ومن المحتمل ان يعود عدم التوافق هذا الى الاختلاف في نوع العزلات واماكن تواجدها او طبيعة الانسجه التي تصيبها .

جدول رقم (١): نتائج اختبار حساسية بكتريا *P. mirabilis* للمضادات الحياتية .

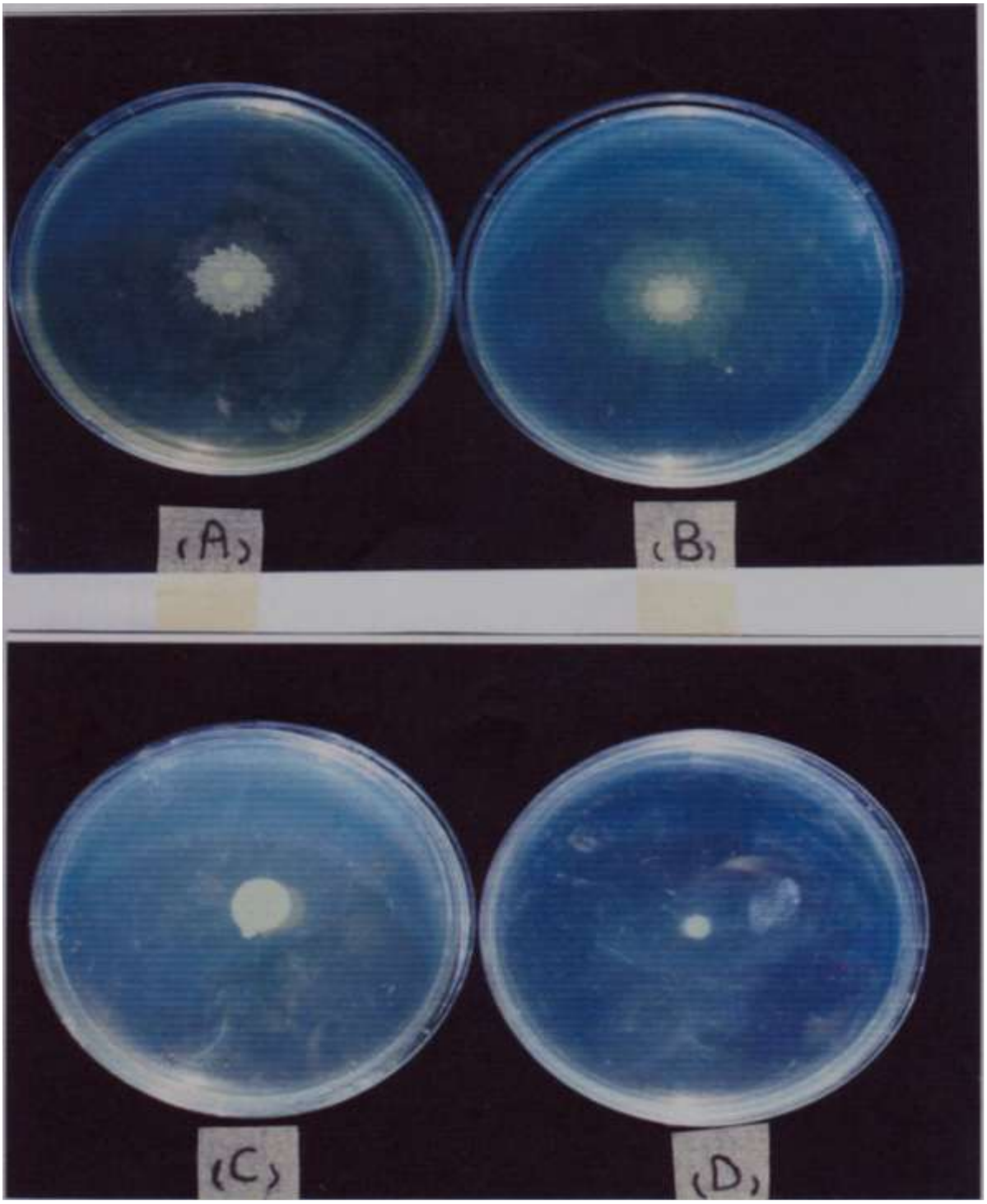
المضاد الحياتي			نتيجة الاختبار
الاسم	الرمز	التركيز (µg / ml)	
Ampicilin	Am	10	R
Amoxicillin	AX	25	R
Cefixime	CFM	5	R
Cefotaxime	CTX	30	M
Ciprofloxacin	CIP	5	S
Chloramphenicol	C	30	S
Clarithromycin	CLR	15	R
Gentamicin	G	10	M
Penicillin	P	10	R

R : مقاومة ، M : متوسطة المقاومة ، S : حساسة .

جدول رقم (٢) : تاثـــــير تراكـــــيز اليوريا والكحول على قطر دائرة الانثيال في بكتريا *Proteus mirabilis*

تركيز اليوريا والكحول	قطر دائرة الانثيال(ملم) (المعدل ± الانحراف المعياري)
0 % (معاملة السيطرة)	a 5.52 ± 30.75
%1	a 4.29 ± 18.42
% 2	b 2.64 ± 13.35
% 3	b 1.73 ± 6.5
كحول 90%	a 2.16 ± 18.75

الاحرف الانكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية (P > ٠.٠٥) .



شكل رقم (١) : (A) وسط الاكار المغذي نامية عليه بكتريا *Proteus mirabilis* (طبق السيطرة ويلاحظ اتساع قطر دائرة الانثيال swarming) وفي (B) العزلة نفسها نامية في الاكار المغذي المضاف له ١% يوريا ، (C) ٢% يوريا ، (D) ٣% يوريا .

References :

1- **Allison , C.; Lai, H.C.; Hughes, c. (1992). Co-ordinate experession of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis* , Mol. Microbiol., 6:1583-91.**

2- **Al- Mansouri, S. ; Amari, A. and Asad, A. G. (2005). Inhibition effect of some medical plants from Iran on swarming motility of *Proteus* rods . J. med. Sci. , 5(3): 216-221.**

3- **Baur,A.W.;Kirby,W.m.;Sherris,J.C. and Turch,M.(1966).Antibiotics Susceptibility testing by standardized disk method.Aln.Clin.Pathol.45:493-496.**

4- **Bush,K.;Jacoby,G.A. and Medeiros,A.A. (1995). A functional Classification scheme for β- Lactamase and its correlation with molecular structure . Antimicrob.Agent.Chemother. 39(6):1211-1233.**

5- **Fons , J. A. ; Van Asten and WimGaastra . (1999). Urea restrains swarming of *Proteus mirabilis* . J . Clin. Microbiol. 37(5): 1652.**

6- **Hernandez, E. : Ramisse, F. and Cavallo, J.D. (1999). Abolition of Swarming of *Proteus* . J.Clin. Microbiol . 37(10):3435-36.**

7- **Holt, J. G. ; Krieg, N. R.; Sneath, P. A.; Staley , J. A. and Williams, S. T. (1994). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology . (9)th ed . Willims and Wilkins .**

8- **Iwalokun , B.A. and Akinwumi (2002) Swarming modulatory effect of some amino acid on *Proteus* strains from Logos, Nigeria . Afr. J. Bacteriol. 1: 10-16 .**

9- **Iwalokun , B.A. ; Akinside , K. A. and Nkiruika , N. (2003) . Inhibition of swarming by urea and its diagnostic implications among uropathogenic *Proteus* species from Lagos, Nigeria . Afr. J. Clin. Exp. Microbiol. 4(2):17-27.**

10- **Iwalokun , B.A. ;Olukosi, Y.A. ; Adejoro, A. ; Olaye , J. A. and Fashade , O . (2004) . Comparative biochemical and molecular evalution of swarming of *Proteus* and effects of anti- swarm agents . Afr. J. Biotechn. 3(1): 99-104 .**

11- **Latta , R. K.; Shur, M. J.; Tolson , D. L. and Altman , E. (1998). The effect of growth conditions on *in vitro* adherence and NAF expression of *Proteus mirabilis 7570* Can. J. Microbiol. 44(9): 896-904.**

12- **Liaw, S. J. ; Lai, H. C.; Luh , K. T. and Wang , W. B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by ρ-nitrophenylglycerol . J. Med. Microbiol. 49(8):725-31.**

13- **MacFaddin , I. F.(2000) Growth negative Enterobacteriaceae and other intestinal bacteria . Biochemical tests for identification of medical bacteria . 3rd ed. Lippincott Wiliams and Wilkins , Philadelphia . p:732-718 .**

14- **National Committee for Clinical Laboratory standards (2003). Approved standard M2-A8 . performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests , 8th ed . NNCCLS ,Wayne, Pa.**

15- **Rahman , M.M.; Jean, P. G.; Kokila, A. ; Colin , H. and Carson , R.W.(1999). The structure of the colony migration factor from pathogenic *Proteus mirabilis* J. boil. Chemi. 27(33): 22993-98.**

16- **Senior, B. (1998). In Topley and Wilson's microbiology and microbial infections (Collier, L.; Ballows, A. and Duerden, B. I.) 9th ed . Arnold, New York , vol.11, 1035-1050 .**

17- **Subbannayya, K. and Udayalaxmi, J. (2005). Fish meal extract agar –medium to inhibit swarming of *Proteus*spp. Current science , 89(10): 1666-1667.**