

## تأثير البيوريا و الايثانول على ظاهرة الانتثيال في عزلة محليه لبكتريا

## Proteus mirabilis

أنعام جواد مطرود / مدرس

د. سهام جاسم الكعبي / مدرس

جامعة الكوفة / كلية التربية للبنات - علوم الحياة

**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.

**الخلاصة :**

عزلت بكتريا *Proteus mirabilis* من عينات إدرار من مستشفى الزهراء للولادة والاطفال / النجف الاشرف ، واجريت الاختبارات الكيموحيوية للتأكد من تشخيصها . نميت العزلة على وسط الاكار المغذي Nutrient Agar والمضاف اليه ( ١% ، ٢% ، ٣% ) من البيوريا ، 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 البيوريا والكحول على ظاهرة الانتثيال Swarming التي تكونها هذه البكتريا ، واطهرت النتائج انخفاض معنوي بمستوى (  $P < ٠.٠٥$  ) في معدل قطر دائرة الانتثيال المتكونة عند ( ٢% ، ٣% ) لتراكيز البيوريا 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*.

المقدمة :

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

اجري هذا البحث لمعرفة دور اليوريا في تثبيط ظاهرة الانثيال وللاستفادة 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 لبكتيريا *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:

1- 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 .

تعد بكتيريا *Proteus mirabilis* من العصيات اللاهوائية الاختيارية السالبة لصبغة جرام وتقع ضمن العائلة المعوية Enterobacteriaceae ( Holt et 1994 ) ، كما انها متوطنة بصورة طبيعية في الامعاء ، وهي انتهازية ذات نمو هالي Zonal growth ، وتمتلك 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 الزرعى 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 منات الاسواط تبنى من مادة متعددة السكريد الحامضية اللزجة والتي تساعد على حركة الخلايا المنثالة Swarm cells خلال سطح الوسط الصلب ، وان ظاهرة الانثيال ممكن ان تحدث في الاوساط السائلة وحتى داخل الجسم الحي in vivo .

## Medium تحضير الوسط الزراعي preparation

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

## Medium inoculation تلقيح الوسط

تم عمل مستنبت ثانوي للبكتيريا قيد الدراسة باستخدام الوسط الزراعي السائل Trypticase Soya broth وحضن لمدة 24 ساعة بعد ذلك نقل منه 1 مايكروليتر باستخدام ماصة دقيقة Micropipette الى مركز الأطباق الحاوية على الوسط الزراعي المحضر سابقا ، من جهة أخرى نقلت نفس الكمية الى أطباق حاوية على الوسط الزراعي Nutrient agar . ثم أضيف الى غطاء الطبق قطرات قليلة من مادة الكحول الأثيلي 90% ( Hernandez et al., 1999 ) ، كما زرع 1 مايكروليتر من المزروع البكتيري في أطباق خالية من اليوريا والكحول وعلى نفس مادة الوسط الزراعي المستخدم وعدت أطباق سيطرة Control ثم حضنت جميع الأطباق بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة ، 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) وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة وعلى مستوى معنوية (5%) ثبتت النتائج بشكل ( المعدل  $\pm$  الانحراف المعياري ) .

## Microscopic الخصائص المجهرية . characters

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

3- الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests : اجريت مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية كما جاء في (MacFaddin 2000) لتشخيص العزلات البكتيرية . ولغرض التأكد 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 Baure et al (1966) ، اذ استخدمت تسعة من المضادات الحياتية شملت Amoxicillin , Ampicillin , Cefixime , Cefotaxim , Chloramphenicol, Ciprofloxacin , 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 البييتالاكتاميز  $\beta$ -Lactamase . اجري الاختبار على وفق ما ورد في Bush et al. (1995) والمسماة طريقة اليود القياسية السريعة . Rapid iodometric method

النتائج والمناقشة :

اظهرت نتائج الاختبارات التأكيدية لعزلات بكتريا *Proteus mirabilis* نموها بدرجة حرارة 37م على وسطي Blood agar ووسط Nutrient agar وبشكل مستعمرات ذات لون ابيض الى كريمي شفاف ومكونة حلقات متحدة المركز نتيجة لظاهرة الانثيال و متجهة نحو حافة الطبق وغير محللة للدم ، كما بدت البكتريا تحت المجهر بانها عصيات سالبة لملون جرام ، جاءت نتائج الفحوصات الكيموحيوية مطابقة لما جاء في ( MacFaddin , 2000 ) كما تم التأكد 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) . ويتضح ان العزلة التي تم الحصول عليها كانت مقاومة لاكثر من نصف عدد المضادات الحياتية المستخدمة ، وانها كانت منتجة لانزيم البيتا لاكتاميز Lactamase -  $\beta$  وهذا ما يؤكد مقاومتها لاربعة من المضادات الحياتية الحاوية 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 البيتا لاكتاميز واسعة الطيف لاعلاقة له بسعة دائرة الانثيال فيها . لقد اشار (Senior 1998) الى ان المدة التي تستغرقها ظاهرة الانثيال ومساحة المنطقة الناتجة عنها تتغير تبعاً 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 تدريجياً مع ارتفاع تركيز اليوريا المستخدم اذ كانت (١٣.٣٥) ملم و(٦.٥) ملم عند التركيزين ٢% و ٣% 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) ، ان معدل قطر دائرة الانثيال تقل بازياد نسبة تركيز مادة اليوريا المستخدمة . كما ان اليوريا تجعل من الوسط الزرع قاعديا مما يؤثر على اسواط هذه البكتريا وبالتالي تحد من حركتها فوق السطوح الصلبة (Senior , 1998) . في حين اشار (Iwalokun et al ., 2004) الى ان وجود اليوريا يؤثر على الجينات المسؤلة عن ظاهرة الانثيال والتي تكون موجودة على بلازميد الخلية البكتيرية 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 معنوياً 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 تفرحات 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 الحيوية .

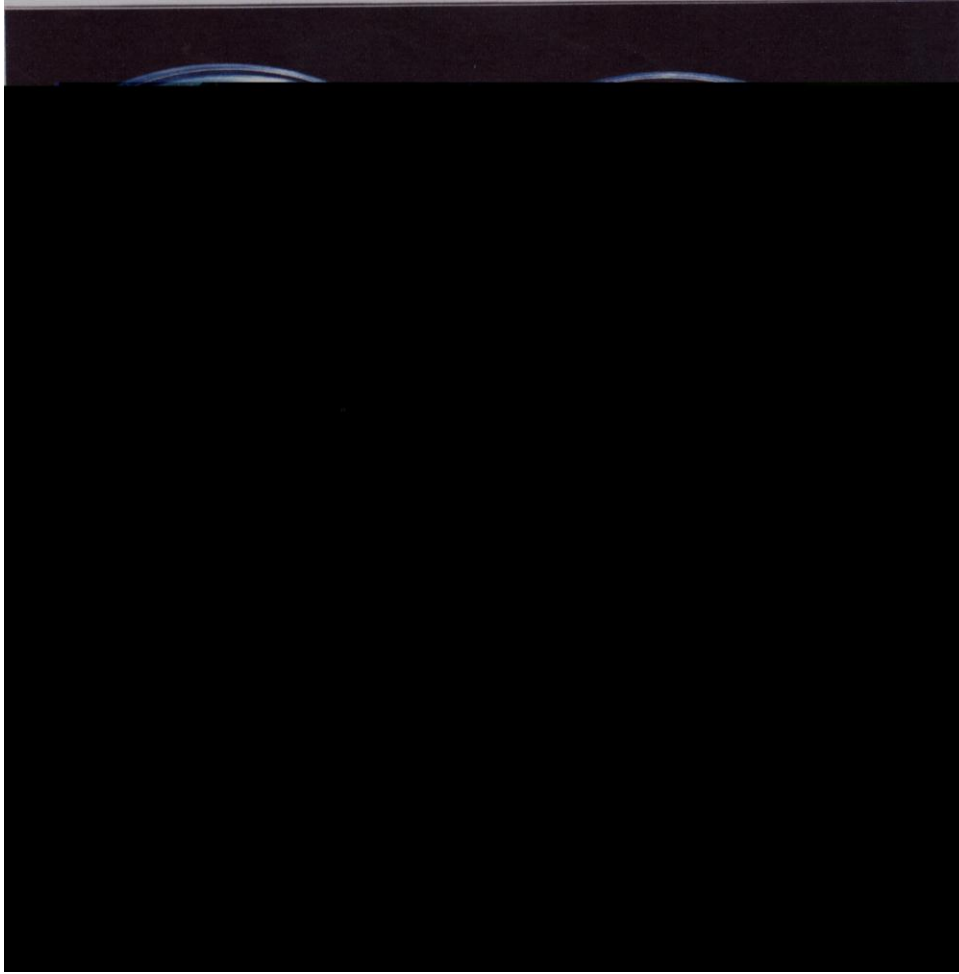
نتيجة الاختبار	المضاد الحياتي		
	التركيز (µg / ml)	الرمز	الاسم
R	10	Am	Ampicilin
R	25	AX	Amoxicillin
R	5	CFM	Cefixime
M	30	CTX	Cefotaxime
S	5	CIP	Ciprofloxacin
S	30	C	Chloramphenicol
R	15	CLR	Clarithromycin
M	10	G	Gentamicin
R	10	P	Penicillin

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

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

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

الاحرف الانكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية ( $P > 0.05$ ) .



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

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 experssion of  
virulence genes during swarm-cell  
differentiation and population

- 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 evaluation 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  $\rho$ -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 . 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins , Philadelphia . p:732-718 .
- 14- National Committee for Clinical Laboratory standards (2003). Approved standard M2-A8 . performance standards for method.Aln.Clin.Pathol.45:493-496.
- 4- Bush,K.;Jacoby,G.A. and Medeiros,A.A. (1995). A functional Classification scheme for  $\beta$ -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. : Ramiisse, 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)<sup>th</sup> 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*

antimicrobial disk susceptibility tests , 8<sup>th</sup> ed . NCCLS ,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. ) 9<sup>th</sup> ed . Arnold, New York , vol.11, 1035-1050 .
- 17- Subbannayya, K. and Udayalaxmi, J. (2005). Fish meal extract agar – medium to inhibit swarming of *Proteusspp.* Current science , 89(10): 1666-1667.