وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم- قسم علوم الحياة

دراسة تأثير درجات حرارة مختلفة على انتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *E.coli* المعزولة من اخماج الجروح

بحث مقدم

إلى كلية العلوم / قسم علوم الحياة– جامعة القادسية

كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

من قِبل الطالبة

نور الهدى نوفل عبد الجليل

بإشراف

م.م.عباس ميار حزام

١٤٤٠ هـ ٢٠١٩ م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

وَمَا أُوتِيتُم مِّنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا

صدق الله العظيم

الإهداء

إلى ملاكي في الحياة . . إلى معنى الحب والحنان . . إلى بسمة الحياة وسر الوجود . . إلى من كان دعاؤها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي

. . . . . والدتي العزيزة.

إلى من جرع الكأس فارغاً ليسقيني قطرة حب . . إلى من كلت أنامله ليقدم لي لحظة سعادة . . إلى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم . . . . . .

. . . . . والدي العزيز.

إلى نبراس حياتي ورمز سعادتي . . إلى ينبوع المحبة والحنان . . إلى من بهم اشد ازري

. . . . . أخي وأخواتي

نور الهدى

شـــــــكر وتقـــــــدير

الحمدُ لله والصلاة والسلام على أفضل خلق الله محمد سيد المرسلين وخاتم النبيين وعلى أهل بيته الطيبين الطاهرين..

أتقدم بخالص شكري وتقديري إلى الأستاذ عباس ميار حزام لاقتراحه موضوع البحث وإشرافه عليه و لِما قدمة لي من توجيهات سديدة ونصائح وإرشادات قيِّمة خلال فترة إنجاز رسالتي..

وتقف الكلمات عاجزة عن الشكر والإمتنان إلى والدي العزيزين داعية الله سبحانهُ وتعالى أن يمدَّهما بالصحة والعافية..

شكري وتقديري إلى رئاسة جامعة القادسية وعمادة كلية العلوم وقسم علوم الحياة أساتذة وتدريسيين لدعمهم المعنوي لي خلال مدة البحث. وأخصّ بالشكر والتقدير عميد كلية العلوم الدكتور نيل عبد عبد الرضا و رئيس قسم علوم الحياة الدكتور حبيب وسيل كاظم لرعايته، واهتمامه بطلبته، ومدّه يد العون لنا على مواصلة الدراسة والبحث..

وفي الختام لا يسعني الا ان اعبر عن فائق تقديري وعرفاني بالجميل الى كل من مد لي يد العون والمساعدة ومن الله التوفيق .

نور الهدى

الخلاصة

الخلاصة Summary

جُمعت عينات الدراسة بواقع ٤٤ عينة (اخماج الجروح) من مستشفى الديوانية التعليمي للمدة من تشرين الثاني ٢٠١٨ ولغاية كانون الثاني ٢٠١٩ وذلك لغرض التحري عن بكتريا *E.coli* الملوثة للجروح ، إذ بينت نتائج الفحوصات الزرعية والكيموحيوية عائدية ١٢ عزلة لبكتريا *E.coli* وبنسبة ٢٧,٢% .

تم التحري عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation في بكتريا *E.coli* المعزولة من اخماج الجروح باستعمال طريقة الانابيب Tube Methods، حيث أظهرت النتائج ان ١٠ عزلات *E.coli* من اصل ١٢ عزلة قادرة على انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة ٨٣,٣ % .

من جهة أخرى تم دراسة تأثير درجات حرارة مختلفة (٢٥،٣٠ ٣٧،٤٤) م على تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *E.coli* حيث تم اختيار اكفأ عزلة في انتاج الغشاء الحيوي واجراء الاختبار عليها. بينت النتائج عدم قدرة العزلة البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بدرجة ٢٥ م اما بدرجة ٣٠ فتكون غشاء حيوي رقيق جدا وفي بدرجة ٣٧ م و٤٠ فقد تكون غشاء حيوي سميك .

أوضحت نتائج الدراسة الحالية ان لدرجة الحرارة تاثير كبير في انتاج الغشاء الحيوي وان سمك الغشاء الحيوي يزداد بزيادة درجة الحرارة ولحد معين .

Abstract

The study samples were collected from 44 samples of wounds from the Diwaniyah Teaching Hospital for the period from November 2018 to January 2019. For the purpose of investigating the *E.coli* in the wounds، Biochemical tests showed that 12 (27.2%) isolates were *E. coli*.

Biofilm Formation was investigated for *E.coli* isolated from wounds using Tube Methods. The results showed that 10 (83.3%) *E.coli* isolates were capable of producing the biofilm Formation.

On the other hand, the effect of different temperatures (25,30 37,44) on the Biofilm Formation in *E.coli* was studied, Where the most efficient bacteria were selected in the production of the biofilm and the test was carried out.The results showed that the bacteria were unable to form the biofilm at 25 C either at 30 C, the biofilm is very thin and at 37 C and 40 C, it becomes a thick biofilm.

The results of the current study showed that the temperature has a significant effect on the production of the biofilm and that the thickness of the biofilm increases with increasing temperature.

المحتويات

رقم الفقرة	العنوان
١	المقدمة
٢	استعراض المراجع
١,٢	الخصائص العامة لبكتريا *E.coli*
٢,٢	تصنيف جرثومة *E.coli* Classification of
٣,٢	السلالات الممرضة الجرثومية *E.coli*
١,٢,٣	جرثومة *E.coli* المعوية السمية
٢,٢,٣	جرثومة *E.coli* المعوية الغازية
٣,٢,٣	جرثومة *E.coli* المعوية المتجمعة
٤,٢,٣	جرثومية *E.coli* المعوية النزقية
٥,٢,٣	جرثومة *E.coli* المنتشرة الملتصقة
٤,٢	عوامل الضراوة
٥,٢	تكوين الغشاء الحيوي
٣	المواد وطرائق العمل
١,٣	الأجهــزة والصبغات والأدوات والمواد الكيميائية
٢,٣	تحضير الأوساط الزرعية
٣,٣	التعقيمSterilization
٤,٣	جمع العينات
٥,٣	تشخيص البكتريا المعزولة
١,٥,٣	الفحص المظهري والمجهري
٢,٥,٣	الفحوصات الكيموحيوية
٦,٣	حفظ العزلات البكتيرية
٧,٣	الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي
٤	النتائج والمناقشة
١,٤	العزل والتشخيص
١,١,٤	الفحوصات المظهرية والمجهرية
٢,١,٤	الفوحصات الكيموحيوية
٢,٤	تكوين الغشاء الحيوي
	الاستنتاجات والتوصيات
	المصادر

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

١. المقدمة

تعد بكتريا *E.coli* من الجراثيم السالبة لصبغة كرام عصوية الشكل لاهوائية اختارية من النبيت الطبيعي في القناة الهضمية ومن الممكن ان تتواجد كممرضات انتهازية يرجع ذلك لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة (Brooks *et al*.,2013)، اذ تمتلك جرثومة *E.coli* عوامل كثيرة تساعدها على احداث الاصابة حيث تعرف هذه العوامل بعوامل الفوعة virulence Factor حيث تشمل عوامل الاتصاق . خمل النوع الاول نوع (s) نوع (p) نوع (Fic) ، (ii) الذيفانات (عامل التنخر السمي . عامل تحلل الدم . متعدد السكريد الشحمي) و انتاج الانزيمات (الفوسفاتي القلوي الحال الدهون الحال للبروتيات الحال لسليوز) حيث تساعد هذه العوامل الجراثيم على استعمار سطوح المضيف واضعاف او تخريب دفاعات المضيف حيث هذه تساعد على غزو وانتشار الخلايا الجرثومية لخلايا انسجة المضيف (Maureui,2007). اذ تملك جرثومة *E.coli* تركيباً متضدياً معقداً يتكون من ثلاث انواع من المستضدات (Antigens) حيث تكون بعض مستضداتها مقاومة للحرارة Heat- Stable like وتعرف بالمستضد الجسمي Somatic Antigen والبعض يكون حساساً للحرارة Heat-labile like وهو المستضد المحفضي Capsular Antigen واما النوع الثالث يدعى بالمستضد السوطي Flageilar antigen (Rebcca and Elizabeth, 2005) .

تعيش بكتريا القولون على هيئة تجمعات معقدة التركيب مرتبطة بالسطح بشكل غير قابل للتراجع بدلا ان تكون بشكل خلايا حرة وتترتب بشكل طبقات متراصة في المواد الخارج خلوية اذ يصعب ازالتها واختراقها مكونة مايدعى بالغشاء الحيوي Bioflim الذي يتسبب بالعديد من الإصابات (Hadjifrangiskou *et al*.,2012) .

ان تكوين الغشاء الحيوي يشكل خطورة أذ تكمن خطورتة في مقاومتة لاغلب المضادات الحياتية ، وذلك لقيامة بعدة اليات تمكنه من تقليل او تثبيط تلك المضادات وكذلك يعزز من مقاومة البكتريا للاستجابة المناعية (Ashraf *et al*.,2015).

الهدف من الدراسة:

يعد الغشاء الحيوي من اهم عوامل الضراوة المسؤول عن اخماج الجروح فقد هدفت الدراسة التحري عن قابلية تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *E.coli*، وتحقق الهدف من خلال عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* و دراسة تأثير درجات حرارة مختلفة في تكوين الغشاء الحيوي .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

٢. استعراض المراجع

٢ . ١: الخصائص العامة لبكتريا *E.coli*

وصفت جرثومة *E.coli* لاول مرة عام ١٨٨٥م من قبل الطبيب الالماني Theodor Escherich اذ عزلت من ابرز الاطفال الاصحاء وحديثي الولادة كجرثومة قولون متعايشة ولهذا فقد عدت غير مرضية (Non – Pathogenic) متعايشة في الامعاء الغليظة وفي عام ١٨٨٤ تمكن العالم Escherich من عزلها من ادرار فتيات شابات مصابات باخماج المجاري البولية Urinary Tact jnfection (Conway ,1995)

تظهر جرثومة *E.coli* على هيئة عصيات صغيرة الحجم (1.3-0.5) مايكرو متر سالبة الصبغة غرام حيث توجد بشكل منفرد او بهيئة ازواج وتنمو في ظروف لا هوائية اختيارية (Facultative anaerobic) (Madigan *et al*,2006) وتتحرك بواسطة الاسواط المحيطية غير مكونة من السيورات Non –spore foruning بعض سلالاتها تمتلك المحفظة (Hollet et al, 1994) حيث تستطيع النمو في درجات حرارة تتراوح ما بين (١٥-٤٥)م° الا ان درجة حرارة المثلى لنموها هي ٣٧° (Fotador *et al* 2005) تظهر مستعمرات جرثومية *E.coli* المرضية على وسط ايوسين المثلين الازرق الصلب ذات بريق اخضر معدني Green metali sheen (brooks et al ,2004)

كما ان لها القدرة على تخمير سكر اللاكتوز فتظهر مستعمراتها بلون وردي على وسط الماكونكي الصلب (Nester *al et* ,1998) . تعطي جرثومة *E.coli* نتيجة موجبة للعديد من الاختيارات الكيموحيوية مثل اختيار الكاتليز Catalase test واختيار الاندول Inidol testواختيار احمر المثيل واختيار الفوكس برسكاور Vages Proskar testتمتلك الجرثومة القابلية على اختزال النترات الى نتريت وتحلل الجيلاتين بينما لا تمتلك القابلية على انتاج انزيم اليوريز وانتاج كبريتيد الهيدروجين H,S (Macfaddin , 2000).

٢-٢- تصنيف جرثومة *E.coli* Classification of

تعود جرثومة ***E.coli*** وفقا لنظام لينايوس في التصنيف الى شعبة Proteo bacteria صنف Gammaprotabactria رتبة Enterobacteriales العائلة المعوية Enterobactreriaceae جنس Escherichia النوع *Escherichia Coli* (trivedi et al,2010) . اقتراح Kaffman (١٩٤٠) نظاماً تصنيفاً خاصاً لتصنيف جرثومة *E.coli* يعتمد على الخصائص المستضديه اذ تمتلك جرثومة *E.coli* ثلاث انواع من المستضدات هي المستضد الجسمي Somatic antigen ويدعى O.Ag والمستضد السوطي Flagellar antigen ويدعى H.Ag والمستضد المحفظي Capsular antigen ويدعى K.Ag . يتم الكشف عن هذا المستضدات باختبار التلازن Aggltination test (Brooks *et al* ,2004) يطلق على المستضد الجسمي ايضاً مستضد جدار الخلية اما مستضد المحفظة فهو عبارة عن عديد السكريد Polysaccharide بينما يتكون المستضد السوطي من بروتين من نوع خاص يدعى Flagellin (Anjnum et al ,2003).

٢-٣- السلالات الممرضة الجرثومية *E.coli* Pathogenic starins of

تعد جرثومة *E.coli* من النبيت الطبيعي Normal flora تستوطن امعاء الانسان والحيوان كما قد تتواجد في التربة والمياه السطحية كما وقد تمتلك بعض سلالات *E.coli* القابلية على احداث العديد من الاخماج للانسان والحيوان فهي مسؤولية على اخماج الجهاز الهظمي واخماج المسالك البولية واخماج اخرى منها فقر الدم والسحايا (Russo and Belanger al,2011) .

٢-٣-١ جرثومة *E.coli* المعوية السمية Enterotoxigenic E.coli (ETEC)

يمتاز هذا النمط بكونة الاكثر شيوعاً بين انماط *E.coli* كما انه قد يكون هو المسبب الرئيسي لإسهال الاطفال والمسافرين Traveler's Diarrhoea اذ قد يسبب هذا المرض من النمط الاسهال المائي الحاد Acute watery Diarrheaوالذي قد يؤدي الى الجفاف عند الاطفال الرضع ويمتلك هذا النمط القابلية على انتاج الذيفانات المعوية Enterotoxins من النوع الثابت للحرارة والنوع الحساس للحرارة (oliveira et al , 2007)

٢-٣-٢- جرثومة *E.coli* المعوية الغازية Enteroinvasive E.coli (EIEC)

حيث يمتاز هذا النمط بقدرته على غزو الخلايا المبطنة للأمعاء الغليظة ويسبب الاسهال الدموي الاخراجي للإنسان ، ويعد الانسان المضيف الرئيسي لها ان الجرعة المخصصة لنمط (EIEC) وهو ($١٠^{٦}$) خلية كافية لأحداث المرض في الانسان عن طريق مهاجمة الخلايا الظهارية المخاطية

المبطنة للامعاء وقدرتها على الانتشار من خلية الى أخرى حيث تميز هذا النمط بظهور دم مخاط في براز الاشخاص المصابين (vieira et al ,2007).

٢-٣-٣- جرثومة *E.coli* المعوية المتجمعة: Enter aggregative E.coli (EAEC)

يمتاز هذا النمط بعدم انتاجية للذيفانات المعوية entero toxins بنوعيها الثابت للحرارة (ST) والحساس للحرارة (LT) ويكون التصاق هذا النمط بالخلاية الطلانية المبطنة للامعاء من النوع المتجمع يملك هذا النمط العديد من عوامل الفوعة التي تساعد على الالتصاق بالخلايا المخاطية المبطنة للامعاء الدقيقة وان امراضية الجرثومة تحدد عن طريق المستضد الجسمي (O-Ag) والمستضد السوطي H-Ag (Lguchi et al , 2009)

٢-٣-٤- جرثومية *E.coli* المعوية النزقية Enter hemorrhagic E.coli (EHEC)

يطلق على هذا النمط ايضاً (VTEC) Verotoxin Producing لانتاج ذيقان (Verotoxin) حيث تبدأ اعراض الاصابة بنمط (EAEC) بالاسهال غير دموي Nonbloody ohiarrhea ومغص بطني Abdominal Crump ثم تتطور الاعراض بعدها ليصبح الاسهال دموياً والذي يعد التشخيص الرئيسي للاصابة . يمتاز هذ النمط باحداث حالتين مرضتين هما التهاب القولون النزفي HC/ Hemorrhagic Colitis ومتلازمة فرط يوريا الدم الانحلالي ويسبب هذا النمط الاسهال الحاد للاطفال الرضع بدون حمى وقيء فضلاً عن دورها في احداث اسهال المسافرين (Venacchio *et al* , 2006).

٢-٣-٥- جرثومة *E.coli* المنتشرة الملتصقة .Diffusely Adherent E.coli (DAEV)

حيث يمتاز هذا النمط بقدرته على الالتصاق على خلايا الانسان الطلائية نوع ٢- Human ٢- /2 tlFp / Type (Epithelial) . كما لها القابلية على الالتصاق والانتشار بصورة واسعة على الخلايا الظهارية للامعاء و الاغشية المخاطية للقولون مسببة تحطم الانسجة الظهارية وحدوث خلل في افراز السوائل والاملاح وبالتالي تسبب الاسهال عند الاطفال وتملك هذا النمط نوعين من الخمج من النوع A ، Dr والتي تساعد الالتصاق (Betis *et al* , 2003).

٢-٤- عوامل الضراوة

تمتلك البكتريا العديد من عوامل الظراوة اهما :الخمل Fimbriae والاسواط التي تساعد على الحركة والالتصاق بخلايا المضيفFlagella حيث تتحرك الى المواد المغذيه والاوكسجين والضوء او تتدرج الى الاسفل بعيد عن المواد السامه. ومن عوامل الضراوة الأخرى المحفظه Capsule و الغشاء الحيوي Biofilm وانتاج الذيفانات Toxin وانتاج الانزيمات Emzymes تلعب الانزيمات دورا هاما في جميع مراحل عمليات الايض والتفاعلات الكيمياويه المختلفه ،تمتلك الاحياء المجهريه القابليه على انتاج انزيمات معينه ذات اهميه خاصه تدخل في مجالات مختلفة ومنها مجال الصناعات الغذائيه ،كما تعد من عوامل الفوعه التي تزيد من امراضيه الجراثيم المنتجه لها (Chirumamilla, *et al*,2001).

٢,٥: تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

عندما تلامس الجراثيم سطح خلايا المضيف تلتصق عن طريق الخمل ثم تبدا الجراثيم بالنمو والانتشار مكونة مستعمرات متقاربة وملتحمة مع بعظها مكونة الغشاء الحيوي .ويعرف الغشاء الحيوي بأنه طبقة من متعدد السكريد والاحماض النووية والبروتينات تقوم البكتريا بتصنيعة لحماية نفسها من الخطر وذلك بالالتصاق بالسطح (Vuotto *et al*., 2014) .اغلب البكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها بكتريا القولون قادرة على انتاج الغشاء الحيوي . يعتبر الغشاء الحيوي من عوامل الضراوة حيث يقوم بحماية البكتريا من تأثير المضادات الحياتية والمطهرات (Abidi *et al*., 2013). تظهر البكتريا التي تمتلك غشاء حيوي مقاومة عالية لاليات الجهاز المناعي وبالتالي يكون لها دور في تطور الاخماج المرضية وتقليل نفوذ الدواء مما يزيد من مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية وبالتالي يتحول الخمج من الحاد للمزمن .وقد وجد ان سمك الغشاء الحيوي الذي نتتجة بكتريا القولون يتختلف تبعا لطبيعة انتاج البكتريا والضروف البيئية المحيطة مثل درجة الحرارة والاس الهيدروجيني (Niemirowicz *et al*., ٢٠١٤).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials

&

Methods

٣. المواد وطرائق العمل Materials and method

١,٣: الأجهــزة والصبغات والأدوات والمواد الكيميائية

جدول(١) الأجهزة والمعدات المختبرية والصبغات والمواد الكيميائية

ت	أســـــــم الجـــهـاز	
١	مجهر ضوئي	**light microscope**
٢	مسخن حراري	**Hot plate**
٣	حمام مائي	**Water bath**
٤	مؤصده	**Autoclave**
٥	ميزان حساس	**Sensitive balance**
٦	جهاز تقطير	**Distiller**
٧	منبذة عالية السرعة	**High speed centrifuge**
٨	حاضنة	**Incubator**
٩	مازج	**Vortex mixer**
١٠	كابينة الزرع المجهري	**Laminar flow cabinet**
١١	ثلاجة	**Refrigerator**
١٢	الناقل الزرعي القياسي	**Standard wire loop (1µ)**
١٣	دورق مخروطي	**Conical flasks**
١٤	اطباق بتري بلاستكية	**Disposable Petri dishes**
١٥	شرائح زجاجيه وغطاء شريحة	**Slides and cover slides**
١٦	أنابيب إختبار	**Test tube**
١٧	كليسيرول	**Glycerol**
١٨	المثيل الأحمر	**Methylred ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)**
١٩	الاكار	**Agar- Agar**
٢٠	كاشف كوفاكس	**Kovac' s reagent**
٢١	صبغة گرام	**Gram stain**

٢,٣: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

حُضِّرت الأوساط الزرعية الجاهزة حسب تعليمات الشركة المُصنِّعة كما موضح في الجدول (٢)

جدول (٢):الأوساط الزرعية الجاهزة والتركيبية .

ت	الوسط الزرعي	الغرض منه
١.	Eosin methylene blue	استخدم لتفريق بكتريا *E .coli* عن البكتريا المعوية الأخرى.
٢.	MacConkey agar	استعمل بوصفه وسطا انتخابيا للبكتريا السالبة لصبغة غرام وللتفريق بين المستعمرات المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز
٣.	Blood agar	معرفة نوع التحلل الدموي
٤.	Nutrient agar	وسط تنمية عام
٥.	Nutrient broth	استعمل لتنشيط وادامة العزلات
٦.	Motility media	استخدم لاختبار حركة البكتريا
٧.	Pepton water	استعمل للكشف عن حلقة الاندول
٨.	M.R.V.P Medium	استخدم الوسط للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الحامض أو الاستيل مثيل كاربون
٩.	Simmons citrate agar	استعمل للكشف عن البكتريا المخمرة للسترات بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون
١٠.	brain heart infusion broth	الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي

٣,٣: التعقيمSterilization

عقمت الزجاجيات بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة ١٦٨ مْ لمدة ساعتين ، اما الأوساط الزرعية الجاهزة، والتركيبية، وأغلب المحاليل المستخدمة التي لاتتأثر بالحرارة فقد عقمت بجهاز الموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مº وتحت ضغط ١٥ باوند / انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة، المحاليل التي تتأثر بالحرارة فقد عقمت بالترشيح (MacFaddin, 2000).

٤,٣: جمع العينات Samples collection

جُمعت ٤٤ عينة سريرية من مستشفى الديوانية التعليمي للمدة من تشرين الثاني ٢٠١٨ ولغاية شباط ٢٠١٩. وذالك باخذ مسحات Swabs من الجروح بعدها نقلت العينات الى المختبر الاحياء المجهرية في كلية العلوم لغرض زرعها وتشخيصها ، اذ زرعت في وسط الماكونكي ووسط الايوسين- ازرق المثلين بطريقة التخطيط Streaking method وحضنت بدرجة ٣٧ م ولمدة ١٨- ٢٤ساعة (MacFaddin, 2004) .

٥,٣: تشخيص البكتريا المعزولة

١,٥,٣: الفحص المظهري والمجهري

درست الصفات المظهرية لكل من المستعمرات والخلايا البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة، شملت دراسة المستعمرات البكتيرية من حيث اللون والشكل و القوام والحواف والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية Differential media والانتقائية Selective media. كذلك تم عمل مسحات مباشرة من الأوساط الزرعية ثم صبغت بصبغة كرام لدراسة الخصائص المجهرية للأنواع البكتيرية المعزولة التي شملت شكل الخلية البكتيرية، وانتظام الخلايا البكتيرية مع بعضها ، وطبيعة تفاعلها مع صبغة كرام.

٢,٥,٣: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

أجريت الاختبارات الكيموحيوية وفقا لطريقة (MacFaddin, 2000) ومن أهمها

الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test

تم إجراء الاختبار بنقل كمية قليلة من النمو على الوسط الزرعي بواسطة عيدان خشبية إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من ٣% بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) المحضر في الفقرة، إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة .

الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test

تم إجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية معقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنياً، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي يدل على النتيجة الموجبة للكشف.

إختبار انتاج الهيمولايسين Hemolysin production test

استُخدم في هذا الإختبار وسط أگار الدم؛ إذ تم تلقيح الوسط بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها ، وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة37°م لمدة 18–24 ساعة. لوحظت النتيجة الموجبة عند حدوث تحلل دموي حول المستعمرة ، اذ كان التحلل من نوع التحلل الكامل β hemolysis .

الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test

تم تلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري ،حضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة، ثم أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى كل أنبوبة مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة

اختبار احمر المثيل Methyl red test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي M.R.V.P Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة عندها تم اضافة ٥ قطرات من كاشف احمر المثيل مع رج الانبوبة ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة يدل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض .

اختبار الفوكس بروسكور Voges pros-kauer test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة بعد ذلك تم إضافة ١ ملي ليتر من الكاشف إلى كل أنبوبة مع الرج، ان ظهور اللون الوردي خلال ٢ –٥ دقيقة والذي يصبح كرزي غامق خلال ٣٠ دقيقة مع الرج المتواصل يعبر عن النتيجة الموجبة .

اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test

اجري الفحص بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة. ان تحول لون الوسط الاخضر الى الازرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدل على النتيجة الموجبة .

اختبار قابلية الحركة Motility test

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على وسط الحركة بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة .

٦,٣: حفظ العزلات البكتيرية

وسط الحفظ قصير الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة ٣٧ مº لمدة ٢٤ ساعة، ثم حفظت في درجة ٤ مº، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات كل شهر، (Forbes *et al.*, 2007).

وسط الحفظ طويل الأمد

حضر بإضافة ١٥% من الكليسيرول إلى المرق المغذي المحضر ، وعقم بالمؤصدة، وترك ليبرد في درجة حرارة ٥٦ مْ باستعمال الحمام المائي، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في ٤ مْ لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - ٢٠ مْ (Forbes *et al.*, 2007) .

٧,٣: الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي Detection of the Biofilm Formation

استخدمت طريقة الانابيب Tube Methods للكشف عن قابلية البكتريا في تكوين الغشاء الحيوي وفقا لطريقة (Hassan *et al*., 2011) وكالاتي :

١ -لقحت الانابيب الحاوية على وسط (Brain heart infusion broth+glucose) بالبكتريا ثم تحضن بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة .

٢ -بعد فترة حضانة يتم التخلص من الوسط وتغسل الانابيب بمحلول الفوسفات الملحي المنظم ثم تجفف وتصبغ بصبغة البنفسج البلوري crystal violet لمدة ٣ دقائق.

٣ -ثم يتم التخلص من الصبغة الزائدة وتغسل الانابيب بالماء المقطر ثم تقلب الانابيب لتجف ، اذا يلاحظ تكون اغشية حيوية في قعر وجوانب الانبوبة بشكل طبقة بنفسجية .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results

&

Discussion

٤. النتائج والمناقشة

١,٤: العزل والتشخيص

تم الحصول على ١٢ عزلة (٢٧,٢%) لبكتريا القولون من مجموع ٤٤ عينة جروح للمرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي ، شخصت جميع العزلات بالاختبارات المظهرية والكيموحيوية وكما يلي:

١,١,٤:الفحوصات المظهرية والمجهرية

ظهرت بكتريا *E.coli* بمستعمرات وردية على اكار الماكونكي MacConkey agar نتيجة لتخمرها سكر اللاكتوز كما موضح في الشكل (١) ، وفق ماورد في (MacFaddin، ٢٠٠٠). كما أظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا بكتريا *E.coli* بشكل عصيات صغيرة سالبة لصبغة كرام ذات لون وردي غير مكون للابواغ وهذا متفق مع Holt وجماعته (١٩٩٤).

الشكل (١) مستعمرات بكتريا *E.coli* على وسط MacConkey agar

٢,١,٤:الفوحصات الكيموحيوية

أعطت الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *E.coli* نتائج موجبة لاختبار الكتاليز، اختبار الحركة ، اختباراحمر المثيل، وتخمر الكلوكوز واللاكتوز . ونتائج سالبة لفحص لاوكسديز وفوكس بروسكور، وكذلك سالبة لاستهلاك السترات لعدم قابليتها على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون من خلال عدم تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق. وموجبة لاختبار الاندول من خلال تكوين حلقة الاندول الحمراء نتيجة تحلل الترتيوفان وتكون الاندول. كما في الجدول (١) .

جدول (١) الاختبارات الكيموحيوية لجميع العزلات البكتيرية

الاختبارات الكيموحيوية	النتيجة
الاوكسديز	-
الكتاليز	+
الاندول	+
احمر المثيل	+
Vogesproskauer	-
استهلاك سترات	-
الحركة	+
الكلكوز	+
اللاكتوز	+
Hemolysin test	+

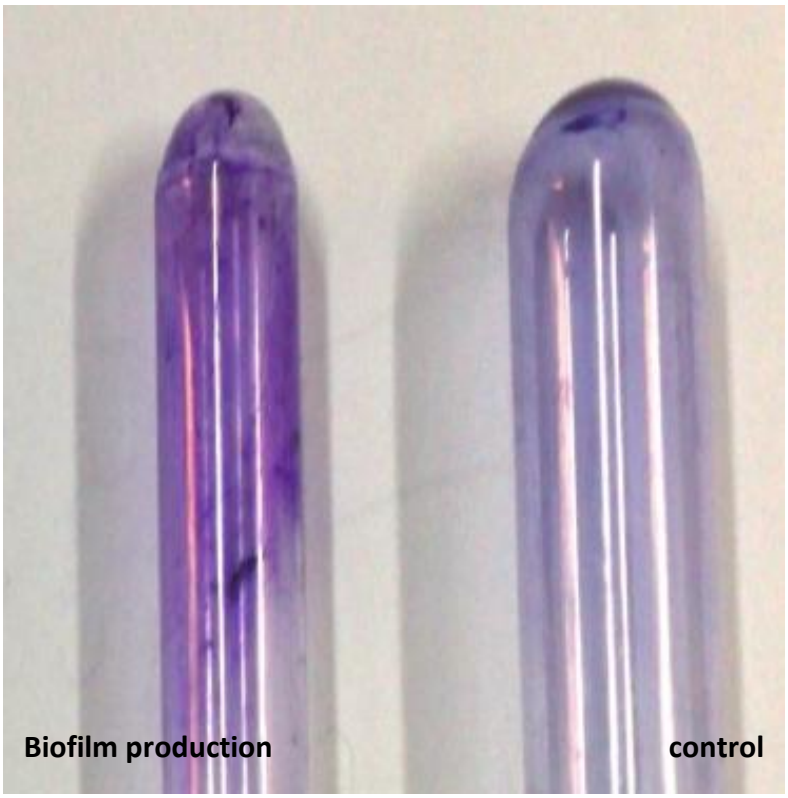
أوضحت الدراسة تغايرا واضحا في الاختبارات الكيموحيوية حيث يعتمد اختبار انزيم الاوكسيديز على امتلاك البكتريا للسايتوكروم C الضروري لعملية تنفس الخلايا حيث يعمل على تحفيز نقل الالكترونات ،حيث لاتمتلك معظم العزلات القابلية على انتاج انزيم الاوكسيديز وبالتالي فأن بكتريا القولون تسلك مسارات أخرى تستخدم في عملية التنفس هي سايتوكروم bd وسايتوكروم bo3 (Abramson *et al*, 2000). في حين اعتمد اختبار الكاتليز على وجود انزيم الكاتليز في الخلايا البكتيرية التي لها القابلية على انتاج بروكسيد الهيدروجين ومنها بكتريا القولون التي أعطت نتائج موجبة لهذا الاختبار حيث يعتبر بروكسيد الهيدروجين سام للخلايا حيث يعمل الانزيم على تحلل البروكسيد الهيدروجين الى ماء و H_2 و O_2 (Abramson *et al*, 2000) .

يعزى قابلية بكتريا *E.coli* على إعطاء نتيجة موجبة لفحص الاندول الى انتاج انزيم Tryptophanase الذي يعمل على تحويل الحامض الاميني التربتوفان ضمن مكونات الوسط الى الاندول اذ ان استخدام كاشف كوفاكس (حامض الهيدروكلوريك و كحول الاميل) يودي الى تكوين حقلة الاندول الحمراء وذلك لان كحول الاميل لايذوب بالماء وانما يعمل على تلوين الطبقة الدهنية في الجزء العلوي (Macfaddin,2000). كما أظهرت جميع العزلات نتيجة إيجابية لاختبار احمر المثيل وذلك لان البكتريا تخمر سكر الكلوكوز ويكون الناتج النهائي ثلاث احماض مايزيد من حموضة الوسط وخفض PH=4.4 مما يؤدي الى تغير لون الكاشف للون الأحمر (Macfaddin,2000) . أعطت جميع العزلات فحصا سالبا لاستهلاك السترات مما يشير الى عدم قابلية البكتريا على استهلاك السترات (عدم امتلاكها انزيم Citrate dismutase) كمصدر وحيد للكاربون من خلال عدم تغير لون الوسط من الاخضر الى الأزرق بينما تعزى قابلية العزلات على النمو على وسط السيمون ستريت الى قابليتها على استخدام املاح الامونيا كمصدر وحيد للنتروجين حيث يتم انتاج هيدروكسيد الامونيوم مما يؤدي الى ارتفاع قاعدية الوسط وإعطاء نتيجة ايجابيه للاختبار (Harley ,2005)

٢,٤: تكوين الغشاء الحيوي

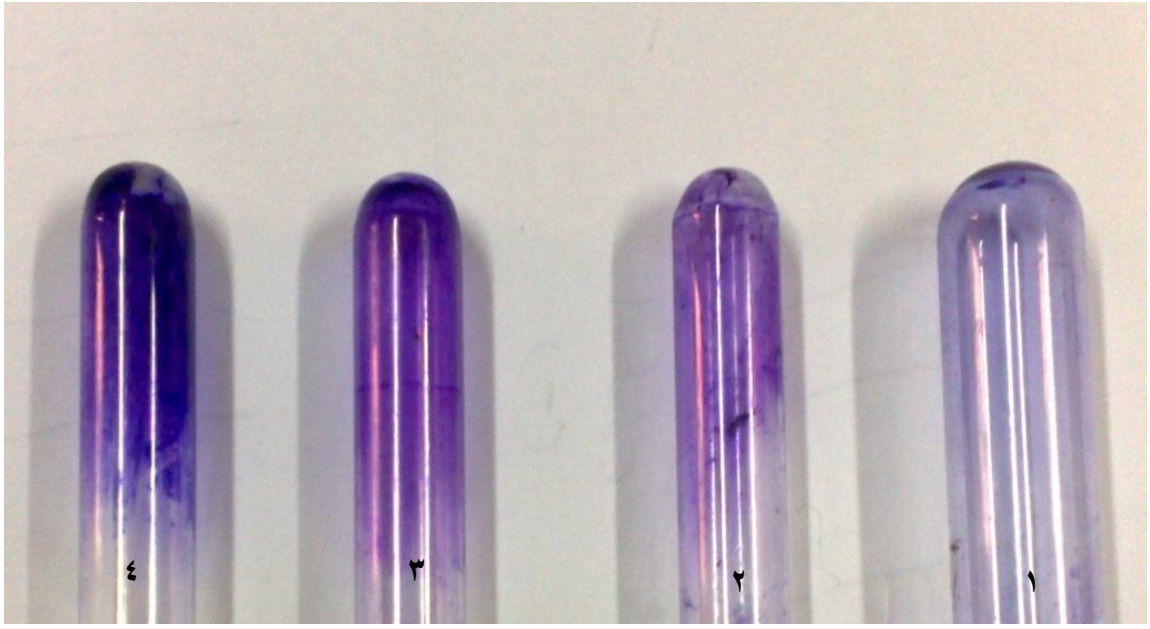
تم التحري عن تكوين الغشاء الحيوي من قبل بكتريا *E.coli* المعزولة من اخماج الجروح باستعمال طريقة الانابيب Tube Methods، حيث كانت النتيجة الموجبة بدلالة تكوين اغشية حيوية بلون بنفسجي على قعر والجدران الداخلية للانبوبة . أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٢) ان ١٠ عزلات (٨٣,٣ %) من اصل ١٢ عزلة من الـ *E.coli* قادرة على انتاج الغشاء الحيوي.

يعد انتاج الغشاء الحيوي من عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا القولون فهو يسمح للجراثيم للبقاء فترة أطول في موقع الإصابة (Hanna *et al.*, 2003) . تقوم البكتريا بأنتاج الغشاء الحيوي استجابة لمجموعة عوامل منها نقص المغذيات وانخفاض الاس الهيدروجيني (Sharma *et al.*, 2014) .يمنح انتاج الغشاء الحيوي العزلات البكتيرية العديد من الصفات منها صفة مقاومة المضادات الحياتية ومقاومة عملية الالتهام الخلوي ويعد الغشاء الحيوي السبب الرئيسي لاستمرار الخمج (Soto *et al.*, 2007).



الشكل (٢) انتاج الغشاء الحيوي من قبل بكتريا *E.coli* بطريقة الانابيب

من جهة أخرى تم دراسة تأثير درجات حرارة مختلفة (٢٥، ٣٠ ٣٧، ٤٤) م على تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *E.coli* حيث تم اختيار اكفأ عزلة في انتاج الغشاء الحيوي (بالاعتماد على سمك الغشاء في الانبوبة) واجراء الاختبار عليها. بينت النتائج الموضحة في الشكل (٣) والجدول (٢) هنالك تفاوت كبير في انتاج الغشاء الحيوي بأختلاف درجة الحرارة ، اذ لوحظ عدم قدرة العزلة البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بدرجة ٢٥ م اما بدرجة ٣٠ فتكون غشاء حيوي رقيق جدا . في حين بدرجة ٣٧ م و٤٠ م فقد تكون غشاء حيوي سميك أي ان سمك الغشاء الحيوي يزداد بزيادة درجة الحرارة ولحد معين.



الشكل (٣) تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *E.coli* بتأثير درجات حرارة مختلفة حيث ان

١ -تكوين الغشاء الحيوي بدرجة ٢٥ م

٢ -تكوين الغشاء الحيوي بدرجة ٣٠ م

٣ -تكوين الغشاء الحيوي بدرجة ٣٧ م

٤ -تكوين الغشاء الحيوي بدرجة ٤٤ م

جدول (٢) : تأثير درجات حرارة مختلفة في تكوين الغشاء الحيوي

ت	درجة الحرارة	تكوين الغشاء الحيوي
١	٢٥ م	-V
٢	٣٠ م	+V
٣	٣٧ م	++V
٤	٤٤ م	++V

حيث ان :

V– تمثل عدم تكوين الغشاء الحيوي

V+ تمثل تكوين غشاء حيوي رقيق

V++ تمثل تكوين غشاء حيوي سميك

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

&

Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

١ -تلوث ردهات الجروح ببكتريا القولون *E.coli*.

٢ -امتلاك معظم عزلات بكتريا القولون *E.coli* للغشاء الحيوي .

٣ -لدرجات الحرارة تأثير واضح في تكوين الغشاء الحيوي حيث يتناسب سمك الغشاء طرديا مع ارتفاع درجة الحرارة ولحد معين .

التوصيات Recommendations

١. الاهتمام بالنظافة الصحية لردهات الجروح

٢. ضرورة اجراء المسح الدوري لردهات الجروح لتحديد مصدر التلوث البكتيري والاهتمام بالنظافة الشخصية للعاملين فيها .

٣. ضرورة استعمال طريقة التخطيط على وسط Chrom Agar في تشخيص بكتريا القولون وذلك لسهولة الأستعمال والسرعة في اعطاء النتائج.

المصادر :

Abidi, S. H., Sherwani, S. K., Siddiqui, T. R., Bashir, A., & Kazmi, S. U. (2013). Drug resistance profile and biofilm forming potential of Pseudomonas aeruginosa isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. BMC ophthalmology, 13(1), 57.

Abramson, J.; Riistama, S. ; Larsson, G. ; Jasaitis, A. ; Svensson-Ek, M. ; Laakkonen, L. ; Puustinen, A.; Iwata S. ; and Wikstrom,M. (2000). The Structure of the Ubiquinol Oxidase from Escherichia coli and Its Ubiquinone Binding Site. J. N. S. B. 7:910-917.

Anjum, M. F.; Lucchini,S.; Thompson,A.; Hinton,J.C.D.and Woodward, M. J. (2003). Comparative genomic indexing reveals the phylogenomics of Escherichia coli pathogens.Infect. Immun. 71:4674-4683.

Ashraf, F.; Iram, S.; Riaz, Gul-e-Zar.; Rasheed, F.and Shaukat, M.(2015). Comparison between non-catheterized and catheter associated urinary tract infections caused by extended spectrum B-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* . *IJSR*.4(4): 1223-1227.

Betis, F.; Brest, P.; Hofman, V.; Guignot, J.; Kansau, I.; Rossi, B.; Servin, A. and Hofman, P. (2003). Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial migration, which inturn promotes cytokine-dependent upregulation of decayaccelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins. Infect Immun . 71:1774-1783.

Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J. S. and Morse, S.A. ; Mietzner,T. A. (2013). Jawetz and Adelbergs Medical Microbiology. 26th.ed. *The McGraw-Hill Medical. New York*.p: 229-399.

Brooks, G.F. ; Butel, J.S. and Mores, S.A.(2004). Medical Microbiology . Jawetz and Menick and Adelberg's (eds) . 23rded . Appleton and Lange ,USA., :250-252.

Chirumamilla, R.R.; Muralidhar, R.; Marchant, R.and Nigam, P.(2001). Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol. Cell. Biochem*. 224:159–168.

Conway, P.L. (1995). Microbial ecology of the human large intestine.In: G.R. Gibson and G.T. Macfarlane, eds. p.1-24. Human colonic bacteria: role in nutrition,physiology, and pathology. CRC Press, Boca Raton, FL.

Forbes, B.A., Sahm, D.F., and Weissfeild, A.S. (2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby, USA. pp: 323.

Fotador, U. ; Zaveloff, P. and Terracio, L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperature . *J. Basic.Microbio* 45.5:403-404 .

Hanna, A., Berg, M., Stout, V. & Razatos, A. (2003). Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic Escherichia coli. Applied Environmental Microbiology, 69 (8), pp: 4474-4481.

Harley, J. P.(2005). Laboratory exercises in microbiology, 6th ed. McGraw Hill, New York, NY. Hasan, R. J. *et al.* Structure– function analysis of decayaccelerating factor: identification of residues important forbinding of the *Escherichia coli* Dr adhesin andcomplement regulation. *Infect. Immun.* 70:4485–4493.

Hassan, A. Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 15(4), 305-311.

Holt, J.G. ; Krieg, N.R. ; Sneath, P.H. ; Statey, J.T. and Williams, S.T.(1994). Bergey's manuals of determinative bacteriology . 9th ed .Williams and Wilkins Baltimore.USA.: 605-612.

Iguchi, A.; Thomson, N.R.; Ogura, Y.; Saunders. D.; Ooka, T. and Henderson, I.R. (2009). Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 Strain E2348/69. *J Bacteriol*.191:347–354**.**

Macfaddin, J.F. (2000).Biochemical test for bacteria, 3nded.the Williams andWilkins. London. identification of medical Microbiology .8thed .The McGraw-Hill Companies.USA.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M. and Parker, J. (2006): Diagnostic Microbiology and Immunology. In: Brock Biology of Microorganisms. 11

Maurelli, A. T. (2007). Black –holes,antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. *FEMS. Microbiol. Lett*. 267:1–8.

Nester, E.W. ; Roberts, C.E. ; Pearsall, N.N. ; Anderson, D.G. and Nester, M.T.(1998).Microbiology a Human Perspective.2nded. WCB. McGraw-Hill Companies. Pp:599-604.

Niemirowicz, K., Swiecicka, I., Wilczewska, A. Z., Misztalewska, I., Kalska-Szostko, B., Bienias, K., ... & Car, H. (2014). Gold functionalized magnetic nanoparticles restrict growth of Pseudomonas aeruginosa. International J. of nanomedicine, 9,2217–2224.

Oliveira, I.R. ; Bessler, H.C. ; Bao, S.N. ; Lima, R. and Giugliano, L.G.(2007). Inhibition of Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) adhesion to caco-2 cell by human milk and its immunoglobulin and non-immunoglobulin fractions. *Braz. J. Microbiol.*38:86-92 .

Rebecca, N. and Elizabeth, M.(2005). Some virulence characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* in different patient groups. Indian. *J. Med. Res.* 122 : 143-147 .

Russo, T.A. and Johnson, J.R.(2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*. 5: 449-456.

Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S. & Gabrani, R. (2014) . Pseudomonas aeruginosa biofilm : potential therapeutic targets .J. Biologicals . 42(1): 1-7 .

Soto, S. M., Smithson, A., Martinez, J. A., Horcajada, J. P., Mensa, J., & Vila, J. (2007). Biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli strains: relationship with prostatitis, urovirulenc factors and antimicrobial resistance. The Journal of urology, 177(1), 365-368.

Th ed. Prentice Hall, Upper Saddle *River*. *NJ*. p: 778-816.

Trivedi, P.; Duan, Y.and Wang, N.(2010). Huanglongbing, a systemic disease, restructures the bacterial community associated with citrus roots. Appl Environ Microbiol.76:3427–3436.

Venacchio, L. ; Vezina, R.M. ; Mitchell, A.A. ; Lesko, S.M. ; Plaut, A.G.and Acheson, D.W.(2006). Diarrhoea in American infant and young children in the community setting :Incidence, clinical presentation and microbiology . *J. Pediatr. Infect*. Dis. 25:2-7 .

Vieira, N. ; Bates, S.J. ; Solberg, O.D. ; Ponce, K. ; Howsmon, R. ; Cevallos, W. ; Trueba, G. ; Riley, L. & Eisenberg, J.N.S. (2007). High prevalence of Enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a Remote region of Northern Coastal Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg* . 76.3:528-533 .

Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., & Varaldo, P. E. (2014). Antibiotic Resistanc Related to Biofilm Formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens, 3(3), 743–758.