Journal of Education and Science
Vol. 28, No.4, 2019, pp.93-107
ISSN 1812-125X
http://edusj.mosuljournals.com

Isolation And Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from Some Clinical And Environmental Samples And Study It's Activity for The Production of Pyocyanin And Protease

Nazar Mohammed Hassan Al-mamari
University of Mosul
College of Education for Pure Science
Biology Department
Nazar.almamary@yahoo.com

Adeba Younes Sharif Al-Numa'an
University of Mosul
College of Science
Biology Department
Shareefadeeba@yahoo.com

DOI: 10.33899/edusj.1970.163328

Received 25/ 10 / 2018 **Accepted** 03 / 12 / 2018

Abstract

The study includes isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from different sources as (90) samples were collected during a period from November (2017) to February (2018), including (wounds, suckers, urine, drinking water), Twinty five isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were identified depending on morphological and biochemical tests at a rate of (27.77%) from total samples including (13) isolates from suckers used for sucking solutions from respiratory tract, (7) isolates from wounds, (3) isolates from urine and (2) isolates from drinking water. The isolates from sucker formed the highest rate reached (14.44%) of total samples and (52%) of total *Pseudomonas aeruginosa* isolates, whereas the lowest rate was from drinking water (2.22%) of total samples and (8%) of total *Pseudomonas aeruginosa* isolates. The results showed that (92%) of total isolates were pyocyanin producer on King A agar medium, It was also found that all isolates of this bacteria have the ability to produce protease.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Pyocyanin, Protease.

بحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول بإشراف الباحث الثاني

عزل وتشخيص جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* من بعض العينات السريرية والبيئية ودراسة فعاليتها لإنتاج صبغة البايوسيانين وانزيم البروتييز

نزار محمد حسن المعماري
جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة
Nazar.almamary@yahoo.com

أديبه يونس شريف النعمان
جامعة الموصل
كلية العلوم
قسم علوم الحياة
Shareefadeeba@yahoo.com

DOI: 10.33899/edusj.1970.163328

الاستلام القبول

2018 / 10 / 25 2018 / 12 / 03

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* من مصادر مختلفة إذ جُمعت (90) عينة في الفترة بين شهر تشرين الثاني (2017) حتى نهاية شهر شباط (2018) شمِلت (الجروح، جهاز سحب السوائل من الجهاز التنفسي Sucker، الادرار، مياه الشرب)، تم الحصول على (25) عُزلة جرثومية تعود لجرثومة الزائفة الزنجارية والتي تم تشخيصها إعتماداً على الصفات المظهرية والإختبارات الكيموحيوية وبنسبة عزل بلغت (27.77%) من المجموع الكلي للعينات توزعت بواقع (13) عزلة من أجهزة سحب السوائل من الجهاز التنفسي، (7) عزلات من الجروح، (3) عزلات من الإدرار وعزلتان من مياه الشرب. شكلت عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية المعزولة من أجهزة سحب السوائل من الجهاز التنفسي أعلى نسبة إذ بلغت (14.44%) من المجموع الكلي للعينات و(52%) من مجموع عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية فيما كانت اقل نسبة عزل لهذه الجرثومة من عينات مياه الشرب وبنسبة (2.22%) من المجموع الكلي للعينات و(8%) من مجموع عزلات هذه الجرثومة. ووجد أن نسبة (92%) من المجموع الكلي لعزلات هذهِ الجرثومة كانت مُنتجة للصبغة الزرقاء المخضرة Pyocyanin على وسط اكار King A. اضافةً الى أن جميع العزلات لهذه الجرثومة اظهرت قابلية على إنتاج إنزيم البروتييز.

الكلمات المفتاحية: جرثومة الزائفة الزنجارية، صبغة البايوسيانين، انزيم البروتييز

المقدمة Introduction

تُعد جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* من الممرضات الانتهازية Opportunistic pathogen الواسعة الإنتشار في الطبيعة بسبب إمراضيتها للإنسان والحيوان والنبات، لهذه الجرثومة القدرة على العيش في بيئات متنوعة لإحتياجها متطلبات تغذوية قليلة ومقاومتها للمضادات الحيوية، فهى تمتلك قابلية فائقة على التكيف في البيئات غير المناسبة لنمو الاحياء المجهرية والتي قد تكون معدومة المغذيات تقريباً(1). ولها قدرة عالية في إحداث العديد من الإصابات للإنسان إذ تُعد أكثر الممرضات شيوعاً وتشكل خطراً حقيقياً على المرضى الراقدين في المستشفيات بشكل خاص كالاشخاص المصابين بالحروق والجروح ومرضى السرطان وزراعة الاعضاء ومرضى نقص المناعة فهى إحدى اهم انواع الجراثيم المسببة لما يعرف بعدوى المستشفيات Nosocomial infection (2).

يعتمد الطيف الواسع من الامراض التي تُسببها الجرثومة على إمتلاكها العديد من عوامل الضراوة، منها المقترن بالخلية كالاسواط Flagella والأهداب من نوع Pili IV التي تستعملها في عملية الالتصاق على الخلايا الظهارية والسطوح الحرة والاستيطان ومن ثم تكوين الغشاء الحيوي Biofilm الذي هو في الاصل عبارة عن متعدد سكريات خارجي مخاطي Mucoid exopolysaccharide يسمى Alginate تفرزه سلالات هذه الجرثومة وخاصةً المعزولة من الإفرازات التنفسية لمرضى التليف الكيسي Cystic fibrosis كعامل اخر من عوامل الضراوة المرتبطة بالخلية، فضلاً عن متعدد السكريات الدهني Lipopolysaccharides، كما تمتلك القدرة على غزو الانسجة الموضعية وتحطيمها ولها ميل لغزو مجرى الدم وإحداث الامراض الجهازية Systemic disease (3). ان قدرة جرثومة الزائفة الزنجارية على غزو الانسجة يعتمد على مقاومتها لعملية البلعمة Phagocytosis والدفاعات المناعية للمضيف Host immune defenses وإفرازها للإنزيمات الخارجية والذيفانات مثل انزيمات protease ، Elastase ، Coagulase، hemolysin، Lipase، gelatinase، DNase، Phosphatase alkaline، Lecithenase وLeukocidin فضلاً عن حاملات الحديد Siderphore التي تُعد عوامل ضراوة خارجية تعمل على تحطيم الحواجز الفيزيائية وتشارك في الغزو الجرثومي (4)، يُعد انزيم البروتييز من أهم عوامل الضراوة لهذه الجرثومة كونه يعمل على تحطيم الانسجة عن طريق تحليل المواد البروتينية خاصة في الانسجة العضلية، وفصل الالتحام الوثيق بين الخلايا الظهارية، كما يعمل على تحليل Fibronectin وتثبيط α-antiproteinase ويعمل على تحفيز إفراز المخاط Mucus (5). إضافة الى الصبغات التي لاتقل أهمية عن عوامل الضراوة الخارجية الاخرى، إذ تُنتج جرثومة الزوائف الزنجارية العديد من الصبغات أهمها صبغة البايوسيانين Pyocyanin pigment ذات اللون الازرق المخضر، والتي تُلاحظ على سطح الطبق الزرعي ويُشار لها بالقيح الأزرق Blue pus إذ تُميز الإصابات القيحية الناتجة بفعل هذه الجرثومة، فضلا عن وجود صبغات أخرى منها صبغة البايوفردين Pyoverdin pigment ذات اللون الاصفر المخضر، تتألق هذه الصبغة عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية، وصبغة البايوميلانين Pyomelanin pigment ذات اللون الاسود وصبغة البايوروبين Pyorubin pigment الحمراء (6). تُعد

صبغة البايوسيانين ناتجاً لعمليات الايض الثانوي، وهى تنتمي لعائلة الفينازينات لإحتوائها على نواة الفينازين، وفضلاً عن كونها عامل ضراوة فهى تعمل كجزيئة إشارة إستشعار حيوي، تشارك في مجموعة متنوعة من الأنشطة الحيوية الهامة بما في ذلك التعبير الجيني، وهى تُحافظ على حيوية الخلايا الجرثومية المنتجة لها وتدعم تشكيل الغشاء الحيوي، وتتميز بفعاليتها المضادة للجراثيم والفطريات (7).

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1- جمع العينات Collection of Specimens

جُمعت (90) عينة شملت (30) عينة لمسحات الجروح المتقيحة، و(30) عينة لمسحات من عدة أجهزة لسحب السوائل من الجهاز التنفسي الـ Sucker، و(20) عينة من إدرار المرضى المصابين بأخماج القناة البولية، كما جُمعت (10) عينات من مياه الشرب بإعتماد طريقة رابطة الصحة الأميركية American Public Health Association (APHA) والتي تتضمن جمعها في قناني زجاجية معقمة ذات سعة (500) مل حاوية على (0.4) مل من محلول ثايوسلفات الصوديوم بتركيز(10%) لإزالة تاثير الكلور المتبقي في عينة الماء، جُمعت العينات عن طريق تنظيف الحنفية التي تُجهز المنزل بماء الإسالة الرئيسي بصورة جيدة من المواد المتكلسة وعُقمت بطريقة التلهيب الكحولي ثم فتحت الحنفية على سعتها للتخلص من المياه الراكدة ثم مُلئت القنينة المعقمة وذلك بفتح الغطاء قرب الحنفية وملئت بسرعة، ونقلت العينات الى المختبر خلال مدة زمنية لاتتجاوز ثلاث ساعات لغرض عزل الجرثومة المستهدفة (8). جُمعت العينات المرضية من الاطفال والبالغين ومن الذكور والإناث من مستشفى السلام التعليمي والمستشفى الجمهوري العام ومستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى ابن الاثير للاطفال ومستشفى الحميات ومجمع الرازي الطبي التخصصي في الموصل، اما عينات المياه فقد جُمعت من بعض احياء مدينة الموصل في الفترة مابين تشرين الثاني (2017) حتى نهاية شباط (2018).

2- الاوساط الزرعية Cultural Media

أُستُعملت الاوساط الغذائية الأتية:

2-1- الاوساط الجاهزة:

وسط الاكار المغذي Nutrient agar، وسط المرق المغذي Nutrient broth ، وسط اكار الماكونكي MacConkey agar ، وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain-Heart infusion broth، وسط ماء الببتون Pepton water ، وسط آكار ثلاثي السكر والحديد Triple sugar iron agar(TSI)، وسط آكار السايمون والسترات Simmon citrate agar ، وسط الجيلاتين Gelatin Medium والتي جُهزت من قبل شركة (LAB M limited) الانكليزية.

2-2- الاوساط الزرعية المحضرة:

1- وسط آكار الدم Blood agar medium
2- وسط آكار السترمايد Cetrimide agar
3- وسط آكار King A
4- وسط آكار King B
5- وسط آكار حليب الفرز Skimmed milk agar
6- وسط آكار الحركة (وسط شبه الصلب) Motility medium
7- وسط آكار اليوريا Urea agar medium
8- وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفيتGlucose phosphate peptone water medium

حُضرت جميع الاوساط اعلاه حسب ماورد في (9) و(10).

3-عزل جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudo. aeruginosa*

لُقحت مسحات الجروح ومسحات جهاز سحب السوائل الـ Sucker مباشرةً على وسط آكار الدم ووسط آكار الماكونكي، اما عينات الإدرار فقد اخذ (0.1) مل من العينة الى وسط مرق نقيع القلب والدماغ وحُضنت بدرجة حرارة (37)° م ولمدة (24) ساعة ثم نُقلت حملة بواسطة العروة المعقمة من المزرعة السائلة الى وسط آكار الدم ووسط آكار الماكونكي ولقحت بطريقة التخطيط وحُضنت بدرجة حرارة (37)°م لمدة (24) ساعة، ثم نُقلت المستعمرات التي اظهرت صفات مزرعية مشابهة لصفات الجرثومة قيد الدراسة الى وسط آكار السترمايد ووسط King A وحضنت بدرجة حرارة (37)° م ولمدة (24) ساعة للتأكد من ان العزلات تعود الى جرثومة *Pseudo. aeruginosa*.

اما عن عزل الجرثومة من مياه الشرب فقد استعملت طريقة الترشيح الغشائي إذ رُشحت عينة الماء باستعمال اوراق ترشيح نوع Cellulose nitrate filter ذات ثقوب بقطر(0.45) مايكروميتر، وباستعمال قمع بوخنر Buchner funnelتحت ضغط مخلخل باستعمال جهاز تفريغ الضغط Vacuum pump إذ تم ترشيح (100) مل من عينة ماء الحنفية خلال ورقة الترشيح تحت ظروف التعقيم، ثم نُقلت ورقة الترشيح بإستعمال ملقط معقم الى سطح الوسط الغذائي الإنتخابي آكار السترمايد المحضر والمعقم والمصبوب في اطباق بتري، ثم حُضنت الأطباق عند درجة حرارة (37)° م، إذ تنتشر المواد الغذائية للوسط خلال ثقوب ورقة الترشيح لتصل الى الجراثيم المحتجزة على سطح ورقة الترشيح، وبعد (18-24) ساعة من التحضين تم ملاحظة مستعمرات جرثومة الزائفة الزنجارية في حال وجودها في العينة نامية على سطح ورقة الترشيح والتي يمكن التعرف عليها وتشخيصها من خلال ملاحظة إنتاجها لصبغة البايوسيانين الزرقاء المخضرة في حال كون العزلة منتجة للصبغة (11).

4- التشخيص Identification

شُخصت العزلات الجرثومية إعتماداً على الصفات الزرعية والمجهرية والإختبارات الكيموحيوية.

4-1- الصفات الزرعية والتشخيص المختبري

دُرست الصفات الزرعية لعزلات جرثومة الزوائف الزنجارية بإختبار قدرتها على النمو في وسط آكار الماكونكي ووسط آكار الدم وكذلك على الوسط الانتخابي وسط آكار الستريمايد، والوسط المعزز لإنتاج صبغة البايوسيانين King A، وذلك لتشخيص صفاتها المزرعية من حيث شكل ولون المستعمرات وطبيعة تحلل الدم (12). تم انتخاب المستعمرات النامية على وسطي آكار الماكونكي ووسط آكار الدم والتي تتصف بكونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز والمحللة للدم تحللاً كاملاً من نوع β-hemolysis والتي انتجت الصبغة على وسط King A ونمت ولم تُثبط على الوسط الانتخابي آكار الستريمايد، وحُفظت على موائل الآكار المغذي لإجراء الفحص المجهري والإختبارات الكيموحيوية الأتية.

4-2-الفحص المجهري

أُجري الفحص المجهري لخلايا العزلات الجرثومية النامية وذلك بنقل جزء من مستعمرة فتية بواسطة العروة المعقمة ومُزجت مع قطرة من الماء المقطر على سطح شريحة زجاجية نظيفة ثم نُشرت على سطح الشريحة وتركت لتجف وثُبتت بالحرارة ثم صُبغت بطريقة كرام وفُحصت تحت المجهر لملاحظة شكل الخلايا الجرثومية وطبيعة تفاعلها مع صبغة كرام (9).

4-3- الإختبارات الكيموحيوية

1-مجموعة إختبارات IMViC والتي تشمل (اختبار انتاج الاندول Indol production test , اختبار المثيل الاحمر Methyl red test, اختبار فوكس بروسكاور Voges-Proskauer test , اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test).

2- إختبار الأوكسديز Oxidase Test

3- إختبار الكتاليز Catalase test

4- إختبار الكشف عن انزيم محلل الدم Detection of haemolytic activity

5- إختبار إنتاج أنزيم اليوريز Urease test

6- إختبار الحركة Motility test

7- إختبار النمو على وسط آكار الستريمايد Grwth on Cetrimide agar

8- إختبار تميع الجيلاتين Gelatin liqufication test

9- إختبار النمو على وسط آكار ثلاثي السكر والحديد Growth on Triple Sugar Iron (TSI) agar test

10- إختبار قابلية النمو بدرجات الحرارة (4)°م و (42)°م

أُجريت جميع الاختبارات اعلاه حسب ماورد في (9) و(10).

5- إختبار قابلية الجراثيم المعزولة لإنتاج الصبغات على وسطي King A و King B

لُقحت اطباق من وسطي King A وKing B بطريقة التخطيط بمستعمرات فتية من الجراثيم قيد الدراسة، وحُضنت بدرجة حرارة (37)°م ولمدة (24-72) ساعة ولوحظت قدرة الجراثيم على إنتاج الصبغات (13) .

6- إختبار قابلية الجراثيم المعزولة لإنتاج انزيم البروتييز Protease production test

استُعمل هذا الإختبار للتحري عن قابلية الجراثيم على إنتاج انزيم البروتييز إذ لُقح وسط آكار حليب الفرز Skimmed milk agar بعزلات جرثومية نقية وبشكل خط في الوسط الزرعي، وحُضنت الاطباق عند درجة حرارة (37)°م ولمدة (24) ساعة، وعُدَّ تكّون منطقة شفافة حول خط الزرع دليلاً على قدرة الجرثومة على إنتاج انزيم البروتيز وحصول تحلل مائي للكازائين وعدّت النتيجة موجبة (10).

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

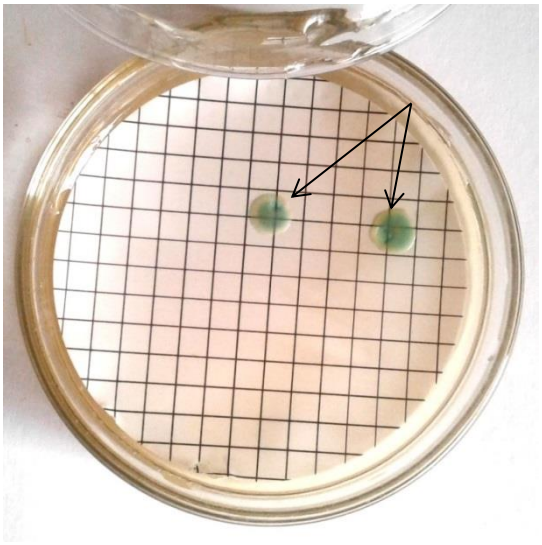
1-عزل جرثومة *Pseudo.aeruginosa*

تم الحصول على (25) عزلة جرثومية تعود للنوع *Pseudo.aeruginosa* من مجموع (90) عينة جُمعت من مصادر مختلفة شمِلت جروح متقيحة (30) عينة، أجهزة سحب السوائل من الجهاز التنفسي الـ Sucker (30) عينة، إدرار لمرضى مصابين باخماج القناة البولية (20) عينة وكذلك عينات من مياه الشرب (10)، وكانت نسبة العزل (27.77%) من المجموع الكلي للعينات. توزعت بواقع (7) عزلات من الجروح، (13) عزلة من جهاز سحب السوائل من الجهاز التنفسي، (3) عزلات من الإدرار وعزلتان من مياه الشرب وكما موضح في الجدول (1).

الجدول (1): اعداد ونسب عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية المعزولة من مصادر مختلفة.

مصدر عزل العينة	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية من المجموع الكلي للعينات	النسبة المئوية من المجموع الكلي للعزلات
جهاز الـ Sucker	30	13	14.44	52
الجروح	30	7	7.77	28
الإدرار	20	3	3.33	12
مياه الشرب	10	2	2.22	8
المجموع الكلي	90	25	27.77≈	100

كما يبين الجدول (1) ان عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية المعزولة من جهاز سحب السوائل من الجهاز التنفسي شكلت اعلى نسبة بلغت (14.44%) من المجموع الكلي للعينات و (52%) من مجموع عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية تليها عزلات الجروح بنسبة (7.77%) من المجموع الكلي للعينات و(28%) من مجموع عزلات هذه الجرثومة، ثم عزلات الإدرار وبنسبة (3.33%) و (12%) من مجموع العينات وعزلات هذه الجرثومة على التوالي، بينما كانت اقل نسبة عزل لهذه الجرثومة من عينات مياه الشرب وبنسبة (2.22%) من المجموع العينات و (8%) من مجموع العزلات والتي عُزلت بطريقة الترشيح الغشائي وكما موضح في الشكل (1).



الشكل(1): مستعمرات جرثومة الزائفة الزنجارية المعزولة من مياه الشرب بطريقة الترشيح الغشائي.

جاءت نسبة عزل جرثومة الزائفة الزنجارية من جهاز الـ Sucker لمجموع العزلات اعلى بكثير من النتائج التي حصلت عليها (14) إذ عزلت هذه الجرثومة من الجهاز نفسه في مستشفيات مدينة الموصل بنسبة (17.8%) وكانت قد حصلت على (15) عزلة لجرثومة الزائفة الزنجارية من اصل (84) عزلة جرثومية مختلفة، وتُعد هذه النسبة مقاربة لنسبة عزل الجرثومة في الدراسة الحالية اذا ما قورنت بنسبة عزلها من المجموع الكلي للعينات. كما عزل (15) انواع مختلفة لجنس الزوائف *Pseudomonas* spp. من الجهاز نفسه في مستشفى ابن الاثير في مدينة الموصل وحصل على (8) عزلات جرثومية تعود لجنس الزوائف من اصل (30) عزلة جرثومية مختلفة وبنسبة (26.6%) والتي تُشكل نصف النسبة التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة، ونسبة اعلى اذا ماقورنت مع نسبة عزل الجرثومة من المجموع الكلي للعينات. اما دراسة (16) فقد أظهرت نسبة عزل لجرثومة الزائفة الزنجارية بلغت (39.28%) من مجموع (140) عينة سريرية مختلفة، وبلغت نسبة عزل الجرثومة من الجروح (38.2%) ومن الإدرار (25.5%) وهى اعلى من النسب التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية لنفس مصادر العزل. واتفقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة (17) إذ عزلت الجرثومة بنسبة (40.55%) من مجموع (108) عينة سريرية مختلفة، وبلغت نسبة عزل الجرثومة من الجروح والإدرار (31.55%) و (12.3%) على التوالي وتُعد هذه النسب اعلى اذا ما قورنت بالنسب التي تم الحصول عليها في

الدراسة الحالية من مجموع العينات. واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة (18) فيما يخص نسبة عزل الجرثومة من الإدرار إذ كانت (12.24%) فيما عزلها من الجروح وبنسبة (9.18%) وذكر الباحث نفسه انه عزلها من مختلف مناطق الجسم بنسبة بلغت (67.32%) من مجموع (98) عينة وهى نسب اعلى من نسب عزل الجرثومة من مجموع العينات في الدراسة الحالية، وكانت نسبة عزل جرثومة الزائفة الزنجارية من الجروح والادرار في الدراسة الحالية مقاربة لنتائج دراسة (19) الذان حصلا على (75) عزلة تعود لجرثومة الزائفة الزنجارية من اصل (100) عينة جُمعت من حالات مرضية مختلفة، وكانت نسبة عزل الجرثومة من الجروح (13.33%) و (10.66%) من الإدرار وهذه النسب اعلى اذا ما قورنت بالنسب التي تم الحصول عليها من مجموع العينات. وكانت نتائج هذه الدراسة مقاربة لنتائج دراسة (20) فيما يخص عزل الجرثومة من مياه الشرب إذ عُزلت هذه الجرثومة من مياه الشرب في محافظة نينوى بنسبة (5.2%) وكانت قد حصلت على (7) عزلات تعود لهذه الجرثومة من بين (135) عزلة جرثومية مختلفة عزلتها من اصل (900) عينة لمياه الشرب.

يعود سبب عزل جرثومة الزائفة الزنجارية بنسب عالية من أجهزة سحب السوائل من الجهاز التنفسي الى قلة العناية بهذه الاجهزة وعدم الادامة والغسل الدوري لها بسبب الظروف الحالية لمستشفيات المحافظة وازدياد اعداد المراجعين وشحة المطهرات في هذه المستشفيات مما وفر ظروفاً ملائمة لنمو هذه الجرثومة، كما موضح في الشكل (2)، وان الاستعمال المتتالي للجهاز نفسه في سحب السوائل من الاشخاص المصابين باصابات مختلفة والاصحاء يُسهم في زيادة التلوث بهذه الجرثومة وانتشارها فقد اشار (21) الى ان تلوث جهاز الـ Sucker بجرثومة الزائفة الزنجارية يُعد احد اسباب انتشارها ونقل العدوى في بيئة المستشفيات. وتعود الإختلافات في نسب العزل للجرثومة نفسها من دراسة لأُخرى حسب مصدر العزل، وتفاوت نسبة النظافة في المستشفيات، ونوعية مواد التعقيم والمطهرات المستعملة، كما وتعتمد على عدد العينات قيد الدراسة (22).

الشكل (2): احد اجهزة الـ Sucker الملوثة بانواع مختلفة من الجراثيم اهمها جرثومة الزائفة الزنجارية التي انتجت الصبغة في المنطقة المستعمرة.

2- تشخيص جرثومة Pseudo.aeruginosa

شُخصت الجراثيم المعزولة اعتماداً على الصفات الزرعية، المجهرية والإختبارات الكيموحيوية المبينة في الجدول (2)، إذ ظهرت مستعمرات جرثومة الزائفة الزنجارية على وسط الآكار المغذي كبيرة لها مظهر مرتفع وحافات مسطحة، ورائحة تشبه رائحة العنب، اغلبها منتجة لصبغة البايوسيانين، وكانت المستعمرات شاحبة على وسط آكار الماكونكي لكونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز وهذه النتائج جاءت متوافقة مع ماذكره (12)، كما ظهرت المستعمرات على وسط آكار الدم مخاطية محللة للدم تحللاً كاملاً β-hemolytic وهذا يتفق مع ما ذكره (9). وظهرت مستعمرات معظم العزلات على وسط آكار King A كبيرة قليلة التحدب ذات حافات مشرشرة مميزة نتيجةً لافرازها صبغة البايوسيانين، بينما ظهرت المستعمرات بلون اصفر لماع على وسط آكار King B نتيجةً لافراز صبغة البايوفردين الفلورسينية. كما نمت عزلات هذه الجرثومة على وسط آكار السترمايد الانتقائي الحاوي على مادة Cetrimide بنسبة (0.03%) وهذه النسبة لاتؤثر على نمو جرثومة الزائفة الزنجارية ولكنها تُثبط نمو بقية الجراثيم. كما أظهرت النتائج قدرة جميع العزلات على النمو بدرجة حرارة (42)°م وهي صفة تشخيصية مهمة للنوع *Pseudo.aeruginosa* عن بقية انواع الجنس Pseudomonas ولم تنمو جميع العزلات عند درجة حرارة (4)°م، كما أظهرت جميع العزلات منطقة ضبابية منتشرة حول خط الطعن في الوسط شبه الصلب كدليل لقدرة الجرثومة على الحركة كما كانت جميع العزلات مميعة للجيلاتين عند نموها على وسط الجيلاتين المغذي (9).

اما نتائج الفحص المجهري للمسحات الجرثومية المصبوغة بصبغة كرام فقد ظهرت خلايا هذه الجرثومة بشكل عصيات صغيرة سالبة لصبغة كرام وهذا يتفق مع ماذكره (10).

تميزت جرثومة الزائفة الزنجارية بكونها موجبة لإختبار الاوكسيديز، إختبار الكتاليز وكذلك إختبار اليوريز. فيما كانت جميع العزلات سالبة لإختبارات؛ الاندول, المثيل الاحمر وفوكس بروسكاور، في حين ابدت جميع العزلات نتيجة موجبة لإختبار استهلاك السترات الذي يُستعمل للتحري عن قابلية الجراثيم على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون. وعند تنمية العزلات على وسط آكار ثلاثي السكر والحديد (TSI) تبين ان جميع العزلات قيد الدراسة كانت غير مخمرة لاي نوع من انواع السكريات الثلاثة (كلوكوز- لاكتوز- سكروز) وغير مكونة لغاز (CO_2) وغير منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين وهذا يتفق مع ماذكره (9).

الجدول (2) : نتائج الإختبارات التشخيصية لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa*.

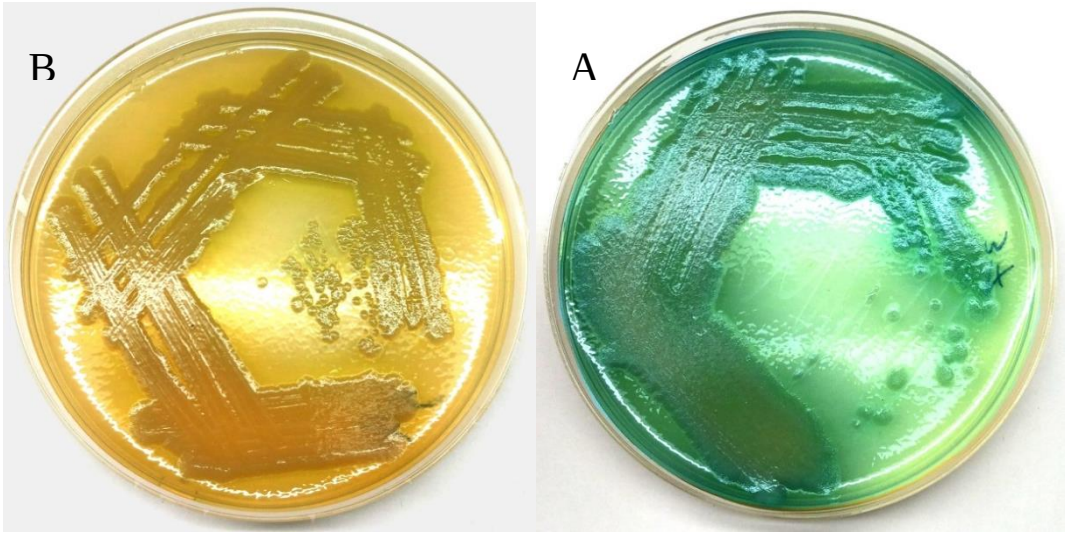
ت	الإختبار		النتيجة
1	استجابة الخلايا لصبغة كرام		-
2	شكل الخلايا على الشريحة		عصوية
3	النمو على آكار ماكونكي		+
4	النمو على آكار السترمايد		+
5	النمو على آكار TSI	القعر	قاعدي
		السطح	قاعدي
		تكوين غاز	-
		إنتاج H_2S	-
6	تحليل كريات الدم الحمر(نوع β-hemolysis) عند النمو على آكار الدم		+
7	الحركة في الوسط شبه الصلب		+
8	استهلاك السترات		+
9	إختبار الاندول		-
10	إختبار فوكس بروسكاورVogas-proskauer		-
11	إختبار المثيل الاحمر		-
12	انتاج انزيم الكتاليز		+
13	انتاج انزيم الاوكسيديز		+
14	انتاج انزيم اليوريز		+
15	انتاج انزيم الجيلاتينيز		+
16	إنتاج الصبغة		V
17	النمو عند درجة حرارة 4 °م		-
18	النمو عند درجة حرارة 42 °م		+

+ : نتيجة موجبة

- : نتيجة سالبة. V : متغاير

3- إنتاج صبغة البايوسيانين من قبل جرثومة الزائفة الزنجارية على الوسط الصلب

استُعمل وسط آكار King A لإختبار قدرة الجراثيم المعزولة على إنتاج صبغة البايوسيانين والذي يحتوي على املاح البوتاسيوم والمغنيسيوم بتراكيز كافية لتعزيز إنتاج هذه الصبغة من خلال دعم الجينات المشفرة لها وتثبيط إنتاج صبغة البايوفردين الفلورسينية، بينما يحتوي وسط آكار King B على تراكيز قليلة من هذه الاملاح وتراكيز كافية من الفوسفات لتثبيط إنتاج صبغة البايوسيانين ودعم انتاج صبغة البايوفردين (23)، الشكل (3)، إذ أظهرت توهجاً عند تعريضها للاشعة فوق البنفسجية الشكل(4). وهذا يتفق مع ماورد في (9).



الشكل(3): A- إنتاج صبغة البايوسيانين من قبل جرثومة الزائفة الزنجارية على وسط King A.

B- تثبيط إنتاج صبغة البايوسيانين على وسط King B وإنتاج صبغة البايوفردين.

الشكل (4): توهج المستعمرات المنتجة لصبغة البايوفردين عند تعريضها للاشعة فوق البنفسجية.

أظهرت النتائج ان (23) عزلة من بين (25) عزلة لجرثومة الزائفة الزنجارية كانت منتجة للصبغة الزرقاء المخضرة (البايوسيانين) على وسط آكار King A وبنسبة (92%)، إذ انتجت جميع عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية المعزولة من أجهزة الـ Sucker وكذلك المعزولة من الجروح صبغة البايوسيانين على هذا الوسط وبنسبة (56.5%) و (30.4%) على التوالي، وكانت عزلة واحدة من اصل عزلتين لهذه الجرثومة المعزولة من

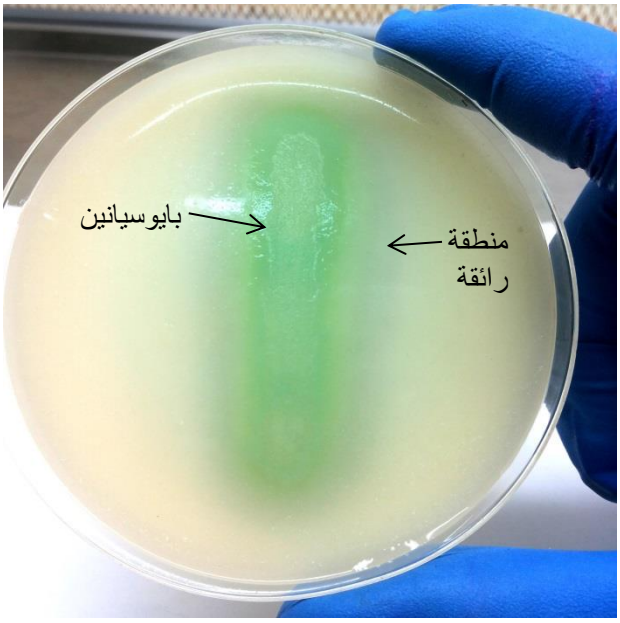
مياه الشرب منتجة للصبغة على هذا الوسط وبنسبة (4.4%) من المجموع الكلي للعزلات، وكما مبين في الجدول (3)، جاءت هذه النتائج متفقة مع (24) الذي أشار الى ان مابين (90–95%) من عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية تكون منتجة لصبغة البايوسيانين، وتطابقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة (25) الذي وجد ان (45) عزلة من اصل (49) عزلة لجرثومة الزائفة الزنجارية كانت منتجة لصبغة البايوسيانين وبنسبة (92%)، إذ ان (12) عزلة من اصل (13) عزلة من الجروح والحروق كانت منتجة لصبغة البايوسيانين، وكذلك (10) عزلات من اصل (11) عزلة من الإدرار اظهرت قدرة لانتاجها. كما اتفقت مع نتائج دراسة (18) التي وجدت ان (60) من اصل (66) عزلة لجرثومة الزائفة الزنجارية كانت منتجة لصبغة البايوسيانين وبنسبة (90.88%)، وكانت جميع عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية المعزولة من الجروح منتجة للصبغة، و (10) من اصل (12) عزلة لهذه الجرثومة المعزولة من الإدرار منتجة لها .

الجدول (3): اعداد ونسب عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية المنتجة لصبغة البايوسيانين على وسط آكار King A.

مصدر العزل	عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة للصبغة	النسبة المئوية للعزلات المنتجة للصبغة
جهاز الـ Sucker	**13**	**13**	**56.5**
الجروح	**7**	**7**	**30.4**
الإدرار	**3**	**2**	**8.7**
مياه الشرب	**2**	**1**	**4.4**
المجموع الكلي	**25**	**23**	**100**

4- قابلية جرثومة الزائفة الزنجارية على إنتاج انزيم البروتييز Protease

عند تنمية العزلات الجرثومية على وسط آكار حليب الفرز اوضحت الدراسة الحالية قدرة جميع العزلات على إنتاج انزيم البروتييز Protease الذي يُعد احد عوامل الضراوة المهمة لهذه الجرثومة، وبنسبة (100%) إذ أظهرت منطقة رائقة حول المستعمرات النامية نتيجة التحلل المائي للكازائين كدليل على إنتاج انزيم البروتييز، وقد اتفقت هذه النتائج مع دراسة (26) وكذلك مع دراسة (27) التي عزلت جرثومة الزائفة الزنجارية من مصادر مختلفة ووجدت ان جميع عزلات هذه الجرثومة منتجة لانزيم البروتييز وبنسبة (100%). وأظهرت العزلات المنتجة لصبغة البايوسيانين انتشار الصبغة على هذا الوسط إذ يُعد من الاوساط المهمة لملاحظة انتاج الصبغات الجرثومية وجاءت هذه النتائج متفقة مع نتائج دراسة (25)، وكما مبين في الشكل (5). إذ يُعد هذا الانزيم احد عوامل الضراوة المهمة والمسؤول عن تحطيم الانسجة ونخر الجلد في الاصابات الجلدية ونزف الاعضاء الداخلية في الاصابات الجهازية (5).



الشكل (5): تكون منطقة رائقة حول نمو جرثومة الزائفة الزنجارية على وسط آكار حليب الفرز نتيجة تحلل الكازائين اضافة لإنتاج صبغة البايوسيانين.

References المصادر

(1) Vessillier, S.; Delolne, F.; Bernillon J.; Saulueir, J. and Wallach, J. Euro. J. Bioch., 268 (4): 1049-1057 (2001).
(2) Streeter, K. and Katouli, M., Epidem. and Med., 2(1): 25-32 (2016).
(3) Zubair, M.; Malik, A.; Ahmad, J.; Rizvi, M.; Farooqui, K.; Rizvi M., J. of Biomd., 3(2): 147-157 (2011).
(4) Westman, E.L. ; Matewish, J.M. and Lam, J. S., Pathogenesis of bacterial infections in animals . Edited by Gyles, C.L. ; Prescott, J. F. ; Songer, J.G. and Thoen, C.O. 4th ed., Jhonwiley and Sons, Inc., publication (2010).
(5) Wilson, R. and Dowling, R.B., Thorax, 53(3): 312-219 (1998).
(6) Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J.S. ; Mores, S. A., Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 25th ed. Lange, McGraw -Hill. USA (2010).
(7) Jayaseelan, S.; Ramaswamy, D. and Dharmaraj, S., World J. of Micro. and Biot., (304): 1159-68 (2014).
(8) APHA. American public health association., Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health association, 20th ed., Washington D.C. , USA (1998).
(9) Procop, G.W.; Church, D.L.; Hall, G.S.; Janda,W.M.; Koneman, E.W.; Schreckenberger, P.C.; and Woods, G.L., Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th ed. Wolters Kluwer Health, Philadelphia (2017).
(10) Cappuccino, J. G., and Welsh, C. T., Microbiology: A Laboratory Manual. 11th ed. Pearson Education. England (2018).
(11) Hassan, K. and Hussein T. A., Ira. J. of Sci., 4; 3203-5209 (2015). (In Arabic).
(12) Baron, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R., Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. Missouri (2007).
(13) Cruickshank , R . ; Marion , B . and Duguid , S., Medical Microbiology : The Practice of Medical Microbiology . 12 th . ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK. Vol 2 (1975) .
(14) Al-Naemi N. A. F., M.Sc. Thesis, College of Science, University of Mosul (2001). (In Arabic).
(15) Al-Khaffaf, M. N. S. M.Sc. Thesis. College of Medicine. University of Al-Qadissiya (2012).
(16) Al-Damluji A. S. S., ph.D. Thesis, College of Science, University of Baghdad (2008). (In Arabic).
(17) Zeki, L. S., M.Sc. Thesis. College of Science. University of Baghdad (2009).
(18) Mohammed, H. A., M.Sc. Thesis. College of Science. University of Baghdad (2014).

(19) Abdullah R. M. and Mehdi A. F., J. of Lif. Sci. Res. Cen., 10 (1): 45-49 (2016). (In Arabic).
(20) Al-Oqaiday A. J. S.,M.Sc. Thesis, College of Science, University of Mosul (2009). (In Arabic).
(21) Mims, C.; Drockell , H. M.; Goering , R. V., Mims Medical Microbiology. 3th ed., Elsevier Mosby, USA (2004).
(22) Livermore, D.M., Inter. J. of Antimicr. Agents, (3): 1-7 (2007).
(23) Ramalho, R.; Cunha, J.; Teixeira, P. and Gibbs, P.A., Microb. Meth., 49:69-74 (2002).
(24) Saha, S.; Thavasi, R.; and Jayalakshmi, S., Res. J. of Micro., 3(3), 122-128. (2008).
(25) Al-Imari, H.M.H., M.Sc. Thesis. College of Science. University of Baghdad (2011).
(26) Hoiby, N.; Johansen, H.K.; Moser, C.; Song, Z.; Ciofu, O. and Kharazmi, A., Micro. and Inf., (3): 23-35 (2001).
(27) Al-Mashhadani K. A. M. ph.D. Thesis, College of Science, University of Mosul (2004). (In Arabic).