

Effect of Virulen Factor on Hydrophobicity cell wall of *Staphylococcus* and it's Attached on Meat

دراسة تأثير بعض عوامل الضراوة على الخاصية الراهبة للماء Hydrophobicity لجدار بكتريا *Staphylococcus* والالتصاق باللحوم

ا.م.د. لمى عبد الهادي ا.م.د. اسراء عبد الجبار م. انعام عبد القادر
قسم علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة -ابن الهيثم /جامعة بغداد

المستخلص

شملت الدراسة الحالية جمع 35 عزلة بكتيرية *Staphylococcus* من مستشفى الكاظمية والنعمان ومختبر الاحياء المحيرية في كلية التربية ابن الهيثم وانتخب منها 10 عزلات مشخصة ودرست انتاجها لانزيم Hemolysin و Coagulase و urease فضلا عن تخمرها لسكر Mannitol . واختبرت الخاصية الراهبة للماء لجدار البكتريا بطريقة hydrocarbon adherence ، وقابلية البكتريا على الالتصاق في اللحم و اشارت النتائج الى ارتفاع الخاصية الراهبة للماء للعزلات المنتجة لانزيم Hemolysin ولم تلاحظ هذه الخاصية في العزلات المنتجة لانزيم urease scoagulase . اما قابلية العزلات على الالتصاق في اللحم فقد اشارت النتائج ان العزلات المنتجة لانزيم Hemolysin قابلية اكثر بالالتصاق في قطع اللحم . اما العزلات المنتجة لانزيم Coagulase و urease فلم يلاحظ اي تأثير لهما على قابلية الالتصاق في اللحم . اما نتائج التحليل الاحصائي فقد لوحظ عدم وجود علاقة بين الخاصية الراهبة للماء والالتصاق في قطع اللحم اذا كانت قيمة ($r = -0.870$).

Summary

the study included the collecting of 35 isolates bacteria *Staphylococcus* of Kadhimiya hospital, Numan hospital and microbiology labortary in Department of biology / Collage of education ibn al Haitham and selected 10 isolated . Studied enzyme production Hemolysin Coagulase and urease as well as sugar fermentation Mannitol. And tested property hydrophobic the wall of the bacteria in a way that hydrocarbon adherence, and susceptibilty of bacteria to attachment to the meat .the results indicate high hydrophobic property of the isolates producing enzyme Hemolysin but This increase wasnot observed in isolates producing enzyme coagulase and urease. Susceptibility of the isolates to attach to the meat, the results indicated that the isolates produced Hemolysin portability more in attached the pieces of meat. The isolates producing Coagulase and urease enzyme did not attach to the meat . Either statistical results have been observed no relationship between property hydrophilic and attach the pieces of meat if the value ($r = -0.870$)

المقدمة

تتواجد البكتريا في كل ما يحيطنا من مواد صلبة وسائلة فضلا عن تواجدها في اجسامنا بشكل طبيعي او انتهازى وذلك لقدرتها على الانتشار والالتصاق في اجسامنا بسبب امتلاكها عوامل ضراوة مثل المحفظة Capsule او الشعيرات fimbriae او الاهلاب Pili او السكريات المتعددة الدهنية Lipopolysaccharide وغيرها من العوامل التي تمكن البكتريا من الالتصاق بخلايا المضيف (1) في حين اشارت المصادر الى وجود صفات اخرى تحدد مدى قابلية البكتريا على الالتصاق بسطح المضيف ومن هذه الصفات هي الخصائص السطحية لجدار البكتريا والتي تشمل الخاصية الراهبة والمحبة للماء Hydrophobic and Hydrophilic والتي تساهم بشكل كبير في عملية الالتصاق (2) . اذ اشار (3) ان الخصائص السطحية تختلف من نوع الى اخر وايضا تختلف بين النوع الواحد اذ لاحظ ان البكتريا *Staphylococcus aureus* تمتلك خصائص راهبة للماء في حين بكتريا *Staphylococcus epidermads* تمتلك خصائص محبة للماء وذلك يعود الى امتلاكها انزيمات معينة تؤثر بشكل كبير في هذه الخصائص في حين اشار (3) الى ان امتلاك بكتريا *Staph . aureus* بروتين A يؤدي الى زيادة الخاصية الراهبة للماء فضلا عن وجود انزيم Coagulase. كما اشار (4) الى ان وجود المحفظة تعمل على زيادة الخاصية المحبة للماء في حين اشار (5) الى عدم تأثير وجود المحفظة على الخاصية الراهبة للماء . كما بين (4) الى ان بكتريا *epidermidis Staphylococcus* كانت تمتلك خاصية الراهبة للماء اكثر من بكتريا *Staphylococcus saprophyticus* في حين تصبح ذات خاصية محبة للماء عند معاملة البكتريا بانزيم البيبين ولا تتاثر هذه الصفة عند المعاملة بالبنسلين . اما (6) فقد اشار الى وجود علاقة بين قابلية البكتريا على تكتل كريات الدم الحمراء والالتصاق . في حين لاحظ (2) ان البكتريا التي تمتلك عوامل

ضراوة كثيرة Highly virulent toxigenic تكون اكثر قابلية على الالتصاق من البكتريا التي لاتتمتلك او تمتلك كمية قليلة من عوامل الضراوة Non or weakly virulent .
لذا هدفت الدراسة الحالية الى دراسة علاقة بعض عوامل الضراوة كانزيم urease و coagulase و hemolysin على الخصائص السطحية لبكتريا Staphylococcus وفي الالتصاق في اللحم .

المواد وطرق العمل

1- تم الحصول على 32 عزلة بكتيرية من مستشفى الكاظمية والنعمان ومختبر الاحياء المجهرية في كلية التربية للعلوم الصرفة وانتخبت 10 عزلات بكتيرية مشخصة واحريت لها الفحوصات البايوكيميائية حسب ما ذكر في (7) وفحصت قدرة العزلات على انتاج Hemolysin و انزيم Urease و Coagulase باستخدام وسط الدم Blood agar و urea agar وبلازما الدم على التوالي .

2- تحضير العالق البكتيري

نميت كل من العزلات في الوسط المغذي الصلب Nutrient agar بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة ثم غسلت بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئي ذو رقم هيدروجيني 6.8 ووضع المحلول في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة واهمل الرائق واضيف للراسب محلول الملح الفسيولوجي Saline solution للحصول على عدد بكتيري مقداره 1×10^7 خلية/مل اذ قورنت كثافة نموها مع محلول ثابت العكرة القياسي (مكفر لاند) (8)

2- قياس الخاصية الراهبة للماء

اتبعت طريقة ال hydrocarbon adherence التي ذكرها Dickson و Koohmaraie (9) اذ اضيف 4 مل من عالق البكتريا (1×10^7 خلية/مل) في انبوب اختبار و 4 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئي ذو رقم هيدروجيني 6.8 و 1 مل من الزايلين xylene وترك الخليط لمدة 10 دقائق بدرجة 37م ثم جرى تحريك الخليط لمدة 15 دقيقة باستخدام الخلاط المغناطيسي magnetic stirrer و حضن لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37م ثم فصلت الطبقة المائية لتقدير الخاصية الراهبة للماء بقياس الامتصاص الضوئي باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer للطبقة المائية على طول موجي 540 نانومتر واستخدم العالق البكتيري ومحلول دارئي فوسفات البوتاسيوم ومحلول الملح الفسيولوجي Saline solution بدل الزايلين كمحلول سيطرة (Blank).

جرى حساب الخاصية الراهبة للماء (Hydrophobic) حسب المعادلة التالية:

قراءة الامتصاصية لمحلول السيطرة – قراءة الامتصاصية لمحلول المعاملة

قراءة الامتصاصية لمحلول السيطرة

• تم طرح النتيجة النهائية من 1

3 – قياس قابلية البكتريا في الالتصاق باللحم

تم استخدام لحم طازج (2)غم وقطع الى قطع صغيرة بحجم 0.5 سم ويطرق معقمة وحفظت بدرجة حرارة 10^{-6} م لحين الاستعمال وبعد ذلك ذوبت ووضع في قناني معقمة واضيف اليها 2 مللتر من عالق البكتريا و 18 مللتر من دارئي الفوسفات ومزجت لمدة 5 دقائق ، ثم نقلت قطع اللحم الى دورق يحتوي 99 مللتر من دارئي الفوسفات ومزجت لمدة 15 ثانية وحسب عدد البكتريا بطريقة صب الاطباق pour plate والعدد يمثل البكتريا ضعيفة الالتصاق بقطع اللحم، ثم نقلت قطع اللحم الى دورق يحتوي 99 مللتر من دارئي الفوسفات وسحقت لمدة 2 دقيقة وحسب عدد البكتريا بطريقة صب الاطباق pour plate والعدد يمثل البكتريا قوية الالتصاق بقطع اللحم

جرى حساب قوة التصاق البكتريا باللحم (Attachment bacteria) حسب المعادلة التالية:

عدد البكتريا قوية الالتصاق

عدد البكتريا ضعيفة الالتصاق + عدد البكتريا قوية الالتصاق

النتائج والمناقشة :

انتخبت 10 عزلات بكتيرية من 32 عزلة من بكتيريا *Staphylococcus* وشخصت ببعض الفحوصات اليايوكيميائية ثم اختبرت قابليتها على انتاج انزيم *Hemolysin* و *Urease* و *Coagulase* باستخدام وسط *Blood agar* و *urea agar* وبلازما الدم على التوالي والنتائج في جدول (1) يبين بعض الصفات الخاصة ببكتيريا *Staphylococcus* اذ ان العزلة 1 و 2 و 4 و 7 و 8 و 9 تمتلك انزيم *hemolysin* من نوع بيتا اما العزلات 3 و 5 و 6 و 10 فقد اظهرت امتلاكها انزيم من نوع كاما . اما العزلة 2 و 3 و 4 و 5 و 6 فقد اظهرت امتلاكها لانزيم *coagulase* و العزلة 1 و 5 و 6 و 7 و 8 فقد اظهرت امتلاكها لانزيم *urease* . اما نتائج جدول رقم (2) فيشير الى الفة البكتيريا للطور المائي وطور المذيب العضوي *xylyne* اعتمادا على الخاصية الراهية للماء على سطح البكتيريا اذا ان انخفاض القيمة يشير الى الخاصية الراهية للماء مما يجعلها اقل الفة للطور المائي ، اذ يبين الجدول وجود اختلافات في سطح البكتيريا من حيث الخاصية الراهية للماء فكانت العزلات 1 و 2 و 4 و 7 و 8 و 9 اكثر الفة للطور المذيب العضوي اذ بلغت 0.204 و 0.250 و 0.227 و 0.301 و 0.218 و 0.259 على التوالي اي امتلاكها خاصية راهية للماء عالية في حين العزلات 3 و 5 اقل الفة للطور المذيب اذ بلغت 0.429 و 0.531 على التوالي واقلهم الفة كانت العزلة 6 اذ بلغت 0.721 . اما نتائج جدول رقم (3) فيظهر قابلية البكتيريا على الالتصاق في اللحم اذا ان العزلات 1 و 2 و 4 و 7 و 8 و 9 كانت اكثر التصاق باللحم اذ بلغت 69.0 و 69.5 و 69.0 و 78.2 و 74.2 و 78.2 على التوالي من بقية العزلات اذ كلما كانت القيمة عالية تشير الى قوة التصاق العزلة باللحم وعند دراسة تأثير وجود او عدم وجود بعض الانزيمات في البكتيريا على قابليتها في الالتصاق في اللحم فقد اظهرت النتائج ان العزلات التي تمتلك انزيم *shemolysin* كانت اكثر قابلية في الالتصاق مع اللحم مقارنة مع العزلات التي تمتلك انزيم *coagulase* و *urease* . اذا كانت هناك اختلافات بين العزلات من حيث العلاقة بين امتلاكها للانزيمات والخاصية الراهية للماء والقابلية على الالتصاق في اللحم ، اذ اظهرت العزلة 8 و 9 عدم امتلاكها الانزيم *coagulase* و امتلاكها الفة عالية للطور المذيب العضوي و قابلية عالية على الالتصاق باللحم اما العزلة 5 و 6 فكانت تمتلك الانزيم ولم تظهر خاصية راهية للماء ولا قابلية على الالتصاق في اللحم . اما انزيم *urease* فكانت العزلة 2 و 4 و 9 تمتاز بعدم امتلاكها الانزيم و امتلاكها قابلية عالية في الالتصاق في اللحم و الخاصية الراهية للماء . اذا تبين النتائج ان بكتيريا *Staphylococcus* تعد بكتيريا ذات خصائص سطحية كارهة للماء ومن النتائج السابقة فقد تبين ان العزلات التي تمتلك انزيم *hemolysin* اظهرت ارتفاع في الخاصية الراهية للماء وقابلية في الالتصاق في اللحم اما وجود انزيم *urase* و *coagulase* فقد تبين من النتائج ان وجود الانزيم لا يؤثر على الخاصية الراهية للماء او الالتصاق في اللحم وهذا يتوافق مع ما اشار اليه (4) الى ان تأثير انزيم *coagulase* يعد غير مؤثر بشكل كبير على الخاصية الكارهة للماء . ولا يتوافق مع ما وجده (1) اذا اشار الى ان قابلية بكتيريا *Staphylococcus* على تكثف البلازما الدم يزيد من الخاصية الكارهة للماء وقابلية البكتيريا على الالتصاق في جدار المضيف اما العلاقة بين الخاصية الراهية للماء وقابلية البكتيريا على الالتصاق في اللحم فقد اشارت نتائج التحليل الاحصائي الى عدم وجود علاقة بين الخاصية الراهية للماء والالتصاق اذ كانت قيمة $r=0.870$ وهذا يتوافق نوعا ما مع ما وجده (3) فقد بين الى وجود علاقة بين الخاصية الراهية للماء وقابلية البكتيريا على الالتصاق في اللحم ذات المحتوى الدهني العالي وعدم وجود هذه العلاقة مع اللحم قليل الدهن وقد فسر ذلك الى طبيعة الشحنات الموجودة على قطع اللحم عالية الدهن، في حين لا تتوافق النتائج مع ما اشار اليه (1 و 2 و 4) الى ان زيادة الخاصية الراهية للماء يزيد من قدرة البكتيريا على الالتصاق في المضيف ، اذ اشار (4) الى وجود علاقة بين الخصائص الراهية للماء وقابلية البكتيريا على الالتصاق في الخلايا الطلائية للأمعاء . اما (10 و 11) قد اشار الى وجود عوامل اخرى تؤثر على الخاصية الراهية للماء والالتصاق في خلايا المضيف مثل نوعية الوسط الزراعي الذي تنمى فيه البكتيريا و امتلاكها للمحفظة والاسواط . في حين اشار (12) الى تأثير درجة الحرارة على التصاق البكتيريا في اللحم

جدول (1) يوضح بعض الخصائص العامة لبكتيريا *Staphylococcus*

العزلة	تخمير mannitol	وجود hemolysin	وجود coagulase	وجود urease	*البكتيريا
1	+	+	-	+	Staph 110
2	+	+	+	-	Staph .432
3	-	-	+	V	Staph . low
4	+	+	+	-	Staph .kty
5	+	-	+	+	Staph. Gfd
6	+	-	+	+	Staph .567
7	-	+	-	+	Staph. 67
8	-	+	-	+	Staph .rtt
9	+	+	-	-	Staph .ffd
10	-	-	-	-	Staph .cvf

- اعطيت هذه الرموز من قبل المستشفيات اعتمادا على المرضى
- + منجبة للانزيم
- غير منجبة للانزيم

جدول (2) يوضح الخاصية الراهبة للماء Hydrophobicity لبكتريا Staphylococcus

Hydrophobicity	العزلة	البكتريا
0.204	1	Staph 110
0.250	2	Staph .432
0.429	3	Staph . low
0.227	4	Staph .kty
0.531	5	Staph. Gfd
0.721	6	Staph .567
0.301	7	Staph. 67
0.218	8	Staph .rtt
0259	9	Staph .ffd
0.525	10	Staph .cvf

جدول (3) يوضح خاصية التصاق بكتريا Staphylococcus باللحوم

الالتصاق في اللحم	العزلة	البكتريا
69.0	1	Staph 110
69.5	2	Staph .432
50.2	3	Staph . low
69.0	4	Staph .kty
28.4	5	Staph. Gfd
34.2	6	Staph .567
78.2	7	Staph. 67
74.2	8	Staph .rtt
78.2	9	Staph .ffd
35.2	10	Staph .cvf

المصادر

- 1 -Wibawan, W. T.; Lammler, C. and Pasaribu, F. H. (1992). Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B *Streptococci* to epithelial cells. *J.General microbiology* 138:1237
- 2 -Krishna, M. M. ; Powell, N. B. L. and Borriello, S. P.(1996).Cell surface properties of *clostridium difficile*: haemagglutination, relative hydrophobicity and charge. *J. Med. Micribiol.* 44: 115-123
- 3-Reifsteck, F.; Wee, S. and Wilkinson, B. J. (1987). Hydrophobicity – hydrophilicity of *Staphylococci*. *J. Med. Microbiol.* 24: 65-73.
- 4- Hogt ,A.H.; Dankert, J. ; de Vries J.A.;Feijen J.(1983) . Adhesion of coagulase –negative *Staphylococcus* to biomaterials . *J. of General Microbiology* 129:2959-2968 .
- 5- Jonsson ,P. and Wadstrom ,t. (1983). High surface hydrophobicity *staphylococcus aureus* as revealed by hydrophobic interaction chromatography.*Current Microbiology* . 8:347-3
- 6-Kabir, S. and Ali, S. (1983). Characterization of surface properties of *vibrio cholerae* . *Infection and Immunity.* 39(3): 1048-1058.
- 7- Forbes,B.A.;Sahm,D.F.and Weissfeld,A.S.(2007).Diagnostic microbiology .MOSBY ELSEVIER
- 8-Stokes, E. J. and G. L., Ridgway (1987). In *Handling Clinical Specimens for Microbiological Studies.* (5th ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.
- 9-Dicksom, J.S. and Koohmaraie, M. (1989). Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *App. Envir. Microbiology.* 55(4):832-836
- 10-Jain,A.;Nishad,K.K.and Bhosle,N.B.(2007).Effect of DNP on cell surface properties of marine bacteria and its implication for adhesion to surfaces.Author Version: *Bifouling* :23(3-4)171-177
- 11-Kim , H. N. ; Honr, Y. ; lee, I.; Bradford, S. A. and Walker, S.L. (2009). Surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli* O157:H7: Role of extracellular macromolecules. *Biomacromolecules.* 10(9): 2556-2564.
- 12 – zulfakar,S. White ,J. ; Ross,T.and Talplin ,ML. (2012)Bacterial attachment to immobilized extracellular matrix proteins in vitro . *International J. Food Microbiology* , 157 :210- 217 (ABSTRACT)