تطفير المحتوى الوراثي لجرثومة *Proteus mirabilis*

ديانا نور الدين مصطفى
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة الموصل

القبول	الاستلام
٠٥ / ٠٥ / ٢٠١٠	٢٤ / ٠٣ / ٢٠١٠

Abstract

Four isolates of *P.mirabilis* previuosly identified from urine were obtained from the laboratory of microbiology in the college of education. The isolates were tested for their resistance to the antibiotics Ampicillin (Amp), Tettracycline (Tc), Chloramphenicol (Cm), Gentamycin(Gm) and Ciprofloxacin(Cip). There were differences in the antibiotic pattern of the isolates.These isolates were mutagenized by nitrous acid (0.05M) for 5 and 10 minutes.It was found that the percentage of removing the antibiotic resistance at 5 minutes was (0-76) but the 10 minutes treatment caused death to all cells. The bacterial isolates showed variation in losing their ability to hydrolize urea.Swarmming phenomenon was not affected by the process of mutagenesis and retained in the all mutagenized colonies of the isolates.

الخلاصة

تم الحصول على اربع عزلات مشخصة من جرثومة *P.mirabilis* والمعزولة من البول من مختبر الاحياء المجهرية في كلية التربية /قسم علوم الحياة . إختبرت مقاومة هذه العزلات لخمسة من مضادات الحيوية (Cip,Gm,Cm,Tc,Amp) وكانت مختلفة في مقاومتها . طفرت العزلات بإستخدام حامض النتروز بتركيز (0.05M) مدة ٥ دقائق و ١٠ دقائق فكانت النسب المئوية لإزالة مقاومة مضادات الحيوية واقعة بين (0-76) عند الفترة ٥ دقائق بينما لم نتمكن من الحصول على نتائج للمعاملة عند الفترة ١٠ دقائق لأنها كانت قاتلة للخلايا الحية . أظهرت العزلات الجرثومية اختلافاً في فقدان قابليتها على تحليل اليوريا . اما ظاهرة العج فإن جميع المستعمرات المطفرة للعزلات كانت قادرة على العج ولم تتأثر بعملية التطفير.

المقدمة

جرثومة *P.mirabilis* عصيات سالبة لصبغة كرام عائدة لعائلة *Enterobacteraceae* والمقاومة لعدد كبير من مضادات الحيوية وتعتبر من ا لجراثيم السائدة في المستشفيات (١). تمتلك هذه الجرثومة عوامل ضراوة كثيرة كالهيمولايسين والاس واط و Immunoglobulin A واليوريز وتسبب هذه الجرثومة إلتهابات عديدة للانسان ومنها إلتهاب الجهاز البولي ولاسيما الكلية والمثانة وعن طريق اليوريز الذي تكونه هذه الجرثومة تتحلل اليوريا فينت ج الامونيا التي ترفع الـ pH ونتيجة لذلك تزداد ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم وهذه الاملاح البلورية تزيد من قابلية إنتاج الحصى في الكلية والمثانة (٢)، (٣). يحوي انزيم اليوريز على م ركز ثنائي النواة من النيكل والتي تحفز عل ى تحليل اليوريا والى الان لم يعرف بالض بط مدى ضرورة النيكل في عملية التحليل لكن الدراسات الحديثة أشارت الى ان بعض الاحياء المجهرية تسيطر على مستويات معينة من انزيم اليوريز فيها عن طريق آليات تنظيمية معتمدة على ايونات معدنية وقد يكون النيكل أحدها (٤). كما تسبب هذه الجراثيم إلتهابات الحروق والجرو ح وتقرحات الدوالي وإلتهابات حول الاظافر المزمن (٥). يصعب الحصول على مستعمرات منفصلة من هذه الجرثومة عند زراعتها على سطح الوسط الصلب حيث يكون النمو على شكل طبقة رقيقة شفافة على سطح الوسط مشكلاً ما يعرف بالانتشار الزاحف او العج Swarmming، تعاني الخلايا العاجة من تغيرات شكلية غير طبيعية فتتحول من خلايا عصوية قصيرة الى اشكال خيطية كثيرة الاسواط Hyper flagellated والأخيرة تفقد بعد إنتهاء العج (٦). الشكل الخيطي للخلايا العاجة مع كثرة عدد الاسواط مهم اثناء استعمار الجرثومة للنسيج وغزوه ومن ثم إحداث المرض فيه (٧).

الطفرة الجينية هي أي تغيير في تسلسل النيوكليوتيدات للـ DNA قد ينتج عنها بروتينات غير وظيفية قد تغير من صفات الخلية وقد تحصل بشكل تلقائي كنتيجة لاخطاء اثناء التضاعف DNA replication او قد تحصل بإستخدام مطفرات كيميائية او فيزيائية Chemical or physical mutagens فينتج عنها طفرات مستحثة Induced mutations مثل المطفر الكيميائي حامض النتروز الذي يحول مجموعة الامين الى مجموعة كيتو في قواعد الادنين والسايتوسين والكوانين فيؤثر في صفات هذه القواعد ويولد طفرات إنتقالية Transition mutation فيتحول الـ G.C الى A.T وبالعكس او مثل المطفر Nitrosoguanidine الذي يضيف مجاميع الالكيل (سلسلة قصيرة من ذرات الكاربون) الى البيورينات والبرميدينات او مثل المطفر 5-bromouracil او 2-aminopurine وكلاهما من اشباه القواعد Base analogs التي تشبه قواعد البيورين والبيرميدين فتأخذ مكانها أثنا ء تضاعف الـ DNA، كما ان العناصر

القافزة تسبب طفرات الحشر Insertion mutation عندما تقتحم جيناتها جينوم الخلية ، كما يسبب ضوء UV طفرات عندما يؤدي الى تكوين Thymine dimers والذي يحطم الـ DNA ما لم يصلح من قبل الخلية بألية SOS Repair، كما ان اشعة X تؤدي ايضاً الى تكسير الـ DNA وغالباً ما تكون قاتلة ، تستخدم بعض المطفرات الكيميائية في علاج بعض الأمراض السرطانية مثل Nitrogen mustard الذي يحطم خلايا السرطان والخلايا الحية على حد سواء كما يستخدم المطفر Azido thymidine في تثبيط فايروس HIV وفي معالجة الناس المصابون بهذا الفايروس (٨).

ركزت أهداف الدراسة على:

١ -دراسة مدى إمكانية تطفير المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية في هذه الدراسة (Amp,Cip,Cm,Tc,Gm) لعزلات جرثومة *P.mirabilis* والمعزولة من البول بإستخدام حامض النتروز بتركيز (0.05M) عند الفترة ٥ دقائق و ١٠ دقائق والمقارنة بين نتائج الفترتين.

٢ -دراسة مدى إمكانية تطفير المورثات المشفرة لأنزيم اليوريز والمورثات المشفرة للعج.

المواد وطرائق العمل

جمع العزلات الجرثومية وتشخيصها:

حصلنا على اربع عزلات من جرثومة *P.mirabilis* المعزولة من البول وتم التأكد من نقاوتها بإجراء إختبارات (اليوريز ، الاوكسيديز ، إنتاج الاندول ، إنتاج H_2S، إختبار الفوكس بروسكور) وبالفحص المجهري وملاحظة ظاهرة العج على الطبق (٩).

إختبار مقاومة مضادات الحيوية:

إعتمدت طريقة الباحثان (١٠) لتحضير اوساط مضادات الحيوية ، حيث حضرت محاليل خزينة من مضادات (Amp,Cip,Cm,Tc,Gm) كلاً على حدى وذلك بإذابة كمية معينة من المضاد في ١ مل من مذيب مناسب (Amp في 70% إيثانول، Cip في ماء مقطر ، Cm في إيثانول مطلق، Tc في 50% إيثانول، Gm تم الحصول عليه بشكل سائل) (١١).

تم سحب حجم معين من المحلول الخزين بالاعتماد على التركيز النهائي بالـ **µg/ml** الذي تتمكن البكتريا من النمو عليه وهو (Amp50,Cip30,Cm10,Tc15,Gm60) وإضافته الى وسط الاكار المغذي المعقم والمبرد (45-50) مْ ومن ثم زرعت البكتريا على هذه الأوساط بطريقة التخطيط.

تطفير عزلات جرثومة *P.mirabilis* بالمطفر حامض النتروز:

طفرت العزلات ال جرثومية بإستخد ام حامض النتروز بتركيز (0.05M) مدة ٥ دقائق و ١٠ دقائق وتم المقارنة بين الفترتين وملاحظة مدى تأثير زيادة الفترة الزمنية على الخلايا الجرثومية بوجود المطفر عند هذا التركيز وذلك حسب طريقة الباحث (١٢).

تم تحضير الطبق الرئيسي من ١٠٠ مستعمرة مطفرة على وسط الاكار المغذي لكل عزلة بعد ذلك حسبت النسبة المئوية للمستعمرات فاقدة المقاومة للمضادات الحيوية بعد نقل مستعمرات الطبق الرئيسي لكل عزلة الى اوساط مضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة . ولملاحظة مدى تأثير المطفر على المورثات المشفرة لأنزيم اليوريز ف ي العزلات الجرثومية تم نقل المستعمرات المطفرة للطبق الرئيسي لكل عزلة الى اوساط اليوريز الحاوية على اليوريا بتركيز 5%، كما تم نقل هذه المستعمرات على اوساط الاكار المغذي وزرعت بطريقة التخطيط لملاحظة مدى تأثير المطفر على المورثات المشفرة لظاهرة العج.

النتائج والمناقشة

جمع العزلات الجرثومية وتشخيصها:

بعد إجراء الفحوصات التأكيدية للعزلات اظهرت نتائج الفحص المجهري بأن عزلات جرثومة *P.mirabilis* هي عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام كما لوحظ نموهذه العزلات على شكل موجات على سطح وسط الاكار المغذي وهو مايعرف بظاهرة العج في حين كانت نتائج الاختبارات الحيوية ان هذه العزلات موجبة لاختبار اليوريز وانتاج الـ H_2S وسالبة للاوكسيديز والاندول والفوكس بروسكور (٩).

إختبار مقاومة مضادات الحيوية:

جدول(١): المقاومة والحساسية لعزلات جرثومة *P.mirabilis* تجاه مضادت الحيوية المستخدمة:

رقم العزلة	اوساط الاكار المغذي الحاوية على المضادات الحيوية بـ µg/ml				
	Amp	Cip	Cm	Tc	Gm
١	S	S	R	S	R
٢	R	R	R	R	R
٣	R	S	S	S	R
٤	R	S	R	R	S

تشير

R: صفة المقاومة S: صفة الحساسية

من الجدول يلاحظ بأن النسبة المئوية لمقاومة مضادات الحيوية للعزلة ١ و ٣ تقدر ب 40% بينما العزلة ٢ بـ 100% في حين كانت العزلة ٤ 60%.
لقد لاحظ الباحثون (١٣) بأن ٩٧ عزلة من عزلات جرثومة *P.mirabilis* كانت مقاومة للـ Amp وبنسبة عالية تصل الى 40% كما انها تقاوم الـ Cm بنسبة 21.6% ومضاد الـ Gm بنسبة 16.5% وتقاوم الـ Cip بنسبة واطئة تصل الى 5.2%، كما لاحظوا بأن جراثيم الـ Proteus تحوي بلازميدات حاملة لعدد كبير من جينات المقاومة لمضادات الحيوية هذه البلازميدات ممكن ان تنتقل بين عدد كبير من سلالات البكتريا بالأقتران.
في حين لاحظ الباحثان (١٤) بأن 97% من عزلات جرثومة *P.mirabilis* كانت حساسة للـ Cip في حين كانت مقاومة للتتراسايكلين بنسبة 100% وللامبسيلين بنسبة 80% وللـ Cm بنسبة 72% وللـ Gm بنسبة 15% وقد ذكر هذا الباحث بأن المراجع القديمة كانت تشير الى أن جرثومة الـ Proteus كانت حساسة للـ Cm والـ Gm ولكن في الوقت الحاضر ظهرت سلالات عديدة للـ Proteus مقاومة لهذين المضادين ولقد اعزى الباحثان إمتلاك جرثومة الـ Proteus مدى واسع لمقاومة عدد من مضادات الحيوية الى إمتلاك هذه الجرثومة لبلازميدات تحمل جينات المقاومة وتنتقل بين الاحياء المجهرية السالبة لكرام بالأقتران ، أو قد يرجع ذلك الى إمتلاك هذه الجراث يم للغشاء السايتوبلازمي الخارجي والذي يتكون من طبقتين للدهون و الـ Lipoprotein والـ Polyscharide والـ Lipopolyscharide والذي قد يمنع كثير من المضادات من الدخول الى السايتوبلازم (١٥).
معظم البلازميدات تكتسب جينات المقاومة لمضادات الحيوية من العناصر القافزة او من الكروموسومات او من بلازميدات اخرى ، ان مقاومة مضادات الحيوية قد تكون بلازميدية او كروموسومية او بلازميدية وكروموسومية معاً (١٣).

تطفير عزلات جرثومة *P.mirabilis* بالمطفر حامض النتروز:

جدول (٢): النسب المئوية لفقدان المقاومة للمضادات الحيوية في جرثومة *P.mirabilis* بإستخدام الفترة ٥ دقائق.

رقم العزلة	النسب المئوية للتطفير				
	Amp	Cip	Cm	Tc	Gm
١	S	S	10%	S	70%
٢	0%	72%	60%	76%	50%
٣	0%	S	S	S	68%

S	28%	32%	S	4%	٤

يلاحظ من الجدول عدم تأثر مقاومة الـ Amp بالمطفر في العزلتين ٢ و ٣ وهذا ربما يعود الى وقوع مورثات مقاومتها على جزيئات بلازميدية والتي يكون لها نسخ كثيرة وبالتالي قد لا يتمكن المطفر من التأثير على جميع النسخ ، وقد أشارت الدراسات الحديثة الى أن انواع الـ Proteus تكون حاملة لبلازميدات متنقلة بالأقتران تقاوم الـ Amp بشكل كبير (١٣).

كما يلاحظ من الجدول ظهور نسب إزالة عالية في مقاومة مضادات كلاً من (Cip,Cm,Tc,Gm) وهذا ربما يعزى الى وقوع مورثات مقاومتها على الكروموسوم او قد تكون واقعة على البلازميدات ولكن عدد نسخ بلازميداتها قليل ولذلك تأثرت بالمطفر (١٦) او قد يعزى ذلك الى ان حامض النتروز قد طفر أنظمة الاصلاح في هذه العزلات فنتج عن ذلك أنظمة إصلاح غير فعالة فلم تتمكن من إصلاح هذه الطفرات (٨).

لقد ذكر الباحثون (١٣) في دراستهم على جرثومة *P.mirabilis* بأنه يوجد بلازميدات مقترنة تنقل المقاومة للـ Gm ولكن لا يوجد بلازميدات مقترنة تنقل مقاومة الـ Cip ولذلك فإنها ربما تكون واقعة على الكروموسوم، كما أشاروا الى أن نسبة المقاومة البلازميدية قد تصل الى 44% بينما كانت نسبة المقاومة الكروموسومية 32% في حين أن 24% من المقاومة للمضادات كانت نتيجة عدم تمكن المضاد من الوصول الى الخلايا والتأثير عليها.

وبذلك فنتائجي تتفق مع الباحث (١٧) الذي إستخدم حامض النتروز (0.05M) في تطفير عزلات جرثومة *P.mirabilis* وحصل على نسب تطفير عالية في مقاومة الـ Cip تراوحت بين (72-97%) ولكن أختلف معه في نسب تطفير مقاومة الـ Cm والـ Tc حيث حصل على نسب اقل تراوحت بين (11-42%) و (3-40%) على التوالي.

أما تطفير عزلات جرثومة *P.mirabilis* بالمطفر حامض النتروز (0.05M) مدة ١٠ دقائق فلم نتمكن من الحصول على نتائج للتطفير وذلك لعدم تمكن الخلايا الحية الجرثومية من النمو بوجود المطفر عند هذا التركيز وهذه الفترة فلقد كانت هذه الظروف قاتلة للخلايا الحية ، هنالك اجناس اخرى تابعة لعائلة الـ *Enterobacteraceae* تستطيع تحمل التطفير بحامض النتروز وعند نفس التركيز لفترات زمنية اطول حيث تمكن الباحث (١٨) من تطفير عزلات جرثومة الـ Pseudomonas لمدة ١٥ دقيقة لنفس المطفر وبنفس التركيز وربما يعود السبب الى إمتلاك جرثومة الـ Pseudomonas الى انظمة إصلاح عديدة او الى إحتوائها على ١٢ نظام ضخ مسؤول عن ضخ أنواع عديدة من المواد الى خارج الخلية وقد يكون المطفر احد تلك المواد (١٩).

تطفير المورثات المشفرة لأنزيم اليوريز:

فقدت جميع المستعمرات المطفرة والمنقولة على وسط اليوريز صفة تحليل ا ليوريا في العزلات (3,2,1) وبنسبة 100% حيث لم يتغير لون الوسط بينما بقيت 20% من المستعمرات المطفرة قادرة على تحليل اليوريا في العزلة الرابعة في حين فقدت 80% من المستعمرات المطفرة هذه الصفة ، وربما يعود السبب الى تأثير حامض النتروز على إحدى الشفرات الوراثية ا لمكونة للاحماض الامينية في الوحدة الثانوية Ure C لأنزيم اليوريز والحاوية على الموقع الفعال لهذا الانزيم حيث لاحظ الباحثان (٢٠) بأن تغيير الشفرة الوراثية المشفرة للهستدين في الموقع ٣٢٠ للوحدة الثانوية Ure C الى الشفرة المشفرة لليوسين عن طريق التطفير بالعناصر القافزة ادى الى انتاج انزيم يوريز غير فعال وغير قادر على تحليل اليوريا في جرثومة *P.mirabilis*.

وفي جنس آخر تابع لعائلة الـ *Enterobacteraceae* لاحظ الباحثان (٢١) فقدان انزيم اليوريز فعاليته او التقليل منها في عزلات جرثومة الـ Kleibsella عند إحداث الطفرات في هذه الجرثومة بإستخدام الفاج.

التطفير الحاصل في ظاهرة العج:

لم تفقد أي مستعمرة مطفرة ولجميع العزلات قابليتها على العج والسبب ربما يعود الى ان ظاهرة العج مسؤول ع نها مورثات واقعة على جزيئات بلازميدية (1-4) جزيئات فلم تتأثر بالمطفر بسبب كثرة عدد نسخ البلا زميد (٢٢) حيث أثبت هذا الباحث بأن ظاهرة العج مسؤول عنها بلازميدات عن طريق تحييد ٤٠ عزلة من انواع الـ Proteus وإزالة بلازميداتها بإستخدام عدد من المحيدات كاليوريا والـ SDS فلاحظ فقدان العج بنسبة 65.6%.

المصادر

1) Nahum, K. C.; Odes, L. S.; Reisenberg, K.; Schlaeffer, F.; Borer, A., Infect., 38(1): 41-46(2009).

2) Dattelbaum, D. J.; Lockatell, C. V.; Johnson, D. E.; Mobley, H. L. T., Infect. immun., 71(2): 1026-1030 (2003).

3) Roosendaal, B.; Gaastra, W.; Graaf, F. K., FEMS microbial. Lett., 22: 253-258 (1984).

4) Carter, E. L.; Flugga, N.; Boer, J. L.; Mulrooney, S. B.; Hausinger, R. P., Metallomics, 1:207-221(2009).

5) Noble, W. C., "Microbiology of Human SKIN". Medical Book, London (1981).

6) Rauprich, O.; Matsushita, M.; Weijer, C. J.; Siegert, F.; Esipov, S. E.; Shapiro, J. A., Bacteriol.,178(22):6525-6538(1996).

7) Mobley, H. L. T.; Belas, R.; Lockatell, V.; Chippendale, G.; Trifillis, A.; Johnson, D. E.; Warren, J. W., Infect. Immun., 64(12):5332-5340 (1996).

8) Nester, E. W.; Anderson, D. G.; Robert, C. E.; Pearsall, N. N.; Nester, M. T., "Microbiology", Mc Graw Hill(2004).

9) Colle, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P.; Simmons, A., "Mackie and Mc Cartney Practical Medical Microbiology", 14^{th}ed., Longman Singapore Publishers Ltd, Singapore(1996).

10) Grant, A. J.; Pittard, J., Bacteriol., 120:185-188 (1974).

11) Ahmed, K. D., Ph.D.Thesis, Univ. Durham. England (1989).

12) Miller, J. H., "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring harbor Laboratory, U. S. A. (1972).

13) Yah, S. C.; Eghafona, N. O.; Oranusi, S.; Abouo, A. M., African J. of Biotechnol.,6(15):1757-1762(2007).

14) Mordi, R. M.; Momoh, M. I.; African J. of Biotechnol, 8(5):725-730 (2009).

15) Wade, P.; Wickens, H., Pharmaceutical J., 274:501-504(2005).

16) Timmis, N. K.; Puhler, A., ”Advanced in molecular genetics”, Springer-Verlary, New Yourk, (1984).

17) Ahmed, Kh. D.; Hasan, A. H.; Aziz, Z. A., Edu. Sci., 16(4):55-61(2004).

18) Faisal, R. M.; Yassin, J. M.; Mustafa, D. N., Res. Microbiol., 1:201-210 (2009).

19) Chunachuen, R.; Beinlich, K.; Hoong, T. T.; Becher, A.; Karkhoff, R. R.; Schweizer, H. P., Antimicrob. Chemother. 45(2):428-432 (2001).

20) Sriwanthana, B.; Mobley, H., Infect. Immun., 61(6):2570-2577 (1993).

21) Martin, P. R.; Hausinger, R. P., Biol. Chem., 267(28):20024-20027 (1992).

22) Iwalokun, B. A.; Olukosi, Ya.; Adejoro, A.; Olaye, J. A.; Fashade, O., Biotech., 3(1):99-104(2004).