استخلاص الجدار الخلوي الخام لبكتريا *Enterobacter cloacae* ودراسة سميته.

*نغم شاكر محمد حسين** *مي طالب فليح **

تاريخ قبول النشر 1 /3 /2010

الخلاصة

حضر مستخلص الجدار الخلوي الخام لبكتريا *Enterobacter cloacae* باستعمال انزيم الـ Lysozyme الذي استعمل لتحليل الخلايا فضلاً عن اضافة انزيمي الـ DNase ، والـ RNase وكانت نسبة البروتينات ونسبة الكربوهيدرات فيه 24 % و 1.44 % على التوالي.

درست امراضية البكتريا وذلك بدراسة تأثيرها القاتل فقد تم تحديد الجرعة المميتة النصفية (LD50) لكل من عالق البكتريا ومستخلص جدارها الخلوي الخام باستعمال اناث الفئران السويسرية البيض ، وكانت قيمة LD50 للعالق البكتيري مساوية لـ 3.16×10^9 وحدة مكونة للمستعمرة / ملليلتر. اما مستخلص الجدار فلم يكن له أي تاثير قاتل للفئران الا انه اثر في الحالة الفسلجية لها وبشكل كبير ؛ مما ادى الى نقصان اوزانها بمعدل 8 غرامات.

الكلمات المفتاحيه: الجدار الخلوي الخام، *Enterobacter cloacae*

المقدمة :

تعد بكتريا *E. cloacae* جزءاً من النبيت الطبيعي للقناة المعدية المعوية (Gastrointestinal tract) لـ 40 – 80 % من الافراد وتنتشر بشكل واسع في الطبيعة ، وعلى الرغم من ان هذه البكتريا ليست ممرض اولي للانسان ولا تصيب الاصحاء الا انها ممرض فرصي (Opportunistic pathogen) [1] ، وتعد بكتريا *E. cloacae* اكثر الانواع التابعة لجنس *Enterobacter* التي تعزل من العينات السريرية بشكل متكرر تليها *E. aerogenes* و *E. agglomerans* ([2]. ، فهي تصيب أي فئة عمرية وخصوصاً صغار وكبار السن وتحدث الاصابة في أي موقع من الجسم عند انتقالها اليه إذ انها تسبب اصابات المسالك التنفسية والقناة المعدية المعوية والجروح ، والحروق ، والعمليات الجراحية ، وتجرثم الدم ، والسحايا لا سيما في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة (Immunodeficient) او الذين يتناولون ادوية تكبح المناعة (Immunosuppressal drugs) ؛ لذلك تعد من المسببات المرضية المهمة للاصابات المكتسبة من المستشفى (Nosocomial infections) [3;4]كما ان هذه البكتريا تقترن بحالات الوفيات خصوصاً في حالات تجرثم الدم وذات الرئة المتسببة عنها [5] ؛ ولذلك فان بكتريا *E. cloacae* تعد مسؤولة عن 65 – 75 % من مجموع الاصابات المتسببة عن بكتريا *Enterobacter*بشكل عام ، وكذلك تشكل نسبة 5 – 10 % من مجموع الاصابات التي تسببها البكتريا السالبة لصبغة غرام [6;7].

يعتمد حدوث الاصابة بهذه البكتريا على الحالة الصحية للمضيف (Host) ، وعلى ضراوة البكتريا إذ تشترك عوامل عدة في الامراضية واهمها : عديد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide)، والمحفظة (Capsule) ، والخمل ، وانتاج الهيمولايسين. ويزيد من امراضية البكتريا عوامل الضراوة غير المباشرة لا سيما المقاومة المتعددة لمضادات الحياة بسبب انتاجها لانواع مختلفة من انزيمات مقاومة للمضادات [8] إذ لها القابلية على مقاومة كثير من المضادات سواء أكان بشكل طبيعي ام بسبب قابليتها على تطوير مقاومة ضد الانواع الجديدة وخصوصاً مضادات β-lactam ؛ وذلك بسبب انتاجها لانزيمات الـ β-lactamases ، كما تقاوم المطهرات بشكل كبير قياساً ببقية الانواع التابعة للعائلة المعوية [9].

ولذلك استهدفت هذه الدراسة استخلاص الجدار الخلوي الخام لبكتريا *E.cloacae* ،ودراسة سميتها بتحديد الجرعة المميتة النصفية (LD50) لكل من عالق البكتريا ومستخلص جدارها الخلوي الخام.

المواد وطرائق العمل:

بكتريا *E.cloacae*: استخلصت العزلة *E.cloacae* EN73 المعزولة من اخماج الجروح و المشخصة مسبقا اعتمادا على [10;11] إذ تم

قسم علوم الحياة،كلية العلوم،جامعة بغداد

الاعتماد على الصفات المظهرية والصفات الكيموحيوية في التشخيص.

استخلاص الجدار الخلوي لبكتريا *E. cloacae* :

تم الاستخلاص بالاعتماد على [12] .

1. تنمية البكتريا :

حضر 1.5 لتر من Tryptic soya broth ووزع في دوارق سعة 250 مليليتر من الوسط لكل دورق ، ثم عقمت بجهاز الموصدة بدرجة 121 م لمدة 15 دقيقة ، لقحت الدوارق بواقع 1 مليليتر من عالق البكتريا المنماة مسبقاً في وسط Tryptic soya broth بدرجة 37 م لمدة 18 ساعة ، وحضنت الدوارق في حاضنة هزازة بدرجة 37 م لمدة 18 ساعة بواقع 100 هزة / دقيقة.

حصدت الخلايا المنماة بوساطة جهاز الطرد المركزي المبرد (Cooling centrifuge) وبسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة ، وغسلت الخلايا ثلاث مرات بدارئ الفوسفات الملحي المعقم لمدة 10 دقائق وبسرعة 3000 دورة / دقيقة ، وعلقت الخلايا بدارئ الفوسفات الملحي الحاوي على الفورمالين 0.5 % لمدة 18 ساعة في الثلاجة ، رسبت بالمنبذة المبردة وبسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة ، ثم غسلت مرتين بالمحلول نفسه ولمدة 10 دقائق ، جففت الخلايا باستعمال الاسيتون المبرد مسبقاً وبواقع عشر مرات حجم الخلايا ، وتم الحصول على وزن 10 غرامات وزن جاف من الخلايا.

كسرت الخلايا البكتيرية باستعمال الانزيمات على وفق طريقة [12] وتتلخص على النحو الآتي :

تكسير الخلايا البكتيرية :

علقت البكتريا المجففة بالاسيتون بدارئ فوسفات الصوديوم ذو الاس الهيدروجيني 7.0 والحاوي على 0.05 مولاري من EDTA و 0.05 مولاري من Sodium azide (NaN_3) وبنسبة 1 :10 مزج الخليط جيداً على جهاز المحرك المغناطيسي عند السرعة القصوى مدة دقيقة واحدة ، ثم اضيف انزيم Lysozyme بنسبة 0.1 غرام / 5 غرام وزن جاف من الخلايا ، بعدها وضع العالق على جهاز المحرك المغناطيسي بدرجة 4 م لمدة 18 ساعة. حضن العالق في حمام مائي بدرجة 37 م لمدة عشرين دقيقة بعدها وضع على جهاز المحرك المغناطيسي مدة ثلاث دقائق ، وخفف العالق الى الضعف باضافة حجم مساو من محلول كلوريد المغنسيوم ($MgCl_2$) ، ثم اضيف محلول انزيمي DNase و RNase بتركيز نهائي 1 مايكروغرام / مليليتر من العالق بعدها وضع العالق في الحاضنة بدرجة 37 م مدة عشرة دقائق ثم حضنت مدة عشرة دقائق اخرى بدرجة حرارة 60م. نبذ العالق بالمنبذة المبردة بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة ، واهمل الرائق واخذ الراسب الذي يعد مستخلص الجدار الخلوي الخام (Crude cell wall).

تم تقدير كمية البروتين في مستخلص الجدار الخلوي الخام حسب [13] كذلك تم تقدير كمية الكربوهيدرات فيه باستخدام طريقة الفينول-حامض الكبريتيك[14].

حساب الجرعة المميتة النصفية (LD50) للعالق البكتيري للفئران :

استعملت خمس مجاميع بواقع ثلاثة فئران لكل مجموعة ، وحقنت المجاميع بواقع 1 مليليتر لكل فأر من الاعداد البكتيرية (10^{11} ، 10^{10} ، 10^9 ، 10^8 ، 10^7) وحدة مكونة للمستعمرة / مليليتر على التوالي داخل البريتون (Intraperitonial) للفأر ، وبعد مرور خمسة ايام تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل جرعة من العالق البكتيري نسبة الى العدد الكلي الذي تم حقنه ، وحسبت الجرعة المميتة لنصف عدد الفئران باتباع طريقة [15].

حساب الجرعة المميتة النصفية (LD50) لمستخلص الجدار البكتيري :

استعملت خمس مجاميع بواقع ثلاثة فئران لكل مجموعة ، وتم حقن كميات مختلفة من مستخلص الجدار الخام حيث حضر خزين من المستخلص 300 ملغرام / مليليتر من 0.025 مولاري دارئ الفوسفات الملحي وحضر منه التراكيز المراد حقنها وهي على النحو الآتي : (300 ، و 250 ، و 200 ، و 150) ملغرام / مليليتر من دارئ الفوسفات الملحي ، وقد تم حقن 1 مليليتر لكل تركيز وبواقع ثلاثة فئران داخل البريتون. اما السيطرة السالبة فقد حقنت بـ 1 مليليتر من دارئ الفوسفات الملحي ، وبعد مرور خمسة ايام تم حساب عدد الفئران باتباع طريقة [15].

النتائج والمناقشة :

استخلاص الجدار الخلوي لبكتريا *E. cloacae* :

تم الحصول على 10 غرامات وزن جاف من العزلة EN73 التي اظهرت مقاومة عالية إتجاه مضادات الحياة المختبرة ، وقد استعملت نصف الكمية في الاستخلاص أي 5 غرامات ، استخدم الوسط Tryptic soya broth كونه وسطاً اغنائياً للبكتريا [16] ، وقد استعملت الانزيمات في تكسير الخلايا البكتيرية لانها تحللها وتعطي ناتجاً اكبر من LPS لكونه المكون الاهم في تركيبة جدار البكتريا السالبة لصبغة غرام وذلك قياساً باستخدام التكسير الميكانيكي أو التكسير العادي بالفينول من دون استعمال الانزيمات. وان معاملة الخلايا بمادة الـ Lysozyme مع وجود EDTA تزيد من جودة الاستخلاص وتحطيم الخلايا وتعطي ناتجاً اكبر من LPS [12] ، كما ان مادة EDTA لها دور في تحليل مكونات الخلية إذ يعمل على سحب الايونات الثنائية التكافؤ Ca^{++} ، و Mg^{++} التي تعمل على تثبيت LPS بالغشاء [17].

استعملت درجة حرارة منخفضة وهي 4 م عند استخدام Lysozyme لتوفير الظروف المثلى لعمل الانزيم وكذلك ان طول مدة الحضن سوف تسمح بعمل بعض الانزيمات المحللة [12].

وقد استعملت الانزيمات الهاضمة DNase ، و RNase لاختزال مستوى الاحماض النووية إذ ان النبذ الفائق وحده لا يكفي (18) ومن ثم وقف عملها بتعريضها لدرجة حرارة 60 م لمدة 10 دقائق ، ثم نبذ العالق بالمنبذة المبردة بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة واخذ الراسب الذي يمثل مكونات الجدار الخلوي الخام.

قدرت كمية البروتين لمستخلص الجدار الخلوي الخام على وفق طريقة [13] ، وكان تركيزه 12 ملغرام / مليليتر إذ شكل نسبة 24 % من وزن الخلايا. وقد اشار الزيدي عام 1988 [19] الى ان البروتينات تشكل نسبة 15 % من الوزن الجاف لجدران البكتريا السالبة لصبغة غرام ، وقد تكون النسبة التي حصلنا عليها عالية إذ قد تختلف نسبة البروتين من بكتريا الى اخرى.

كذلك قدرت كمية الكربوهيدرات لمستخلص الجدار الخلوي الخام على وفق طريقة [14] ، وقد كان التركيز 0.723 ملغرام / مليليتر والذي شكل نسبة 1.44 % من وزن الخلايا.

كما قيس جزء من مستخلص الجدار الخلوي الخام عند طول موجي 260 نانوميتر وقد كانت القراءة صفراً ؛ مما يعني خلوه من الاحماض النووية [20] جدول(1).

جدول (1) النسب المئوية للكربوهيدرات والبروتينات في مستخلص الجدار الخلوي الخام لبكتريا *E.cloacae*

المكون	التركيز(ملغرام/مليليتر)	النسبة المئوية %
الكربوهيدرات	0.723	% 1.44
البروتينات	12	%24

حساب الجرعة المميتة النصفية (LD50) لبكتريا *E. cloacae* :

تم حساب LD50 لبكتريا *E. cloacae* لمعرفة التركيز القاتل لـ 50 % من الفئران السويسرية البيض المحقونة به ، وقد استعملت خمسة تراكيز بكتيرية وهي: (10^{11} ،و 10^{10} ،و 10^{9} ،و 10^{8} ،و 10^{7}) وحدة مكونة للمستعمرة / مليليتر وحقنها في الفئران ، وقد اظهرت ان قيمة التركيز القاتل لـ 100 % من الفئران المحقونة هو 10^{11} وحدة مكونة للمستعمرة / مليليتر. اما التركيز القاتل لـ 50 % من الفئران كان مساوياً لـ 3.16×10^{9} وحدة مكونة للمستعمرة / مليليتر جدول (2) .

جدول (2) تحديد قيمة الجرعة المميتة النصفية LD50 لبكتريا *E. cloacae*

العدد الحي للخلايا	عدد الفئران المحقونة	عدد الفئران الحية	عدد الفئران الميتة	العدد التراكمي		العدد التراكمي للفئران الحية والميتة	النسبة المئوية للهلاك
				الفئران الحية	الفئران الميتة		
10^{11}	3	0	3	0	6	6	% 100
10^{10}	3	1	2	1	3	4	% 66.6
10^{9}	3	2	1	3	1	4	% 33.3
10^{8}	3	3	0	6	0	6	% 0
10^{7}	3	3	0	9	0	9	% 0

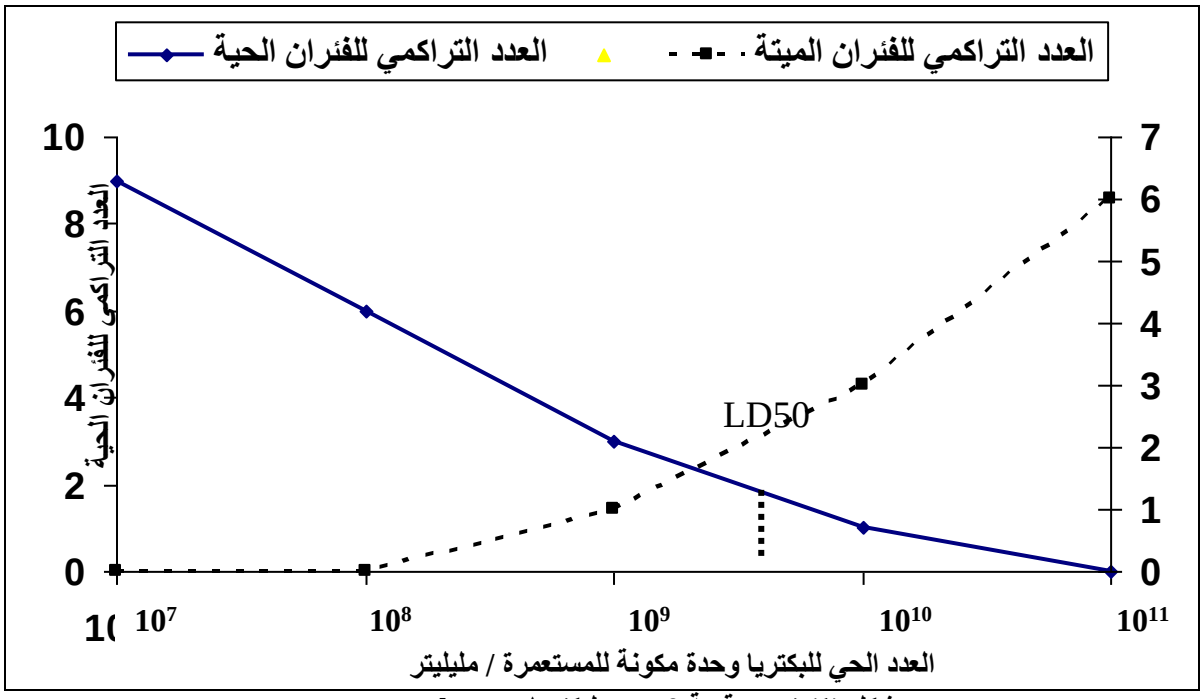
وقد حسبت قيمة LD50 حسب [15].

$$\text{المسافة البينية} = \frac{50\ \% - \%\text{ للفئران الميتة في التركيز الادنى من } 50\ \%}{\%\text{للفئران الميتة في التركيز الاعلى من } 50\ \% - \%\text{للفئران الميتة في التركيز الادنى من } 50\ \%}$$

$$= \frac{50\ \% - 33.3\ \%}{66.6\ \% - 33.3\ \%} = \frac{16.7\ \%}{33.3\ \%} = 0.5$$

الجرعة المميتة لـ $50\ \% = 10^{0.5} \times 10^{9} = 3.16 \times 10^{9}$ خلية / مليليتر.

وقد تم تمثيل قيمة LD50 لبكتريا *E. cloacae* في الشكل (1) إذ يوضح الشكل عدد الخلايا البكتيرية الحية لكل مليليتر على المحور السيني ، وعدد الفئران الحية والميتة على المحور الصادي إذ تم ايصال الخط بين النقاط بالنسبة للفئران الحية والميتة فامكن الحصول من نقطة التقائها على الجرعة المميتة لنصف عدد الفئران.



شكل (1) تحديد قيمة LD50 لبكتريا *E. cloacae*

وفي دراسة محلية اجريت على بكتريا *K. oxytoca* كانت قيمة LD50 مساوية الى 3.16×10^6 خلية / مليليتر [21] ؛ وهذه النتيجة اشد بكثير من LD50 التي تم تحديدها ، وربما يعود السبب في ذلك كون بكتريا *E. cloacae* هي بكتريا انتهازية.

حساب الجرعة المميتة النصفية LD50 لمستخلص الجدار البكتيري :

حقنت الفئران السويسرية البيض باربعة تراكيز من مستخلص الجدار الخلوي الخام (Crude cell wall) وهي : (300 ،و 250 ،و 200 ،و 150) ملغرام / مليليتر لاجل حساب LD50 له ، ولم تسجل أية حالة قتل للفئران باي تركيز من التراكيز المحقونة حتى بعد مرور خمسة ايام حسب [15] ، الا انه لوحظ ان اجسامها اصبحت هزيلة ومتضائلة بشكل لافت للنظر إذ قلت اوزانها خاصة الفئران المحقونة بالتراكيز العالية بمعدل (8) غرامات عن اوزانها الاصلية التي تتراوح بين (20-25) غراماً. وهذا يدل على انه بالرغم من عدم وجود أي تاثير قاتل لمكونات الجدار الا انه يؤثر في الحالة الفسلجية للفئران بشكل كبير.

ربما يكون سبب الهزال (نقصان الوزن) الى التأثيرات الامراضية الفسلجية (Pathophysiology) لعديد السكريد الشحمي المتمثلة بنقصان السكر في الدم (Hypoglycemia) نتيجة لتحفيز عمليات تحلل السكر (Glycolysis) في الخلايا فضلا عن حدوث خلل وظيفي في اعضاء متعددة من الجسم [22].

المصادر:

1. Keller, R. ; Pedroso, M. Z. ; Ritchmann, R. and Silva, R. M. 1998. Occurrence of virulence – associated properties in *Enterobacter cloacae*. J. Infect. Immun. *66 (2)* : 645 – 649.
2. Pan, Y. T. ; Xu, B. ; Rice, K. ; Smith, S. ; Jackson, R. and Elbein, A. D. 1997. Specificity of the high – mannose recognition site between *Enterobacter cloacae* pili adhesion and HT-29 cell membranes. Infect. Immune. *65 (10)* : 4199 – 4206.
3. Clark, N. ; hill, B. ; O'hara, C. ; Steingrimson, O. and Cooksey, R. 1990. Epidemiological typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *13 (6)* : 467 – 472.
4. Chow, J. W. ; Yu, V. L. and Shales, D. M. 1994. Epidemiological perspectives

on *Enterobacter* for the infection control professional. Am. J. Infect. Control. *22 (4)* : 195 – 201.

5. Sinanve, C. P. 2003. *Enterobacter* infections. Medicine. Web MD. (Internet).

6. Bryan, C. S. ; Reynolds, K. L. and Brenner, E. R. 1983. Analysis of 1.186 episodes of gram – negative bacteremia in non – university hospitals : the effects of antimicrobial therapy. Rev. Infect. Dis. *5* : 629 – 38.

7. Kasper, D. L. ; Brounwald, E. ; Fauci, A. S. ; Hauser, S. L. ; Longo, D. L. and Jameson, J. L. 2004 Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. P. 883 – 884. McGraw Hill. New York.

8. Jones, R. N. ; kugler, K. C ; Pfaller, M. A. and Winokur, P. L. 1999. Characteristics of pathogen causing UTI in hospitals in North America. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *35(1)* : 55 – 63.

9. Sanders, W. E and Sanders, C. C. 1997. *Enterobacter* spp. Pathogens poised to flourish at the turn of the centry. Clin. Microbiol. Rev. *10 (2)* : 220 – 241.

10. Sneath, P. H. A. , Mair, N. S. ; Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Vol.2 Williams and Wilkins. Baltimore.

11. Holt, J. G. ; Krieg, N. R. ; Sneath, P. H. A. ; Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. Maryland. USA.

12. Johnson, K. G. and Perry, M. B. 1976. Improved techniques for the preparation of bacterial Lipopolysaccharide. Can. J. Microbiol. *22* : 29 – 34.

13. Lowry, O. H. ; Resebrough, N. J. ; Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem *193* : 265 – 275.

14. Dubois, N. ; Gills, K. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for detection of sugars and related substances, Anal. Chem. *28 (3)* : 350 – 356.

15. Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimation fifty percent end points. Am. J. Hyg. *27 (3)* : 493 – 498.

16. Luchi, M. and Morrison, D. 2000. Comparable endotoxic properties lipopolysaccharide are manifest in diverse clinical isolates of gram – negative bacteria. Infect. Immun. *68 (4)* : 1899 – 1904.

17. Cox, S. T. and Egon, R. G. 1968. Action of ethlene diamine tetracetic acid , tris (hydroxymethyl) aminomethane , and lysozyme on cell walls of *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol. *14* : 913 – 922.

18. Pier, G. B. ; Sidberry, H. F. and Sadoff, J. C. 1978. Isolation and characterization of high molecular weight polysaccharide from slime of *Pseudomonas aeruginosa* . Infect. Immun. *22 (3)* : 908 – 918.

19. الزيدي ، حامد مجيد 1988. علم الاحياء المجهرية. وزارة التعليم العالي. جامعة بغداد.

20. Teti, G. ; Chiofola, M. S. ; Tomasello, F. and Fava, C. 1987. Mediation of *Staphylococcus saprophyticus* adherence to uroepithelial cells

by lipoteichoic acid. Infect. Immune. *55 (3)* : 839 – 842.

21. التكريتـي ، رغـد قـيس مجيـد 2005. استخلاص وتنقية عديد السكريد الشحمي ودراسة *Klebsiella oxytoca* لبكتريا دوره فـي الامراضـية. رسـالة ماجسـتير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

22. Brooks, G. F. ; Butel, J. S. and Morse, S. A. 2004. Jawetz , Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed. McGraw-Hill. New York.

Extraction of raw cellular wall of Enterobacter cloacae and study of its toxicity

N. Sh. M. Hussain* ***M. T. flaih****

* Biotechnology Department, College of science, Baghdad University

ABSTRACT

The crude cell wall of *E.cloacae* was extracted by using Lysozyme , DNase and RNase enzymes, the contents of the proteins and carbohydrates were 24% and 1.44% respectively .

The pathogenicity of the bacteria was studied by testing its lethality, in which the LD50 was identified to both bacterial suspension and the extract of the crude cell wall of bacteria by using white swiss female mice. The value of the LD50 of bacterial suspension was $3.16x10^9$ CFU / ml . The cell wall extract didn't have any lethal effect on the mice, but it had a great effect on their physiological state which led to a deficit in their weight by an average of 8 grams.