Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

# تأثير Sodium Azide على انتاج انزيم اليوريز والغشاء الحيوي وعلاقتها بظاهرة الانثيال في بكتيريا *Proteus Mirabilis*

عمر سنان صادق الزيدي[1]، لمى عبد الهادي زوين[2]
[2,1] قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة /ابن الهيثم، جامعة بغداد، بغداد، العراق.
[1]omer_bs2009@yahoo.com, [2]lumaabdalhadee@yahoo.com

## الملخص

جاءت الدراسة الحالية بغية الكشف عن تأثير مادة ازايد الصوديوم على انتاج انزيم اليوريز وتكوين الغشاء الحيوي وعلاقتها بحركة السباحة Swimming والانثيال Swarming في بكتيريا *P.mirabilis*. جمعت 21 عزلة عائدة لبكتيريا *Proteus* من مصادر سريرية وحيوانية مختلفة خلال المدة 1-10-2017 الى 1-11-2017 وشخصت بالاعتماد على الكشف المجهري والاختبارات الكيموحيوية وتم تأكيد التشخيص باستعمال نظام الفايتك 2- اذ تبين ان 18 عزلة فقط تعود للنوع *P.mirabilis* . امتلكت جميع عزلات بكتيريا *P.mirabilis* القدرة على انتاج انزيم اليوريز. كانت جميع العزلات 100% تفتقر لقدرة تكوين الغشاء الحيوي على اكار الكونغو الاحمر في حين كانت جميع العزلات 100% مكونة للغشاء الحيوي باستعمال طريقة الصفيحة العيارية الدقيقة وبدرجة قوية. ان اضافة ازايد الصوديوم يثبط تكوين الغشاء الحيوي بنسب مختلفة اعتمادا على مصدر العزلة والتركيز فضلا عن تثبيطه لانتاج انزيم اليوريز في الخلايا السابحة والانثيالية لبكتيريا *P.mirabilis* اذ يختلف تأثيره باختلاف التركيز ومدة الحضن.

**الكلمات الدالة:** انزيم اليوريز، الغشاء الحيوي، ازايد الصوديوم، الانثيال، *Proteus mirabilis*

**DOI: http://doi.org/10.32894/kujss.2018.13.4.17**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

# Effect of Sodium Azide on Urease and Biofilm Formation and its Relationship to Swarming Phenomenon in *Proteus Mirabilis*

Omar Sinan Sadiq Al-Zaidi[1], Luma Abd Alhadee[2]
[1,2]Department of Biology, College of Education pure science/ Ibn Al. Haitham,University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
[1]omer_bs2009@yahoo.com, [2]lumaabdalhadee@yahoo.com

## Abstract

The current study was carried out in order to detect the effect of sodium azide on Urease production and biofilm formation in *P.mirabilis.* Twenty one isolates of *Proteus* were collected from different clinical and animals samples for the period from 15th October 2017 to 1st November 2017 and identification depending on microscopic characterization, biochemical tests and conformed by Vitec-2 compact system, its turns out that only 18 isolates belong to the specie *P.mirabilis*.All *P.mirabilis* isolates 100% were have the ability to produce urease enzyme.

All *P.mirabilis* 100% un able to form biofilm on Congo red agar while 100% were strongly able to form biofilm on microtiter plate. The addition of Sodium azide shown an inhibition ratio in biofilm formation depending on the concentration and source of isolate also shows inhibition ability in urease enzyme production in both swimmer cells and swarmer cells of *P.mirabilis* depending on the source of isolate and concentration.

**Keywords:** Urease, Biofilm, Sodium azide, Swarming, *Proteus mirabilis.*

**DOI: http://doi.org/10.32894/kujss.2018.13.4.17**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

## 1. المقدمة:

تنتمي بكتيريا *Proteus mirabilis* الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae وتتميز عن بقية افراد العائلة بانتاجها لانزيم Phenylalanine Deaminase [1]، وهي عصيات سالبة لملون كرام تبلغ ابعادها (0.4–0.8 x 1–3) مايكرون، حرارة نموها المثلى 37 مْ و ذات تغذية كيمائية عضوية Chemoorganotrophic وتحصل عن طريق التنفس Respiration او التخمر Fermentation على الطاقة فضلا عن كونها متحركة باسواط محيطية Peritrichous flagella [2]. تتواجد في العديد من البيئات مثل المياه والتربة الملوثة [3]، كما انها من المنابت الطبيعية لقولون الانسان [1]، تتواجد في العديد الحيوانات واللبائن وقد تكون طبيعية Natural، طفيلية Parasitic او تكافلية Commensals تبعاً لطريقة معيشتها [4]. تمتلك بكتيريا *P.mirabilis* كثير من عوامل الضراوة ومنها انزيم البروتيز Protease، الغشاء الحيوي Biofilm و انزيم اليوريز Urease [5]. يعتبر انزيم اليوريز الحاوي على مجموعة النيكل nickel من اهم عوامل ضراوة بكتيريا *P.mirabilis* لكونه يعمل على تحليل اليوريا Urea الى $Co_2$ و$NH_3$ وبهذا ترتفع قاعدية البول مسهلا من عملية تكون بلورات الاباتيت Apatite و الستروفيت Struvite و الكاربونيت Carbonate التي تتجمع لتكون حصى المجاري البولية لكي تحمي البكتيريا من تأثير المضادات الحيوية [6]. يمكن تثبيط انزيم اليوريز باستعمال العديد من المواد التي قد تكون كيميائية او طبيعية ومنها Hydroxamic acids [7] و مستخلص الكركمين الطبيعي Curcumin [8] و N– acetyl Cysteine و Dipropyl Disulphide [6]. اما قابلية البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي اذ يتثمل الغشاء بتجمع البكتيريا والتصاقها على الاسطح الصلبة ومن المعروف ان البكتيريا تمر بالعديد من الظروف الغير ملائمة اثناء تحولها من كائن سابح Free-Swimming الى الخلايا التي تتجمع وتلتصق على الاسطح، ان مثل هذه التغيرات تؤدي الى تكوين الغشاء الحيوي الذي يعمل على حماية الخلايا من الظروف البيئية المختلفة [9]. ان تكون الغشاء الحيوي يمر بخمسة مراحل وهي مرحلة التصاق الخلايا البكتيرية العكسيReversible bacterial adhesion على الاسطح والذي يتميز بنمو الخلايا البطئ وتطاولها وغياب المواد الخارج الخلويةExtracellular Substances، ثم مرحلة الالتصاق الغير العكسي Irreversible Adhesion والذي يكون مصحوب بقلة استطالة الخلايا وتكون بوليمر المواد الخارج الخلوية Extracellular Polymers، بعدها مرحلة تسارع نمو الخلايا البكتيرية فضلا عن استمرار تناقص استطالة الخلايا وتوقف تكوين بوليمر المواد الخارج الخلوية، والمرحلة الاخيرة نضوج الغشاء الحيوي Maturation Of

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

Biofilm والذي يتميز بكثافته العالية وحجمه الكبير وقلة طول الخلايا البكتيرية وانضغاطها، فضلا عن زيادة انتاج المواد الخارج الخلوية، مرحلة انخفاض كثافة الخلايا البكترية و كمية المواد الخارج الخلوية نتيجة لانفصال الخلايا البكتيرية [10]. اشارت العديد من الدراسات الى إمكانية تثبيط تكوين الغشاء الحيوي باستعمال مواد مختلفة. وقد تؤثر هذه المواد على ظاهرة الانثيال او العج Swarming وهي هجرة المجاميع الخلوية بسرعة لاستيطان البيئات المغذية الغنية Nutrient – Rich environment او انسجة المضيف Host Tissues والتي تتطلب اشارات قد تكون كيميائية Chemical او Physical متبادلة بين الخلايا [11]. ان بكتيريا *P.mirabilis* ثنائية الشكل Dimorphic فهي قصيرة في المزارع السائل Broth Culture تمتلك (6–8) اسواط وتعرف بالخلايا الخضرية Vegetative cells او بالخلايا السابحة Swimmer cells ولكن عند نقلها الى الاوساط الزرعية الصلبة Solid culture media فسرعان ما تصبح متطاولة، متعددة الانوية و ممتلكة اسواط عديدة Hyperflagellated لتعرف بالخلايا الانثيالية Swarmer cells [5]. تعد اصابات المجاري البولية، احدى المشاكل الطبية التي تعاني منها معظم دول العالم وتزداد خطورة هذا المرض عند قدرة المسببات المرضية على تكوين الغشاء الحيوي وخصوصا في المرضى الذين تجرى لهم القثطرة البولية. وخاصة ان بكتيريا *P.mirabilis* وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لانزيم اليوريز فضلا عن تميزها بظاهرة الانثيال التي لها علاقة وثيقة بالتهاب المجاري البولية، لذا هدف البحث الى معرفة تأثير مادة ازايد الصوديوم في تكوين الغشاء الحيوي وانتاج انزيم اليوريز وعلاقته بظاهرة الانثيال.

## 2. المواد وطرائق العمل:

### 2.1 عزل وتشخيص بكتيريا *P.mirabilis*

جمعت 21 عزلة بكتيرية من مصادر سريرية وحيوانية يعتقد انها تعود لبكتيريا *P.mirabilis*، تضمنت الدراسة 7 عزلات من البول Urine (U) و 3 عزلات لكل من مسحات الجروح Wounds swaps(W) و البصاق Sputum (S) و عزلة واحدة لكل من براز الدجاج Chicken Feces (CF) و مستقيم الكلب Dog Rectal (DR) وعزلتين من مستقيم القطة Cat Rectal (CR) و 4 عزلات من بيئة المستشفيات Hospital environment (H.en) . زرعت جميع العزلات على وسط اكار الماكونكي MacConkey Agar ووسط اكار الدم Blood agar المجهزة من شركة Oxiod (US) ثم حضنت الاوساط الزرعية هوائيا لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 مْ.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

## 3. الاختبارات الكيموحيوية:

تم اجراء الاختبارات الاتية ( فحص الاوكسديز Oxidase، فحص الكتاليز Catalase، الاندول Indole، احمر المثيل Methyl Red، اختزال السترات Citrate Utilization، فوكس – بروسكاور Voges Proskauer) كما جاء في [12]، وشخصت باستعمال نظام الفايتك 2- لتأكيد تشخيص عزلات بكتيريا *P.mirabilis*.

### 3.1 اختبار التحري عن انتاج انزيم اليوريز Urease

تم التحري عن قابلية بكتيريا *P.mirabilis* على انتاج انزيم اليوريز كما جاء في [12].

### 3.2 اختبار التحري عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm

تم الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بطريقتين الاولى بواسطة اكار الكونغو الاحمر كما اشار [13]، اما الطريقة الثانية فقد استعملت طريقة الصفيحة العيارة Microtiter plate method كما ذكر في [14] (محورة).

### 3.3 اختبار تأثير مادة ازايد الصوديوم على انزيم اليوريز Urease

لمعرفة تأثير مادة ازايد الصوديوم على انتاج انزيم اليوريز في بكتيريا *P.mirabilis* تم اضافة ثلاثة تراكيز (0.001، 0.01، 0.1)% من ازايد الصوديوم الى وسط اكار اليوريا ثم زرعت عزلات بكتيريا *P.mirabilis* بتخطيط مائل الوسط بعدها حضن الوسط هوائيا بدرجة 37 مْ ولمدة 24 ساعة.

### 3.4 اختبار تأثير مادة ازايد الصوديوم على انزيم اليوريز Urease للخلايا السابحة والانثيالية

لمعرفة تأثير مادة ازايد الصوديوم على انزيم اليويز المنتج من الخلايا السابحة والمنثالة حضر وسط يوريا السائل المضاف له اكار بنسبة (0.3، 0.5)% في انابيب ثم اضيف اليه ثلاثة تراكيز (0.001، 0.01، 0.1) من ازايد الصوديوم وزرعت العزلة U1 بتخطيط مائل الوسط ثم حضنت الاوساط هوائيا لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 مْ.

### 3.5 اختبار تأثير مادة ازايد الصوديوم على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm

للكشف عن تأثير ازايد الصوديوم على معدل تكوين الغشاء الحيوي تم استعمال طريقة الصفيحة العيارية، اذ تم اضافة 3 تراكيز (0.01، 0.05، 0.1)% من ازايد الصوديوم الى 3 انابيب على حدى حاوية على (10) مل من وسط Luria

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

bertani broth المجهز من شركة(Himedia (India والمحضر حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم اتبعت التي ذكرها[14].

## 4. النتائج والمناقشة:

اعتمادا على الخصائص المزرعية على وسط الماكونكي واكار الدم الاساس تبين ان جميع العزلات البكتيرية تعود للجنس *Proteus*، اذ بينت نتائج الاختبارات الكيموئية والموضحة في الجدول 1 ان 18 عزلة فقط تعود لبكتيريا *P.mirabilis* [1,15]. تم تأكيد تشخيص العزلات باستخدام جهاز فايتك-2 اذ كانت النسبة المئوية لتشخيص العزلات تتراوح بين (93-99) %.

**جدول 1:** الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests لعزلات بكتيريا *P.mirabilis*

| العزلات البكتيرية | العدد | Indole | M.R | oxidase | catalase | V.P | Citrate Utilization |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *P.mirabilis* | 18 | − | + | − | + | − | متغاير |

**نتيجة سالبة :-** ، **نتيجة موجبة :** +

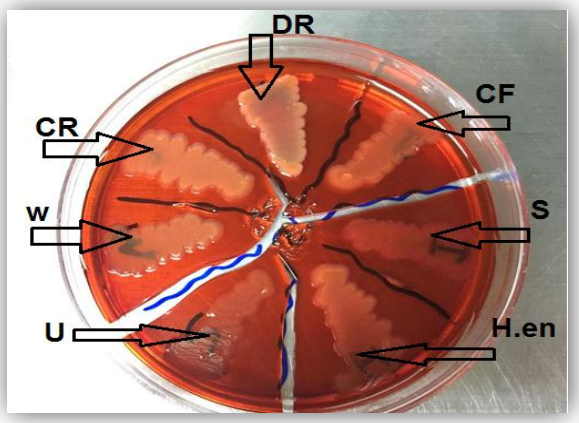
**M.R**: Methyl Red, **V.P**: Voges Proskauer,

واظهرت نتائج الكشف عن انتاج انزيم اليوريز ان جميع عزلات بكتيريا *P.mirabilis* السريرية والحيوانية منتجة لأنزيم اليوريز وبسرع مختلفة، اذ وجد ان 7/7 (100%) عزلة من البول منتجة للانزيم و 2/2 (100%) عزلة من الجروح و البصاق ومستقيم القطة منتجة للأنزيم و 1/1 (100%) عزلة من براز الدجاج ومستقيم الكلب منتجة للأنزيم و 3/3 (100%) عزلة من بيئة المستشفيات منتجة للأنزيم. تتفق الدراسة الحالية مع [16] و [17] و [18] و [19] و [20] و [21] ، اذ أشاروا الى ان معدل انتاج انزيم اليوريز من عزلات بكتيريا *P.mirabilis* المعزولة من البول و مسحات الجروح كان 100%.

اما الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي اذ استخدمت طريقة الكونغو الاحمر وايجابية الفحص على اساس اعطاء مستعمرات سوداء اللون، اذ كانت جميع العزلات 100% غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي على اكار الكونغو الاحمر، اذ اعطت المستعمرات اللون الوردي الباهت كما في الشكل 1، لوحظ من النتائج الحالية ان عزلات بكتيريا *P.mirabilis*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

المعزولة من عينات سريرية لا تختلف عن عزلات العينات البيئية في عدم قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي في سط اكار الكونغو الاحمر، وقد يعود ذلك الى عدم قدرة البكتيريا على تكوين الطبقة المخاطية Slime layer والتي تعتمد على نوع الوسط المستعمل، او قد يعود السبب الى الفعالية التثبيطية لصبغة الكونغو الاحمر لظاهرة الانثيال Swarming والتأثير على الغشاء الحيوي [22]. تتفق نتائج الدراسة الحالية مع [23] الذي اشار الى ان 100% من بكتيريا *P.mirabilis* المعزولة من التهاب المجاري البولية غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي على وسط اكار الكونغو الاحمر اما [24] فقد اشار الى ان 66.6 % من عزلات بكتيريا *P.mirabilis* المرضية غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي على اكار الكونغو الاحمر في حين اشار [25] الى ان 90 % من بكتيريا *P.mirabilis* المعزولة من التهاب الاذن الوسطى Otitis Media كانت مكونة للغشاء الحيوي. اما طريقة الصفيحة العيارية فقد اظهرت نتائج الكشف عن معدل تكوين الغشاء الحيوي من قبل عزلات *P.mirabilis* السريرية والحيوانية ان جميع العزلات كانت مكونة للغشاء الحيوي وبدرجة قوية وكما مبين في جدول 2. اشار[23] الى ان 2 % من بكتيريا *P.mirabilis* المعزولة من التهاب المجاري البولية قادرة على تكوين الغشاء الحيوي بدرجة عالية .في حين اشار[21] الى ان 100% من بكتيريا *P.mirabilis* قادرة على تكوين الغشاء الحيوي وبدرجة قوية اما [26] فقد اشار الى ان نسبة تكوين الغشاء الحيوي في بكتيريا *P.mirabilis* المعزولة من العزلات سريرية كانت 74.56 % بدرجة قوية و 13.73 % بدرجة متوسطة و 11.76 % بدرجة ضعيفة اما العزلات الحيوانية فقد كانت مكونة للغشاء للحيوي بنسبة 24.32 % بدرجة قوية و 40.54 % بدرجة متوسطة و 35.14 بدرجة ضعيفة.




**شكل 1:** قدرة بكتيريا *P.mirabilis* على تكوين الغشاء الحيوي على اكار الكونغو الاحمر Congo Red Agar

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

**U**= Urine, **W**=Wound, **S**= Sputum, **CR**= Cat Rectal, **DR**= Dog Rectal, **CF**= Chicken Feces, **H.en**=Hospital environment

**جدول 2:** مصدر وعدد عزلات بكتيريا *P.mirabilis* ودرجة تكوين الغشاء الحيوي باستخدام الصفيحة العيارية الدقيقة

| العزلات البكتيرية | عدد العزلات | معدل الكثافة الضوئية Optical Density (OD) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | قوي | وسط | ضعيف |
| **U** | 7 | + | - | - |
| **W** | 2 | + | - | - |
| **S** | 2 | + | - | - |
| **CF** | 1 | + | - | - |
| **DR** | 1 | + | - | - |
| **CR** | 2 | + | - | - |

**U**= Urine, **W**= Wound, **S**= Sputum, **CR**= Cat Rectal, **DR**= Dog Rectal, **CF**= Chicken Feces

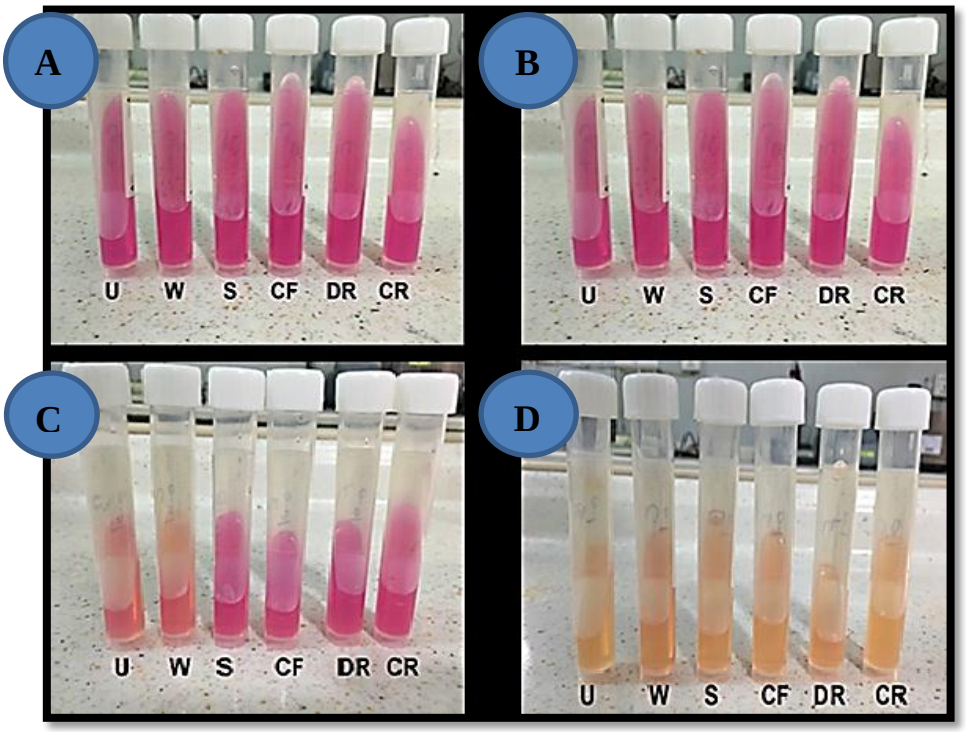
اما جدول 3 و الشكل 2 يوضح تأثير مادة ازايد الصوديوم في تثبيط انزيم اليوريز المنتج من بكتيريا *P.mirabilis*، اذ تشير النتائج الى ان تأثير المادة يختلف باختلاف التركيز ومدة الحضن ومصدر العزلة، اذ لوحظ ان التركيز 0.001 % اعطى فعلا تثبيطيا منخفضا في جميع العزلات بعد 5 ساعات من الحضن وبعد اتمام الحضن لمدة 24 ساعة لم يؤثر على انتاج الانزيم في العزلات السريرية والحيوانية، في حين اظهر التركيز 0.01% بعد 5 ساعات من الحضن فعالية تثبيطية منخفضة في عزلة البصاق (S) ومستقيم القطة (CR) وقدرة تثبيطية كاملة في عزلة البول (U) والجروح (W) وبراز الدجاج (CF) وبعد اتمام الحضن لمدة 24 ساعة اظهر تأثير فعالية تثبيطية منخفضة على عزلة البول (U) و عزلة الجروح (W) اما التركيز 0.1% فقد كان فعال في تثبيط انتاج انزيم اليوريز في العزلات السريرية والحيوانية بعد 5 و 24 ساعة حضن. ان امكانية تثبيط انزيم اليوريز باستعمال مواد مختلفة قد يعود لكون هذه المواد تمتلك قابلية على التفاعل المباشر مع مجموعة النيكل في انزيم اليوريز او قد تتنافس مع الانزيم للارتباط بالموقع الفعال فضلا عن ان مثبطات انزيم اليوريز تعمل على تكوين روابط او كلاليب ترتبط بمجموعة النيكل، او تعمل على الاتحاد مع اليوريا وتحول دون حدوث التفاعل الانزيمي [27,6] .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

**جدول 3:** تأثير مادة ازايد الصوديوم Sodium azide على انتاج انزيم اليوريز في عزلات بكتيريا *P.mirabilis*

| التراكيز ( % ) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 24 H | 0.1 5 H | 0.01 24 H | 0.01 5 H | 0.001 24 H | 0.001 5 H | Control 24 H | Control 5 H | العزلات البكتيرية |
| - | - | + - | - | + | + - | + | + - | U |
| - | - | + - | - | + | + - | + | + - | W |
| - | - | + | + - | + | + - | + | + - | S |
| - | - | + | - | + | + - | + | + - | CF |
| - | - | + | - | + | + - | + | + - | DR |
| - | - | + | + - | + | + - | + | + - | CR |

+ = عزلة منتجة للانزيم، − = عزلة غير منتجة للانزيم ، + − = متغاير، **H** = Hours




**شكل 2:** تأثير مادة ازايد الصوديوم Sodium Azide في انتاج انزيم اليوريز في عزلات بكتيريا *P.mirabilis*، A= اكار اليوريا (سيطرة)، B= اكار اليوريا المعامل بمادة ازايد الصوديوم بتركيز 0.001% ، C= اكار اليوريا المعامل بمادة ازايد الصوديوم بتركيز 0.01 % ، D= اكار اليوريا المعامل بمادة ازايد الصوديوم بتركيز 0.1 %

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

واختبر تأثير مادة ازايد الصوديوم على انتاج الانزيم في العزلة (U) *P.mirabilis* المعزولة من البول، اذ تبين النتائج في الجدول 4 و5 تأثير مادة ازايد الصوديوم على انتاج انزيم اليوريز المنتج من الخلايا السابحة (Swimmer cell) والمنثالة (Swarmer cell)، اذ تشير النتائج ان تأثير المادة يختلف باختلاف مدة الحضن والتركيز، اذ لوحظ ان كل من التركيز 0.001 % و 0.01 % اعطى فعلا تثبيطيا منخفضا في عزلة (U) بعد خمس ساعات من الحضن وبعد اتمام الحضن لمدة 24 ساعة اظهر التركيز 0.01 % فعلا تثبيطيا منخفضا، اما التركيز 0.1% فقد كان فعال في تثبيط انتاج انزيم اليوريز بعد 5 و 24 ساعة حضن. بينت النتائج الحالية ان انتاج انزيم اليوريز في الخلايا الانثيالية للعزلة (U) *P.mirabilis* لا يختلف عن الخلايا السابحة وفي جميع التراكيز وهذا لا يتفق مع الدراسة التي اجراها [28] اذ اكد ان انتاج مقدار كبير من انزيم اليوريز في الخلايا المنثالة مقارنة مع الخلايا السابحة مشيرا ايضا ان اضافة مادة (PNPG) P-nitrophenyl glycerol تعمل على انخفاض كبير في انتاج عوامل الضراوة ومنها انزيم Urease في الخلايا المنثالة مقارنة بالخلايا السابحة، وهذا قد يعزى الى اختلاف الطريقة المستعملة في التحري عن انتاج انزيم اليوريز في الخلايا المنثالة.

**جدول 4:** تأثير مادة ازايد الصوديوم على انتاج انزيم اليوريز من قبل الخلايا السابحة في العزلة *P.mirabilis* (U1)

| % 0.3 Agar | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 24 H | 0.1 5 H | 0.01 24 H | 0.01 5 H | 0.001 24 H | 0.001 5 H | Control 24 H | Control 5 H | العزلات البكتيرية |
| - | - | +<br>- | -<br>+ | + | -<br>+ | + | -<br>+ | U |

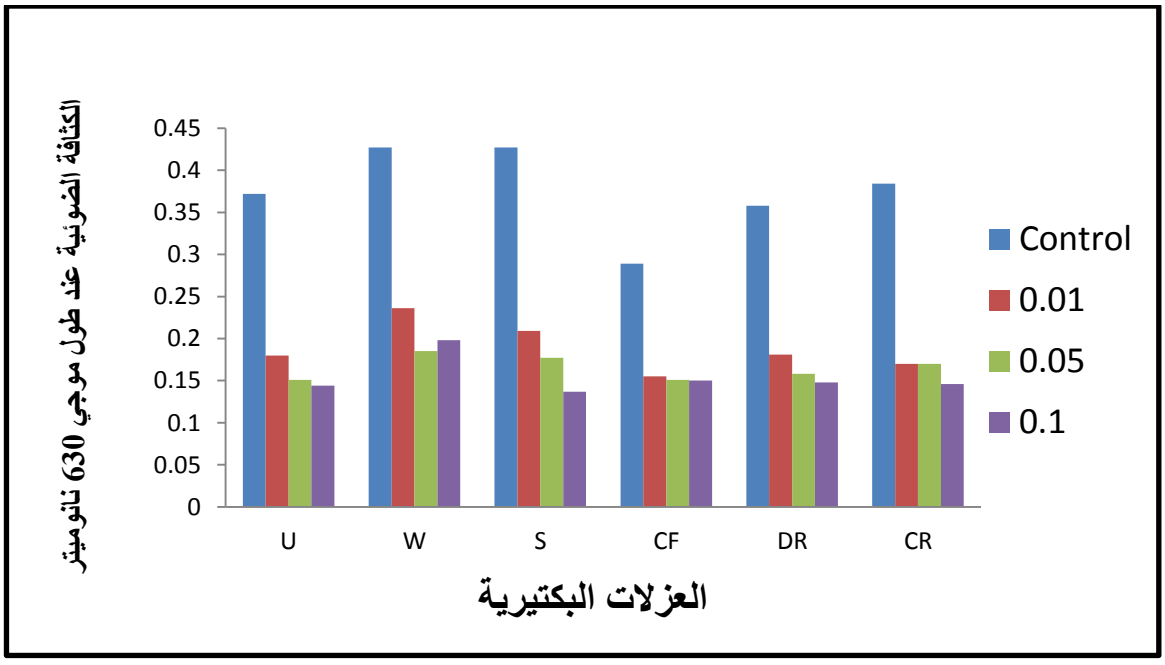
**جدول 5:** تأثير مادة ازايد الصوديوم على انتاج انزيم اليوريز من قبل الخلايا الانثيالية في العزلة *P.mirabilis* (U1)

| % 0.5 Agar | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 24 H | 0.1 5 H | 0.01 24 H | 0.01 5 H | 0.001 24 H | 0.001 5 H | Control 24 H | Control 5 H | العزلات البكتيرية |
| - | - | +<br>- | -<br>+ | + | -<br>+ | + | -<br>+ | U |

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

ووضحت النتائج في الشكل 3 ان جميع عزلات بكتيريا *P. mirabilis* كانت منتجة للغشاء الحيوي اذ كانت قيم الكثافة الضوئية Optical Density للسيطرة حسب ترتيب العزلات ( البول، الجروح، البصاق، براز الدجاج، مستقيم الكلب، مستقيم القطة) كالتالي ( 0.372، 0.427، 0.427، 0.289، 0.358، 0.384)، واظهرت النتائج ايضا ان لمادة ازايد الصوديوم Sodium Azide تأثير واضح في تثبيط قدرة البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي عند تنمية البكتيريا على وسط زرعي سائل وبوجود تراكيز مختلفة من مادة ازايد الصوديوم، اذ ان زيادة التركيز يؤدي الى انخفاض في تكوين الغشاء الحيوي وكان التأثير واضح في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي في جيع العزلات السريرية والحيوانية مقارنة بالسيطرة Control. ان تأثير مادة ازايد الصوديوم على تكوين الغشاء الحيوي قد يعود الى تأثيرها على انظمة نقل الاشارات الكيميائية بين الخلايا البكتيرية والذي يدعى بنظام Quorum Sensing System (QS) [29] اذ تعمل مادة ازايد الصوديوم على تثبيط جزيئات QS والتي لها علاقة وثيقة بتكوين الغشاء الحيوي [30].

اشارت العديد من الدراسات ان الـ QS اثر واضح في التعبير الجيني لعوامل الضراوة التي تنتجها البكتيريا ومنها قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاجها لانزيم اليوريز فضلا عن عوامل اخرى. وقد بينت النتائج التي تم الحصول عليها ان تثبيط عامل من عوامل الضراوة ومنها اليوريز يعمل على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتيريا *P.mirabilis*.




**شكل 3:** تأثير مادة ازايد الصوديوم Sodium Azide على تكوين الغشاءالحيوي Biofilm لعزلات بكتيريا *P.mirabilis*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

## 5. الاستنتاجات:

مادة ازايد الصوديوم ذات تأثير فعال في تثبيط انتاج انزيم اليوريز من الخلايا السابحة والمنثالة وتكوين الغشاء الحيوي تبعا للتركيز ومصدر العزلة.عملية تثبيط الانثيال يرافقها تثبيط في عوامل الضراوة ومنها انتاج انزيم اليوريز و تكوين الغشاء الحيوي.

## المصـــادر

**[1]** W. Levinson, **"*Review of medical microbiology and immunology*"**, 14th Edition., McGraw-Hill education ,Inc (2016).

**[2]** G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, D. R. Chairman, V. Boone, P. Chairman, M. DeVos, F. A. Good fellow, Rainey and K-H. Schleifer, ***"Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2 the proteobacteria Part B the Gammaproteobacteria"***, Publisher Springer, (2005).

**[3]** I. Kwill, D. Kazmierczak and A. Rozalski, ***"Swarming Growth and Resistance of Proteus penneri and Proteus vulgaris Strains to Normal Human Serum",*** Advances in clinical and experimental medicine, 22(2), 165 (2013).

**[4]** D. Drzewiecka, ***"Significance and roles of Proteus spp. Bacteriain natural environments"***, Microbial ecology,72,741 (2015) .

**[5]** A. Rozalski, A. Torzewska, M. Moryl, I. Kwil, A. Maszewska, K. Ostrowska, D. Drzewiecka, A. Zablotni, A. Palusiak, M. Siwinska and P. Staczek,***"Proteus sp. – an opportunistic bacterial pathogen -classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors"***, Folia Biologica et Oecologica, 8 , 1 (2012) .

**[6]** R. M. Abdel-Baky, M. A. Ali, G. ED. A. A. Abuo-Rahma and N. AbdelAziz, ***"Inhibition of urease enzyme production and some other virulence factors expression in Proteus mirabilis by N-Acetyl Cysteine and Dipropyl Disulphide"***,In: G. Donelli

(eds) Advances in microbiology, infectious diseases and public health,advances in experimental medicine and biology, Springer, Cham, 973, 99 (2017).

**[7]** J. Hase and K. Kobashi, **"*Inhibition of Proteus vulgaris Urease by Hydroxamic Acids*"**, The journal of biochemistry, 62(3), 293 (1967).

**[8]** J. Prywer and A. Torzewska, **"*Effect of Curcumin Against Proteus mirabilis During Crystallization of Struvite fromArtificial Urine*"**, Hindawi Publishing Corporation, 2012, 1 (2012).

**[9]** G. O'toole, H. B. Kaplan and R. Kolter, **"*Biofilm formation as microbial development*"**, Annual review of microbiology, 54, 49 (2000).

**[10]** G. Schlapp, P. Scavone, P. Zunio and S. Härtel,**"*Development of 3D architecture of uropathogenic Proteus mirabilis batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach*"**, Journal of microbiological methods, 87, 234 (2011).

**[11]** N. Verstraeten, K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant and J. Michiels,**"*Living on a surface: swarming and biofilm formation*"**, Trends microbiology, 16(10), 496 (2008).

**[12]** B. A. Forbes, D. F. Saham and A.S. Weissfeld,**"*Baily and Scott's diagnostic microbiology*"**, 12th Ed., Mosby, Inc., an anffilliate of Elsevier, Inc, (2007).

**[13]** D. J. Freeman, F. R. Falkiner and C.T. Keane,**"*New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci*"**, Journal of clinical pathology, 42(8), 872 (1989).

**[14]** A. Fusco, L. Corettil, V. Savio, E. Buommino, F. Lembo and G. Donnarumma, **"*Biofilm formation and immunomodulatory activity of Proteus mirabilis clinically isolated strains*"**, International journal of molecular science, 18(2), 1 (2017).

**[15]** C. M. O'hara, F. W. Brenner, and J. M. Miller,**"*Classification, identification , and clinical significance of Proteus, Providencia, and Morganella*"**, Clinical microbiology reviews, 13(4), 534 (2000).

**[16]** P. M. Kafaf, **"*Study on some biological activity and Biotyping of Proteus mirabilis isolated from clinical samples*"**,MS.c. Thesis, Al-Mustansiryia University College of Science, Iraq (2006).

**[17]** W. W. Al-Bassam and A-K. Al-Kazaz,**" *The Isolation and characterization of Proteus mirabilis from different clinical samples*"**, Journal of biotechnology research center, 7(2), 24 (2013).

**[18]** T. H. Ali and H. M. Jasim, **"*Detection of virulence factors of local isolates of Proteus mirabilis*"**, Journal of Al-Nahrain university – Science, 17(4), 137 (2014).

**[19]** عدنان العزاوي، هادي الطائي و ابراهيم الرجب،**"*دراسة بكتيرولوجية لبكتريا Proteus mirabilis المعزولة من اصابات سريرية مختلف*"**، مجلة ديالى للعلوم الصرفة، 11(2)، 42 (2014).

**[20]** D. A. Ahmed, **"*Prevalence of Proteus spp. in some hospitals in Baghdad city*"**, Iraqi Journal of Science, 65(1), 665 (2015).

**[21]** M. J. Al-Dawah, A. H. Al-Hamadany and E. M. Al-Jarallah**," *Study of Some Virulence Factors of Proteus mirabilis Isolated from Urinary Stones Patients*"**, Journal of biology, agriculture and healthcare, 5(23), 85 (2015).

**[22]** C. J. Ingham and E. B. Jacob, **"*Swarming and complex pattern formation in Paenibacillus vortex studied by imaging and tracking cells*"**, BMC microbiology, 8(36), 1 (2008).

**[23]** N. S. Subburaju,**" *In vitro biofilm formation and antimicrobial Susceptibility pattren of Uropathogens in Patients with catheter associated urinary tract infections (CAUTIS)* "**, University Journal of Pre and Para Clinical Sciences, 2(3), (2016).

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 13, Issue 4, December 2018 , pp. (238-252)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

**[24]** ايمان محمود خضر،**"*التحري عن قدرة بعض الأنواع البكتيرية على إنتاج المادة المخاطية Slime layer*"**، مجلة علوم الرافدين، 24(1)، 36 (2013).

**[25]** لمياء سعود خضر،**"*تحديد بعض عوامل الضراوة لبكتريا Proteus mirabilis المعزولة من الاشخاص المصابين بالتهاب الاذن الوسطى*"**، مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 22(8)، 27 (2017).

**[26]** علي سعد كاظم،حسين، **"*دراسة بكتيريولوجية وجزيئية للنوع Proteus mirabilis المعزولة من مصادر سريرية وحيوانية*"**، رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم، جامعة بغداد، العراق (2016).

**[27]** L. S. B. Upadhyay,**"*Urease inhibitors : A review*"**,Indian journal of biotechnology, 11, 381 (2012).

**[28]** S-J. Liaw, H-C. Lai, S.W. Ho, K.T. Luh and W-B. Wang, **"*Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in Proteus mirabilis by p-nitrophenylglycerol* "**, Journal of medical microbiology, 49(8), 725 (2000).

**[29]** M.G. Kociolek,**"*Quorum-Sensing inhibitors and biofilms*"**, Anti-infective agents in medicinal chemistry, 8, 315 (2009).

**[30]** M. Ghaidaa, W. Yanchang and H. Abdallah,**"*The effect of p-nitrophenylglycerol on swarming and the production of some virulence factors in Proteus vulgaris*"**, New York Science Journal, 6(9), 08 (2013).