



دراسة فعالية انزيم Amylase proteinase K - في تثبيط الغشاء الحيوي لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* المعزولة من مرضى التهاب المسالك البولية.

محمد كامل كودي^{1*}، أم.د. مثنى حامد حسن²، أ.د. محمد ابراهيم نادر³

¹ دائرة صحة الأنبار، وزارة الصحة، الأنبار، العراق. mmm86kk@gmail.com

² الاستاذ المساعد الدكتور، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الأنبار، الأنبار، العراق. muthanna_477_aliraqi@yahoo.com

³ الاستاذ الدكتور، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد، بغداد، العراق. 2000@yahoo.commohgen

تاريخ قبول النشر: 2018/4/24

تاريخ استلام البحث: 2018/3/7

هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن قابلية تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* عينة إدرار من المرضى الذين يعانون من التهاب المسالك البولية الراقدين والمراجعين مستشفى الرمادي التعليمي، مستشفى اليرموك التعليمي، مستشفى الرمادي للنسائية والمختبرات التعليمية في مدينة الطب ومن كلا الجنسين للفترة الزمنية من (2017/7/5) ولغاية (2017/10/10) وشخصت العينات مختبرياً بزراعتها على الأوساط الانتقائية فضلاً عن الاختبارات الكيموحيوية وتم تأكيد التشخيص باستعمال جهاز الفايتهك VITEK-2 compact system. بينت النتائج أن نسبة عزل بكتريا *K.pneumoniae* 17.1% (68) وبكتريا *S.aureus* هي 13.1% (52) واختبرت حساسيتها ضد (10) مضادات حيوية وظهرت العزلات حسب نوع البكتريا، تم الكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج الغشاء الحيوي بالطرق النوعية والكمية، اختبرت العزلات الأكثر تكويناً للغشاء الحيوي والمقاومة للمضادات الحيوية وبواقع خمس عزلات لكل بكتريا، استخدام المواد الصناعية كإنزيم Amylase Proteinase K - تراكيز لكل إنزيم 33,100,250µg/ml على التوالي في تثبيط الغشاء الحيوي لبكتريا الاختبار بطريقة تطبيق المعايرة الدقيقة وظهرت النتائج انخفاضاً ملحوظاً في تكون الغشاء الحيوي بعد اضافة الانزيمات مقارنة بتكوين الغشاء قبل اضافة الانزيمات بلغت اعلى نسبة انخفاض للغشاء الحيوي لأنزيم Proteinase K عند التركيز 33µg/ml 95% تثبيط وجدت في تركيز 250µg/ml 59% لبكتريا *S.aureus* اما بالنسبة لبكتريا *K.pneumoniae* التركيز نفسه فعالية تثبيطية بنسبة 93% واقل فعالية تثبيطية عند التركيز 250µg/ml 61%. اما فيما يخص انزيم Amylase - فقد ابدى فعالية تثبيطية عالية بنسبة 96% عند التركيز 100mg/ml لبكتريا *S.aureus* تثبيط وجدت في التركيز 20mg/ml 87% اما فيما يخص بكتريا *K.pneumoniae* فقد ابدت التراكيز الثلاثية فعالية تثبيطية حددت بين 36-77%. كما اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين كل تركيز من الانزيم نوعين من البكتريا وكذلك وجود فروق معنوية بين مختلف التراكيز ولكل نوع بكتيري عند مستوى معنوي (P 0.01). الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية الذهبية، الكليسيلا الرئوية، Amylase، Proteinase K، α-، الغشاء الحيوي.

STUDYING THE EFFECT OF Proteinase K AND -Amylase ON INHIBITION OF *Staphylococcus aureus* AND *Klebsiella pneumoniae* BIOFILM ISOLATE FROM URINARY TRACT INFECTION.

Mohammed Kamel Kodi^{1*}, Muthanna Hamid Hassan², Mohammed Ebraheem Nader³

¹ Bacteriology, Ramadi hospital, Anbar, Iraq. mmm86kk@gmail.com

² Assis. Prof. Dr. Department of Biology, Collage of science, Al-Anbar University, Anbar, Iraq muthanna_477_aliraqi@yahoo.com

³ Prof. Dr. Institute Genetic Engineering and Biotechnology for PostgraduateStudies, University of Baghdad, Baghdad, Iraq. mohgen2000@yahoo.com

ABSTRACT

The current study aimed to investigate the viability of biofilm formation *klebsilla pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. 440 urine samples were collected from patients suffering from urinary tract infection (UTI) from those who were admitted and visitors to Al-Ramadi Teaching Hospital, Al-Yarmouk Teaching Hospital, Al-Ramadi Teaching Hospital for women and children and , Teaching Laboratories in the Medical City for

* البحث مستل من رسالة ماجستير



both genders for a period extended from 5 July, 2017 to 10 October, 2017. Samples were diagnosed by culturing them on a selective media and by biochemical testes , also, diagnosis was ensured by using VITEK-2 compact system. Results showed that *K.pneumoniae* isolation ratio was 17.1%(68) and *S.aureus* ratio was 13.1%(52). Their sensitivity was tested against 10 antibiotics, isolates showed uneven resistance according to the type of bacteria. Bacterial biofilm formation viability was detected by qualitative and quantitative methods, isolates per bacteria. Artificial material was used proteinase K and -Amylase with triple concentrations to each enzyme 33,100,250 µg/ml and 20,100,200 mg/ml respectively, with biofilm inhibition of testing bacteria by precision calibration dishes method. Result showed noticeable decreasing in biofilm formation after enzymes addition in comparison with its formation before enzymes addition, where high decreasing ratio of biofilm according to proteinase K was at concentration 33µg/ml with 95% ratio, while less inhibition to *K.pneumoniae*, the same concentration showed inhibition viability at 93% and less inhibition viability at 259 µg/ml with 61%. Also, regarding to -Amylase showed a high inhibition activity at 95%with concentration 100 mg/ml to *S.aureus* and less inhibition ratio was found at 20 mg/ml with 87%. While to *K.pneumoniae* , the triple concentrations showed inhibition activity ranged between 36-77%. Statistical analysis showed presence of significant variation between each enzyme concentration to both types of bacteria, also presence of significant variation among different concentration to each bacterial type at (P 0.01).

Keywords : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, proteinase K, α-Amylase, biofilm.

1. INTRODUCTION

تعد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام المسبب الرئيسي لخمج المجاري البولية (UTIs) والذي يعتبر احد الامراض الأكثر شيوعاً لدرجة جعلته بالمرتبة الثانية بعد اخماج المسالك التنفسية وهو يصيب الاناث والذكور وفي مختلف الاعمار امتداداً من حديثي الولادة حتى مرحلة الشيخوخة (Abid & Jamal, 2008; AIBejat, 2008; Srivastave & Vasudev, 2011) المستشفيات، حيث تمتلك العديد من العوامل التي تزيد من ضراوتها وامراضيتها، منها قدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية و التصاقها على خلايا المضيف ، وأيضاً على السطوح غير الحية (Krismer & Peschel, 2011) . تستطيع بكتريا الـ *K.pneumoniae* تكوين الغشاء الحيوي، حيث يلعب الخمج من نوع Type 3 Fimbriae دوراً كبيراً في تكوين الغشاء الحيوي الذي يعتبر مشكلة حقيقية في الأجهزة الطبية وخاصة القثطرة البولية التي تكون سبباً للكثير من الاصابات المكتسبة في المستشفيات (Schroll et al., 2010). تعيش البكتريا على شكل تجمعات مُعقدة التركيب مرتبطة بالأسطح تتواجد داخل قالب من بوليمرات خارج خلوية تعرف بالأغشية الحيوية تعطي أنماطاً مظهرية متغيرة للنمو، التعبير الجيني وإنتاج البروتين، ويمكن أن تسبب إلى عواقب طبية واقتصادية (Mariana et al., 2009) ويعد الغشاء الحيوي من اهم عوامل الضراوة للممرضات لما يولد من حماية للممرض حيث يلعب دوراً مهماً في تطور الاخماج وتقليل نفوذية الدواء مما يزيد من مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية، وهذا يؤدي الى تحول الخمج الحاد الى مزمن (Niemirowicz et al., 2014) ، وقد أدت الزيادة في عدد العدوى المكونة للغشاء الحيوي وضرورة منع تشكيل وإزالة الأغشية الحيوية الجرثومية من المواقع المصابة إلى اكتشاف استراتيجيات جديدة للعلاج ومنها استخدام المواد الكيميائية أو غيرها من الاستراتيجيات التي تستهدف خطوات مختلفة من تشكيل الغشاء الحيوي (Kostakioti et al., 2013; Nostro et al., 2013)

الإنزيمات هي الاختيار الجيد وأحد أسباب ذلك هو استخدامها كعلاجات لتحطيم الصلابة الهيكلية لمصفوفة متعددة السكريات خارج الخلية (EPS) Exopolyssacharide في الأغشية الحيوية وهي بديل ممكن عندما لا تعطي عوامل التطهير القياسية نتائج مرضية في إزالة الأغشية الحيوية. أنزيمات Depolymerase قادرة على تحلل البروتينات عند اواصر اميد معينة. وكذلك تحليل الكربوهيدرات والدهون وتدمير البنية الهيكلية للأغشية الحيوية بشكل فعال وبدلاً من قتل معظم عوالم البكتريا وبعض البكتريا الساكنة ، فإنها تفكك الأغشية الحيوية وتسمح بإزالتها من النظام بأكملها (Xavier et al., 2005). وبالتالي فإنها تساعد على القضاء على الأغشية الحيوية الحالية ومنع البكتريا من التمسك بالسطوح مما يجعلها خيار مرغوب فيه (Shukla & Rao, 2017) وقد تم التحقيق من استخدام depolymerases كوسيلة لإزالة الأغشية



الحيوية في العديد من الدراسات الحديثة باستخدام proteases و amylases (Molobela et al., 2010). يعد الغشاء الحيوي من أهم عوامل الضراوة التي تنتجها الكائنات المجهرية ولاسيما بكتريا المكورات العنقودية الذهبية و الكليبيلا الرئوية نظراً لأهمية تكوين الغشاء الحيوي وخطورته في احداث اصابات مختلفة ، ونظراً لأهمية التطبيقية للمواد الصناعية قد تم التحقيق من استخدام انزيم Proteinase K و α -Amylase كوسيلة لإزالة الأغشية الحيوية .

MATERIALS AND METHODS

عزل البكتريا والتشخيص Isolation of bacteria and diagnosis: استعملت في هذه الدراسة (100) عزلة من مجموع (396) عزلة من البكتريا الممرضة الموجبة والسالبة لصبغة كرام والمعزولة من مرضى اخماج المسالك البولية في مستشفى الرمادي التعليمي، مستشفى اليرموك التعليمي، مستشفى الرمادي للنسائية والاطفال، والمختبرات التعليمية في مدينة الطب. للفترة الزمنية من (2017/7/5) ولغاية (2017/10/10) للتحري عن مدى تلوثها بالبكتريا. وتوزعت العزلات التي تم اختبارها على النحو الاتي (50) عزلة لبكتريا *S.aureus* و (50) عزلة لبكتريا *K.pneumoniae* وقد شخصت العزلات اعتماداً على ماورد في (Holt et al, 1994) وشخصت المستعمرات مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات، لونها، ورائحتها، وقوامها، وحجمها على وسط اكار الدم و اكار الماكونكي ووسط المانتول الملحي ووسط الايوسين المثلين الازرق، واخضعت العزلات الى الفحص المجهرى باستعمال صبغة كرام للتعرف على شكل البكتريا وتنظيمها وتفاعلها مع صبغة كرام، واستعملت الفحوصات الكيموحيوية المختلفة مثل فحص الكتاليز، الاوكسيد، الاندول، احمر المثل، الفوكس بروسكاور، استهلاك السترات الحركية، انزيم التخثر Coagulase، انزيم محلل الدم، واليوربا وغيرها وتم تأكيد التشخيص باستعمال جهاز Vitek2. تم تحضير الأوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المجزة إذ تم تعديل الرقم الهيدروجيني والتعقيم باستعمال المؤسدة تحت ضغط 15 (بار/انج²) وبدرجة حرارة 121م ولمدة 15 دقيقة.

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic sensitivity test: استخدمت (10) انواع من المضادات الحيوية المجزة من شركة Mast Group اعتمدت طريقة الأنتشار بالأقراص Disc diffusion method وبالاعتماد على طريقة (Morello et al., 2006) وقسمت العزلات الى ثلاث فئات المقاومة وشبه المقاومة والحساسة وتمت مقارنة النتائج بأقطار التثبيط القياسية الواردة في (CLSI, 2016).

تحضير الأنزيم الحال للبروتين Proteinase K preparation: اذيب (20 ملغم) من الانزيم في (10 مل) من الماء المقطر الخالي من الايونات (Deionized distal water) المعقم، للحصول على التركيز النهائي (2 ملغم/مل) ويحفظ بدرجة حرارة 4م لحين الاستعمال.

تحضير أنزيم الحال للسكريات الفا-أميليز Amylase Preparation: اذيب (6 غم) من الإنزيم في (10 مل) من الماء المقطر الخالي من الايونات (Deionized distal water) المعقم، للحصول على التركيز النهائي (600 ملغم/مل) ويحفظ بدرجة حرارة 4م لحين الاستعمال.

اختبار تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية و الكليبيلا الرئوية Test the formation of the bacterial biofilm of S.aureus and K.pneumoniae: استعملت طريقة اطباق المعايرة الدقيقة (MTP) microtitration plates method للتحري عن اختبار تكوين الغشاء الحيوي (Dheepa et al., 2011).

قياس الفعالية التثبيطية لأنزيم Amylase proteinase K ضد بكتريا S.aureus و K.pneumoniae Measuring enzyme activity of proteinase K and Amylase against S.aureus and K.pneumoniae:

اتبعت طريقة الانتشار بالحفر للتحري عن الفعالية التثبيطية well diffusion method ضد بكتريا *S.aureus* و *K.pneumoniae* (Ouibrahim et al., 2013).

تثبيط الغشاء الحيوي Inhibition of Biofilm: التاثير الإنزيمي لتثبيط الغشاء الحيوي لبكتريا عنقودية الذهبية والكليبيلا الرئوية The enzymatic effect of inhibition of biofilm for S.aureus and K.pneumoniae:

تم اجراء الفعالية الإنزيمية لمعاملة الغشاء الحيوي المكون من بكتريا المكورات العنقودية والكليبيلا الرئوية بواسطة اطباق المعايرة الدقيقة (MTP) وفقاً ما جاء في (Molobela et al., 2010) مع بعض التحويرات.



حضر العالق البكتيري وقورن مع انبوية ثابت العكورة القياسي (McFarland No. 0.5) من حيث العكورة ثم لطح العالق البكتيري في وسط Trypticase soy broth وحضن بدرجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة في ظروف ثابتة، إضافة الوسط الزراعي الحاوي على العزلات المنشطة بمقدار 200 مايكروليتر لكل حفرة من أطباق المعايرة (بثلاث مكررات في حفر الصفوف العمودية طبق المعايرة لكل عزلة على حدة وبالتالي). إضافة الى سيطرة سالبة بإضافة 200 مايكروليتر من نفس الوسط الزراعي المعقم غير المملح بالبكتريا لثلاث مكررات في آخر صف عمودي، وحضنت اطباق المعايرة بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة. تم بعدها التخلص من محتويات الحفر وغسلت بالماء المقطر المعقم لإزالة الخلايا البكتيرية غير الملتصقة. تم بعدها إضافة 200 مايكروليتر من انزيم α -Amylase لثلاث تراكيز 20,100,200 mg/ml ، ومن انزيم proteinase K لثلاث تراكيز 33,100,250 $\mu\text{g/ml}$. تم استخدام ثلاث مكررات بدون معاملة الانزيمات كسيطرة لكلا النوعين من البكتريا. وحضنت اطباق المعايرة لمدة ساعة في درجة حرارة 37م. بعد الحضنة فرغت اطباق المعايرة وغسلت بالماء المقطر ثبتت الخلايا المتبقية مع 200 مايكروليتر من الميثانول بتركيز 99% لمدة 15 دقيقة. سكب المحلول وترك الطبق ليجف، ثم صبغت الحفر بصبغة البنفسجي البلوري (0.1%) لمدة 15 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر لثلاث مرات وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة، اضيف 200 مايكروليتر من حامض الخليك الثلجي بتركيز (33%) كخطوة تحويلية لربط الصبغة بالخلايا الملتصقة، وبعدها تم قراءة الكثافة الضوئية بجهاز ELISA reader لجميع المحتويات بطول موجي 630 نانومتر لتحديد كفاءة العلاج الانزيمي في تثبيط الغشاء الحيوي. تم استخدام المعيار الكمي لقياس فعالية إزالة هذه الإنزيمات على الغشاء الحيوي لكلا النوعين من البكتريا. واستخدمت مقياس للفعالية يسمى تخفيض النسبة المئوية من قبل (Pitts et al., 2003) لتقييم فعالية هذه الإنزيمات.

$$\text{النسبة المئوية للتخفيض} = \left[\frac{(C - B) - (T - B)}{(C - B)} \right] * 100\%$$

حيث:

B يدل على متوسط الامتصاصية لحفر السيطرة السالبة ؛

C يدل على متوسط امتصاص للسيطرة الموجبة ؛

T يشير إلى متوسط الامتصاصية للحفر المعالجة بالإنزيم.

RESULTS AND DISCUSSION

بينت نتائج عزل البكتريا من مجموع (440) عينة ادرار من مرضى يعانون من اخماج المجاري البولية للتحري عن وجود البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام في هذه العينات ولقد تبين بأن (396) عينة منها أي بنسبة (90%) أعطت نمواً بكتيرياً على أوساط الزرع الأولى في حين لم تعط العينات الباقية أي نمواً بكتيرياً، ان النسبة المرتفعة للزرع الايجابي لهذه العينات نسبة حقيقية ومتوقعة حيث ان جميع العينات المأخوذة هي من حالات مرضية (AlKaabi, 2013) كذلك اوضحت النتائج ان نسبة العزل في النساء اكثر من الرجال بنسبة 66% للنساء و 34% للرجال، اخضعت العزلات لمجموعة من الاختبارات المظهرية والزرعية فضلاً عن الاختبارات الكيموحيوية الموضح نتائجها في (الجدول، 1) كما اظهرت النتائج في (الجدول، 2) وجود بكتريا *K.pneumoniae* في (68) عزلة ادرار بنسبة (17.1%) من العينات الموجبة للزرع البكتيري وبالمرتبة الثانية بعد بكتريا القولون (*Escherichia coli*) اما بكتريا المكورات العنقودية الذهبية فقد بلغت (52) عزلة بنسبة (13.1%) من مجموع العزلات وهذه تتفق مع الدراسة التي توصل اليها الباحث (2016) (Al-Dulemi).

(1): يوضح الاختبارات الكيموحيوية والمجهرية لغرض التمييز والتشخيص الأولي.

String test	Haemolysis	Coagulase	Urease	Catalase	Oxidase	Citrate	V-P	M- Red	Indole	Motility	Mannitol	Gram stain	
-	+	+	+	+	-	/	/	/	/	-	+	+	<i>S.aureus</i>
+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>K. pneumonia</i>

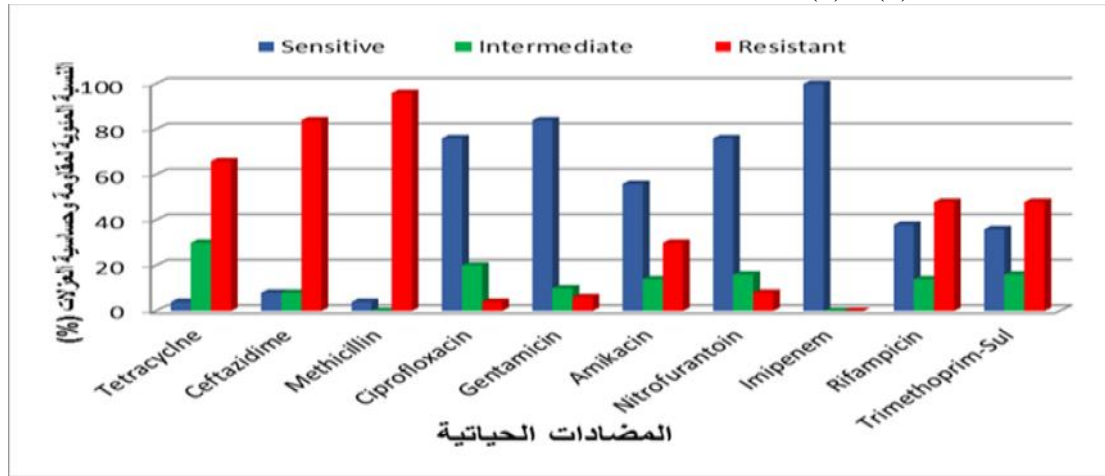
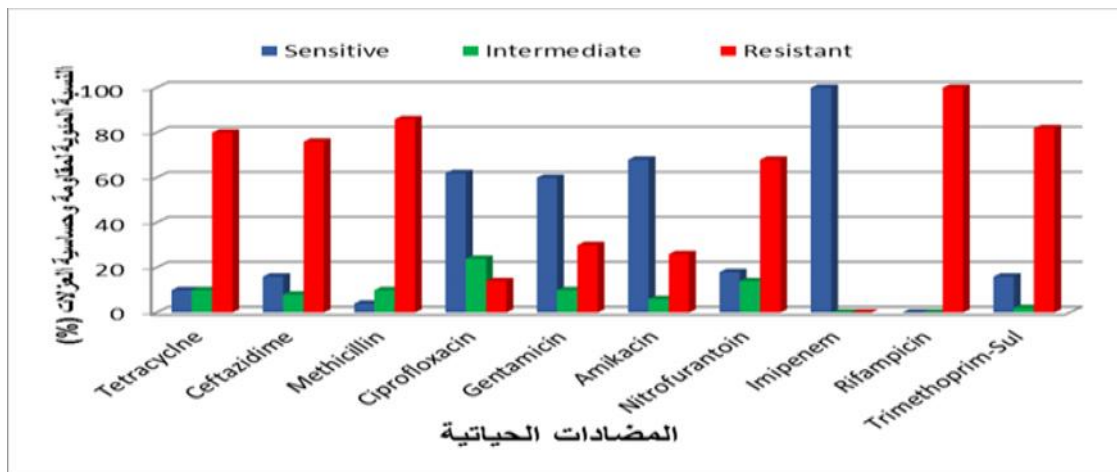
(+) الفحص الموجب

(-) الفحص السالب

(2): عدد العزلات البكتيرية ونسبتها المئوية من العينات.

النسبة المئوية	العزلات البكتيرية	العزلات البكتيرية
43.68	173	<i>Escherichia coli</i>
17.17	68	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15.40	61	<i>Proteus spp</i>
13.13	52	<i>Staphylococcus aureus</i>
6.56	26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4.04	16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
%100	396	

تم اختبار (100) عزلة لفحص الحساسية لـ (10) مضادات حيوية لكلا النوعين من البكتيريا قيد الدراسة وبواقع (50) عزلة لكل نوع بكتيري وحددت النتائج بوصف البكتيريا حساسة S او متوسطة المقاومة I او مقاومة R من خلال قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة ذلك بما ورد في (2016), Clinical Laboratory Standards Institute CLSI سجلت النتائج الموضحة بالشكلين (1) و (2):

(1): النسبة المئوية لمقاومة وحساسية عزلات *S.aureus* للمضادات الحيوية.(2): النسبة المئوية لمقاومة وحساسية عزلات *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية.

التحري عن تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية والكليبيلا الرئوية *S.aureus* و *K.pneumoniae* لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقتي formation biofilm for bacteria *S.aureus* and *K.pneumoniae*

اظهرت نتائج الكشف عن قابلية كل من بكتريا *S.aureus* و *K.pneumoniae* لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقتي النمو على أكار أحمر الكونغو (CRA) وطريقة الأنبوب (TM) وطريقة أطباق



المعايرة الدقيقة (MTP) Microtitre plate الموضحة في (الجدول، 3) و أظهرت النتيجة الموجبة بدلالة تكوين الأغشية الحيوية على الجدران الداخلية وقعر الأنبوبة بشكل طبقة بنفسجية ملتصقة بالسطح الداخلي للأنبوبة وأما بالنسبة لطريقة آكر أحمر الكونغو (CRA) ظهرت العزلات المكونة للأغشية الحيوية بمظهر أسود جاف فيما ظهرت العزلات غير المكونة للأغشية بلون وردي أو أحمر أو نبيذي وهذا مطابق مع ما ذكره (Hassan et al., 2011) أشارت الدراسات الى ان طريقة احمر الكونغو و طريقة الانابيب (TM) بوصفها من الطرق النوعية الكفوءة في التحري عن تكوين الغشاء الحيوي وتستخدم كطريقة فحص عامة للكشف عن الاخير في المختبرات (Rewatkar & Wadher, 2013) ، بينت النتائج التي تم الحصول عليها بطريقة MTP كما موضح في (الجدول،3) تباين كبير في كمية انتاج الغشاء الحيوي لكلا النوعين من البكتريا اعتماداً على قراءات الكثافة الضوئية OD للعزلات المختلفة ، اذ أظهرت بكتريا *K.pneumoniae* تفاوت في معدل قراءات الكثافة الضوئية تراوحت بين (0.066-0.302) ، حيث كانت 30% من عزلات هذه البكتريا منتجة للغشاء الحيوي بشكل قوي و 64% أنتجته بشكل متوسط او ضعيف بينما لم تتمكن 6% من انتاجه ، في الوقت نفسه أظهرت جميع عزلات بكتريا *S.aureus* قابليتها في إنتاج الغشاء الحيوي، وتفاوتت في معدلات الإنتاج للغشاء إذ تراوحت بين (0.092-0.782) ، إذ تميزت 74% من عزلاتها بإنتاجها القوي للغشاء الحيوي ، بينما بلغت العزلات المتوسطة الإنتاج 26%. ويتبين من النتائج التي تم الحصول عليها أن طريقة MTP هي الأكثر دقة وحساسية من باقي الطرق المستعملة (CRA و TM) كون طريقة MTP لاتعتمد على التميز النوعي بل يتم قراءتها بواسطة جهاز قارئ الامتزاز الانزيمي المناعي المرتبط ELISA . ولم تتفق هذه النتيجة مع (Eftekhar & Dadaei, 2011) . إذ لم يلاحظ اي فرق في نسب انتاج الغشاء الحيوي عند استعمال طريقة أطباق المعايرة الدقيقة MTP وطريقة CRA وذكر ان كلا الطريقتين كانتا بالحساسية نفسها واطهرت نتائج متشابهة في التحري عن انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 91% لكليهما ، بينما دراسة (Dadawala et al., 2011) فقد اوضحت وجود اختلاف في نتائج الطريقتين وان طريقة CRA كانت الاكفا في التحري عن انتاج الغشاء الحيوي وهذا لايتفق ايضاً مع نتائج الدراسة الحالية .في حين أشار (Bozkurt et al., 2009) إلى ان طريقة CRA لا ينبغي ان تستعمل اختباراً لقياس قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي لانها تعطي نتائج غير حقيقية. واتفقت نتائج دراستنا مع ما اشار اليه (Al-Sudany, 2014) ان طريقة MTP تعد الاكثر حساسية وسهولة للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي.

(3): إنتاج الغشاء الحيوي بطريقتي النمو على وسط أحمر الكونغو وطريقة الانبوب وطريقة اطباق المعايرة الدقيقة.

النسبة المئوية (%)									نوع البكتريا
اطباق المعايرة الدقيقة MTP			طريقة الانبوب TM			طريقة وسط احمر الكونغو CRA			
غير المنتجة	ضعيف		غير	ضعيف		غير	ضعيف		
0%	26%	74%	0%	36%	64%	20%	68%	12%	<i>S.aureus</i>
6%	64%	30%	8%	40%	52%	30%	62%	8%	<i>K.pneumoniae</i>

اختبار الفعالية التثبيطية للأنزيمات *S.aureus* و *K.pneumoniae* المكونة للغشاء الحيوي بطريقة حفر

Test of inhibition enzyme activity against *K.pneumoniae* and *S.aureus* on formation of biofilm by use well agar methode

اظهرت نتائج هذه الدراسة عدم تأثير فعالية انزيمي α -Amylase و proteinase K ضد النمو البكتيري باستخدام التراكيز 100، 200، 400، 600 mg/ml و 500، 1000، 1500، 2000 μ g/ml على التوالي ولكلا النوعين من البكتريا واتفقت نتائج دراستنا مع ما توصل اليه (Kalpana et al., 2012) اذا لم يبدي انزيم α -Amylase اي فعالية ضد ميكروبية تجاه العزلات المنتخبة بطريقة حفر الاكار وتحاقيف الانابيب

تأثير انزيم proteinase K على تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية والكليسيلا الرئوية Effect of proteinase K enzyme on the biofilm formation of *S.aureus* and *K.pneumoniae*

للتحقيق في نشاط تثبيط الغشاء الحيوي، تم اختبار مجموعة من التراكيز لأنزيم Proteinase K ضد الاغشية الحيوية لبكتريا *K.pneumoniae* و *S.aureus* وبيبين (الجدولين، 4،5) التركيز ونسب التثبيط للغشاء الحيوي. وقد لوحظ انخفاض حوالي 95% للغشاء الحيوي المكون من قبل بكتريا *S.aureus* مع تركيز 33 μ g/ml بواسطة انزيم Proteinase K ، في حين أن أعلى جرعة 250 μ g/ml أظهرت انخفاض اقل للغشاء الحيوي بنسبة 59%. اما فيما يخص بكتريا *K.pneumoniae* فقد اعطى الانزيم نتائج متفاوتة اذ اظهر فعالية عالية بتركيز 33 μ g/ml بنسبة تثبيط للغشاء الحيوي 93% وفعالية اقل بتركيز 100 μ g/ml بينما ابدى الانزيم فعالية تثبيط للغشاء الحيوي بنسبة قليلة عند التركيز



العالي 250µg/ml وبالنظر إلى نتائج انزيم proteinase K كانت أكثر فعالية لإزالة الغشاء الحيوي في اختبار تركيز 33µg/ml لكلا النوعين من البكتيريا ولذلك، كان واضحاً من هذه الملاحظة أن زيادة تركيز Proteinase K لم يؤدي إلى تعزيز النسبي من التثبيط، وان نسبة 100% تحطيم للغشاء الحيوي لا يمكن أن يتحقق. وللحفاظ على النهج الاقتصادية، تم اختيار تركيز 33µg/ml من Proteinase K لمزيد من التجارب واتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Shukla & Rao, 2017) حيث لم يعطي الانزيم فعالية تثبيطية للغشاء الحيوي عند التراكيز العالية. وتتفق هذه الدراسة مع ما توصل إليه (Nguyen & Burrows, 2014) إذ وجد ان Proteinase K مثبت للغشاء الحيوي أكثر فاعلية من DNase I وبتراكيز بين 6.3 و 200 µg/ml، يمنع تشكيل الغشاء الحيوي بشكل فعال بالحصول على درجة التركيز المثبت الأمثل للانزيم. ويظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين كل تركيز من الانزيم لنوعين من البكتيريا وكذلك وجود فروق معنوية بين مختلف التراكيز ولكل نوع بكتيري عند مستوى معنوية ($P \leq 0.01$).

(4): فعالية انزيم proteinase K في تخفيض الغشاء الحيوي لبكتيريا *S.aureus* والمقاس بجهاز الاليزا.

التراكيز	O.D ()	O.D 33µg/ml	O.D 100µg/ml	O.D 250µg/ml	قيمة F
<i>S.aureus</i> 2	0.488	0.086	0.110	0.186	F= 71.94**
نسبة التخفيض (%)		%95	%89	%71	
<i>S.aureus</i> 19	0.479	0.091	0.131	0.226	
نسبة التخفيض (%)		%93	%83	%59	
<i>S.aureus</i> 25	0.586	0.094	0.134	0.196	
نسبة التخفيض (%)		%94	%86	%74	
<i>S.aureus</i> 32	0.459	0.087	0.117	0.203	
نسبة التخفيض (%)		%94	%86	%64	
<i>S.aureus</i> 44	0.493	0.092	0.128	0.206	
نسبة التخفيض (%)		%93	%85	%66	

(5): فعالية انزيم proteinase K في تخفيض الغشاء الحيوي لبكتيريا *K.pneumoniae*

التراكيز	O.D ()	O.D 33µg/ml	O.D 100µg/ml	O.D 250µg/ml	قيمة F
<i>K.pneumoniae</i> 13	0.347	0.091	0.128	0.172	F= 14.34**
نسبة التخفيض (%)		%90	%77	%61	
<i>K.pneumoniae</i> 20	0.342	0.082	0.086	0.122	
نسبة التخفيض (%)		%93	%92	%79	
<i>K.pneumoniae</i> 43	0.441	0.107	0.120	0.182	
نسبة التخفيض (%)		%88	%85	%69	
<i>K.pneumoniae</i> 47	0.392	0.099	0.127	0.175	
نسبة التخفيض (%)		%89	%80	%66	
<i>K.pneumoniae</i> 50	0.450	0.138	0.161	0.205	
نسبة التخفيض (%)		%81	%75	%63	
T test		22.92	14.53	-3.79	
P 0.01					

إن انخفاض قيم الامتصاصية للعزلات البكتيرية قيد الإختبار عند هذه التراكيز من الأنزيم يدل على إن هذه التراكيز تثبت التصاق البكتيريا على سطح Polystyrene لحفر طبق المعايرة الدقيق مما أدى إلى حدوث الإنفصال (Detachment) للغشاء الحيوي المتكون مسبقاً بفعل هذه البكتيريا في حفر طبق المعايرة الدقيق (Parsek & Singh, 2003).



تأثير انزيم Amylase - على تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية والكليسيلا الرئوية

Effect of -Amylase enzyme on the biofilm formation of *S.aureus* and *K.pneumoniae*

لوحظت من النتائج بان هناك اختلافات من حيث نشاط الانزيمات لإزالة الغشاء الحيوي. وكانت هذه الاختلافات نتيجة الاختلاف في قوة وفعالية الانزيمات اعتماداً على تركيباتها. اظهرت النتائج في (الجدولين، 6، 7) أن انزيم α -Amylase أعطى تأثيراً تثبيطياً عالياً ضد بكتريا *S.aureus* بالمقارنة مع بكتريا *K.pneumoniae* إذ استخدمت ثلاث تراكيز مختلفة (20، 100، 200 mg/ml) لكلا النوعين من البكتريا، ان انزيم α -Amylase اعطى اعلى نسبة تثبيط للغشاء الحيوي عند التركيز 100mg/ml وبنسبة تثبيط 96% تعود لبكتريا *S.aureus* اما اقل نسبة تثبيط للغشاء الحيوي لنفس البكتريا عند التركيز 20 mg/ml وبنسبة تثبيط 87% وعند استخدام التراكيز العالية للانزيم 200 mg/ml لم تبدو فعالية تثبيطية عالية تجاه الغشاء الحيوي مقارنة مع نتائج التراكيز الاخرى نتيجة لتثبيط المادة الاساس مع الانزيم، اما بالنسبة لبكتريا *K.pneumoniae* فقد اعطى انزيم α -Amylase فعالية تثبيطية قليلة عند التركيز 20 mg/ml وبنسبة تثبيط 36% اما اعلى تثبيط للغشاء ظهرت عند التركيز 100mg/ml وبنسبة تثبيط 77% وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها، كان لأنزيم α -Amylase تأثير ضعيف لإزالة الغشاء الحيوي بالمقارنة مع انزيم proteinase K. قد تكون هذه القدرة الضعيفة لل- α -Amylase لإزالة الاغشية الحيوية بسبب تفاعلات كيميائية ضعيفة بين هذا الإنزيم ومصفوفة الغشاء الحيوي (EPS) Exopolysaccharide ويبين التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين كل تركيز من الانزيم لنوعين من البكتريا وكذلك وجود فروق معنوية بين مختلف التراكيز ولكل نوع بكتيري عند مستوى معنوية ($P \leq 0.01$).

(6): فعالية انزيم α -Amylase في تخفيض الغشاء الحيوي لبكتريا *S.aureus* والمقاس بجهاز الاليزا.

التراكيز	O.D ()	O.D 20mg/ml	O.D 100mg/ml	O.D 200mg/ml	قيمة F
<i>S.aureus</i> 2	0.507	0.118	0.104	0.107	F= 10.46**
نسبة التخفيض (%)		%87	%93	%90	
<i>S.aureus</i> 19	0.543	0.103	0.084	0.115	
نسبة التخفيض (%)		%92	%96	%89	
<i>S.aureus</i> 25	0.560	0.105	0.089	0.114	
نسبة التخفيض (%)		%91	%94	%89	
<i>S.aureus</i> 32	0.547	0.099	0.083	0.095	
نسبة التخفيض (%)		%92	%96	%93	
<i>S.aureus</i> 44	0.533	0.108	0.091	0.118	
نسبة التخفيض (%)		%90	%94	%88	

(7): فعالية انزيم α -Amylase في تخفيض الغشاء الحيوي لبكتريا *K.pneumoniae*.

التراكيز	O.D ()	O.D 20mg/ml	O.D 100mg/ml	O.D 200mg/ml	قيمة F
<i>K.pneumoniae</i> 13	0.347	0.171	0.128	0.143	F= 8.64**
نسبة التخفيض (%)		%62	%77	%72	
<i>K.pneumoniae</i> 20	0.250	0.145	0.124	0.141	
نسبة التخفيض (%)		%56	%68	%58	
<i>K.pneumoniae</i> 43	0.411	0.285	0.160	0.238	
نسبة التخفيض (%)		%36	%72	%50	
<i>K.pneumoniae</i> 47	0.386	0.219	0.161	0.214	
نسبة التخفيض (%)		%51	%70	%53	
<i>K.pneumoniae</i> 50	0.402	0.138	0.161	0.205	
نسبة التخفيض (%)		%47	%67	%54	
T test		54.51	46.6	45.02	
P 0.01					



تشير هذه النتائج إلى أن تكوين (EPS) يمكن أن تختلف بين السلالات والأنواع المرتبطة ارتباطاً وثيقاً، ومع ظروف النمو. وبالتالي، فإن الاختبار التجريبي ضروري لتحديد أهم مكونات المصفوفة. بالإضافة إلى منع التصاق الأغشية الحيوية. يمكن أن يعزى الاختلاف في تخفيض الغشاء الحيوي إلى حقيقة أن α -Amylase هو محلل للكربوهيدرات الذي يحلل الروابط 1,4-glucosidic في النشا فقط من النهاية غير المحددة من السكريات (Toda et al., 1993). أشار (Jebur, 2014) إلى أن الكفاءة الأنزيمية لأي إنزيم محطم للمصفوفة الهيكلية (EPS) من الأغشية الحيوية ستعزز أو تضعف هيكل المصفوفة اعتماداً على تكوين المصفوفة الهيكلية (EPS)، وبالتالي فإن فعالية الإنزيمات تعتمد على نوع المصفوفة من الغشاء الحيوي وتركيزات هذه المصفوفة يحدد الجرعة المطلوبة لتحسين الكفاءة.

:REFERENCES

- I. Abid, A. J. & Jamal, N. S. (2008). The bacterial roles in urinary tract infections in Women and the susceptibility of some bacterial isolates to some antibacterial agents. *Al-Qadisiya Journal of Vet. Medicine Sciences*, 7(1): 34-41.
- II. Al-Begat, S. T. M. (2007). *Study of Most Common Aerobic Bacteria Causing Lower Urinary Tract Infection (UTI) In Ramadi General Hospital*. Thesis, College of Medicine, University of Al- Anbar.
- III. Al-Dulemi, H. H. (2016). *Investigation of Some Virulence Factors Which Caused Urinary Tract Infection By Using Polymerase Chain Reaction*. Thesis, College of Science-University of Al-Anbar.
- IV. AlKaabi, S. A. (2013). Bacterial isoates and their antibiogram of burn wound infections in burns specialist hospital in Baghdad. *Journal of Baghdad for Sciences*, 10(2): 331-340.
- V. Al-Sudany, E. A. R. (2014). *Inhibition of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Growth by Inhibitory Proteins Produced by Saccharomyces cerevisiae*. Thesis, College of Science, University of Al-Mustansiriyah.
- VI. Bozkurt, H., Kurtoglu, M. G., Bayram, Y., Keşli, R. & Berkaş, M. (2009). Correlation of slime production investigated via three different methods in coagulase-negative staphylococci with crystal violet reaction and antimicrobial resistance. *Journal of International Medical Research*, 37(1): 121-128.
- VII. CLSI. (2016). *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-SIX informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- VIII. Dadawala, A. I., Chauhanm, H. C., Chandelm, B. S., Ranaware, P., Patel, S. S., Khushboo, S., Ratod, P. H., Shah, N. M. & Kher, H. N. (2011). Assessment of *Escherichia coli* isolates for in vitro biofilm production. *Journal of Infectious Diseases*. 3(8): 364-366.
- IX. Dheepa, M., Rashme, V. L. & Appalaraju, B. (2011). Comparison of biofilm Production and multiple drug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in south India. *Int. Journal of Pharm.Biomed. Sciences*, 2(4): 103-107.
- X. Eftekhar, F. & Dadaei, T. (2011). Biofilm formation and detection of icaAB genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(2): 132-136.
- XI. Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A. & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4): 305-311.
- XII. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. A. & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual Of Derminative Bacteriology*. 9th ed., Williams and Wilkins.



- XIII. Jebur, A. Q. (2014). *Effect of Some Physical and Chemical Factors on Biofilm Formation by Klebsiella pneumoniae Isolated from Hospitals*. MSc. Thesis. College of Science, Baghdad University.
- XIV. Kalpana, B. J., Aarthy, S. & Pandian, S. K. (2012). Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6): 1778-1794.
- XV. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4): a010306.
- XVI. Krismer, B. & Peschel, A. (2011). Does *Staphylococcus aureus* nasal colonization involve biofilm formation. *Journal of Future Microbiology*. 6(5):489-493.
- XVII. Mariana, N. S., Salman, S. A., Neela, V. & Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(6): 330-338.
- XVIII. Molobela, I. P., Cloete, T. E. & Beukes, M. (2010). Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(14): 1515-1524.
- XIX. Morello, J. K., Mizer, H. E. & Granato, P. A. (2006). *Laboratory Manual And Work Book In Microbiology Application To Patient Care*. 8th ed., Mc Graw Hill.
- XX. Nguyen, U. T. & Burrows, L. L. (2014). DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 187: 26-32.
- XXI. Niemirowicz, K., Swiecicka, I. Z., Wilczewska, A., Misztalewska, I., Kalska-Szostko, B., Bienias, K. & Bucki, R. (2014). Halina car gold-functionalized magnetic nanoparticles restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 2217-2224.
- XXII. Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A. & Bisignano, G. (2013). Development and characterization of essential oil component-based polymer films: a potential approach to reduce bacterial biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21): 9515-9523.
- XXIII. Ouibrahim, A., Tlili-Ait-kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A. G. & Djebbar, M. R. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(42): 4968-4973.
- XXIV. Parsek, M. R. & Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1): 677-701.
- XXV. Pitts, B., Hamilton, M. A., Zelter, N. & Stewart, P. S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2): 269-276.
- XXVI. Rewatkar, A. R. & Wadher, B. J. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm formation methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biology Science*, 8(5): 36-40.
- XXVII. Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A. & Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *Journal of BMC Microbiology*, 10(1): 179-184.



- XXVIII. Shukla, S. K. & Rao, T. S. (2013). Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *The Journal of Antibiotics*, 66(2): 55-61.
- XXIX. Shukla, S. K. & Rao, T. S. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. *The Indian Journal of Medical Research*, 146(1):1-8.
- XXX. Srivastava, R. N. & Vasudev, A. S. (2011). Urinary tract infections current management. *Journal of Apollo Medicine*, 8(4): 270-275.
- XXXI. Toda, H., Nitta, Y., Asanami, S., Kim, J. P. & Sakiyama, F. (1993). Sweet potato β -amylase. *The FEBS Journal*, 216(1): 25-38.
- XXXII. Xavier, J. B., Picioreanu, C., Rani, S. A., van Loosdrecht, M. C. & Stewart, P. S. (2005). Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix—a modelling study. *Journal of Microbiology*, 151(12): 3817-3832.