مجلة جامعة النهرين المجلد 9(2) كانون الاول، 2006، ص:12-16 العلوم

عزل سلالات ذات أمراضية لجنس *Aeromonas* من الخضروات الطازجة

إيمان جواد كاظم

مدرس مساعد / الكلية التقنية المسيب

الخلاصة

تم عزل الجرثومة العائدة لجنس الـ *Aeromonas* بنسبة 46.6% من 90 عينة من الخضروات الطازجة (كرفس، خس، سلق) وتم الكشف عن قابلية هذه العزلات لإنتاجها الهيمولايسين ووجد أن 54% منها لها القابلية على إنتاج البيتا هيمولايسين بينما كانت العزلات المنتجة للالفا هيمولايسين بنسبة 26% كما تم الكشف عن قابلية تلك العزلات لإنتاجها السموم المعوية بطريقة الفأر الرضيع ووجد أن 24% تلك العزلات منتجة للسموم المعوية .

المقدمة

تمثل الخضروات الطازجة الجزء الرئيسي في غذاء الإنسان وخلال السنوات الأخيرة ازدادت الأهمية الاستهلاكية للخضروات الطازجة وذلك بسبب الترويج لها والرفع من أهميتها من قبل خبراء الصحة حيث وجد أنها تمنع تطور بعض الإمراض المزمنة والخطرة على الإنسان مثل السرطان[14,3]. وبالرغم من ذلك توجد خطورة في استهلاك الخضروات حيث تم تشخيص إحياء مجهرية ممرضة في الخضروات الطازجة ولسنوات عديدة وقد لوحظ وجود علاقة بين انتشار العديد من الممرضات المعدية المعوية للإنسان مع استهلاك الخضروات الطازجة الملوثة بالإحياء المجهرية الممرضة مثل *Vibrio* والـ *Salmonella* [5,2].

بدء الاهتمام بشكل ملفت للنظر بجنس الـ *Aeromonas* منذ بداية الثمانينات من القرن الماضي حيث اعتبرت بعض أنواعه كممرض أولي للإنسان والحيوان حيث تسبب هذه البكتريا العديد من الإمراض الخارج معوية وتكون مهددة للحياة في بعض الأحيان ولكن اقترانها أكثر بالإمراض المعوية لذا تعد كممرض معوي شائع[16,9,8].

عزلت الجرثومة من بيئات مختلفة وخاصة البيئة المائية ومياه الفضلات ومن التربة وكذلك من مدى واسع من الأغذية النباتية والحيوانية لذلك تعد المياه والأغذية هي مصدر الإصابة للإنسان [13,11,7].

وبالنظر للأهمية الامراضية لهذه الجرثومة وخصوصا أهميتها في الإمراض المعوية وزيادة الاهتمام بها على نطاق عالمي واسع لذا تهدف الدراسة إلى عزل وتشخيص هذه الجرثومة من الخضروات الطازجة والكشف عن امراضيتها من خلال إنتاجها hemolysin والسموم المعوية .

المواد وطرق العمل

عزل البكتريا

جمعت 90 عينة من الخضروات الطازجة وشملت 30 عينة من الخس و30 عينة من الكرفس و30 عينة من السلق ،حيث تم اخذ 25 غرام من كل عينة ووضعها في ماء الببتون القاعدي (pH8.4) لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م° وذلك لتنشيط وإكثار الإحياء المجهرية الموجودة في العينة وبعد انتهاء الحضانة تم زرع العينات بواسطة التخطيط على وسط أكار الدم (Blood agar) ووسط أكار ماكونكي (Macconkey agar) عند درجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة بعدها نقلت المستعمرات على وسط Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar(TCBSA) والذي حضن عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة ثم أعيد تنقيتها على نفس الوسط وقد استخدم وسط أكار المغذي Neutrient agar والمرق المغذي Neutrient broth لحفظ العزلات في الثلاجة لغرض تكملة بقية خطوات البحث، واستخدام وسط نقيع القلب والدماغ Brain- heart infusion agar لغرض تنشيط العزلات بين فترة وأخرى.

تشخيص العزلات

تم الاعتماد في تشخيص السلالات المعزولة من الخضروات الطازجة على المخطط المقترح من قبل الباحث Abbott وجماعته (1) بالإضافة إلى مصادر تشخيصية أخرى وقد أجريت الاختبارات البايوكيميائية الموضوعة في الجدول رقم (1). ولتفريق جنس الـ *Aeromonas* عن جنس *Plesiomonas* تم الاعتماد على نتائج اختبار أنزيم DNase وأنزيم Ornithine decarboxylase. أما تفريقها عن جراثيم العائلة المعوية فقد اعتمدت نتيجة اختبار انزيم الاوكسيديز ولتفريقها عن جرثومة الـ *Vibrio cholerae* تم استخدام اختبار الحساسية للمادة المضادة لجرثومة الهيضة Vibrostatic agent sensitivity(O/129) وذلك بتنقيع الأطباق الحاوية على

وسط Muller Hinton agar بنشر الجرثومة على سطح الوسط ثم وضعت الأقراص O/129 وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 م لمدة ساعة وتقرأ النتيجة الموجبة بعدم ظهور حلقة تثبيط حول الأقراص.

الكشف عن أنتاج الهيمولاسين

تم استخدام وسط أغار الدم Blood agar للكشف عن قابلية الجرثومية على إفراز أنزيم hemolysin .

الكشف عن السلالات المنتجة للسم المعوي

لغرض الحصول على السم المعوي الخام لقحت انابيب حاوية على وسط Tryptone soy broth (TSB) مضاف اليه مستخلص خميرة 0.6% بالجرثومة وحضنت عند درجة حرارة 37 م في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/بالدقيقة لمدة 24 ساعة. ثم النبذ المركزي المبرد للمزروع الجرثومي بسرعة 4000 دورة بالدقيقة لمدة 30 دقيقة، ثم تم تشريح الطافي Supernatant من خلال أغشية ترشيح بحجم 0.45 مايكروميتر للحصول على راشح خام خالي من الخلايا الجرثومية Cell-Free filtrate وخزن المحلول في درجة حرارة 4 م [19].

اختبار فاعلية السم المعوي

تم قياس فاعلية السم المعوي بتقنية الفار الرضيع Suckling mouse technique للتحري عن فاعلية السم المعوي وكانت الخطوات كالآتي:-

1- حقنت معدة الفأر الرضيع الذي عمره (2-4) يوم بـ 100 مايكروليتر من السم المعوي الخام Cell-Free Filtrate المضاف اليه 2 مايكروليتر من صبغة غذاء خضراء بواقع ثلاثة مكررات لكل سم معوي خام من كل عزلة.

2- تم قتل الفئران بعد مرور 3 ساعات على الحقن بواسطة خلع الرقبة.

3- تم تعيين نسبة وزن الأمعاء إلى بقية وزن الجسم فإذا كانت النسبة اكبر من 0.08 تعد نتيجة موجبة لفاعلية السم المعوي [20].

النتائج

العزلات البكتيرية

تم الحصول على 20 عزلة شخصت على أنها تعود لجنس الـ *Aeromonas* من عينات الكرفس أي أن نسبة العزل كانت 60% بأما من عينات الخس فتم الحصول على 12 عزلة شخصت على أنها تعود لجنس الـ *Aeromonas* أي أن نسبة العزل 40% بينما تم الحصول من عينات الحمق على 10 عزلات تعود لجنس الـ *Aeromonas* أي بنسبة عزل 33.3%.

تشخيص العزلات الجرثومية

أن نتائج الاختبارات التشخيصية البايوكيميائية موضحة في الجدول رقم (1) حيث أظهرت الجرثومة العائدة لجنس الـ *Aeromonas* نتيجة موجبة لاختبار أنزيم DNase بينما أعطت نتيجة سالبة لاختبار أنزيم ornithine decarboxylase وهذا ما يميزها عن جرثومة الـ *Plesiomonas* . كما أعطت الجرثومة نتيجة موجبة لاختبار أنزيم الـ oxidase وهذا ما يميزها عن جراثيم العائلة المعوية .وكذلك أعطت الجرثومة نتيجة موجبة لاختبار الحساسية للمادة المضادة لجرثومة الهيضة vibriostatic agent sensitivity (O/129) وبذلك تميزت عن جرثومة الهيضة *Vibrio cholerae* .

الكشف عن انتاج الهيمولاسين hemolysin

يوضح الجدول رقم (2) نتائج الكشف عن انتاج الهيمولاسين بأن 19 عزلة قادرة على أن تحلل الدم وذلك بظهور منطقة تحلل كاملة شفافة حول المستعمرات الجرثومية وهذا التحلل هو من نوع بيتا ،أي ان نسبة العزلات المنتجة للبيتا هيمولاسين β hemolysin هي 45 % ،كما اظهرت النتائج بان 11 عزلة قادرة على أن تحلل الدم وذلك بظهور منطقة تحلل غير كاملة نصف شفافة خضراء اللون حول المستعمرات الجرثومية وهذا التحلل هو من نوع الفا ،أي أن نسبة العزلات المنتجة للالفا هيمولاسين α hemolysin هي 26 %، بينما اظهرت النتائج بان 12 عزلة غير قادرة على أن تحلل الدم وذلك بعدم ظهور منطقة تحلل، أي أن نسبة العزلات غير المنتجة للهيمولاسين هي 29 %.

اختبار فعالية السم المعوي

يظهر الجدول رقم (3) نتائج اختبار فعالية السم المعوي للعزلات الجرثومية حيث أظهرت النتائج بأن 10 عزلات جرثومية لها القابلية على إنتاج السموم المعوية الفعالة أي أن نسبة العزلات الجرثومية ذات السمية هي 24 %.

المناقشة :

تؤكد المصادر العلمية على الأهمية الامراضية لجرثومة الـ *Aeromonas* [16,4].ومما يؤكد امراضية هذه الجرثومة هو امتلاكها العديد من عوامل الفوعة حيث للجرثومة القابلية على

انتاج السموم المعوية والهيمولايسين والإنزيمات المختلفة ومنها المحللة للدهون والمحللة للبروتين وكذلك قدرتها على الالتصاق واجتياح الأنسجة الحية [15,11,6] . ومن الجدير بالذكر ان الجرثومة تمتلك نوعين من الهيمولايسين الأول من نوع بيتا والثاني من نوع الفا حيث يكون للنوع بيتا دور رئيسي في أمراضية الجرثومة أما النوع الفا فله دور ثانوي في امراضية الجرثومة[8,5]

السم المعوي هو من المنتجات الخارج خلوية Extracellular products للجرثومة والذي يلعب دورا مهما في أمراضيتها وان لهذه السم المعوي القابلية على تجمع السوائل في الحيوانات المختبرية[9,9] .

وبسبب امتلاك الجرثومة للسم المعوي فلها القدرة على أن تسبب الإسهال الحاد وقد ازداد تكرار إصابات الإسهال الحاد في الأشخاص الأصحاء بسبب هذه الجرثومة[16,15,8]. وتشير المصادر بأنه اذا وصلت أعداد هذه الجرثومة إلى مستوى عال في الغذاء فمن الممكن ان تسبب تسمما غذائيا ومن ثم حدوث المرض والذي يمكن أن ينتج اما من تمركز أعداد عالية من الجرثومة (والذي يتبعه التصاق الجراثيم وإنتاجها السم المعوي بعد ذلك) أو من التسمم والذي يأتي بعد ابتلاع الغذاء الملوث[10,3]. تحدث أخطاء في تشخيص هذه الجرثومة حيث أشارت البحوث إلى ان الجرثومة تكون مخمرة لسكر اللاكتوز أو متأخرة في تخمره أو تكون غير مخمرة له لهذا يحدث خطأ في التشخيص مع العائلة المعوية ومع جنس الـ *Vibrio* [7,1]. يوجد جنس الـ *Aeromonas* بشكل واسع في البيئة وخاصة في الماء فهي متوطنة بشكل طبيعي في المياه[17,6] وفضلا عن المياه والغذاء فقد عزلت البكتريا من التربة[14,8]. ومن الجدير بالذكر ان جرثومة الـ *Aeromonas* تنمو عند درجة حرارة 4 م وهذا يعني ان الثلاجة لا تمنع هذه الجرثومة من النمو والتكاثر وإنتاج السموم المعوية [10,5] . تصبح الخضروات ملوثة بالأحياء المجهرية الممرضة ، مما خلال السقي لان جنس الـ *Aeromonas* ذات منشأ مائي لذلك له أهمية خاصة بالاقتران مع الأمراض المعدية المعوية واستهلاك الخضروات الطازجة [7,2].

قام عدد من الباحثين بعزل هذه الجرثومة من العديد من الخضروات الطازجة مثل البقدونس والسبانغ والكرفس وهذه يؤكد دور الخضروات الطازجة كناقل للأحياء المجهرية الممرضة . تلعب الخضروات الطازجة دور مهم في انتشار هذه الجراثيم المتواجدة وبنسب مئوية مهمة في مياه الصرف الصحي الغير معاملة بشكل جيد والمستخدمة للأغراض الري [18,11,3] . حيث سجل وجود الجراثيم في مدى واسع جدا من الأغذية

جدول رقم (1) نتائج الاختبارات التشخيصية البايوكيميائية لجرثومة الـ *Aeromonas*

ت	الاختبار	النتيجة
1	استجابة الخلايا لصبغة كرام	–
2	شكل الخلايا على الشريحة	عصوية
3	النمو على اكار TCBS	+
4	النمو على اكار الدم	+
5	النمو على اكار TSI	+
6	النمو على اكار مكونكي	–
7	الحساسية للعامل المضاد لجرثومة الهيضية 0/129	مقاومة
8	اختبار أنزيم الكاتالاز	+
9	تخمر سكر اللاكتوز	+
10	اختبار أنزيم اليوريز	–
11	الحركة على وسط شبه صلب	+
12	اختبار احمر المثيل	+
13	استهلاك السترات	+
14	اختبار أنزيم الاوكسديز	+
15	القدرة على النمو اللاهوائي	+
16	اختبار أنزيم الليبيز	+
17	اختبار أنزيم DNase	+
18	اختبار أنزيم البروتيز	+
19	اختبار أنزيم الجلاتينيز	+
20	اختبار أنزيم ornithine decarboxylase	–
21	اختبار أنزيم الكازنيز	+

حيث عزلت الجرثومة بنسب عالية من الخضروات المختلفة [12,6,2] . حيث اشار Szabo وجماعته[18] إلى أن نسبة عزل جرثومة الـ *Aeromonas* من الخس كانت 55% كما أشار wilson &Mcmahon [12] إلى ان نسبة عزل هذه الجرثومة من الخضروات كانت 41% . تشير الأبحاث إلى إمكانية ان يلعب الغذاء دور مهما في ويائية إصابة الإنسان بهذه الجرثومة [18,11,3,2]. تختلف النسب المئوية لعزل هذه الجرثومة من باحث لأخر وأسباب الاختلاف عديدة منها وقت جمع العينات المأخوذة والظروف الصحية والاقتصادية والموقع الجغرافي والتباين في طرق التشخيص المتبعة . تعد طريقة الفأر الرضيع Suckling Mouse Test(SMT) من

المغرائق المعتمد عليها في تصنيف العزلات السمية وتعد طريقة مناسبة للتعيين السم المعوي الذي ينتج من الجراثيم الممرضة المعوية مثل Enteropathogenic *E. coli* وانواع جنس الـ *Aeromonas* وتتيح هذه الطريقة على مدى واسع أكثر من اختبار rabbit ileal loop وطريقة SMT فائدة في الكشف عن عينات كبيرة وبهذه فهي تسهل الدراسات الوبائية تدور انواع جنس الـ *Aeromonas* في مرض الإسهال الحاد[20,19].

جدول رقم (2) نتائج الكشف عن إنتاج الهيموليسين لجرثومة الـ *Aeromonus*

مصدر العزل	عزلات محللة للدم: عزلات منتجة لأنزيم β hemolysin	عزلات محللة للدم: عزلات منتجة لأنزيم α hemolysin	عزلات غير محللة للدم	مجموع العزلات
الخس	5	3	4	12
الكرفس	8	7	5	20
السلق	6	1	3	10
المجموع	19	11	12	42

جدول رقم (3) نتائج اختبار فعالية السم المعوي للعزلات الجرثومية

ت	مصدر العزل	نسبة وزن الأمعاء إلى بقية وزن الجسم	ت	مصدر العزل	نسبة وزن الأمعاء إلى بقية وزن الجسم
1	الخس	0.057	22	الكرفس	0.096
2	الخس	0.052	23	الكرفس	0.058
3	الخس	0.065	24	الكرفس	0.051
4	الخس	0.08	25	الكرفس	0.087
5	الخس	0.055	26	الكرفس	0.066
6	الخس	0.054	27	الكرفس	0.068
7	الخس	0.055	28	الكرفس	0.070
8	الخس	0.082	29	الكرفس	0.11
9	الخس	0.072	30	الكرفس	0.055
10	الخس	0.09	31	الكرفس	0.058
11	الخس	0.059	32	الكرفس	0.078
12	الخس	0.060	33	السلق	0.071
13	الكرفس	0.099	34	السلق	0.066
14	الكرفس	0.072	35	السلق	0.065
15	الكرفس	0.069	36	السلق	0.085
16	الكرفس	0.10	37	السلق	0.077
17	الكرفس	0.075	38	السلق	0.078
18	الكرفس	0.065	39	السلق	0.068
19	الكرفس	0.056	40	السلق	0.059
20	الكرفس	0.064	41	السلق	0.093
21	الكرفس	0.077	42	السلق	0.063

المصادر

1-Abbott,S.L.;Seli,L.S.;Catino,M.;Hartley,M. Aand Janda, S.M.(1998). Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*:acontinuingproblem.J.Clin.Microbiol .36:1103-1104.

2-Beuchat,L.(1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food . Prot .59: 204-216.

3-Borrell,N.;Figueras,M.J.andGuarro,J.(1998). Phenotypic identification of Aeromonas genomospecies from clinical and environmental sources.CanadianJournalof icrobiology.44(2):103-108.

4-Eley,A.;Geary,I.andWilcox,M.H.(1993).Growth of *Aeromonas* spp.at 4C and related toxin production.Letters in Applied Microbiol.16(1):36 39.

5-Garcia,R.M.;Sanchez,M.D.;Amaro,M.A.and Zurera,G.(1996).Behaviour of *Aeromonas* hydrophilain vegetable salads under modified atmosphere at 4-15C. Food Microb.13:369.

6-Handfield,M.;Simard,P.;Couillard,M.and Lettarte,R.(1996)*Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water :hemagglutination, hemolysisand cytotoxicity for ahuman intestinal cellline (HL-29). Appl-Environ-Microbiol. 62(9):3459-3461.

7-Hernandez,P.and Degar cia,R.R. (1997). Prevalence of *Aeromonas* spp.in surface water.Archivoslatinoamericansde Nutricion.47(1): 44-46.

8-Kaman,S.and Nair,G.B. (2000). *Aeromonas* an emerging pathogen associated with evolving clinical spectrum and potential Indian.J.Med.Microbiol.18:117-127.

9-Kelly,K.A.;Koehler,J.M and Ashdown,L.R. (1993).Spectrum of extraintestinal disease dueto Aeromonasspeciesintropical Queensland.Australia. Clin.Infect. Dis.16:574-579.

10-Little,C.L.;Monsey,H.A.;Nichols,G.L.and delouvois,J.(1997).The microbiological quality of refrigerated salads and crudités.PHLS Microbiology Digest.14:142-146.

11-Mattick,K.L.andDonovan,T.J.(1998). Optimisation of the protocol for detection of *Aeromonas* species in ready-to-eat salads,and its use to speciate isolates and estabish their prevalence.Communicable Disease and Public Health.1(4):263-266.

12-McMahon,M.A.S.and Wilson,I.G.(2001).The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables.Inter.J.Food .Microbiol 70:155-162.

13-pianetti,A.;Baffone,w.;Bruscolini,F.;Barbiri,

18-Szabo,E.A.;Scurrah,K.J.and Burrows,J.M.(2000).Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce.Lett.Appl.Microbiol.30:456-460.

19-Torwer,C J.; Abo,S.;Majeed,K.N.and Itzstein ,M.(2000).Production of an enterotoxin by agastro-enteritis,associated*Aeromonas*strain.J. Med. Microbiol. 49:121-126.

20-Wong,C.Y.F.;Mayrofer,G.;Heuzenroeder,M. W.;Atkinson,H.M.;Quinn,D.M.andFlower,R.L.P .(1996).Measurement of virulence of aeromonads using asuckling mouse model of infection.FEMSImmunol.Microbiol.15:233-241.

F.;Biffi,M.R.;Salvaggio,L.and Alpano,A.(1998). Presence of several pathogenic bacteria in the Metauro and Foglia Rivers (Pesaro-Urbino,Italy).Water Research.32(5):1515-1521.

14-Rock,C.;Jacob.R.and Bowesn,P.(1996).Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients:Vitamin C,Vitamin E and the carotenoids.J.Am.Diet.Assoc.96: 693-702.

15 Rohner,P.;Pittet,D.;Pepey,B.;Nije-Kinge,T.and Auckenthaler,R.(1997). Etiological agents of infectious diarrhea:implications for requests for microbial culture.J.Clin.Microbiol.35:1427-1432.

16-Schiavano,G.F.;Bruscolini,F.;Albano,A.and Brandi,G.(1998).Virulence factors in *Aeromonas* spp.and their association with gastrointestinal disease.New Microbiol.21:23-27.

17-Sisti,M.;Albano,A.andBrandi,G.(1998). Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy.Lett.Appl.Microbiol.26:347-451.

Abstract

The genus of *Aeromonas* was isolated from fresh vegetables(celery,lettuce and chard).We found that 46.6% were isolated. We found that 45% were β hemolysin,and 26%were α-hemolysin.We investigated their ability to produce entertoxin by the suckling mouse test procedure .we found that 24%were producers for such toxin.