عزل و دراسة عاثيات الكوليرا في مدينة الديوانية و إمكانية استخدامها للسيطرة على بكتريا الكوليرا نمط O1 مختبرياً

د.زياد متعب الخزاعي — **كلية العلوم /جامعة القادسية**
ا.د.عدنان حمد الحمداني — **كلية الطب /جامعة القادسية**
دينا محمد رؤوف إبراهيم — **كلية العلوم/جامعة القادسية**

الخلاصة:

أجري هذا البحث في الفترة بين حزيران2009 وكانون الأول للعام 2010 حيث تم تحديد خمس نقاط لجمع عينات المياه على طول نهر الديوانية لعزل بكتريا الكوليرا تم جمع 50 عينة من المياه(بواقع 25عينة من النهر و 25 عينة من مياه مبازل ومجاري المدينة) ولعزل العاثي جمعت 45 عينة من المياه(بواقع 25 عينة من مياه النهر و20 عينة من مياه مبازل المدينة و مياه المجاري الثقيلة) . بينت نتائج الدراسة الحالية بان بكتريا الكوليرا التي تم عزلها من العينات التي أخذت من النهر كانت 3 عينات أعطت فحصا موجباً(12%) في حين كانت العينات التي أخذت من مياه المبازل والمجاري 12 عينة أعطت فحصاً موجباً(48%). تم عزل جزيئات العاثي البكتيري من عينات مياه النهر وكان متوسط العزل بحدود 56±22 pfu/ml في حين في مياه المبازل كان متوسط العزل 23±14 pfu/ ml هذا علماً بان بعض العينات أعطت فحصاً سالباً بعدم ظهور البقع عند العزل، وضحت النتائج التي تم الحصول عليها بان فعالية جزيئات العاثي تبلغ أعلى مستوى للفعالية في الوسط القاعدي بين 8 و 10 وبعد 10 تبدأ هذه الفعالية بالانخفاض، هذا وفي نفس السياق يعتبر حد العتبة لبقاء العاثي فعالاً وبأعداد قليلة بحدود 6 ، وضحت نتائج الدراسة الحالية بأن نسبة الجزيئات الفعالة من العاثي لم تتغير فعاليتها كثيراً عندما تكون درجات الحرارة بحدود 40م° في حين لوحظ انخفاض متزايد في فعالية جزيئات العاثي عندما تم حضنها بدرجات حرارة 50 م° و60 م° وبلغ اكبر تأثير على فعالية العاثيات في 70 م° وكانت نقطة نهاية فعالية العاثي تتوقف في درجة حرارة 70 م° بعد 7-8 دقائق تماماً، بينت النتائج التي تم الحصول عليها بان جزيئات العاثي البكتيري استطاعت تحقيق أعلى مستوى للامتزاز في وقت بلغ أقصاه بين 2-4 دقيقة ومن الملاحظ بان زيادة الوقت كانت ذات تأثير معنوي كبير في زيادة أعداد الجزيئات الممتزة على سطوح الخلايا البكتيرية وان كل من الرج و التخفيف المستمر للعينات يطيل من الزمن اللازم للامتزاز، وضحت نتائج الدراسة الحالية بان جزيئات العاثي كانت ذات فعالية عالية المعنوية عند اختبارها في حل الخلايا البكتيرية، وان الفعالية بلغت أقصاها بحدود الساعتين من مزج جزيئات العاثي مع المزروع البكتيري في المزرعة السائلة الأمر الذي رفع تراكيز الجزيئات الفيروسية في حين على العكس بينت النتائج بان هنالك ارتباط عكسي بين أعداد البكتريا مع الجزيئات الفيروسية حيث انخفضت أعداد الخلايا البكتيرية في الخليط بزيادة الوقت وبلغت مرحلة الانقلاب السالب عددياً للبكتريا عندما تجاوز الوقت عتبة الساعتين وكانت نقطة النهاية لتواجد البكتريا في الخليط (زمن التحلل الكلي) عندما بلغ الوقت 6 ساعات، كما بينت نتائج هذه الدراسة بان العزلات البكتيرية كانت اكثر حساسية للإصابة بالعاثي المعزول من مياه النهر إذ كان متوسط نسبة الإصابة هو 88.5% للجزيئات الفيروسية المأخوذة من مياه النهر في حين كانت اقل حساسية للعاثيات المعزولة من مياه المبازل 77.22% وكانت مجموعة السيطرة الموجبة التي شملت reference strain حوالي 91%.الأمر الذي يشير لأهمية هذا النوع من العاثيات ودوره البيئي للسيطرة على بكتريا الكوليرا في المياه.

المقدمة:

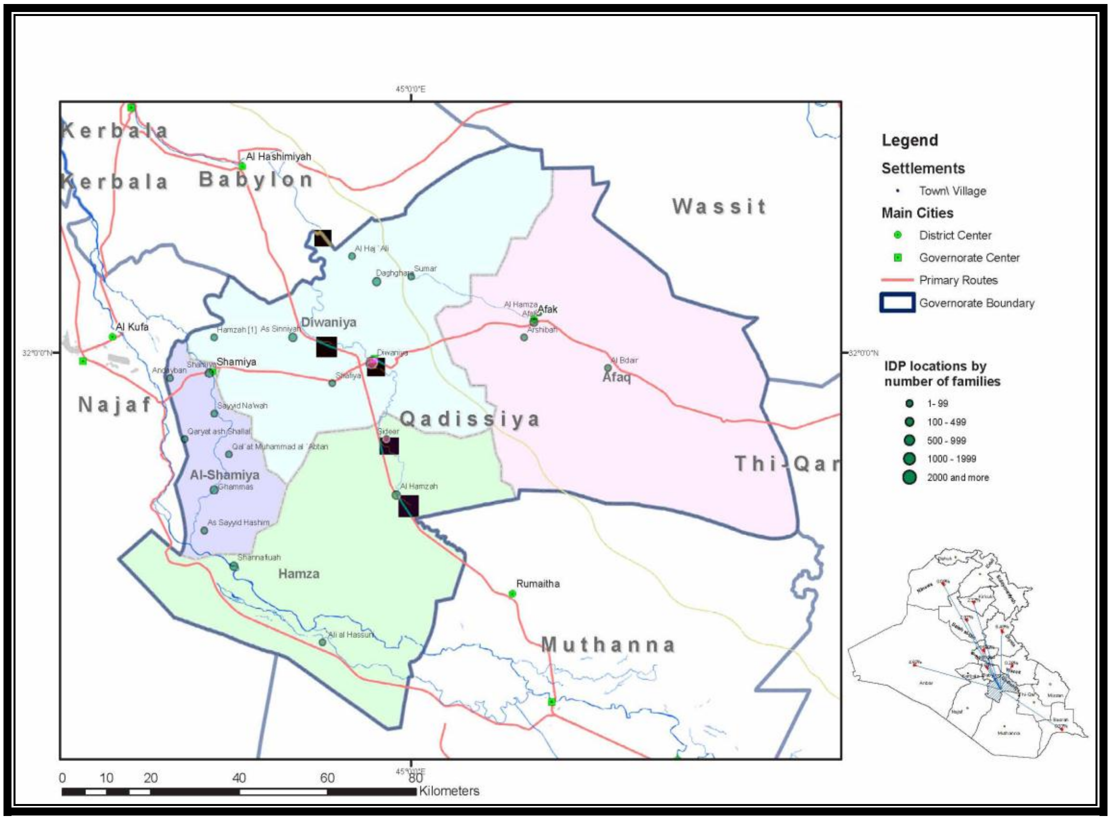
يعتبر مرض الكوليرا أحد الأمراض المهمة على مستوى العالم مما له من تأثير على الصحة العامة كونه مرض انتقالي ويمكن أن ينتشر بسرعة عالية ويسبب نسب وفيات عالي(3,2,1). والمسبب للمرض بكتريا سالبة لصبغة كرام تعيش في البيئة المائية تسمى *Vibrio cholerae* ،حيث صنفت البكتريا لنمطين مصليين هما O1 وnonO1 ويصنف النمط O1 إلى نمطين حيويين biotypes هما التقليدي classical و التور ElTor . لحد عام 1992 تقريباً سجل حوالي 140 نمط مصلي لسلالات تعود للنمط المصلي O1 من بكتريا *Vibrio cholerae* المسببة لمرض الكوليرا، في حين نادراً ما كان يتم تسجيل حالات إسهال سببها بكتريا الكوليرا التي يكون مسببها النمط Non-O1 (6,5,4) . بعد ذلك تم تشخيص تواجد عاثيات الكوليرا في نفس البيئات المائية حيث لوحظ بان تواجد العاثيات مرتبط بتواجد البكتريا المسببة للكوليرا، ومنذ ذلك الحين افترض بان تواجد العاثيات يؤثر ويتأثر بنسب تواجد و أعداد البكتريا الأمر الذي ينعكس على ديناميكية وفترة حصول الوباء في تلك المناطق(4,3). عرف العراق الكوليرا لاول مرة عام 1820 إذ انتشر في محافظة البصرة مسبباً عدد كبير من الوفيات الأمر الذي أدى لإغلاق مناطق سكنية كاملة من المدينة، وانتشر المرض ليصل لبغداد مسبباً نتائج مشابهة. بعد ذلك استمر المرض بالظهور خلال عام 1872و1889و1894و1899و1917 ليختفي من العراق ويعاود الظهور في آب من عام 1966 مسببا الانتشار السابع للوباء تلاه تسجيل بعض حالات الظهور من وقت لآخر حتى عام 1999. عام 1991 كانت ثلث حالات المرض في بغداد(7). عام 2001 نشرت منضمة الصحة العالمية حدوث 257 حالة في محافظة البصرة(8).. تابع المرض ظهوره مسببا 187 و35 حالة لعامي 2003 و2004 على التوالي(10,9).وبعدها تأثر البلد بشكل كبير بالمرض عام 2007 حيث سجلت 4696 حالة إصابة و24 حالة وفاة اغلبها في شمال العراق خصوصاً في محافظة كركوك ومنها انتشر للسليمانية المجاورة لها ليواصل انتشاره لبقية المحافظات، وكانت كركوك والسليمانية الأكثر تضرراً بنسبة 91% من الحالات (11).وظهر المرض في عام 2008 مسبباً 341 حالة إصابة اغلبها في بابل 58% تليها بغداد 18% وكربلاء 9% وأيضا سجلت المحافظات الأخرى . (12).وفي الفترة بين تشرين الثاني 2008 وتموز 2009 ومن اصل 221 حالة إسهال مائي تم تسجيل 33 (14.9%) حالة إصابة لدى الأطفال دون سن 14 سنة في مدينة الديوانية بينما كانت نسبة عزل البكتريا من مياه النهر 9(33.3%) (13). تمثل العاثيات البكتيرية مجموعة متنوعة من الفيروسات التي تتطفل وتتضاعف في مضائف بكتيرية محددة ويمكن أن يصيب الفيروس نوع بكتيري واحد (بعض الفيروسات يصيب نمط مصلي محدد) ولهذا السبب استخدمت كأداة تشخيصية مهمة تسمى التنميط بالعاثي phage typing (14) . كما وقد ظهرت بعض الدراسات التي تتناول أهمية استخدام العاثيات في علاج بعض الإصابات المزمنة وخصوصاً البكتيرية منها في حقل العلاج الحياتي (Biotherapy) فقد تم استخدام العاثيات لعلاج العديد من الحالات المرضية منها الإسهال الذي تسببه بكتريا *E. coli* على المستوى المختبري وأيضا برز اتجاه واعد باستخدام عاثيات الكوليرا لعلاج الإصابة بالمرض(15) . أحد أهم مجاميع العاثيات المستخدمة في الدراسات الميكروبية البيئية هي عاثيات الكوليرا وهذه المجموعة بدورها متنوعة أيضا فبين الفينة والأخرى يتم تسجيل نوع جديد من هذه العاثيات على مستوى العالم فمنها ذات التناظر المكعبي ومنها ذات التناظر الخيطي وهي بأحجام وخصائص مجهرية وجزيئيه ووراثية مختلفة. كان عزل العاثيات القولونية في مدينة الديوانية عام 2008 (16) مشجعا جداً ولعدم وجود بحوث كثير على مستوى العراق بهذا المجال، وخصوصاً بعد الانتشار الكبير لمرض الكوليرا في العراق، هدف البحث لعزل ودراسة تواجد عاثيات الكوليرا و دراسة بعض خصائص هذا النوع من العاثيات ودراسة إمكانية استخدامها كإحدى أدوات السيطرة على بكتريا الكوليرا.

المواد وطرق العمل:

أجري هذا البحث في كلية العلوم بجامعة القادسية للفترة حزيران2009 وكانون الأول للعام 2010، وشمل الخطوات التالية:

أولا- العزلات البكتيرية:

للحصول على عزلات بكتيريا *Vibrio cholerae* تم تحديد خمس نقاط للجمع على طول النهر(من نقطة دخوله للمدينة وصولاً لنقطة خروجه منها(الصورة 1))حيث جمعت 50 عينة من المياه بواقع 25عينة من نهر مدينة الديوانية وأيضا جمعت 25 عينة من مياه مبازل ومجاري المدينة.حيث أخضعت العينات للزرع المختبري والذي شمل تنميتها على وسط ماء الببتون لمدة 18 ساعة بدرجة 37م° ومن ثم تم تخطيطها على الوسط الصلب TCBS واكار الدم وبعدها تم ملاحظة الخصائص المزرعية والمجهرية بشكل أولي ثم أجريت الاختبارات البايوكيميائية والمصلية عليها. أما عزلة السيطرة الموجبة (reference strain) فقد تم الحصول عليها من كلية الطب بجامعة القادسية وهي عزلة محفوظة مشخصة مختبرياً ومصليا وتم تأكيد تشخيصها مسبقا بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (19,18,17) .



صورة (1): نقاط جمع عينات المياه على طول النهر مبينة بالمربعات السوداء

ثانيا- العاثي البكتيري:

تم جمع حوالي 45 عينة من المياه بواقع 25 عينة من مياه النهر و20 عينة من مياه مبازل المدينة و مياه المجاري الثقيلة . حيث تم ترشيح العينات بواسطة مرشحات دقيقة Millipore (0.22 مايكرون) خلال مدة لم تزد عن ساعتين من وقت جمع العينات. قبل ذلك كنا قد نقلنا 500 مايكروليتر من المرق المغذي الحاوي على بكتريا الكوليرا بعمر 18 ساعة لأنبوبة اختبار

حاوية على الاكار الخفيف soft agar (وهو اكار مغذي حاوي على Bactoagar 0.8%) حيث تم إضافة حوالي 50 مايكروليتر من عينات الماء التي تم ترشيحها حديثاً. ثم تم صب الخليط على وسط الاكار الصلب وحضن لمدة 18-24 ساعة بدرجة37 م°. سجلت النتائج بعد ذلك وفي حالة ظهور البقع اعتبرت النتائج موجبة حيث تم حساب عدد البقع و قياس أقطارها . وبعدها أجريت الفحوصات الأخرى على العاثي وشملت زمن التحلل الكلي للبكتريا ومعدل الأمتزاز للعاثي وحساسية العزلات للإصابة بالعاثي وحساسية العاثي للتغير بقيم الأس الهيدروجيني والحرارة(4,3,20,21,22). وكما يلي:

1-تركيز العاثي في عينات المياه:

اجري هذا الفحص عن طريق إجراء سلسلة من التخافيف العشرية لعينات الماء المرشحة وحسبت عدد البقع المتكونة على الوسط الصلب وضرب العدد في مقلوب التخفيف للحصول على تركيز العاثي (24,23).

2-زمن التحلل الكلي للبكتريا:

تم حسابه بإضافة 1مل من المحلول الحاوي على العاثي البكتيري بتركيز $3*10^5$ pfu/ml (وحدة مكونة للبقعة/مل) مع 9مل من الوسط المرق المغذي الحاوي على بكتريا الكوليرا بتركيز $5*10^8$ خلية/مل بعمر 18 ساعة حيث تم وضع الخليط في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة 37م° وتم هز الخليط ببطء،حسب زمن التحلل الكلي باستخدام المطياف لقياس الكثافة الضوئية كل 30 دقيقة وكذلك التخطيط على وسط الاكار الصلب مع كل قياس للتأكد من وجود وحساب تراكيز الخلايا المتبقية(26,25).

3-حساب معدل الأمتزاز للعاثي:

تم حساب معدل أمتزاز العاثي من خلال إضافة المحلول الحاوي على ما يقارب 10^6 وحدة مكونة للبقعة/مل من جزيئات الفيروس والمحصل عليه من الخطوة السابقة (إذا كان التركيز اكبر يصار إلى تخفيف النموذج وحساب التركيز بواسطة المطياف أو بطريقة عد البقع وهي الأسهل) وهنا يجب التأكد من كون عمر المحلول لا يزيد على 24 ساعة. يضاف المحلول لعالق الخلايا المنماة في وسط لوريا السائل بتركيز 10^8 خلية/مل وبعد الخلط بخمس دقائق ينقل المحلول لجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000-4000 دورة/دقيقة حيث يفصل الرائق ويتم حساب عدد البقع للحصول على عدد جزيئات العاثي والغير ملتصقة بالخلايا ويطرح من العدد الأصلي للحصول على معدل الأدمصاص ويمكن إعادة العملية كل خمس دقائق على نفس النموذج للحصول على علاقة خطية بين الزمن ومعدل الأمتزاز (27).

4- حساسية العزلات للإصابة بالعاثي:

استخدم في هذا الفحص تركيز من العاثي حوالي 10^3 وحدة مكونة للبقعة/مل ويسمى التخفيف الروتيني الاختباري((routine test dilution (RTD)) ويمثل أعلى تركيز يفشل بالتسبب بانحلال كامل للبكتريا تحت الاختبار. ولاختبار حساسية العزلات البكتيرية تنتخب سلالات نموذجية منفردة وتلقح في 3مل من المرق المغذي وتحضن في 37م° لمدة أربع ساعات وبعدها تصب على الوسط الصلب،ثم يتم استخدام العاثي بتركيز RTD بشكل نقط منفصلة وبحجم 0.05 مل على الطبق وبعدها يحضن الطبق ويترك لمدة 20 ساعة بدرجة حرارة37 م°. النتيجة الموجبة تسجل بحساب وجود التحلل للبكتريا(28,29,6) .

5- حساسية العاثي للتغير بقيم الأس الهيدروجيني:

هذا الفحص من الفحوصات البسيطة ويشمل تحضير سلسلة من أنابيب الاختبار الحاوية على المرق المغذي وتضبط قيم pH فيها لتكون متدرجة من 3-13 مع وجود 1N HCL أو 1N NaOH وتكون حاوية على جزيئات الفيروس بمقدار معلوم لتعطي تركيز 10^7 وحدة مكونة للبقعة/مل حيث تحضن بدرجة حرارة 37م° لمدة ساعة واحدة وبعدها يتم تخفيف العينة وتلقح لحساب عدد البقع والتحري عن فعالية جزيئات الفيروس حيث يعبر عن فعالية الفيروس بشكل النسبة المئوية القصوى للنمو(22,28).

6- وحساسية العاثي للتغير بقيم درجات الحرارة:

تم دراسة حركيات تضاعف الفيروس أو فعاليته من خلال حفظ العينة في المرق المغذي بدرجات حرارة 40 م° و 50م° و60 م° و70 م° على التوالي وبعدها تم التحري عن نشاط الجزيئات الفيروسية المعاملة بالحرارة عن طريق مزجها مع المزروع البكتيري وصب الخليط في أطباق زرعيه وحساب أعداد البقع المتكونة بعد الحضن والتي تعطي مؤشراً على فعاليته جزيئات الفيروس (28).

7-دراسة إمكانية استخدام العاثيات في السيطرة على بكتريا الكوليرا في عينات مياه النهر مختبرياً:

لأجراء هذا الاختبار تم جمع عينات من مياه نهر الديوانية وذلك لمحاكاة الحالات الطبيعية وتم التأكد من خلو هذه العينات من بكتريا الكوليرا وذلك بالتحري عن هذه الكوليرا حيث حفظت بفلاسكات معقمة بواقع 500 مل لكل عينة وبثلاث مكررات بعدها تم إضافة 1مل من المرق المغذي الحاوي على $6*10^8$ خلية/مل من بكتريا الكوليرا وأيضا تم إضافة 1مل من المحلول الحاوي على جزيئات العاثي حوالي $3*10^7$ وحدة مكونة للبقعة/مل.بعد ذلك كان يتم التأكد من تركيز الخلايا في الماء المعامل بالعاثي كل ساعتين لحساب أعدادها وتم تسجيل النتائج بحساب زمن التحلل الكلي أي بتوقف عزل ونمو الخلايا من الماء.

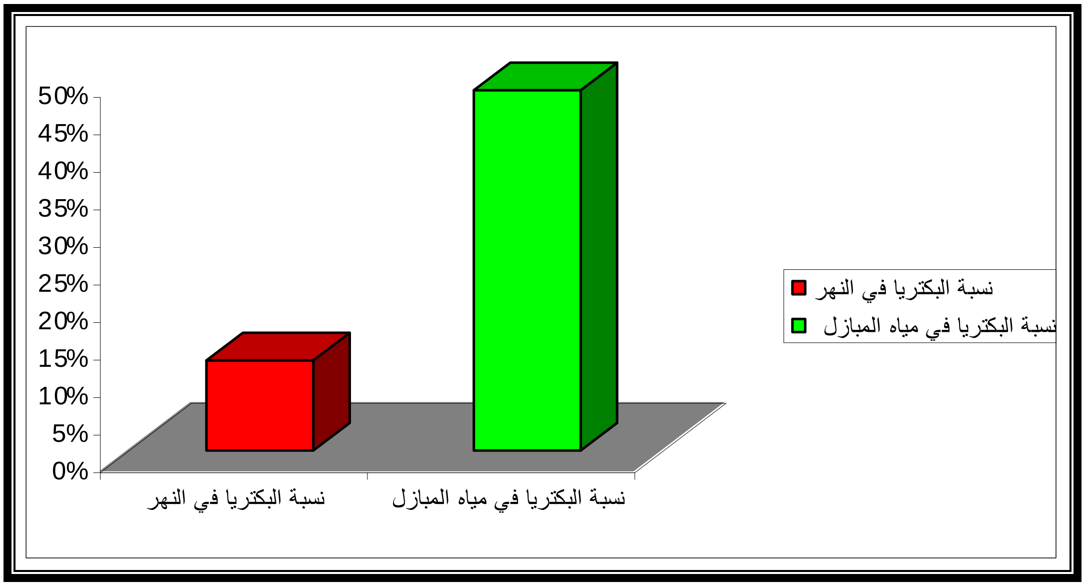
8-التحليل الإحصائي:

تم اختبار معنوية الفروقات باستخدام فحص اقل فرق معنوي LSD وكذلك حساب معامل الارتباط بفحص زمن التحلل الكلي باستخدام برنامج التحليل الإحصائي المتخصص SPSS وبعد ذلك رسمت الأشكال البيانية ومجالات الانحراف المعياري باستخدام برنامج Excel (30).

النتائج:

1- عزل بكتريا الكوليرا في مياه النهر و المبازل في مدينة الديوانية :

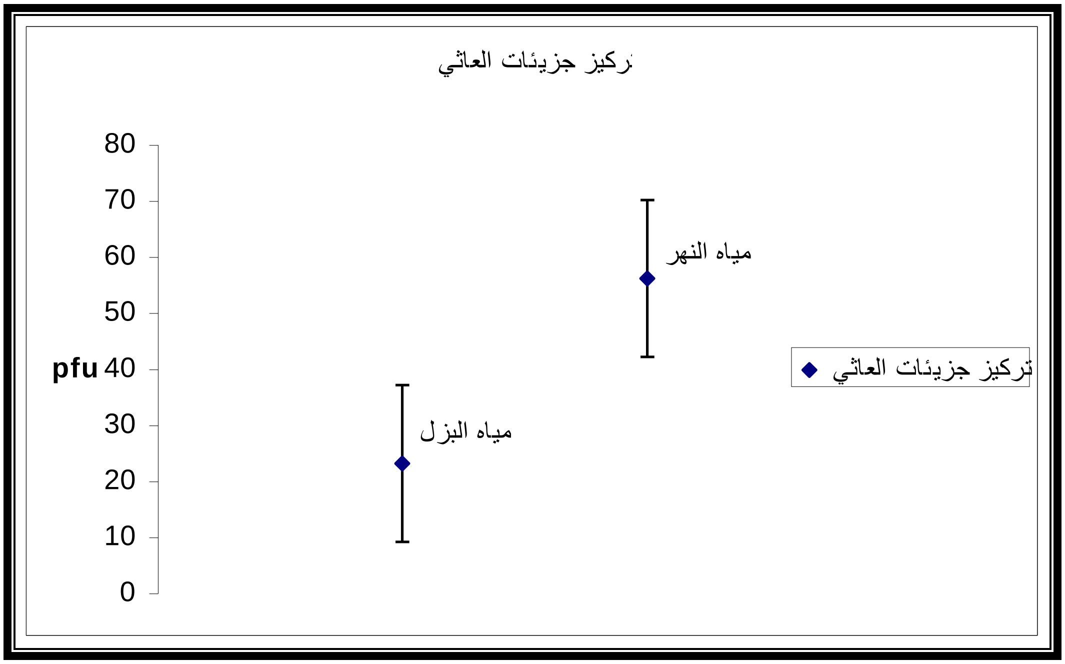
بينت نتائج الدراسة الحالية بأنه من 50 عينة من المياه (25 من كل من النهر ومياه المبازل) أظهرت النتائج بان بكتريا الكوليرا التي تم عزلها من العينات التي أخذت من النهر كانت 3 عينات أعطت فحصا موجباً(12%) في حين كانت العينات التي أخذت من مياه المبازل والمجاري 12 عينة أعطت فحصاً موجباً(48%) الشكل (1).



الشكل (1): نسب عزل بكتريا الكوليرا من مياه النهر و المبازل.

2- عزل عاثيات الكوليرا في مياه النهر و المبازل في مدينة الديوانية :

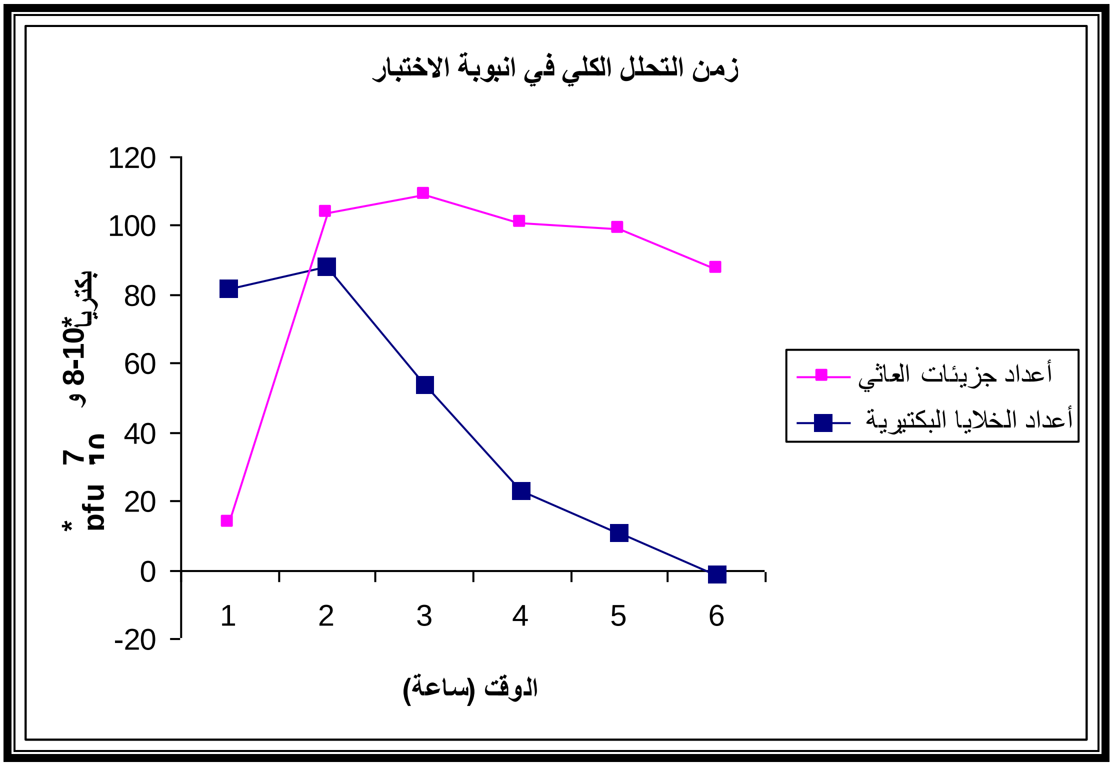
تم عزل أعداد متباينة من جزيئات العاثي البكتيري من عينات مياه النهر وكان متوسط العزل بحدود 56±22 وحدة مكونة للبقع/مل في حين في مياه المبازل كان متوسط العزل 23±14 وحدة مكونة للبقع/مل هذا علماً بان بعض العينات أعطت فحصاً سالباً بعدم ظهور البقع عند العزل الشكل (2).



الشكل(2): تواجد وعزل عاثيات الكوليرا في مياه النهر و المبازل في مدينة الديوانية .

3-زمن التحلل الكلي للخلايا البكتيرية:

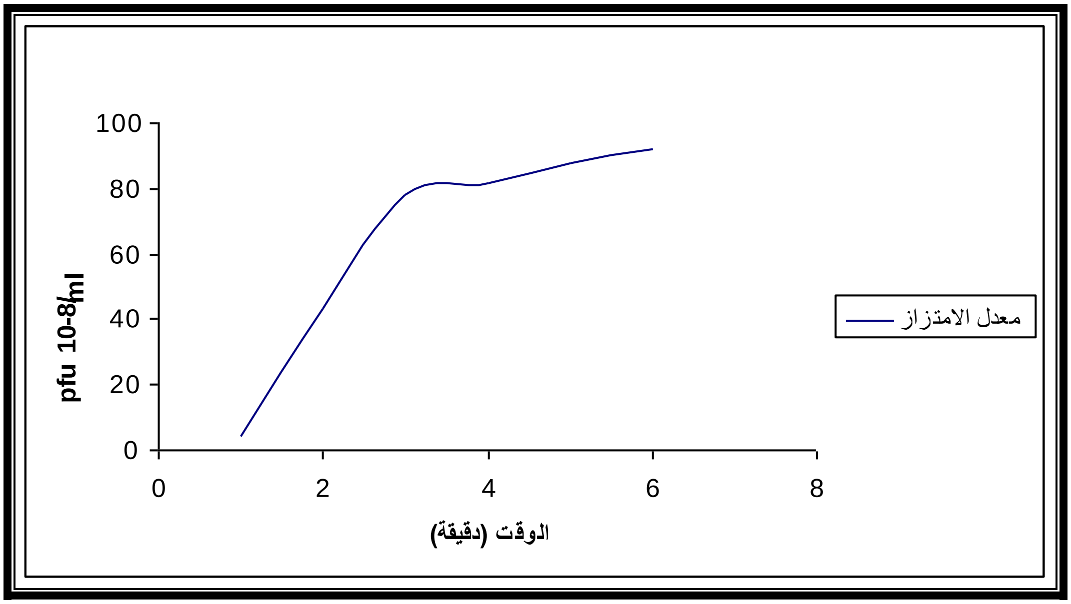
وضحت نتائج الدراسة الحالية بان جزيئات العاثي كانت ذات فعالية عالية المعنوية P>0.01 عند اختبارها في حل الخلايا البكتيرية، وان الفعالية بلغت أقصاها بحدود الساعتين من مزج جزيئات العاثي مع المزروع البكتيري في المزرعة السائلة الأمر الذي رفع تراكيز الجزيئات الفيروسية في حين على العكس بينت النتائج بان هنالك ارتباط عكسي بين أعداد البكتريا مع الجزيئات الفيروسية حيث انخفضت أعداد الخلايا البكتيرية في الخليط بزيادة الوقت وبلغت مرحلة الانقلاب السالب عددياً للبكتريا عندما تجاوز الوقت عتبة الساعتين وكانت نقطة النهاية لتواجد البكتريا في الخليط (زمن التحلل الكلي) عندما بلغ الوقت 6 ساعات كما في الشكل (3) .



الشكل (3): زمن التحلل الكلي للخلايا البكتيرية.

4- معدل أمتزاز جزيئات العاثي على الخلايا البكتيرية:

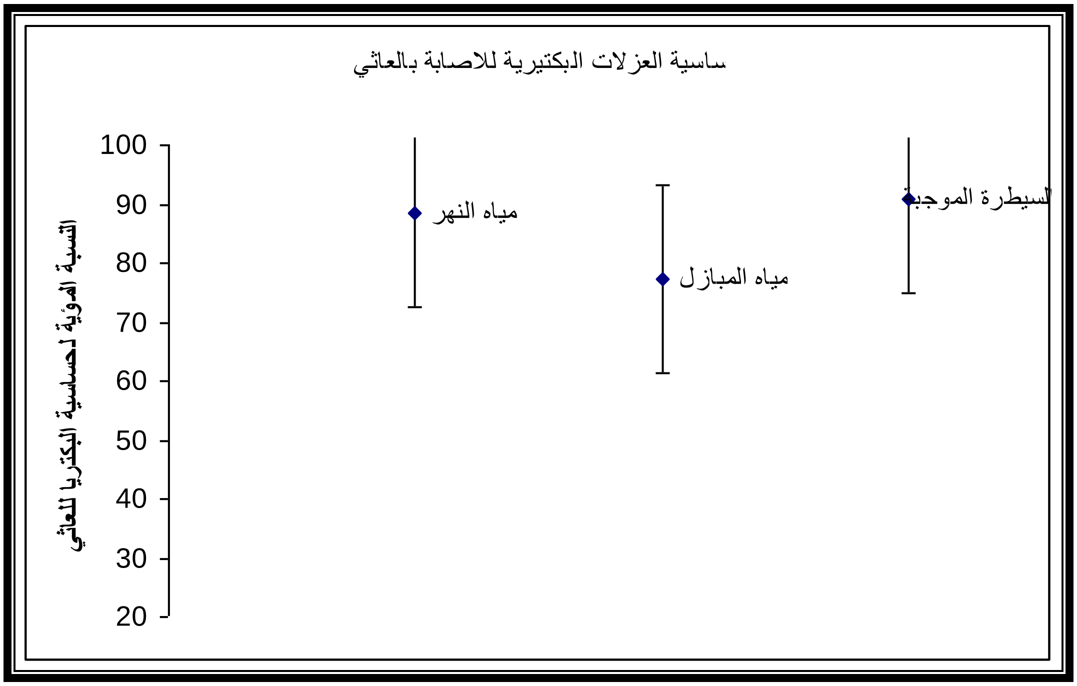
بينت النتائج التي تم الحصول عليها بان جزيئات العاثي البكتيري استطاعت تحقيق أعلى مستوى للامتزاز في وقت بلغ أعلاه بين 2-4 دقيقة ومن الملاحظ بان زيادة الوقت كانت ذات تأثير معنوي كبير $P>0.01$ في زيادة أعداد الجزيئات الممتزة على سطوح الخلايا البكتيرية وان كل من الرج و التخفيف المستمر للعينات يؤخر العملية لتأخذ وقتا أطول الشكل (4).



الشكل(4) أمتزاز جزيئات العاثي على سطوح الخلايا البكتيرية.

5-حساسية البكتريا للإصابة بجزيئات العاثي البكتيري:

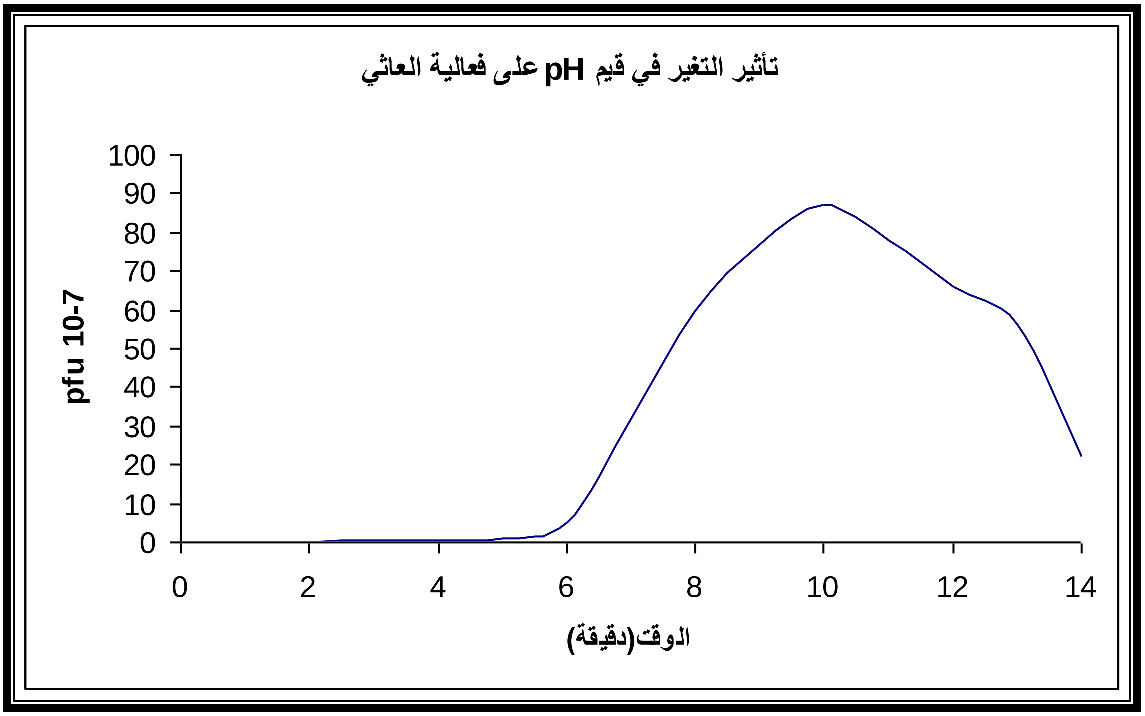
بينت نتائج هذه الدراسة بان العزلات البكتيرية كانت اكثر حساسية$P>0.01$ للإصابة بالعاثي المعزول من مياه النهر إذ كان متوسط نسبة الإصابة هو 88.5% الفيروسية المأخوذة من مياه النهر في حين كانت اقل حساسية للعاثيات المعزولة من مياه المبازل 77.22% وكانت مجموعة السيطرة الموجبة التي شملت reference strain حوالي 91% كما في الشكل (5).



الشكل(5): حساسية البكتريا للإصابة بجزيئات العاثي البكتيري.

6- تأثير التغير في قيم الأس الهيدروجيني في فعالية العاثي:

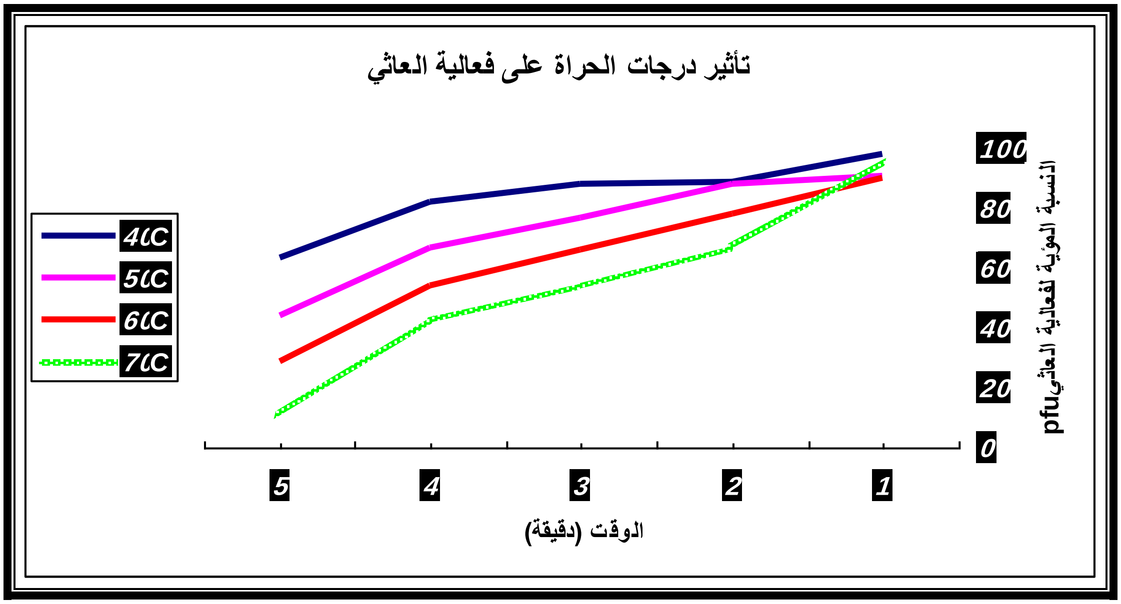
أوضحت النتائج التي تم الحصول عليها بان فعالية جزيئات العاثي تبلغ أعلى مستوى لها في الوسط القاعدي بين pH =10-8 وبعد 10 تبدأ هذه الفعالية بالانخفاض، هذا وفي نفس السياق يعتبر حد العتبة لبقاء العاثي فعالاً وبأعداد قليلة في الوسط الحامضي بحدود pH=6 وكما هو مبين في الشكل (6).



الشكل(6) تأثير التغير في قيم الأس الهيدروجيني في فعالية العاثي

7-تأثير التغير في قيم درجات الحرارة على فعالية العاثي:

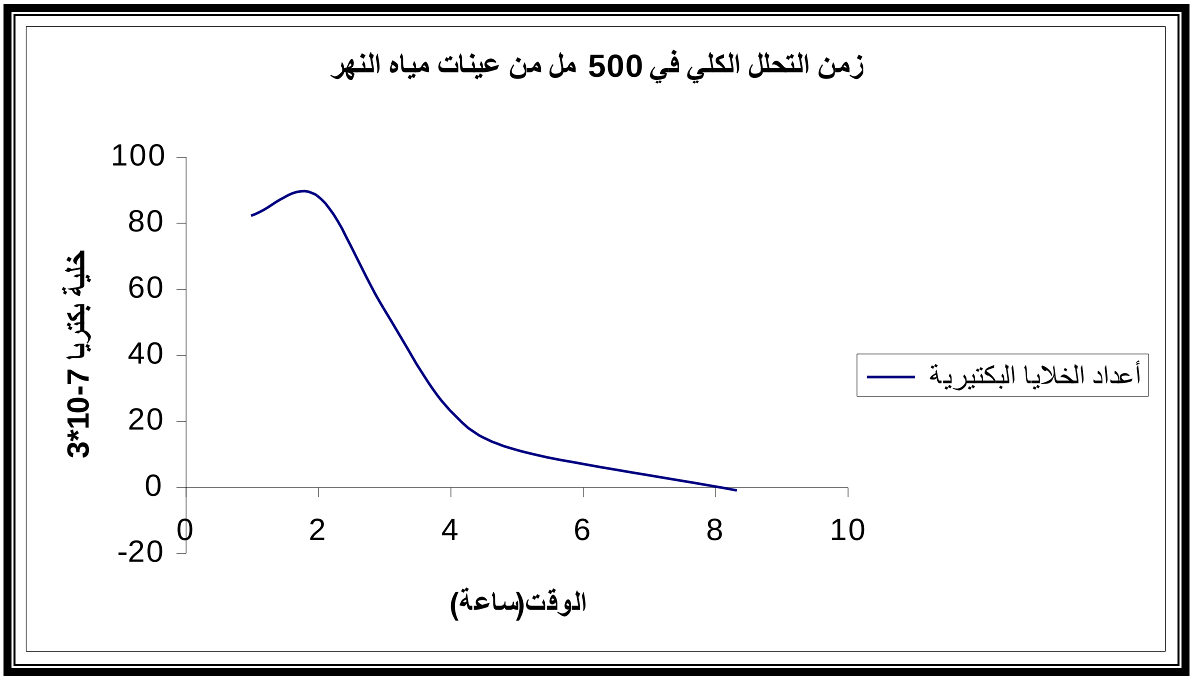
وضحت نتائج الدراسة الحالية بأن نسبة الجزيئات الفعالة من جزيئات العاثي لم تتغير فعاليتها كثيراً على مستوى احتمالية P>0.01 عندما تكون درجات الحرارة بحدود 40م° في حين لوحظ انخفاض متزايد في فعالية جزيئات العاثي عندما تم حضنها بدرجات حرارة 50 م° و60 م° ، وبلغ اكبر تأثير على فعالية العاثيات في 70 م° وكانت نقطة نهاية فعالية العاثي تتوقف في درجة حرارة 70 م° بعد 7-8 دقائق تماما الشكل (7).



الشكل(7) :تأثير التغير في قيم درجات الحرارة على فعالية العاثي.

8-استخدام العاثيات للسيطرة على بكتريا الكوليرا في مياه النهر مختبريا:

أوضحت النتائج التي تم تسجيلها بان السلوك العام للعلاقة بين تركيز جزيئات العاثي والخلايا البكتيرية لم يتغير إلا أن الاختلاف كان واضحا بمقياس الزمن الكافي للتسبب بوقت التحلل الكلي حيث لوحظ بان 6 ساعات لم تكن كافية للتسبب بالتحلل الكلي في حين كانت 8 ساعات ونصف هي الوقت الكافي للتسبب بتحلل كلي للخلايا البكتيرية$P>0.01$ في عينة من مياه النهر كان حجمها 500 مل وكما هو مبين في الشكل (8).



الشكل (8):استخدام العاثيات للسيطرة على بكتريا الكوليرا في مياه النهر مختبريا.

المناقشة :

بينت نتائج الدراسة الحالية بان بكتريا الكوليرا التي تم عزلها من العينات التي أخذت من النهر كانت 3 عينات أعطت فحصا موجباً في حين كانت العينات التي أخذت من مياه المبازل والمجاري 12 عينة أعطت فحصاً موجباً ، هذه النتائج تتماشى مع ما كان متوقعاً و مع ما تم تسجيله في دراسات عديدة (31 , 20 ,13 ,2).

أوضحت نتائج هذه الدراسة أيضا تواجد عاثيات الكوليرا في كل من مياه النهر ومياه المبازل، غير أن مياه النهر احتوت النسبة الأعلى على عكس ما تم ملاحظته من وجود أعداد اقل من البكتريا، في حين احتوت عينات مياه المبازل على أعداد اقل من العاثيات بالرغم من ارتفاع أعداد البكتريا المعزولة منها. هذه النتائج توضح مدى الدور الذي تلعبه العاثيات في خفض أعداد البكتريا في مياه النهر الأمر الذي أشار أليه Faruque وجماعته في عامي (2004) و(2005) في بنغلادش حيث بين الأخير إن أعداد بكتريا الكوليرا في عينات المياه المعزولة من مناطق بيئية مختلفة محددة ذاتياً بسبب الدور الكبير الذي تلعبه العاثيات في تلك البيئات، وذلك من خلال ملاحظته إن العينات التي احتوت على أعداد اكبر من العاثيات كانت نسب عزل البكتريا منها اقل والعكس بالعكس. الأمر الذي يتوافق مع نتائج هذه الدراسة حيث تمثل العاثيات أداة تحكم نوعية بأعداد البكتريا المضيف (4,3). وقد أشار Albert وجماعته(1996) إلى أهمية استخدام عاثيات الكوليرا من نمط 01 كأداة تشخيص تأكيديه في حالات تفشي المرض(6).

سجلت نتائج هذه الدراسة قدرة العاثيات التي تم عزلها على تحمل الارتفاع في دالة الأس الهيدروجيني$P>0.01$ في البيئة القاعدية فقد كان مستوى الفعالية الأكثر عند $pH= 10.5\text{-}9$ في حين لوحظ بقاء نشاط جزيئات العاثي وبمستوى قليل في الوسط المتعادل هذا النشاط يتوقف عند $pH=5.5$. وعند مقارنة هذه النتيجة مع ما توصلت له بعض الدراسات يلاحظ بان أنواع العاثيات تختلف في مستوى تحملها للتغير في قيم الأس الهيدروجيني إلا أن عاثيات الكوليرا تتشابه بأنها تبقى فعالة في أوساط قاعدية (28) . أما بالنسبة للتغير في درجات الحرارة فان الفيروسات عموما تسلك سلوكا متشابها تقريباً إذ إنها تبقى فعالة بدرجات حرارة تصل إلى 40-45 م° وتفقد فعاليتها مع ارتفاع الحرارة لمستويات أعلى وقد تم تسجيل توقف لفعالية عاثي لبكتريا الكوليرا المسمى S20 في وقت خمس دقائق ونصف بدرجة حرارة 70م° وسبع دقائق ونصف بحرارة 60م° وحوالي خمس عشر دقيقة في درجة حرارة 50م ° الأمر الذي ينسجم ما تم تسجيله بشكل عام بهذا الخصوص (29,28).

أوضحت النتائج التي سجلها هذا العمل إن معدل أمتزاز الجزيئات الفيروسية يتناسب طردياً مع عامل الوقت (ارتباط موجب) ويعود ذلك لإتاحة فرصة اكبر لجزيئات العاثي للالتصاق بالبكتريا الأمر الذي يفسر هذه الزيادة وهذا يتماشى تماماً مع ما سجلته الدراسات السابقة بهذا الخصوص (22). سجلت دراسات عديدة أنواع مختلفة من عاثيات الكوليرا التي تستطيع حل الخلايا البكتيرية في المزروع السائل حيث يتم حساب الزمن اللازم للتسبب بحل كل الخلايا وهو يمثل سرعة تضاعف العاثي داخل الخلايا وانتاج الجزيئات الجديدة وهذه العملية تعطي مؤشرات عن الفيروس ومستوى نشاطه الجزيئي ، وبمقارنة هذه النتائج مع ما تم تسجيله في حالة عاثيات الكوليرا تبين بان هذه العاثيات احتاجت وقتاً اقصر للامتزاز وحل الخلايا الأمر الذي يمكن أن يفسر إنها اكثر كفاءة في النظام البيئي وقد يعود السبب للتراكيز البكتيرية في البيئة التي ربما تكون قليلة مما يجعل العاثيات تستغل هذه الأعداد بكفاءة اكثر لتضمن بقائها(25,22) . ومن الجدير بالذكر إن زمن التحلل الكلي للبكتريا في عينات مياه النهر كان أطول يمكن أن يعود السبب إلى عامل التخفيف يسبب انخفاض معدل تصادم جزيئات العاثي بالخلايا المضيف الأمر الذي يقلل بدوره من فرص حصول أمتزاز العاثي على هذه البكتريا وهذه النتائج يمكن أن تستند إلى ما ذهبت إليه دراسات سابقة حيث بينت الدراسات إن تخفيف العينات يؤدي لاطالة زمن التحلل وكذلك استخدام الحرارة وبعض المواد

الكيميائية أو تقليل تركيز البكتريا المضيف(26,32).تشير مجمل النتائج التي تم التوصل لها لأهمية عاثيات البكتريا المختلفة ودورها الكبير في السيطرة على مستويات هذه البكتريا في البيئة المائية بشكل عام ويمكن أن يستفاد منها كبدائل طبيعية سليمة لمضادات الحياة للسيطرة على البكتريا المقاومة لمضادات الحياة وكذلك يمكن الاستفادة من هذه العاثيات كأدلة على تواجد البكتريا واعدادها في البيئات المائية في بلدنا العزيز.

المصادر

1-Brooks; **G. F.; Butel, J. S.;and Morse S. A. C**.(2001). Medical Microbiology . 26/E. Lange. Medical book. Me Graw: Hill. VSA.

2-Kaistha, N.;Mehta, M.; Gautam,V.; and Gupta, V. (2005). Outbreak of cholera in and around Chandigrah during two successive years (2002,2003).J. Indian Medical Reviews, Vol.122, pp.404-407.

3-Faruque, S. M.; Naser, I. B.;Islam, M.J.;Faruque, A.S. Ghosh,A.M.; Nair, G.B. ; Sack, D.A.; and Mekalanos,J.J.(2004).seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. J.PNAS, Vol.102, No.5,pp:1702-1707

4-Faruque, S. M.; Islam, M.J.; Ahmed, Q.S.;Faruque, A.S.G.;Sack, D.A.;Nair, G.B. and Mekalanos,J.J.(2005).Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics :Role of host-mediated amplification of phage. J.PNAS, Vol.102, No.17,pp:6119-6124.

5-Jouravleva,E.A.;McDonald,G.A.;Garon,C.F.; Boesman-Finkelstein, M. and Finkelstein, R.A. (1998). Chracterization and possible functions of a new filamentous bacteriophage from *Vibrio cholerae* 0139. J.Microbiology. Vol. 144. pp:315-324.

6-Albert,M.J.; Bhuiyan, N.A.; Rahman, A.;Ghosh, A.N.;Kultenby,K.A.; Nahar, S.;Kibriya,A.K.M.G.;Ansaruzzaman,M. and Shimada, T. (1996).Phage specific for *Vibrio choerae* 0139 Bengal. J. Clinical microbiology. Vol.34, No.7. pp:1843-1845.

7-Al-Abbassi, A.M.;Ahmed,S. and Al-Hadithi,T.(2005).Cholera epdemic in Baghdad during 1999:clinical and bacteriological profile of hospitalized cases. J.WHO. Easte. Mediter.Health. Vol.11, No.1&2.(cited by Habeeb,2010).

8-(WHO)World Heath Organization (2003).Cholera in Iraq-update2.W.H.O.Epdemic and Pandemic Alert Response(EPR).

9-(WHO)World Heath Organization.(2004).Cholera in 2003. Weekly Epedimiology Record. Vol.79. pp:281-288.

10-(WHO)World Heath Organization.(2005).Cholera in 2004. Weekly Epedimiology Record. Vol.80. pp:261-268-288.

11-(WHO)World Heath Organization.(2008a).Cholera in 2007. Weekly Epedimiology Record. Vol.83. pp:269-284.

12-(WHO)World Heath Organization.(2008b).Cholera in Iraq. W.H.O. Global Alert and Response. (GAR).(cited by Habeeb,2010).

13-Habeeb,T. A.(2010).Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhea cases of children in Al-Diwanyia province. M.Sc. thesis, College of Medicine, Al-Qadisiya university.pp:9-10.

14- Abedon ,S. T.(2008). Bacteriophage Ecology Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses. Advances in Molecular and Cellular Microbiology Vol.15. Cambridge University Press. UK.

15-Shri,J. N.(2002).Cholera bacteriophages revisited .J. Indian Council of Medical Research. Vol.32, No.4.

16-Alkhozai, Z. M. F. (2008). First record of Coliphage in Al-Qadissyia province and using it as biomonitors in water pollution. J. Al-Kufa for pure science. Vol.1, No.3. pp:

17- Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for the identification of medical bacteria. 3rd ed. The Williams and Wilkins-Baltimor USA.

18-Baron,**E. J.O.; Peterson, T. R.;Finegold, S. M**.(1994).Diagnostic microbiology 9/E Mosby. USA.

19- Collee, **G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P.; Simmons, A.** (1996). Practical Medical Microbiology. 14/E Churchill Livingston. USA.

20-Sen, A. and Ghosh, A.N.(2005)A .Physiochemical characterization of vibriophage N5. J. Virology. Vol.2, No.7,pp.1-4.

21-Sen, A. and Ghosh, A.N.(2005)B.New Vibrio cholerae O1 Biotype El Tor bacteriophages. J. Virology. Vol.2, No.28.pp.754-756.

22-Phumkhachorn, P. and Pongsak, R.(2010). Isolation and partial characterization of a Bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi.* J. Microbiology Research. Vol 4, No.16, pp. 1794-1800.

23-Primrose, S.B.;Seeley, N.D.;Logan,K.B. and Nicolson, J.W.(1982). Methods for studying aquatic bacteriophage ecology. J. Applied and Environmental Microbiology. Vol.43,No.3. pp:694-701.

24-Yousefi,Z. and Zazouli,M.A. (2008).Evaluation of bacteriophages methods for detection and isolation of viruses from surface water. J. World Applied sciences, Vol.3, No,2, pp.317-322.

25-Shao, Y. and Wang I.N.(2008).Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. J.Genetics, Vol.108, pp.471-482

26-Heineman, R.H. and Bull, J.J.(2007).Testing optimality with experimental evaluation :lysis time in Bacteriophage .J. Evolution, Vol.61, No.7,pp.1695-1709.

27-Moldvan, R.; McQuiston, E. and Wu, X.L.(2007).On kinetics of phage adsorption. J. Biophysical sciences, Vol.93, pp.303-315.

28-Dutta, M. and Ghosh, A.N.(2007). Physiochemical characterization of ElTor vibriophage S20. J. Interovirology ,Vol.50, pp.264-272.

29-Budzik, J.M.(2000). Phage isolation and investigation. J. Dartmouth undergraduate of science. Vol.3, No.1, pp.37-43.

30-Niazi, A.D.(2000). Statistical analysis in medical research. Republic of Iraq. Al-Nehrien University.

31-Sarkar, B. L.; Ghosh,A.M.; Sen, A.;and Rodriguest, D.P. (2004). Newly isolated *Vibrio cholerae* Non-01, Non-0139 phages. J. Emerging infectious diseases. Vol.10, No. 4, pp754-756.

32-DePaola, A.; Motes, M. L.; Chan, A. M.; and Suttle, C. A.(1998). Phage infecting *Vibrio vulnificus* are abundant and diverse in oysters (*Crassostrea virginica*) collected from the gulf of mexico.J. Apllied and Environmental Microbiology. Vol.65, No.1, pp346-351.

Isolation and Studying of Cholera phage in Al-Diwanyia city and possibility of using it to control *Vibrio cholerae* phenotype 01 in laboratory

Ziad M. Al-khozai
College of Science
Al-Qadisyia University

Adnan H. O.Al-Hamdani
College of Medicine
Al-Qadisyia University

Dina M.R. Al-Khafaf
College of Science
Al-Qadisyia University

Abstract:

This work was carried out in the period between June 2009 to November 2010, water samples were collected from five positions of the river of Al-Diwanyia city, 50 sample were collected (25 from river and 25 from sewage and heavy water) to isolate bacteria and 45 sample were collected for isolation of phages (25 from river and 20 from sewage and heavy water) .

Results showed that only three samples gave positive record for cholera from river about 12%, while sewage samples recorded 12 (48%) . Vibriophages were isolated from river about 56±22 pfu/ml while from sewage were 23±12 pfu/ml. Results also showed that the isolated vibriophages appeared at the maximum activity in the alkaline medium between 8-10 this activity was declined after 10, activity also was reduced in the acidic medium and activity end point was around 6. In 40Cº the phage activity was not affected but it was decreased continuously when temperature increase 50 Cº and 60 Cº, in 70 Cº phage activity was diminished in about 7-8 minutes. Highest adsorption rate of isolated vibriophages on bacterial cells was about 2-4 minutes, time increment significantly increase the adsorption while dilution and shaking reduce adsorption. Maximum lysis activity of bacterial cells was documented in about two hours and resulted in elevation of viral concentration and decreasing bacterial cell concentration in the same time, complete lysis time was about 6 hours. Results also showed that the sensitivity of isolated bacteria towards the phages was high especially to river phages about 88.5% and less to sewage phages 77.22%, while highest sensitivity was recorded in the positive reference strain 91%.Over all results of this work reflect the important role of vibriophages in controlling the levels of *Vibrio cholerae* in environment.