

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحياتية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر، فيفيان زيا كوركيس، نيشتمان محمد نجيب

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحياتية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية

نزار أدور ناصر *

فيفيان زيا كوركيس **

نيشتمان محمد نجيب **

* كلية العلوم – الجامعة المستنصرية
** كلية العلوم – جامعة صلاح الدين في أربيل

تاريخ استلام البحث: 2010/11/20 - تاريخ قبول النشر: 2011/3/22

الخلاصة

أجريت الدراسة على بعض انواع البكتريا الممرضة للانسان و الاكثر انتشارا في العينات المرضية حيث تم تأكيد تشخيصها بأجراء الفحوصات المجهرية و الكيموحيوية و الفسلجية لها , ثم تعريضها للمضادات الحياتية الحساسة لها وبتراكيز واطنة جدا لغرض التعرف على مدى تأثير البكتريا بتعرضها لهذه المستويات المتدنية من تراكيز للمضادات الحياتية والتي تتعرض لها البكتريا في حالة عدم تناول المضادات الحياتية في الفترات الزمنية المحددة حسب ارشادات الطبيب .

أظهرت النتائج تأثير جميع العزلات بالمضادات الحياتية المعاملة بها و بدرجات متباينة . كان نمو *Proteus vulgaris* بغزارة في تركيز 0,01 ملغم/مل لكل المضادات الحياتية المستخدمة في هذه الدراسة , في حين كان نمو *Escherichia coli* بغزارة اثناء معاملتها بالنتراسايكلين في التراكيز من 0,01 الى 0,3 ملغم / مل , وكان للبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* نمو جيد جدا ايضا في تركيز 0,01 ملغم / مل من النتراسايكلين , وبكتريا *Klebsiella pneumoniae* في تركيز 0,2 ملغم/مل من البكتريم. لوحظ ايضا حصول التغيرات في بعض الصفات المظهرية و الفسلجية للخلايا البكتيرية , في استجابتها لصبغة كرام , افراد خلايا البكتريا العنقودية وفقدانها للترتيب العنقودي , زيادة حجم خلايا البكتريا *E. coli* عن معدلاتها الطبيعية , نقص في طول خلايا *P. aeruginosa* وفقدان قدرة البكتريا *K. pneumoniae* على تكوين العلبنة .

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحياتية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر، فيفيان زيا كوركيس، نيشتمان محمد نجيب

يمكن الاستنتاج من هذه الدراسة الى قابلية هذه التراكيز الواطنة من المضادات الحياتية في توليد سلالات مقاومة و جديدة من نفس الانواع من البكتريا المرضية التي تعرضت لها والتي تتحسسها في تراكيز معينة نتيجة عدم اتباع ارشادات الطبيب في استعمالها بالصورة الصحيحة.

Abstract

Certain types of the most common pathogenic bacteria affecting humanbeing , being diagnosed using specified biochemical and physiological tests , were included in this study , to demonstrate the effect of very low concentrations of identified susceptibility types of antibiotics on these bacteria , aiming at exploring the effect of improper use of antibiotics , using then in low doses or for short time , irrespective of the doctor's instruction . The results showed that all the isolates were affected by all antibiotics used in this study in different manner . *Protues vulgaris* reveal heavy growth of 0.01 mg/ml oncentration for all types of used antibiotics, while the growth of *Echerichia coli* was heavy with concentration of 0.01 to 0.3 mg/ml of tetracycline , *Pseudomonas aeruginosa* show very profound growth at 0.01 mg/ml concentration of tetracycline as well as *Klebsiella pneumonia* at 0.2 mg/ml concentration of Bacterim. On the other hand bacterial cells showed morphological and physiological changes in regard to its response to Gram stain , attachment of cells and cluster appearance of *Staphylococcus aureus*, increase in the size of cells of *E. coli* than it's normal range , shortening in the length of *P. aeruginosa* and loss of capability to form capsule of *K. pneumonia* . On conclusion , low concentration of antibiotics lead to generation of new resistant strains from the same type of pathogenic bacteria when these antimicrobial ents were used incorrectly in response to the doctors instruction .

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر، فيفيان زيا كوركيس، نيشتمان محمد نجيب

المقدمة

تستخدم المضادات الحيوية في مجالات عدة في وقتنا الحاضر, في مقدمتها الاستعمالات الطبية (1) . ان هذه المركبات الحيوية قد بحثت تفصيلا و حددت طرائق استعمالها بهدف خدمة الانسان من خلال السيطرة على مختلف العزلات المرضية المعروفة لقدرتها على ايقاف النمو بتأثيرها على العمليات الحيوية أو اباده العزلات المرضية (2), الا ان عدم التقيد باستخدامها بالشكل الصحيح فيما يخص كمية الجرعة ومواعيدها يؤدي الى ظهور سلالات جديدة من العزلات المرضية نتيجة حدوث طفرات وراثية فيها وبالتالي عدم ملائمة العلاج المستخدم ضدها (3) أو انها عندما تكون بتراكيز واطنة قد تؤثر باتجاه تحفيز الاحياء المجهرية على النمو غير الاعتيادي (4 و 5).

ونظرا الى اهمية هذا الجانب فيما يتعلق بحياة الانسان اليومية , واحتمالات ظهور عزلات بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية المعروفة , اجريت هذه الدراسة للتقصي والبحث عن النتائج المحتملة في حالة تعرض بعض العوامل المرضية المعروفة الى مستويات واطنة من تراكيز المضادات الحيوية نسبة الى التراكيز المستخدمة لغرض العلاج والتي قد تحصل عند تناول جرعات صغيرة أقل من المقرر أو تعاطيها بفترات زمنية متباعدة مما يؤدي الى دوام المستوى الواطني لتراكيزها في الجسم ودون المستوى المطلوب لقتل العامل المرضي (6) .

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على ثمانية عزلات مرضية نقية من مختبر الصحة المركزي في مدينة أربيل بواقع ثلاث مكررات لكل منها , ومصدرها جميعا من عينات المرضى تم جمعها لأغراض الفحص والتشخيص المختبري , وقد كانت هذه العزلات كالاتي :

1 : بكتريا موجبة لصبغة كرام ,

ت	المصدر	أسم العزلة
1	فيح	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	فيح	<i>Staphylococcus albus</i>
3	قشع	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
4	مسحة بلعوم	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر، فيفيان زيا كوركيس، نيشتمان محمد نجيب

2 : بكتريا سالبة لصبغة كرام ,

ت	المصدر	أسم العزلة
1	خروج لطفل دون السننتين	<i>Escherichia coli</i>
2	ادرار	<i>Proteus vulgaris</i>
3	قشع	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	قيح	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

اجريت فحوصات مجهرية و اختبارات كيموحيوية وفسلجية لغرض التأكد من تشخيصها وتضمنت صفاتها المظهرية وتخمر سكريات المالتوز والمانيتول والسكروز والكلوكوز واللاكتوز . واختبار تحلل الدم وقابلية انتاج انزيم مخثر الدم للعنقوديات الذهبية وايضا اختبارات انتاج انزيم اليوريز والاكسيديز واختبارات IMVIC و TSI , كذلك استخدمت صبغة كرام وصبغة ألبرت وصبغة العلبة لغرض فحصها مجهريا (7) .

كما تم اختبار المضادات الحيوية ذات الفعالية المناسبة للعزلات البكتيرية الممرضة الشائعة الاستخدام وهي : Gentamicin, Lincomycin , Ampicillin , Cloxacillin , Chloramphenicol , Cephalosporin Erythromycin , Trimethoprim , Streptomycin , Penicillin-G and Tetracyclin حيث زرعت العزلات المرضية على اوساط زرعية مختلفة وبتركيز مخففة من المضادات الحيوية (0,01 و 0,02 و 0,03 و 0,04 و 0,05

و 0,1 و 0,2 و 0,3 و 0,4 و 0,5) ملغم/مل (8) .

الايوساط الزرعية التي تم استخدامها هي اوساط اكار المغذي و اكار الدم ووسط ماكونكي والوسط المنتخب لعصيات الخناق Cystine Tellurite blood agar (9) والايوساط الخاصة باختبارات الصفات الفسلجية والكيموحيوية (7) .

طريقة العمل :

طريقة العمل : وضع الوسط الزرع في حمام مائي (45 م°) ولمدة عشرون دقيقة ثم اضيف اليه المضاد الحيوي وبالتراكيز قيد الاختبار , ثم سكب في اطباق بتري عدا طبق اضافي لم يضاف اليه المضاد الحيوي (عينة السيطرة) . بعد تصلب الوسط الزرع , لقحت جميع الاطباق بالعزلة المرضية قيد الدراسة بطريقة التخطيط وبتلاثة مكررات ثم وضعت في الحاضنة في (37م°) ولمدة (48) ساعة , وسجلت النتائج كل (24) ساعة (2) .

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر، فيفيان زيا كوركيس، نيشتمان محمد نجيب

النتائج

اظهرت النتائج أن جميع العزلات المدروسة لم تنمو في التراكيز (1) ملغم/مل فأكثر , اما في التراكيز الادنى فقد كانت معدلات النمو متذبذبة من البكتريا الموجبة لصبغة كرام (جدول-1) فقد كانت بكتريا العقنودية الذهبية حساسة للبنسلين اعتبارا من التركيز (0,1) ملغم/مل فأكثر , بينما تأثرت بالمضادات الحيوية الاخرى جزئيا مع ملاحظة أن معدلات النمو كانت في بعض التراكيز أكثر مما هي في نموذج السيطرة , أي نموا أكثر من الاعتيادي من حيث حجم ومظهر العام للمستعمرات النامية (في تركيز 0,1 و 0,2 ملغم/مل من كلوكساسيلين , و 0,03 ملغم/مل من سيفالوسبورين) .

لقد كانت العقنوديات البيضاء حساسة لجميع تراكيز كلوكساسيلين وبنمو ضعيف مع البنسلين والسيفالوسبورين .
لم يحدث نمو لبكتريا الخناق عدا نموا ضعيفا في تركيز (0,01 و 0,02) ملغم/مل من البنسلين , كذلك بكتريا المسببة لمرض ذات الرئة كانت حساسة لجميع المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة .

في حالة البكتريا السالبة لصبغة كرام , فقد أظهرت النتائج ايضا نموا متميزا في بعض التراكيز المستخدمة من المضادات الحيوية (جدول -2) , كانت بكتريا أشيريشيا القولونية مقاومة للمضاد الحيائي (بكتريم) لغاية التركيز (0,5) ملغم/مل بينما تحسست وبشكل تام بالمضادات الحيوية كلورامفينيكول وجنتاميسين , اما مع المضاد الحيائي تتراسايكلين فقد كان نمو مستعمراتها أكبر بكثير من السيطرة لغاية التركيز (0,3) ملغم/مل , وفي التركيز (0,5) ملغم/مل بدأ يتأثر نموها بالمضاد الحيائي المذكور .

كانت بكتريا *Proteus vulgaris* مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة في تراكيزها القليلة , أكثر من العزلات البكتيرية الاخرى , كما لوحظ أن نموها في تراكيز (0,01) ملغم/مل ولجميع المضادات الحيوية كان نمو جيدا جدا , وعلى العكس منها فقد كانت بكتريا *Klebsiella pneumoniae* حساسة للمضادات الحيوية المستخدمة عدا البكتريم حيث تذبذب نموها ما بين الضعيف والجيد جدا .

واخيرا أظهرت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* نموا متميزا في تركيز (0,01) ملغم/مل من التتراسايكلين ثم تدرج نموها بعد ذلك الى النمو الطبيعي ثم الضعيف في التراكيز الاعلى منها , بينما لم تتمكن من تحقيق أي نمو في جميع التراكيز المستخدمة من ستربتومايسين و جنتاميسين , وهي متوافقة مع (10) .

كما أظهرت النتائج حصول بعض التغيرات غير الاعتيادية في بعض العزلات البكتيرية عند تعرضها لتراكيز واطئة من المضادات الحيوية الحساسة لها (جدول -3) . من البكتريا الموجبة لصبغة كرام , لوحظ أن بكتريا العقنوديات الذهبية تفقد ايجابيتها لصبغة كرام عند تعرضها للكلوكساسيلين بتراكيز (من 0,1 و لغاية 0,5) ملغم/مل , وكذلك بكتريا العقنوديات البيضاء عند تعرضها للسيفالوسبورين في جميع تراكيزه المستخدمة التي استطاعت النمو فيها . ايضا لوحظ أن بكتريا العقنوديات الذهبية تنفرط خلاياها من شكلها العقنودي حيث تبدو خلاياها منفردة ومتناثرة عند تعرضها للسيفالوسبورين بتراكيز (0,1 و 0,2) ملغم/مل والبنسلين في

تركيز (0,05) ملغم/مل .

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر، فيفيان زيا كوركيس، نيشتمان محمد نجيب

في بكتريا السالبة لصبغة كرام , لوحظ ان بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus vulgaris* يفقدان سلبيتهما لصبغة كرام عند تعرض الاولى للسيفالوسبورين في جميع التراكيز النامية فيها , والثانية للمضاد الحيوي تتراسايكلين في تركيز (0,05) ملغم/مل .
لوحظت صفة فسلبية ومظهرية أخرى في هذه الدراسة , وهي اختزال طول الخلايا لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* عن معدلاتها العامة عند نموها في تركيز (0,05) ملغم/مل من التتراسايكلين , بينما تفقد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* قدرتها على تكوين العلبه عند نموها في تركيز (0,5) ملغم/مل من البكتريم , وهو ما أشار اليه ايضا (11) .

المناقشة

جميع العزلات التي استخدمت في هذه الدراسة , أظهرت النتائج بأنها كانت حساسة للمضادات الحيوية التي تعرضت لها , مما يؤكد صلاحية هذه العلاجات في استخدامها مع العوامل المرضية المنتشرة محليا , والتي قد يكون بعضها سلالات بكتيرية طافرة , أو مقاومة لبعض المضادات الحيوية .
نمو العزلات قيد الدراسة كان نمو غير اعتياديا أثناء اجراء الاختبارات عليها , وذلك من خلال زيادة حجم المستعمرات البكتيرية على الاوساط الزرعية نسبة الى مستعمراتها في السيطرة . اضافة الى المظهر العام للنمو وزيادة حجم الخلايا عن حجمها الاعتيادي في بعض العزلات . يشير ذلك الى امكانية استغلال بعض انواع البكتريا للمضادات الحيوية عندما تكون الاخيرة بتراكيز واطنة جدا , حيث تستفاد منها كعوامل محفزة للنمو لذلك وجب التنبيه بعدم التهون في اهمال الارشاد الطبي عند استعمالها للأغراض العلاجية أو الغير علاجية .
من حزمة المتغيرات في الخواص المظهرية والفسلجية الاخرى والتي تم ملاحظتها , فقد تأثرت الخلايا ايجابا أو سلبا عند تعرضها لتراكيز متدنية غير قاتلة من المضادات الحيوية , لكنها جميعا تشير الى حدوث تغيير حاصل بالنمط العام لدورة حياة الخلية البكتيرية والتي قد ينتج عنها تطور في قابليات هذه الخلايا , مما يفسح المجال لظهور اجيال جديدة من هذه العزلات المرضية قد تكون في غير صالح الانسان , ويتوافق ذلك مع (4 و 12) .

تأثير التراكيز الواطئة من المضادات الحياتية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر ، فيفيان زيا كوركيس ، نيشتمان محمد نجيب

جدول - 1: تأثير التراكيز الواطئة من المضادات الحياتية على نمو بعض انواع البكتريا المرضية الموجبة لصبغة
كرام .

العزلة المرضية	المضاد نمو الحياتي السيطرة	التراكيز (ملغم / مل) 0,5 0,4 0,3 0,2 0,1 0,05 0,04 0,03 0,02 0,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	g Penicillin	g g g g m
	g Erythromycin	w w w w w
	g Cloxacillin	w m g v v - - - -
	g Lincomycin	w w m m g w w w w
	g Cephalosporin	- - - w w w m 4 m w
	g Gentamicin	- - - - - - - -
<i>Staphylococcus albus</i>	g Penicillin	- - - w w m m m m
	g Cloxacillin	- - - - - - - -
	g Cephalosporin	- - - - - w w m m
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	g Penicillin	- - - - - - - -
	g Erythromycin	- - - - - - - -
	g Cephalosporin	- - - - - - - -
	g Chloramphenicol	- - - - - - - -
	g Tetracyclin	- - - - - - - -
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	g Penicillin	- - - - - - w w
	g Gentamicin	- - - - - - - -
	g Tetracyclin	- - - - - - - -

v : نمو جيد جدا

m : نمو متوسط

- : عدم حصول نمو

g : نمو جيد

w : نمو ضعيف

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر، فيفيان زيا كوركيس، نيشتمان محمد نجيب

جدول - 2: تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على نمو بعض انواع البكتريا المرضية السالبة لصبغة
كرام .

التراكيز (ملغم / مل)	المضاد الحيوي	العزلة المرضية
0,5 0,4 0,3 0,2 0,1 0,05 0,04 0,03 0,02 0,01	نمو السيطرة	
g g g g g g g g g g	g Trimethoprim	<i>Escherichia coli</i>
- - - - - - - - - -	g Chloramphenicol	
- - - - - - - - - -	g Gentamicin	
m g v v v v v v v v	g Tetracyclin	
- - - m m g g g g v	g Ampicillin	<i>Proteus vulgaris</i>
- - - - - m m m m v	g Chloramphenicol	
w m g g g g g g g v	g Trimethoprim	
- - - m m g g g g v	g Cephalosporin	
- - - - - - - - - -	g Streptomycin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- - - - - w m g g v	g Tetracyclin	
- - - - - - - - - -	g Gentamicin	
w m g v g w w w w w	g Trimethoprim	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
- - - - - - - - w	g Chloramphenicol	
- - - - - - - - -	g Gentamicin	

- : عدم حصول نمو
m : نمو متوسط
v : نمو جيد جدا
g : نمو جيد
w : نمو ضعيف

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر ، فيفيان زيا كوركيس ، نيشتمان محمد نجيب

جدول - 3: تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على الصفات المظهرية والفسلجية لبعض العزلات
البكتيرية الممرضة للإنسان

العزلة المرضية	المضاد الحيوي	التركيز (ملغم / مل)	نوع التأثير
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cloxacillin	0,1 لغاية 0,5	سالبية لصبغة كرام
	Cephalosporin	0,1 لغاية 0,2	خلايا منفردة
	Penicillin	0,05	خلايا منفردة
<i>Staphylococcus albus</i>	Cephalosporin	0,01 لغاية 0,04	سالبية لصبغة كرام
<i>Escherichia coli</i>	Tetracyclin	0,01 لغاية 0,4	يزداد حجم الخلايا عن معدلاته الاعتيادية نسبة الى عينة السيطرة
<i>Proteus vulgaris</i>	Cephalosporin	0,01 لغاية 0,2	تفقد سلبيتها لصبغة كرام
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tetracyclin	0,05	تفقد الخلايا سلبيتها لصبغة كرام , كما انها تصبح خلايا قصيرة نسبة الى عينة السيطرة
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trimethoprim	0,5	تفقد قدرتها على تكوين العلبه

المصادر

1. Narayana K.J.P. & M. Vijayalakshmi , (2005) : Cultural, physiological and antimicrobial properties of *Streptomyces tanashiensis* MTCC 6277, Ind. J. Microbiol. 45: 161 – 163.
2. Ozgur Ceylan ; Gulden Okmen & Aysel Ugur , (2008) : Isolation of soil Streptomyces as source antibiotic active against antibiotic – resistant bacteria , EurAsian J. of BioSciences , 2 , 73 – 82.
3. Oliviera, D.C. ; Wu, S.W. & de Lencastre , (2000) : Genetic organization of the downstream region of the *mecA* element in MRSA isolates Carrying different polymorphisms of this region , J. AntiMicrobial agents Chemotherapy . 44 : 7, 1906 – 1910.

تأثير التراكيز الواطنة من المضادات الحيوية على بعض الخواص المزرعية
والمظهرية لعزلات من البكتريا المرضية
نزار أدور ناصر، فيفيان زيا كوركيس، نيشتمان محمد نجيب

4. Fu Y. ; Zhu M. ; Xing J. (2000) : Resonant activation a strategy against Bacterial persistence , J. Phys. Biol. 7: 16013.
5. Rachid S. ; Ohlsen K. ; Witte W. ; Hacker J. & Ziebuhr W. (2000): Effect of subinhibitory antibiotic concentration in Polysaccharide intercellular adhesion expression in Biofilm – forming *Staphylococcus epidermidis* . Antimicrob. Agents chemother. , 44 : 3357 – 63.
6. Kavitha & M. Vijayalakshmi (2007) : Studies on Cultural , Physiological and Antimicrobial Activities , j. of Applied Sciences Research , 3(12): 2026 – 2029.
7. Holt,J. ; Krieg,N.R. and Sneath,P.A. " Berge's Manual of Determin- ative Bacteriology " ed. 9th, Edited by Williams and Wilkins, Library of Congress Cataloging, Baltimore, (1994).
- 8- Vandepitte , J. ; Engback,K. ; Piot,P. and Heuck,C.C. " Basic labo-ratory procedures in clinical bacteriology ", WHO, Geneva pp. 78-95 (1991).
9. كوركيس , فيفيان زيا (1986) : دراسة حول بكتريا الخناق لدى المرضى وحاملي الجرثومة في مدينة أربيل , رسالة ماجستير , كلية العلوم / جامعة صلاح الدين .
10. Food Marketing Institute (FMI), (1998) : Emergence of Multidrug – resistant *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* DT 104 infections in U.S. , New England J. of Medicine.
11. Lewis K. (2007) : Persister cells , dormancy and infections disease , Nat. Rev. Microbial , 5 : 48 – 56.
12. Cynara, M.R. ; Ana, I. ; Marcus T. ; Mar co lino ; Ana M. Bonetti & Mal con A.M. Brande – Burgo , (2007) : Public Health : Urban Ants and Transportation of Nosocomial bacteria . Neotropical Entomology 36 (3): 454 – 458.