# دراسة دور بلازميدات بعض العزلات البكتيرية تجاه بعض المضادات الحيوية

**ليث مصلح نجيب**

جامعة الأنبار - كلية العلوم

**معلومات البحث:**
تاريخ التسليم: 2011/9/5
تاريخ القبول: 2011/12/29
تاريخ النشر: 14/ 6 / 2012
DOI: 10.37652/juaps.2011.44262

**الكلمات المفتاحية:**
تحييد بلازميدات ،
*E.coli* ،
*Klebsiella pneumonia* ،
*Raoultcella planticola* .
لمضادات الحيوية.

**الخلاصة:**

تضمنت الدراسة تحييد بلازميدات من خمس عزلات بكتيريه اثنان منها تابعة للجنس E.coli تحمل الأرقام المحلية 1، 2 وعزلة Klebsiella pneumonia وعزلة Raoultcella planticola. واختبار دور هذه البلازميدات في استجابة للمضادات الحيوية ولتحقيق ذلك نميت العزلات في درجات حرارية مختلفة وبأوقات حضن مختلفة للحصول على نسبة قتل تتجاوز 95% نقيت العزلات الباقية ثم باستعمال تقنية DNA Electrophoresis تم الكشف عن حيود البلازميدات بالمقارنة مع الأصلية. اختبرت حساسية العزلات الأصلية والمحيدة تجاه مختلف المضادات الحيوية بطريقة الأقراص فظهرت العزلات المحيّدة أكثر حساسية تجاه المضادات الحيوية وخصوصاً تجاه المضادان Rifampin (RA) و Tobramycin (TOB) حيث ظهرت العزلات المحيدة التابعة لنوع E. coli ذات الأرقام المحلية 1، 2 حساسة بمعدل تثبيط 8، 8.3 ملم على التوالي وذات الرقم 3 حساسة تجاه المضاد RA بمعدل تثبيط 9 ملم في حين لم تكن العزلات الأصلية حساسة لهذه المضادات.

**المقدمة**

تعد مقاومة المضادات الحيوية من قبل بعض الأحياء المجهرية مؤشراً خطيراً على صحة الإنسان لاسيما تأثيرها المباشر في زيادة نسبة الإصابات وانتشار المرض وبالتالي زيادة معدل الوفيات إضافة إلى زيادة تكاليف صناعة المضادات الحيوية (1، 2). وان من بين أهم أنواع الأحياء المجهرية التي قد تضهر مثل هذه المقاومه هذه المقاومة هي البكتريا السالبة لصبغة كرام وخصوصاً ال E.coli لما لها من خاصية فسلجية ضمن تركيب جدارها الخلوي الذي يسمح بشكل أو بآخر تبادل بعضاً من المحتوى الوراثي وخصوصاً البلازميدات مع الأنواع الأخرى علاوة على انتشارها الواسع وأنواعها المختلفة المسببة لمختلف الإصابات المتمثلة بالحالات المرضية (3) وتلف الأغذية (4) وعلى النطاق نفسه في مجال الدراسات المختلفة وخصوصاً الدراسات المتخصصة في مجال التلاعب بالجينات (5) وهذا ربما يعود إلى الأنواع المصلية العديدة ذات القدرات الايضية المختلفة لهذه البكتريا (6) والذي يساعد في ذلك التركيب الجيني وخصوصاً المكتسب المتمثل بالبلازميدات والتي تكون مسؤولة عن الكثير من الصفات الخاصة بصناعة الأنزيمات خصوصاً ما بعد عملية الترجمة والتصدير (7).

* Corresponding author at: Anbar University - College of Science, Iraq;
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5859-6212 .Mobil:777777
E-mail address:

أوضح (8) ان الجين المسؤول عن إنتاج عوامل الضراوه Colin, وProtease في العزلة E.coli يقعان على البلازميد ECOR1. وأشار (9) ان سبب مقاومة البكتريا المعزولة من المجاري البوليـة تجـاه المضـادات Tetracyclin و Sulphonamide و Streptomycin يعود إلى امتلاكها بلازميد بحجم 8.4 كيلو زوج قاعده.

ذكر (10) ان فقدان عزلة E.coli المعزولة من المجاري البولية للبلازميدات أدى إلى اكتسابها صفه الحساسيه حساسيتها تجاه المضاد Cephamycin في حين بقيت مقاومة لجميع مضادات ß-lactum كون الصفة غير محمولة على البلازميد. بين (11) ان الجين المسؤول عن صفة المقاومة لمختلف مضادات الحيوية خصوصاً Amoxicillin للعزلة E.coli كانت محمولة ضمن البلازميد المحيّد وان فقدانه أدى إلى فقدان جميع الصفات المظهرية المرتبطة به.

**المواد وطرائق العمل**

1. العزل والتشخيص: تم الحصول على خمسة عزلات بكتيرية من مختبرات كلية العلوم/ جامعة الأنبار تضمنت عزلتان E.coli وعزلة واحدة لكل من Klebsiella pneumonia والعزلة

البكتيريه(Klebsiella planticola) planticola Raoultella . تم التأكد من عائديتها بدراسة بعضاً من خواصها الزرعية والمجهريه على وسط Nuterient agar و Macconkey agar هذا بالإضافة إلى تصبيغها بملون كرام إضافة إلى بعض الاختبارات الكيموحيويه اضافة الى اختبار API20ES.

2. تحديد الموقع الوراثي المسؤول عن مقاومة العزلات للمضادات الحيوية: حييّدت البلازميدات باستعمال الطريقة الموصوفة في (11) المحورة وكالاتي:

- حضر وسط Nuteriant broth ووزع في أنابيب متجانسة وبواقع 5 مل في كل أنبوبة ثم عقم بالموصدة.
- لقحت الأنابيب من المزروع المنشط والمحضر مسبقاً والخاص بالعزلات قيد الدراسة.
- حضنت الأنابيب بسلسلة من الدرجات الحرارية (40– 60) مْ ولفترات زمنية مختلفة(30,25,20,15,10)دقيقه.
- حسب العدد الكمي على وسط المرق المغذي لكل درجة حرارة مستعملة وكل فترة زمنية.
- نقيت العزلات النامية عدة مرات والخاصة بالمعاملة الحرارية التي أعطت نسبة قتل تتجاوز 95% والتي ظهرت بشكل رؤوس الدبابيس على أطباق المرق المغذي وحفظت في الموائل ولغاية الاختبارات اللاحقة.

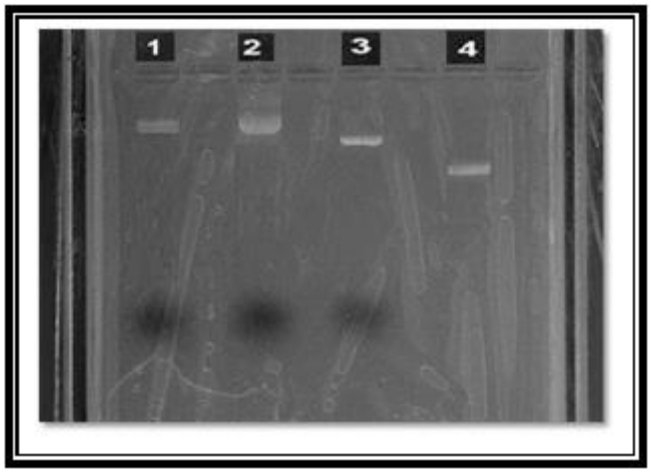
3. الترحيل الكهربائي للمادة الوراثية: تم الكشف عن وجود أو فقدان البلازميدات من خلال استعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis DNA وحسب الطريقة الموصوفة في (12).

4. اختبار الحساسية تجاه المضادات الحيوية: اختبرت حساسية العزلات الأصلية (قبل التحيد) والعزلات المحيّدة تجاه مضادات حيوية مختلفة تضمنت Tobramycin (TOB) و Rifampin (RA) و Ampicillin (A) و Nitrofurantion (F) و Nalidixic (NA) و Doxycycline (DO) و Gentamycin (GN) و Siprofloxacin (SP) وذلك بطريقة الانتشار حول الأقراص Disk Diffusion Method (13).

5. التحليل الإحصائي: تم تحليل بيانات التجربة باستعمال التصميم العشوائي الكامل (Complete Randomized Design) لتحديد المعاملات في الصفات المدروسة واستعمال اصغر فرق معنوي Least Significant Differences بين متوسطات المعاملات المختلفة لمعرفة الفروقات المعنوية.

**النتائج والمناقشة**

الترحيل الكهربائي للمادة الوراثية: أدى استعمال الحرارة (58) مْ لمدة 20 دقيقة إلى فقدان البكتريا قيد الدراسة لبلازميداتها (صورة 1).




صورة (1) الترحيل الكهربائي للماده الوراثيه للعزلات الاصليه (المشار لها بالأرقام) والمعرضه للحراره

اوضح (14) إن السبب لفقدان العزلات لبلازميداتها يعود إلى ان للحرارة تأثير مباشر على الجدار الخلوي للبكتريا وخصوصاً العزلات السالبة لصبغة كرام حيث تعمل الحرارة على إذابة بعض مكونات الطبقة الغشاء Outer membrane مما يؤدي إلى السماح للبلازميدات بالهروب خارج الخلية ،وبين (15) ان معاملة الخلايا المايكروبية بمحلول بول الإبل يؤدي إلى تمزق جدران الخلايا المايكروبية وبالاتجاه نفسه أوضح (13) أن فقدان الخلايا المايكروبية لبلازميداتها يجعلها أكثر حساسية تجاه المضادات الحيوية.

– اختبار حساسية العزلات الأصلية والمحيدة للمضادات الحيوية:

اختبرت حساسية العزلات الأصلية والمحيدة قيد الدراسة تجاه 8 مضادات حيوية هي:

Tobramycin و Rifampin و Ampicillin و Nitrofurantion و Nalidixic و Doxycycline و Gentamycin و Siprofloxacin . أظهرت النتائج أن هناك فرق معنوي عالي في استجابة العزلات المختلفة الأصلية والمحيدة تجاه المضادات الحيوية المختلفة فكانت اغلب العزلات حساسة تجاه المضاد الحيوي SP وبمعدل عام 11.5 مْ

وكانت أعلى استجابة من قبل العزلة E.coli ذات الرقم المحلي 3 ويليه المضاد CN وبمعدل عام 11 مْ في حين لم تظهر أي عزلة حساسية تجاه المضاد AMP. من جانب آخر أظهر التحليل الإحصائي ان لحيود بعض العزلات تأثير معنوي وخصوصاً تجاه المضاد RA للعزلتان E.coli ذات الرقم المحلي 1 و3 حيث لم تُظهر العزلة الأصلية استجابة لذلك المضاد في حين أظهرت العزلة المحيدة استجابة بمقدار 8 ملم و9 ملم على التوالي أما تجاه المضاد TOB فقد أظهرت العزلة E.coli ذات الرقم المحلي 1 المحيدة استجابة واضحة 8.3 ملم بالمقارنة مع الأصلية (صفر) وهي مشابهة لاستجابة العزلة E.coli ذات الرقم المحلي 3 تجاه المضاد NA بالمقارنة مع الأصلية أما العزلة Klebsiella pneumonia الأصلية فقد تباينت في مقاومتها تجاه المضادات الحيوية بالمقارنة مع الأصلية وكانت واضحة تجاه المضاد F و NA (جدول 1).

جدول (1) تأثير المضادات الحيويه المختلفه في تثبيط نمو (ملم) لبعض العزلات البكتيريه قبل وبعد تحييدالبلازميدات

| العزلة | نوع المضاد | | | | | | | | المعدل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CN. | SP. | AMP | NA. | F. | DO. | RA. | TOB. | |
| *Klebsiellu pneumonia* | 14.3 | 20 | - | 17 | 17 | 12.3 | - | 14 | 11.825 |
| *Klebsiellu pneumonia* المحيدة | 16 | 20.6 | - | 15.3 | 12.6 | 12.3 | - | 14 | 11.363 |
| E. coli 1 | 9.3 | - | - | - | 14 | - | - | - | 2.913 |
| E. coli 1 المحيدة | 10.3 | - | - | - | 14.3 | - | 8 | 8.3 | 5.113 |
| E. coli 2 | 8 | - | - | - | 13 | - | 8 | 6 | 4.375 |
| E. coli 2 المحيدة | 10 | - | - | - | 14 | - | 9 | 7.3 | 5.037 |
| *Raoultella planticola* | 16 | 21 | - | 17.3 | 11 | 14 | - | 14.3 | 11.7 |
| *Raoultella planticola* المحيدة | 16 | 21 | - | 18 | 11 | 14 | - | 14.6 | 11.825 |
| E. coli 3 | 10 | 22 | - | - | - | 14.3 | - | 14 | 7.538 |
| E. coli 3 المحيدة | 10 | 22 | - | 9.3 | - | 14.3 | 9 | 14 | 9.825 |
| المعدل | 11.99 | 12.66 | | 7.69 | 10.69 | 8.12 | 3.4 | 10.65 | |

LSD للعزلات= 0.25. للمضادات= 0.21. للعزلات + المضادات= 0.7.

تتفق نتائج الدراسة مع ما وجده (15) من ان جميع العزلات قيد الدراسة كانت مقاومة للمضاد Ampicillin و Amicacin وفسر ذلك إلى ارتباطهما في مجموعة ß-lactimas ومع ما وجده (16) الذي أوضح ان هناك تباين في استجابة العزلات المعزولة والمسببة لالتهاب المجاري البولية تجاه المضادات الحيوية؛ من جانب آخر فان زيادة حساسية العزلات المحيّدة بالمقارنة مع الأصلية ناتج من الفقدان الفيزياوي للبلازميد الحامل للجينات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية فظهرت العزلات المحيّدة حساسة وبفرق معنوي لأغلب المضادات المستعملة وخصوصاً العزلة E.coli ذات الرقم المحلي 1، 3 تجاه المضاد (TOB, RA)؛ فسّر (17) ذلك إلى ارتباط وجود البلازميدات بالحساسية تجاه المضاد (RA) وإنتاج أنزيم البنسلينيز وان فقدان هذه الصفة ناتج من فقدان البلازميد الحامل لهذه الصفة؛ بين (18) ان السبب الرئيسي في الحساسية للمضادات الحيوية ناتج من تثبيط إنتاج البروتينات المختلفة الضرورية لديمومة الكائن الحي وان طرق المقاومة لهذه المضادات ناتج من الوسائل اللازمة لمنع هذه المضادات الحيوية من العمل ومنها الأنزيمات اللازمة لهدم هذه المضادات وأن شفرات بعضها محمول على البلازميد؛ وبالاتجاه نفسه بين (10) ان السبب في ان تصبح E.coli حساسة للمضاد Cephamycin وغير حساسة لمجموعة مضادات ß- lactimas كون الصفة الأولى محمولة على البلازميد والثانية غير محمولة على البلازميد وبالتالي فان فقدان البلازميد كان السبب في ذلك.

**المصادر:**

1. الطائي، هيام عادل. (2000). مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية وإنتاج أنزيمات بيتا لاكتميز. مجلة الدواء العربي، (2): 15– 16.
2. الحسن، يس والخليل، عبد الله. (1988). المايكروبات تعيد الهجمة. مجلة العلوم والتقنية. (5): 17– 20.

3. Kennan, R.; Soderlind, O. and Conway, P. (1995). Presence F107, 213 P and AV24 fimbriae strains of E. coli isolated from Swedish piglets with diarrhea. Vet. Microbiol., 2: 123- 129.
4. Law, D. (2000). Virulence factor of Escherichia coli O157 and other shiga toxin- producing E.coli. J. Appl. Microbiol., 88: 729- 745.
5. الخفاجي، زهرة محمود. (2008). التقنية الحيوية المايكروبية (توجهات جزيئية). معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا/ جامعة بغداد– وزارة التعليم العالي والبحث العلمي– العراق.
6. Padhye, N. V. and Doyle, M. P. (1992). Escherichia coli O157: H7: Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. J. Food Prot., 55: 555- 565.
7. Dovgherty, B. A.; Hill, C.; Weldman, J. F. and Ross, R. P. (1998). Sequence and analysis of the 60 Kb conjugative, Bacteriocin- producing plasmid PMRCOL from *Lactococcus lacts* DPC 3147. Molecular Microbiol., 29: 1024- 1038.
8. Otto, B.; Silvy, T. M.; Van Dooran, T. and Nuijens, H. (2000). Characterization of a heamoglobin protease secreted by the pathogenic *E.coli* strain E /3/.
9. Ojo, Kayode, K.; Corinna Kehreberg, H. and Stefan Schwarz, T. (2003). Structural analysis of the tetracycline resistance gene region of a small Multiresistance plasmid from uropathogenic isolated in Nigeria.
10. Daini, O. A. and Adesemowo, A. (2008). Antimicrobial susceptibility patterens and R-plasmids of clinical strains of *E.coli*. Australian J. of Basic and Appl. Sci., 2 (3): 397- 400.
11. Livermore, O. M.; Lanton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmannp; Rossolin, G. M. and Arlet, G. (2007). Changing the face of ESBLS in Europe. J. Antimicrobial. Chemother., 59: 165- 174.
12. التميمي، وليد خالد. (2010). دور بعض رواشح العصيات اللبنية (Lactobacillus) في تثبيط نمو الخلايا السرطانية. رسالة ماجستير. كلية العلوم– جامعة الأنبار.
13. شعيب، عالية عبد الباقي وعائشة محمد علي باحاذق. (2007). تأثير بول الإبل على عزلات ممرضة من *E.coli* و*P.aeruginosa* جهة احتفاظها لمقاومة المضادات الحيوية ووجود البلازميدات. المجلة السعودية للعلوم البايلوجية. 14 (2): 177– 184.
14. نجيب، ليث مصلح. (2007). دراسة إنتاج وتنقية البكتريوسينات من بكتريا حامض اللبنيك وتحديد بعض خواصه. أطروحة دكتوراه. قسم علوم الحياة– كلية العلوم– جامعة الأنبار.
15. شعيب، عالية عبد الباقي وعائشة محمد علي باحاذق. (2007). دراسة الكترومايكروسكوبية لتأثير بول الإبل على الشكل المورفولوجي لبعض أجناس البكتيرات الممرضة للإنسان، مقارنة بالمضاد الحيوي Cefuroxime. المجلة السعودية للعلوم البايلوجية. 15 (3): 119– 125.
16. Harnett, N.; Mangan, L.; Brown, S. and Krishnan, C. (1996). The rmosensitiv transfer of antimicrobial resistances and citrate utilization and cotransfer of hydrogen sulfide. Micr. and Infec. Dis., 24 (4): 173- 178.
17. Johnson, T. J.; Johnson, S. J. and Nolan, L. K. (2006). Complete DNA sequence of a col BM plasmid from Avian pathogenic *E. coli* sajjest that it evolved from closely related col V. J. of Bact. 188 (16): 5975- 5983.
18. الجبوري، محيميد مد الله. (1990). علم البكتريا الطبية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي– جامعة بغداد.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2011 ,( 5), ( 3 ) :01-05

# STUDY THE ROLE OF PLASMIDS OF SOME BACTERIAL ISOLATES TO SOME ANTIBIOTICS.

**LAITH M. NAJEEB**

ABSTRACT:

Thes study involved bacterial curing plasmids of four isolates, three isolates belonging to the genus E.coli with local numbers 1, 2 and one to Klebsiella pneumonia and isolation Raoultcella planticola (Klebsiella planticola) . the study includ test the role of these plasmids in the response of isolates to various antibiotics and to achieve the grown isolates at differant temperatures different incubation periods until killing ratio of 95% these bacteria scrubbed isolates remaining, then the use of technology DNA Electrophoresis was detected diffraction plasmids compared with the original; way drive tested the sensitivity of the original isolates and neutralized to various antibiotics neutralized isolates appeared more sensitive to antibiotics, especially towards Relenza Rifampin (RA) and Tobramycin (TOB), where isolates curing emerged of the type E. coli with local numbers 1.2 sensitive to inhibition at 8, 8.3 mm, respectively, with the number 3 is sensitive to anti-RA inhibition rate of 9 mm, while the original isolates were not sensitive to these antibiotics.