Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from fish to some antibiotics

حساسية بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الأسماك لبعض المضادات الحياتية

صباح مالك حبيب الشطي شيماء ذياب جدوع السهلاني علاء كريم نعيمة الخزاعي قسم علوم الأغذية والتقانات الإحيائية – كلية الزراعة – جامعة البصرة - البصرة – العراق.

الخلاصة

جمعت ٢٥سمكة من أسماك الصبور *Tenualosa ilisha* خلال شهر أيلول ٢٠٠٨ وعزلت من غلاصم هذه الأسماك كل من بكتريا *Staphylococcus aureus* وبكتريا *E. coli* بعد أن نميت على أوساط زرعيه متخصصة وشخص النوع الأول وفقا للصفات المظهرية وفحص الكواكيوليز في حين شخص النوع الثاني وفقا" للصفات المظهرية والاختبارات الكيماحيوية (فحوصات IMViC) وتم اختبار حساسيتها لعدد من المضادات الحياتية بلغت ١٨ نوعاً .

وقد أسفرت نتائج الدراسة على الأوساط الصلبة بيان حساسية بكتريا *Staph. aureus* تجاه كل من المضادات الحياتية جينتاميسين CN وسبروفلوكساسين CIP إذ أعطت هالة تثبيط كبيرة بلغت ٢٩ ،٢٨.٥ ملم على التوالي ولم تظهر البكتريا أية حساسية تجاه كل من المضادات ستربتومكسين S ،حامض النلدكسك NA، ارثرومايسين E، مثيسلين ME ،كنامايسين K ،سباير امايسينSP ،كلوكساسلينCX، روكسيثرومايسين ROX، كلورامفنيكول C،سيفاماندول MA، كاربنسلين PY،امبيسلين AMو فانكومايسين VA. أما نسبة التثبيط للبكتريا في الأوساط السائلة فقد بلغت أعلى نسبة تثبيط لبكتريا *Staph. aureus* (٩٢.٥٩،84.1،٦٣.١)% لكل من جينتاميسينCN وسبروفلوكساسينCIP وبيبراسلين PRL على التوالي في حين بلغت اقل نسبة تثبيط (٤.٠٦، ٥.١٢ ،١٤.٣١) % للمضادات امبيسلين AM و كلوكساسلينCX و كاربنسلينPY على التوالي.

أما حساسية بكتريا *E. coli* فقد تبين من النتائج على الأوساط الصلبة أن المضادات موكسيفلوكساسين MXF و ازيثرومايسين AZM كانت أكثر المضادات تأثيرا اذ بلغت أقطار التثبيط ٢٨.٥ ، ٢٥.٥ ملم على التوالي في حين أعطى المضاد PY تأثيرا قليلا اذ بلغ قطر التثبيط ٧ ملم ولم تظهر البكتيريا أية حساسية تجاه كل من المضادات AM,MA,CX,NA,ME,S و VA ، وتبين من النتائج على الأوساط السائلة أن أعلى نسبة تثبيط بلغت (٩٦.١ ،٨٣.٧، ٧٩.٠٠)% لكل من AZM,MXF و CIPعلى التوالي في حين كانت اقل نسب تثبيط (٣.٧،٥.٠٦، ٨.٣)% لكل من AMوCX وME على التوالي.

خلصت الدراسة إلى تبيان أن أفضل المضادات الحياتية تأثيرا على البكتريا المدروسة *Staph. aureus* و *E. coli* هي CNو CIP و MXF في حين لم تثبت جدوى كل من المضادات VA وNA و MEو MA وAM و CX عند استعمالها.

Abstract

Twenty five *Tenualosa ilisha* fish were collected during September,2008. *Staph. aureus* and *E. coli* were isolated from gills of these fishes after they had grown on specific culture media. *Staph. aureus* was identified according to the morphological characteristics and coagulase test, whereas *E. coli* identified according to the morphological characteristics and IMViC tests, then the antibiotic susceptibility test was done against 18 antibiotics.

The results showed that the inhibiting zones were 29,28.5 mm for Gentamicin CN and Ciprofloxacin CIP against *Staph. aureus* . Ampicillin AM, Carbenicillin PY, Cefamandole MA, Chloramphenicol C, Roxithromycin ROX, Cloxacillin CX, Spiramycin SP, Kanamycin K, Methicillin ME, Erythromycin E, Nalidixic acid NA, Streptomycin S and Vancomycin VA didn't show any activity towords this bacterium . The highest inhibition percentage of *Staph. aureus* in broth were (92.59, 84.1,63.1)% for Gentamicin CN, Ciprofloxacin CIP and Piperacillin PRL respectively ,whereas the lowest inhibition percentage were (4.06,5.12,14.31)% for antibiotic Ampicillin AM, Cloxacillin CX and Carbenicillin PY respectively.

E. coli were sensitive to Moxifloxacin MXF and Azithromycin AZM ; inhibiting zones were 28.5,25.5 mm respectively, while the antibiotic PY showed less activity, (7mm) whereas the S, ME ,NA,CX,MA,AM and VA had no effect on the bacterium .The highest inhibition percentage were (96.1,83.7,79)% for MXF,AZM,and CIP respectively whereas the lowest inhibition percentage were (3.7, 5.06,8.3)% for AM,CX and ME respectively.

The study concluded that the best antibiotic which showed activity to wards *Staph. aureus* and *E. coli* were CN,CIP and MXF while the antibiotics VA,NA,ME,MA,AM,AM and CX didn't show any activity when they were used.

Key words: *Tenualosa ilisha* , antibiotic resistance, *E. coli* , *Staph. aureus*

المقدمة

تستخدم المضادات الحياتية بشكل واسع في الطب البشري والبيطري فضلا عن استخدامها في علائق الحيوانات كل ذلك أدى إلى ظهور سلالات مختلفة من البكتريا ذات مقاومة للمضادات الحياتية وخصوصا البكتريا السالبة لصبغة كرام (3,2,1).

وان لمقاومة المايكروبات المرضية للمضادات الحياتية أهمية كبيرة في الطب(٤). والمضادات الحياتية عبارة عن منتجات مايكروبية ذات أوزان جزيئية واطئه وتعتبر من المنتجات الايضية الثانوية Secondary metabolites وتتداخل مع نمو الإحياء المجهرية وتقضي عليها عند وجودها بكميات قليلة،وليس لها دور في نمو وإدامة الخلية الحية التي تقوم بإنتاجها وتنتج عادة في نهاية فترة النمو وعندما تدخل الخلية في المراحل الأخيرة من دورة حياتها(٥).

وقد درست حساسية البكتريا المرضية المعزولة من اللحوم والأسماك للمضادات الحياتية بشكل واسع ومنها بكتريا *Vibrio* و *Aeromonas* (9,8,7,6) وبكتريا *E. coli* 0157:H7 المعزولة من الأسماك و الأنهار (10).

وقد جرت دراسات عديدة حول استعمال المضادات الحياتية كعلاج للقضاء على المايكروبات المسببة لإمراض الأسماك (14,13,12,11).

إضافة إلى دراسة محلية أجريت على اسماك الكارب استخدمت فيها ٥ مضادات حياتية ضد ١٠ عزلات من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام المسببة لإمراض الأسماك(١٥).

أن مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية قد تسبب خسائر اقتصادية كبيرة وأصبحت المضادات غير كفوءة في معالجة إمراض كثيرة ، ونظرا لأهمية كل من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* كونها البكتريا المسببة للتسمم الغذائي الستافيلي وبكتريا القولون البرازية *E. coli* كونها تعطي دليلاً على إمكانية تواجد مايكروبات مرضية أجريت هذه الدراسة لتحديد مدى مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحياتية المستخدمة ولمعرفة المقاومة المتعددة الأنماط للمضادات الحياتية على هذه البكتريا.

المواد وطرائق العمل

العينات

عزلت البكتريا من غلاصم ٢٥ سمكة من اسماك الصبور(Hamilton) *Tenualosa ilisha* التي جمعت من السوق المحلية لمدينة البصرة باستعمال المسحات القطنية خلال شهر أيلول إذ جمعت العينات في صندوق من الفلين وخلطت مع مجروش الثلج (4)مْ وحال وصولها إلى المختبر خلال ساعتين اجري العزل ونميت على أوساط زرعية متخصصة.

الأوساط الزرعية

استخدمت الأوساط الزرعية التالية

Mueller Hinton Agar, Mueller Hinton Broth, MacConkey Agar, المجهزة من شركة Oxoid الانكليزية ووسط Staphylococcus No.110. ، Brain Heart Infusion broth المجهزان من شركة Hi media الهندية .

المضادات الحياتية

استخدمت ١٨ نوعاً من المضادات الحياتية المجهزة من شركة Bioanalyse^{R} التركية وحسب الجدول التالي

جدول (١) أنواع المضادات المستخدمة في الدراسة

اسم المضاد	رمز المضاد	كمية المضاد(mg)
Ampicillin	AM	١٠
Azithromycin	AZM	١٥
Carbenicillin	PY	١٠٠
Cefamandole	MA	٣٠
Cloxacillin	CX	١
Chloramphenicol	C	٣٠
Ciprofloxacin	CIP	٥
Erythromycin	E	١٥
Gentamicin	CN	١٠
Kanamycin	K	٣٠
Methicillin	ME	٥
Moxifloxacin	MXF	٥
Nalidixic acid	NA	٣٠
Piperacillin	PRL	١٠٠
Roxithromycin	ROX	٣٠
Spiramycin	SP	١٠٠
Streptomycin	S	١٠
Vancomycin	VA	٣٠

عزل البكتريا

تم العزل على أوساط تفريقية واستعملت الاختبارات البايوكيميائية في التشخيص بعد إن زرعت بكتريا *Staph. aureus* على وسط Staphylococcus No.110 وحضنت على ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة وبعدها أخذت المستعمرات الذهبية النامية ،أجريت لها الفحوصات المظهرية و البايوكيميائية ، وتضمنت هذه الفحوصات ، التصبيغ بصبغة كرام لون وشكل المستعمرات واختبار الكواكيوليز Coagulase بعد أن تم تنشيطها في وسط Brain Heart Infusion broth ولوحظ حدوث التخثر أو التكتل واختبارالكاتليز وتخمر الكلوكوز والمانتول (17,16).

أما بكتريا *E. coli* فقد عزلت على الوسط MacConkey Agar وحضنت على درجة ٤٤.٥ مْ لمدة ٢٤-٤٨ ساعة وبعدها التقطت المستعمرات الحمراء وأجريت عليها الفحوصات المظهرية و البايوكيميائية وتضمت هذه الفحوصات ، التصبيغ بصبغة كرام ،لون وشكل المستعمرات واختبار الكواكيوليز وفحوصات IMViC (الاندول، المثيل الأحمر، فوكس بروسكاور، استهلاك السترات) (19,18,16) .

فحص الحساسية:-

نشطت البكتريا المعزولة على وسط Mueller Hinton Broth وحضنت بدرجة ٣٧ مْ لمدة ١٨ ساعة وحسبت إعداد البكتريا في حجم اللقاح باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer إذ كانت ٢٨ × $١٠^{٧}$وحدة تكوين مستعمرة/مل لبكتريا *Staph. aureus* في حين كان حجم اللقاح البكتيري ٥٢× $١٠^{٦}$ وحدة تكوين مستعمرة/مل لبكتريا *E. coli* . وقد قيست أقطار التثبيط للمضادات على الأوساط الصلبة إذ اتبعت طريقة باور وجماعته (15) لبيان حساسية البكتريا للمضادات الحياتية حيث نشر ٠.١ مل من البكتريا المنشطة على الوسطMueller Hinton Agar ثم وضعت أقراص المضادات الحياتية على سطح الطبق وبواقع ٦ أقراص لكل طبق وحضنت الإطباق بدرجة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم قيست أقطار هالة التثبيط وقورنت مع الهيئة العالمية لإرساء جودة المختبرات الطبيةNCCLS (٢١) .

أما نسب التثبيط في الأوساط السائلة تم احتسابها من خلال اخذ ٠.٠٥ مل من اللقاح البكتيري وأضيفت إلى وسط Mueller Hinton Broth وأضيفت المضادات الحيوية وحضنت الأنابيب بدرجة ٣٧ مْ ولمدة ١٨ ساعة ثم قيست كثافة النمو بالمطياف الضوئي على طول موجي مقداره ٦٠٠ نانوميتر وبوجود عينة سيطرة control وحسبت نسبة التثبيط وفقاً للمعادلة التالية: (٢٢)

$$\text{نسبة التثبيط}(\%) = \frac{١٠٠ \text{ (قياس المطياف لعينة السيطرة – قياس المطياف لعينة الاختبار)}}{\text{قياس المطياف لعينة السيطرة}}$$

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (٢) نتائج الفحوصات البايوكيميائية التأكيدية لكل من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staph. aureus* وبكتريا القولون *E. coli* .

جدول(٢) نتائج الفحوصات البايوكيميائية وأوصاف المستعمرات النامية

البكتريا	اللون والشكل	تصبيغ كرام	الفحوصات البايوكميائية					
			الكوكيوليز	الكاتليز	تخمر الكلوكوز	تخمر المانيتول		
Staph. aureus	ذهبية عشعنقودية	G^+	+	+	+	+		
			لون البكتريا علىL-EMB	النمو بدرجة ٤٤.٥ مْ	فحوصات IMViC			
					الاندو ل	المثيل الأحمر	فوكس بروسكاو ر	استهلاك السترات
E. coli	حمراء عصوية	G^-	مستعمرات مرتفعة ذات لون معدني لماع	+	+	+	-	-

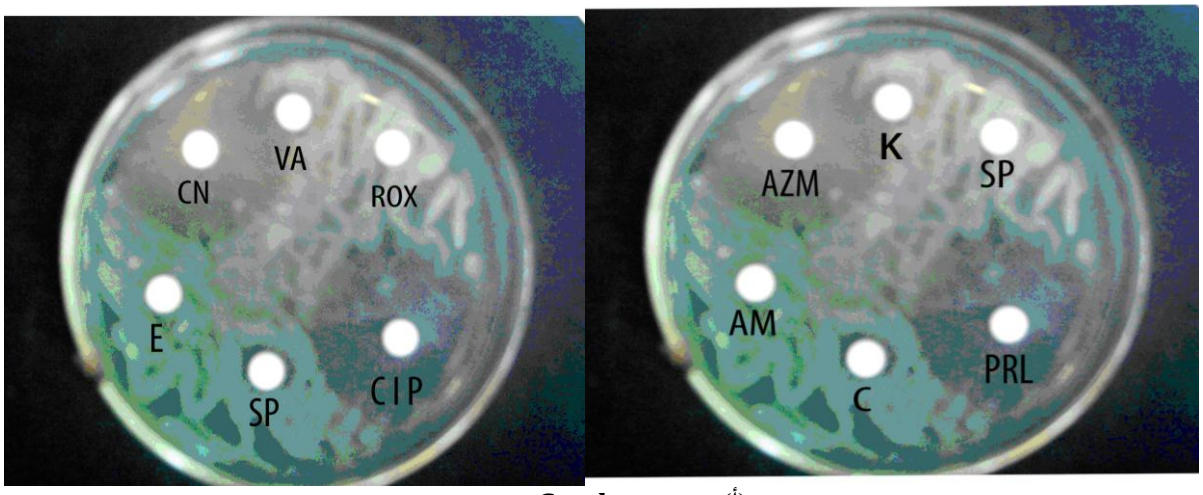
أما الجدول (٣) وشكل (١) يبين قطر التثبيط للمضادات الحيوية المستعملة حيث أظهرت النتائج أن حساسية كل من المضادات الحياتية(CN) Gentamicin و(CIP)Ciprofloxacin إذ أعطت هالة تثبيط كبيرة وكانت واضحة بلغت ٢٩ ،٢٨.٥ ملم على التوالي لبكتريا *Staph.aureus* يليها كل من المضادات Piperacillin (PRL) و Moxifloxacin (MXF) و(AZM)Azithromycin حيث كانت أقطار هالة التثبيط ٢٥ ،٢٥، ٢١ ملم على التوالي في حين لم تظهر بقية المضادات AM,PY,MA,C,ROX,CX,SP,K,ME,E,NA,S,VA أي حساسية ضد هذه البكتريا.

أما حساسية المضادات الحياتية لبكتريا *E. coli* فيبين الجدول (٣) إن هنالك ست مضادات حياتية قد كانت حساسة تجاه هذه البكتريا إذ كان قطر هالة التثبيط لكل من المضادات MXF PRL,CN,C,CIP,AZM, بحدود ٢٨.٥ ،٢٥.٥، ٢٣.٥، ٢١.٥، ٢١، ٢٠ ملم على التوالي في حين كانت كل من المضادات K وSP متوسطة المقاومة إذ بلغت أقطار هالة التثبيط ١٥.٥ ، ١٢ ملم على التوالي ولم توثر بقية المضادات على نمو بكتريا *E. coli* وقد يرجع سبب المقاومة للاستعمال غير الملائم المفرط والسيئ للمضادات الحياتية الذي يؤدي إلى تطوير البكتريا لآليات المقاومة للمضادات مما يؤدي إلى ظهور سلالات مقاومة من البكتيريا.وتجدر الإشارة إلى إن وجود بكتريا *Staph. aureus* في الغلاصم دلالة على التلوث الحاصل خلال عمليات التداول والنقل في حين وجود بكتريا *E. coli* في الغلاصم يعطي دلالة أكيدة على التلوث من مصادر برازية واحتمالية وجود مايكروبات مرضية معها (٢٣) .

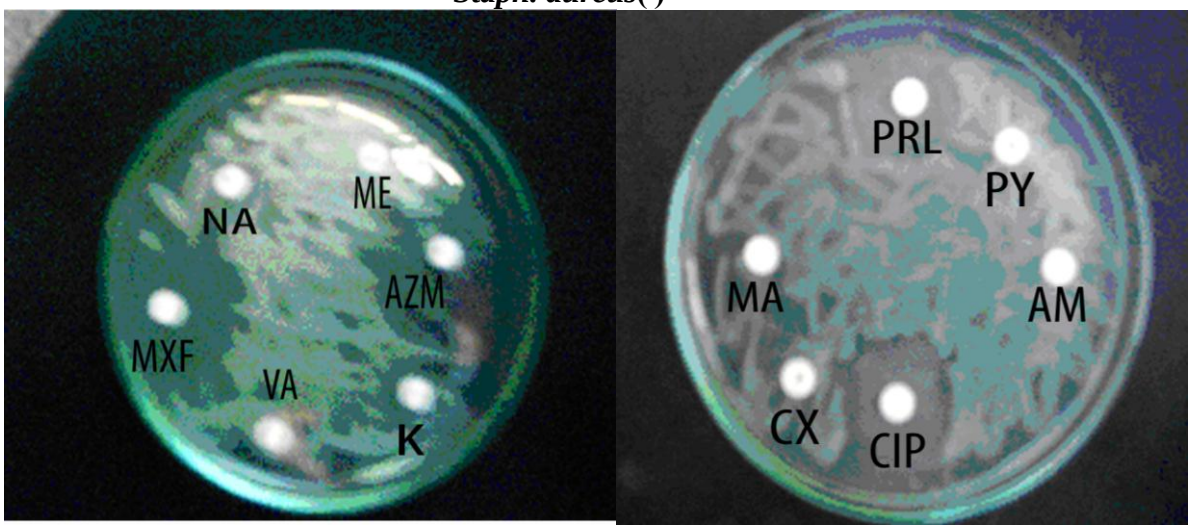
جدول(٣) إبعاد قطر التثبيط للمضادات الحياتية تجاه بكتريا *Staph. aureus* و *E. coli* على الأوساط الصلبة

رمز المضاد الحيوي	قطر التثبيط (ملم) لبكتريا *Staph. aureus*	قطر التثبيط (ملم) لبكتريا *E. coli*
AM	R _	R _
AZM	S٢١	S٢٥.٥
PY	R _	R٧
MA	R _	R _
CX	R _	R _
C	I١١	S٢١.٥
CIP	S ٢٨.٥	S٢٣.٥
E	R _	R١٠
CN	S٢٩	S٢١
K	I١٣.٥	I١٥.٥
ME	R _	R _
MXF	S٢٥	S٢٨.٥
NA	R _	R _
PRL	S٢٥	S٢٠
ROX	R١٠	R١٠.٥
SP	I١٣	I١٢
S	R٩	R _
VA	R _	R _

- **لقراءة تمثل المعدل لثلاث مكررات.**
- **- عدم وجود منطقة تثبيط.**
- **R: مقاومة ، S : حساسة ، I :متوسطة المقاومة**



***Staph. aureus*(أ)**



***E. coli* (ب)**

شكل(١) صور قطر التثبيط للمضادات الحياتية تجاه بكتريا (أ) *Staph. aureus* و (ب) *E. coli* على الأوساط الصلبة

ويظهر الجدول (٤) النسبة المئوية للتثبيط لبكتريا *Staph. aureus* في الأوساط السائلة ومقدار التركيز المستعمل في كل مضاد حيوي، وقد أظهرت نتائج الجدول أن كل من المضاد CN ، CIP ، PRL ، MXF ، AZM قد أعطت نسب متفاوتة اذ كانت ٩٢.٥٩ %، ٨٤.١ %، ٦٣.١ %، ٥٧.٧ %، ٥٥.٠٥ % على التوالي .

أما النسب المئوية لتثبيط بكتريا *E. coli* ، فقد بلغت لكل من المضادات الحياتية MXF ، AZM ، CIP ، C ، CN ، PRL بحدود ٩٦.١%، ٨٣.٧%، ٧٩ %، ٦٠.١ %، ٥٦.١ %، ٥٩.٧ % على التوالي .

وقد جاءت نتائج هذا الجدول متوافقة مع نتائج التثبيط على الأوساط الصلبة وان صفة مقاومة المضادات الحياتية قد تكون مورثة أي أنها محمولة على كروموسومات البكتريا ويتم انتقالها بين الأجيال المختلفة بالوراثة أو أنها مكتسبة تنتقل من خلال قطع DNA خارج الكروموسومات المسماة البلازميدات والتي تنتقل من بكتريا إلى أخرى بعملية الاقتران Conjucation(٢٤، ٢٥).

وأخيرا يتضح من خلاصة نتائج الدراسة إن كل من المضادات الحياتية جينتاميسين CN ، سبروفلوكساسين CIP ،بيبراسلين PRL ،موكسيفلوكساسين MXF ،ازيثرومايسين AZM كانت مؤثرة وذات فعالية تجاه البكتريا المرضية وبالتالي من الممكن استخدام مثل هذه المضادات في العلاج للقضاء على هذه البكتريا عند الإصابة بها .

جدول(٤) النسب المئوية لتثبيط بكتريا *Staph. aureus* و *E. coli* في الأوساط السائلة ومقدار التركيز المستخدم

رمز المضاد الحيوي	تركيز المضاد (ملغم/مل)	النسبة المئوية للتثبيط بكتريا ***Staph. aureus***	النسبة المئوية للتثبيط بكتريا ***E. coli***
AM	٢	٤.٦٠	٣.٧٠
AZM	٣	٥٥.٠٥	٨٣.٧
PY	٢٠	١٤.٣١	١٩.٩
MA	٦	١٥.٦	١٢.٣
CX	٠.٢	٥.١٢	٥.٠٦
C	٦	٣٤.٤	٦٠.١
CIP	١	٨٤.١	٧٩
E	١٥	٢٤.٧	٤٩.٤
CN	٢	٩٢.٥٩	٥٦.١
K	٦	١٦.٥	١٤.٤
ME	١	١٥.٦	٨.٣
MXF	١	٥٧.٧	٩٦.١
NA	٦	١٥.٢	١٣.٦
PRL	٢٠	٦٣.١	٥٩.٧
ROX	٦	٢٢.٠٦	٥٥.٥
SP	٢٠	١٩.٦	٢٥.٨
S	٢	٤٩.٥٢	١١.٨
VA	٦	٢٢.٥	٢٠.٧

المصادر

1- Anderson, E.S., Annual Review of Microbiology **.**(1968) 22:131-180.

2-Turtura,G.C. ;Massa, S. and Ghazvinizadeh, H., International Journal of Food Microbiology. (1990) 11:351-354.

3-Lim,S.K.;Lee,H.S.;Nam,H.M.;Cho,Y.S.;Kim,J.M.;Song,S.W.;Park,Y.H. and Jung,S.C., International Journal of Food Microbiology. (2007) 116:283-286.

4-Felmingham,D., Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2002) 50:1-7.

5- العاني، فائز عزيز(١٩٩٣).التكنولوجيا الحيوية ، دار الكتب للطباعة والنشر،جامعة الموصل ، الموصل.٢٩١ صفحة.

6- Shahidi , A. and Ellner, P.D., Applied Microbiology (1969) 18(5):766-770.

7-Spanggaard,B.;Jorgensen,F.;Gram,L.and Huss, H., Aquaculture(1993) . 115:195-207.

8-Berge,A.C.B.; Atwill, E. R. and Sischo, W. M. Preventive Veterinary Medicine (2003) 61 : 91-102.

9-Andrew,S.M.;Moyes.M.K.;Borm,A.A.;Fox,L.K.;Leslie,K.E.;Hogan,J.S. ;Oliver,S.P.;Schukken,Y.H.;Owens,W.E. and Norman,C. Veterinary Microbiology (2009) 134:150-156

10- Majeed,K.R. and Al-Shatty,S.M. Basrah Journal Science, (2000) 18(1):97-110.

11- Wolf, K. and Snieszko, S.F. Antimicrobial Agent and Chemotherapy (1964) 1:597-603.

12-Plumb, J. A.; Sheifinger, C.C.; Shryock, T.R. and Goldsby, T. Journal of Aquatic Animal Health (1995) 7:211-217.

13-Mcphearson, R.M.; Depaola, A.; Zywno, S. R.; Motes, M.L. and Guarino, A. M. Aquaculture (1991) 99:203-211.

14-Taylor, P.W. North American Journal of Aquaculture (2003) 65:120-125.

15- Al-Imarah, E.A. Journal of Kerbala University.(2008) (In press)

16- Andrews,W. Manual of food quality control 4.Rev.1. microbiological analysis. **.**(1992). FAO. Food and nutrition paper No.14/4 (Rev.1).Rome, Italy.
17- Cowan,S.T. and Steel,K.J. Manual of the identification of medical bacteria. (1975). Cambridge University, London.
18- Bridson,E.Y. The oxoid manual (1998).8th ed., Oxoid limited, Basingstoke, U.K.
19- Lewis, D. R. Predominant aerobic bacteria of fish and shellfish. (1973). Texas A and M University. Sea Grant college.
20- Bauer, A.W.; Kirby, M.M.; Sherris, J.C. and Turck, M. American Journal of Clinical Pathology**.** (1966) 45:493-496.
21- NCCLS(National Committec for Clinical Laboratory Standards) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. (1984). 13th ed. ,M2-A3,p:369.
22- Waterworth,P.M. Quantitative methods for bacterial sensitivity testing**.** (1978). In: Laboratory methods in antimicrobial chemotherapy, Reeves, D.S.;Phillips,I.;Williams,J.D. and Wise, R. (eds.) Edinburgh : Churchill livingstone.35-37.
23-Frazier, W.C. and Westhoff, D.C.(1988) Food Microbiology, 4th ed., McGraw- Hill book Company, New York, USA.
24-Burwen,D.R.; Banerjee, S. N.; Gaynes, R. P. The Journal of Infectious Diseases (1994) 170 (6):1622-1625.
25-Dornbusch,K.;Mörtsell,E.;Goransson,E. Chemotherapy (1990) 36(4):258-267.