

## أثر أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم في حث التحول إلى أشكال L البكتيرية

أوس إبراهيم سليمان

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

القبول

٢٠١٠ / ٠٦ / ٢٧

الاستلام

٢٠٠٩ / ٠٥ / ٢٧

### Abstract

The ability of  $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$  ions to induce the following bacterial species: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Streptomyces albidoflavus* to transform to L- forms were studied. Hypertonic special culture medium was designed for this purpose in which Vancomycin was added to it in concentration of (6.25 mg/l and 12.5 mg/l).

The result indicated that the species *Klebsiella pneumoniae* was the most effective on especially at concentration of antibiotic Van. (12.5 mg/l) Also when we added  $MgSO_4$  alone at concentration of (0.5 gm/liter).

The species *Escherichia coli* was clearly affected when we added  $CaCl_2$  alone to the medium at concentration of (3gm / liter) with availability of antibiotic at the same concentration above.

The species *Klebsiella pneumoniae* at concentration of  $CaCl_2$  at (1.5 gm/liter) from the other was affected more than species under study. The same species *Klebsiella pneumoniae* was clearly affect when we added the both  $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$  ions in all concentration using but *Escherichia coli* was affected when we used  $MgSO_4$  (1 gm/liter) and  $CaCl_2$  (3 gm/liter) together from all other species.

The species *Klebsiella pneumoniae* gave clear growth when we added antibiotic Van. At (6.25 mg / l) and at low percentage of  $MgSO_2$  (0.5 gm/ liter) and the species *Escherichia coli* didn't show any effect at concentration of  $MgSO_2$  (2 gm/ liter).

The *Klebsiella pneumoniae* gave clear response at  $CaCl_2$  (12 gm/ liter) alone then the species *Staphylococcus aureus* but the species *Escherichia coli* didn't give any response.

Best growth of L-form appears for the species *Klebsiella pneumoniae* when we added  $MgSO_4$  and  $CaCl_2$  together especially at concentration (4gm/ liter) for the 1<sup>st</sup> and (12 gm/ liter) for the 2<sup>nd</sup> one.

So when we used the two salts at (0.5 and 4 gm/ liter) for  $MgSO_4$  and (1.5 and 12 gm/ liter) for  $CaCl_2$  we obtained the best culture medium for L-form and especially when we use MIC for antibiotic under study.

### الخلاصة

درست قدرة أيونات  $Ca^{++}$  و  $Mg^{++}$  على حث الأنواع البكتيرية الآتية: *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumoniae*، *Escherichia coli* و *Streptomyces albidoflavus* على تكوين أشكال L بوجود المضاد الحيوي Vancomycin.

استخدم وسط زرع خاص عالي الازموزية مضاف له التركيز الأدنى المثبط (١٢.٥ ملغم/لتر) للمضاد الحيوي Vancomycin وتحت التركيز المثبط الأدنى (٦.٢٥ ملغم/لتر). بينت النتائج أن النوع *Klebsiella pneumoniae* كان أكثرها تأثيراً خاصة عند تركيز (١٢.٥ ملغم/لتر) لمضاد Vancomycin و بوجود  $MgSO_4$  بتركيز (٠.٥ غرام/لتر). تأثر النوع *Escherichia coli* بوضوح عند إضافة  $CaCl_2$  للوسط و عند إضافته بتركيز (٣ غرام/لتر) وبوجود المضاد بنفس التراكيز أعلاه. تأثر النوع *Klebsiella pneumoniae* عند التركيز (١.٥ غرام/لتر) من  $CaCl_2$  من بقية الأنواع. كذلك تأثر النوع *Klebsiella pneumoniae* عند إضافة أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم معا عند كافة التراكيز المستخدمة بينما تأثر النوع *Escherichia coli* فقط عند التركيز (١ غرام / لتر) من  $MgSO_4$  و (٣ غرام / لتر)  $CaCl_2$  معا من دون بقية الأنواع.

أظهر النوع *Klebsiella pneumoniae* نموا واضحا عند إضافة (٦.٢٥ ملغم/لتر) والتركيز  $MgSO_4$  (٠.٥ غرام / لتر). لم يبدي النوع *Escherichia coli* أي استجابة للتركيز  $MgSO_4$  (٢ غرام / لتر).

تأثر النوع *Klebsiella pneumoniae* عند استخدام  $CaCl_2$  و بتركيز (١٢ غرام / لتر) ثم النوع *Staphylococcus aureus* ولم يبدي النوع *Escherichia coli* أي استجابة.

تحقق أفضل نمو للأشكال L للنوع *Klebsiella pneumoniae* عند استخدام أملاح  $MgSO_4$  و  $CaCl_2$  معا خصوصا بتركيز (٤ غرام / لتر) للأول و (١٢ غرام / لتر) للثاني عن بقية الأنواع. أي أن استخدام الملح معا و بالتركيزين (٠.٥ و ٤ غرام / لتر)  $MgSO_4$  و (١.٥ و ١٢ غرام / لتر)  $CaCl_2$  مع استخدام التركيز المثبط الأدنى للمضاد الحيوي Van. يعطينا أفضل وسط لتكوين أشكال L من استخدام الوسط الحاوي على المضاد لوحده.

### المقدمة

بدأت دراسة أشكال L الجرثومية عام ١٩٣٥ حيث تم الحصول على مستعمرة نقية من كائنات شبيهة بـ *Mycoplasma* وظهرت فيما بعد بأنها أشكال L لبكتريا *Streptobacillus moniliformis* (١)، يعد الجدار الخلوي التركيبي الرئيسي للبكتريا يحميها من الضرر ومن التحلل الازموزي كما انه الهدف الرئيسي لكثير من المضادات الحيوية المؤثرة على الجدار الخلوي ، تعاني أشكال L من فقدان الجدار و بهذه الحالة تحتاج إلى ظروف وأوساط خاصة ذات ازموزية معينة لغرض النمو و البقاء بهذا الشكل و تحميها من الإنزيمات و المضادات الحيوية القاتلة (٢، ٣).

أوضح (٤) على أن شكل L هو خلل في الخلية البكتيرية وتظهر البكتريا أما كروية أو غير منتظمة الشكل ويحدث أما بصورة تلقائية كما في *Streptobacillus moniliformis* أو يتم حثه عن طريق الصدمة الحرارية أو الازموزية أو عن طريق المضادات الحيوية المثبطة للجدار الخلوي وفي حال كون الخلية قد أصبحت شكل L فهي تكون فاقدة كلياً أو جزئياً للجدار و قد تعود الخلية إلى شكلها الطبيعي بعد إزالة العامل المحفز لها و هذا يطلق عليه بشكل L غير المستقر أو قد تبقى بحالة شكل L ولا تعود إلى طبيعتها حتى بعد زوال العامل المسبب و تنمو و تتكاثر و هي بهذا الشكل يطلق عليها بهذه الحالة شكل L المستقر هنالك العديد من البكتريا ممكن ملاحظتها بشكل L *Bacillus* , *Vibrio* , *Escherichia coli* , *Haemophilus* , *Proteus* , *Klebsiella* .

تظهر أشكال L بأشكال متعددة (Pleomorphism) تتميز بقدرتها على تغيير شكلها و حجمها ، بعض من أشكال L ممكن أن تنمو و تظهر بشكل خيوط طويلة و مجتمعة مع بعضها مكونة (Biofilm) والذي يتكون من أشكال L الخيطية الطويلة و بروتين الغمد الواقي و ممكن أن تظهر بشكل أجسام عملاقة، لهذه الأسباب تبقى أشكال L غير مفهومة (٥، ٦).

تنمو أشكال L الفاقدة لطبقة الببتيدوكلايكان ، وتنقسم بصورة اعتيادية، وعادة ما تأخذ الشكل الكروي أو الدائري، وهي حساسة جدا للتغير بالازموزية . في عام ١٩٤٢ ظهرت أشكال L المحتفظة بحوالي ٧ % من طبقة الببتيدوكلايكان الطبيعية مقاومة للمضاد الحيوي البنسلين و تستخدمها تركيب أساسي لغرض تكاثرها في معظم الانقسام الخلوي (٧، ٨، ٩).

المغنيسيوم من العوامل المساعدة في خطوات بناء الجدار الخلوي و له تأثير رئيسي في نمو البكتريا من دون الاعتماد على الكالسيوم(10). وهو من المقترضات القطعية في إرجاع البروتوبلاست (١١)، (١٢، ١٣).

يلعب  $Ca^{++}$  دورا مهما في دورة حياة البكتريا حيث يتواجد بين الجدار الخلوي و المحيط الخارجي للخلية و ينشط الإنزيمات الداخل خلوية، يضاف  $Ca^{++}$  إلى الأوساط المزرعية لكل البكتريا من دون المعرفة إذا كانت تحتاجه أو لا تحتاجه البكتريا لغرض النمو ، ويعد من المركبات الكيميائية

الضرورية الداخلة في تركيب الجدار الخلوي، و يشترك في عملية الانجذاب الكيمياوي ، الاستقرار الحراري(Thermo stability)، الحركة، تفعيل الإنزيمات الداخل خلوية و تنظيم عمليات دورة الخلية (14، 15). تمتلك أشكال L تراكيز قليلة من  $Ca^{++}$  بالمقارنة مع الشكل الطبيعي للبكتريا (16).

يتواجد  $Mg^{++}$  بكمية وافرة داخل الخلية و يلعب دور أساسي في حياتها، يقوم  $Mg^{++}$  بوظائف عديدة داخل البكتريا منها الانجذاب الكيمياوي، مساعد أنزيمي، يحافظ على سلامة الجدار الخلوي و الغشاء الخلوي بالإضافة لدوره في النمو ، يختلف دوره باختلاف الأنواع البكتيرية، وجزء من المغنيسيوم يتواجد في جدار الخلية، ولكن معظمه يكون مرتبط بالرابيوسومات وهو من مقتضيات المحافظة على تركيبها، يؤثر نقص  $Mg^{++}$  في أحداث تغيرات شكلية للخلية وقد تصبح خيطية (17). يتساوي تركيز  $Mg^{++}$  في كل من البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام وهو من ضروريات النمو للبكتريا ولا يحل محله أي أيون آخر .

لذا اعتمدت دراستنا التحري عن اثر ايون المغنيسيوم و الكالسيوم على أنواع بكتيرية مختلفة بوجود المضاد الحيوي Vancomycin كأحد المضادات المؤثرة على جدار الخلية البكتيرية و معرفة مدى تأثيرهما على تحفيز البكتريا لتتحول إلى أشكال L واثر ذلك في ضراوة البكتريا الممرضة.

### المواد و طرائق العمل

حصل على الأنواع البكتيرية الآتية من مختبرات قسم علوم الحياة كلية العلوم و أكد تشخيصها بواسطة إجراء الفحوصات المظهرية ، المجهرية و الكيموحيوية المميزة لكل نوع بكتيري: *Staphylococcus aureus* , *Streptomyces albidoflavus* , *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae* وحصل على *Streptomyces albidoflavus* من مختبر د.إسراء غانم السماك من نفس القسم أعلاه (18، 19).

لغرض إجراء اختبار الحساسية تجاه المضادات الحيوية و اختيار المضاد الأكثر تأثيرا على الأنواع المستخدمة. اجري اختبار التركيز المثبط الأدنى للمضاد الحيوي المنتخوب وهو Van30 و المجهز من قبل الشركة الفرنسية MERCK، و المعادن  $CaCl_2$  و  $MgSO_4$  من شركة S.D. fine-chem. Ltd. الهندية.

استخدم وسط تكوين أشكال L (20) المحور من قبل الباحث والمكون من:

Breef Heart Infusion: 4%, Sucrose: 20%, Glucose: 0.8 %, Agar: 1 %

و تراكيز من  $Ca^{++}$ : 1.0، 3، 6، 1.2 غرام / لتر و  $Mg^{++}$ : 0.5، 1، 2، 4 غرام / لتر

وبإضافة التركيز المثبط الأدنى و تحت الأدنى للمضاد الحيوي Vancomycin: 12.5 و 6.25 ملغم / لتر

استخدمت أقراص المضادات الحيوية و المجهزة من قبل شركة Bioanalyse التركيبة الآتية:  
Ampicillin (Am10), Cefotaxime (CTX30), Penicillin G (P 10 U),  
Vancomycin (Van 30), Cephalothin (KF 30), Cephalexin (CL 30) and  
Pepracillin (PRL 100).

### ١. اختبار التركيز المثبط الأدنى:

أجري اختبار التركيز المثبط الأدنى (Minimal Inhibitory Concentration) حسب طريقة (٢١) و المحورة من قبل (٢٢) وذلك بإجراء تخفيف مضاعفة للمضاد الحيوي Vancomycin في المرق المغذي ثم اظيف لكل تخفيف ١ مل من المرق المغذي الملقح بحملة لوب من الأنواع قيد الدراسة عدا أنبوب السيطرة وحضنت في درجة ٣٥-٣٧ لمدة ٤٨ ساعة وحدد MIC و Sub MIC.

### ٢. حث البكتريا على تكوين أشكال L:

اعتمدت طريقة (٣٠) مع بعض التحوير إذ أضيفت المعادن و تحت الظروف المعقمة الكاملة و بالتراكيز الآتية:  $MgSO_4$ : ٠.٥، ١، ٢، ٤ و  $CaCl_2$ : ١.٥، ٣، ٦، ١.٢ غرام / لتر لوسط شكل L المحور. حضنت الأطباق في درجة حرارة ٣٥-٣٧م لمدة ٤٨ ساعة ولوحظ النمو وسجل (جيد، متوسط، قليل) ثم عملت شرائح وصبغت بصبغة كرام لملاحظة تحول البكتريا إلى أشكال L البكتيرية، مع إضافة التركيز المثبط الأدنى و تحت الأدنى للمضاد الحيوي Vancomycin.

### النتائج

أعطى المضاد الحيوي Vancomycin نطاق تثبيط قطره ما بين (٢١-٣٣) ملم/ قرص لكل الأنواع البكتيرية قبل إضافة المعادن . حدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) له وهو (١٢.٥ ملغم/ لتر) والتركيز تحت المثبط الأدنى (Sub MIC) (٦.٢٥ ملغم/ لتر) ولكل الأنواع.

إضافة المضاد الحيوي Vancomycin بتركيز ١٢.٥ ملغم/ لتر على الوسط الحاوي على  $MgSO_4$ ، عند التراكيز ٠.٥، ١، ٢، ٤ غرام / لتر:

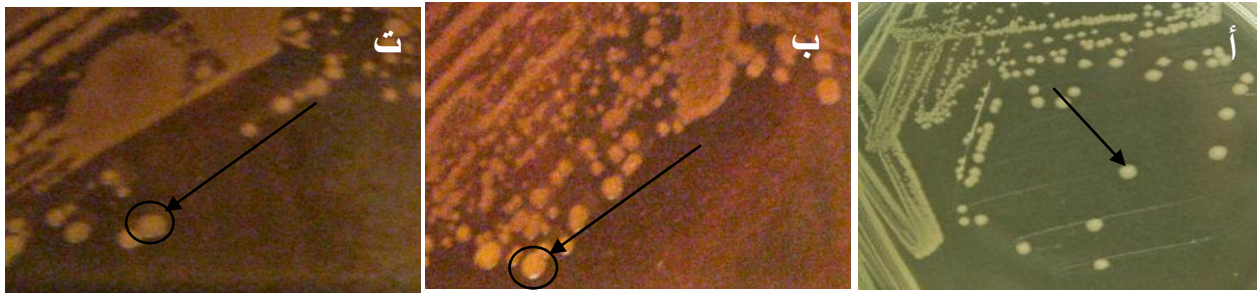
أظهرت النتائج تكون أشكال L بصورة واضحة للنوع *E. coli* عند التركيزين (٢، ٤ غرام / لتر) إذ أن التركيز ٢ غرام/لتر أظهر المستعمرات صغيرة الحجم مع وجود مستعمرات شبيهة بالبيض المقلي ظهرت أشكال عسوية منتفخة كبيرة تمثل أشكال L البكتيرية وواضحة بصورة متميزة ، التركيز ٤ غرام/لتر بدت المستعمرات صغيرة الحجم ومنتشرة بكثافة مع كثرة وجود أشكال L الجرثومية حيث

أثر أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم في حث التحول إلى أشكال L البكتيرية.

ظهرت خلايا كبيرة سميكة و عصوية مع قلة وجود الشكل الاعتيادي كما موضح في الصورة (١)،  
(٢).

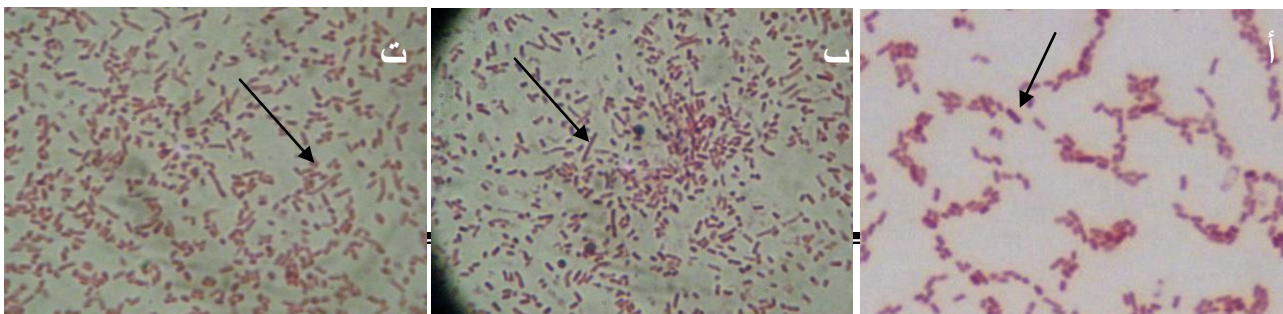


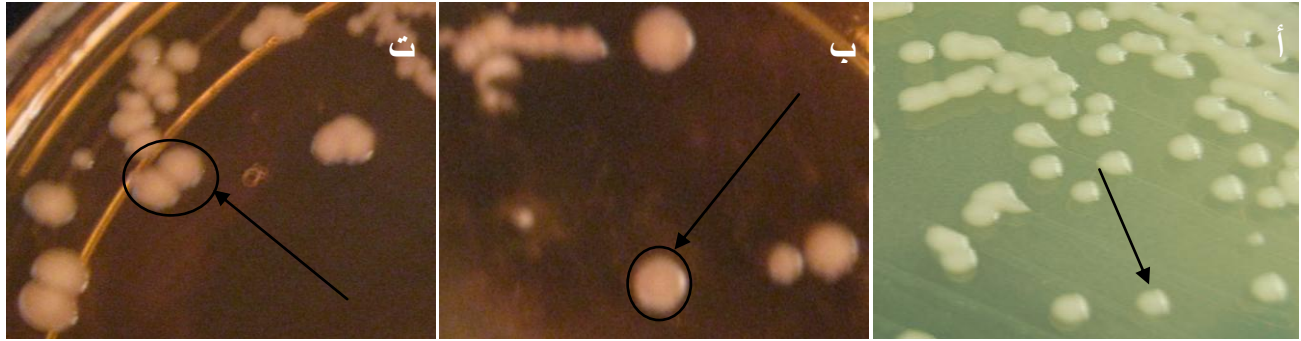
الصورة (١): بكتريا *Escherichia coli* تحت العدسة الزيتية  $\times 100$ ، أ. الشكل الاعتيادي، ب. أشكال L عند التركيز ٢ غرام / لتر، ت. أشكال L عند التركيز ٤ غرام / لتر. لاحظ الفرق بين الشكل الطبيعي و أشكال L لهذه البكتريا



الصورة (٢): مستعمرات بكتريا *Escherichia coli*، أ. الشكل الاعتيادي، ب. شكل البيض المقلي للمستعمرات عند التركيز ٢ غرام/لتر، ت. شكل البيض المقلي للمستعمرات عند التركيز ٤ غرام/لتر. لاحظ الفرق بين حجم المستعمرات.

يليه النوع *Klebsiella pneumoniae* كما موضح في الصورة (٣، ٤) بين التركيز ٢ غرام / لتر أن المستعمرات النامية على الطبق حجمها اكبر من بقية المستعمرات مع ملاحظة المستعمرات الشبيهة بالبيض المقلي و ظهرت الخلايا منتفخة الشكل مع وجود استطالات بالإضافة إلى بعض الأشكال التي أخذت الشكل الكروي المنتفخ و عند التركيز ٤ غرام / لتر ظهرت المستعمرات بأحجام كبيرة و متميزة شبيه بالبيض المقلي و ظهرت أشكال L البكتيرية بكميات كبيرة حيث لوحظت خلايا بكتيرية منتفخة و كروية الشكل ونادرا ما نشاهد الشكل الاعتيادي للبكتريا كما موضح بالجدول (١)





الصورة (٤): مستعمرات بكتريا *Klebsiella pneumoniae*، أ. الشكل الاعتيادي، ب. شكل البيض المقلي للمستعمرات عند التركيز ٢ غرام / لتر، ت. شكل البيض المقلي للمستعمرات عند التركيز ٤ غرام / لتر. لاحظ الفرق بين حجم المستعمرات.

الجدول (١): النمو و أشكال L البكتيرية على الوسط الحاوي  $MgSO_4$  و المضاد الحيوي Vancomycin

بوجود $MgSO_4$ و المضاد الحيوي Vancomycin							الأنواع
أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٤ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٢ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ١ غرام / لتر	أشكال L	
						النمو على الطبق بوجود ٠.٥ غرام / لتر	

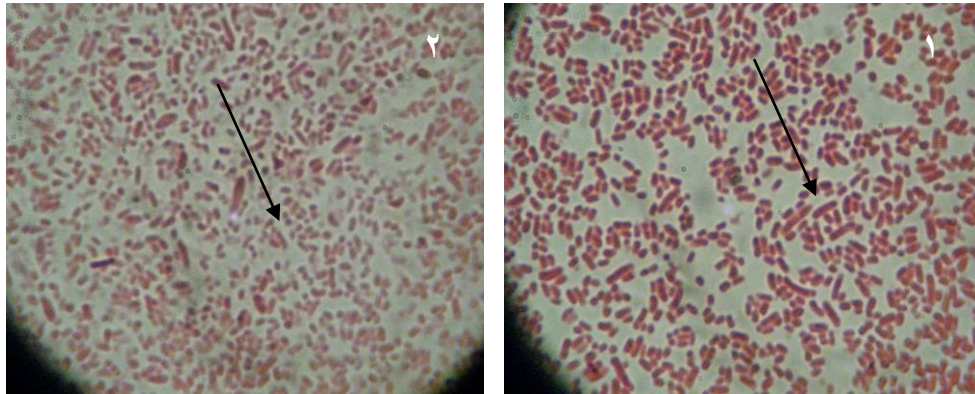


أثر أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم في حث التحول إلى أشكال L البكتيرية.

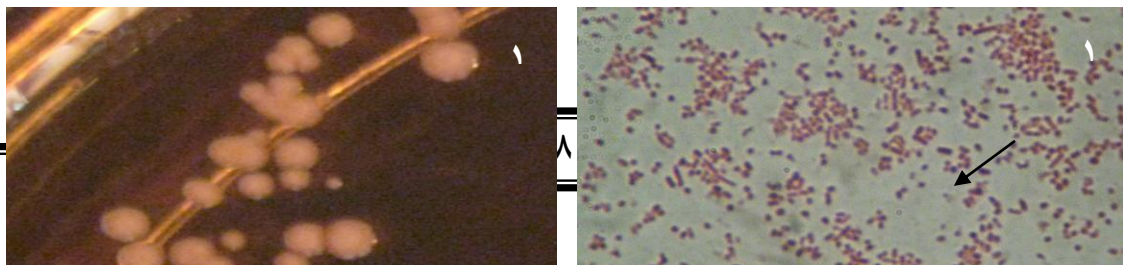
+	قليل	+	قليل	++	قليل	+++	متوسط	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
+	جيد	+	متوسط	++	قليل	+++	قليل	<i>Escherichia coli</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Staphylococcus aureus</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Streptomyces albidoflavus</i>

ظهور أشكال L بكثرة +++، ظهور أشكال L بكمية متوسطة ++، قلة ظهور أشكال L +

أما عند بقية التراكيز بالنسبة للنوع *E. coli* فظهرت مستعمراتها صغيرة الحجم مع عدم تمييز وجود المستعمرات التي تميل الى الحجم الكبير أو الشكل الشبيه بالبيض المقلي عند التركيز ٠.٥ غرام/ لتر كما شوهدت أشكال عصوية متحولة الى ا لشكل الكروي المنتفخ ولكنها قصيرة سميكة مع وجود بعض الخلايا التي اظهرت ميلا الى الاستطالة ، اما عند التركيز ١ غرام/ لتر فشوهدت مستعمرات صغيرة الحجم ومشابهة تقريبا للمستعمرات السابقة ولوحظت خلايا ذات أشكال عصوية غير متميزة مع وجود اشكال صغيرة اعتيادية كما موضح في الصورة (٥).



أما النوع *Klebsiella pneumoniae* ظهرت مستعمرات مخاطية، أعتيادية مع ندرة ملاحظة الصورة (٥)؛ بكثريا *Escherichia coli* تحت العدسة الريئية  $\times 100$ ، ا أشكال L عند التركيز المستعمرات الشبيهة بالبيض المقلي، كما لوحظ عند التراكيز السابقة لهذا النوع غرام / عند التركيز ٠.٥ غرام/ لتر اما تحت المجهر فنادرا ما شوهدت أشكال L إذ ان السيادة كانت واضحة للشكل الطبيعي لهذا النوع، اما التركيز ١ غرام/ لتر بين المستعمرات بكونها تميل الى الظهور بحجم أكبر من حجمها الطبيعي ومع ملاحظة المستعمرات المتميزة بظاهرة البيض المقلي ذات مركز واضح، وظهرت كميات من أشكال L البكتيرية والتي تميزت بقصرها و زيادة سم اكتها مع وجود أشكال عصوية - مكورة سميكة قصيرة تحت الفحص المجهر كما موضح في الصورة (٦).





إضافة المضاد الحيوي Vancomycin بتركيز ١٢.٥ ملغم/ لتر على الوسط الحاوي على  $CaCl_2$  عند التراكيز ١.٥، ٣، ٦، ١٢ غرام/ لتر:

بينت النتائج بأن النوع *Escherichia coli* قد تأثر أكثر من بقية الأنواع ولكن لم نشاهد شكل البيض المقلي للمستعمرات النامية كالتى ظهرت عند استخدام  $MgSO_4$ ، اما عند الفحص المجهري عند التركيز ٦ غرام / لتر إذ شوهدت عصيات سميكة متطاولة مع ملاحظة ظاهرة تعدد الاشكال بصورة متميزة، كان البعض منها ذو أشكال كروية متحولة من الشكل العصوي الى اشكال L. كما في الصورة (٧).



الصورة (٧): بكتريا *Escherichia coli* تحت العدسة

الزيتية  $\times 1000$ ، ١. أشكال L عند التركيز ٦

غرام / لتر لاحظ طول الخلايا والفرق بينها

وبين الشكل الطبيعي لهذا النوع راجع الصورة (١) التي يظه

لاحظناها عند استخدامها عند استخدام  $MgSO_4$  وكذلك عند الفحص واضحة. كما موضح بالجدول (٢).

الجدول (٢): النمو و أشكال L البكتيرية على الوسط الحاوي  $CaCl_2$  و المضاد الحيوي Vancomycin

وجود $CaCl_2$ و المضاد الحيوي Vancomycin							الأنواع
أشكال L	النمو على الطبق بوجود ١٢ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٣ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ١.٥ غرام / لتر	أشكال L	

أثر أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم في حث التحول إلى أشكال L البكتيرية.

-	-	-	-	-	-	++	قليل	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
++	متوسط	++	متوسط	+++	متوسط	++	جيد	<i>Escherichia coli</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Staphylococcus aureus</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Streptomyces albidoflavus</i>

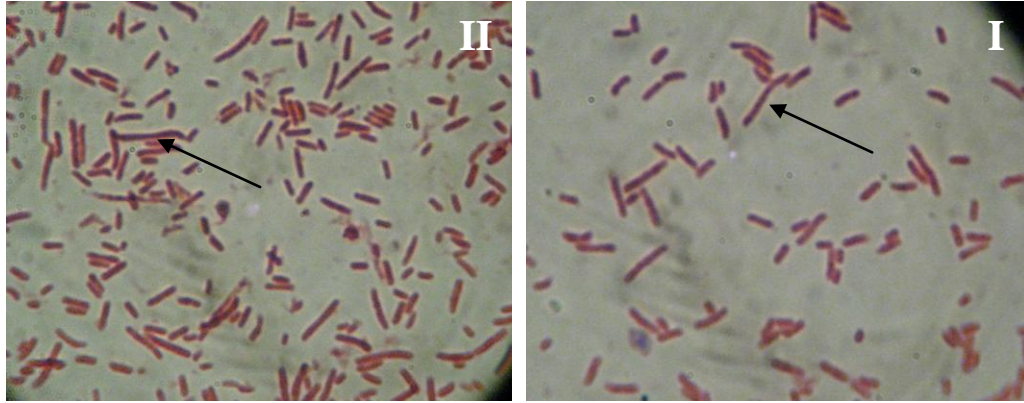
ظهور أشكال L بكثرة +++، ظهور أشكال L بكمية متوسطة ++، قلة ظهور أشكال L +

أما عند بقية التراكيز لاحظنا عند النوع *Escherichia coli* فقط تغيرات واضحة عند الفحص المجهرى إذ ظهرت أشكال L عند التركيز ١.٥ غرام/ لتر عصيات سميكة ذات ميل الى الاستطالة مع وجود خلايا قد استطالات فعلا مع ملاحظة ظاهرة تعدد الأشكال وهي واحدة من الصفات المميزة لأشكال L، التركيز ٣ غرام/ لتر لم يظهر اي تغاير مميز عن التركيز الأول، أما عند التركيز ١٢ غرام/ لتر شوهدت خلايا متحولة الى شكل L بكميات اكبر وبحجم اكبر من السابق حيث ظهرت عصيات منتفخة مع وجود عصيات منتفخة صغيرة مع تميز واضح لظاهرة تعدد الأشكال. كما موضح في الصورة (٨).

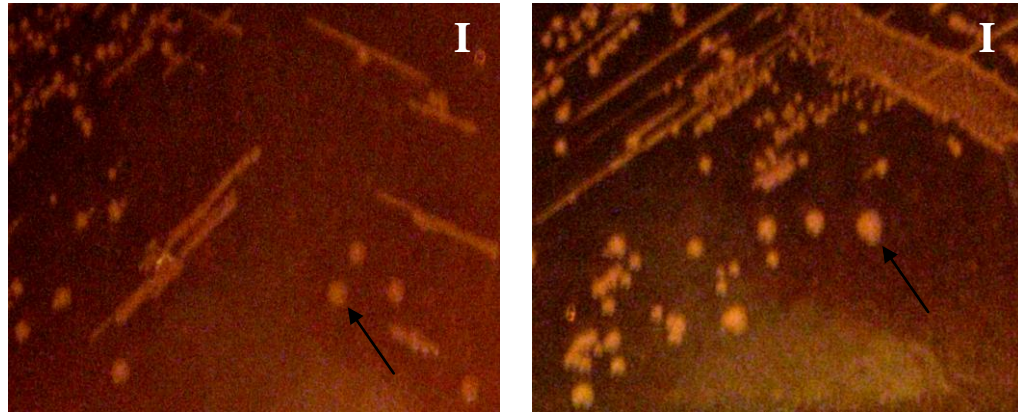


إضافة المضاد الحيوي Vancomycin تحت تركيزه الربيعي ١٠٠ ملغم/لتر A. على الوسط الحلو يزرع على *Escherichia coli* (التركيز ٣ غرام/ لتر) B. على  $CaCl_2$  (التركيز ٥ غرام/ لتر) C. على  $MgSO_4$  (٥ غرام/ لتر) عند التركيز ١٢ غرام/ لتر. أوضحت النتائج بان النوع *Escherichia coli* أظهر تأثيرا مميزا من بقية الانواع قيد الدراسة شوهدت المستعمرات التي قد أبدت ميلا للظهور بشكل الشبيه بالبيض المقلي على الطبق و لكن تحت المجهر فلقد لاحظنا أشكال L البكتيرية بصورة واضحة جدا وخاصة عند التركيزين (٠.٥، ١.٥ غرام/ لتر) و (١، ٣ غرام/ لتر)، إذ لوحظ عند التركيز ٠.٥، ١.٥ غرام/ لتر أشكال L بصورة مميزة حيث ظهرت بهيئة عصيات متغايرة من الطول منتفخة سميكة مع ملاحظة انتفاخات كروية على هيئة عقد داخل الشكل العصوي شكل تخلص وهو من ميزات أشكال L، اما التركيز ١، ٣ غرام/لتر اظهر أشكال L بصورة واضحة و مميزة جدا، شكل عصيات باستطالات منها طويل جدا

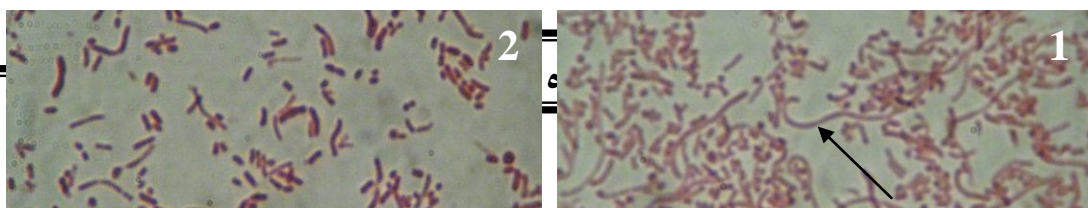
ومنها ما هو متوسط الطول بالإضافة الى ملاحظة أشكال L الكروية كما موضح في الصورة (٩)، (١٠).

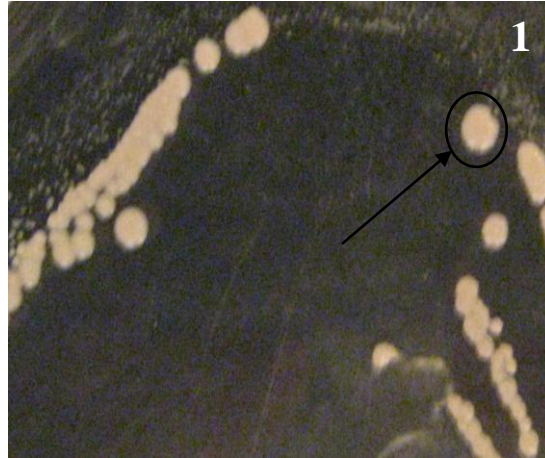


الصورة (٩): بكتريا *Escherichia coli* تحت العدسة الزيتية  $\times 1000$ ، I. أشكال L عند التركيز (١.٥، ٠.٥) غرام / لتر، II. أشكال L عند التركيز (٣، ١) غرام / لتر.



الصورة (١٠): مستعمرات بكتريا *Escherichia coli*، I. عند التركيز (١.٥، ٠.٥) غرام/لتر، II. أما النوع *Klebsiella pneumoniae* فلقد أبدى تأثيراً فقط عند التركيزين (٢، ٦ غرام/لتر) و (٤، ١٢ غرام/لتر) إذ أظهر التركيز ٢، ٦ غرام/لتر مستعمرات صغيرة الحجم مع وجود مستعمرات كبيرة شكلها شبيه بالبيض المقلي، وعند التركيز ٤، ١٢ غرام/لتر المستعمرات ظهرت صغيرة في الوسط مع ندرة وجود مستعمرات كبيرة الحجم شبيهة بالبيض المقلي. كما موضح في الصورة (١١، ١٢)، اما تحت الفحص ألمجهري لوحظ تأثير كبير عند التركيز (٢، ٦ غرام/لتر) و بصورة مميزة حيث استطالت بشكل خيوط وعند التركيز ٦، ١٢ غرام/لتر ظهرت البكتريا متأثرة بشكل كبير اكبر من السابق مع ملاحظة ان الخلايا قد أستطالت بشكل كبير مع زيادة القطر، وتحول جميع الخلايا الى أشكال L البكتيرية. كما موضح بالجدول (٣).





الصورة (١٢): مستعمرات بكتريا *Klebsiella pneumoniae*، ١. عند التركيز (٢، ٦) غرام/لتر  
الجدول (٣): النمو و أشكال L البكتيرية على الوسط الحاوي على  $MgSO_4 + CaCl_2$  و المضاد الحيوي

**Vancomycin**

Vancomycin و المضاد الحيوي $MgSO_4 + CaCl_2$ بوجود							الأنواع	
أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٤ و ١٢ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٢ و ٦ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ١ و ٣ غرام / لتر	أشكال L		النمو على الطبق بوجود ٠.٥ و ١.٥ غرام / لتر
+++	متوسط	+++	متوسط	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

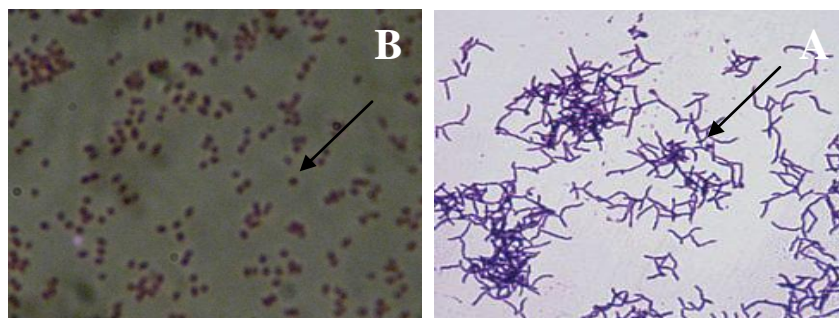


-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	+++	متوسط	++	متوسط	<i>Escherichia coli</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Staphylococcus aureus</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Streptomyces albidoflavus</i>

ظهور أشكال L بكثرة +++، ظهور أشكال L بكمية متوسطة ++، قلة ظهور أشكال L +

إضافة المضاد الحيوي Vancomycin بتركيز ٦.٢٥ ملغم / لتر على الوسط الحاوي على  $MgSO_4$  (٠.٥، ١، ٢، ٤) غرام / لتر:

هنالك بعض التأثيرات التي ظهرت عند هذه الإضافة حيث تأثر النوع *Streptomyces albidoflavus* وان كان تأثير بسيط عند التركيز ٠.٥ غرام/لتر شوهدت مستعمرات صغيرة ، أما التركيز ٢ غرام/لتر فبين مستعمرات ذات حجم كبير وحواف ملساء وشكل شبيه بالبيض المقلي ، وعند الفحص المجهرى لوحظت خلايا عسوية مكورة منها ما أصبح مكورا وهي إحدى صفات أشكال L البكتيرية حيث مع المقارنة بالشكل الطبيعي الذي هو على شكل خيوط موجبة لصبغة كرام كما موضح في الصورة (١٣، ١٤).



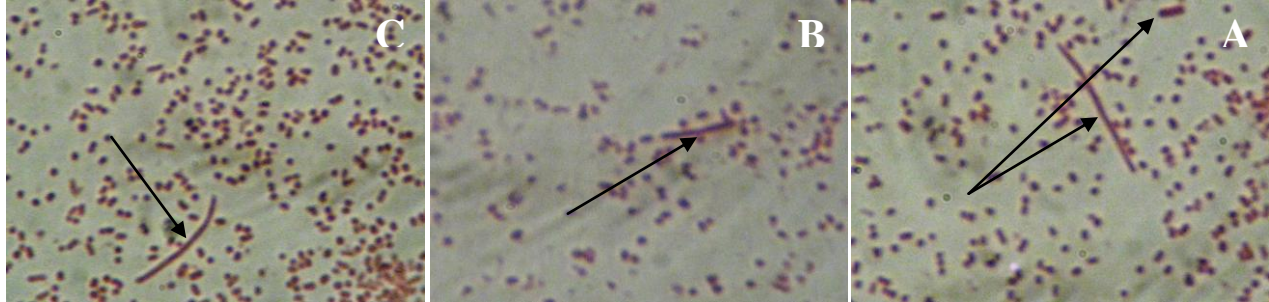
الصورة (١٣): بكتريا *Streptomyces albidoflavus* تحت العدسة الزيتية  $\times 100$ . A. شكل البكتريا الطبيعية، B. الشكل الطبيعي لهذا



الصورة (١٤): مستعمرات بكتريا *Streptomyces albidoflavus*، عند التركيز ٢ غرام / لتر

أثر أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم في حث التحول إلى أشكال L البكتيرية.

يليهما النوع *Klebsiella pneumoniae* المستعمرات لم تظهر بالشكل الشبيه بالبيض المقلي بصورة واضحة و مميزة عند كل التراكيز ، وعند الفحص المجهرى لكل التراكيز ظهرت الخلايا قد مالت إلى الانتفاخ ولو بشكل ضئيل. كما موضح في الصورة (١٥). كما موضح بالجدول (٤).



الصورة (١٥): بكتريا *Klebsiella pneumoniae* تحت العدسة الزيتية  $\times 100$ . A. أشكال L عند التركيز ٠.٥ غرام/ لتر، B. أشكال L عند التركيز ١ غرام/ لتر، أشكال L عند التركيز ٤ غرام/ لتر.

الجدول (٤) النمو و أشكال L البكتيرية على الوسط الحاوي  $MgSO_4$  و المضاد الحيوي Vancomycin

وجود $MgSO_4$ و المضاد الحيوي Vancomycin								الأنواع
أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٤ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٢ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ١ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٠.٥ غرام / لتر	
+	متوسط	+	متوسط	++	متوسط	++	متوسط	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Escherichia coli</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Staphylococcus aureus</i>
+	قليل	+	قليل	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Streptomyces albidoflavus</i>

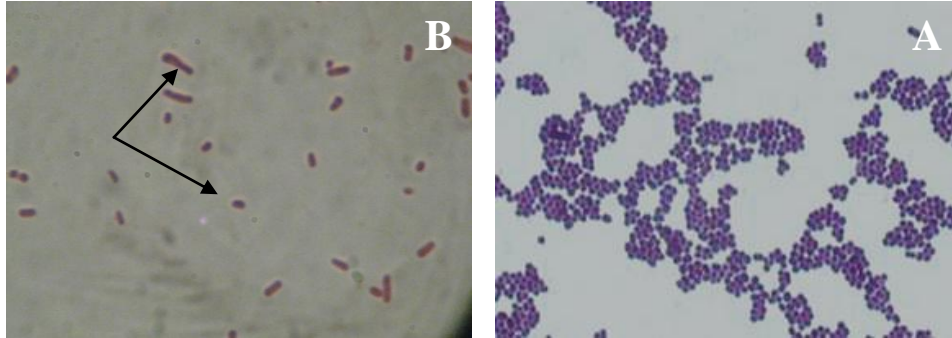
إضافة المضاد الحيوي Vancomycin بتركيز ٢٠٠ ميكروغرام/ لتر على الوسط الحاوي على

$CaCl_2$  والمضاد عند التراكيز ١.٥ ، ٣ ، ٦ ، ١٢ غرام/لتر:

بينت النتائج تأثر النوع *Staphylococcus aureus* عند التركيز ١٢ غرام/لتر فقط إذ ظهرت المستعمرات بشكلها الطبيعي المعروف لهذه البكتريا أما عند الفحص المجهرى فظهرت الخلايا بشكل عناقيد كروية كما هو معروف للشكل الطبيعي لهذه البكتريا ولكن الملفت للنظر ان البعض منها اخذ حجم اكبر من الطبيعي منها ما شوهد وهو مع العنقود و البعض الآخر منفرد كما أخذت بعض من



هذه الخلايا الكبيرة الحجم الصبغة السالبة لكرام تمثل الخلايا الكروية المنتفخة الكبيرة الحجم أشكال L البكتيرية، وبعض منها قد استطالت. كما موضح في الصورة (١٦).



الصورة (١٦): بكتريا *Staphylococcus aureus* تحت العدسة الزيتية  $\times 100$ ، A. الشكل الطبيعي، B. أشكال L عند التركيز ١٢ غرام/لتر، لاحظ الفرق الواضح بين الشكل الطبيعي و أشكال L.

يليهما النوع *Klebsiella pneumoniae* الذي بدت مستعمراته مشابه لشكل هذه البكتريا على الطبق ولكن عند فحص الشريحة ظهر لدينا عند التركيز ١٢ غرام / لتر أشكال L البكتيرية بكثرة و واضحة حيث امتازت الخلايا بالاستطالة ولقد تغيرت عن شكلها الطبيعي . كما موضح في الصورة (١٧). كما موضح بالجدول (٥)



الصورة (١٧): بكتريا *Klebsiella pneumoniae* تحت العدسة الزيتية  $\times 100$ ، أشكال L عند التركيز الجدول (٥): النمو و أشكال L البكتيرية على الوسط الحاوي  $CaCl_2$  و المضاد الحيوي Vancomycin ١٢ غرام / لتر . لاحظ الشكل الطبيعي لهذه البكتريا راجع الصورة (٣ أ).

بوجود $CaCl_2$ و المضاد الحيوي Vancomycin						الأنواع
أشكال L	النمو على الطبق بوجود ١٢ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٢ غرام / لتر	أشكال L	النمو على الطبق بوجود ٣ غرام / لتر	

أثر أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم في حث التحول إلى أشكال L البكتيرية.

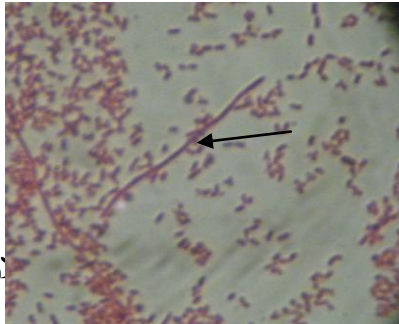
++	متوسط	+	متوسط	+	متوسط	-	متوسط	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Escherichia coli</i>
+	+	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Staphylococcus aureus</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Streptomyces albidoflavus</i>

ظهور أشكال L بكثرة +++، ظهور أشكال L بكمية متوسطة ++، قلة ظهور أشكال L +

بالنسبة للنوع *Klebsiella pneumoniae* عند التركيز ١.٥ غرام/لتر لم يلاحظ وجود أشكال L البكتيرية فقط الشكل الطبيعي مميزا وواضحا ، شوهد في التركيز ٣ غرام/لتر بعض الاستطالات القليلة في الخلايا ولكن يبقى الشكل السائد والواضح هو الشكل الاعتيادي للبكتريا و كذلك عند التركيز ٦ غرام/لتر .

إضافة المضاد الحيوي Vancomycin بتركيز ٦.٢٥ ملغم/لتر على الوسط الحاوي على (٠.٥ ، ١ ، ٢ ، ٤)  $CaCl_2 + MgSO_4$  (١.٥ ، ٣ ، ٦ ، ١٢) غرام/لتر:

أوضحت النتائج أن النوع *Klebsiella pneumoniae* هو الوحيد المتأثر من بقية الأنواع عند هذه الإضافة، حيث بدت المستعمرات بشكل مشابه تقريبا لشكل مستعمراتها الطب يعي ولكن عند الفحص تحت العدسة الزيتية ظهرت لدينا خلايا بكتيرية متحولة إلى أشكال L البكتيرية في التركيز ٤ و ١٢ غرام/لتر حيث ظهرت الخلايا قد استطالت مع وجود خلايا منقخة ونادرا ما شوهد الشكل الاعتيادي مع ميل بعض منها إلى الاستطالة الطويلة جدا. كما موضح في الصورة (١٨).



بينما في التركيز ٠.٥ و ١.٥ استطالة وبدت الخلايا ذات ميل

للانتفاخ أما السيادة فكانت للشكل الطبيعي و ظهر في التركيز ١ و ٣ غرام/لتر بعض الخلايا الصورة (١٨): بكتريا *Klebsiella pneumoniae* تحت العدسة الزيتية  $\times 1000$ ، أشكال L عند التركيز المتحولة إلى أشكال L البكتيرية ولكن بكمية ضئيلة مع وجود جيد للشكل الاعتيادي، وعند التركيز ٤، ٦ غرام/لتر لاحظ ظاهرة تعدد الأشكال الطاهرة بصورة مميزة.

٢ و ٦ غرام/لتر أظهرت بعض الخلايا ميل للانتفاخ مع وجود جيد للشكل الطبيعي. كما موضح بالجدول (٦).

الجدول (٦): النمو و أشكال L البكتيرية على الوسط الحاوي على  $MgSO_4 + CaCl_2$  و المضاد الحيوي

Vancomycin

Vancomycin و المضاد الحيوي $MgSO_4 + CaCl_2$ بوجود	الأنواع
--	---------

اشكال L	النمو على الطبق بوجود ٤ و ١٢ غرام/لتر	اشكال L	النمو على الطبق بوجود ٢ و ٦ غرام/لتر	اشكال L	النمو على الطبق بوجود ١ و ٣ غرام/لتر	اشكال L	النمو على الطبق بوجود ٠.٥ و ١.٥ غرام/لتر	
++	متوسط	+	متوسط	+ -	متوسط	-	متوسط	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Escherichia coli</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Staphylococcus aureus</i>
-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	-	انعدام النمو	<i>Streptomyces albidoflavus</i>

ظهور أشكال L بكثرة +++، ظهور أشكال L بكمية متوسطة ++، قلة ظهور أشكال L +

وفي كل الجداول المعتمدة ظهرت نتيجة واضحة وهي أن جميع العناصر الكيميائية والمضاد الحيوي والتراكيز المستعملة مع كل منها وهي الاختلاف الواضح في التأثير بين الأنواع لبيكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

### المناقشة

إن تأثير المضاد الحيوي Vancomycin على البكتريا يعود الى دوره في تثبيط عملية تخليق الجدار الخلوي وهذا ما أشار له (٢٣) بان المضادان الحيويان Bacitracin و Vancomycin يؤثران على عملية تخليق الجدار الخلوي للبكتريا بطريقة مختلفة عن Cephalothin و Penicillin و يحثان على تكوين أشكال L البكتيرية عندما تنمى على وسط ذو ازموزية معينة ، يبدو ان أشكال L الجرثومية تمتلك القابلية على البقاء فوق المعدلات الطبيعية من الازموزية (Osmolalitis) ولكن ميكانيكية التنظيم الازموزي لأشكال L الجرثومية لحد الآن غير مفهومة بشكل جيد، إن دراسة هذه الأشكال الفاقدة للجدار الخلوي للبكتريا تعطينا فكرة عن بعض العمليات الابيضية التي تحدث في البكتريا. (٢٤، ٢٥)

إن تعريض البكتريا إلى المضادات الحيوية و المصل المضاد Antiserum و العوامل الكيميائية المختلفة و مياه الحنفية تؤدي إلى تحول البكتريا إلى أشكال L و بقاء و نمو أشكال L الجرثومية بعد تعرضها لأحد هذه العوامل المحثة يعود إلى كونها تصبح أكثر مقاومة من الخلايا الأبوية إذ تمتلك زيادة في المقاومة بالمقارنة مع الخلية البكتيرية الأصلية و متى ما تتحول البكتريا إلى أشكال

L البكتيرية تصبح امراضيتها غير واضحة ويمكن ان يحدث التحول أثناء عملية البلعمة أو عن طريق فعل Bacteriophage أو في أثناء العلاج بالمضادات الحيوية. (٢٣، ٢٦، ٢٧).  
إن أصعب مشكلة تواجه العاملين في الحقل الطبي هو تحديد النسب المعنوية للبكتريا بأشكال L المعزولة من المرضى و عند عودة الإصابة إذ تحتفظ بمقاومتها للدفاعات الجسمية. (٢٨)  
أستطاع (٢٩) من حث و تنمية أشكال L البكتيرية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* عن طريق إضافة المضاد الحيوي Carbenicillin و بين بان أشكال L هذه حساسة للمضادات الحيوية Colistin sulfate, Gentamycin, Tetracycline, Kanamycin و عند التحليل الكيماوي لطبقة متعدد السكريات أدهني وجد اختلافا في محتوى الفوسفور و تغيرات في محتوى الأحماض الدهنية لغلاف الجدار الخلوي، وفسر ذلك بنقل المضادات الحيوية خلال الجدار الخلوي.  
إن للسكروروز دور فعال في حث البكتريا على تكوين أشكال L الجرثومية حيث استعمل السكروروز و بتركيز ٢٠% لاحداث هذا التأثير عند دراسته لبكتريا *Streptomyces levoris* كما أوضح (٣٠)  
بان أشكال L الجرثومية تحتاج الى تراكيز عالية من الأملاح أو السكروروز عند دراسته لأشكال L الجرثومية لبكتريا *Streptococcus faecalis* حيث تعد هذه الأملاح و السكروروز كمنظمات او مثبتات ازموزية (Osmotic Stabilizer) وان الاحتياجات الازموزية تكون متغايرة تبعاً للسلالة و النوع البكتيري و لاحظ أيضاً أن الازموزية الداخلية تكون أعلى بكثير مما هو موجود في الوسط و إنها تزداد بتضاعف أشكال L الجرثومية، و تبين أن الغشاء الساييتوبلازمي يلعب دوراً كبيراً في مساعدة البكتريا على تحمل التغييرات الحاصلة في الضغوط الازموزية او ان هذا الغشاء قد أصبح أكثر مرونة عند أشكال L.

عزلت أشكال L البكتيرية من أنواع موجبة لصبغة كرام كروية و عصوية، إذ تنتفخ البكتريا إلى أجسام كبيرة وهذا يحدث عند كل الأنواع و بنفس الطريقة كما لوحظت هذه العملية عند أنواع بكتيرية مثل *E. coli, Proteus, Bacteriodes, Klebsiella*. إن أشكال L الجرثومية النامية إلى أجسام كبيرة تصبح مستقيمة عند بعضها و قد تتكسر عند البعض الآخر و تعطينا شكل شبيهه بالحبيبات و في بعض الحالات تظهر هذه الأشكال صغيرة كثيرة العدد ومنها ما يحدث له استطالة كبيرة، وهناك عدة محفزات تحفز الخلية على التحول إلى أشكال L منها التراكيز العالية للمكونات العضوية مثل Glycine, L-phenylalanine, dL-methionine, Caffein, Raffinose، كذلك الأملاح المعدنية الخفيفة و الجرعات تحت القاتلة للأملاح المعدنية الثقيلة تحت على انتفاخ كل الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام العصوية و الكروية و أحيانا البكتريا الموجبة لصبغة كرام

العصوية و الكروية، كذلك عند التبريد، ويعتقد أن هذه الأشكال تنجز وظيفة جينية هي إعادة تنظيم الخصائص الوراثية للسلاسل المتحولة. (٢٦)

أشار (٣١) بأن أشكال L الجرثومية تظهر تحت المجهر غالبا أعرض ب ٢ ملمتر من ناحية القطر وزيادة في العدد الحيوي خلال ٦ ساعات من النمو عن الشكل الأصلي.

بينت النتائج إن استخدام المضاد الحيوي بتركيز ١٢.٥ ملغم/لتر مع التراكيز المختلفة من  $MgSO_4$  أظهرت تأثير على النوع *Klebsiella pneumoniae* يليها النوع *Escherichia coli* بنفس التراكيز أعلاه، ولقد بينت النتائج بأن *Escherichia coli* أظهر تأثير أكبر عند استخدام  $CaCl_2$  مع المضاد الحيوي يليه النوع *Klebsiella pneumoniae*. عند استخدام كلا المعدنين ظهر تباين بين النوعين *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* بينما لم يظهر النوعين الآخرين *Staphylococcus aureus* و *Streptomyces albidoflavus* نمو على كل ما ذكر أعلاه، وهذا ما أوضحه (١٦) حيث درس تأثير التراكيز المختلفة للكالسيوم لل نوع *Escherichia coli* إذ لاحظ ازدياد في مستويات  $Ca^{++}$  الداخل الخلية أثناء عملية الانقسام الخلوي وعند حدوث تغيرات في الظروف البيئية المختلفة و بين بأن  $Ca^{++}$  دور فعال في تنظيم دورة حياة الخلية عن طريق تعديل البروتين المسيطرة على الأنزيمات الهيكلية، ان اشكال L الجرثومية لهذه البكتريا الفاقدة لطبقة الببتيدوكلايكان الطبيعية تستطيع ان تنمو و تنقسم وعندما يفقد الوسط  $Ca^{++}$  سوف تتوقف الخلية عن الانقسام، وتصبح كروية و تنتفخ وقد تكون تجاوبف ومن ثم تتحلل عندما يستنزف وجود  $Ca^{++}$  في الوسط تصبح الخلايا طويلة، مكونة أشكال خيطية متعددة الانوية، إن التراكيز العالية من  $Ca^{++}$  تتداخل مع و تؤثر على اتجاه دوران الاسواط البكتيرية حيث إن الزيادة تعمل على قلب البكتريا بينما التراكيز المنخفضة منه تجعلها تسبح و عندما يتم اعادة وضع  $Ca^{++}$  في الوسط فان الخلية ستبدا من جديد بالنمو. (٢، ١٤، ١٥، ٣٢، ٣٣)

لقد بين (١٧) بأن التراكيز الداخل خلوية لـ  $Mg^{++}$  تظهر تشابها عند البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام لذلك فهو من الاحتياجات المهمة للنمو و لايمكن ان يعوض عنه باي ايون اخر ، ويلعب  $Mg^{++}$  دور مهم في عملية النقل الفعال عبر الاغشية ، يعد  $Mg^{++}$  عاملا مساعدا رئيسيا لعدد من الانزيمات المشاركة في عملية التخليق الحيوي لطبقة الببتيدوكلايكان ، لهذا من المحتمل ان يدخل  $Mg^{++}$  في تفاعلات متداخلة مع انزيمات تخليق الجدار الخلوي ، بينما لا يظهر بان هنالك دور لـ  $Ca^{++}$  في هذه العملية ، ماعدا دوره في عملية تكوين السبورات اذ ان ك ل من  $Ca^{++}$  و  $Mg^{++}$  جزءان مهمان في جدار الخلية. (١١)

عند نقص  $Ca^{++}$  مع وجود وفرة من  $Mg^{++}$  تسبب اختزال معدل النمو البكتيري ، اما عند نقص أيون  $Mg^{++}$  أقل من 0.1 mmol فنلاحظ حدوث استطالة للخلية البكتيرية ، عندما يقل تركيز  $Ca^{++}$  عن 0.25 mmol تنتفخ الخلية البكتيرية وتكون فجوات. (١٠)

إن النتائج التي حصلنا عليها مشابهة لما وصل إليه (٢٠) حيث أوضحنا بان  $CaCl_2$  من الاحتياجات الضرورية للنمو و لا يمكن أن يعوض بـ  $MgSO_4$  ، وان البيئة الحاوية على كل المستويات من  $MgSO_4$  غير قادرة على حث البكتريا للتحول الى أشكال L الجرثومية من دون إضافة  $CaCl_2$  ، والتركيز النموذجي لإضافته هو ٠.١٥% ولإضافة  $MgSO_4$  هي ٠.٠٥% إن التراكيز الأعلى و الأدنى من هذا التركيز تعطي كمية اقل من أشكال L الجرثومية.

لقد بين (٣٤) ان الاحتياجات لـ  $MgCl_2$  استطاع ان يستبدلها بـ  $MnCl_2$  و تراكيز قليلة من  $CaCl_2$  ، يعتقد بان للكور دور في تثبيط تكوين اشكال L الجرثومية، ومن المعروف ان ايونات  $Mg^{++}$  تنظم البروتوبلاست و ايونات  $Ca^{++}$  تستطيع ان تحل محل الاحتياجات الضرورية للخلية و اقترح الباحث أن اغشية أشكال L لبكتريا *Escherichia coli* تمتلك موقعين محددين الأول مملؤ او اكثر فعالية مملؤ بالـ  $Ca^{++}$  اكثر من  $Mg^{++}$  و بزيادة تركيز ايونات  $Mg^{++}$  أكثر من ٠.٠٥% تؤدي الى تنافسها مع ايونات  $Ca^{++}$  على الموقع الأخير وفي حال كون التأثير اقل للـ  $Ca^{++}$  من زيادة تركيز  $Mg^{++}$  يؤدي إلى كبح أشكال L الجرثومية بالنهاية، إضافة  $Ca^{++}$  و  $Mg^{++}$  لا تعطينا القدرة للحصول على أشكال L الجرثومية مستقرة، وأخيرا أشكال L تحتاج إلى  $Ca^{++}$  لغرض الحث و النمو و  $Mg^{++}$  لغرض التحفيز. (٢٠)

ولقد استنتج من هذا البحث بان  $Ca^{++}$  و  $Mg^{++}$  مهمان و ضروريان لغرض تكوين أشكال L و خاصة عندما تنمى البكتريا في وسط ذو ازموزية عالية باستعمال الأملاح أو السكروز وكل هذا مهم من اجل معرفة ضراوة البكتريا و مقاومتها لدفاعات الجسم و بقاء الأمراض أو الحالة المزمنة وان الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام متباينة من حيث تأثرها  $Ca^{++}$  و  $Mg^{++}$  حيث أن البكتريا السالبة لصبغة كرام قد تأثرت بصورة واضحة ومميزة عن البكتريا الموجبة لصبغة كرام م وقد يعزى هذا التباين إلى طبيعة تركيب الجدار الخلوي لكل منهما إذ طبقة الببتيدوكلايكان في البكتريا الموجبة لصبغة كرام تكون اسمك من تلك الموجودة في السالبة لصبغة كرام مما قد يجعلها أكثر تأثرا أو أن المضاد الحيوي المستخدم ذو تأثير قليل على البكتريا الموجبة لـ كرام عندما تكون قد تحولت إلى أشكال L بفعل وجود  $Ca^{++}$  و  $Mg^{++}$  ، أو البكتريا السالبة لـ كرام التي عادة لا تتأثر بهذا المضاد تصبح أكثر تأثرا به عند وجود تراكيز معينة من  $Ca^{++}$  و  $Mg^{++}$  في الوسط.



## المصادر

- 1) Klieneberger, E. (1935). The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J.Path.Bact. Vol.* 40: 93-105.
- 2) Freestone, P.; Grant, S.; Trinei, M.; Onoda, T. and Norris, V. (1998). Protein Phosphorylation in *Escherichia coli* L. forms NC-7. *Microbiology. Vol.* 144: 3289-3295.
- 3) Leaver, M.; Dominguez-Cuevas, P.; Coxhead, J. M.; Daniel, R. A. and Errington, J. (2009). Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature, International weekly journal of science. Vol.* 457: 849- 853.
- 4) Singleton, P. and Sain Sbury, D. (2006). "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology". 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley and Sons Ltd. England.
- 5) Amy, Proal. (2007). Understanding L-forms Bacteria. Bacteriality-Exploring chronic disease: <http://bacteriality.com/2007/08/15/l-forms/>
- 6) Innes, C. M. J. and Allan, E. J. (2001). Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-forms bacteria. *Journal of Applied Microbiology. Vol.* 90: 301-308.
- 7) Shingaki, R.; Kasahara , Y.; Iwano , M.; Kuwano , M.; Takatsuka , T.; Inoue, T.; Kokeguchi, S. and Fukui, K. (2003). Induction of L-forms – like cell shape change of *Bacillus subtilis* under micro-culture conditions. *Microbiology. Vol.* 149: 2501- 2511.
- 8) Mattman, L. H. (2001). Definitions. "In cell wall deficient forms: Stealth pathogens", 3<sup>rd</sup> ed., Pp. 9-12. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 9) Pierce, C. H. (1942). *Streptobacillus moniliformis* its associated L1 form and other pleuropneumonia – like organisms. *J. Bacteriol. Vol.* 43: 780.
- 10) Vincent, J. M. (1962). Influence of Calcium and Magnesium on the growth of *Rhizobium spp.* *J. Gen. Microbiol. Vol.* 28: 658-668.
- 11) Horwitz, A. H. and Casida, L. E. (1978). Effect of Magnesium, Calcium and Serum on reversion of stable L-forms. *Journal of Bacteriology. Vol.* 136(2): 565 – 569.
- 12) Ghuyesen, J. M. and Shockman, G. D. (1973). Bacterial membranes and walls. Marcell Dekker, Inc., New York, USA.
- 13) Landman, O. E.; Ryter, A. and Frehel, C. (1968). Gelatin – induced reversion of protoplasts of *Bacillus subtilis* to the bacillary form:

- electron microscopic and physiological study. *J. Bacteriol.* 96: 2154 – 2170.
- 14) Ordal, G. W. (1977). Calcium ion regulators chemo tactic behavior in bacteria. *Nature. Vol.* 270: 66 – 67.
  - 15) Yu, X. and Margolin, W. (1997). Ca<sup>+2</sup>- mediated GTP- dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J. Vol.* 16: 5455 – 5463.
  - 16) Onoda, T.; Enokizono, J.; Kaya, H.; Oshima, A.; Freestone, P. and Norris, V. (2000). Effects of calcium and calcium chelators on growth and morphology of *Escherichia coli* L – for NC-7. *Bacteriol. Vol.* 182: 1419 – 1422.
  - 17) Silva, M. (2005). Role of ionized calcium and magnesium in cellulose degradation by ruminal bacteria. Dissertation of Doctorate. The Ohio State University. USA.
  - 18) Willey, J. M.; Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley and Klein's "Microbiology". 7<sup>th</sup> ed. McGraw Hill Higher Education.
  - 19) Collee, G. J.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996). "Practical Medical Microbiology". 14<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone.
  - 20) Makemson, J. and Darwish, R. (1972). Calcium requirement and magnesium stimulations of *Escherichia coli* L-forms induction. *American Society for Microbiology. Vol.* 6(5): 880 – 882.
  - 21) Rollins, D. M. and Joseph, S. W. (2000). Pathogenic Microbiology (Minimal Inhibitory Concentration). University of Maryland. USA.
  - 22) Hogg, S. (2005). "Essential Microbiology". John Wiley and Sons Ltd. England. U.K. P. 367.
  - 23) Molander, C. W.; Kagan, B. M.; Weinberger, H. J.; Heimlich, E. M. and Busser, R. J. (1964). Induction by antibiotics and comparative sensitivity of L – phase variants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology. Vol.* 88(3): 591- 594.
  - 24) Gilpin, R. W. and Paterson, S. K. (1976). Adaptation of a stable L – form of *Bacillus subtilis* to minimal salt medium without osmotic stabilizers. *Journal of Bacteriology. Vol.* 125: 845 – 849.
  - 25) Montgomerie, J. L.; Kalmanson, G. M. and Hubert, E. G. (1972). Osmotic stability and sodium and potassium content of L – forms of *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology. Vol.* 110: 624 – 627.
  - 26) Dienes, L. and Weniberger, H. J. (1951). The L- forms of Bacteria. *Bacteriol. Rev. Vol.* 15: 245 – 288.
  - 27) Marston, J. (1961). Observation on L- forms of Staphylococci. *J. Infect. Diseases. Vol.* 108: 75 – 84.

- 28) Butler, H. M. and Blakey, J. L. (1975). A review of bacteria in L – phase and their possible clinical significance. *Med. J. Vol. 2(12):* 463 – 467.
- 29) White, C. J.; Horsman, M. R.; Rowe, P. S. and Howelles, K. F. (1978). Cell wall characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* and its carbenicillin – induced L – forms. *Acta. Boil. Acad. Sci. Vol. 29(1):* 67 – 74.
- 30) Panos, C.; Cohen, M. and Fagan, G. (1966). Lipid alternations after cell wall inhibition. Fatty acid content of *Streptococcus pyogenes* and derived L – form. *Biochemistry. Vol. 5:* 1461 – 1468.
- 31) Gilpin, R. W.; Paterson, S. K. and Knight, R. A. (1981). Quantitation of *Bacillus subtilis* L – form growth parameters in Batch culture. *Journal of Bacteriology. Vol. 145(1):* 651 – 653.
- 32) Joseleau – Petit, D.; Liebart, J.; Ayala, J. and Ari, R. (2008). Unstable *Escherichia coli* L- forms revisited: growth requires peptidoglycan synthesis. *Journal of bacteriology. Vol. 10.1128:* 00273-07.
- 33) Dehority, B. A. (2003). Chapter 8. Cellulose digesting reumen bacteria. In: *Rumen Microbiology*. Nottingham. University Press, U. K. Pp. 177 – 208.
- 34) Landman, O. E.; Altenbern, R. A.; Ginoza, H. S. (1958). Quantitative conversion of cells and protoplasts of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* to the L- form. *J. Bacteriol. Vol. 75:* 567 – 576.