Isolation and Identification The Actinomycetes From Soil and Its Effect on Human Fungi

عزل وتشخيص الاكتينوميسيتات من التربة وتأثيرها في الفطريات الممرضة للإنسان

ندیم احمد رمضان[1] فرح خالد الفیل[2]
(1) قسم علوم الحياة -كلية العلوم nadeem.ramadan53@yahoo.com
(2)وزارة الصناعة و المعادن-الشركة العامة لصناعة , الادوية والمستلزمات الطبية نينوى.

الخلاصة

تم الحصول على 109 عزلة من الاكتينوماسيتات Actinomycetes من 140 عينة تربة جمعت وعلى مدى ثلاثة اشهر ابتداء من 10-1-2010 من مناطق مختلفة من محافظة نينوى ودهوك واربيل وكركوك وتكريت وبغداد والنجف وكربلاء.

اظهرت نتائج التشخيص بتقنية الشريحة الزجاجية والتشخيص بواسطة الاختبارات الكيموحيوية والانزيمية وجود العزلات والاجناس التالية : 69 عزلة تابعة لجنس *Streptomyces* و27 عزلة تابعة لجنس *Streptoverticillum* و7عزلات تابعة لجنس *Nocardia* وعزلة واحدة تابعة للجنس *Rhodococcus* و5 عزلات لم تشخص لصعوبة نموها على الاوساط التشخيصية والكيموحيوية. وان العزلة المنتجة التي ثبطت اكبر عدد من فطريات الاختبار شخصت الى مستوى النوع وكانت *Streptomyces purpureus*. اظهرت 6 عزلات منها قابليتها على انتاج المضاد الفطري ضد الفطريات المستخدمة في الاختبار وهذه العزلات هي MUAc.1، MUAc.2، MUAc.3، MUAc.4، MUAc.5، MUAc.6 وتعود للجنس *Streptomyces* .

كان للعزلة MUAc.3 القدرة على تثبيط اكبر عدد من فطريات الاختبار حيث ثبطت نمو 27 فطراً من مجموع 28 فطر و اثرت على جميع الفطريات الممرضة للانسان باستثناء الفطر *Aspergillus flavus*. تليها العزلات MUAc.1 وMUAc.2 وMUAc.5 ثبطت كل منهما نمو 9 فطريات, والعزلة MUAc.4 ثبطت نمو 7 فطريات واخيرا العزلة MUAc.6 ثبطت نمو 6 فطريات.

كان أعلى تثبيط للمضاد الفطري المستخلص من العزلةMUAc.3 هو على الفطر *A.amstelodami* إذ بلغ 36 ملم وللـ Nystatin33 ملم في حين كان اقل تثبيط للمضاد الحيوي المستخلص من العزلة MUAc.3 هو على الفطر *A.candidus* وبلغ 21 ملم وللـ Nystatin24 ملم.

من خلال الفعالية المعلومة للـ Nystatin والبالغة 8500 وحدة دولية/ ملغم (I.U./mg) وباستخدام الطريقة الدوائية الدستورية تم قياس فعالية المضاد الفطري المستخلص من العزلة MUAc.3 وكانت (10455) وحدة دولية /ملغم باستخدام الفطر *A.amstelodami*.

Summary

One hundred and nine isolates of actinomycetes were obtained from 104 soil sample, collected over three months during 10-01-2010 from different regions of the province of Nineveh,Duhok,Irbil,Kirkuk,Tikrit, Baghdad, Najaf and Karbala.

Results of diagnosis by Slide Culture Technique and by biochemical and enzymatic test have showed the existence of the following isolates and races (69 isolates belong to the genus of *Streptomyces*, 27 isolates belong to the genus of *Streptoverticillum*, 7 isolates belong to the genus of *Nocardia* and one belong to the genus of *Rhodococcus*, and 5 isolates have not been diagnosed because of the difficulty of growth on the diagnostic and biochemical media). The productive isolate which have inhibited the largest number of fungi have been diagnosed to the level of species was *S.purpureus.*

Six isolates of which have showed their ability to produce antifungi used in the test. These isolates are: MUAc.1, MUAc.2, MUAc.3, MUAc.4, MUAc.5 and MUAc.6 which belong to the genus of *Streptomyces*.

The isolate MUAc.3 had the capacity to inhibit the greatest number of tested fungi where it effect of the growth of 14 human pathogenic fungi , that's to say 27 fungi out of 28 ,The isolate MUAc.3 affected all tested fungi except *Aspergillus flavus* fungi. Following by isolates MUAc.1 ,

MUAc.2 , MUAc.5 which inhibited the growth of 9 human pathogenic fungi , isolate MUAc..4 inhibited the growth of 7 human pathogenic fungi, and finally isolate MUAc.6 inhibited the growth of 6 human pathogenic .

The highest inhabitation to the extracted antibiotic from isolate MUAc.3 was on the fungi of *A.amstelodami* where it reached 36mm for Nystatin which was used for the comparison. the lowest inhabitation for the antibiotic extracted from isolate MUAc.3was on *A.candidus*. (21 mm) and with Nystatin 24 mm .

The effectiveness of the antibiotic extracted from isolate MUAc.3 was (10455) IU/mg, it was measured by using the given effectiveness of *Nystatin* amounting 8500 IU/mg by using constitutional pharmaceutical method. This was done by using *A.amstelodami* fungi. Isolate MUAc.3 diagnosed to the level of species *S.purpureus*.

المقدمة

نظرا للارتفاع السريع في مستويات الاصابة بالامراض الفطرية التي تصيب الانسان والنبات، ومع تزايد مقاومة الفطريات للمبيدات بمعدل ينذر بالخطر، فقد حدث تطور في مجال تصنيع المبيدات للفطريات، الا ان هذه المبيدات قد تكون غالية الكلفة، وان الاستعمال العشوائي والمستمر لها يؤدي الى العديد من التأثيرات الجانبية فضلا عن ازدياد عدد العزلات الفطرية المقاومة لتلك المبيدات ولمحاولة تقليل الاعتماد على المبيدات الكيمياوية المنتجة صناعيا، فإن الطلب متزايد لايجاد مضادات فطرية جديدة وآمنة مع اعراض جانبية أقل، لذا فان البديل الافضل لتلبية هذه الحاجة المتزايدة لمضاد فطري آمن وقليل الكلفة، هي المنتجات المستخلصة طبيعيا والتي ينتجها عدد من انواع الاحياء المجهرية بكميات ضئيلة من خلال مسارات ايضية محددة تتضمن سلسلة من التفاعلات بوجود انزيمات متخصصة يطلق عليها عمليات الايض الثانوي Secondary Metabolism (1). فضلاً عن هذا فإن العديد من المضادات الحيوية المنتشرة في الاسواق تعد المضادات الفطرية مجموعة قليلة على الرغم من انها مجموعة مهمة ومميزة من العقاقير وتلعب دورا مهما في السيطرة على الامراض الفطرية (2).

أوجب التقدم الهائل في مجالات العلوم المختلفة البحث عن مصادر رخيصة ووفيرة لسد الحاجات المتجددة للمزيد من السكان، ولما كانت الاحياء المجهرية قادرة على انتاج مواد ذات قيمة اقتصادية عالية اقتضى البحث عن الكثير في هذا المجال، ومنها المضادات الحيوية وهي احدى المنتجات الميكروبية التي لها اهمية كبيرة في حياتنا اليومية من النواحي الصحية للانسان والحيوان وفي السيطرة على امراض النبات المختلفة، تنتشر الاحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية بصورة واسعة في الطبيعة، وتعد التربة المصدر الرئيس لعزل الكثير منها، ويتم عادة اختبار قدرة الاحياء المجهرية المعزولة من مصادرها المختلفة على انتاج مضادات حيوية من خلال معرفة تأثيرها التضادي على أحياء مجهرية أخرى تعرف بأحياء الاختبار Test Organisms (3).

تعد الاكتينومايسيتات من الاحياء المجهرية التي تسكن في التربة ولها قابلية لم يسبق لها مثيل في انتاج مضادات حيوية لها استعمالات طبية واسعة (4)، إذ أن أغلب المضادات الحيوية الميكروبية المكتشفة لحد الان مصدرها من الاكتينومايسيتات التي تنتج نطاقا واسعا من المواد الايضية، وان اكثر من 70% من المضادات الحيوية المأخوذة من الطبيعة والمستعملة سريريا في الطب في الوقت الحالي هي من الاكتينومايسيتات (5).

احتلت الاكتينومايسيتات مكانة مهمة في البيئة من خلال قدرتها على انتاج العديد من الانزيمات المحللة للمواد العضوية المعقدة الموجودة في التربة والناتجة من بقايا النباتات والحيوانات والحشرات والبكتريا (6) فضلاً عن انتاجها مركبات كيميائية متنوعة ذات نطاق واسع من النشاطات الحيوية (7و8). كانت الاكتينومايسيتات مجموعة متوسطة ما بين البكتريا والفطريات لكنها فيما بعد عدت ضمن البكتريا واحتلت مكانا مميزا (9).الاكتينوميسيتات موجبة لصبغة كرام، تكون خيوط متفرعة يطلق عليها الهايفات، مستعمراتها جلدية او طباشيرية او شمعية او مخاطية تكون مستعمراتها غائرة في الوسط الزرعي وتكون غزلاً هوائياً وارضياً أو أرضياً فقط، تظهر المستعمرة بألوان مختلفة وتنتج صبغات داخلية تمثل لون المستعمرة او صبغات خارجية تنتشر في الوسط الزرعي (10).تمثل افراد جنس *Streptomyces* حوالي 80% من مجموعة الاكتينومايسيتات الموجودة في التربة (11). وان حوالي 80% من النواتج الطبيعية للاكتينومايسيتات هي من حصة جنس *Streptomyces* على وفق ما ذكره الباحثان Bull و Stach (12).الهدف من الدراسة: عزل وتشخيص الاكتينومايسيتات المعزولة من عينات التربة و تحديد قدرة الاكتينومايسيتات على تثبيط الفطريات الممرضة للانسان .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Samples Collection

جمعت 140عينة تربة (نصف كغم/عينة) وعلى مدى 3 اشهر وخلال عام 2010 لعزل الاكتينومايسيتات من أنحاء ومناطق مختلفة من محافظة نينوى ودهوك واربيل وكركوك وتكريت والنجف وكربلاء وبغداد، وتضمنت هذه العينات ترب لحدائق منازل ومدارس وجامعات ومستشفيات وكذلك ترب حقول لتربية الاغنام والابقار وحقول دواجن ومزارع تابعة لأقضية ونواحي وقرى مختلفة تعود اغلبها لمحافظة نينوى وأطراف بحيرة سد الموصل وحواف نهر دجلة.أخذت عينات التربه بعد ازالة الطبقة السطحية

من التربه(5سم) وعلى عمق5-15سم ووضعت في أكياس من البولي اثيلين وأُغلقت بإحكام ثم وضعت في الثلاجة لحين الإستعمال (3).

العزل من التربة

عوملت التربة مسبقا بمادة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ بنسبة 10: 1 وزن/ وزن (تربه:$CaCO_3$). وحضنت في الحاضنة في درجة حرارة 37°م لمدة 4 أيام لغرض التجفيف، وبعد انتهاء فترة التحضين تم عمل معلق من التربة بإستعمال محلول رنكر المعقم وذلك بإضافة 1 غم من التربة إلى 9 مل من المحلول في انبوبة اختبار نظيفة ومعقمة فتم الحصول على التخفيف 10^{-1} والذي نقل منه 1 مل إلى أنبوبة اختبار ثانية تحتوي ايضاً على 9 مل من المحلول المذكور، كررت العملية إلى حد التخفيفة 10^{-4} اخذ 0.5 مل من التخفيف 10^{-3} و10^{-4} ووضع في أطباق بتري معقمة ثم أضيف لكل طبق20 مل تقريبا من وسط العزل الاوليGlycerol Yeast Extract Agar(GYEA)الذائب في درجة40°م ودورت الأطباق بهدوء لمزج المكونات(3 اطباق لكل عينة تربه) وحضنت بالحاضنة في درجة حرارة 28°م لمدة 7-14 يوم لحين ظهور نمو مستعمرات الاكتينومايسيتات. بعدها نقلت المستعمرات المنتخبة والتي كانت ذات مظهر اما تباشيري أو شمعي أو جلدي من المجموع الزرعي إلى أطباق حاوية على الوسط نفسه (GYEA) ثم حضنت في درجة 28°م ولمدة 7 أيام وبعد الحصول على عزلات نقية تم تحويلها إلى أنابيب حاوية على الوسط المائل نفسه وايضاً حُضِنَتْ لمدة 7 أيام في درجة حرارة 28°م، وبعدها حفظت بالثلاجة في درجة 4°م لحين إجراء الاختبارات التشخيصية واختبارات انتاج المضادات الفطرية عليها (13و14).

التشخيص Identification: شخصت عزلات الاكتينومايسيتات اعتمادا على الطرق التالية:

1- تقانة الزرع على الشريحة الزجاجية Slide Culture Technique

استعملت هذه التقنية لملاحظة الغزل الهوائيى والغزل الارضي وترتيب سلاسل السبورات للعزلات بإستعمال المجهر الضوئي، وقد تم اجراء هذه الطريقة التي اتبعها الاسعيد (15).وتم حساب النسبة المئوية للاكتينومايسيتات.

2- الاختبارات الكيموحيوية والإنزيمية والشكلية:

اجريت العديد من الطرق لغرض تشخيص الاكتينومايسيتات المعزولة ومنها استهلاك المصادر الكاربونية (16) واختبار تميع الجلاتين(6) و اختبار تحلل النشا (17) اختزال النترات(18) واختبار انتاج إنزيم اليوريز (19) واختبار انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين(20) و اختبار انتاج إنزيم الكتاليز (21) واختبار تحلل الاسكولين (22) واختبار تحلل الدم (23) واختبار إنتاج إنزيم اللسثنيز وتحمل الاكتينومايسيتات للتركيز 5 % و7% من ملح الطعام (22) وتأثير إستعمال أزايد الصوديوم والفينول (24 و25).

3- شكل النمو في الوسط السائل

لُقِحَ وسط Nutrient Broth Medium بحملة (loop) من مزرعة نقية للاكتينومايسيتات، وحضن في درجة حرارة 28°م لمدة 7 أيام. لوحظت التغيرات الحاصلة في شكل النمو وقدرة الاكتينومايسيتات على إنتاج الصبغات الخارجية الذائبة في الماء (3).

اختبار قابلية عزلات الأكتينومايسيتات على انتاج المضادات الفطرية

لغرض اختبار قابلية عزلات الأكتينومايسيتات على إنتاج المضادات الفطرية وبيان فعالياتها تجاه عدد من الفطريات الممرضة الانسان.

أ - وسط انتاج المضادات:

حُضِّر وسط إنتاج المضادات الحيوية باذابة (غم/ لتر): NaCl, 0.8 و NH4Cl,1 و KCl, 0.1 و K2HPO4, 0.1 و MgSO4.7H2O,0.2 و CaCl2, 0.04 و10 كلوكوز و3 مستخلص الخميرة في1 لترماء مقطر وباس هيدروجيني7.3 ووزع في دوارق زجاجية بمقدار50مل لكل دورق سدت الدوارق بإحكام بسدادات قطنية ، وغلفت برقائق الالمنيوم,ثم عقمت بجهاز المعقام. تركت الدوارق لتبرد ثم لُقِحَت بلقاح الاكتينومايسيتات المحضر بعمر 3أيام وبنسبة2 % (حجم/حجم) ووضعت الدوارق بالحاضنة الهزازة في درجة حرارة 28°م وبسرعة رج 140 دورة/ دقيقة ولمدة 7 أيام.

ب - تحضير لقاح عزلاتالأكتينومايسيتات

حُضِّر وسط اللقاح من مكونات وسط الانتاج والمذكور في الفقرة أ ووزِّع في دوارق زجاجية وبواقع 50 مل لكل دورق، عُقِمَ الوسط بجهاز المعقام في درجة حرارة 121°م وتحت ضغط 1.5 كغم / سم2 لمدة 15 دقيقة. بعد ذلك لُقِحَ الوسط بنقل جزء من مزرعة الاكتينومايسيتات النقية والنامية على وسط (GYEA) أوالنامية على وسط Glycerol Asparagine Agar (GAA) ثم وضعت الدوارق بالحاضنة الهزازة موديل SI-600R المصنعة في Korea من قبل شركة Medline في درجة حرارة 28°م وبسرعة رج 140 دورة/دقيقة ولمدة3 أيام (3).

الفطريات الممرضة:

تم الحصول على الفطريات التالية من بنك السلالات في قسم علوم الحياة – كلية العلوم–جامعة الموصل *Aspergillus clavatus,A.amstelodami,A.candidus,A.ochraceous,A.terricola,Emericella nidulansEupenicillium javanicum,Microsporum gypseum,Neosartorya*sp.,*Pencillium expansum,P.griesofulvumP.janthinellum,P.selerotigennm,Trichophyton mentagrophytes*.

تحضير العالق البوغي الفطري

بعد ان تم تنمية الفطريات المستعملة في الاختبار على أطباق بتري حاوية على وسط Potato Dextrose Agar(PDA) المعقم والمحضر باس هيدروجيني 5.6، أخذ بوساطة ثاقبة الفلين قرص من الفطر 4 ملم، ووضع في قنينة زجاجية صغيرة حاوية على 5 مل من الماء المقطر المعقم (مررت من خلال الشاش لاستبعاد الغزل الفطري) ورجت القنينة للحصول على توزيع متجانس من الابواغ.

التاثير التثبيطي للمضاد الفطري على الفطريات الممرضة المستعملة في الاختبار

أُفِحَتْ قناني زجاجية حاوية على 25 مل من وسط السابروید أكار المعقم والمحضر باس هيدروجيني 5.6 بـ 0.1 مل من العالق البوغي لكل فطر من الفطريات المستعملة في الاختبار بوساطة ماصة دقيقة معقمة مع الرج الجيد لضمان التوزيع المتجانس للابواغ مع الوسط ثم صبت في أطباق بتري معقمة وبعد أن بردت الأطباق استعملت طريقة الانتشار بحفر الأگار Well diffusion methodإذ تم عمل حفر بوساطة ثاقبة الفلين المعقمة في الطبق الملقح بالعالق البوغي الفطري ووضع في كل حفرة 100 مايكرو ليتر من المزرعة السائلة للاكتينومايسيتات. بعد ان تم تنميتها على وسط إنتاج المضادات الحيوية بالحاضنة الهزازة ولمدة 7 أيام في درجة حرارة 28°م. استعمل الماء المقطر المعقم لغرض المقارنة ثم وضعت الأطباق بهدوء في الحاضنة الاعتيادية في درجة حرارة 28°م ولمدة3 أيام، وبعد انتهاء فترة التحضين تم قياس مناطق تثبيط النمو (قطر التثبيط) حول الحفر في الطبق الملقح بالفطريات (26و27).

تم اختيار العزلة رقم MUAc3 والتي شُخصت على أنها *S. purpureus* (الفيل,2012) لكونها ذات تأثير مثبط لأكبر عدد من الفطريات . لقحت دوارق زجاجية حاوية على وسط انتاج المضادات الحيوية Antibiotics Production المعقم والمحضر باس هيدروجيني7.3 بلقاح العزلة MUAc3 وبنسبة 2 % (حجم/حجم) ووضعت الدوارق بالحاضنة الهزازة في درجة حرارة 28°م وبسرعة رج 140دورة/دقيقة ولمدة 7 أيام.

النتائج و المناقشة

العزل

تم الحصول على 109 عزلة تابعة للاكتينومايسيتات Actinomycetes من 140 عينة تربة (الجدول، 1).

اختيرت العزلات اعتمادا على الصفات الشكلية ومظهر المستعمرات على وسط GYEA ، وهذه كانت صفة اساسية عند العزل الأولي كما ذكر Holt وآخرون (28) وايليا (3).تمتاز الاجناس التابعة لمجموعة الاكتينومايسيتات بصعوبة العزل الأولي وصعوبة التشخيص وهذا ما تم ملاحظته من خلال دراستنا خلال فترة البحث، وهذا ما أشار إليه الباحث Holt وآخرون (28) وكذلك السماك (10)، والسبب في ذلك يعود إلى ان أغلب أفرادها يمتاز بظاهرة تعدد الاشكال إذ يتغير شكل ولون المستعمرة مما يؤدي إلى الشك والارباك في معرفة النوع المعزول، هذا فضلاً عن بطء نموها إذ تحتاج من 4-14 يوما للنمو، وبطء نموها يؤدي إلى انتشار الانواع البكتيرية سريعة النمو المتواجدة بشكل طبيعي في التربة مثل النوع *Bacillus* الذي يطغى على مستعمراتها، وبالتالي يصعب عزلها وتنقيتها وهذا يتفق مع ما أشار إليه السماك (10) والاسعيد (15). كان لمعاملة التربة بمادة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ بنسبة (1:10) وتجفيفها في درجة حرارة 37 مْ دوراً كبيراً في العزل الأولي، وذلك لان تجفيف التربة أدى إلى اختزال أعداد البكتريا الخضرية المتواجدة بشكل طبيعي في التربة من جهة، والى رفع قيمة الاس الهيدروجيني لتحديد نمو معظم الفطريات من جهة اخرى (29).تعد التربة بيئة طبيعية لتواجد الاكتينومايسيتات، وغالبا ما تكون أعلى نسبة للعزل من التربة، ولاحظنا تواجدها بشكل كثيف في مناطق تربية الحيوانات كالأغنام والابقار كونها غنية بالمواد العضوية وهذا ما ذكره ايضا Willey وآخرون (30).

اظهرت النتائج التشخيص بتقانة الشريحة الزجاجية والتشخيص بوساطة الاختبارات الكيموحيوية والإنزيمية وجود الاجناس التالية :69 عزلة تابعة لجنس *Streptomyces* و27 عزلة تابعة لجنس *Streptoverticillum* و7 عزلات تابعة لجنس *Nocardia*وعزلة واحدة تابعة للجنس *Rhodococcus* و5 عزلات لم تشخص لصعوبة نموها على الأوساط التشخيصية والكيموحيوية.وان أغلب العزلات تعود إلى جنس *Streptomyces* وقد ذكر Lee و Hwang (11) بأن افراد جنس *Streptomyces* تشكل80%من مجموع الاكتينوماسيتات المعزولة من التربة، في حين أن Prabavathy وآخرون (31) ذكر بأن جنس *Streptomyces* يمثل حوالي50 % من اكتينومايسيتات التربة، وفي دراستنا هذه كان جنس *Streptomyces* يشكل حوالي63% من اكتينومايسيتات التربة.

الجدول (1): مواقع العزلات النقية من الأكتينومايسيتات المعزولة من التربة و إنتاجها للصبغات.

ت	موقع عينة التربة	عدد العزلات المتحصل عليها	عدد العزلات المنتجة للصبغة	الملاحظات
1	حي الاندلس	1	-	-
2	مستشفى ابن الاثير	1	-	-
3	جامعة الموصل	3	-	-
4	حي النجار	2	-	-
5	حمام العليل	4	2 ميلانين	-
6	حي العربي	3	-	-
7	محافظة كركوك	1	-	-
8	مصنع أدوية نينوى	1	1 بنفسجي	-
9	مصنع أدوية نينوى	1	1 ميلانين	-
10	قرية كرمليس	3	1 ميلانين	-
11	حي المهندسين	1	-	-
12	حي عدن	6	-	-
13	حي الصديق	2	1 ميلانين	-
14	جامعة الموصل	2	-	-
15	حي المالية	5	2 ميلانين,2 بنفسجي	-
16	محافظة كربلاء	8	1 بنفسجي	-
17	قرية الدراويش	5	1 ميلانين	نمو كثيف جدا
18	ناحية ربيعة	2	1 أصفر	نمو كثيف جدا
19	حي دوميز	3	-	نمو كثيف
20	حي الثقافة	2	2 برتقالي	-
21	بحيرة سد الموصل	2	2 ميلانين	-
22	مزرعة -سد الموصل	6	4 ميلانين,1 أصفر	نمو كثيف جدا
23	بحيرة سد الموصل	2	-	-
24	محافظة تكريت	2	1 أصفر,1 برتقالي	-
25	محافظة تكريت	3	1 ميلانين	-
26	سنجار	4	1 ميلانين ,2 برتقالي	نمو كثيف
27	منطقة تلعفر	1	-	-
28	مستشفى الجمهوري	3	1 ميلانين	-
29	قرية تل سمير(ربيعة)	1	-	-
30	مشروع الري (ربيعة)	2	2 ميلانين	-
31	جامعة الموصل	4	2 ميلانين	-
32	منطقة الرشيدية	7	4 ميلانين,1 برتقالي	نمو كثيف جدا
33	قرية الخضرانية	1	-	-
34	قرية شكرا	4	3 ميلانين	-
35	قرية جوعانة	2	1 ميلانين	-
36	قرية جمسة	2	1 ميلانين	-
37	قرية الجرناف	2	-	-
38	منطقة الرشيدية	1	-	-
39	قرية وادي قوجا	4	1 ميلانين1, أصفر	-

إنتاج المضادات الحيوية

اختبرت قدرة كل عزلة من 109 عزلات التابعة للاكتينومايسيتات على إنتاج المضاد الفطري ضد 28 فطر ممرض للإنسان .اظهرت6 عزلات منها قابليتها على إنتاج المضاد الفطري ضد الفطريات في الاختبار وهذه العزلات هي1.MUAc،2.MUAc،3.MUAc،4.MUAc،5.MUAc،6.MUAc وتعود للجنس *Streptomyces* والجدول (2) يوضح مواقع عينات التربة المعزولة منها، وعدد الفطريات التي تم تثبيط نموها من قبل كل عزلة من العزلات المنتجة ونوع الصبغة المنتجة من قبل العزلة.إن العزلة المنتجة للمضادات الفطرية التي ثبطت أكبر عدد من فطريات الاختبار شخصت إلى مستوى النوع وكانت *S.purpureus*. تمتاز الاكتينومايسيتات بإنتاجها للمضادات الفطرية ضد العديد من الفطريات، وفي دراسة El-Tarabily وآخرون، (32) وجد أن عزلات الـ *Streptomyces* المعزولة من التربة لها القدرة على إنتاج إنزيم chitinase وبالتالي تحلل الجدر الخلوية للفطريات. فضلاً عن وسائل اخرى تعمل من خلالها المضادات الحيوية على تثبيط نمو أو قتل الاحياء المجهرية، وأشار إلى ذلك Brooks وآخرون (33) ومنها تثبيط وظيفة الغشاء البلازمي مثل Nystatin الذي يكون معقدات مع مكونات الغشاء البلازمي مسببا بذلك خللا في وظيفة الغشاء البلازمي أو قد تعمل المثبطات على أحداث خلل في عملية تصنيع البروتين، وبالتالي يحدث خطا في قراءة المعلومات الوراثية التي يحملها الحامض النووي المراسل mRNA وبالتالي تكوين بروتين غير قادر على اداء وظائف الخلية الحية، أو قد تعمل المضادات الحيوية على تثبيط تكوين الاحماض النووية من خلال

ارتباطها بإنزيمات معينة مثل إنزيم RNA polymerase وبالتالي أحداث خلل في تكوين الاحماض النووية سواء DNA أو RNA.

الجدول (2) عزلات الاكتينومايسيتات المنتجة للمضداد الفطرية ضد الفطريات الممرضة.

رقم العزلة	موقع عينة التربة المعزولة منها العزلات المنتجة	عدد الفطريات المثبط نموها	إنتاج الصبغة	التشخيص
MUAc.1	حي المهندسين	9	غير منتجة	*Streptomyces*
MUAc.2	حي الصديق	9	غير منتجة	*Streptomyces*
MUAc.3	حي المالية	14	صبغة الميلانين	*S. purpureus*
MUAc.4	منطقة كارة في سنجار	7	برتقالي	*Streptomyces*
MUAc.5	منطقة الرشيدية	9	صبغة الميلانين	*Streptomyces*
MUAc.6	قرية الجرناف تابعة لقضاء الشرقاط	6	غير منتجة	*Streptomyces*

الجدول (3) يوضح التأثير التثبيطي للمضاد الفطري المنتج من قبل العزلة MUAc.3 بعد الاستخلاص والتنقية ضد عدد من الفطريات الممرضة المستعملة في الاختبار بإستعمال المضاد الفطري Nystatin المعلوم الفعالية للمقارنة وكان أعلى تثبيط للمضاد الحيوي المستخلص من العزلة MUAc.3 هو على الفطر *A.amstelodami* إذ بلغ 32 ملم وكان اقل تثبيط للمضاد الفطري المستخلص من العزلة MUAc.3 هو على الفطر *A.Terricola* وبلغ 12 ملم.

الجدول (4) يوضح التأثير التثبيطي للمضاد الحيوي المنتج من قبل العزلة MUAc.3 ضد عدد من الفطريات الممرضة المستعملة في الاختبار بإلمقارنة مع المضاد الحيوي Nystatin المعلوم الفعالية وكان أعلى تثبيط للمضاد الحيوي المستخلص من العزلةMUAc.3 هو على الفطر *A.amstelodami* إذ بلغ 36 ملم و للـ Nystatin33 ملم في حين كان اقل تثبيط للمضاد الحيوي المستخلص من العزلة MUAc.3 هو على الفطر *A.candidus* وبلغ 21 ملم وNystatin 24 ملم (الجدول,5). ومن خلال الفعالية المعلومة للـ Nystatin والبالغة 8500 وحدة دولية /ملغم (I.U./mg) وبإستعمال الطريقة الدوائية الدستورية تم قياس فعالية المضاد الحيوي المستخلص من العزلة MUAc.3 وكانت (10455) وحدة دولية/ملغم بإستعمال الفطر *A.amstelodami*.

الجدول (3) يوضح قدرة عزلات الاكتينومايسيتات على تثبيط نموعدد من الفطريات الممرضة للإنسان*

الفطريات / العزلات المنتجة للمضاد الحيوي	*Eupenicillium javanicum*	*Penicillium griesofulvum*	*Penicillium expansum*	*Penicillium janthinellum*	*Penecillium selerotigenum*	*Aspergillus candidus*	*Aspergillus terricola*	*Aspergillus clavatus*	*Aspergillus ochraceous*	*Neosartorya sp.*	*Emericella nidulans*	*Microsporum gypseum*	*Trichophyton mentagrophytcs*	*Aspergillus amstelodami*
MUAc.1	0	11	21	15	15	17	0	0	0	19	17	0	20	19
MUAc.2	0	0	20	0	19	13	0	10	0	13	22	20	24	17
MUAc.3	27	19	35	31	21	16	20	18	13	12	27	13	22	32
MUAc.4	0	0	0	0	18	19	11	0	0	0	13	15	22	25
MUAc.5	12	0	16	19	20	0	0	15	0	0	17	11	21	37
MUAc.6	15	0	14	13	0	0	0	0	0	0	20	18	0	20

*
قطر منطقة التثبيط (ملم). النتائج لثلاثة مكررات . استخدم الماء المقطر المعقم للمقارنة.

الجدول (4) قدرة المضاد الفطري النقي المستخلص من العزلةMUAc.3على تثبيط الفطريات الممرضة للإنسان

الفطريات الممرضة للإنسان	قطر التثبيط ملم
Aspergillus clavatus	23
Aspergillus amstelodami	36
Aspergillus candidus	22
Aspergillus ochraceous	14
Aspergillus terricola	12
Emericella nidulans	29
Eupenicillium javanicum	31
Microsporum gypseum	19
Neosartorya sp.	14
Pencillium expansum	30
Pencillium griesofulvum	20
Pencillium janthinellum	26
Pencillium selerotigennm	25
Trichophyton mentagrophytes	27

الجدول(5) مقارنة المضاد الحيوي المستخلص من العزلةMUAc.3 مع المضاد Nystatin ضد الفطريات.

الفطر	قطر التثبيط (ملم)	
	المضاد الحيوي المستخلص من العزلة MUAc.3	Nystatine
Aspergillus amstelodami	36	33
Aspergillus candidus	21	24
Penicillium janthinellum	28	26

المصادر

(1) مصطفى، بري لطيف محمد (2009). دراسة وبائية وتشخيصية للفطريات الجلدية في مدينة كركوك ومعالجتها. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة تكريت.

(2) Strohl, W. R. 1997.The Biotechnology of Antibiotics, *2nd ed*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-48.

(3) ايليا، سهى سليمان (2008). عزل وتشخيص النوع *Streptomyces lavendulae* من التربة ودراسة الظروف المثلى لانتاج المضادات الحيوية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل. الموصل, العراق.

(4) William, F. and RJ. Paul, 2006. Developing anew resource for drug discovery: Marine actinomycetes bacteria. Nat. Chem. Biol., 2: 666-673.

(5) Pimentel- Elardo, S. M., Kozytska, S., Bugni. T. S., Ireland, C. M., Moll, H. and Hentschel, U., 2010. Anti-parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean sponges. Marine Drugs, 8: 373-380.

(6) Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed., McGraw-Hill companies, U. S. A pp. 992.

(7) Bredholt,H.Fjaervik,E.Johnsen,G. and Zotchev, B. (2008). Actinomycetes from Sediments in Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological activity Marine Drugs, 6: 12-24.

(8) Prieto-Davo, A. Fenical, W. (2008). Comparative actinomycete diversity in marine sediments Aquat. Microb. Ecol. 52: 1-11.

(9) Pandey, B. Chimire, P. Agrawal VP (2004). Studies on the antimicrobial activity of actinomycetes isolated from khumbu region of Nepal. PhD dissertation, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal.

(10) السماك، اسراء غانم(2006). دراسة تصنيفية لمجموعة البكتريا الخيطية. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل, العراق.

(11) Lee, J. Y. and Hwang, B. K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol., 48:407-417.
(12) Bull, A. T. and Stach, J. E. (2007) Marine actinobacter: New opportunities for natural product search and discovery Trends. Microbiol. 15: 491-499.
(13) Sahin, N. and Ugar, A. (2003). Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. Turk. J. Biol., 79-84.
(14) Oskay, M. Tamer, A. U. and Azeri, C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soil of turkey. Afr. J. Biotech., 3:411-446.
(15) الاسعيد، رنا صلال حسن (2009). عزل بعض انواع البكتريا الخيطية من الاشخاص المعرضين لفرط التحسس الرئوي وبيئتهم في الموصل، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل/العراق.
(16) Williams, S. T., Goodfellow, M., Wellington, E. M. H., Vickers, J. C., Alderson, G., Sneath,P.H.A., Sackin, M.J.and Mortimer,A. M. (1983). A probability matrix for identification of some *Streptomyces.* J. Gen. Microbiol., 129:1815-1830.
(17)Lennette,E.H.,Balows,A.,Hausler,W.J.andShadomy,H.J.(1985).Manual of Clinical Microbiology.*4th ed*., American Society for Microbiology,Washington, USA.
(18) Finegold, S. M., Martin, W. J. and Scott, E. G. (1978). Bailey and Sott's Diagnostic Microbiology. *5th*. *ed*., C. V. Mosby company, Henry Kimpoton, London, UK.
(19)Cruickshank,R.,Duguid,J.P.Marmion,B.P.andSwain,R.H.A.(1975).Medical Microbiology :The Practice of Microbiology. *12th ed*., Vol. 2, Churchill living stone, Edinburgh, UK.
(20) Harley, J. P. and Prescott, L. M. (1996). Laboratory Exercises in Microbiology. 3rd ed., WCB/McGraw-Hill Company, New York, USA.
(21) Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Janda, W. M., Sommer, H. M. and Winn, W. C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. *4th ed*., J. B. Lippinaott Comp., Philadelphia, USA.
(22) Lechevalier,H.A.andLechevalier,M.P.(1981).Introduction to the order Actinomy-ceteales in the Prokaryotes:A Handbook on Habitats, isolation and identification of Bacteria ,Starr, M.P,Stolp, H.,Truper ,H.G., Balows ,A. and Schlegel ,H. G. The Prokoryotes.Springer-Verlage,Berlin,Germany.Vol.2pp.1915-1922.
(23) Stukus, P. E. (1997). Investigation Microbiology: A Laboratory Manual for General Microbiology. Harcourt Brace and Company, New York, USA.
(24) Chaphalkar,S. R. and Dey, S. (1996). Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. Actinomycetes, 7:47-54.
(25) الفيل, فرح خالد.(2012). عزل و تشخيص عزلات من الاكتينومايسيتات المنتجة للمضادات الحيوية و دراسة تاثيرها على بعض الفطريات.اطروحة دكتوراه- كلية العلوم –جامعة الموصل.
(26)Augustine,S.K.,Bhavsar S. P.,*et al*.,(2005).Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK.39.Indian J.Med.Res.,121: 164-170.
(27) Anonymous (2008). What is *Rhizoctonia*barepatch?. Grains Research Development Corporation (GRDC). Fact sheet. www. grdc. com. au.
(28)Holt,J.G.,Krieg,N.R.,Sneath,P.H.A.,Staley,J.T.andWilliams,S.T.(1994).Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.*9th ed*.,Williams and Wilkins,Baltimore, USA.
(29) نهر, حبيب صاحب و بهاء الدين معروف و علي محسن نعمة (1997). عزل وتشخيص البكتريا المنتجة للمضادات الحيوية من مصادر مختلفة, مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة, 2: 201-208.
(30) Willey, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. I. (2008). Prescott, Horley, and Klein's Microbiology. 5th ed., McGraw-Hill., America,. 590 pp.
(31) Prabavathy ,V. R., N. Mathivanan, K. Murugesan (2006). Control of blast and Sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. Biological Control 39:313-319.
(32) El-Tarabily, K. A., Soliman, M. H., Nassar, A. H., Al- Hassani, H. A., Sivasithamparam, K., Mckenna, F. and Hardy, G. E. J. (2000). Biological Control of *Sclerotinia minor* using achitionlytic bacterium and actinomycetes. Plant Pathology., 49: 573-583.
(33) Brooks, G. F., Butel. J. S. and Morse, S. A. (2004). Jawetz, Melinck and Adelberg's Medical Microbiology. *23rd ed*., McGraw-Hill companies, Inc., Singappore.