P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS) Open Access
2013,(7), (1) :78-89

دور بلازميدات بكتريا *Escherichia coli* المقاومة للملوحة ومقاومتها للمضادات الحيوية .

انوار يوسف زعين ليث مصلح نجيب صفاء كامل نصيف

جامعة الانبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2012/4/20
تاريخ القبول: 2012/10/23
تاريخ النشر: 30/ 11 /2013
DOI: 10.37652/juaps.2013.82754

الكلمات المفتاحية:

E.coli _
بلازميدات _
حيود _
مضادات حيوية _
كلوريد الصوديوم NaCl.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة تحييد بلازميدات بكتريا E.coli ودور البلازميدات في استجابة البكتريا لبعض المضادات الحيوية. نميت بدرجات حرارية مختلفة (40-60) م0 ولمدد زمنية مختلفة (30-25-20-15-10- 5) دقيقة للوصول الى نسبة قتل 93% بطريقة الترحيل الكهربائي الافقي Agaros Gel electrophoresis تم الكشف عن فقدان بكتريا E.coli لبلازميداتها بالمقارنة مع العزلة الاصلية. اختبرت حساسية البكتريا وبطريقة الاقراص للمضادات الحيوية للعزلات المحيدة بالمقارنة مع العزلة الاصلية. اظهرت النتائج تباين في استجابة العزلات المحيدة للمضادات الحيوية بالمقارنة بالعزلة الاصلية كمضاد Erythromycin أذ اصبحت العزلات حساسة وبمعدل 31.00 ملم للعزلة 65 المحيدة بينما بلغ 0.00 ملم للعزلة الاصلية. كما اظهرت النتائج ليس للبلازميدات دور في مقاومة بكتريا E.coli لملح كلوريد الصوديوم NaCl.

المقدمة

تعود بكتريا *Escherichia coli* إلى عائلة البكتريا المعوية وهي أكثر الانواع البكتيرية أنتشاراً في الطبيعة ويعد تواجدها في المياه مؤشراً على تلوث المياه (1). وترتبط هذه البكتريا بالعديد من الاصابات والامراض التي تكاد تكون متعلقة بكل عضو في جسم الانسان (2) تتميز بسهولة تنميتها حيث لاتحتاج الى مواد عذائية معقدة (3). وتوصف بكونها عصيات سالبة لصبغة كرام، صغيرة، غير مكونة لسبورات، ومعظم سلالاتها متحركة، كما أن لها القدرة على النمو عند درجة حرارة تتراوح بين (18-44) وتكون مستعمراتها النامية على الاوساط الزرعية الاعتيادية صغيرة محدبة وغير ملونة، أما على وسط الماكونكي الصلب فتكون ذات لون وردي، إذ لها القدرة على تخمر اللاكتوز (4). بعض أنواعها تخمر سكر اللاكتوز بشكل بطيء بالاضافة لوجود عتر غير مخمرة لسكر اللاكتوز نهائياً (5,6).

تستوطن بكتريا *Escherichia coli* طبيعياً أمعاء الإنسان كجزء من النبيت الطبيعي (7)، وتوجد في النبات والتربة والمياه، وتسبب بكتريا *Escherichia coli* أمراض كثيرة للانسان (8,9). ويشكل إكتساب بكتريا *Escherichia coli* لخاصية المقاومة للمضادات الحيوية تهديداً خطيراً على فائدة المضادات الحيوية, أذ تعد مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية من أكبر المشاكل الصحية والاقتصادية على مستوى العالم (10,11)، مما دفع الباحثين الى التحري عن مضادات حيوية حديثة للتغلب على العزلات البكتيرية المقاومة التي تزيد من نسبة الاصابة ومعدل الوفيات (12,13).

يرجع أختيار بكتريا *Escherichia coli* لقدرتها الامراضية وعوامل الضراوة. والتي تناولتها العديد من البحوث كصفات محمولة على البلازميدات منها القدرة الامراضية والمقاومة للمضادات الحيوية، العناصر الثقيلة،السموم والاصابة بالفاجات وصفة الانتقال والقدرة التزاوجية. ظهور وسرعة إنتشار بلازميدات المقاومة في مختلف أنواع البكتريا وفي جميع أنحاء العالم جاءت متزامنة مع استعمال المضادات الحيوية (14). وقد بينت العديد من الدراسات لدراسة البلازميدات على مستوى الجين وقدرتها الانتقالية من بكتريا *P.aeruginosa* ومن ثم

* Corresponding author at: University of Anbar / College of Science;
E-mail address:

الثبات في بكتريا *Escherichia coli* (15,16,17). تتوجد بكتريا *E.coli* في بيئات مختلفة أذ تعرضها للأجهادات بيئية (الملوحة، الحرارة) مما يجعلها تختزل نشاطها الايضي وبالتالي تقل أعدادها (18). ويعد التحييد واحد من المميزات المألوفة في البلازميدات ويقصد به عملية فقدان البلازميدات بواسطة معاملات متنوعة مع أهمية اشارة الى كون بعض البلازميدات تعاني انعزالاً ذاتياً إلا أن الغالبية العظمى من البلازميدات تكون مستقرة بدرجة كبيرة والتي تتطلب إستعمال عوامل محيدة curing agents مختلفة لغرض زيادة تردد الانعزال التلقائي (12) إذ إن هناك عوامل مختلفة تثبط من تكرار بلازميدات معينة بصورة منتخبة مما يؤثر على تضاعف البلازميدات دون التأثير على تكرار الكروموسوم الرئيسي مما يؤدي الى تقليل الخلايا التي تمتلك البلازميد من خلال عوامل تحييد البلازميد جيل بعد جيل للوصول الى خلايا بكتيرية خالية تماماً من البلازميدات مما يؤدي الى فقدان الصفات التي تتحدد من خلال المورثات الموجودة على البلازميدات فقط (12,19). كما يعتبر التحييد طريقة جيدة للتعرف على البلازميدات المشفرة لعوامل الضراوة في البكتريا (20). يمكن تحييد البلازميدات بإستخدام عوامل فيزيائية مثل تنمية البكتريا في درجات حرارة عالية ويستدل على حدوث حيود للبلازميدات من خلال حساسية هذه الجراثيم للمضادات الحيوية التي كانت مقاومة لها مثل فقدان المقاومة لمضاد Kanamycin في بكتريا *E. coli* K-12 عند تنميتها في درجة حرارة 42 م كذلك تحييد البلازميدات المشفرة لانزيم Pencillinase عند تنمية بكتريا *Staphylococcus* بدرجة حرارة 43 م وفقدان المورثات *B-* lactamase بدرجة حرارة 44 م^0.(21) كما أن هناك عدد من العوامل الكيميائية مثل Refampin حيث وجد أن عمله كمحييد يكون من خلال تثبيط أنزيم RNA polymerase الذي يؤثر على تضاعف البلازميدات (22). وكذلك مادة الاكريدين وبروميد الاثيديوم الذي يعمل كمطفر ومحيد في الوقت ذاته (3,23). لقد وجد (24) أن SDS من العوامل القوية لتحييد البلازميدات إذ وجد أنه يعمل على إزالة البلازميدات المشفرة لأنزيم Pencillinase من بكتريا *S.aureas* كما وجد أنه يعمل على ازالة عامل المقاومة R عندما درس تاثيره على بكتريا *E. coli* k-12 ومن المواد المحيدة الاخرى اليوريا. التحييد يعتمد على طبيعة المحدد الوراثي المحمول بلازميدياً فضلاً عن عامل التحييد المستخدم كونه مؤثراً على البكتريا (25). ويلاحظ من الناحية التطبيقية إختلاف العوامل والتراكيز المستعملة في تحييد البلازميدات التي تعتمد على نوع العزلة المعاملة بها وكفاءة العامل المحيد ومدى التأثير والفعالية التي يعمل بها على الخلية البكتيرية.(22)

المواد وطرائق العمل

تم جمع 150 عزلة من مصادر مختلفة شملت (التربة، المياه، عينات مرضية) للمنطقة الغربية من العراق. جمعت عينات التربة من خلال قشط 2 سم من سطح التربة ثم اخذ النموذج بعدها أخضعت نماذج التربة لسلسة من التخافيف العشرية واستعمل التخفيف السادس من خلال زرعها وسط على وسط الماكونكي الصلب ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م^0 ولمدة 24 ساعة. جمعت عينات المياه من عمق 10 سم ووضعت في انابيب معقمة في جو مبرد لنقلها الى المختبر لغرض عزل بكتريا *E.coli* فقد تم استخدام وسط الماكونكي الصلب حيث اخذ 1 مل من المياه وزرع مباشرة على وسط الماكونكي الصلب وحضنت بدرجة 37 م^0 ولمدة 24 ساعة. جمعت عينات الادرار من الاشخاص المراجعين للعيادة الاستشارية لمشتشفى الرمادي التعليمي وكذلك من العيادات الخارجية في مدينة الرمادي وهيت وجمعت عينات الخروج بنفس الطريقة وزرعت على وسط ماكونكي الصلب باستعمال مسحات قطنية معقمة وحضنت بدرجة 37 م^0 ولمدة 24 ساعة. بغية التاكد من عزل بكتريا *E.coli* نقلت كمية من المستعمرات الوردية المخمرة لسكر اللاكتوز من وسط الكاكونكي الصلب الى انابيب مرق E.C medium وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م^0 لمدة 24 ساعة واعتمد ظهور الغاز والحامض في هذه الانابيب على عزل بكتريا القولون .

وللتأكد من عزل بكتريا القولون نقلت حلقة زرع مملؤة من الانابيب الموجبة من مرق E.C medium الى وسط آخر هو (EMB) وحضنت الاطباق عند درجة 37 م لمدة 24 ساعة ولوحظ ظهور مستعمرات ذات بريق معدني أخضر (green metallic sheen) دليل على عزل بكتريا *E.coli* (26). بعد ذلك زرعت بالوسط المغذي الملحي بالتراكيز (1,3,5,7,10,13%).

الفحوصات الكيموحيوية

لغرض تشخيص العزلات اجريت الفحوصات الكيموحيوية حسب ماأشار (27) وهي إحتبارات الاوكسيديز Oxidase والكاتليز Catalase وفحص قابلية البكتريا على الحركة وقابلية البكتريا لانتاج

حلقة الاندول Indol production وإختبار اليوريا وقابلية البكتريا على استهلاك السترات.

تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص Api20E:

لغرض التشخيص النهائي استخدمت عدة التشخيص المجهزة من قبل شركة Biomeriex الفرنسية وهي تحتوي على (20) فحص كيموحيوي وهي معتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية، اجري هذا الاختبار حسب تعليمات الشركة المصنعة.

فحص حساسية المضادات الحيوية

أُجري فحص أختبار حساسية بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية وباستخدام طريقة (28)، حيث حضر عالق بكتيري من العزلة المراد اجراء الاختبارات لها وذلك بنقل (4-2) مستعمرة نقية نامية على وسط الماكونكي الصلب وبعد 24 ساعة بواسطة ناقل (Loop) الى وسط المرق المغذي وحضنت لمدة (18-24) ساعة، ثم خفف العالق البكتيري بـ 5 مل من Normal salin، بواسطة مسحة قطنية معقمة ونظيفة تنشر جزء من العالق البكتيري على سطح اطباق حاوية على وسط اكار مولر_هنتون (Mullar_Hinton)، ثم بعدها وزعت اقراص المضادات الحيوية والتي شملت: (Refampin(RA), Ampicilin(AM), Streptomycin(S),Gentamycin(CN), Ciprofloxacin(Cip), Cefotaxime(CTX), Naldixic acid(NA), Vancomycin(VA), Erythromycin(E). والمجهزة من شركة Bioanalyse على سطح وسط اكار مولر_هنتون وبواقع (4_5) أقراص لكل طبق بواسطة ملقط معقم، حضنت الاطباق بعد ذلك بدرجة حرارة 37م^0 ولمدة 24 ساعة، بعد انتهاء فترة التحضين لوحظت النتائج وتم قياس قطر التثبيط حول كل قرص.

إستخلاص وتنقية الـ DNA البلازميدي:-

أستخلص DNA البلازميدي لبكتريا *E.coli* باستخدام محاليل عزل البلازميدات والمجهزة من شركة Geneaid.

طريقة تحييد البلازميدات

تم أعتماد طريقة (20) المحورة في تحييد البلازميدات باستخدام درجات الحرارة.

الترحيل الكهربائي

نفذ الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز تبعا لـ (20).

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج التشخيص الاولي ان 150 عزلة تعود لبكتريا *E.coli* والمعزولة من بيئات مختلفة، اذ كانت جميع العزلات سالبة لإختبار الاوكسيديز، وموجبة للكاتليز، متحركة، موجبة لإختبار الاندول، لاتنتج H2S، ولها القدرة على تحويل النترات الى نتريت، وهذه الصفات تنطبق على بكتريا *E.coli* (23).

اجري فحص Api20 E لـ 13 عزلة وذلك لتأكيد التشخيص الكيموحيوي، اذأظهرت النتائج 10 عزلات عائدة لبكتريا *E.coli* والتي أُجريت عليها الدراسة الحالية. أظهرت النتائج إن بكتريا *E.coli* كانت مقاومة لتركيزي 13-7% من كلوريد الصوديوم. تتواجد بكتريا *E.coli* في بيئات مختلفة إذ تعد من الفلورا الطبيعية في الجهاز الهضمي للانسان (27)، وتسبب العديد من الامراض (9). وقد يعود الى تواجد بكتريا *E.coli* في المياه وذلك لقدرتها لتحملها لدرجة حرارة 44 م^0 (29).

تحييد البلازميدات Plasmid Curing

اظهرت نتائج تحييد البلازميدات عشر عزلات من بكتريا *E.coli* بإستخدام درجات حرارة عالية حيث اختلفت درجة حرارة تحييد بلازميدات بكتريا *E.coli* والمدة الزمنية اللازمة لتحييدها لتحديد فيما اذا كانت الجينات المحمولة على البلازميدات لها دور في مقاومة بكتريا *E.coli* لملح كلوريد الصوديوم NaCl وكذلك فيما اذا كانت الجينات المحمولة على البلازميدات لها دور في مقاومة تلك العزلات لبعض المضادات الحيوية. إذ تم تحديد الدرجة الحرارية المثلى لتحييد البلازميدات من خلال نسبة قتل 93% والتي أدت الى تحييد البلازميدات كل عزلة.

أظهرت نتائج الكشف عن البلازميدات على هلام الاكاروز لثلاث عزلات من بكتريا *E.coli* والتي تحمل الارقام المحلية *E.coli*52، *E.coli* 55 و*E.coli* 10R غير المحيدة وبعد عملية إستخلاص الـ DNA البلازميدي للعزلات الثلاث المحيدة وغير المحيدة والكشف عن حزم الـDNA لوحظ إختفاء الحزم البلازميدية في العزلات المحيدة صورة (1).

وجد (30) أن درجة الحرارة المرتفعة تؤدي الى تحييد البلازميدات والتي تتفق مع نتائج الدراسة الحالية حيث أعطى التحييد بإستخدام درجات الحرارة المرتفعة كعامل محيد للبلازميدات نسبة تحييد عالية.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنه ليس لفقدان الـDNA البلازميدي دور في مقاومة بكتريا *E.coli* للملوحة إذ أن دور البلازميدات في تحمل الملوحة غير معروفة لندرة الدراسات في هذا المجال ومع ذلك توجد إشارة واحدة لاتتفق مع نتائج هذه الدراسة وهو ماوجده(31) في دراسته ان لعملية التحييد للبلازميد الوحيد في بكتريا Halomonase longa فإنها تفقد قابليتها على النمو بتركيز 20% لكن عزل نفس البلازميد من نفس البكتريا وجد انه يحمل معلومات متعلقة بالمقاومة لعدد من المضادات الحيوية ولم ترد إشارة عن علاقته بتحمل الملوحة (32)، ربما يكون السبب في الاختلاف هو نسبة التركيز الملحي المستخدم بالاضافة الى إختلاف التركيب الكيميائي والتعبير الجيني للخلايا البيكتيرية الذي أدى الى هذا الاختلاف (33). ربما نجاح الحرارة في تحييد بلازميدات العزلات قيد الدراسة لما للحرارة من تاثيرات على الانزيمات المشتركة في الفعاليات الايضية اليكتيرية ومنها تصنيع الدنا البكتيري. وكذلك عملية التحول البكتيري والاقتران المهمة في نقل صفة المقاومة للمضادات الحيوية عبر المادة الوراثية،التحييد يعتمد على طبيعة المادة الوراثية أو المحدد الوراثي المحمول بلازميدياً فضلاً عن عامل التحييد المستخدم كونه مؤثراً أو غير مؤثر على البكتريا (25).

دور البلازميد البكتيري في مقاومة المضادات الحيوية

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي إن هناك تأثيراً معنوياً ($P<0.05$) لتأثير الحيود مقارنة بالعزلة الاصلية وأظهر أختبار L.S.D أن هناك فرق معنوي لمعدل إستجابة العزلات لتأثير الحيود حيث بلغ 9.48 ملم للعزلة 1R مقارنة بالعزلة الاصلية أذ بلغ معدل إستجابتها 8.33 ملم، بينما بلغ 13.04و11.11 ملم على التوالي للعزلتين 58المحيدة والعزلة 65 المحيدة مقارنة بالعزلة الاصلية 58 و65 أذ بلغ 6.81 و6.89 ملم على التوالي جدول (1,2,3). بينما أظهر المعدل العام لتأثير المضادات الحيوية المدروسة أن هناك تباين في استجابة العزلات للمضادات الحيوية فمثلاً العزلة 1R إن مضادي Setrptomycin و Vancomycin أكثر المضادات الحيوية تأثيراً وبمعدل 16.00 ملم في حين أن المضاد Ciprofloxacin هو أكثر المضادات تأثيراً على العزلة 58 وبمعدل بلغ 17.83 ملم بينما المضاد Erthromycin هو أكثر المضادات تأثيرا على العزلة 65 وبمعدل بلغ 15.50 ملم بينما لم يظهر مضاد Ampicillin أي تأثير على جميع العزلات المحيدة باستثناء العزلة 101 وبمعدل 14.83 ملم جدول (4). كما أظهر اختبار LSD ان هناك فرقاً معنوياً في إستجابة العزلات لتأثير الحيود 10R و 52 و 53 و 57 و 73و 101 بمعدل بلغ 22.96, 14.44, 11.74, 16.41, 18.22, 21.78 ملم على الترتيب، كما ابدت نتائج اختبار L.S.D ليس هناك فرق معنوي في استجابة العزلة 55 لتأثير الحيود جدول (5)، بينما أظهر المعدل العام لتأثير المضادات الحيوية أن هناك تباين في إستجابة العزلات أذ أن المضاد Ciprofloxacin أكثر المضادات المدروسة تأثيراً على كلاً من العزلات 10R, 53, 57, 101 المحيدة وبمعدل 37.17, 14.00, 31.67, 37.83 ملم على الترتيب جدول (4,6, 7, 8) بينما المضاد Cefotaxime أكثر المضادات تأثيراً على العزلات73 ,55 بمعدل 23.17, 30.67 ملم على الترتيب كذلك المضاد Nalidxic acidبمعدل 30.67, 23.00 ملم على الترتيب أكثر المضادات تأثيراً على العزلتين 73 و 52 جدول(9,10) . من جانب اخر اظهرت النتائج فيما يخص التداخل بين تأثير المضادات ومعاملة الحيود فقد اظهر اختبار LSD أن هناك تباين في إستجابة العزلات للمضادات الحيوية وتبعا للعزلة. إذ تم استعمال 9 مضادات حيوية شملت:-

Refampin وStreptomycin و Gentamycin وAmpicillin و Nalidxic acid وCiprofloxacin Cefotaxime وVancomycin وكذلك Erthromycin

أظهرت العزلات المحيدة مقاومتها لمضاد RA وAM باستثناء العزلة 101 التي كانت حساسة لمضاد Ampicillin شكل (4). بينما تباينت العزلات في فقد مقاومتها للمضادات الاخرى، فقد فقدت جميع العزلات مقاومتها للمضاد Streptomycin أما العزلتين 65 و73 احتفظت بمقاومتها لهذا المضاد، فقدت بعض العزلات مقاومتها لمضاد NA شكل (3,10) بينما أحتُفظت العزلات 65 و 58 و 53 و 1R بمقاومتها إتجاه نفس المضاد NA وكذلك العزلة الأخيرة بالأضافة لإحتفاظها للمضاد NA احتفظت ايضا بمقاومتها للمضادين Streptomycinو Cefotaxim شكل (1, 2,3,7). أبدت النتائج المتحصل عليها أن جميع العزلات حساسة للمضاد Erythromycin بأستثناء العزلة 55 التي بقيت مقاومة لهذا المضاد وبدون تغير بقطر

التثبيط شكل (5)، بينما أظهرت النتائج أن جميع العزلات حساسة لمضاد Vancomycin بإستثناء العزلتين 57 و53 والتي بقيت الاخيرة مقاومة أيضاً للمضاد Gentamycin شكل (7,8). كما وأبدت الدنتائج إحتفاظ العزلة 65 بمقاومتها اتجاه المضاد Ciprpfloxacin بينما فقدت العزلات الاخرى مقاومتها اتجاه نفس المضاد أما العزلة 52 فقدت مقاومتها لجميع المضادات بينما أحتفظت بمقاومتها اتجاه المضاد Streptomycin شكل (9) في حين أظهرت النتائج ان العزلة 10R اصبحت اكثر حساسية اتجاه المضاد Erthromycin شكل(6).

ومن الدراسات التي تطرقت لهذا الموضوع دراسة أجراها (34)على بكتريا *E.coli*،المعزولة من أطفال مصابين بالأسهال في بعض مستشفيات أربيل، فقد وجدت أن الجينات المشفرة لمقاومة المضادات Nalidixic acid و Cefotaxime و Cefotaxim هي بلازميدية الموقع. وفي دراسة أُخرى اجراها (35) على بكتريا *E.coli* وجدت أن الجينات المشفرة لمقاومتها المضاد Nalidixic acid هي كروموسومية الموقع. وهي تتفق مع نتائج هذه الدراسة اذ ابدت بعض العزلات المحيدة حساسيتها اتجاه المضاد Nalidixic acid بينما بعض العزلات احتفظت بمقاومتها لهذا المضاد. أن المقاومة البكتريا لمضاد Nalidixic acid قد تكون إما عن طريق تغير أنزيمات هدف المضاد (DNAgyrase , Topoisomerase IV) في البكتريا السالبة لصبغة كرام عن طريق حدوث طفرات في الجين المشفر لتلك الانزيمات مما يؤثر على إرتباط المضاد به. أو عن طريق نفاذية الخلية البكتيرية للمضاد نتيجة حصول تغيرات في الجدار الخلوي (36,37).

ويعزى سبب حساسية العزلات المحيدة لمضاد Streptomycin إنتاج البكتريا أنزيمات تحوير الامينوكلايكوسيدات والمشفرة من قبل جينات محمولة بلازميدياً في البكتريا السالبة لصبغة كرام ممايمنحها المقاومة لمضاد Streptomycin (38).

كما نلاحظ من خلال نتائج هذه الدراسة أن نسبة المقاومة لمضاد Refampin 100%للعزلات المحيدة وغير المحيدة وهي مقاربة من نتائج (39) إذ فسر آلية المقاومة لهذا المضاد الى حدوث طفرة في الجين المشفر لتلك لأنزيم DNAdependent RNApolymerase الذي يعتبر الوقع الهدف للمضاد، مما يؤدي إلى استبدال زوج قاعدي لذلك الجين (*rpo*B) المحمول كروموسومياً(40).

أما مضاد Ampicillin نلاحظ من خلال نتائج هذه الدراسة فقد وجد أن جميع العزلات المحيدة بقيت مقاومة لهذا المضاد بإستثناء العزلة 101 كانت حساسة لهذا المضاد وقد يعزى سبب المقاومة لهذا المضاد إنتاج العزلات بروتينات مرتبطة بالبنسلينات بديلة (Alternative PBPs) مشفرة من قيل الجين *mec*A والمحمول كروموسومياً (41,42).

تقاوم البكتريا السالبة لصبغة كرام مضادات الكونيولينات بعدة طرق منها أنظمة الدفق، والطريقة الاخرى تتوسطها البلازميدات التي تشفر لأنتاج البروتينات التي ترتبط بأنزيم DNAgyrase من جانب آخر قد تحدث طفرة في انزيم DNAgyrase فتعمل على جعلها أقل أُلفة لتلك المضادات مما يقلل من فعاليتها (36). أذ تتفق نتائج دراستنا الحالية مع تلك الدراسة أذ فقدت جميع العزلات المحيدة مقاومتها لمضاد Ciprofloxacin بعد إن كانت مقاومة له بإستثناء العزلة 65 المحيدة أحتفظت بمقاومتها لهذا المضاد.

بينما أظهرت النتائج حساسية عالية لمضاد Erythromycin من قبل العزلات المحيدة بينما أحتفظت العزلة بمقاومتها للمضاد. وقد عزى (43) مقاومة البكتريا الى عدد من الاليات، منها النفاذية المنخفضة للغشاء الخلوي الخارجي أو من خلال نظام الدفق الذي يشفر لها صنفان من الجينات :- *mef* إذ تكون مرتبطة بعناصر إقترانية موجودة على الكروموسوم (44) و msr والموجود في بكتريا *S.aureus* (45).

لوحظ فقدان البلازميدات بشكل تام ما يؤكد وجود جينات مقاومة المضادات الحيوية (AM,RA,S,CN ,CIP,CTX, E, NA, VA) على تلك البلازميدات فقدت بطريقة التحييد بالحرارة.

الاستنتاجات

إستخدام درجة الحرارة كعامل فيزيائي محيد وبدرجة 55-60م^0 وبمدة زمنية مختلفة لوحظ فقدان البلازميدات وبالتالي فقدت الجينات المشفرة لمقاومة بعض المضادات المدروسة وتبين من ذلك إن صفة المقاومة للمضادات الحيوية ليس فقط محمولة عىلى البلازميدات بل توجد جينات محمولة كروموسومياً أو قد تكون المقاومة ناتجة عن طفرة كروموسومية أدت الى تقليل نفاذية الغشاء الخلوي البكتيري وبالتالي قلة تراكم المضاد داخل الخلية البكتيرية، بينما لم تفقد بكتريا *E.coli* مقاومتها لملح كلوريد الصوديوم NaCl.

المصادر

1.Carter, G.R.; Chengappa, M.M; Robert, A. W.; William, C. G. and Yasuk,o.R. (1995). Essentials of Veterinary Microbiology.5th ed. Awaverly Company.

2.Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Jauda, W.M.; Schrechenberger, R.C. and Winn, W.S. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Lippincott-Raven Published, Philadelphia. U.S.A.

3.شكارة، مكرم ضياء. (2009). علم الوراثة. دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة. عمان.

4.Jawetz, E.; Melinck, J.L.; Adelberg, E.A.; Geo, F.B.; Janet, S.B.; Karen, C.C.; Stphen, A.M.(2007). Jawetz, Melinck and Adelberg "Medical microbiology". 24th ed. Prentice-Hill Companies. Inc.USA.

5.كوفمان، ف. (1985). البكتريا المعوية. مترجم. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. العراق.

6.Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J.; Shadomy, H.J. (1985). Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. Washington.D.C.

7.Gyles, C.L.(2007). Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Am. Sci*. 85:45-62.

8.James, P.N. and James, B.K.(1998). Diarrheagenic *Escherichia Coli. Clin. Microbiol. Rev*. 11 (1):142-201.

9.Alain, L.S.(2005). Mechanism by which the disease is thought to be induced: ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, DACE, EAEC. *Clin. Microbiol. Rev*. 18(2): 264-292.

10.Wegner, H.C.; Aarestrup, F.M.; Gerner – Smidit, P. and Bager, F. (1999). Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta Vet. Scand*. 92(1): 51 – 57.

11.Lambie, N.; Negleka, M.; Brown, G. and Ryan, J. (2000). Retrospective Study on *Escherichia coli* infection in Broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. *Avian Dis*. ,44 (4): 155 – 160.

12.Kuenkates, E. and Kocazeybek, B.(2002). High resistance rate against 15 different antibiotic in aerobic gram-negative bacteria isolates of cardiology intensive care unit patient. Indian. *J .Microbial*. 20:208-210.

13.Ang, J.Y. ; Eziike, E. and Asmar, B.(2004). Antibacterial resistance. Indian. *J. Pedit*. 71:229-239.

14.الطائي، هيام عادل. (2000). مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية وإنتاج أنزيمات بيتا لاكتاميز. مجلة الدواء العربي. (2):15-16.

15.Shingler, V.and Thomas, C.M. 1989. Analysis of nonpolar insertion mutations in the *trfA* gene of IncP plasmid RK2 which affect its broad-host-range property. Published by *Elsev.Sci. B.V*. 1007 (3): 301-308.

16.Easter, C.L.;Schwab, H. and Helinski, D.R. (1998). Role of the parCBA operon of the broad-host-range plasmid RK2 in stable plasmid maintenance. *J. Bacteriol*. 180(22): 6023-6030.

17.Brinkman, F.S.L.; Schoofs, G.; Hancock, R.E.W. and DeMot, R. (1999). *J. Bacteriol*. 181(6):4746-4754.

18.Dupray, E.; pommepuy. M.;Derrien, A.; Caprais, M, P. and cormier, M. (1993). Use of the direct viable count (D.V.C) For the assessment of survival of *E.coli* in marine Environments Water.*Sci. Tech*. 27 (3-4): 395-399.

19.كودراينوف، اورسولا. (1985). علم الوراثة. الجزء الثاني، جامعة هارفارد. مترجم. جامعة الموصل

20.Trevors, J.T. (1986). Plasmid curing in bacteria fems. *Microbiol. Rev*. 32 (3-4): 149 – 157.

21.Motallebi, M.; Zamani, M.R. and Saffar, B. (2000). Serological and Biochemical Characteristics of Virulence Plasmid of Yersinia enterocolitica Isolates from Chicken in the Islamic Republic of Iran, Eastern. *Med Health J*. (6): 1-6.

22.الراشدي، ديانا نور الدين مصطفى عبدالله. (2002). تحييد المحتوى البلازميدي لجرثومة الـ *Proteus mirabilis* المعزولة من حالات مرضية مختلفة في الانسان باستخدام مواد كيميائية وعوامل فيزيائية. رسالة ماجستير _ كلية التربية_ جامعة الموصل. العراق.

23.حداد، جاسب جاسم.(1991). علم الاحياء المجهرية البيطرية، اساسيات علم الجراثيم. مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر. الموصل. العراق.

24.Tomoeda, M.; Inuzuka, M.; Auto, Sh. and Konishi, M. (1974). Curing action of sodium dodecy sulfat on proteus mirabilis R^+ strain. *J. Bacteriol*. 120(3): 1158 – 1162.

25.Mesas, J. M. ; Carmen-Rodriguez, M. and Teresa, T. M. (2004). Plasmid curing of *Oenococcus oenis*. *J. Bacteriol* 51(1):37-40.

26.Senior ,B.W.(1996) Examination of water ,milk food and air. Medical Microbiology. Churchill Livingston. New York.

27.Forbes,B.A.;Seham, D.F.;and Weissfeld,a.s.(1998).Bailey and Scotte Diagnosis Microbiology, 10 th ed. Mosby, Inc, St. Louis.

28.Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; and Turch, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized disk method. *Aln. Clin. Pathol.*,45:493-496.

29.American Public Health Association. (APHA).1998. Standard method for the examination of water and wastewater. 20th ed.

30.Sonstein, S.A. and Baldwin, J.N. (1972). Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulphate. *Bacteriol*.109(1):262-265.

31 .Vreeland, R.H. (1987). Mechanisms of halotolerance in microorganisms Crig. *Microbiol. Rev*. 14(4): 311-356.

32.Fernandez-Castillo, R.;Vargas, C.; Nieto, J.J.; Ventosa, A. and Ruiz-Berraquero, F.(l992). Characterization of a plasmid from moderately halophilic eubacteria. *J. Gen. Microbiol.* 138(6): 1133-1137.

33.Tamai,E.; Shimamoto,T.; Tsuda,M.; Mizushima,T., and Tsuchiya,T. (1998). Conversion of Temperature-sensitive to –resistant Gene Expression Due to Mutations in the Promoter Region of the Melibiose Operon in Escherichia coli. *J. Bio Chemi.* 273(27): 16860-16864.

34.AL-Sorchee, S.M.(2009). Causative agents of diarrhoea in Erbil children and the effect of some plant extract on bacterial isolates. Ph.D. Thesis. Collage of Education (Ibn AL-Haitham). Baghdad University.

35.المقدادي، إيلاف أسامه محمد علي.(2000). دراسة كيموحيوية ووراثية لبعض عزلات *Escherichia coli* المنتجة لأنزيم البنسلينيز. رسالة ماجستير_ كلية العلوم_ الجامعة المستنصرية.العراق.

36. Drlica, K. and Zhao, X.L. (1997). DNA gyrase topoisomerase IV and the4-quinolones. *Microbiol.Rev.*16:377-392.

37.Schmitz.F.J.; Jones, M.E.; Hofman, B.; Hansen, B.; Scheuring, S.; Luckefahr, M.; Fluit, A.C.; Verhoef, J.; Hadding, U.; Heinz, H.P. nd Kohrer, K. (1998). Characterization of *grlA, grlB, gyrA* and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* in relation to minimal

(2000). Prevalence of macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J. Antimicrob.Chemother*. 45:921-923.

جدول (1) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة *E.coli* 1R للمضادات الحيوية.

Treatment	Conrol	Curing	Average
RA	13.00	12.67	12.83
S	16.67	15.33	16.00
CN	0.00	9.33	4.67
AM	0.00	0.00	0.00
CIP	15.67	15.33	15.50
CTX	0.00	0.00	0.00
NA	0.00	0.00	0.00
VA	15.00	17.00	16.00
E	14.67	15.67	15.17
Average	8.33	9.48	

L.S.D for Antibiotics → 1.478 L.S.D for Treatment → 0.697 L.S.D for Intraction → 2.090

جدول (2) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة *E.coli* 58 للمضادات الحيوية.

Treatment	Control	Curing	Average
RA	9.67	10.67	10.17
S	11.33	14.67	13.00
CN	14.33	16.33	15.33
AM	0.00	0.00	0.00
CIP	15.33	20.33	17.83
CTX	0.00	11.33	5.67
NA	0.00	8.33	4.17
VA	10.67	14.33	12.50
E	0.00	21.33	10.67
Average	6.81	13.04	

L.S.D for Antibiotics → 1.115 L.S.D for Treatment → 0.526 L.S.D for Intraction → 1.577

جدول (3) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة *E.coli* 65 للمضادات الحيوية.

Treatment	Control
RA	11.67
S	11.67
CN	14.33
AM	0.00
CIP	0.00
CTX	10.67
NA	0.00
VA	13.67
E	0.00
Average	6.89

inhibitory concentrations of Ciprofloxacin. *J.Antimicrob. Chemother*. 42:1249-1252.

38. Tenover, F.C.; Phillips, K.L.; Gilbert, T.; Lockhart, P.; O'Hara, P.J. and Plorde, J.J.(1989). Development of DNA probe from the deoxyribonucleotide sequence of a 3-N-aminoglycoside acetyle teansferase[AAC(3)-I] resistance gene. *J.Antimicrob. Chemother*. 33 : 551 - 559.
39. Sherley, M.; Gordon, D.M. and Collignon, P.J. (2000). Variations in antibiotic resistance profile in Enterobacteriaceae isolated from wild Australian mammals. *Environ. Microbiol*. 2(6) : 620-631.
40. Jin, D.J. and Cross, C.A. (1988). Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol*. 202(1):45-58.
41. Tomasz, A.; Drugeon, H. B.; de Lencastre, H. M.; Jabes, D.; McDougall, L. and Bille, J. (1989). New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding protein with modified penicillin-binding capacity. *J. Antimicrob. Chemother*. 33:1869-1874.
42. Barg, N.; Chambers, H. and Kernodle, D. (1991). Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of beta-lactamase. *J.* Antimicrob. *Chemother*. 35:1975-1979.
43. Fluit, C.; Visser, M.R. and Schmitz, F. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev*. 14(4):836-
44. Luna, V.A.; Coates, P.; Eady, E.a.; Cove, J.H.; Nguyen, T.T. and Roberts, M.C. (1999). A variety of gram – positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother*. 44(1):19-25.
45. Schmitz, F.J.; Sadurski, R.; Kray, A.; Boss, M.; Geisel, R.; Kohrer, k.; Verhoef, J. and Fluit, A.C.

Treatment	Control	Curing	Average
RA	12.33	13.67	13.00
S	13.67	16.00	14.83
CN	15.33	16.33	15.83
AM	0.00	0.00	0.00
CIP	33.00	41.33	37.17
CTX	22.00	22.00	22.00
NA	30.00	26.67	28.33
VA	13.67	30.33	22.00
E	14.33	40.33	27.33
Average	17.15	22.96	

L.S.D for Antibiotics → 2.463 L.S.D for Treatment → 1.161
L.S.D for Intraction → 3.843

جدول (7) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة *E.coli* 53 للمضادات الحيوية.

Treatment	Control	Curing	Average
RA	11.00	10.33	10.67
S	9.67	12.33	11.00
CN	12.67	11.67	12.17
AM	0.00	0.00	0.00
CIP	13.00	15.00	14.00
CTX	9.00	12.00	10.50
NA	11.33	13.67	12.50
VA	9.00	11.33	10.17
E	0.00	19.33	9.67
Average	8.41	11.74	

L.S.D for Antibiotics → 1.033 L.S.D for Treatment → 0.487 L.S.D for Intraction → 1.460

جدول (8) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة *E.coli* 57 للمضادات الحيوية.

Treatment	Control	Curing	Average
RA	10.00	10.67	10.33
S	15.33	17.33	16.33
CN	16.33	15.33	15.83
AM	0.00	0.00	0.00
CIP	30.00	33.33	31.67
CTX	14.33	21.33	17.83
NA	12.33	16.33	14.33
VA	9.33	10.67	10.00
E	15.00	22.67	18.83
Average	13.63	16.41	

L.S.D for Antibiotics → 1.495 L.S.D for Treatment → 0.705 L.S.D for Intraction → 2.114

Treatment	Control	Curing	Average
RA	11.67	11.67	11.67
S	10.00	10.00	10.83
CN	15.67	15.00	15.00
AM	0.00	0.00	0.00
CIP	0.00	0.00	0.00
CTX	14.67	12.67	12.67
NA	0.00	0.00	0.00
VA	17.00	15.33	15.33
E	31.00	15.50	15.50
Average	11.11		

L.S.D for Antibiotics → 1.127 L.S.D for Treatment → 0.531 L.S.D for Intraction → 1.593

جدول (4) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة *E.coli* 101 للمضادات الحيوية.

Treatment	Control	Curing	Average
RA	10.67	9.33	10.00
S	15.00	14.33	14.67
CN	15.67	17.33	16.50
AM	13.67	16.00	14.83
CIP	43.00	32.67	37.83
CTX	23.33	15.67	19.50
NA	28.67	33.33	31.00
VA	0.00	20.00	10.00
E	21.33	37.33	29.33
Average	19.04	21.78	

L.S.D for Antibiotics → 2.265 L.S.D for Treatment → 1.068 L.S.D for Intraction → 3.203

جدول (5) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة *E.coli* 55 للمضادات الحيوية.

Treatment	Control	Curing	Average
RA	12.00	12.67	12.33
S	14.00	11.00	12.50
CN	12.67	16.00	14.33
AM	0.00	0.00	0.00
CIP	19.00	12.00	15.50
CTX	23.67	22.67	23.17
NA	26.00	18.67	22.33
VA	13.33	15.33	14.33
E	12.33	12.33	12.33
Average	14.78	13.41	

L.S.D for Antibiotics → 4.131 L.S.D for Treatment → 1.947 L.S.D for Intraction → 5.842

جدول (6) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة *E.coli* 10R للمضادات الحيوية.

جدول (9) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة 52 *E.coli* للمضادات الحيوية.

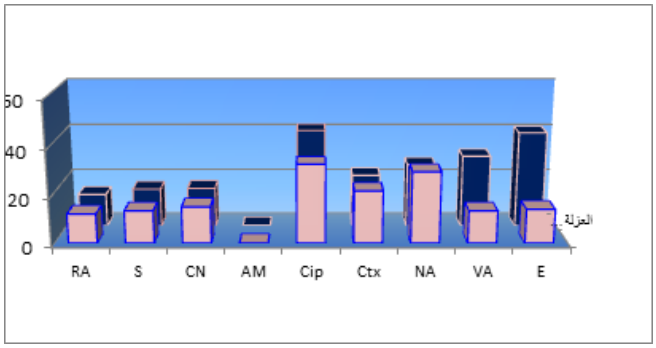
Treatment	RA	S	CN	AM	CIP	CTX	NA	VA	E	Average
Control	10.33	10.33	13.33	0.00	8.67	0.00	24.67	19.33	15.00	11.30
Curing	12.67	13.33	12.00	0.00	16.00	22.67	21.33	17.67	14.33	14.44
Average	11.50	11.83	12.67	0.00	12.33	11.33	23.00	18.50	14.67	

L.S.D for Antibiotics → 1.352 L.S.D for Treatment → 0.637 L.S.D for Intraction → 1.912

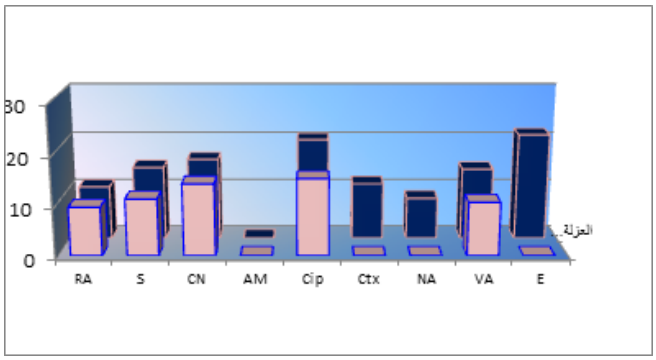
جدول (10) تأثير معاملة الحيود على استجابة العزلة 73 *E.coli* للمضادات الحيوية.

Treatment	RA	S	CN	AM	CIP	CTX	NA	VA	E	Average
Control	11.00	10.00	13.67	0.00	10.67	28.67	27.33	19.67	15.00	15.11
Curing	11.00	11.00	15.67	0.00	15.00	32.67	34.00	22.67	22.00	18.22
Average	11.00	10.50	14.67	0.00	12.83	30.67	30.67	21.17	18.50	

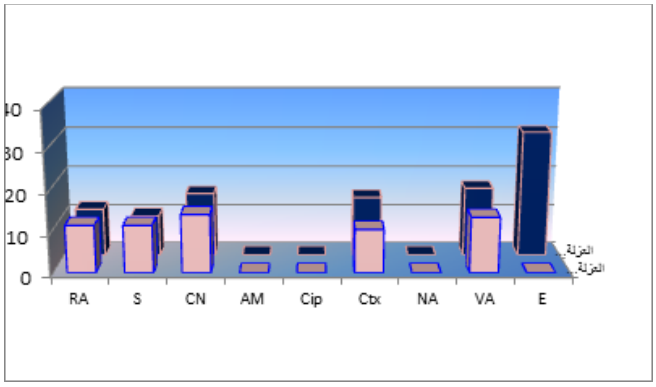
L.S.D for Antibiotics → 1.648 L.S.D for Treatment → 0.777 L.S.D for Intraction → 2.331



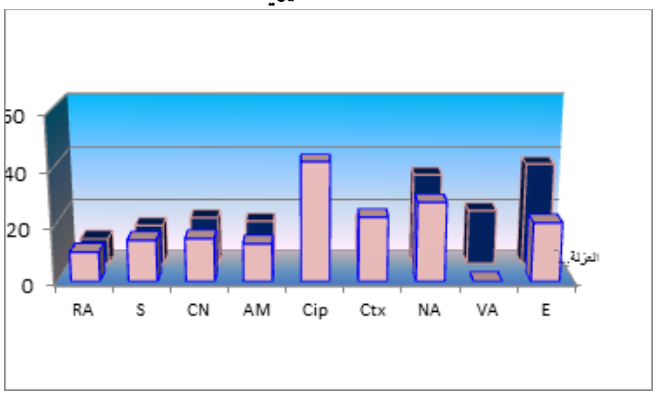
الشكل (1) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 1R*E.coli* لبكتريا للمضادات الحيوية.



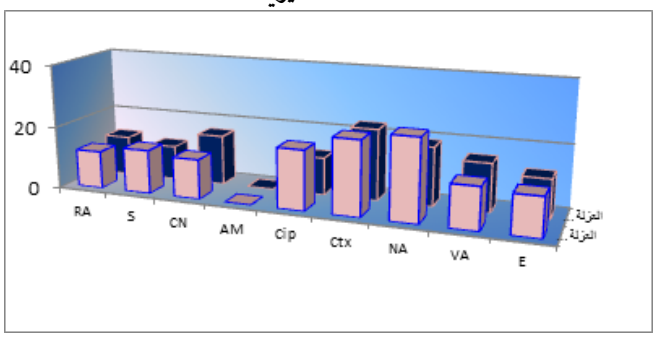
الشكل (2) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 58 لبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.



الشكل (3) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 65 لبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.

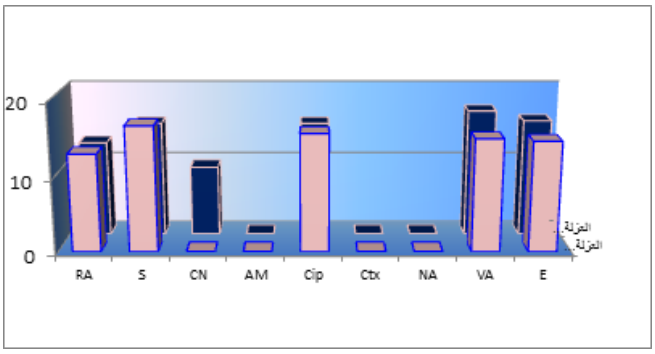


الشكل (4) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 101 لبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.

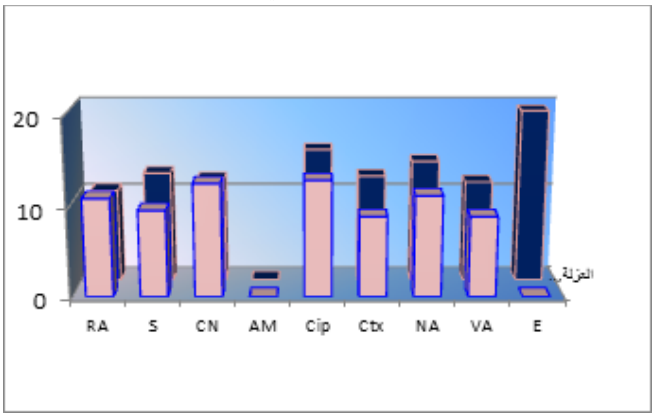


الشكل (5) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 55 لبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.

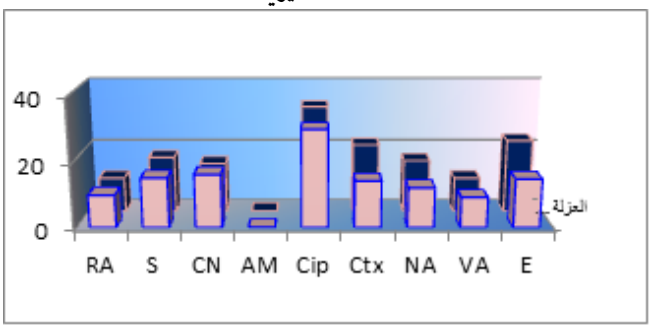
P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2013,(7), (1) :78-89



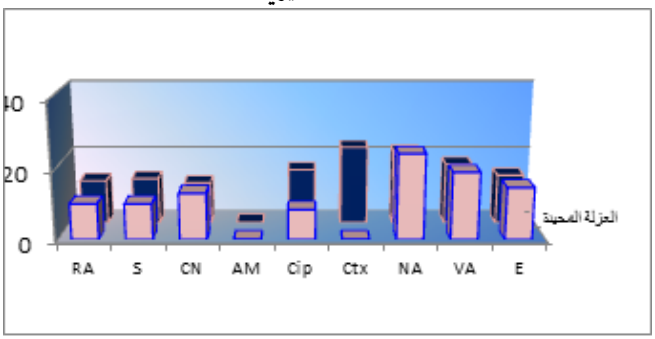
الشكل (6) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 10Rلبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.



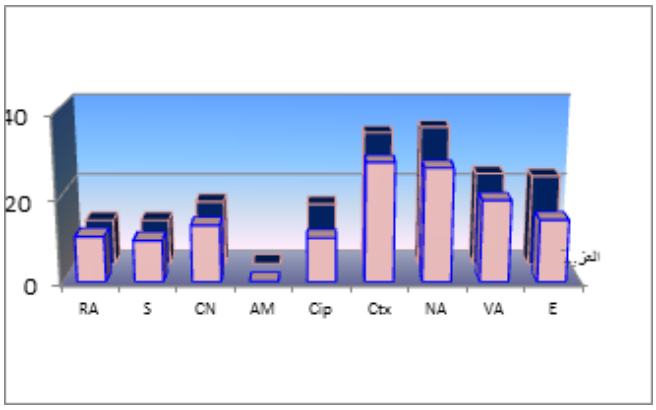
الشكل (7) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 53 لبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.



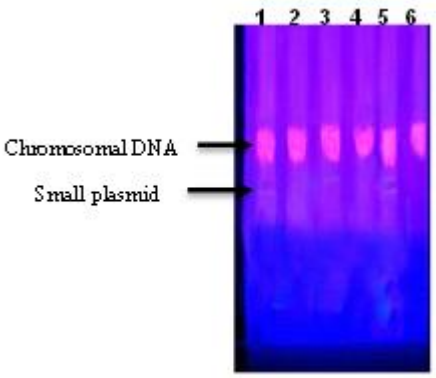
الشكل (8) تأثير معاملة الحيود استجابة العزلة 57 لبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.



الشكل (9) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 52 لبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.



الشكل (10) تأثير معاملة الحيود في استجابة العزلة 73 لبكتريا E.coli للمضادات الحيوية.



صورة (1) الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بنسبة 1% للمحتوى الوراثي لبكتريا *E.coli* للعزلات الأصلية والمحيدة.

1- العزلة 52 الأصلية
2- العزلة 52 المحيدة
3- العزلة 55 الأصلية
4- العزلة 55 المحيدة
5- العزلة 10R الأصلية
6- العزلة 10R المحيدة

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2013,(7), (1) :78-89

ROLE *Escherichia coli* PLASMIDS HALOTOLERANCE TO RESISTANT OF ANTIBIOTICS

ANWAR Y. ZAAEN LEITH M. NAJEEB SAFA K. AMIN

ABSTRACT:

The study included the neutralization of bacterial plasmids E.coli and the role plasmids bacteria in response to some antibiotics. Growth of bacteria was carried out in different temperatures (40-60)0c and for different time periods (5-30) minutes to reach the 93% rate of killing and deportation in Agaros Gel Electrophoresis was detected over the losses of bacteria E.coli for plasmids compard with the original isolation.Tthe sensitivity of the bacteria was tested by discks method to antibiotics for the isolates curing compard with the original isolation. the rasults showed variation in the response of isolates to antibiotics curring comparde with the original isolates as an antibiotic Erythromycin which become sensitive isolates by the largest rate of 31.00 mm of isolation 65 the curring while 0.00 mm for original isolate, and these curring isolates have retained their resistance to sodium chloride NaCl.