مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (3) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (3) 2011

الفعالية الصادة لمستخلص جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* تجاه الجراثيم الممرضة

الدكتورة أسمهان زينب*

(تاريخ الإيداع 23 / 11 / 2010. قبل للنشر في 17 / 5 / 2011)

□ ملخّص □

أُستخلصت المواد الفعالة الناتجة عن نمو جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر مختلفة بالمحل العضوي إيتيل أسيتات. أظهرت دراسة الفعالية الصادة للمستخلصات الجرثومية تجاه الجراثيم الممرضة المعزولة من عينات مرضية مأخوذة من مختبر مستشفى الأسد الجامعي في اللاذقية فضلاً عن عزلتين من مياه بحرية بطريقة الانتشار بوساطة الأقراص أن المستخلصات الجرثومية تمتلك فعالية صادة في الجراثيم السلبية غرام (*Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas cepacia*) والإيجابية غرام (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus epidermidis*) والمجموعة الأخيرة كانت أكثر حساسية لهذه المستخلصات الجرثومية.

وهكذا يبدو أن منتجات جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* قد تكون أحد المصادر الممكنة للمركبات الصادة الطبيعية في الجراثيم الممرضة في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: جراثيم *Pseudomonas aeruginosa*، التصاد الجرثومي، المستخلص الجرثومي، الجراثيم الممرضة.

* مدرسة - قسم علم الحياة النباتية - كلية العلوم - جامعة تشرين-اللاذقية-سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (3) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (3) 2011

The Antibacterial Activity of *Pseudomonas Aeruginosa* Extract against Pathogenic Bacteria

Dr. Asmahan Zeinab*

(Received 23 / 11 / 2010. Accepted 17 / 5 /2011)

□ ABSTRACT □

Cultures of *Pseudomonas aeruginosa* ,which were isolated from different sources, were extracted with ethyl acetate (EtOAc). Results study the effect of extracts against pathogenic bacteria, which were isolated from Al-Assad hospital laboratory in Lattakia and two isolates from sea water, with disk diffusion method showed antibacterial activity against Gram-negative bacteria (*Serratia marcescen*s, *Proteus vulgaris, Pseudomonas cepacia*) and Gram-positive bacteria (*Streptococcus pneumoniae, Streptococcus faecalis, Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus, Staphylococcus epidermidis*) the last one were the most susceptible.

Depending on these results, we can say that the extracts of *Pseudomonas aeruginosa* are expected to be potential resources of natural antibiotic products against pathogenic bacteria in the future.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Antibacterial activity, Bacterial extract, Pathogenic bacteria.

***Assistant prof. in department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University, lattakia, Syria.**

مقدمة:

إن انتشار المقاومة المتعددة للصادات الحيوية في الجراثيم الممرضة السلبية الغرام والإيجابية الغرام (Thomson and Bonomo 2005 (Hiramatsu 1997; Rice 2006; Appelbaum (2007، دعا الباحثين إلى التحري عن المواد الصادة من مصادر طبيعية كالطحالب البحرية (Ibtissam *et al*., 2009; Dubber and Harder 2008) والفطريات البحرية (Yang *et al*., 2006) والحيوانات البحرية كالإسفنج (Rungprom *et al*., 2008) فضلاً عن بعض أنواع الجراثيم (Ansaruzzaman *et al*., 2009; Marinho *et al*., 2009). وقد أكدّ العديد من الدراسات امتلاك بعض الجراثيم خصائص صادة كالجراثيم الفوقية للطحالب البحرية تجاه جراثيم أخرى (Zheng *et al*., 2005) (زينب وعباس، قيد النشر)، وخاصة بعض أنواع *Pseudomonas* البحرية (Uzair *et al*., 2006; Saha *et al*., 2008; Marinho *et al*., 2009).

تعدّ جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* شائعة الانتشار ubiquity في بيئات التربة والمياه العذبة والمالحة وفي الرسوبيات وعلى سطوح النباتات والأسماك المغمورة في المياه، وفي بيئات المستشفيات ومياه المسابح مسببة التهابات العين والأذن والأنف والبلعوم وتقيح الجروح والتهابات المجاري التنفسية والبولية وإنتان الدم.... (Pellett *et al*., 1983; Ansaruzzaman *et al*., 2009; Isnansetyo and Kamei 2009).

يعدّ العالم Schroter أول من اقترح تسمية *Bacterium aeruginosa* لهذه الجراثيم (1872) إذ عزلها من جروح متقيحة، ثم جاء Gessard الذي امتدت دراسته عشر سنوات (1882-1892) إذ كان أول من استطاع عزل *P. aeruginosa* من القيح الأخضر المزرق وميّزها بكونها الجراثيم العصوية وأطلق عليها *Bacillus pyocyanin* ثمّ سميت *P. pyocyanin* وقد أثبتت نتائج دراسته أن لهذه الجراثيم نوعين من الصبغات هما: البيوسيانين Pyocyanin و الفلورسين Fluorecin (Vollum *et al*., 1970; Buchanan & Gibbons 1974; Saha *et al*., 2008).

وأكدّ Schoental (1941) أن هذه الجراثيم تطرح أصبغة متعددة إضافة إلى الأصبغة المذكورة في الأعلى هي صباغ البيروبين pyorubin البني المحمر ومادة صفراء اللون شاحبة ذات طبيعة دسمة.

تتميّز جراثيم *P. aeruginosa* بقدرتها على إنتاج صباغ البيوسيانين – الذي يؤدي دوراً مهماً في فيزيولوجية الخلية وهو أحد مشتقات phenazine – وقدرتها على تثبيط نمو أو تحلل بعض الجراثيم الأخرى (Young 1947; Saosoong *et al*., 2009)، ويعدّ الباحث Bouchard (1989) أول من أظهر الخصائص الصادة للجرثوم من خلال تجربته عندما قام بحقن الأرانب بعصيات الجمرة الخبيثة *Bacillus anthracis* وتبيّن له أن الإصابة بالجمرة الخبيثة لا تحدث بعد حقن عصيات القيح الأزرق (blue pus Bacillus)، ثم استخدم رشاحة المزرعة السائلة لجراثيم *P. aeruginosa* لمنع حدوث الإصابة بالجمرة الخبيثة.

إن المزارع القديمة لهذه الجراثيم تنتج α –oxyphenazine الذي يعمل على تثبيط عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة غرام وهو ناتج تفكيك البيوسيانين (Todar 2004; Melville and Russell 1975). وتمكّن الباحث Saosoong *et al*. (2009) وزملاؤه من عزل صاد حيوي أصفر اللون وتنقيته من مزرعة سائلة لجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 وهو 1-Hydroxyphenazine يثبط بعض الأحياء الدقيقة.

وأثبت العديد من الدراسات أن بعض سلالات الزائفة *Pseudomonas* sp. AMSN تنتج مركب 2,4-diacetylphloroglucinol الذي يتميز بخصائص صادة Antibacterial ومحللة lysis لجراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسللين methicillin والفانكومايسين vancomycin عزلت من الطحالب البحرية (Kamei and Isnansetyo 2003; Isnansetyo *et al*., 2003).

الصفات العامة لجراثيم *Pseudomonas aeruginosa*:

خلايا عصوية مستقيمة أو منحنية سالبة صبغة غرام أسطوانية ذات نهاية مدورة يراوح طولها بين (1.5−3.0) ميكرومتر وعرضها (0.5−0.8) ميكرومتر، خلايا مفردة أو أشفاع أو سلاسل قصيرة، تكون متحركة بسوط قطبي واحد أو اثنين أو أكثر، غير مكونة للأبواغ أو المحفظة أو الغُلف، الممرض منها يمتلك طبقة هلامية لزجة محيطة بها.

جراثيم *P. aeruginosa* هوائية إجبارياً Obligate aerobic لكنها يمكن أن تنمو في ظروف لاهوائية إذ تستطيع استخدام النترات مستقبلاً إلكترونياً نهائياً بدلاً من الأوكسجين وذلك يساعدها على النمو في ظروف لاهوائية، تنمو جراثيم *P. aeruginosa* على جميع الأوساط الزرعية الشائعة، ودرجة الحرارة المثلى للنمو 37° م ولكنها تنمو ضمن مجال واسع من درجات الحرارة 5−42° م ويتميز هذا النوع من باقي أنواع *Pseudomonas* بأنه يستطيع النمو في درجة حرارة 42° م (Buchanan & Gibbons 1974) تنمو على وسط الآغار المغذي فتكون مستعمراتها كبيرة دائرية بقطر 3 ملم تقريباً، ذات حافة غير منتظمة نصف شفافة كما أن المستعمرات تكون خشنة غير منتظمة.

أشار (Todar 2004) إلى أن جراثيم *P. aeruginosa* تنتج ثلاثة أنواع من المستعمرات، أولها: الطبيعية المعزولة من الماء والتربة تنتج مستعمرات صغيرة وخشنة، أما المعزولة سريرياً فتظهر المستعمرات بأحد الشكلين الأول منتجة لنوعين الأولى كبيرة وملساء وذات حافات مستوية ومظهر مرتفع، أما الشكل الثاني فغالباً ما تعزل من المسالك البولية والتنفسية وتكون ذات مظهر مخاطي، وفي وسط المرق المغذي تعطي عادة عكارة مع ترسبات ثقيلة، وتستطيع هذه الجراثيم أن تنمو على الكثير من الأوساط الشائعة والمستخدمة في التشخيص مثل وسط MacConkey Agar وإيوزين أزرق المتيلين ووسط سالمونيلا شيغلا آغار (Melville and Russell 1975).

الأس الهيدروجيني المثالي لنمو هذه الجراثيم (7.4−7.6)، تنتج هذه الجراثيم نوعين من الصبغات تدعى الأولى البيوسيانين Pyocyanin الزرقاء المخضرة الذائبة في الماء والكلوروفورم، أما الثانية فهي الفلورسين Fluorecin الصفراء المخضرة الذائبة في الماء ولا تذوب في الكلوروفورم، تظهر ضمن أوساط خاصة مثل King medium A و King medium B (King and Phillips 1978). وتكون المستعمرات ذات رائحة شبيهة برائحة زهر اللوز وهي رائحة الأمينوسيتوفينون الناتج من استقلاب ثلاثي متيل الأمين Trimethyl amine (Phillips 1969) وجراثيم الزوائف الزنجارية مؤكسدة في التفاعلات الاستقلابية غير مخمرة للكاربوهيدرات الشائعة (Isnansetyo and Kamei 2009)، ولكن قد تنتج الحمض في حالة الأكسدة وهذه الصفة تستعمل في تمييزها من الجراثيم السالبة صبغة غرام المخمرة في فصلية الأمعائيات فضلاً عن اختبار الأوكسيداز، حيث تؤكسد سكر الغلوكوز إلى α–Keto glutanic acid، وتحلل البروتين وتميع الجيلاتين ولا تنتج الإندول وكذلك تختزل النترات إلى نتريت (Melville and Russell 1975; Buchanan & Gibbons 1974). تمتلك جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* مقاومة عالية لعدد من الصادات الحيوية الشائعة الاستعمال (السلامي، 2000).

أهمية البحث وأهدافه:

تكمن أهمية هذا البحث في دراسة الفعالية الصادة لمستخلصات جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر متعددة تجاه الجراثيم الممرضة المأخوذة من عينات بشرية مرضية، للاستفادة من المنتجات الاستقلابية الطبيعية لهذا النوع الجرثومي في المستقبل بوصفها مواد فعالة حيوياً بديلة للصادات الحيوية، ويهدف إلى:

1-عزل جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* من مصادر مختلفة.

2-استخلاص المواد الفعالة من جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* .

3-دراسة الفعالية الصادة لمستخلصات جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* تجاه الجراثيم الممرضة المعزولة من عينات مرضية.

طرائق البحث ومواده:

عزل جراثيم *Pseudomonas aeruginosa*

عُزلت ثلاث مزارع من جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* من مصادر مختلفة جميعها تعطي صباغاً أخضر مزرقاً ضمن الوسط الزرعي وهي:

1- العزلة الأولى من مياه نهر الكبير الشمالي عُزلت بتاريخ 2009/11/28.

2- العزلة الثانية من عينة مرضية (بول) مأخوذة من مختبر مستشفى الأسد الجامعي عُزلت بتاريخ 2010/1/3.

3- العزلة الثالثة من عينة مرضية (سائل دماغي شوكي) مأخوذة من مختبر مستشفى الأسد الجامعي بتاريخ 2010/1/20.

باستخدام طرائق قياسية وعلى أوساط مختلفة مثل Cetrimide Agar و Pseudomonas Agar P و Pseudomonas Agar F و Pseudomonas Agar Base وأمكن تحديد النوع الجرثومي بالاعتماد على دراسة الخصائص الزرعية والاختبارات الحيوية الكيميائية والموازنة بينها وبين دليل بيرجي (Buchanan & Gibbons 1947; Krieg and Holt 1984; Sneath *et al.*, 1986; Garrity *et al.*, 2004). أنجز هذا البحث في مختبر البحث العلمي لقسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم بجامعة تشرين خلال عام 2010.

تحضير مستخلصات *Pseudomonas aeruginosa*:

للحصول على المواد الفعالة نُقلت مستعمرة واحدة من كل عزلة من العزلات الثلاث لجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* المزروعة في وسط الآغار المغذي إلى زجاجة (إرلينة) تحتوي 100 مل من وسط pepton water، أضيف إلى هذا الوسط 1% غليسرول لإنتاج الأصبغة الجرثومية (Young 1947)، ثمّ وضعت في حاضنة هزازة في الدرجة 37° م مدة 72 ساعة 120 هزة /د.

بعد انتهاء فترة الحضن وضع المعلق الجرثومي في مثفلة لتقليل عدد الخلايا الجرثومية 10000 دورة /د مدة 10 دقائق، ثمّ رشح السائل الطافي عبر أغشية ترشيح (Millipore) ذات قطر 47 ملم وحجم الثقوب 0.22 ميكرومتر للتخلص من جميع الخلايا الجرثومية.

استُخلص السائل الطافي ثلاث مرات بالمحل العضوي إيتيل أسيتات (EtOAc) Ethyl acetate، في كل مرة أضيف 100 مل من المحل العضوي وفُصل الطور المائي عن المحل باستخدام قمع الفصل، ثمّ ركّزت الخلاصة إلى 1 مل بالتخلص من المحل باستخدام المبخر الدوار في درجة حرارة المختبر، وحُفظت مستخلصات الجراثيم في المجمدة بالدرجة − 20° م حتى يحين استخدامها واختبار فاعليتها الصادة تجاه الجراثيم الممرضة (Saosoong *et al*., 2009; Zheng *et al*., 2005)، بواقع ثلاثة مكررات.

الأحياء الدقيقة المستخدمة لدراسة اختبار التصاد الجرثومي:

اختُبرت مجموعة من الأحياء الدقيقة من عينات مرضية مأخوذة من مختبر مستشفى الأسد الجامعي في مدينة اللاذقية، حيث عُزل من البول الأنواع الآتية: *Escherichia coli* 1 حالة للدم، *Escherichia coli* 2، *Proteus vulgaris*، *Serratia liquefaciens*، *Citrobacter freundii*، *Shigella* sp.، *Streptococcus faecalis*، *Staphylococcus albus* حالة للدم، وخمائر *Candida albicans* ، كما عُزلت من الدم الأنواع الآتية: *Serratia marcescens* حالة للدم، *Klebsiella pneumoniae*، *Enterobacter cloacae*، *Pseudomonas cepacia*، كما عُزل من مفرزات جرح *Acinetobacter* sp.، من مفرزات رغامى *Streptococcus pneumoniae*، من رتج خلفي *Staphylococcus aureus* 1، من مسحة قزحية *Staphylococcus aureus* 2، من مفرزات أذن يمنى *Staphylococcus aureus* 3، من مفرزات ثدي *Staphylococcus aureus* 4، من مفرزات السرّة *Staphylococcus epidermidis*، من البراز *Salmonella* sp.، إضافة إلى عزلتين مأخوذتين من مياه البحر هما: *Streptococcus* sp.، *Bacillus* sp.

أُستخدم العديد من الأوساط لزراعة الجراثيم وتنقيتها من العينات المرضية مثل وسط MacConky Agar – وسط إيوزين أزرق المتيلين EMB Agar – وسط M-FC Agar – وسط SS Agar – وسط M-enterococcus Agar – وسط KF-Streptococcus Agar – وسط شابمان آغار لزراعة العنقوديات – وسط Psedomonas agar p Base – وسط الآغار الدموي لكشف التحلل الدموي وزراعة الجراثيم الحساسة كالمكورات الرئوية – وسط Acetamide agar لتمييز أنواع *Psedomonas* القادرة على نزع الأمين من الأسيت أميد – وسط Potato Dextrose Agar (PDA) لزراعة خمائر *Candida albicans* فضلاً عن الآغار المغذي والمرق المغذي.

أمكن تصنيف الجراثيم المعزولة من العينات المرضية والجراثيم المعزولة من مياه البحر بعد إجراء كامل الاختبارات الحيوية الكيميائية اللازمة (الأوكسيداز ، الكاتالاز، الإندول، أحمر الميتيل، السترات، فوجس بروسكاور، الحركة، اليوريا، تخمر السكاكر، إطلاق H_2S، تحلل الجيلاتين والنشاء، إرجاع النترات، نزع الكربوكسيل من الحموض الأمينية، المختراز coagulase ....) ثمّ بالاعتماد على دليل بيرجي (Krieg and Holt 1984; Sneath *et al*., 1986; Garrity *et al*., 2004) إضافة إلى

(Buchanan & Gibbons 1974; APHA 2000) وأحياناً أُستخدمت أنظمة تحديد الجراثيم (BioMérieux API Staph, API 20 Strep, API 20E System, France).

اختبار الفعالية الصادة للمستخلصات الجرثومية:

اختُبِرت الفعالية الصادة للمستخلصات الجرثومية تجاه الجراثيم الممرضة بطريقة الانتشار بوساطة الأقراص أو طريقة Kirby-Bauer (Bauer *et al.*,1966; Barker & Kehoe 1995; Saosoong *et al.*, 2009)، حيث شربت أقراص ترشيح قطر 6 مليمتر (Whatman, No.1, 6 mm) بمقدار 20 ميكرومتر من المستخلص الجرثومي وتركت لتجف في درجة حرارة المختبر، واستُخدمت أقراص ترشيح مشربة بمقدار 20 ميكرومتر من المحل العضوي إيتيل أسيتات كشاهد سلبي للاختبار.

بعدها أُخذت مستعمرات عدة من المزارع الجرثومية الممرضة النامية في وسط Nutrient Agar عمرها 24 ساعة، وضعت في محلول فيزيولوجي بحيث تعطي عكارة 0.5 ماكفرلاند McFarland Standard ما يعادل 1.5×10^{8} خلية/ مل، أو من المزارع الجرثومية النامية ضمن وسط Mueller Hinton Broth نفس العكارة، أُخذ 0.5 مل من المعلق الجرثومي ووضع فوق وسط Mueller Hinton Agar وفرش على السطح بتحريك الطبق حركة مائلة ثمّ أُزيلت الكمية الزائدة بماصة دقيقة، تركت الأطباق 15 دقيقة في درجة حرارة المختبر ثمَ وزعت أقراص الترشيح المشربة بالمستخلصات الجرثومية الثلاثة المشربة بالمحل العضوي فوق سطح الوسط بملقط معقم وحضنت في الدرجة 37° م مدة 24 ساعة، إن ظهور مناطق التثبيط Inhibition zones واضحة في الآغار حول الأقراص دليل واضح على تثبيط النمو الجرثومي، ثمّ سجلت أقطار التثبيط بعد انتهاء الحضن بالمليمتر بمسطرة مدرجة (Barker & Kehoe 1995; Saosoong *et al.*, 2009)، أُعيدت التجربة بواقع ثلاثة مكررات. واعتماداً على أقطار مناطق تثبيط النمو وُصفت استجابة الأحياء الدقيقة الممرضة والبحرية لمستخلصات جراثيم *Psedomonas aeruginosa* في ثلاث مجموعات: حساسة ومقاومة ومتوسطة الحساسية (مقاومة = 0 ملم، متوسطة الحساسية = 7 – 15 ملم، حساسة = 15.1 – 45 ملم).

النتائج والمناقشة:

نتائج اختبار الفعالية الصادة للمستخلصات الجرثومية تجاه الجراثيم الممرضة:

أثبت الكثير من الدراسات أن أكثر من 95% من جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* تطرح الكثير من المواد الاستقلابية الفعالة حيوياً ضمن المزارع السائلة عند حضنها في درجة حرارة المختبر أو في الدرجة 37° م مع الهز، تبلغ 795 مركباً، منها 610 مركبات لها خصائص صادة Antibiotics تجاه بعض الأحياء الدقيقة الأخرى و 185 مركباً تمتلك فعالية حيوية مختلفة عن الفعالية الصادة، يكون لها دور في عمليات التنافس الجرثومي والمعالجة الحيوية وهي خافضة للتوتر السطحي (Saha *et al.*, 2008; Saosoong *et al.*, 2009; Ansaruzzaman *et al.*, 2009; Isnansetyo and Kamei 2009) .

من المركبات الشائعة phenazine-pyocyanin و 1-Hydroxyphenazine و 1-carboxyphenzine و phenazine-1-carboxyamide أجزاء أمينية amino ، هيدروكسيل Hydroxyl أو كربوكسيل أو ليبيد rhamnolipid وسكاكر متعددة خارجية exopolysaccharide ومركبات البيرول pyroles و quinoline

و quinolone و zafrine . (Machan, *et al.*, 1991; Lars *et al.*, 2006; Onbasli and Aslim 2008; Isnansetyo and Kamei 2009).

يوضح الجدول رقم 1 تأثير المسخلصات الجرثومية والمحل العضوي في العزلات الجرثومية الممرضة، بعد حساب متوسط أقطار حلقات التثبيط بالملم، مع الإشارة إلى أن المستخلص /1/ يعود للعزلة الجرثومية الأولى، والمستخلص /2/ يعود للعزلة الجرثومية الثانية، والمستخلص /3/ يعود للعزلة الجرثومية الثالثة للزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*.

الجدول -1- تأثير مستخلصات الجراثيم والمحل العضوي (الشاهد السلبي) في الأحياء الدقيقة الممرضة.

المستخلصات / الجراثيم	المستخلص /1/	المستخلص /2/	المستخلص /3/	المحل العضوي
	قطر حلقة التثبيط بملم	قطر حلقة التثبيط بملم	قطر حلقة التثبيط بملم	قطر حلقة التثبيط بملم
Escherichia coli 1	*0	0	0	0
Escherichia coli 2	0	0	0	0
Proteus vulgaris	13.6	14	14.3	0
Serratia marcescens	10.6	10.6	11	0
Serratia liquefaciens	0	0	0	0
Klebsiella pneumoniae	0	0	0	0
Enterobacter cloacae	0	0	0	0
Citrobacter freundii	0	0	0	0
Shigella sp.	0	0	0	0
Salmonella sp.	0	0	0	0
Acinetobacter sp.	0	0	0	0
Pseudomonas cepacia	11.6	12	11.3	0
Streptococcus pneumoniae	32.3	32.6	33.3	0
Streptococcus faecalis	31.6	32.3	32.6	0
Streptococcus sp.	33	32.3	32.6	0
Staphylococcus aureus 1	26.6	26.6	27.3	0
Staphylococcus aureus 2	29.6	30	29.6	0
Staphylococcus aureus 3	29	30.3	30	0
Staphylococcus aureus 4	31.3	31.6	32	0
Staphylococcus epidermidis	44.3	43.3	44.6	0
Staphylococcus albus	34.3	35	34.6	0
Bacillus sp.	37.3	36.6	36.3	0
Candida albicans	0	0	0	0

*** المتوسط 0 تأثير سلبي**

يتبين من الجدول المذكور أن مستخلصات جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* قد أثرت في بعض أنواع الجراثيم السلبية غرام كالمتقلبات الشائعة *Proteus vulgaris* وبلغ قطر حلقة التثبيط (13.6 – 14.3) ملم، وأثرت المستخلصات في جراثيم *Serratia marcescens* وبلغ قطر حلقة التثبيط (10.6 – 11) ملم، وأثرت المستخلصات على جراثيم *Pseudomonas cepacia* وسجل قطر حلقة التثبيط (11.3 – 12) ملم، على حين كان تأثير المستخلصات في أنواع الجراثيم الإيجابية غرام أوسع وقطر حلقة التثبيط أكبر أيضاً، حيث أظهرت مستخلصات الجراثيم فعالية تجاه عزلات المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* الأربع المعزولة من عينات مرضية مختلفة، وكانت أقطار حلقة التثبيط ضمن المجال (26.6- 32) ملم، وبعض هذه العزلات محللة للدم. وأثرت أيضاً في المكورات العنقودية الجلدية *Staphylococcus epidermidis* ضمن المجال (43.3 – 44.6) ملم،

والمكورات العنقودية البيض *Staphylococcus albus* ضمن المجال (34.3 – 35) ملم، وهذه النتائج متفقة مع نتائج الباحث (Machan *et al*., 1991) الذي أثبت تأثير مستخلصات جراثيم الزائفة الزنجارية في أنواع العنقوديات وخاصة الذهبية بقطر حلقة تثبيط يقارب 30 ملم وغياب جراثيم العنقوديات الذهبية كلياً من عينات القشع المحتوية على جراثيم الزائفة الزنجارية، كما أثرت مستخلصات جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* في المكورات الرئوية المعزولة من مفرزات رغامى وفي المكورات العقدية البرازية *Streptococcus faecalis* المعزولة من البول وفي المكورات العقدية المعزولة من عينة مائية، حيث بلغ قطر حلقة التثبيط ضمن المجال (31.6 – 33.3) ملم. وأثرت المستخلصات في العصيات المعزولة من المياه البحرية .*Bacillus* sp حيث بلغ قطر التثبيط ضمن المجال (37.3 – 36.3) ملم، والملاحظ من الجدول أيضاً أن الفرق في نتائج المستخلصات الثلاثة العائدة إلى جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* ذات المصدر المختلف مهمل.

لم تؤثر المستخلصات الجرثومية في الخمائر الممرضة *Candida albicans* المعزولة من البول وهذه النتائج متفقة مع دراسات (Uzair *et al*., 2006; Onbasli and Aslim 2008)، ولم تؤثر المستخلصات في عزلتي جراثيم *Escherichia coli*، وفي الجراثيم الأخرى السلبية الغرام المدروسة *Serratia liquefaciens*، *Klebsiella pneumoniae*، *Enterobacter cloacae*، *Citrobacter freundii*، *Shigella* sp.، *Salmonella* sp.، *Acinetobacter* sp.، وبهذا تكون النتائج متفقة مع نتائج الباحث (Ansaruzzaman *et al*., 2009) ولاحظ هذا الباحث تأثير المستخلص الجرثومي لجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* في جراثيم *Vibrio cholera* من النمط المصلي O_1 و O_{139}، ومختلفة عن نتائج (Machan *et al*., 1991) الذي فصل مادة pyocyanin واستخدمها بتركيز 32 ميكروغرام / مل في دراسته، ومختلفة عن نتائج (Saosoong *et al*., 2009) الذي فصل مركب phenazine من مستخلص جراثيم الزائفة الزنجارية من مصدر مياه بحرية.

لم تؤثر مستخلصات جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* في جراثيم *Escherichia coli* في الدراسة الحالية ربما لقلة تركيز المركبات الصادة في المستخلصات.

ونتائج تأثير المستخلصات الجرثومية للزوائف في جراثيم *Pseudomonas cepacia* متفقة مع دراسة (Marinho 2009) وزملائه، وتعزى الفعالية الصادة لهذه الجراثيم بالدرجة الأولى إلى الحموض الدسمة وخاصة غير المشبعة.

تمتلك المركبات الفعالة الصادة المنتجة في مزارع جراثيم الزائفة الزنجارية آليات متعددة في التأثير في الجراثيم: بعضها يؤثر في الغشاء الخلوي الجرثومي، بعضها يسبب تحلل الخلية الجرثومية، وثالث يعمل مثبطاً لتركيب أنزيم أسيتيل– كو أنزيم كربوكسيلاز acetyl-CoA carboxylase ومثبطاً لتركيب أكسيد الآزوتي N_2O (Isnansetyo and Kamei 2009).

إن اختلاف نتائج الدراسة الحالية عن نتائج الدراسات المذكورة وعدم تأثير المستخلصات في الجراثيم الممرضة المُختبرة يعزى إلى عوامل عدة: الجراثيم المدروسة، ظروف الحضن ومدته، الأوساط المستخدمة لزراعة جراثيم الزوائف الزنجارية وإضافة بعض المواد كالغليسرول والسكاكر، جميعها تؤثر في إنتاج المركبات الاستقلابية الصادة، مثلاً تركيب البيوسيانين ضمن الخلية يتأثر بمصدر الكربون والآزوت في الوسط الزرعي، ولنوعية المحل العضوي المستخدم دور في اختيار المركبات الاستقلابية، إضافة إلى تقانات فصل المواد الفعالة من المستخلص واستخدام كل مركب بمفرده وتركيزه في تجربة الفعالية الصادة (Uzair *et al*., 2006; Onbasli and Aslim 2008)، والدراسة الحالية لم تُنجز

عمليات فصل للمركبات في المستخلص، علاوة على الاختلاف في مصدر الجراثيم الممرضة المُختبرة والمريض ومدى تعرضه لعلاج بالصادات الحيوية.

يبين الجدول 2- أن جميع الجراثيم الإيجابية غرام أظهرت حساسية لمستخلصات جراثيم الزائفة الزنجارية، على حين معظم الجراثيم السلبية غرام وفطريات *Candida albicans* أظهرت مقاومة للمستخلصات الجرثومية، باستثناء جراثيم المتقلبات الشائعة *Proteus vulgaris* و *Serratia liquefaciens* و *Pseudomonas cepacia* حيث كانت متوسطة الحساسية لمستخلصات الجراثيم، كما أن جميع الأحياء الدقيقة المُختبرة كانت مقاومة للمحل العضوي ويعود هذا الاختلاف في الحساسية بين الجراثيم الإيجابية الغرام والسلبية الغرام بالدرجة الأولى إلى طبيعة الاختلاف في تركيب الجدار الخلوي عند الجراثيم السلبية الغرام عنه عند الجراثيم الإيجابية الغرام، وهذا يوضح حقيقة أن أغشية الجراثيم السلبية غرام من الصعوبة أن تسمح بنفوذ الجزيئات القطبية (الدسم) وغير القطبية (Onbasli and Aslim 2008) ويُعد إيتيل أسيتات من المحلات العضوية وخاصة المواد الدسمة التي تمتلك دوراً فعالاً في عملية تثبيط النمو الجرثومي وهي ثابتة تجاه الحرارة وهو المحل المستخدم في الدراسة الحالية.

الجدول -2- مقاومة الأحياء الدقيقة الممرضة وحساسيتها لمستخلصات الجراثيم والمحل العضوي.

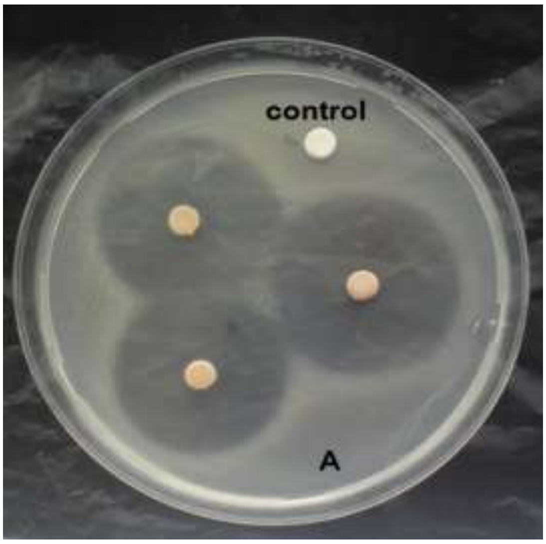
المستخلصات / الجراثيم	المستخلص /1/	المستخلص /2/	المستخلص /3/	المحل العضوي
Escherichia coli 1	R	R	R	R
Escherichia coli 2	R	R	R	R
Proteus vulgaris	I	I	I	R
Serratia marcescens	I	I	I	R
Serratia liquefaciens	R	R	R	R
Klebsiella pneumoniae	R	R	R	R
Enterobacter cloacae	R	R	R	R
Citrobacter freundii	R	R	R	R
Shigella sp.	R	R	R	R
Salmonella sp.	R	R	R	R
Acinetobacter sp.	R	R	R	R
Pseudomonas cepacia	I	I	I	R
Streptococcus pneumoniae	S	S	S	R
Streptococcus faecalis	S	S	S	R
Streptococcus sp.	S	S	S	R
Staphylococcus aureus 1	S	S	S	R
Staphylococcus aureus 2	S	S	S	R
Staphylococcus aureus 3	S	S	S	R
Staphylococcus aureus 4	S	S	S	R
Staphylococcus epidermidis	S	S	S	R
Staphylococcus albus	S	S	S	R
Bacillus sp.	S	S	S	R
Candida albicans	R	R	R	R

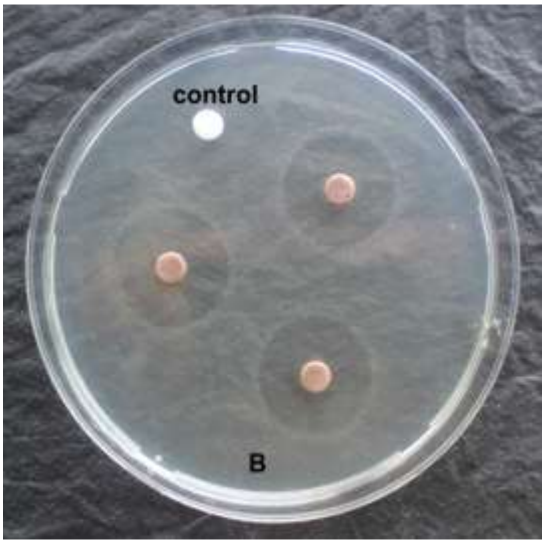
R= Resistant, I= Intermediate, S= Susceptible

مقاومة (R) = قطر حلقة التثبيط 0 متوسطة الحساسية (I) = قطر حلقة التثبيط 7 – 15 ملم

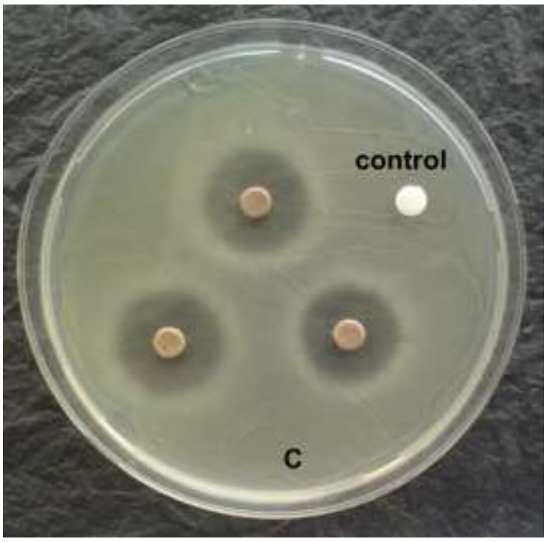
حساسة (S) = قطر حلقة التثبيط 15.1 – 45 ملم

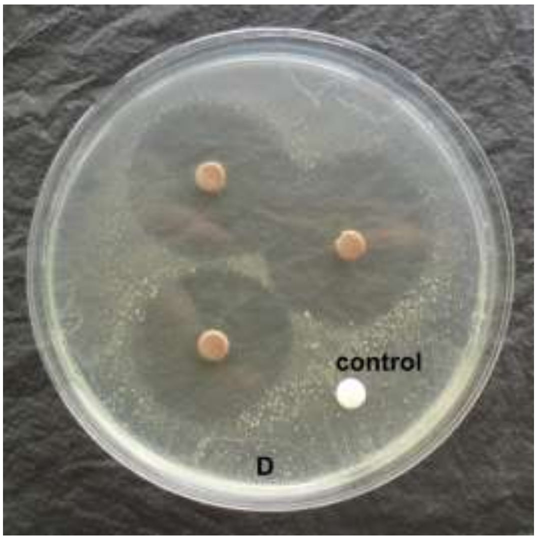
ويوضح الشكل رقم 1 حلقات التثبيط لبعض الأنواع الجرثومية المدروسة إضافة إلى نتائج الجراثيم والخمائر المقاومة للمستخلصات.



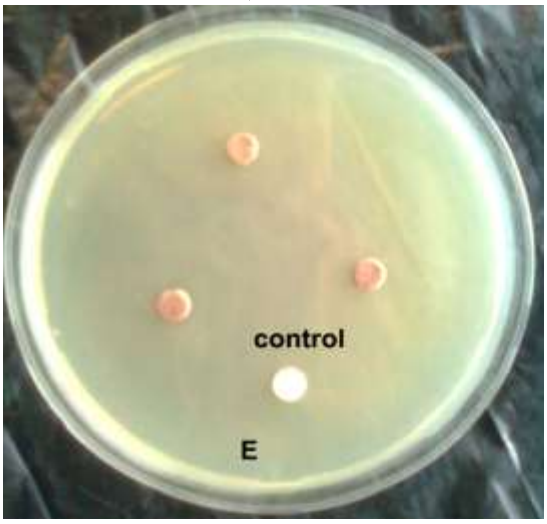


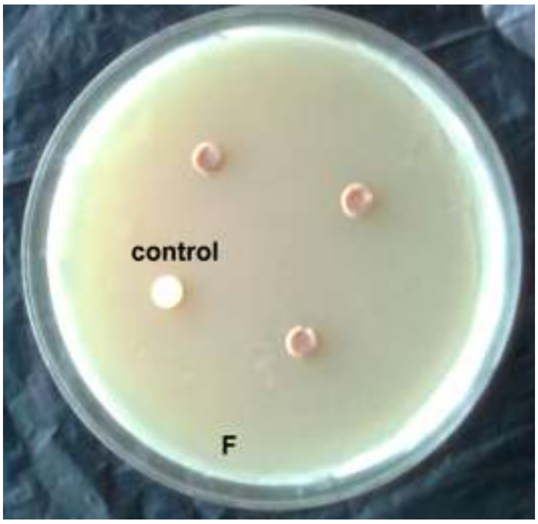
A: التأثير الصاد للمستخلصات في جراثيم *Bacillus* sp. **B: التأثير الصاد للمستخلصات في *Staphylococcus aureus***





C:التأثير الصاد للمستخلصات في *Pseudomonas cepacia* **D: التأثير الصاد في العقديات *Streptococcus faecalis***





E: غياب فعالية المستخلصات في جراثيم *E. coli* **F: غياب فعالية المستخلصات في خمائر *Candida albicans***

الشكل -1- حلقات التثبيط لمستخلصات جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* في بعض الأحياء الدقيقة المدروسة.

الاستنتاجات والتوصيات:

أظهرت نتائج هذا البحث أن مستخلصات جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* في إيتيل أسيتات وهي مركبات استقلابية ثانوية صباغية تمتلك فعالية صادة تجاه الجراثيم السلبية والإيجابية غرام الممرضة وخاصة الأخيرة، لذا يمكن أن يكون لهذه الجراثيم دور في الحصول على المواد الفعالة تجاه أنواع العنقوديات الممرضة سواء أكانت الذهبية والبيضاء أم الجلدية .*Staphylococcus* spp وبعض أنواع المكورات العقدية كالعقديات الرئوية والبرازية الممرضة الحالة للدم. انطلاقاً من هذه النتائج لا بدّ من القيام بإجراء دراسة أوسع حول المستخلصات وتحديد طبيعة المركبات الكيميائية فيها بهدف إمكان الحصول على مواد حيوية فعالة لمعالجة الإنتانات الجرثومية مستقبلاً.

المراجع:

1-السلامي، نبراس يحيى عبد الله. *دراسة تأثير مستخلصات نباتي الآس* .*Myrtus communis L* *والثوم* *Allium sativum* *في بكتريا* *Pseudomonas aeruginosa* *خارج وداخل الجسم الحي*. رسالة ماجستير، جامعة الكوفة، 2000، 106 صفحة.

2-زينب، أسمهان وعباس، آصف. *الجراثيم الفوقية المرتبطة بالطحالب البحرية: مصادر محتملة للمواد الصادة للجراثيم*. مجلة جامعة تشرين للعلوم البيولوجية.2010، قيد النشر.

3-ANSARUZZAMAN, M.; NAIR, G. B; ENDRZ, H. P. *Antibacterial Substance Produced Pseudomonas aeruginosa with High In-Vitro Antimicrobial Activity against Vibrio cholera* O_1 *and* O_{139}. Scientific Session. 2009, 1 February. 2010. http://www.sciencedirect.com/

4-APHA, AWWA and WEF, *Standard Methods for Examination of water and wastewater*. 20th edition. American Public Health Association, Inc., Baltimore, M.D. USA. 2000.

5-APPELBAUM P. C. *Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). International Journal of Antimicrobial Agents, Vol. 30, 2007, p. 398-408.

6-BARKER, G. A.; KEHOE, E. *Assessment of disc diffusion methods for susceptibility testing of Aeromonas salmonicida*. Aquaculture, Vol. 134, 1995, P. 1-8.

7-BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C. and TURCK, M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am. J. Clin. Pathol., , Vol. 45, N°.4, 1966, P. 493-496.

8-BOUCHARD, C. *Influence qu'exerce sur la maladie charbonneuse l'inoculation du bacille pyocyanique.* Compt. rend., 108, 1989,713-714.

9-BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eight Edition, William & Wilkins, Baltimore, USA., 1974, P. 1-573.

10-DUBBER D. and HARDER T. *Extracts of Ceramium rubrum, Mastocarpus stellatus and Laminaria digitata inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations*. Aquaculture, 274, 2008, 196-200.

11-GARRITY, G. M.; BELL, J. A. and LILBURN, T. G. *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd Edition, Springer, New York Berlin-Heidelberg, 2004, 401.

12-HIRAMATSU, K. *Reduced susceptibility of Staphylococcus aureus to vancomycin-Japan,1996*. Am. J. Infect. Control, Vol. 25, 1997, p. 405-408.

13-IBTISSAM, C.; HASSANE, R.; JOSÉ, M-L.; FRANCISCO, D. S. J. F.; ANTONIO, G. V. J.; HASSAN, B. and MOHAMED, K. *Screening of antibacterial activity in marine*

green and brown macroalgae from the coast of Morocco. African Journal of Biotechnology, Vol. 8, N°. 7, 2009, p. 1258-1262.

14- ISNANSETYO, A.; KAMEI, Y. *Bioactive substances produced by marine isolates of Pseudomonas.* J. Industrial Microbiology & Biotechnology. Vol. 36, N°. 10, 2009, P. 1239-1248.

15-ISNANSETYO, A.; CUI, L., HIRAMATSU, K.; KAMEI, Y. *Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by Pseudomonas sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant Staphylococcus aureus.* International Journal of Antimicrobial Agents, Vol. 22, 2003, P. 545-547.

16-KAMEI, Y.; ISNANSETYO, A. *Lysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by 2,4-diacetylphloroglucinol produced by Pseudomonas sp. AMSN isolated from a marine alga*. International Journal of Antimicrobial Agents, Vol. 21, 2003, P. 71-74.

17-KING, A. and PHILLIPS, L. *The identification of pseudomonas and related bacteria in a clinical laboratory*. J. Med. Micobiology, 11, 1978, 165-176.

18-KRIEG N.R. AND HOLT J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Lippincott William & Wilkins, Baltimore, M.D. USA. Vol. 1, 1984, P. 1 – 964.

19-LARS, E. P.; WHELAN-P. A.; PETERSEN, A.; WHITELEY, M. and NEWMAN, D. K. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa.* Molecular Microbiology, Vol. 16, N°.5, 2006, P. 1308-1321.

20-MACHAN, Z.A.; PIT, T. L.; WHITE, W.; WATSONT, D.; TAYLORT, G. W.; COLE, P. J. and WILSONS, R. *Interaction between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus: description of an antistaphylococcal substance.* J. Med. Microbiol., Vol. 34, 1991, P. 213-217.

21-MARINHO, P. R.; MOREIRA A. P. B.; PELLEGRINO, F. L. P. C.; MURICY, G.; BASTOS, M. D. C. D. F.; SANTOS, K. R. N. D.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M. S. *Marine Pseudomonas putida: a potential source of antimicrobial substances against antibiotic-resistant bacteria*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.144 , N°. 5, 2009, P.678-682.

22-MELVILLE, T. H. and RUSSELL, C. *Microbiology for Dental Students.* 2nd Edition, Printed in Great Britain by the White Friars Press Ltd., London and Tondridge, 1975, p. 220-222.

23-ONBASLI, D. and ASLIM, B. *Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by Pseudomonas aeruginosa B1 and B2 in sugar beet molasses.* African Journal of Biotechnology, Vol. 7, N°. 24, 2008, P. 4614-4619.

24-PELLETT, S.; BIGLEY D. V. and GRIMES, J. *Distribution of Pseudomonas aeruginosa in a Riverine Ecosystem*. Applied and Environmental Microbiology, , Vol. 45, N°.1, 1983, P.328-332.

25-PHILLIPS, I. *Identification of Pseudomonas aeruginosa in the clinical libratory*. Journal of Medical Microbiology, 2 : 1969, p. 9-16.

26-RICE, L. B. *Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria*. Am. J. infect. control, Vol. 34, N°. 5, 2006, p. 11-19.

27-RUNGPROM, W.; SIWU, E. R. O.; LAMBERT L. K.; DECHSAKULWATANA, C.; BARDEN, M. C.; KOKPOL, U.; BLANCHFIELD, J. T.; KITA, M.; GARSON M. J. *Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed Diginea sp. And the sponge Halisarca ectofibrosa.* Tetrahedron, 64, 2008, P. 3147-3152.

28-SAHA, S.; THAVAS, R. and JAYALAKSHMI, S. *Phenazine pigments from Pseudomonas aeruginosa and their application as antibacterial agent and food colourants*. Res. J. Microbiol., Vol. 3, 2008, 122-128.

29-SAOSOONG, K.; WONGPHATHANAKUL W.; POASIRI, C. and RUANGVIRIYACHAI, C. *Isolation and analysis of antibacterial substance produced from P. aeruginosa TISTR 781*. KKU. Sci. J. Vol. 37, N°. 2, 2009, P. 163-172.

30-SCHOENTAL, R. *The nature of the antibacterial agents present in Pseudomonas pyocyaneus culture*. Brit. J. Exptl. Path., Vol. 22, 1941, P. 137-147.

31-SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. and HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Lippincott William & Wilkins, Baltimore, M.D. USA. Vol. 2, 1986, P. 965 – 1599.

32-THOMSON, J. M. and BONOMO, R. A. *The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β-lactams in peril!* J. mib. Vol. 8, 2005,p. 518-524.

33-TODAR , K. *Text Book of Bacteriology*. University of Wisconson –Madison, Department of Bacteriology, U.S.A., 2004.

34-UZAIR, B.; AHMED, N.; KOUSAR, F.; EDWARDS, D. H. *Isolation and Characterization of Pseudomonas Strain That Inhibit Growth of Indigenous and Clinical Isolate*. The Internet Journal of Microbiology, Vol. 2, N°. 2, 2006. 16 February. 2011. http://www.sciencedirect.com/

35--VOLLUM, R. L.; JAMISON, D. G. and CUMMINS, C. S. *Fairbrother's Text Book of Bacteriology*, 10th ed..Arnold Hwinmann Purlisher .India, 1970.

36-YANG, R.-Y.; LI, C.-Y.; LIN, Y-C.; PENG, G.-T.; SHE, Z.-G. and ZHOU, S.-N. *Lactones from a brown alga endophytic fungus (No. ZZF36) from the South China Sea and their antimicrobial activities*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16, 2006, P. 4205-4208.

37-YOUNG, G. *Pigment Production and Antibiotic Activity in Cultures of Pseudomonas aeruginosa*.54 ,1947, 109-117.

38-ZHENG, L.; HAN, X.; CHEN, H.; LIN, W.; YAN X. *Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources*. Annals of Microbiology, Vol. 55, N°. 2, 2005, P. 119-124.