



جامعة سبها – كلية العلوم

قسم : علم النبات

شعبة الأحياء الدقيقة

بحث تخرج مقدم لاستكمال متطلبات الحصول على درجة البكالوريوس

بعنوان :-

عزل البكتيريا المقاومة للمضاديين الحيويين النستاتين والستربتومايسين من التربة

إعداد الطالبات /

عائشة وردكو صالح

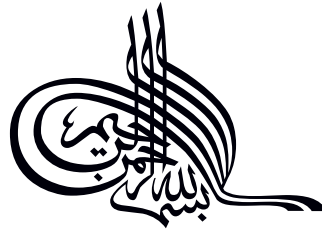
عائشة بركة محمد

حواء شهاء حسن

تحت إشراف الدكتور /

عبد الهادي البصير

العام الجامعي



﴿ رَبِّ أَوْزِرْ عَنِّي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ وَعَلَىٰ وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ ﴾ .

بِسْمِ اللَّهِ
الْعَظِيمِ

الإمام

بدأنا بأكثر من يد وقاسينا أكثر من هم وها نحن اليوم والحمد لله نطوي سهر الليالي وتعب السنين وخالصة مشوارنا بين دفتي

هذا البحث الذي لا يسعنا فيه إلا أن نهدي حصيلة جهدنا

إلي من كان سببا في مسيرتنا هذه إلى منارة العلم والعالمين . . . إلى سيد الخلق إمام المرسلين . . . إلى الأمي الذي علم خلق الله

أجمعين إلى خاتمة الأنبياء والمرسلين . سيدنا محمد (صلي الله عليه وسلم)

إلى صاحبة أظهر قلب ،، إلى الحُضن الذي ضمنا ونحن صغار وسهر الليالي في سقمنا وسقانا من عطفه ،، إلى القلب الذي يرقبنا

وخطي معنا الحياة خطوة بخطوة إلى من كان دعائها من أقوى أسباب توفيقنا إلى من يسعد قلبي ببقاياها

"أمي"

إلى رمز الرجولة والتضحية إلى من دفعني إلى العلم وبه انرداد افتخار إلى منهل العطاء الذي استمد منه قوتي . . . إلى من سعي

وشقي ليضمن لي مراحتي .

"أبي"

فؤادي إلى الجدار التي تعمقت في داخلي ،،،، إلى هجة وبسمة أيامي وأنسي في صغري ،،،، إلى من ملئت حياتي بالأمل والسعادة

"جدتي أطل الله في عمرها"

إلى من هم اقرب ألي من مروحي إلى من شاركني حزن الأمر وهم استمد عزتي وإصراري إلى من أقاسمهم الحياة حلوة ومرّة
.. إلى نور الدنيا الساطع ومر من الاقتحاس .. إلى سندي في الحياة وعوني على الأيام .. إلى الذين عشت معهم طريقي
وقاسموني همومي وشاركوني فرحتي ..

"أخوتي وأخواتي"

إلى من أنسني في دراستي وشاركتني همومي تذكراً وتقديراً

"أصدقائي"

الباحثات

كلمة الشكر

بسم الله والحمد لله والصلاة والسلام على رسول الله

نشكرك الله تعالى أولاً وأخيراً وهو القائل ﴿ولئن شكرتم لأزيدنكم﴾

يا من خلقت فسويت .. أنعمت فأكرمت .. أعطيت فأكرمت .. لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك
وعظيم سلطانك علي ما وفقني وأعنتني علي إنجاز هذا البحث .

أتقدم بخزير الشكر والعر فان للذي أمدني بعلمه ولم يدخل علي بجهده ووقته في إنمام هذا البحث

الدكتور الفاضل: عبد لهاذي البصير فله منا خالص الشكر والتقدير والاحترام .

كما يسرنا أن نوجه بالشكر إلى من قدمت لنا النصائح القيمة والنوجيهات التي أنارت لنا الطريق
كما يسعدني أن أقدم جزيل الشكر والتقدير والعرفان

الأستاذة الكريمة : مسعودة عمر خليفة

والأستاذة الكريمة : مريم عبد النبي

اللاتي قدمنا لنا يد العون فأثلهما الله وجزاهما عني خيرا . و أقدم شكري وتقديري إلى كل من يد
العون والشجع ولو بكلمة طيبة .

فهرس المحتويات

رقم الصفحة	<u>الموضوعات</u>	ت
أ	الآيةالقرآنية	--
بالإهداء	--
ج	كلمةالشكر	--
	المقدمة	1

1 المضادات الحيوية	1.1
2 التضاد الحيوي	2.1
5 الكائنات المجهرية والمضادات الحيوية	3.1
6 مقاومة البكتيريات للمضاد الحيوي	4.1
7 الصفات الواجب توافرها في المضادات الحيوية	5.1
8 المضاد الحيوي النستاتين	1.5.1
9 الستربتومايسين	2.5.1
9 الخصائص الفيزيائية والكيميائية	6.1
10 تثبيط الريبوسومات	1.6.1
10 زيادة نفاذية الغشاء الخلوي البكتيري	2.6.1
11	Antibacterial spectrum طيف الفاعلية	7.1
.....		
11	Bacterial resistance مقاومة البكتيريا	8.1
.....		
13 الفرضية	9.1
.....		
2 . المواد وطرق العمل		
14 اوساط النمو	1.2
14 جمع وتحضير العينات	2.2
15 النتائج والمناقشة	3
20 الخلاصة	4
21 المراجع العربية	5
22 المراجع الأجنبية	6

فهرس الأشكال

رقم الصفحة	الأشكال	ت
17	المستعمرة المعزولة من حديقة كلية العلوم على الوسط الغذائي مستخلص الخميرة والمضاد الحيوي الستربتومايسين.....	1
17	إعادة زرع البكتيريا المعزولة من حديقة كلية العلوم على الوسط الغذائي مستخلص الخميرة والمضاد الحيوي الستربتومايسين.....	2
18	البكتريا المعزولة من تربة منطقة زلاف.....	3
18	إعادة زرع وتنقية البكتيريا المعزولة من منطقة زلاف.....	4
19	نمو الاكتينومييسيتات المعزولة من رملة منطقة زلاف الوسط الغذائي مستخلص الخميرة والجليسرول مع المضاد الحيوي النستاتين.....	5
19	يوضح تفاعل صبغة جرام للأكتينومييسيتات المعزولة.....	6

الفصل الأول

المقدمة Introduction

1.1. المضادات الحيوية تحمي الكائنات الحية نفسها في بيئاتها الطبيعية من تأثير فعل الكائنات الأخرى المضاد لها بطرق مختلفة، حيث تتجمع الكائنات بأعداد كبيرة لكي تستهلك معظم الغذاء المحيط بها وذلك بغرض تجويع الكائن المنافس لها أو المضاد لنموها، وكنتيجة لزيادة تجمعها تصبح البيئة عالية الحموضة أو القلوية بدرجة لا تسمح لنمو الميكروبات المنافسة. تزيد الميكروبات من التوتر السطحي أو الضغط الأسموزي للبيئة بدرجة لا تسمح لغيرها بالنمو، تفرز الميكروبات بعض المواد (مضادات حيوية) التي تؤدي إلى قتل أو منع نمو الكائن المنافس، حيث

تتدخل هذه المواد في التحولات الأيضية للكائن المنافس مما يؤدي إلى منع نموه أو قتله و بناءا على ما سبق فالمضادات الحيوية عبارة عن مواد كيميائية عضوية تتكون نتيجة للتفاعلات الأيضية لبعض الكائنات الحية الدقيقة والتي تكون ذات تأثير قاتل أو مثبط لنمو أو نشاط غيرها من الكائنات الدقيقة .

ومن مدلول التسمية (مضادات حيوية) يمكن أن نتفهم مدى أهميتها في تنظيم المحتويات الميكروبية للمجاميع المختلطة في البيئات الطبيعية ولا يوجد من الأدلة ما يكفي للتحقق من تأثير مثل هذه المواد السامة على الكائنات التي تؤثر عليها إلا أنه من المعروف أنها تعمل على بعض المراكز الأيضية الهامة بالخلايا ومثال على ذلك وجد إن المضاد الحيوي كلورا مفينيكول يشابه في تركيبه الكيميائي الحمض الأميني فينيل الانين كما ان اضافة هذا الحمض الاميني الي البيئة يمكنه ان يعكس الفعل الضار للتركيزات المنخفضة من المضاد الحيوي المشابه له في التركيب بطريقة تنافسية. تستعمل المضادات الحيوية حالياً كنوع من المواد الكيميائية الطبيعية العلاجية natural chemotherapeutic agents لعلاج كثير من الأمراض الميكروبية وبالرغم من الحقيقة المعروفة من أن بعض هذه المواد قد أمكن تصنيعها تجارياً synthetically prepared على نطاق واسع إلا أن غالبيتها لا زالت تحضر تجارياً بالاستعانة بالكائنات الحية الدقيقة القادرة على إنتاجها.

(أبو ذهب، 1965)

1. 2. التضاد الحيوي

عرفت ظاهرة التضاد الحيوي بين الكائنات الحية الدقيقة منذ زمن طويل، استعملت كلمة تضاد حيوي لأول مره بواسطة العالم (1889) Vuillemin الذي عرفها بأنها الظروف التي يمكن تحتها لكائن حي إبادة آخر ليحتفظ هو بحياته

ووجوده. عرفت نشاط المضادات الحيوية منذ مدة طويلة قبل اعطائها تسميتها الحالية، حيث استخدم الصينيون القدامى معلق حبوب فول الصويا *Glycine max* المخمر بفعل بعض الأعفان في علاج الدامل وجروح الاقدام، إن البيئة العكرة نتيجة لنمو بعض البكتيريات بها تصبح رائقة عندما تنمو الأعفان على سطحها. إن خلايا بكتيريا الجمرة الخبيثة *Bacillus anthracis* تختفي من المزارع عندما تتلوث ببعض الكائنات الحية الأخرى، إن حقن بعض من مزارع *Pseudomonas aeruginosa* بحيوان مخبري (الأرنب) يقيه (يحميه) من الإصابة بمرض الجمرة الخبيثة. ومن الملاحظات القديمة عن استغلال ظاهرة التضاد الحيوي للميكروب في الأغراض العلاجية ما أشار به ميتكنيكوف في استعمال البكتيريا التابعة لجنس *Lactobacillus* في علاج الدوسنتاريا وتعتبر هذه المحاولة مثلاً واضحاً للعلاج التبادلي replacement therapy والتي تعني إضافة أو حقن ميكروب غير ضار ليحل محل ميكروب آخر ضار ممرض ويقضي الاول على الثاني داخل الجسم، ثم تطور العلاج باستعمال الجوهر النشط في التأثير على البكتيريات، والذي يتم الحصول عليه من ناتج نمو الكائنات التي تعرف بقدرتها على الإفراز في بيئة غذائية مناسبة. يعتبر كل من أول من قاما بأبحاث منظمة لدراسة المضادات الحيوية حيث أمكنهما اكتشاف مادة اكتينومييسين Actinomycin التي تفرزها بعض الاكتينوميسيتات التربة، ولم يستعمل هذا المضاد الحيوي لعلاج المرضى بل أنه استعمل لمعاملة مزارع البكتيرية خارجياً لتحضّر الفوكسين اللازمة، وفيما بعد لاحظ العالم فلمنج Alexander Fleming أن مزارع *Staphylococcus aureus* الملوثة ببعض الفطريات أوقفت نموها وتحللت خلاياها نتيجة لنمو تلك الفطريات وإفرازها لبعض المواد السامة، ثم قام بعزل هذه الفطريات للتعرف عليها ودراسة نشاطها والذي عرف فيما بعد بفطر *Penicillium nutatum* ولما كان الفطر المعزول ينتمي الي جنس *Penicillium* لذلك أطلق على المضاد الحيوي الذي تفرزه

إسم penicillin ولم يتعرف على أهمية اكتشاف فلمنج لهذا المركب في علاج أمراض الإنسان المعدية إلا خلال الحرب العالمية الثانية، وابتدأ من عام 1939 تمكن بعض الباحثون منهم Dubos من عزل السلالة من البكتيرية *Bacillus brevis* لها قدره على افراز بعض المواد السامة البكتيرية الموجبة لصبغة جرام والتي تتركب من مادتين مضادتين لهذه البكتيريات وهما (Tyrothirin Tyrocidine Gramicidin) وأعقب هذا الاكتشاف ما قام به Solman Waksman ومساعدوه من اكتشاف المضاد الحيوي ستريتومايسين من جنس *Streptomyces* وهي نوع من أنواع بكتيريا التربة والتي تسمى الآن الأكتينومايسينات كما أن هنالك مضادات حيوية تم استخلاصها من فطريات الجنس *Aspergillus*، وتم اكتشاف نوع آخر من فطريات الـ *Penicillium* والذي ينتج الـ *penicillin* بكميات وفيرة وهو *Penicillium chrysogenum* اكتشف بأن المضادات الحيوية المستخلصة من الفطريات تعطي تأثيرات واسعة المدى على كل من البكتيريا و الفطريات ومنذ ذلك الوقت اكتشف مئات من المضادات الحيوية، وامكن التعرف عليها واستعمل بعضها في العلاج الداخلي للإنسان والحيوان كما ان البعض الآخر قد طور كثير من المعلومات المعروفة عن عمليات العلاج الداخلي، وان المزيد من هذه المواد لا زالت غير معروفة، بعض المضادات الحيوية معروفة حاليا ومستعملة في العلاج الداخلي للأمراض الميكروبية والكائنات التي تفرزها وتاريخ اكتشافها ومجال ميكروبي التي تؤثر عليه وعموما تتميز المضادات الحيوية بقدرتها العالية على ايقاف النمو او قتل العديد من البكتيريات مع قلة تأثيرها الضار على خلايا العائل وأن بعض هذه المضادات الحيوية تستعمل الآن في علاج الأمراض البكتيرية التي تصيب النباتات أيضاً.

تستعمل في كثير من الاحيان مخاليط من مضادين حيويين أو أكثر للقضاء على الأمراض التي قد تكتسب مناعة إذا ما استعمل مضاداً حيوياً واحداً وللقيام بإجراء المزج يجب أن يراعي عدم تدخل أحد أفراد المخلوط في كفاءة المحتوى الآخر في إبادة أو إيقاف نمو الميكروب المسبب للمرض كما يجب أن تكون مكونات المخلوط من المضادات الحيوية مختلفة عن بعضها من الوجهة الكيميائية حتى يكون لكل منها طريقته الخاصة في تأثيره على الكائنات الممرضة وكذلك لعدم أقله الطفرات المضادات لفعل أحد مكونات المخلوط إذا ما تكونت بجسم العائل وعند خلط المضادات الحيوية بمركبات السلفوناميد أمكن الحصول على نتائج علاجية أفضل بكثير من استعمال كل بمفرده .

1. 3. الكائنات المجهرية والمضادات الحيوية

تنتشر الإحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية بصورة واسعة في الطبيعة، حيث وجدت في التربة والماء وبقايا النباتات والحيوانات وتعتبر التربة المصدر الرئيسي لعزل الكثير منها لذلك اتجه الكثير من الباحثين الي التربة لغرض الحصول على العزلات من الأحياء المجهرية منتجة للمضادات حيوية جديدة (Egoro, 1985).

ظهرت أدلة علمية على كفاء الإحياء العلاجية في التأثير وأنها شملت أنواع عديدة من جنس العصيات وانواعا من البكتريا الأخرى (الخفاجي ، زهرة ، 2008)

لقد استعمل مصطلح مضادات الحيوية (Antibiotics) لأول مرة عام 1942 من قبل العالم Waksman الذي استطاع تعريف مضادات الحيوية على إنها مواد أيضا تنتجها الإحياء المجهرية تقوم بتنشيط نمو أحياء مجهرية أخرى ولا تؤثر على البكتريا المنتجة لها (Waksman, 1967)

المضادات الحيوية نواتج أيض ثانوية Secondary metabolites من نواتج التمثيل الغذائي للميكروبات "لأن تمثيلها غير مرتبط بنمو الميكروبات" وتلعب الكائنات المجهرية دوراً مميزاً في إنتاج المضادات الحيوية ، فأكثر من حوالي 85 % من المضادات تكونها الميكروبات، 60 % من هذه النسبة ينتج من الأكتينوميستات، 10 % من البكتريا، 10 % من الفطريات والنسبة الباقية تنتج من كائنات أخرى مثل الطحالب والاوليات والنباتات الراقية (مبارك و آخرون، 2005). المضادات الحيوية منها ما يؤثر على بدائيات النواة كالبكتيريا ومنها ما يؤثر على حقيقيات النواة كالفطريات .

1. 4. مقاومة البكتيريات للمضاد الحيوي :

إن اكتساب مقاومة مزرعة بكتيرية او أي كائن دقيق آخر للفعل الضار للمضادات الحيوية يعتمد كثيرا على تكوين طفرات مقاومة لها أو الى حدوث الانتخاب الطبيعي لسلاسله طفريه مقاومة لهذه المضادات الحيوية .

هناك ثلاثة طرق اساسية يمكن للبكتيرية ان تقاوم بها الفعل السام للمضادات الحيوية وهي:

1- إنتاج البكتيريات لأنزيمات توقف نشاط المضاد الحيوي مثل انزيمات بيتا - لاكتامازات β -lactamases التي توقف نشاط البنسيلينات وسيفالوسبورينات عن طريق ارتباط حلقة بيتا لاكتام بالمضاد الحيوي.

2- يمكن للبكتيريات تخليق مركبات مستهدفة لا تؤثر عليها المادة السامة مثل ذلك تطفر البروتين في الوحدة البنائية 30S من الريبوسوم وهذا ينتج عنه مقاومة البكتيريات للستربتوميسين، كما أن اضافة مجموعة الميثايل للوحدات البنائية (S 23 RNA r) يمكن ان تؤدي الى مقاومة البكتيريات للاريثروميسين .

3-تغير البكتيريات نفاذيتها، وهذا يؤدي الى عدم وصول التركيز الفعال من المادة السامه داخل الخلية البكتيرية و مثال وجود تركيز من التتراسيكلينات اقل داخل البكتيريات المقاومة الحساسة لها (أبو ذهب ، 1965).

1. 5. الصفات الواجب توافرها في المضادات الحيوية :

ان المضادات هي مجموعة من المواد العلاجية التي تستعمل داخليا Chemotherapeutic agents، لذلك يجب أن يتوفر فيها كل مقاومات المواد العلاجية صفات مما يلي:-

1- أن يكون لها القدرة على إبادة عدد كبير من الأنواع الطفيلية اي أن يكون لها مجال ميكروبي واسع.

2- يجب أن لا يكون لها قدره على انتخاب سلالات مقاومة لها من الطفيليات.

3- يجب أن لا يحدث تأثيرات ثانوية Side effects بجسم العائل مثل الحساسية أو التأثير على الأعصاب أو تهيج الكلية أو القناة الهضمية.

4- يجب أن لا تقضي على الميكرو فلورا الطبيعية للعائل، أو بمعنى آخر أن لا تؤثر تأثير مبيدا شاملا على محتويات القناة الهضمية من الكائنات الحية الدقيقة النافعة، إذ أن حدوث ذلك يفسد التوازن الطبيعي لهذه الميكرو فلورا ويسمح بتأقلم كثير من الكائنات غير المرضية أو المرضية جزئيا والتي كانت الفلورا الطبيعية بجسم العائل تعمل على عدم تأقلمها.

وكلما كان المضاد الحيوي ذا مجال ميكروبي واسع، كلما كانت له القدرة على القضاء على الميكرو فلورا الجسمية التي تقوم بتجهيز الفيتامينات اللازمة للجسم فيشترط عند استعمال مثل هذا المضاد الحيوي إعطاء العائل كميات كافيه من

الفيتامينات وخاصة تلك التابعة لمجموعة فيتامين ب والتي تقوم الفلورا الطبيعية بالقناة الهضمية بتخليقها (أبو ذهب، 1965).

1. 5. 1. المضاد الحيوي النستاتين Nystatin:

ينتمي إلي مجموعة الماكروليدات البولينية و التي تتميز بوجود حلقات اللاكتون المكونة من 30 أو اكثر من ذرات الكربون مع وجود الهيدروكسيل كبديل وتشمل سلاسل تحتوي على 4- 7 اواصر (روابط) ثنائية مقترنة، لا يمتص النستاتين من خلال طبقات الجلد أو الأوعية المخاطية أو القناة الهضمية؛ لذلك يستخدم في حالات التهابات الفطر السطحية التي تصيب طبقات الجلد الخارجية وتجويف القناة الهضمية، يؤثر هذا المضاد في الغشاء الخلوي للفطر، حيث يرتبط بالكحولات الصلبة للغشاء من نوع Ergo sterol الامر الذي يؤدي إلى احداث ثقب في الغشاء الخلوي وبالتالي احداث خلل في وظيفة الغشاء "خاصة في النفاذية الاختيارية" وبالنتيجة تثبيط الخلية الفطرية (شاهين و شاهين، 2008).

آلية التأثير

كما هو الحال في باقي المضادات الفطرية المنتمة لمجموعة البولين يرتبط النستاتين بالأجيسترول، المكون الرئيس للغشاء السيتوبلازمي في الفطريات، كما أنه يؤدي عند توافره بتركيز مناسبة، إلى إحداث ثقب في هذا الغشاء الأمر الذي يؤدي إلى تسرب البوتاسيوم خارج الخلية وبالتالي موت الخلية.

فإن النستاتين من أصل جرثومي. تم عزل النستاتين في عام 1950 على يد إليزابيث لي هازين وراشيل فلور داون من جراثيم تدعى ستربتومييسين نورسي Akaike & Harata (1994) its application Streptomyces nourse

1. 5. 2. الستربتومايسين Streptomycin:

يتبع مجموعة الامينوجلايكوزيدات المتكونة من سكريات امينية مرتبطة ببعضها بروابط جلايكوزيدية، وهو أول ادوية هذه المجموعة المستعملة سريرياً تنتجها بكتيريا *Streptomyces griseus* فعال فقط ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام مثل *E. coli, Shigella & Pseudomonas*، يؤثر في الخلية البكتيرية عن طريق وقف تصنيع البروتين من خلال ارتباطه بالرايبوسوم تحت الوحدة 30S مثبط بذلك تخليق السلاسل الببتيدية وبالنتيجة تخليق وتصنيع البروتين (شاهين وشاهين، 2008).

تم عزل مركب الستربتومايسين الجلايكوزيدي في عام 1943م من إحدى العصويات الهوائية السالبة لصبغة جرام التي تدعى بالستربتومايسيز جريساس *Streptomyces griseus* وهو أول الامينوجلايكوزيدات المكتشفة وبعد ذلك الاكتشافات العلمية وتم التعرف على الجنتاميسين التي تنتجها المايكرومونسبوا *Micromonospora* عام 1963م وبذا أصبح الجنتاميسين خاصة والامينوجلايكوزيدات بصفة عامة حجر الزاوية في علاج الالتهابات التي تسببها بكتريا العصويات الهوائية سالبة الجرام (شاهين و شاهين، 2008).

1. 6. الخصائص الفيزيائية والكيميائية

ينتهي أسم الامينو جلايكوزيدات المشتقة من الستريبتو مايسينات *Streptomyces* بمقطع ما يسين *mycin* . سميت الأمينوجلايكوزيدات بهذا الاسم نسبة إلى تركيبها الكيميائي المتضمن عدداً من السكريات الأمينية المرتبطة بنواة الهكسوز المركزية بواسطة روابط جلايكوزيدية، قد يحتوي التركيب الكيميائي لبعض الأمينو جلايكوزيدات مثل الستريبتو مايسين على سكر خماسي متعادل (شاهين وشاهين، 2008).

آلية التأثير

جميع الأمينو جلايكوزيدات لها تأثير مردي على البكتريا الحساسة Bactericidal ولا تعرف الآلية الأكيدة لهذا الفعل القاتل ذلك إن باقي المضادات الحيوية الأخرى المثبطة الإنتاج البروتينات هي صاده Bacteriostatic وقد تم التعرف على أكثر من آلية تعمل من خلالها الامينوجلايكوزيدات بحيث تتأزر جميع هذه الآليات مع بعضها البعض للحصول على التأثير المردي للأمينو جلايكوزيدات ومن أهم هذه الآليات ما يلي :

1. 6. 1. تثبيط الريبوسومات:

تعمل الامينو جلايكوزيدات بعد انتقالها بواسطة آلية النقل الفاعل إلى داخل الخلية البكتيرية على تثبيط عمل الريبوسومات ومن ثم وقف تصنيع البروتينات فيها المكون من كل الريبوسوم 30 s الآر إن إي أرسولي (mRNA) وبالتالي يؤدي إلى تثبيط تخليق السلاسل البيبتيدية وبالنتيجة تثبيط تخليق البروتينات

1. 6. 2. زيادة نفاذيه الغشاء الخلوي البكتيري:

البكتيرية سالبة الجرام التي تحتوي على هذا النظام الناقل وليست لها فعالية ضد البكتيرية اللاهوائية ذلك لأنها تفتقر إلى هذا النظام الناقل للأمينو جلايكوزيدات كما أن هناك آلية أخرى يمكن أن تنتقل بواسطتها الأمينو جلايكوزيدات إلى داخل الخلية البكتيرية من خلال ارتباط جزيئات إيجابية الشحنة بالجزيئات سالبة الشحنة الموجودة على سطح الغشاء الخلوي البكتيري ينتج عنه ما يشبه بالتصدع في هذا الغشاء لذلك يزيد الانتقال من خارج الخلية البكتيرية إلى داخلها بسبب زيادة نفاذية الغشاء الخلوي البكتيري، ويعتقد أن التأثير مسئول ولو جزئياً عن الأثر المردي للأمينو جلايكوزيدات على الخلية البكتيرية. (شاهين و شاهين، 2008).

وبشكل عام أثبتت الدراسات أن اختراق الأمينو جلايكوزيدات للغشاء الخارجي للخلية البكتيرية يعتمد على عاملين أساسيين هما:

1-pH الوسط البكتيري حيث أن انخفاض pH هذا الوسط يؤدي إلى عرقلة نفاذية الأمينو جلايكوزيد إلى داخل البكتيريا مما يؤثر على الشحنة الموجبة التي تحملها جزيئات الأمينو جلايكوزيد ويجعلها متعادلة.

2- مستوى الأكسجين في الوسط الذي تنمو فيه البكتيريا حيث أن انخفاض مستوى

الأكسجين في هذا الوسط يؤدي أيضاً إلى عرقلة أثر الأمينو جلايكوزيد.

(شاهين و شاهين، 2008).

1.7. طيف الفاعلية Antibacterial spectrum :

يشمل طيف الفاعلية للأمينو جلايكوزيدات بدرجة خاصة البكتيريا سالبة الجرام الهوائية مثل الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* والأمعائيات Bacteroids وبدرجة أقل العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* وتعتبر

المتفطرة السلية *Mycobacterium tuberculosis* حساسة بدرجة كبيرة للستربتومايسين والكناماييسين والأميكاسين والجنتاميسين.

1. 8. مقاومة البكتريا Bacterial resistance :

مثل باقي المضادات الحيوية كانت نسبة مقاومة البكتيريا (الجرثيم) للأمينوجلايكوزيدات عند بداية استخدامها قليلة جدا ولكن وبسبب الاستخدام الطويل (المديد) وأحيانا العشوائي واللامسؤول لهذه المضادات الحيوية بدأت العديد من الجرثيم تظهر مقاومة للأمينوجلايكوزيدات فعلى سبيل المثال أصبح الستربتومايسين غير فعال في العديد من حالات الالتهاب الجرثومية (شاهين و شاهين، 2008) قد تنتج مقاومة البكتريا الأمينوجلايكوزيد بالعديد من آليات نذكر منها ما يلي :

1-تدنى دخول الدواء الفاعل إلى داخل الخلية وتراكمه فيها بسبب نقصان نفاذية الغشاء البكتيري واختفاء القنوات البورينية porins أو اختفاء الانتقال الفاعل المعتمد على الأكسجين .

2- تحور مواقع ارتباط الجلايكوزيدات على الريبوسومات من نوع 30إس مما ينتج عنه تدنى ألفتها (التقارب) Affinity للارتباط بالدواء وتعتبر هذه الآلية من أهم العوامل التي تساهم في مقاومة البكتريا للأمينوجلايكوزيدات.

3- إفراز خمائر بواسطة الإنزيمات المرتبطة بالبلازميدات Plasmid associated enzymes تعمل على إبطال فاعلية الأمينوجلايكوزيدات من خلال إضافة أحد جزيئات الأستيل Acetyl أو الأدينيل Adenyl أو الفوسفوريل Phosphoryl بواسطة الإنزيمات الناقلة transferases للأمينوجلايكوزيدات بالتالي تصبح غير قادرة على الوصول إلى الريبوسوم والارتباط به وتتميز هذه الخمائر بأن كل منها قادر على تثبيط بعض الأمينوجلايكوزيدات وبالتالي فإن البكتيريا الحاملة لهذه

الخمائر تكون مقاومة لفعل بعض الأمينوجلايكوزيدات دون غيرها (شاهين و شاهين، 2008).

1. 9. الفرضية

يقاوم العديد من الميكروبات العديد من المضادات الحيوية وهنا نعتقد بأن ذلك ربما يرجع لكون هذه الميكروبات منتجة لنفس المضادات الحيوية ولذلك لا تؤثر عليها وبناءً على هذه الفرضية سنقوم باختبار المضادان الحيويان النستاتين والستربتومايسين محاولين بذلك عزل بكتيريا منتجة لهذين المركبين على أن يجرى اختبارنا على ميكروبات من التربة وليس على أنواع قد تكون ممرضة.

2. 1 اوساط النمو

استخدم الوسط الغذائي مستخلص الخميرة والجليسرول ومستخلص الخميرة 0.2 جم، الجليسرول 0.5 مل، فوسفات ثنائي البوتاسيوم 0.1 جم ، اجار 1.5 جم ماء مقطر 1000 مل (Balagurunathan, 1992)، حيث أذيبت المكونات في الماء المقطر قبل تعقيمها في جهاز الاوتوكلاف على درجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة، بُرد الوسط بعد التعقيم إلى ما يقارب درجة حرارة 50-55°م وقُسم إلى ثلاث مجموعات ثم أُضيف إلى كل مجموعة على حدة المضادات الحيوية المراد اختبارها والتي عُقدت باستخدام منقيات الترشيح ذات القطر 0.2 ميكرومتر، حيث أُضيف إلى المجموعة الاولى والتي أعطيت الرقم (1) المضاد النستاتين + الستربتومايسين

أما المجموعة الثانية (2) فأضيف إليها النسبتين فقط، وأضيف الستربتومايسين فقط للمجموعة الأخيرة (3). وُزعت هذه الاوساط على أطباق بتري معقمة ثم تركت على اليوم التالي. التركيزات النهائية للمضاد الحيوي النسبتين 300 وحدة دولية (International unit) أما الستربتومايسين فعند 100 ميكروجرام لكل واحد مل من الوسط الغذائي.

2.2 جمع وتحضير العينات

تتواجد في التربة اعداد كثيرة من الأكتينوميستات و يتم عزلها منها بعد اجراء سلسلة من التخفيفات العشرية و ذلك كما وصف من قبل (Gerrettson-Cornell & Kelly, 1981)، جمعت العينة (التربة) الاولى من حديقة كلية العلوم جامعة سبها وذلك بعمق يتراوح 10 سم تقريبا، حيث وُضعت التربة في طبق بتري معقم (فارغ) ثم نُقلت العينة للمعمل، أخذت وزنة مقدارها 1 جم ثم نُقلت إلى دورق مخروطي يحوي 99 مل ماء مقطر معقم ثم رج الخليط بشدة 25 مرة (يدويا) أُجريت بعدها التخفيفات العشرية من 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} حيث نُقل بواسطة ماصة بلاستيكية معقمة 1 مل من الدورق المخروطي إلى أنبوبة الإختبار الاولى المحتوية على 9 مل ماء مقطر معقم، ثم رجت هذه الانبوبة بشدة ثم نُقل منها 1 مل بواسطة ماصة معقمة (جديدة) إلى الانبوبة الثانية والمحتوية أيضا على 9 مل ماء مقطر معقم وكررت خطوات النقل والرج حتى الوصول إلى الانبوبة الخامسة. وُزعت حوالي 200 ميكرو لتر من التخفيفات 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} على أطباق بتري (مسجل عليها نفس البيانات) تحوي وسط مستخلص الخميرة والجليسرول بالإضافة للمضادات الحيوية المختبرة حيث تم نشر النقلة بواسطة ماسح قطني وتركت لمدة ليلة واحدة في دولاب العزل.

أما العينة الثانية (التربة) من منطقة زلاف (الواقعة شمال غرب مدينة سبها وجنوب وادي الشاطئ) من تحت النبات (الرسو) بعمق يتراوح 10-15 سم تقريبا حيث وُضعت في عبوة بلاستيكية معقمة ثم نُقلت العينة للمعمل وحفظت عند 4°م إلى حين إجراء التجربة ، أخذت وزنة من التربة (1 جرام) ووزعت مباشرة على أطباق بتري المحتوية على الوسط الغذائي (مستخلص خميرة وجليسيرول) والمضادين الحيويين النستاتين والستربتومايسين وذلك حسب ما هو مذكور سابقا.

حضنت الأطباق على درجة حرارة الغرفة (25°م) لمدة سبعة إلى عشرة ايام حيث يتم فحصها يوميا وذلك لملاحظة تكوّن نمو، سيعاد زراعة اية مستعمرة نامية وذلك بزراعتها على طبق بتري جديد يحوي نفس الوسط الغذائي والمضاد الحيوي النامية عليه ثم يجرى لها اختبار تفاعل صبغة جرام.

تربة حديقة كلية العلوم

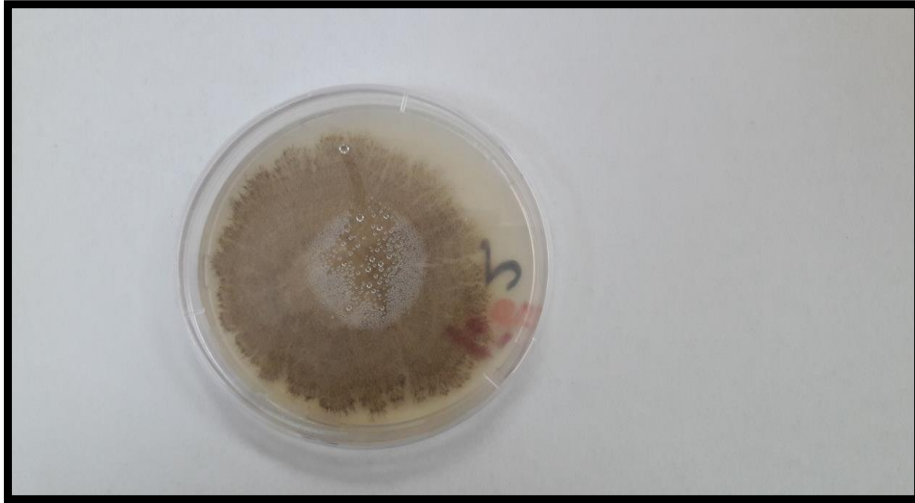
أظهرت النتائج تكوّن نمو في التخفيف 10⁻⁶ المحتوي على المضاد الحيوي الستربتومايسين لعينة التربة من حديقة كلية العلوم ولم يحدث نمو في التخفيفات 10⁻⁴ و 10⁻⁵ ربما هذا يرجع إلى عدم الرج (الخط) الجيد للتخفيفات المستخدمة قبل عملية النشر على الاطباق، المستعمرة المتكوّنة (شكل 1) خيطية الشكل موجبة لصبغة جرام، أعيد زراعة هذه المستعمرة (شكل 2) على نفس الوسط الغذائي المحتوي على نفس المضاد الحيوي وتأكد نموها بعد 48 ساعة من التحضين على 37°م مما يؤكد مقاومتها لهذا المضاد الحيوي الامر الذي يحتاج لمزيد من الدراسة

تربة منطقة زلاف

أظهرت النتائج نمو لمستعمرة على الطبق الذي يحوي الوسط الغذائي والمضادان الحيويان النستاتين والستربتومايسين (شكل 3) الفحص الظاهري لهذه

العينة جعلنا نعتقد في بداية الامر على أنها فطر غير أنّ نتائج الفحص المجهرى بيّن على أنها بكتيريا عصوية الشكل موجبة لتفاعل صبغة جرام ، نشير هنا إلى أنّ صغر حجم هذه البكتيريا لم يمكننا من التقاط صورة واضحة لها (للشريحة المصبوغة بطريقة جرام) أعيد زراعة هذه البكتيريا على ثلاث أطباق بتري تحوي المضادات الحيوية سابقا حيث نمت بعد 48 ساعة نحضينها على درجة حرارة 37 °م غير أنها نمت بدرجة أسرع (24 ساعة من التحضين) على الطبق الحاوي على المضاد الحيوي الستربتومايسين فقط (شكل 4).

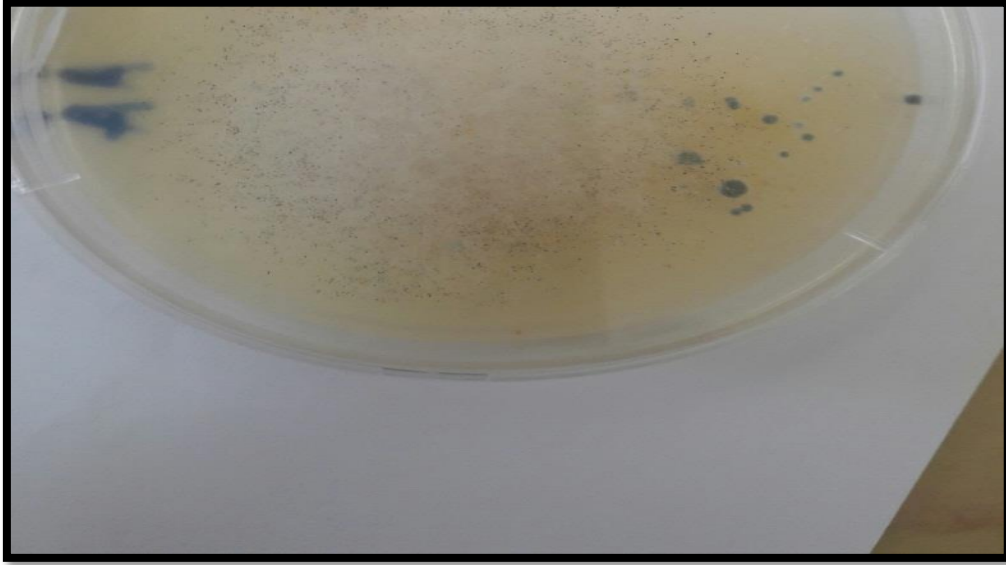
تمّ عزل بكتيريا تتبع الاكتينوميستات من تربة منطقة زلاف والتي نمت فقط على الوسط المحتوي على المضاد الحيوي الستربتومايسين، بينّ الفحص المجهرى بأنها موجبة لصبغة جرام كما أمكن رؤية الجراثيم (الأبواغ) حول الخيوط البكتيرية المستعمرات دائرية الشكل ولها مظهر شبيه بالطباشير وعليه فرمما تعود إلى *Streptomyces* غير أنها ليست شديدة الالتصاق بالوسط النامية عليه وفقا الى ما ذكره الكسندر (1982).



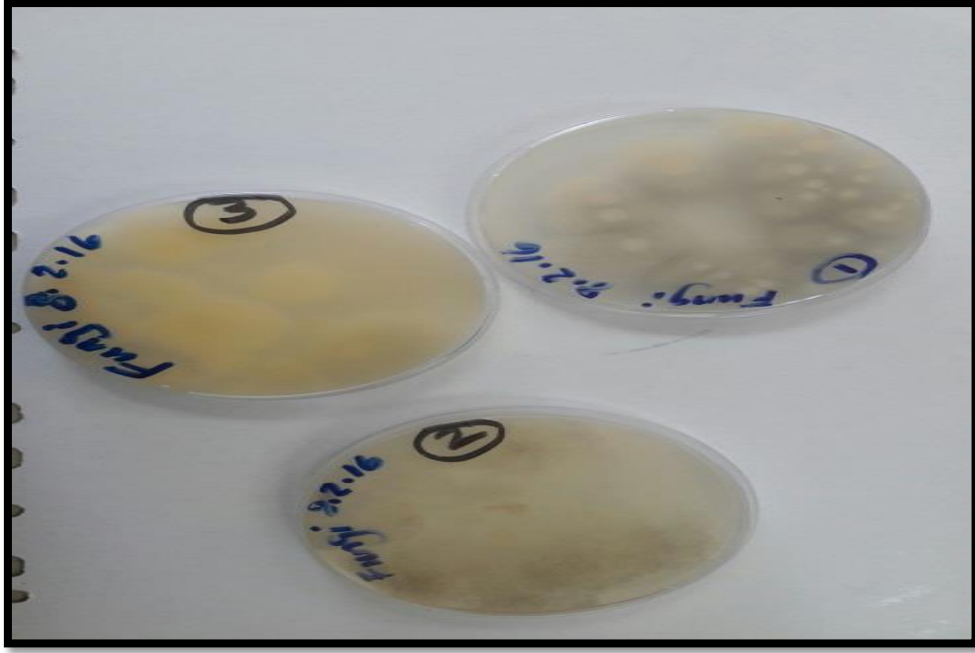
شكل (1) للمستعمرة المعزولة من حديقة كلية العلوم على الوسط الغذائي مستخلص الخميرة والمضاد الحيوي الستربتومايسين.



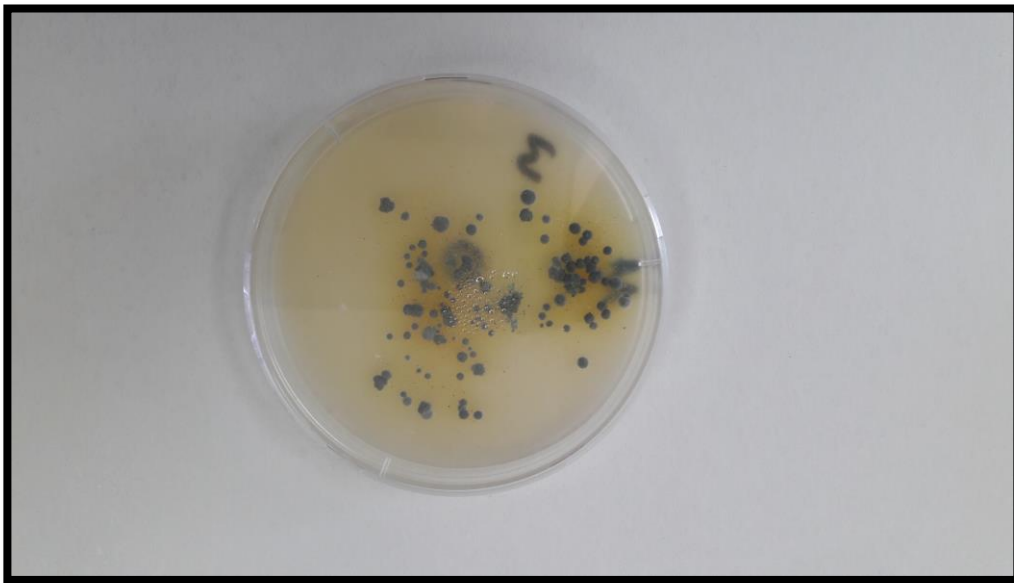
شكل (2) إعادة زرع البكتيريا المعزولة من حديقة كلية العلوم على الوسط الغذائي مستخلص الخميرة والمضاد الحيوي الستربتومايسين



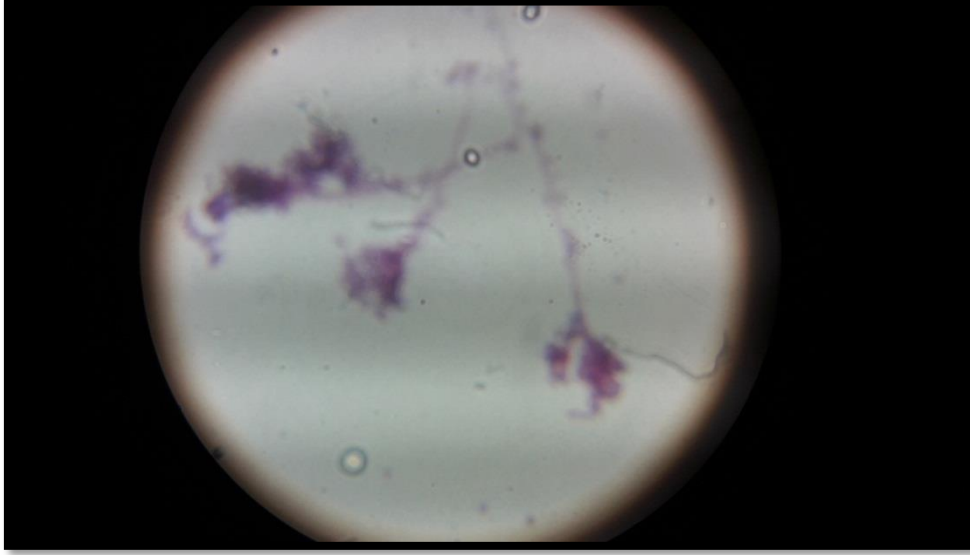
شكل (3) البكتيريا المعزولة من تربة منطقة زلاف.



شكل (4) إعادة زرع وتنقية البكتيريا المعزولة من منطقة زلاف.



شكل (5) نمو الاكتينومييسيتات المعزولة من رملة منطقة زلاف الوسط الغذائي مستخلص الخميرة والجليسرول مع المضاد الحيوي النستاتين.



شكل (6) يوضح تفاعل صبغة جرام للأكتينومييسيتات المعزولة.

الخلاصة

ان معظم الكائنات الحيه تحمى نفسها من افرازات الميكروبات الأخرى بعملية من المضادات الحيوية والتي تلعب دور كبير وواسع في العمليات الايضية بشكل عام، استعملت المضادات الحيوية في علاج العديد من الامراض للإنسان والحيوان والنبات وتنتج هذه المضادات من فعل الاحياء الدقيقة المجهرية المتواجدة طبيعياً في التربة والماء، كما توجد كائنات اخرى تقاوم هذه المضادات بوسائل مختلفة كتخليق مركبات لا تؤثر عليها المواد السامة، كما أن آلية تأثير هذه المضادات تختلف

باختلاف بنيتها الكيميائية ومنطقة تأثيرها في الكائن فبعضها تؤثر على الجدار وبعضها الآخر يعمل على تثبيط صناعة أو تخليق البروتين وهذا إلى حد ما يتوافق مع فرضيتنا، حيث أظهرت النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة الحالية أنّ بعض الميكروبات مقاومة للمضادين الحيويين الستربتومايسين والنستاتين وربما هي تنتج هذين المضادين الحيويين وبالتالي فهي لا تتأثر بوجودهما في الوسط الغذائي غير أنّ الجزم أو الفصل في ذلك يحتاج إلى دراسة اعمق ليكملها طلبة آخرون.

المراجع References

أولاً. المراجع العربية

-الخفاجي، زهرة محمود (2008). الاحياء المجهرية، جامعة بغداد- وزارة التعليم العالي والبحث العلمي العراق.

- الكسندر، مارتن الكسندر (1982). مقدمة في ميكربولوجيا التربة، دار جون وايلي و أولاده نيويورك /أمريكا. ط2.

- شاهين، عمر و رند عمر شاهين (2008). المضادات الحيوية، دار الفكر العربي- عمان / الأردن.

- مبارك، محمد الصاوي محمد و عبد الوهاب محمد عبد الحافظ و راوية فتحي جمال (2005). عالم البكتيريا، مكتبة أوزوريس- القاهرة/مصر.

-مصطفى، كمال أبو الذهب (1965). البكتريا، دار المعارف- الطبعة الاولى- القاهرة / مصر.

ثانياً. المراجع الاجنبية

-**Arnold, R.M. (1982).**Antibiotics. In ; R. F. Doerge (ed.).Wilson and Gisvolds ,Text book of organic medical pharmaceutical. j. B Lippincott Co. , U.S.A .P.225-289.

-**Balagurunathan, R. (1992).** Antagonistic actinomycetes from Indian shallow sea sediments with reference to α , β -unsaturated γ - lactone type of antibiotic from *Streptomyces*

griseobrunneus. Ph. D. Thesis, Annamalai University, India, pp 88.

–**Egorov, N.S. (1985)** Antibiotics a scientific approach . Mir publishers, Moscow.

–**Gerrettson–Cornell, L. and Kelly, J.(1981)**. Notes on the actinomycetes of a forest soil in new south wales 1. isolation and preliminary characterization. *Forestry Commission of N.S.W. Sydney Australia*.

– **its applications Akaike N, Harata N. (1994)** Nystatin perforated patch recording and

PMID753436 ;73–433:(5) 44, to analyses of intracellular mechanisms. *Jpn ,J physiol* .

–**Talaro, K. and Talaro, A.(1996)** .Fundations in Microbiology, basic principles, Times mirror higher education group, WM.C.Brown publishers.chicago.

– **Waksman. S.A. (1967)** .the actinomycetes :a summary of current knowledge .the Ronald press Co . New york