وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة سبها
Sebha University

قسم علم الحيوان – شعبة التقنيات الحيوية

بحث مقدم لاستكمال متطلبات الحصول على درجة البكالوريوس

بعنوان :

دراسة الفاعلية البيولوجية لقواعد شيف الازوية مع بعض المضادات الحيوية على بكتيريا سالبة غرام *Brucella melitensis*

اعداد الطالبة :

هبه عبد القادر الشريف يوسف

تحت اشراف :

د . احمد علي الجنقة

للعام الدراسي

2017- 2018 م

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ قُلْ إِنَّ صَلاتِي وَنُسُكِي وَمَحْيَايَ
وَمَمَاتِي لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ * لا شَرِيكَ لَهُ
وَبِذَلِكَ أُمِرْتُ وَأَنَا أَوَّلُ الْمُسْلِمِينَ ﴾

صدق الله العظيم

سورة الأنعام: 162، 163

قالَ النَبيُّ صَلَّىٰ اللهُ عَلَيهِ وَسَلَم:

((مَا مِنْ خَارِجٍ خَرَجَ مِنْ بَيْتِهِ فِي طَلَبِ الْعِلْمِ إِلاَّ وَضَعَتْ

لَهُ المَلاَئِكَةُ أَجْنِحَتَهَا رِضاً بِمَا يَصْنَعُ حَتَّى يَرْجِعَ))

حديث صحيح عن صفوان بن عسال

صحيح الجامع ٥٧٠٢

كلمة الشكر والتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين وعلى آله وأصحابه أجمعين ،وبعد.

بعد توفيق المولى عز وجل وتيسيره لي في الانتهاء من كتابة هذا البحث العلمي ، يطيب لي في هذا المقام أن أتقدم بخالص امتناني وجزيل شكري وعرفاني وأثمن تقديري لكل من قدموا لي مساعدة أو مساهمة في إتمام هذه الرسالة :

الدكتور : أحمد علي الجنقة

إلى المشرف الفاضل الذي اعطى الكثير و مازال يعطي من وقته و فكره و جهده دون انتظار المقابل ، كان كالأب في صبره و احتماله ، جزاك الله عنا كل خير و متعك بالصحة و السلامة.

الأستاذة الفاضلة : سالمة ابو القاسم

الأستاذ الفاضل : مراد عبد الرحمن بركة

لكم مني اسمى آيات الشكر و التقدير لما بذلتموه معي من جهد في هذا البحث العلمي فكنتم سراج أضاء طريقي و اتمنى من الله أن يحفظكم بعينه التي لا تنام

و خالص شكري و تقديري لكل من علمني حرفا ومد لي يد العون في مشواري العلمي وإلى كل من ساعدني ولو بكلمة طيبة

الإهداء

إلهي لا يطيب الليل إلا بشكرك، ولا يطيب النهار إلا بطاعتك، ولا تطيب اللحظات إلا بذكرك، ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك، ولا تطيب الجنة إلا برؤيتك الله جل جلالك .

إلى من بلغ الرسالة وأدّى الأمانة، ونصح الأمة، إلى نبي الرحمة ونور العالمين ، إلى الأمي الذي علم المتعلمين

سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم.

إلى من كلله الله بالهيبة والوقار، إلى من علمني العطاء بدون انتظار، إلى من أحمل اسمه بكل افتخار، أرجو من الله أن يمد في عمرك لترى ثماراً قد حان قطافها بعد طول انتظار وستبقى كلماتك نجوم أهتدي بها اليوم وفي الغد وإلى الأبد

"والدي العزيز"

إلى من ابتسامتها كإشراقت شمس الصباح ، إلى من وجودها يعطي بهجة و نكهة الحياة تأكدي لو أني كتبت لك كل عبارات الشكر فلا توجد كلمة توفي حقك علينا ولو جمعت كل القبلات فينبغي أن توضع في مكان واحد فقط هو رأسك الجليل .

"أمي الحبيبة"

إلى الذين تطلعوا لنجاحي بنظرات الأمل رفقاء دربي وتوأم روحي الذين تحلو بالإخاء وتميزوا بالوفاء والعطاء هم ينابيع الصدق الصافي فمعهم سعدت وبرفقتهم في دروب الحياة الحلوة والحزينة سرت فكانوا معي على طريق النجاح والخير.

أختي و إخوتي

إلى صديقاتي الوفيات اللائي بدونهن لا تعني الحياة شيء معهن أكون أنا وبدونهن أكون مثل أي شيء .. في نهاية مشواري أريد أن أشكرهن على مواقفهن النبيلة

*وما من كاتب إلا سيفنى *** ويبقى الدّهرَ ما كتبت يداه*

*فلا تكتب بخطك غير شيء *** يسرك في القيامة أن تراه*

ابن قتيبة الدينوري

الفهرس

الترقيم	اسم الموضوع	رقم الصفحة
	الواجهة	ا
	الآية الكريمة	ب
	الحديث الشريف	ج
	كلمة الشكر	د
	الاهداء	هـ
	فهرس المواضيع	ز
	فهرس الاشكال	ط
	فهرس الجداول	ي
	فهرس الصور	ي
	الفصل الاول	
1	المقدمة	1
2.1	نبذه حول قواعد شيف	1
1.2.1	قواعد شيف	1
2.2.1	قواعد شيف الأزوية	3
3.2.1	الفعالية البيولوجية لقواعد شيف	3
3.1	البكتيريا المستهدفة من الدراسة	4
4.1	المضادات الحيوية	5
1.4.1	تصنيف المضادات الحيوية	5

5.1	مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية	7
6.1	الهدف من الدراسة	8
7.1	الدراسات السابقة	8
	الفصل الثاني	
1.2	الادوات و الاجهزة	12
2.2	المواد	12
3.2	طرق العمل	14
1.3.2	تنمية عينات البكتيريا	14
2.3.2	خطوات عمل اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	15
3.3.2	خطوات عمل اختبار المركبات الكيميائية	15
4.3.2	خطوات عمل اختبار التأثير التآزري و التضادي للمركبات الكيميائية مع المضادات الحيوية	16
	الفصل الثالث	
3.1	النتائج و المناقشة	17
	الفصل الرابع	
1.4	الخلاصة	28
2.4	التوصيات	30
	المصادر و المراجع	31

فهرس الاشكال

الترقيم	اسم الشكل	رقم الصفحة
1	شكل العام لقواعد شيف	2
2	تحضير قواعد شيف	2
3	تحضير قواعد شيف الازوية	3
4	يوضح قاعدة شف الازوية *1-((aryl benzylideneamino)(aryl phenyl) methyl)-6-bromo-3-(4- nitrophenyl) diazenyl)naphthalene-2-ol*	9
5	يوضح قاعدة شف *4,4-(1,4- phenylenebis(diazene-2,1-diyl))bis(3-methyl-1H-pyrazole-5-(4H)-one*	9
6	يوضح قاعدة شف *1.4-bis((3.5-dimethyl- 1-phenyl-pyazole-4-yl)benzene*	10
7	يوضح قاعدة شف - *2-hydroxyaphthalene 1-carbadehydene 1- naphtylamin*	10
8	يوضح قاعدة شف *2-Hydroxy-5- bromoacetophenone-N,N'-ethylenediimine*	11

فهرس الجداول

الترقيم	الجدول	الصفحة
1	يوضح الادوات و الاجهزة المستخدمة	12
2	يتضمن المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة	13
3	يتضمن المركبات الكيميائية المستخدمة في الدراسة	14
4	متوسط استجابة بكتيريا *B.melitensis* للمضادات الحيوية المستخدمة و تفاعلها مع قواعد شيف	26
5	يوضح متوسط اختبار تركيز قواعد شيف الازوية للبكتيريا	27

فهرس الصور

الترقيم	اسم الصورة	الصفحة
1	توضح اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	17
2	توضح اختبار تآزر DMSO مع المضادات الحيوية	18
3	توضح اختبار تآزر L1 مع المضادات الحيوية	19
4	توضح اختبار تآزر FeL1 مع مضادات الحيوية	20
5	توضح اختبار تآزر NiL1 مع المضادات الحيوية	21
6	توضح اختبار تآزر CoL1 مع مضادات الحيوية	22
7	توضح اختبار تآزر CuL1 مع مضادات الحيوية	23
8	توضح اختبار الحساسية لقواعد شيف (L1, FeL1, NiL1)	24
9	اختبار الحساسية لقواعد شيف (CoL1, CuL1)	24

1. المقدمة INTRODUCTION :

عندما تصبح البكتيريا مقاومة للأدوية المضادة لها تتقلص الخيارات المتاحة لمعالجة ما تسببه من امراض حيث اصبح هذه الظاهرة منتشرة في جميع انحاء العالم و تشمل طائفة عريضة من مسببات الامراض و يتزايد معدل انتشارها على نحو يهدد صحة الانسان و الحيوان **(منظمة الصحة العالمية ، 2014)** .

حيث يرجع سبب المقاومة الي الاستخدام الغير صحيح و المفرط و كذلك الى قدرة البكتيريا على اكتساب صفة المقاومة عن طريق طفرة في المادة الوراثية او عن طريق الاقتران و تبادل المادة الوراثية **(الجراح ، 2007)** .

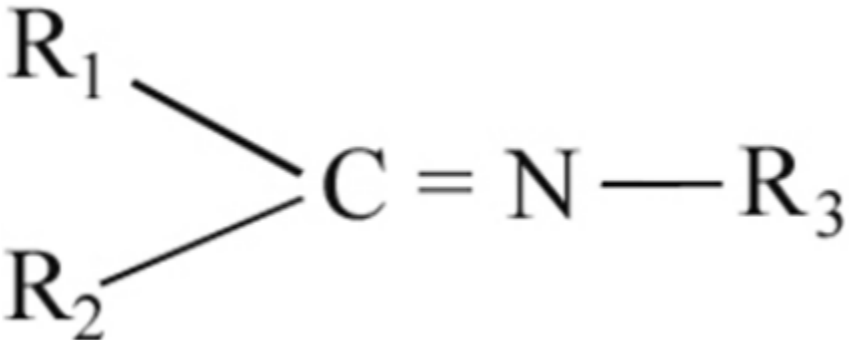
و من هنا اتجه العلماء للبحث عن طريقة لتخفيف من حدة هذه الظاهرة او التقليل منها و كبح جماح التطور البكتيري بما يعرف التأثير التآزري (Synergistic effect) اما بالتآزر بين المضادات او بين المضادات و المستخلصات سواء اكانت طبيعية مثل مستخلصات النباتات او مركبات كيميائية .

من اهم هذه المركبات الكيميائية قواعد شيف ، التي سوف نتناولها في هذا البحث العلمي من حيث فاعليتها و تأثيرها البيولوجي على البكتيريا ، و كذلك فاعليتها التأزرية مع المضادات الحيوية .

2.1 نبذة حول قواعد شيف :

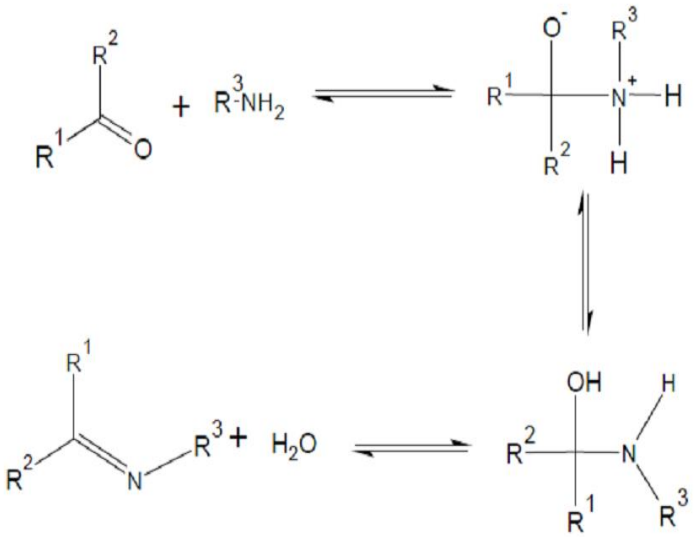
1.2.1 قواعد شيف :

سميت قواعد شيف نسبة الى مكتشفها هوقو شيف عام 1864 م ، وهي عبارة عن مركبات عضوية تحتوي على المجموعة الوظيفية ازو ميتين (N=C) حيث ترتبط ذرة النيتروجين مع ذرة الكربون برابطة ثنائية **(Dewick , 2002)** مجموعة أريل او ألكيل و تكون الصيغة العامة R^1R^2-C=NR^3 ، و في حال اشتقاق قاعدة شيف من الأنين تكون R^3 عبارة عن مجموعة فينيل **(Ali *et al.*,2013)** كما موضح في الشكل (1) .



شكل (1) يوضح التركيب العام لقواعد شيف (**Ali *et al.*,2013**)

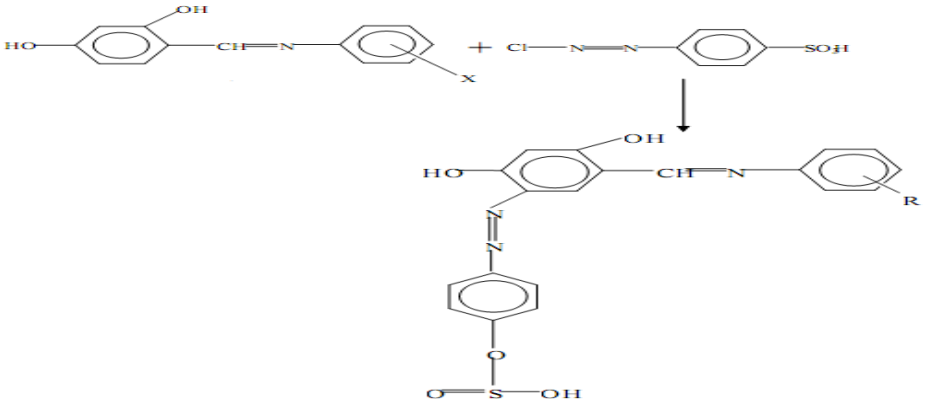
يتم تحضيرها بتكاثف الألديهايدات أو الكيتونات الأليفاتية أو الأرماتية مع أمينات أولية (ألفاتية أو أرماتية) **(Begley, 2009)** ومن هنا جاءت تسميتها وأعطيت لهذه القواعد عدة تسميات منها (Anil) وتدعى (Ketimines) عندما تشتق من الكيتون و تدعي (Aldimine)عندما تشتق من الألديهايد من خلال التكثيف بين مجموعة الكاربونيل و الأمينات الأولية ، إذ أنّ الأمين أحادي الألكيل ($R-NH_2$) أو الأمين أحادي الأريل ($Ar-NH_2$) يضاف إلى كربون مجموعة الكاربونيل التابعة للألديهايد أو الكيتون ويتكون مركب وسطي Carbinolamine، يتبعها فقدان جزيئه ماء ليتكون N-substituted imine والتي تمثل قاعدة شيف كناتج نهائي **(Boyer *et al.*, 1990)** كما هو موضح في الشكل (2) **.**



شكل (2) تحضير قواعد شف (**Ali *et al.*,2013**).

2.2.1 قواعد شف الأزوية :

ترتبط قواعد شف الازوية بمجاميع عديدة مختلفة سواء كانت اليفاتية او اروماتية و فيما تعد قواعد شف الازوية الاليفاتية قليلة الانتشار بسبب تفككها السريع الي نيتروجين و الهيدروكربون و لكن قواعد شف الأزوية الأروماتية لها انتشار واسعا بسبب استقراريتها العالية و يعود سبب استقرارية مركبات قواعد شف الأزوية الأروماتية لاحتوائها علي مجموعة الأزو (-N=N-) ذات الروابط المزدوجة القوية (**Ghanim and Majeed, 2009**) كما هو موضح في الشكل (3) .



شكل (3) يوضح تحضير قواعد شف الازوية (**النعيمي،2009**).

3.2.1 الفاعلية البيولوجية لقواعد شيف:

تعد قواعد شيف من المركبات الوسيطة المهمة في تحضير بعض المركبات ذات الفعالية البيولوجية، فضلا عن اهميتها في المجال الحيوي حيث استعملت كمضادات للبكتيريا و الفطريات و غيرها ، و تعزى الفاعلية البيولوجية لهذه المركبات الي تكوين معقدات مستقرة مع الايونات الفلزية الموجودة في الخلية و ان وجود مجموعة الازوميتين C = N في هذه الجزيئات يكون عاملا فعالا و ملائما لتكوين معقدات مستقرة مع الايونات الفلزية **Ali** (***et al.*,2013**).

ترجع أهمية قواعد شيف في كونها قدرتها على اقتناص ايونات المعادن، وتلعب قواعد شيف دورا هاما في الكيمياء التحليلية، والصناعية حيث إنها تستخدم في مقاومة تأكل المعادن، و أيضا لعبت قواعد شف دورا هاما في مجال الكيمياء التناسيقية، قواعد شيف المشتقة من ادوية السلفا تحوز على اهتمام واسع لاستخداماتها المفيدة في المجالات الحيوية وتنبع أهمية مركباتها

في كونها تستخدم في التطبيقات عديدة تتشكل منها مادة أخرى خام، في مختلف المجالات المعرفة و التكنولوجيا مثل السيراميك والحفز والزجاج **(الثبيتي ، 2008).**

نالت قواعد شيف اهتماما كبير كمواد دوائية نتيجة للفعالية البيولوجية التي ظهرت في البعض منها كمانع لنمو البكتيريا و بعضها له فعالية تجاه تقلصات الاوعية القلبية و البعض الأخر له فعالية مضادة للسل و كذلك فان العديد من قواعد شف لها فعالية ضد الفطريات **(البياتي و اخرون، 2005).**

كما اشارت بعض الدراسات بان قواعد شف تتميز بأهميتها البيولوجية المختلفة في المجال الطبي فهي تستخدم كمضادات الي الاكسدة و الالتهابات ، و احتواء بعض الادوية التي تستخدم كمضادات حيوية و كباسط للعضلات علي مجموعة قاعدة شف في التركيب الاساسي لها **(محمد، 2015).**

كما تعتبر قواعد شيف مواد اولية في صناعة الحبر الملون و حبر الطباعة ، اما في مجال الكيمياء التحليلة فقد استعملت في التحليل الكمي و النوعي لكونها تكون معقدات ملونة مع العناصر الانتقالية في اغلب الاحيان ، كما استعملت قواعد شيف كمبيدات للحشرات بسبب احتوائها على مجاميع فعالة مثل الأزو و الكلور **(الحريب .2009).**

3.1 البكتيريا المستهدفة في الدراسة :

التصنيف العلمي :

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class: Alpha Proteobacteria

Order: Rhizobiales

Family: Brucellaceae

Genus: Brucella

Species : melitensis

Brucella melitensis

(Jeffrey ., 2002)

التعريف ببكتيريا البروسيلا *(B.melitensis) :*

هي بكتيريا عصوية الشكل سالبة غرام ، بكتيريا الهوائية ولكن قد تتطلب جو يحتوي على حوالي 5- 10 ٪ من ثاني أكسيد الكربون،سميت بهذا الاسم نسبة لمكتشفها ديفيد بروس (1855-1931) ، هي بكتيريا صغيرة أبعادها (0,7 – 1,5). ميكرون، ذات سياط. **(المفتي ، 1985 ، مبارك . 2008) .**

هناك ستة أنواع من هذه الجرثومة ، ثلاثة أنواع منها فقط هي المسؤولة عن انتقال المرض للإنسان وهى جرثومة بروسيلا الغنم *Brucella melitensis* ،جرثومة بروسيلا البقر *Brucella abortus bovis*_، جرثومة بروسيلا الخنازير. *Brucella abortus suis* **(جميل و السنوسي . 1993، مبارك . 2008) .**

و تعرف البروسيلا بقدرتها الكبيرة على تحمل التغيرات الوسط الخارجي، إذ تستطيع العيش في الماء والتربة حتى ثلاثة أشهر، وفي الحليب 10 أيام وأكثر ،وفي الجبن 45 يوماً تقريباً وفي الصوف ما يقرب من الثلاثة أشهر،ولا تتحمل البروسيلا درجات الحرارة العالية وتموت بالغليان فوراً،أما في درجة حرارة 60˚ م فتموت بعد 30 دقيقة ،كما وتتأثر البروسيلا بالمحاليل المطهرة أيضاً.

داء البروسيلا من الأمراض المشتركة و المتناقلة بين الانسان و الحيوان و لكنها حيوانية المصدر غير شائع بين البشر حيث تنتقل للإنسان عن طريق شرب حليب البقر او الماعز الغير معقم و تسبب له الحمى المتموجة او ما يعرف بالحمى المالطية، اما في الحيوانات فتسبب الاجهاض المعدي للأبقار و الاغنام و التهاب البربخ في ذكور الغنم (**جميل و السنوسي . 1993، مبارك . 2008) .**

4.1 المضادات الحيوية ANTIBIOTICS :

يمكن تعريف المضاد الحيوي بأنه المركب الكيميائي المشتق من افرازات الكائنات الحيه و يمتلك خاصية قتل البكتيريا او كبح نموها و تكاثرها ، و الفطريات و البكتيريا هي اهم الكائنات القادرة على افرازها او قد تكون صناعية او شبه صناعية **(المفتي ، 1985) .**

1.4.1 تصنيف المضادات الحيوية :

صنفت المضادات الحيوية على حسب تأثيرها على الكائن الحي إلى 5 مجاميع رئيسية حسب آلية عملها على البكتيريا **(الطيار و طلاحفة ، 2001)** :

المضادات الحيوية الكابحة لتصنيع جدار الخلية البكتيرية:-

عند اتصال المضادات الحيوية بأحد المستقبلات الخلوية يؤدي إلى نمو غير طبيعي لجدار الخلية أو خلل في محيط جدار الخلية الذي يؤدي إلى تحلل الخلية وفي بعض الأنواع تعمل على تثبيط تفاعلات خاصة بتكوين الجدار الخلوي والذي يؤدي إلى تثبيط تكوين Piptedoglycan والذي يعتبر المكون الرئيسي للجدار الخلوي فمثلا مجموعة glycopeptides الممثلة بالفانكومايسين vancomycin ترتبط بنهايات D-alanyl لسلسلة البيبتيدوجليكون الخماسية البيبتيد الوليدة وهذا الارتباط سوف يمنع أي نمو أو استطالة للبيبتيدوجليكون (**الطيار و طلاحفة ، 2001**) .

المضادات الحيوية التي تؤثر على وظيفة الغشاء الخلوي:

هذه الطائفة من المضادات الحيوية لديها خصوصية لمجموعة ميكروبية معينة بالاعتماد على الاختلاف في محتوى الغشاء من الدهن، فمجموعة polymyxin تؤثر على فوسفوليبيدات الغشاء فتشوه شكل سطح الخلية مسببة في خروج البروتينات والقواعد النيتروجينية للخارج فيؤدي لانفجار الخلية وموتها **(Kenneth,2003)**.

المضادات الحيوية التي تعطل تصنيع البروتينات داخل الخلية:

تمتلك البكتيريا رايبوسومات من نوع 70S بينما الخلايا البشرية تحتوي على ريبوسومات من نوع S80 ، هذا الاختلاف في الحجم والتركيب يجعل عمل المضادات الحيوية يكون محدود على البكتيريا فقط بدون أي تأثير على الخلايا البشرية ، ومن المجموعات التي تؤثر على تصنيع البروتينات هي Macrolides و Tetracyclines و Chloramphenicol

Aminoglycosides حيث تعمل macrolides مثل Erythromycin على الارتباط بتحت الوحدة S50 ليمنع تكوين معقدات البدء، وتعمل مجموعة Aminoglycoside مثل Gentamycin بنفس الكيفية و Chloramphenicol يرتبط بتحت الوحدة S50 ويتداخل مع الأحماض الأمينية في تكوين السلاسل الببتيدية النامية و Tetracyclines الذي يرتبط بتحت الوحدة S30 ويمنع ارتباطها بـ tRNA وبالتالي يمنع إطالة السلاسل الببتيدية (**الطيار و طلاحفة ،2001**).

المواد الكيميائية التي تعيق العمليات الأيضية (أيض الفولات):

هي عبارة عن مواد كيميائية لها تأثير المضاد الحيوي، وتستطيع هذه المركبات الدخول في السلسلة الأيضية للبناء داخل الخلية، مثل مركبات sulphamethoxazole تستطيع أن تتداخل

في سلسلة تكوين الفوليت حيث يتنافس مع حمض البارامينوبينزويك paraaminobenzoic acid المهم في سلسلة تكوين الفوليت ويرتبط بدلا عنه مؤديًا إلى إيقاف إنتاج الفوليت، وتستخدم هذه المضادات بشكل فعال في القضاء على البكتيريا المعوية المسببة لالتهابات المسالك البولية **(الطيار و طلاحفة ، 2001).**

المضادات الحيوية التي تعيق إنتاج الأحماض النووية:

هناك العديد من المضادات الحيوية التي تعيق إنتاج DNA أو RNA فمثلا مجموعة quinolones التي ينتمي لها nalidixic acid و ciprofloxacine تؤثر على تضاعف DNAمن خلال استهدافها لإنزيم Topoisomerase الذي يعتبر من الإنزيمات المهمة في إكمال تضاعف DNA، فيما تعمل مجموعة rifampin والتي ينتمي لها المضاد الصناعي rifamycin B المستخدم في علاج حالات الدرن الرئوي على تثبيط عمل إنزيم بلمرة RNA بإرتباطه بتحت الوحدة وبالتالي يمنع تكون واستطالة سلسلة RNA **(Kenneth,2003).**

5.1 مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية:

ظاهرة مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية تعتبر ظاهرة بيولوجية مهمة جدا، وهي تعني أن الجرثومة أصبحت غير متأثرة بهذا المضاد عند تعرضها له، ففي الوقت الذي توجد فيه سلالات حساسة من جنس البكتيري معين للمضاد الحيوي نجد سلالات أخرى من نفس الجنس كيفت نفسها معه و أصبحت مقاومة وغير متأثرة به وتورث هذه الميزة للأجيال البكتيريا الناتجة منها تنشأ العزلات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية نتيجة لجينات المقاومة **(Madan L.B 2009)** ، وهذه تكتسب بأليات عديدة مثل:-

1-التغير التطفري mutation الذي يطرأ علي المادة الوراثية ،وتم هذا بشكل عشوائي اثناء انقسام الخلية البكتيرية.

2- اكتساب البكتيريا للبلازميدات وهذه الالية تشكل النمط الاكثر شيوعا والاكثر اهمية .

3- اكتساب المقاومة عبر مايسمي بترانسبورات transposons عبارة عن متتالية من الحلمض النووي قادرة علي الانتقال من سلسلة حامض نووي الي جزئ حامض نووي اخر مخنلف .

4-قد تكتسب المقاومة عبر ميكانكية اخري تعرف بالنقل الفاجي transduction.

اكتساب البكتيريا لعوامل المقاومة المذكورة سابقا يجعلها مقاومة للمضاد الحيوي بأليات عديدة هي :

1- إنتاج البكتيريا لإنزيمات توقف نشاط المضاد الحيوي مثل إنزيمات lactamase B- التي توقف نشاط المضاد الحيوي عن طريق ارتباط حلقة البيتا لاكتام بالمضاد الحيوي مثل البنسلين والسيفالوسبورين.

2- إنتاج مركبات مستهدفة لا تؤثر عليها المادة السامة.

3- تغير البكتيريا نفاذيتها مما يؤدي إلى عدم وصول التركيز الفعال من المادة السامة إلى داخل الخلية البكتيرية **(Lowy,1998) .**

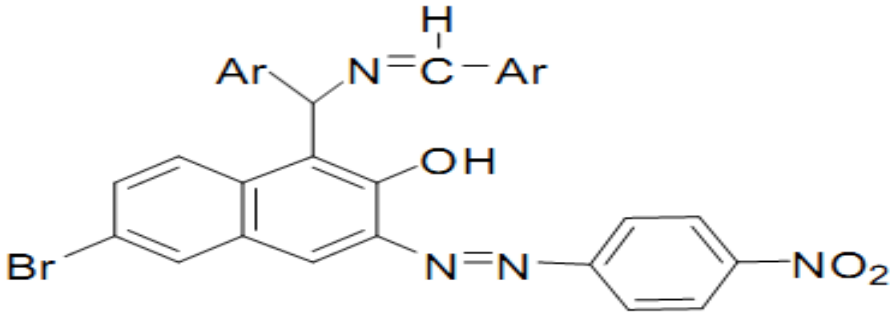
6.1 الهدف من الدراسة :

تهدف هذه الدراسة الى دراسة الفعالية البيولوجية لبعض مشتقات قواعد شف الازوية (L1 , FeL1 , NiL1 , CoL1 , CuL1) وذلك من خلال البرنامج التالي :-

- اختبار حساسية البكتيريا ضد بعض المضادات الحيوية شائعة الاستخدام في منطقة الدراسة .
- أختبار فعالية استخدام هذه القواعد كمضادات ميكروبية .
- اختبار الفعالية البيولوجية لبعض قواعد شف الازوية على البكتيريا
- دراسة التاثير التآزري و التضادي لهذه القواعد مع عينة من المضادات الحيوية شائعة الاستخدام في منطقة الدراسة .

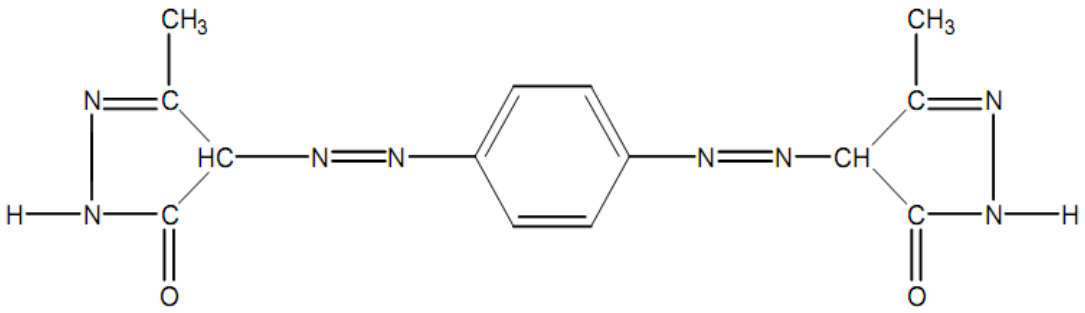
7.1 الدراسات السابقة :

اشارت الدراسة التي قام بها كل من **(Arvind *et al.*,2010)** الي امتلاك قاعدة شف الازوية التالية *1-((aryl benzylideneamino)(aryl phenyl) methyl)-6-bromo-3-(4-nitrophenyl) diazenyl)naphthalene-2-ol* كما هو موضح في الشكل (4) ، بان لها فعالية بيولوجية ضد انواع مختلفة من البكتيريا موجبة لصبغة جرام وهي *Bacillus subtilis* , *Staphylococcus aurens* و سالبة لصبغة جرام وهي *Pseudomonas sp* , *Proteus vulgaris, salmonella sp* , *Escherichia coli.*

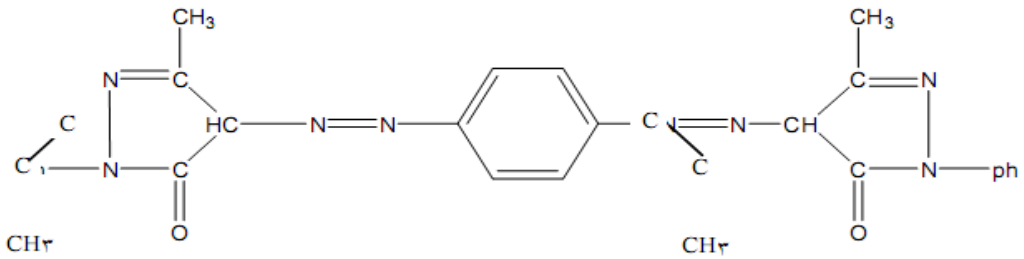


شكل(4) يوضح قاعدة شف الازوية ***1-((aryl benzylideneamino)(aryl phenyl) methyl)-6-bromo-3-(4-nitrophenyl) diazenyl)naphthalene-2-ol*** **(Arvind *et al.*,2010).**

قام **(Ghanim and Majeed, 2009)** بدراسة التأثير تآزري الي المضادات الحيوية التالية Ceftazidime , Amoxycillin , Gentamicin مع قواعـــــد شف التالية *4,4-(1,4-phenylenebis(diazene-2,1-diyl))bis(3-methyl-1H-pyrazole-5-(4H)-one* و *1.4-bis((3.5-dimethyl-1-phenyl-pyazole-4-yl)benzene)* كما هو موضح في الشكل (5)(6) ، علي انواع بكتيرية مختلفة منها موجبة لصبغة جرام وهي *Streptococcus* , *Staphylococcus* و سالبة لصبغة جرام وهي *Klebsiella pneumonia* , *Escherichia coli* و قد اظهرت النتائج تأثير بيولوجي واضـــــــحا.



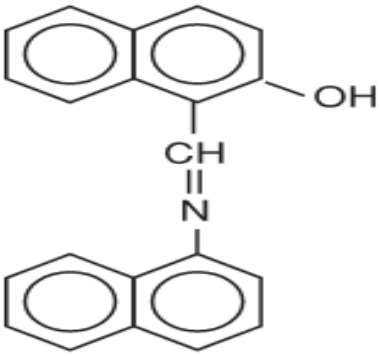
شـــكل(5) يوضـــح قاعـــدة شـــف *4,4-(1,4-phenylenebis(diazene-2,1-diyl))bis(3-methyl-1H-pyrazole-5-(4H)-one* **(Ghanim and Maje CWed, 2009).**



شكل(6) يوضح قاعدة شف *1.4-bis((3.5-dimethyl-1-phenyl-pyazole-4-yl)benzene* **(Ghanim and Majeed, 2009)** .

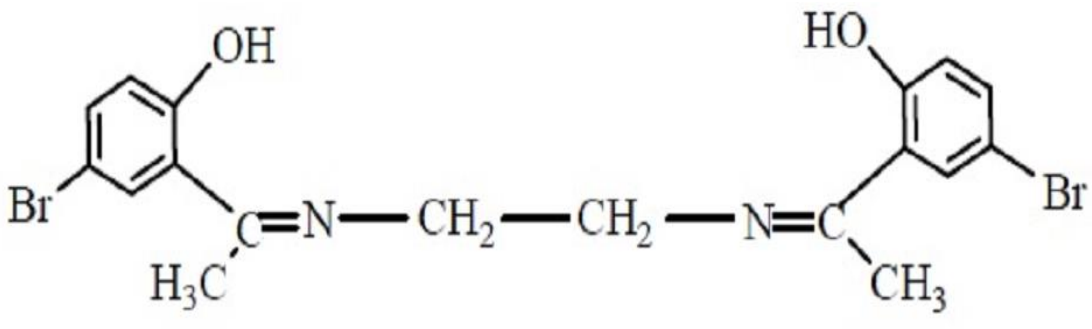
اشار **(الصميدعي و اخرون، 2014)** بان امتلاك بعض المركبات المحضرة فعالية تثبيطية اتجاه نمو البكتيريا موجبة لصبغة جرام وهي *Staphylococcus aurens* و سالبة لصبغة جرام وهي *Pseudomonas aeruginosa* هذه القيم التثبيطية تكون متقاربية من قيم المعاملات بالمضادات الحيوية .

قام **(Akbolat *et al* .,2012)** بدراسة تأثير قاعدة شف التالية *2-hydroxyaphthalene -1-carbadehydene 1- naphtylamin* كما هو موضح في الشكل (7) ، علي انواع بكتيرية مختلفة منها البكتيريا موجبة لصبغة جرام وهي *Staphylococcus aurens* و سالبة لصبغة جرام وهي *Pseudomonas aeruginosa* و قد اظهرت النتائج تأثير بيولوجي واضحا لهذه القاعدة علي البكتيريا .



شكل (7) يوضح قاعدة شف *2-hydroxyaphthalene -1-carbadehydene 1- naphtylamin* **(Akbolat *et al* .,2012).**

اما **(Kelode and Mandlik, 2012)** فقـد حضـــــــــــــــــرا قاعدة شف التاليـة *2-Hydroxy-5-bromoacetophenone-N,N'-ethylenediimine* كمـا هوموضـح في الشكل (8) ، و وجد انها تمتلك فعالية بيولوجية ضد نمو البكتيريا موجبة لصبغة جرام وهـي *Staphylococcus aurens* و سالبة لصبغة جـرام وهــي *Bacillus subtilis* , *Proteus vulgaris* , *Escherichia coli* *Enterobacter aerogenes.* *Pseudomonas fluorescen* ,



شـــــــــكل (8) يوضح قاعدة شف *2-Hydroxy-5-bromoacetophenone-N,N'-ethylenediimine* (**Kelode and Mandlik, 2012).**

اشارت الدراسة التي قام بها كل من **(الضميري و وراد، 2015)** الي امتلاك قواعد شـــــف التالية *N^1,N^2-bis((5-bromothiophen-2-yl)methylene)ethane-1,2-diamine)* و *N^1,N^2-bis(2-chlorobenzylidene)cyclohexane-1,2-diamine)* و معقداتها مع النحاس بان لها فعالية بيولوجية ضد انواع مختلفة من البكتيريا موجبة لصبغة جرام وهي *Staphylococcus aurens* و سالبة لصبغة جرام وهي *Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli* و حيث اظهرت القواعد العضوية نشاط اكبر من معقداتها.

مواد و طرق العمل :

1.2 الادوات و الاجهزة :

تم تجهيز كل متطلبات الأمان الحيوي فذلك لخطورة العينات والمركبات المستخدمة ثم استخدام الأدوات و المعدات و الاجهزة الآتية :

جدول (1) يوضح الادوات و الاجهزة المستخدمة

الادوات و المعدات		الاجهزة
باطو	اطباق بتري	الحضانة
قفازات	انابيب معقمة	المسخن
كمامات	مخبار مدرج	جهاز الأوتوكليف
ماصات أوتوماتيكية	قطن معقم	المجفف
اللوب	اوراق تشبع	الكابينة
ماسحات قطنية	ماء مقطر	الميزان
ملاقط	حاملات أنابيب	موقد بنزن
دوارق	مذيب Dimethyl solveut oxde (DMSO) %97	الثلاجة
Tips	اوراق ترشيح	الحضانة الهزاز
ديتول تركيزه 50 %	كلوركس بتركيزه 50 %	جهاز الطرد المركزي
أكياس عدم خاصة بالتلوث البيولوجي	الكحول ايثيلي بتركيز 97 %.	محرقة للتخلص من بقايا العمل البيولوجي
استخدام الأشعة فوق البنفسجية لمدة 5- 10 دقائق للتعقيم قبل و بعد العمل المعملي		

2.2 المــواد Materials:

الأوساط المغذية:

تم إتباع تعليمات شركة (oxoid) لمنتجات البيوكيميائية في تحضير الأوساط.

الأوساط الصلبة تشمل:

Muller hinton agar (MHA) تم استخدام هذا الوسط لغرض اجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية المراد اختبارها لعينات الدراسة.

الأوساط السائلة وتشمل:

-Nutrient broth تم استخدام هذا الوسط لغرض زراعة الخلايا بالبكتيرية إثناء إجراء اختبارات المضادات الحيوية والمركبات الكيميائية المخلقة.

المضادات الحيوية المستخدمة لاختبار الحساسية:

تم استخدام مضادات حيوية معروفة التركيز على هيئة أقراص من إنتاج شركة oxoid للمنتجات البيوكيميائية ، و تم اختبار هذه المضادات الحيوية ؛ وذلك لأنها الأكثر استخداماً في علاج الاخماج الناتجة من البكتيريا المعوية ، أضف إلى ذلك كثرة استعمال هذه المضادات في منطقة الدراسة، و يهدف إجراء هذا الاختبار إلى معرفة مدى الاستجابة للبكتيريا قيد الدراسة للمضادات الحيوية.

جدول (2) يتضمن المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

المجموعة الوظيفية للمضادات الحيوية	اسم المضاد	رمز المضاد	تركيز المضاد بوحدة Mg	الية العمل
Aminoglgcosides	Streptomycin	S	10	الي تثبط عملية تصنيع البروتين بالتأثير على الوحدة الريبوزومية 50S
	Gentamycin	CN	10	
Cephalosporins	Chloramphenicol	C	10	التي لها تأثير على بناء جدار الخلوي حيث تثبط تصنيع الببتيدوجلايكان
	Cefamandole	MA	30	
Miscellaneous	Vanomycin	VA	5	كبح تصنيع جدار الخلية البكتيرية
	Clindamycin	DA	2	تثبيط تخليق البروتين
b.lactum	Penicillin	P	10	تؤثر على تكوين جدار الخلوي و بشكل اوضح تؤثر علي الببتيدوجلايكان و تثبط تصنيعه
	Ampicillin	AMP	10	

المركبات الكيميائية التي تم استخدامها استقدمت من معمل قسم الكيمياء وذلك بتراكيز مختلفة لغرض الدراسة :

جدول (3) يتضمن المركبات الكيميائية المستخدمة في الدراسة

رمز المركب	المذيب المستخدم	اسم المركب الكيميائي
L_1	DMSO	2-[(z)-({5-(z)-(2-hydroxyphenyl]-2-methyl]phenol.
FeL_1	DMSO	Fe(2-[(z)-({5-(z)-(2-hydroxyphenyl]-2-methyl]phenol).
NiL_1	DMSO	Ni(2-[(z)-({5-(z)-(2-hydroxyphenyl]-2-methyl]phenol).
CoL_1	DMSO	Co(2-[(z)-({5-(z)-(2-hydroxyphenyl]-2-methyl]phenol).
CuL_1	DMSO	Cu(2-[(z)-({5-(z)-(2-hydroxyphenyl]-2-methyl]phenol).

3.2 طرق العمل :

تم العمل على عزلة بكتيرية من المتحف الميكروبي لقسم علم الحيوان من عزلة بكتيريا *B. melitensis* .

تحضير المحلول القياسي:

تم تحضير كل مركبات الاختبار بتراكيز (**50 -5 - 0. 5 mg**) في مذيب DMSO ويؤخذ من هذا المحلول حوالي (**10 µl**) ومن يتم استخدامه للاختبار كمضادات ميكروبات.

1.3.2 تنمية عينات البكتيريا Growth of bacterial sample :

تم استخدام وسط Nutrient broth في تنمية العينات حيث تم أخذ جزء من العينات المحفوظة باستخدام اللوب وتمت إذابته في هذا الوسط و يتم تحضينها في حضانة الهز عند 37°م لمدة 18- 20 ساعة

تم استخدام وسط Muller hinton agar في تنمية العينات تم زراعته بطريقة التخطيط علي هذا الوسط و تم تحضينها فـــــي الحضـــــانة عند37ºم لمدة 18- 24 ساعة **(Alferd and) Brown ,2001**.

2.3.2 خطوات عمل اختبار الحساسية للمضادات الحيوية :

1- تم تنمية البكتيريا على الوسط المغذي الصلب و من ثم حضنها لمدة 18 – 24 ساعة عند درجة 37º م في الحضانة .

2- تم اخذ مسحة لمستعمرة (كلونة) معينة بوسط اللوب البلاستيك او الحديد وحقنها في 5 مل من الوسط السائل تحضن في حضانة الهز عند 37ºم لمدة من 18 - 24 ساعة .

3- خطط سطح الاجار المغذي في اتجاهين لتؤكد الزرع الكثيف للطبق بكاملة تفادي الرطوبة الزائدة على السطح.

4- تم توزيع المضادات الحيوية على سطح الوسط بواسطة ابرة معقمة او ملقط معقم بحث يكون بعد المضاد عن حافة الطبق حوالي 2 سم وبعده عن المضاد الاخر حوالي من 2-3سم.

5- وضعت الاطباق بشكل مقلوب داخل الحضانة عند 37ºم لمدة 24 ساعة، ثم تم اخذ النتائج بقياس و تسجيل مساحة الخالية من البكتريا حول قرص المضاد .**(سيالة ، 1990).**

3.3.2 خطوات عمل اختبار للمركبات الكيميائية :

1- تم تحضير أقراص التشبع بقطر 0.5 سم ثم تعقيمها بتعريضها لأشعة (UV) لمدة 10 د.

2- استعمال مــاصة أتوماتيكية لوضع التراكيز المختلفة للمركبــات و تشبيع الأقراص بسعة (**10 µl**) مع مراعاة تغير ال tips المستخدمة بعد وضع كل تركيز.

3- تم تخطيط أطباق بتري المحتوية على الوسط الصلب بالبكتيريا بواسطة Swap.

4- تخطط سطح الاجار المغذي في اتجاهين لتؤكد الزرع الكثيف للطبق بكاملة تفادي الرطوبة الزائدة على السطح.

5- باستعمال الملقط الذي ثم تعقيمه باللهب تم وضع أقراص التشبع المشبعة بالمركبات على سطح الأجار.

6-حضنت الاطباق عند درجة 37ºم لمدة 18 - 24 ساعة في الحضانة ، وبعد ذلك تم قياس المنطقة الخالية من النمو حول القرص باستعمال المسطرة و سجلت النتائج **(Ali *et***

4.2.2 خطوات عمل اختبار التأثير التازري و التضادي للمركبات الكيميائية مع المضادات الحيوية (*al.*,2013 :

1- تم احضار اقراص المضاد الحيوي المقصود و وضعه في طبق بتري فارغ و معقم .

2- استعمال ماصة أتوماتيكية لوضع التراكيز المختلفة للمركبات و تشبيع اقراص المضاد الحيوي بسعة (**10 µl**) مع مراعاة تغير ال tips المستخدمة بعد وضع كل تركيز.

3- خططت أطباق بتري المحتوية على الوسط الصلب بالبكتيريا بواسطة Swap .

4- خطط سطح الاجار المغذي في اتجاهين لتؤكد الزرع الكثيف للطبق بكامل و تفادي الرطوبة الزائدة على السطح.

5- باستعمال الملقط الذي ثم تعقيمه باللهب نلتقط أقراص المضاد الحيوي و نضعها على سطح الأجار المخطط .

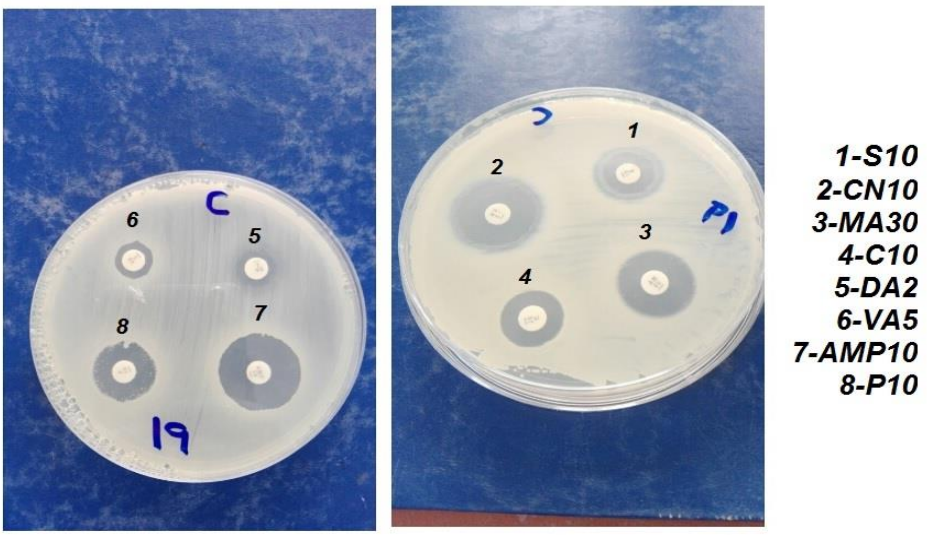
6- وضعت الاطباق عند درجة 37ºم لمدة 18 - 24 ساعة في الحضانة ، وبعد ذلك تم قياس المنطقة الخالية من النمو حول القرص باستعمال المسطرة ويتم تسجيل النتائج . **(2009 Ghanim and Majeed,)**

1.3 النتائج و المناقشة :

تم في هذه الدراسة بحث تأثير قواعد شيف الازوية بالتراكيز (50 ، 5 ، 0.5 ملغم/مل) و كذلك دراسة تأثير التأزري لقواعد شف الازوية مع المضادات الحيوية (S_{10} . CN_{10}, MA_{10}, C_{10}, VA_5, DA_2, P_{10}, AMP_{10})على عزلة البكتيريا ***B.melitensis*** .

اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية :

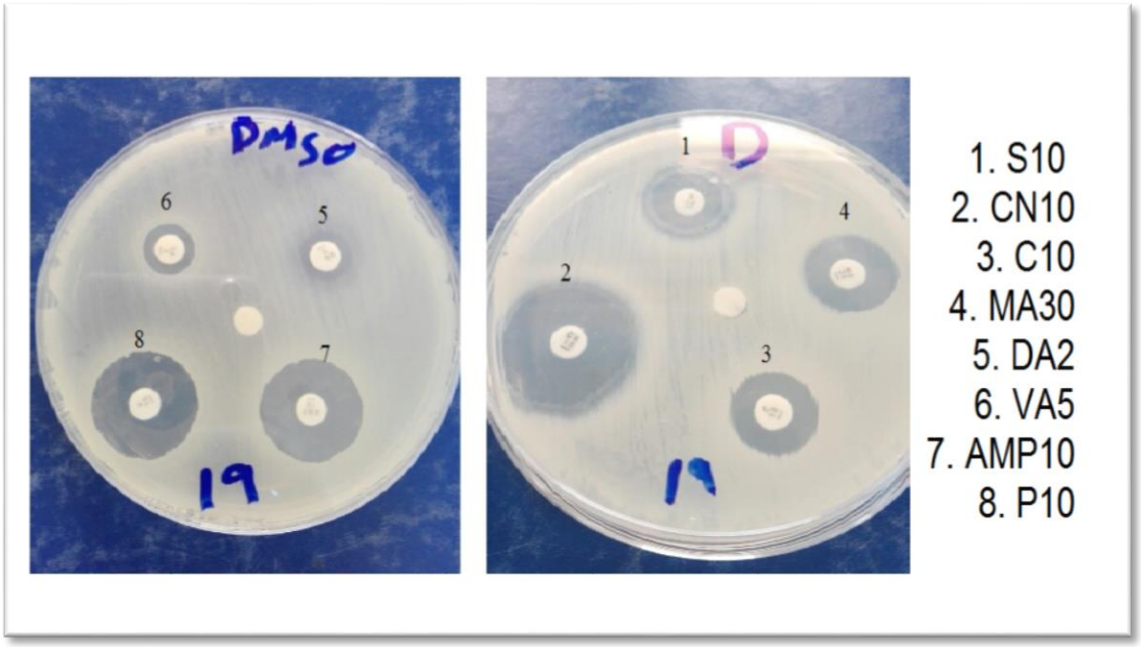
اظهرت النتائج في الصورة (1) و الجدول (4) المتعلقة باختبار الحساسية للمضادات الحيوية ان العزله البكتيرية ***B.melitensis*** حساسة لجميع المضادات المستخدمة (S_{10} . CN_{10}, MA_{10}, C_{10}, VA_5, DA_2, P_{10} , AMP_{10}) و هذا يدل على ان البكتريا لم تكن مقاومة .



صورة (1) توضح اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

اختبار التأثير التأزري ل DMSO مع المضادات الحيوية :

اوضحت النتائج في الصورة (4) و الجدول (4) ان المذيب DMSO قد اعطى تفاعلا تأزري مع المضادات التالية (P_{10}, AMP_{10} , DA_2 , CN_{10}) حيث يرجع السبب الى ان المادة الفعالة في المذيب قامت بتعزيز فاعلية هذه المضادات ، بينما اعطى تفاعل حيادي مع (VA_5) و هذا يعني ان المذيب لم يؤثر على مضاد لا سلبا ولا ايجابا ، في حين انها اعطت تأثير عكسي او تضادي مع (S_{10} ، MA_{30} , C_{10}) و قد يرجع سبب ان مواد فعالة في مذيب اثرت تأثير عكسي مما ادى الى تقليل نشاط مضادات الحيوية **(عبد البهادلي ، ومطرود ، 2015)** .



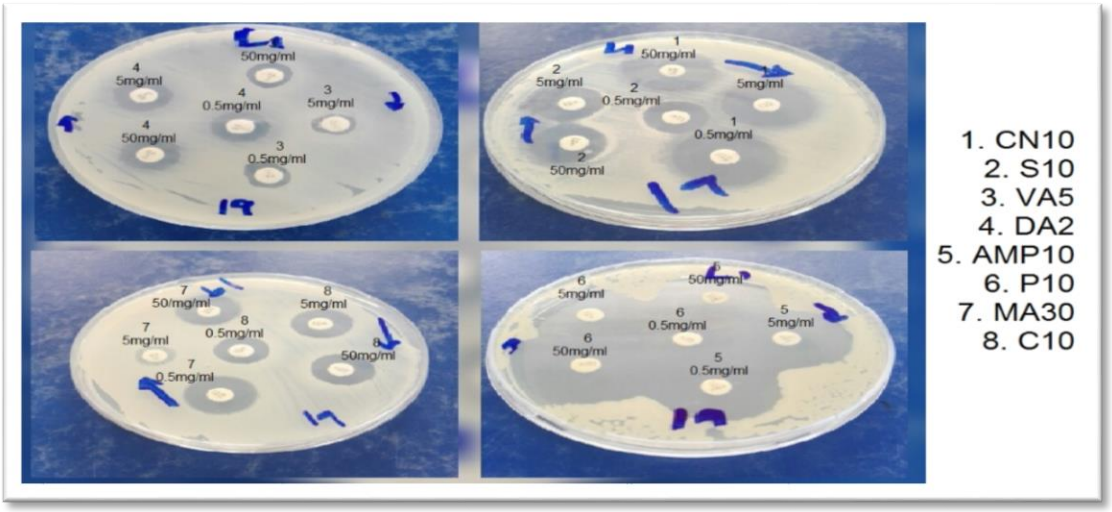
صورة (2) توضح اختبار تآزر DMSO مع المضادات الحيوية

اختبار التأثير التآزري ل L1 مع المضادات الحيوية :

اظهرت النتائج في الصورة (5) و الجدول (4) ان L1 اعطى تأثير تآزري مع (S_{10}) مع التراكيز 50_5mg/ml ، و مع (CN_{10} ، C_{10}) في كل التراكيز، و مع (MA_{30}) في تراكيز 0.5mg/ml _ 50 و، مع (VA_5) عند التركيز 5mg/ml ، و كذلك مع (DA_2) عند التراكيز 5mg/ml _ 50 ، و مع (AMP_{10}) عند التركيز 5mg/ml ، بينما اعطى L1 تأثير حيادي مع (S_{10}) في التركيز 0.5mg/ml ، و مع (MA_{30}) عند تركيز 0.5mg/ml ومع (VA_5) مع تركيز 50mg/ml (DA_2) عند التركيز 0.5mg/ml ، في حين اعطى L1 تأثير تضاديا او عكسيا مع (MA_{30}) عند التركيز 5mg/ml و مع (VA_5) عند التركيز 0.5mg/ml و مع (P_{10}) عند كل التراكيز ومع (AMP_{10}) في التراكيز 0.5mg/ml _ 50 .

ان سبب حدوث التآزر بين مشتقات قواعد شيف و المضادات الحيوية المستخدمة قد تعود الى ان تركيز المواد الفعالة في القاعدة مثل الفينول الحاوي على مجموعة (OH) القطبية الفعالة التي تمتلك القدرة علي الارتباط بواسطة روابط هيدروجينية مع المجاميع الفعالة في المضادات الحيوية ، اما بخصوص حدوث التضاد بين مشتقات قواعد شيف و المضادات الحيوية المستخدمة قد يعود الى ان اختلاف تركيز المواد الفعالة مما ادى الى تأثير عكسي و تثبيط فاعلية المضاد

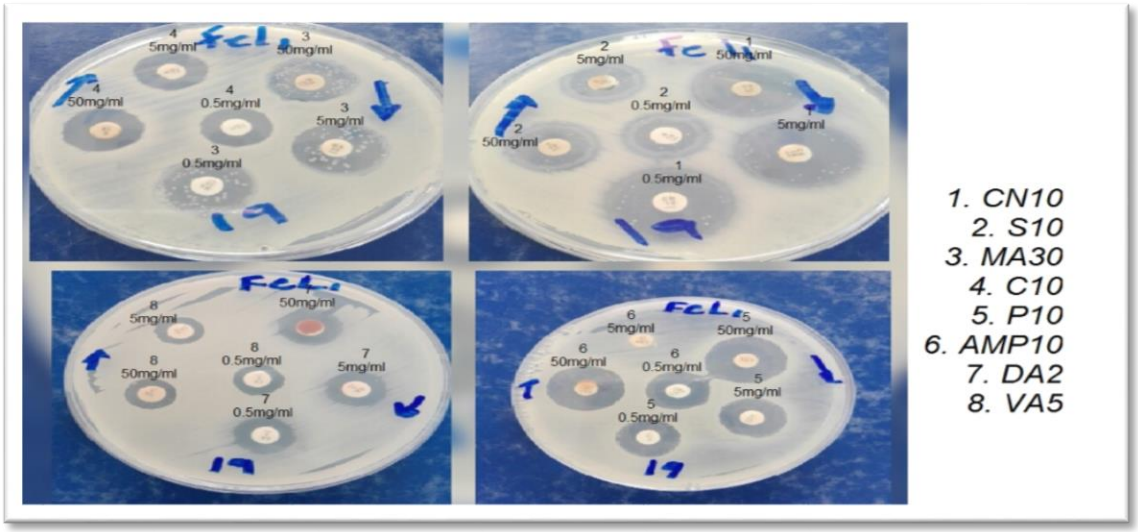
(خضر و الدليمي ، 2008) ، اما التأثير الحيادي فقد يرجع الى ان القاعدة لم ترتبط مع المضاد الحيوي لذلك لم تأثر في فاعليته **(داود و اخرون ، 2006).**



صورة (3) توضح اختبار تآزر L1 مع المضادات الحيوية

اختبار التأثير التآزري ل FeL1 مع المضادات الحيوية :

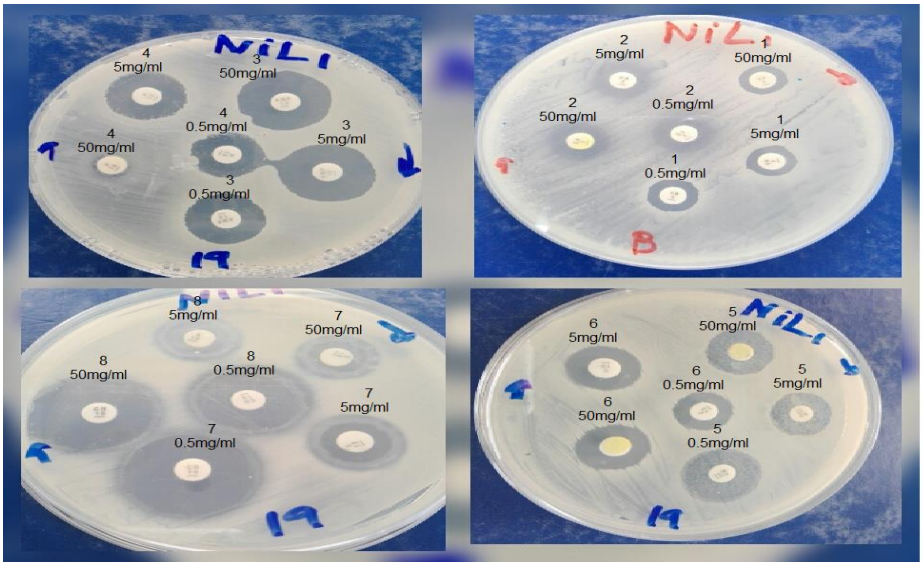
اوضحت النتائج في الصورة (6) و الجدول (4) ان FeL1 اعطى تأثير تآزري مع (CN_{10}) عند التراكيز 0.5 mg/ml _ 5 و مع (C_{10} , MA_{30}) عند كل التراكيز و كذلك (DA_2) عند كل تراكيز و مع (P_{10}) عند تراكيز 0.5 mg/ml _ 5 ومع (AMP_{10}) عند التركيز 0.5mg/ml ، و اعطى FeL1 تأثير تعادلي مع (CN_{10}) عند التركيز 50mg/ml و مع (VA_5) عند كل التراكيز ، و قد اعطى FeL1 تأثير تضادي مع (S_{10}) عند كل التراكيز و مع (P_{10}) عند التركيز 50mg/ml و ايضا مع (AMP_{10}) عند التركيز 5mg/ml _ 50 وللاسباب المذكورة في الصفحة (18).



صورة (4) توضح اختبار تآزر FeL1 مع مضادات الحيوية

اختبار التأثير التآزري ل NiL1 مع المضادات الحيوية :

اظهرت النتائج في الصورة (7) و الجدول (4) ان NiL1 اعطى تأثير تآزري مع (CN_{10} , C_{10}) 5 mg/ml _ 50 و مع (VA_5) عند التركيز 0.5mg/ml و مع (P_{10}) عند التركيز 5 mg/ml_0.5 و مع (AMP_{10}) في كل التراكيز ، بينما اعطى NiL1 تأثير حيادي مع (CN_{10}) عند التركيز 50mg/ml و مع (C_{10}) عند التركيز 0.5mg/ml و مع (VA_5) عند التركيز 5mg/ml _ 50 و مع (DA_2) عند كل تراكيز ، و اعطى هدا مركب تآثير تضادي مع (S_{10}) عند كل تراكيز و مع (MA_{30}) عند كل تراكيز ايضا و مع (P_{10}) عند التركيز 50mg/ml للاسباب السابق ذكرها في الصفحة (18).

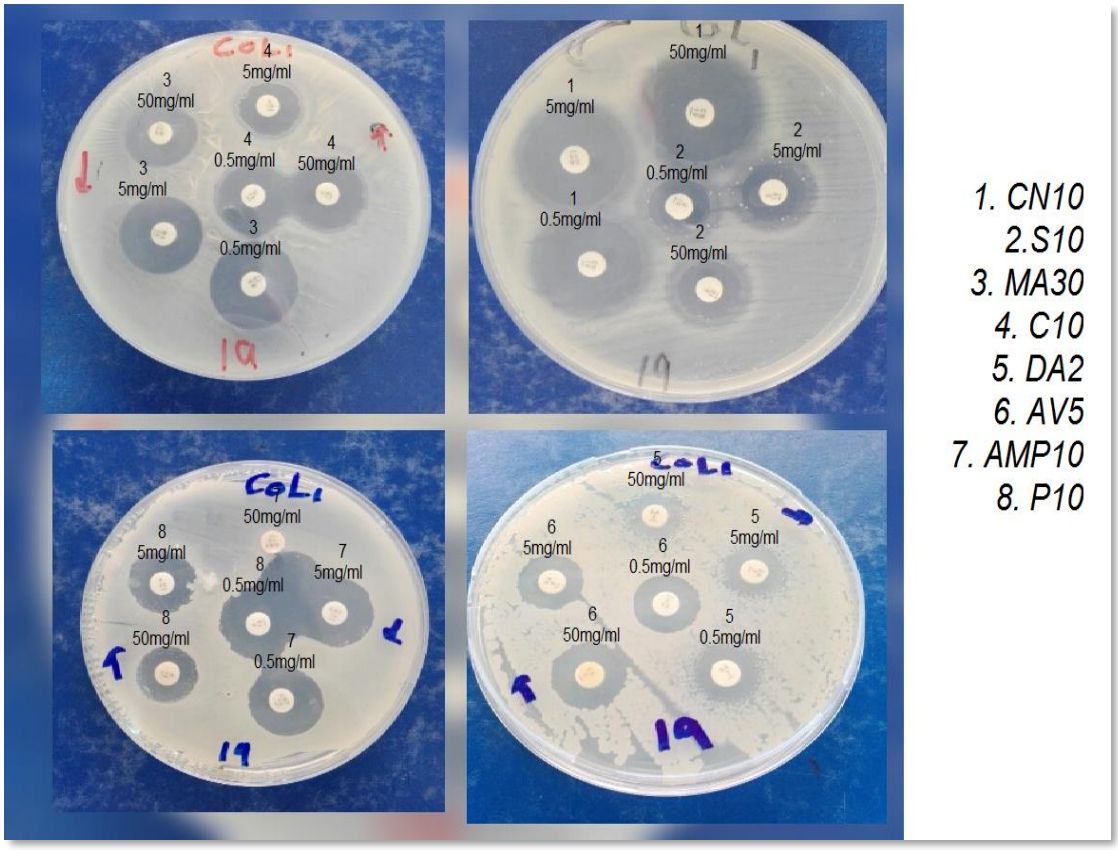


1. VA5
2. DA2
3. AMP10
4. P10
5. MA30
6. C10
7. S10
8. CN10

صورة (5) توضح اختبار تآزر NiL1 مع المضادات الحيوية

اختبار التأثير التآزري ل CoL1 مع المضادات الحيوية :

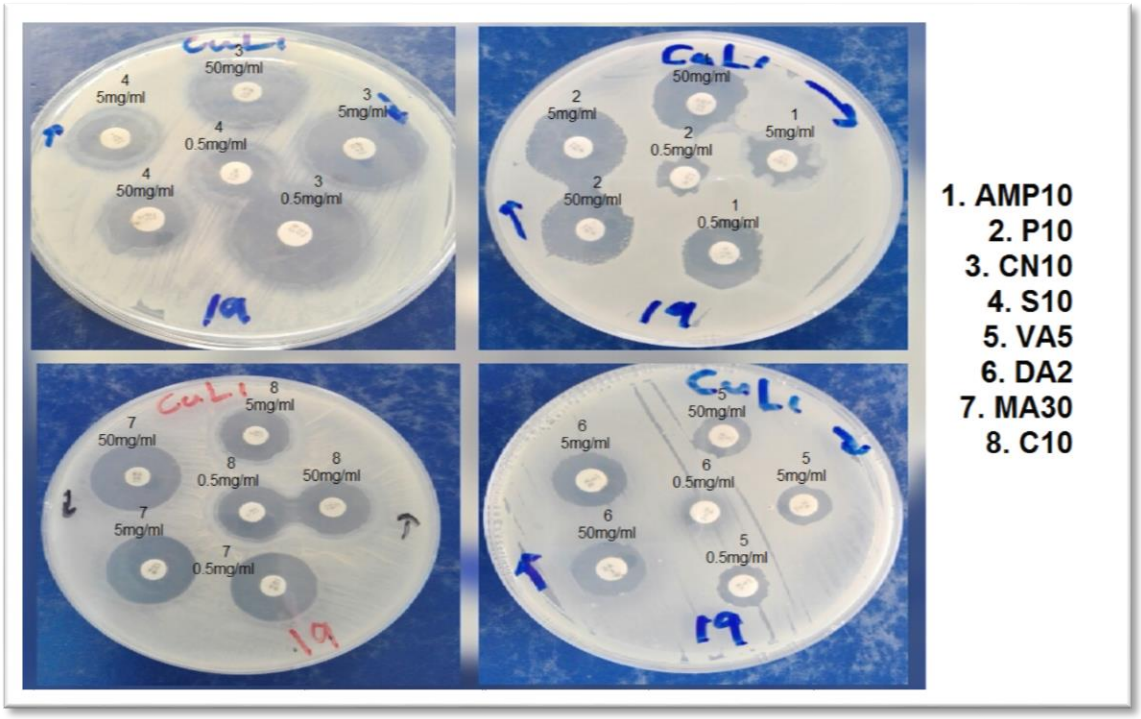
اوضحت النتائج الاختبار في الصورة (8) و الجدول (4) ان مركب CoL1 قد اعطى تفاعلا تآزريا مع (CN_{10}) عن التراكيز 50mg/ml و مع (C_{10}) عند التراكيز 5mg/ml _ 50 ، بينما اعطى تفاعلا تعادليا مع (CN_{10}) عند التراكيز 0.5mg/ml _ 5 و مع (C_{10}) عند التركيز 5mg/ml (MA_{30}) عند التركيز 50mg/ml ومع (VA_5) عند التركيز 0.5mg/ml و مع (DA_2) عند التراكيز 50_5mg/ml و مع (P_{10}) مع تراكيز 5_0.5mg/ml ، و قد اعطى CoL1 تفاعل تضادي مع (S_{10}) في كل التراكيز و مع (MA_{30}) عند التراكيز 0.5mg/ml _ 5 (VA_5) عند التراكيز 5mg/ml _ 50 و مع (DA_2) عند التركيز 0.5mg/ml (P_{10}) عند التركيز 50mg/ml و مع (AMP_{10}) عند كل التراكيز ، للاسباب المذكورة سابقا في الصفحة (18) .



صورة (6) توضح اختبار تآزر CoL1 مع مضادات الحيوية

اختبار التأثير التآزري ل CuL1 مع المضادات الحيوية :

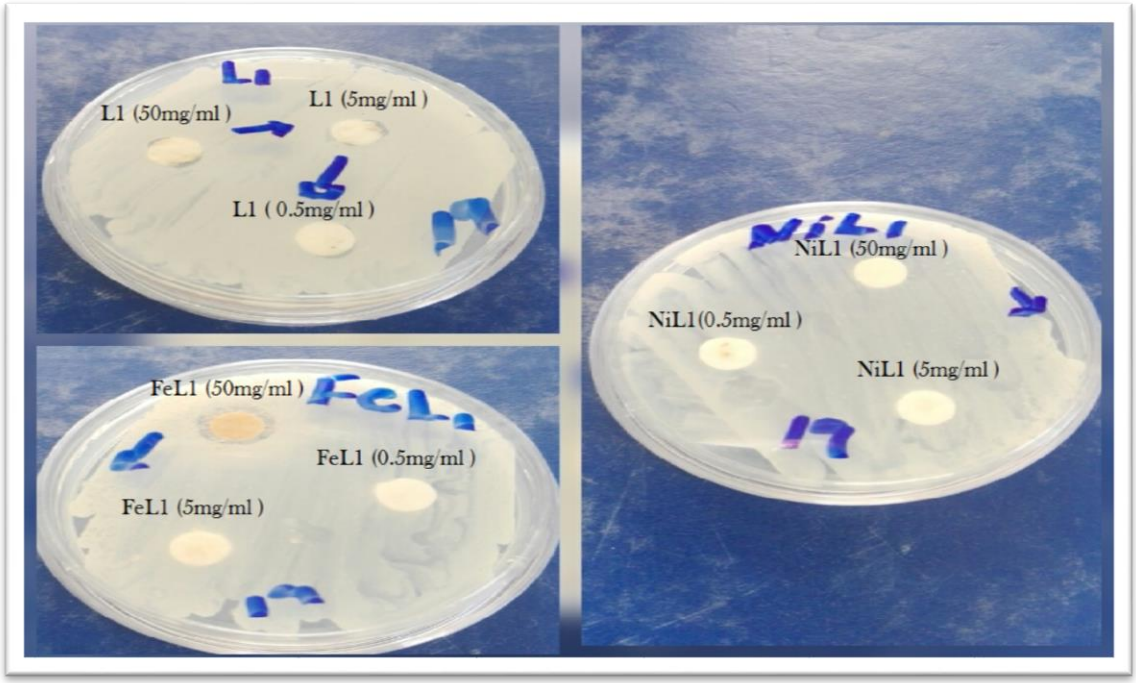
اظهرت النتائج في الصورة(9) و الجدول (4) ان CuL1 اعطى نتائج تأزرية مع (CN_{10}) عند التراكيز 0.5mg/ml _ 5 و مع (DA_2 , P_{10} , AMP_{10}) عند كل التراكيز ، و قد اعطى هذا مركب تفاعلا حياديا مع (CN_{10}) عند تركيز 50mg/ml و مع (C_{10}) عند كل تراكيز و مع (MA_{30}) عند التراكيز 5mg/ml _ 50 ، و قد اعطى تفاعلا تضاديا مع (S_{10}) عند كل التراكيز (MA_{30}) عند التركيز 0.5mg/ml ومع (VA_5) عند كل التراكيز ، للاسباب السابق ذكرها في الصفحة (18).



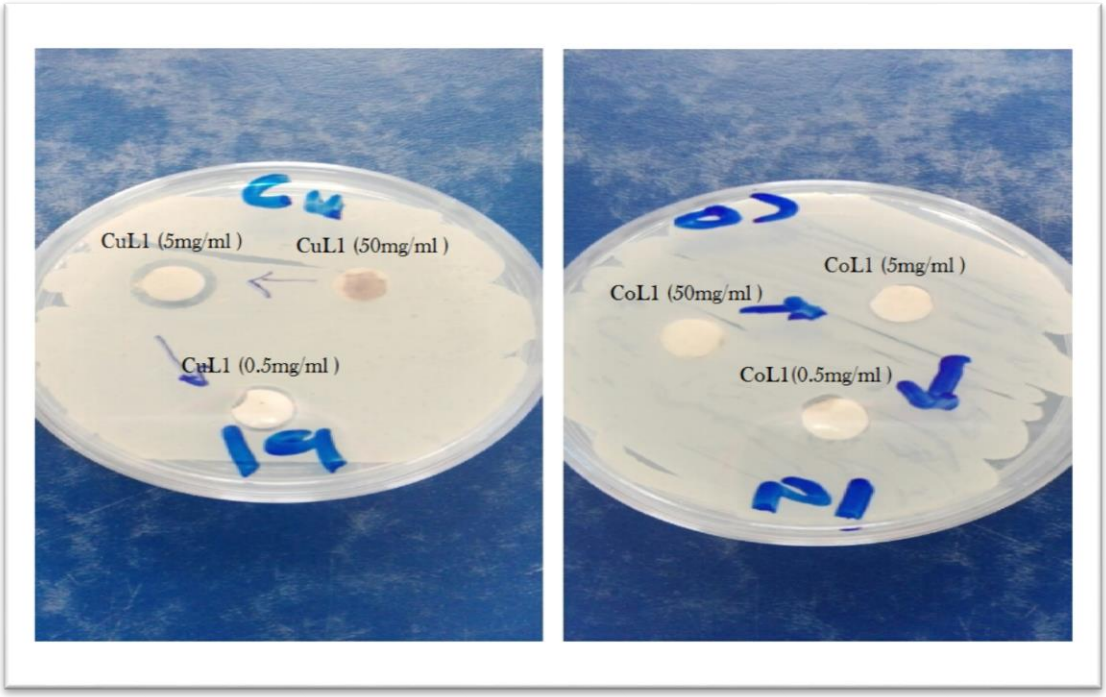
صورة (7) توضح ختبار تآزر CuL1 مع مضادات الحيوية

اختبار الحساسية البكتيريا ل DMSO و قواعد شيف الأزوية و مشتقاتها (L1 , FeL1 , NiL1 , CoL1 , CuL1) :

اوضحت نتائج اختبار الحساسية في الصورة (2)،(3) و الجدول (5) ان البكتيريا كانت مقاومة عند كل من (DMSO) و عند (L1) عند التركيز 0.5mg/ml و عند (FeL1) في التراكيز 5_0.5mg/ml و كذلك عند (NiL1) في كل التراكيز و (CoL1) في تراكيز 50_0.5mg/ml ربما يرجع السبب عدم تأثر البكتيريا بمشتقات القواعد في قلة تركيز المركبات المستخدمة او امتلاك البكتيريا صفة المقاومة الوراثية لهذه المركبات **(حريب ، 2009)** و كانت حساسة عند (L1) في التراكيز 5 mg/ml _ 50 و عند (FeL1) في التركيز 50mg/ml و عند (CoL1) في التركيز 5mg/ml اما عند (CuL1) فكانت حساسة في كل التراكيز قد يرجع سبب حساسيتها ان هذه المواد تكون ذوابة في الدهون و تتمكن من نفاذية عبر الغشاء و منع تخليق البروتين عندما تكون بتراكيز عالية تحتوي على سمية تثبط نمو البكتريا **(Thillaiarasu et al.,2015)** .



صورة (8) توضح اختبار الحساسية لقواعد شيف (L1, FeL1, NiL1)



صورة (9) اختبار الحساسية لقواعد شيف (CoL1, CuL1)

احيانا يكون تفاعل المضادات الحيوية مع القواعد متذبذبا ، فيعطى في بادئ الامر مع التراكيز منخفضة تفاعل تآزري ، ثم ينخفض التأثير الى حيادي او تضادي مع زيادة التركيز ، ثم يعود ليرتفع مرة اخرة مع ازدياد التركيز و هذه الظاهرة يمكن تفسيرها من الناحية الجزيئية كالاتي :

ارتباط القواعد مع المواقع الفعالة مما يزيد من فاعلية المضاد الحيوي ، تم ازدياد التركيز للقواعد عند نقطة معينة يحدث انخفاض مفاجئ في التأثير و ذلك لعدة احتمالات اما ان تكون القاعدة قد ارتبطت في الموقع المثبط للمضاد الحيوي او ارتبط جزئي واحد مع موقعيين احدهما مثبط و الاخر الموضع الهدف للمضاد الحيوي و بذلك منعت ارتباطه بالميكروب ، ثم يعود و يرتفع مرة اخرى تأثير المضاد الحيوي دليل علي زوال المؤثر المانع لتأثير المضاد و هو اما ان تكون القاعدة قد ارتبطت مع قاعدة اخرى او انفصلت من الموقع المثبط ، او يكون للقاعدة مع المضاد ارتباط قوي مع عدة مواقع بدل من موقع الهدف فقط **(فيصل ، 2017) .**

جدول (4) متوسط استجابة بكتيريا ***B.melitensis*** للمضادات الحيوية المستخدمة و تفاعلها مع قواعد شيف

رمز و تركيز المضاد	متوسط اختبار حساسية المضادات الحيوية	متوسط اختبار DMSO	متوسط استجابة البكتيريا للمضادات الحيوية المستخدمة و تفاعلها مع القواعد																	
			L1			FeL1			NiL1			CoL1			CuL1		
			50 mg	5 mg	0.5 mg	50 mg	5 mg	0.5 mg	50 mg	5 mg	0.5 mg	50 mg	5 Mg	0.5 mg	50 mg	5 mg	0.5 mg
S10	$16_{(2.9)}$	$15_{(1)}$	$17_{(2)}$	$17_{(2.6)}$	$16_{(3)}$	$15_{(1)}$	$14_{(1)}$	$14_{(0.7)}$	$15_{(1.5)}$	$14_{(2)}$	$14_{(2.9)}$	$15_{(2)}$	$15_{(2)}$	$15_{(1)}$	$15_{(2)}$	$15_{(2)}$	$15_{(1.7)}$
CN10	$20_{(2)}$	$19_{(3)}$	$22_{(0.7)}$	$21_{(0.7)}$	$21_{(2)}$	$20_{(2)}$	$21_{(3)}$	$21_{(2)}$	$20_{(4)}$	$21_{(2)}$	$21_{(2)}$	$21_{(4)}$	$20_{(2)}$	$20_{(3)}$	$20_{(4)}$	$21_{(2.9)}$	$21_{(2.6)}$
C10	$17_{(3)}$	$18_{(2.9)}$	$19_{(2.6)}$	$18_{(2)}$	$18_{(3)}$	$18_{(2)}$	$18_{(2)}$	$18_{(2)}$	$18_{(2.9)}$	$18_{(2.9)}$	$17_{(3)}$	$18_{(3)}$	$17_{(2.9)}$	$18_{(3)}$	$17_{(2)}$	$17_{(2.9)}$	$17_{(2.9)}$
MA30	$22_{(2)}$	$20_{(2)}$	$23_{(1)}$	$19_{(4)}$	$22_{(2)}$	$22_{(1)}$	$23_{(1)}$	$23_{(0)}$	$18_{(3)}$	$19_{(3)}$	$20_{(3)}$	$22_{(0)}$	$20_{(2)}$	$21_{(1.5)}$	$22_{(2.5)}$	$22_{(1.7)}$	$20_{(2)}$
VA5	$13_{(2)}$	$13_{(3)}$	$13_{(1.7)}$	$15_{(2.6)}$	$11_{(3)}$	$13_{(0.7)}$	$13_{(0.7)}$	$13_{(0.7)}$	$13_{(3)}$	$13_{(2)}$	$14_{(2.9)}$	$12_{(2.5)}$	$12_{(2.5)}$	$13_{(2.5)}$	$12_{(2)}$	$12_{(2.8)}$	$12_{(2.5)}$
DA2	$13_{(1)}$	$14_{(3)}$	$19_{(3)}$	$21_{(4)}$	$13_{(3)}$	$18_{(3)}$	$16_{(3)}$	$16_{(3)}$	$13_{(2.9)}$	$13_{(3)}$	$13_{(3)}$	$13_{(2.5)}$	$13_{(3)}$	$12_{(2.9)}$	$15_{(1.5)}$	$16_{(1)}$	$14_{(3)}$
P10	$16_{(3)}$	$20_{(4)}$	$14_{(2)}$	$15_{(3)}$	$15_{(1.5)}$	$12_{(2)}$	$21_{(1)}$	$20_{(1)}$	$9_{(4)}$	$19_{(4)}$	$19_{(5)}$	$8_{(4)}$	$16_{(3)}$	$16_{(3)}$	$19_{(3)}$	$17_{(3)}$	$17_{(1)}$
AMP10	$16_{(2.5)}$	$20_{(0.7)}$	$15_{(4)}$	$20_{(2)}$	$14_{(3)}$	$15_{(3)}$	$12_{(4)}$	$18_{(3)}$	$21_{(5)}$	$18_{(4)}$	$18_{(1)}$	$17_{(1)}$	$12_{(1)}$	$14_{(1.5)}$	$19_{(2.5)}$	$19_{(2)}$	$18_{(2.9)}$

ملاحظة :الوحدة المستخدمة في قياس هالة التثبيط هي الميليمتر . المتوسط المدرج في الجدول اعلاه يوضح متوسط 3 تكرارات . الرقم الموجود بين القوسين يوضح الانحراف المعياري .

جدول (5) يوضح اختبار تراكيز قواعد شيف

المركبات	التركيز بوحدة ملغم/ مل	استجابة البكتيريا لقواعد شيف
DMSO		R
L1	50mg/ml	3
	5mg/ml	14
	0.5 mg/ml	R
FeL1	50 mg/ml	8
	5 mg/ml	R
	0.5 mg/ml	R
NiL1	50 mg/ml	R
	5 mg/ml	R
	0.5 mg/ml	R
CoL1	50 mg/ml	R
	5 mg/ml	4
	0.5 mg/ml	R
CuL1	50 mg/ml	9
	5 mg/ml	7
	0.5 mg/ml	6

R = Resistance

الخلاصة :

تم في هذا البحث دراسة التأثير قواعد شيف الازوية التالية (L1, FeL1, NiL , CoL , CuL , DMSO) بالتركيز (50, 5 , 0.5 mg/ml) ، تم ايضا دراسة تأثير التآزري لقواعد شيف مع المضادات الحيوية (CN_{10} , S_{10} , C_{10}, MA_{30}, VA_5, DA_2, P_{10}, AMP_{10}) على عزلة البكتيريا *Brucella melitensis* .

حيث اوضحت النتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية ان البكتيريا كانت حساسة لكل المضادات المستخدمة في هذه الدراسة (CN_{10} , S_{10} , C_{10}, MA_{30}, VA_5, DA_2, P_{10} AMP_{10})

اما بالنسبة لاختبار الحساسية البكتيريا لDMSO و القواعد (L1, FeL1, NiL1, CoL1, CuL1) اوضحت النتائج ان البكتيريا كانت مقاومة لكل من DMSO و FeL1, NiL1, CoL1 في حين انها كانت حساسة لكل من L1, CuL1 .

و عند اجراء اختبار التآزري لDMSO مع المضادات الحيوية اعطت النتائج تآزرمع (C_{10}, DA_2, P_{10}, AMP_{10}) ، و تضاد مع (CN_{10} , S_{10}, MA_{30}) وحيادي مع (VA_5) .

اما بالنسبة لاختبار التازري L1 مع المضادات الحيوية فاعطت تآزر مع (CN_{10}, C_{10},) و تضاد مع (P_{10}) ، و تفاعل متذبذب مع باقي المضادات .

وفي اختبار التآزري لFeL1 مع المضادات الحيوية فقد اعطى تآزر مع(CN_{10},C_{10}, MA_{30}, DA_2) و تضاد مع (S_{10}) وحيادي مع (VA_5) اما باقي مضادات اعطت نتائج متذبذبة .

بينما اختبار التآزري لNiL1 مع المضادات الحيوية فاعطى تآزر مع (AMP_{10}) و تضاد مع (S_{10}, MA_{30},) اما باقي المضادات فاعطت نتائج متذبذبة .

اما بالنسبة لاختبار التآزري لCoL1 مع المضادات الحيوية فاعطت النتائج تآزر مع(C_{10}) و تضادي مع (S_{10}) اما باقي مضادات اعطت نتائج متذبذبة .

في حين ان اختبار التآزري لCuL1 مع المضادات الحيوية فاعطت النتائج تآزر مع (CN_{10}, DA_2, P_{10}, AMP_{10}) و تضاد مع (S_{10}, VA_5) وحياد (C_{10}, MA_{30}) .

و من هذه الدراسة نستنتج ان لقواعد شيف تأثير اما يكون تآزي او تضادي و احيانا لا تعطي اي تأثير (حيادي) و هذا يختلف بحسب المضاد الحيوي المستخدم و تركيز القاعدة ايضا، وبذلك اتضح اهمية قواعد شيف كمضادات ميكروبية .

التوصيات :

1. اجراء المزيد من الدراسات حول الموضوع و بشكل ادق و اكثر عمقا .
2. فهم اجراءات السلامة و الامان و اتبعاها بشكل صحيح لتجنب التقاط العدوى البكتيرية
3. اجراء المزيد من الدراسات على مركبات اخرى من قواعد شيف و مضادات حيوية اخرى لتوسيع معرفة فاعليتها البيولوجية .
4. تعامل مع المضادات الحيوية بشكل منتظم ومدروس ، لتجنب اكتساب البكتيريا صفة المقاومة ضدها .
5. العمل على اكتشاف و تحوير مضادات الحيوية جديدة تكون مضمونة الفعالية بحيث تقضي على الميكروبات .
6. إجراء دراسات تأكيدية حول المركبات التي كان لها تأثير سام على السلالات البكتيرية.

3.4 المصادر و المراجع

المراجع العربية :

1. **البياتي ، رضا ابراهيم، ملحم ، يحيي ، الصراف ،ساجدة ، (2005)**، تحضير قواعد شف جديدة مشتقة من 2,5 داي ميتوكسي بنزوفينونات ، جامعة المستنصرية - العراق.
2. **الثبيتي ، شعيل بن احمد، المسلمي ، السيد البدوي ، السلمي ،قنا عابد ، (2008)**، دراسة كيميائية فيزيائية علي بعض قواعد شف المشتقة من ادوية السلفا ، جامعة المملك عبدالعزيز - السعودية .
3. **الجراح ، (2007)** ، المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة في مدينة الرمادي ، مجلة جامعة الانبار لعلوم الصرفة ، العراق ، المجلد الاول ، العدد الاول .
4. **جميل ، سيف الدين،السنوسي ، مصباح الزروق (1993)** . كتاب الدراسة العلمية للبكتيريا و الفطريات ، الدار العربية للنشر و التوزيع ،القاهرة ، مصر الطبعة الاولى ، ص 125 – 129 .
5. **حريب ، نادية صادق مجيد ، (2009)** ، تخليق و تشخيص و دراسة الفاعلية الحيوية لبعض مشتقات البايرازول و الايزوكسازول الجديدة ، رسالة ماجستير ،قسم الكيمياء ، جامعة الكوفة ، العراق .
6. **خضر، داؤد سليمان ، الدليمي ، فاطمة ابراهيم سلطان ،(2008)** ، التأثير التثبيطي لمستخلصات نباتي الدردار و اليوكاليبتس و التآزر بين مكوناتها و المضادات الحيوية في جرثومتي Staphyiococcus aureus و Salmonella typhimurium المعزولتين من حالاتي تسمم ، مجلة التربية و التعليم ، موصل- العراق ، مجلد (21) ، العدد (3) ، 30- 40 .
7. **الخفاجي زهرة محمود (2008)**، التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزيئية) ، بغداد – العراق.
8. **داؤد، خالد محمود ، النعيمي ، كوثر حسين ، شريف ،اديبة يونس (2006)** ، تحضير ودراسة الفعالية التثبيطية ضد البكتريا لبعض معوضات 5-[N-مثيل نيكوتيناميدو]-1،3،4-اوكسادايازول-2-ثايول الجديدة ، مجلة القطرية للكيمياء ، قطر ، المجلد (24) ، العدد (9) ، 518-533 .

9. **سيالة، عبدالرؤوف حمودة (1990)** ، مذكرات في البكتيولوجيا العملية . Berne ، طرابلس – ليبيا.

10. **فيصل ، منال ، (2017)** ، دراسة الفاعلية البيولوجية لقواعد شيف الازوية مع بعض المضادات الحيوية على بكتيريا Salmonella typhimurium ، جامعة سبها ، ليبيا .

11. **الصميدعي ، غزوان حسن عبد الوهاب، حاجي ، سوسن حيدر، محمد ، خالد مطني ، (2014)**، تحضير ودارسة الفعالية البايولوجية لبعض المشتقات الجديدة من بس 3,1 اوكسالين ، مجلة جامعة النهرين العلوم ، العراق ، المجلد 17 العدد 3.

12. **الضميري ، ياسمين عزام ، وراد ، اسماعيل ، (2015)**، تحضير و تحليل و قياس النشاط ضد البكتيريا و ضد الأورام لمركبات مبتكرة مكونة من اتحاد قواعد شف مع ايونات العناصر الأنتقالية ، جامعة النجاح الوطنية - فلسطين.

13. **طلافحة ، مصطفي عارف، الطيار ، ابراهيم علي ، (2001)**، اساسيات علم الأحياء الدقيقة ، اربد دار الكندي للنشر و التوزيع ، اربد - الأردن.

14. **عبد البهادلي ، وداد علي ، مطرود ، سميرة عبد الكريم ،(2015)** - الفاعلية التثبيطية لمستخلص الثمار و الجذور لنبات الكراوية – مجلة جمعة بابل /العلوم الصرفة و التطبيقية / العدد (1) المجلد (23) ، 453-444 .

15. **مبارك ، عبير** ، ماذا تعرف عن الحمى المالطية ، (http://archive.aawsat.com/default.asp) ، 1/12/2017 .

16. **محمد ، سيد حسن ، (2015)**، محاولة ايجاد مضادات للأورام من مركبات البيرازولوبيريميدين و قواعد شف ، مجلة المركز القومي للبحوث ،العدد 1228 ، مصر.

17. **المفتي ، محمد محمد ، (1985)**، المضادات الحيوية، الهيئة القومية للبحث العلمي، طرابلس.

18. **منظمة الصحة العالمية ، (2014)** ، مقاومة مضادات الميكروبات ، مسودة خطة العمل العالمية بشأن مقاومة مضادات الميكروبات ، الدورة السادسة والثلاثون بعد المائة ، البند 8 – 1 .

19. **النعيمي ، محمد محمود ، عزوز عادل سعيد ، (2009)**، دراسة الظروف المثلي لتكوين بعض اصباغ الأزوايميين الفينولية الناتجة من مفاعلة 2,4-ثنائي هيدروكسي

بنزالدهايد و مشتقاته الأيمينية الأخري مع كاشف حامض السلفانيليك المؤزوت بدوال حامضية مختلفة ،مجلة التربية و العلم ،المجلد 22 العدد 2 ، العراق - الموصل .

المراجع الاجنبية :

1. **Akbolat N., Gul K., Pasa Sa., Temel H., Yesil O. F. and Yildiz A. (2012).** Antibacterial effect of some New Metal Complexes with Schiff Base Ligands on Gram-positive Bacteria (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative Bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*) , DUFED 1(1),123-28.
2. **Alferd , E. Brown (2001),** Benson's Micribiology Applications laboratory Manual in General Microbiology, Tenth edition, Mc Graw Hill, New York- U.S**.**
3. **Ali S. A., Khudir A.A. and Mahdi H. A. (2013).** Synthesis and study biologically activity of Some Schiff bases derived from O-vanillin , Salicyaldehyde with Some Metal Complexes by conventional and microwave assisted , Thi-Qar University - Iraq.
4. **Arvind J. M., Chopde H. N., Meshram J. S. and Pagadala R. (2010).** Synthesis, characterization and antibacterial activity of some novel azo-azoimine dyes of 6-bromo-2-naphthol , International Journal of ChemTech Research CODEN(USA) 2 (3), 1823-1830.
5. **Begley T. P. (2009).** Encyclopedia of Chemical Biology. Wiley.
6. **Boyer J. H., Morgan L. R., Chaudhuri A., Gillen L. E. and Wolford L. T.** (1990). Proc. SPIE 1203, 253–265.
7. **Dewick P. M (2002).** Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. Second Edition. Wiley.

8. **Ghanim H. T. and Majeed N. S. (2009).** Synthesis, Identification and Study the biological activity of some new derivatives of pyrazoles and isoxazoles , University of Kufa – Iraq.
9. **Jeffrey C.Pommerville (2002) ,** Foundmentals of Microbiology, Seventh edition. U.S.A .
10. **Kelode S.R. and Mandlik P.R. (2012).** Synthesis, Characterization and Antimicrobial Studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) Cr(III), Mn(III), Fe(III), VO(IV), Zr(IV) and UO (VI) with Tetradentate
Schiff base having N_2O_2 donor group "JOCPR", 4(9), 4181-4184.
11. **Lowy. F.D.; (1998)** Staphylococcus aureus infection-New Enland J.Med.339:520 .
12. **MADAN L.B. (2009) .** Microbiology and biochemistry , manglampublicayions , Delhi-India .
13. **Thillaiarasu .P , Kulandaisamy . A , Kavitha . T (2015)** , Synthesis spectroscopic characterization electrochemical and antimicrobial studies of Copper (II) , Nikel (II) , Cobalt (II) , Zink (II) and Oxovanadium (II) complexes derived form napthylidene-4-aminontipyrine and tryphan , International Journal of Innovative Research in Science,
14. Engineering and Technology , India , Vol.4 , Issue 12 , December 2015 , 1221-12231 .