وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص بكتريا

pseudomonas aeruginusa

من ترب ملوثة بالزيت واستجابتها للمضادات الحياتية

بحث مقدم الى مجلس كلية العلوم/ جامعة القادسية وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في قسم علوم الحياة

من قبل الطالبة

علياء حميد ياسين الحسني

بإشراف

الاستاذ : ديار خلف فليفل

١٤٣٧ هـ ٢٠١٦م

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة المجادله

الآية رقم : ١١

الإهداء

الى من جرع الكأس فارغا ليسقيني قطرة حب

الى من كلت أنامله لنا لحظة سعادة

الى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم

الى القلب الكبير (والدي العزيز)

.....

الى كل من في الوجود بعد الله ورسوله

الى سندي وقوتي وملاذي بعد الله

الى ينبوع الصبر والامل والتفاؤل

الى القلب الحنون (والدتي الغالية)

.....

الى من اثروني على نفسهم

الى من علموني علم الحياة

الى من اظهروا لي م اهو اجمل من الحياة

(أخوتي)

****

الى من كانوا ملاذي وملجئي

الى من تذوقت معهم اجمل اللحظات

الى من سأفتقدهم .. واتمنى أن يفتقدوني

الى من جعلهم الله اخوتي بالله .. ومن احببتهم بالله

.....(طلاب قسم العلوم).....

شكر وتقدير

لا بد لي وأنا اخطو خطواتي الاخيرة في الحياة الجامعية من وقفة اعود بها الى اعوام قضيتها في راحب الجامعة مع أساتذتي الكرام الذين قدموا لنا الكثير باذلين بذلك جهوداً كبيرة في بناء جيل الغد لتبعث الأمة من جديد ..

قبل ان أمضي اقدم اسمى ايات الشكر والامتنان والمحبة ألى الذين حملو اقدس رسالة في الحياة ..

ألى الذين مهدوا لنا طريق العلم والمعرفة ..

الى جميع أساتذتنا الأفاضل ..

(كن عالماً..فأن لم تستطع فكن متعلماً,فأن لم تستطع فأحب العلماء , فأن لم تستطع فلا تبغضهم)

وأخص با لتقدير والشكر:

د.ديار خلف فليفل

وكذلك كل من ساعد على أتمام هذا البحث وقدم لنا العون ومد لنا يد المساعدة وزودنا با لمعلومات اللازمة لأتمام هذا البحث ...

****

الملخص (Abstract):

جمعت 5 عينات من ترب ملوثة بالزيت لعزل بكتريا pseudomonas aeruginosa وتشخيصها في بيئات من Nutrient agar و Muller hinton لغرض تنميتها واستجابتها للمضادات الحيوية حيث اظهرت النتائج نمو المستعمرات بلون الاخضر او الاخضر المصفر والمحاطة بهالات متباينة القطر في ثلاث عينات فقط وقد تاكد تشخيصها في مستشفى الديوانية التعليمي العام على أنها تابعة لنوع pseudomonas aeruginosa كما بينت النتائج أن عزلات البكتريا التي تم الحصول عليها مقاومة للعديد من المضادات لأن بكتريا السيدوموناس من اكثر البكتريا مقاومة لأنها تفرز أنزيم البيتا لاكتيميز ..

الكلمات المفتاحية :عزل , تشخيص , بكتريا , pseudomonas aeruginosa , ترب ملوثة با لزيت , مضادات حيوية , مقاومة متعددة ...

الفصل الاول

المقدمة

المقدمة :

تعد بكتيريا *pseudomonas aeruginosa* من اكثر انواع البكتيريا استخداما على النطاق التجاري ، وتتبع هذه البكتيريا مملكة Bacteria و قسم *Gracillicutes* و صنف *Scotobacteria* و رتبة *Pseudomonadalas* و عائلة *Pseudomonadaceae* حسب تصنيف العالم Bergy (and Holt , 1994) و هي بكتيريا عصوية سالبة لصبغة كرام هوائية تنتشر بشكل عام في التربة و الماء و لها القدرة على انتاج اصغة ملونة (Pyocyanin) بلون اخضر مزرق و متألقة (Fluoarescein) او بلون اخضر مصفر و بني محمر Pyorubin ليس لها متطلبات نمو خاصة و درجة حرارة النمو المثالية ٣٧° م و تستطيع النمو حتى ٤٢° م .

تتميز بكتيريا P.aeruginosa بتطوير مقاومتها للمضادات الحيوية بسبب الاستعمال المفرط و الغير منظم لهذه المضادات الحيوية و عليه فإن ازدياد البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية تعد مشكلة الجميع في انحاء العالم خاصة بعد تزايد المشاكل المتعلقة بالبنسيلين و غيرها من المضادات الحيوية .

اصبح لزاما اختبار حساسيتها للمضادات الحيوية نظرا لتطور صفة المقاومة لديها . و عليه تناول هذا البحث دراسة استجابتها التي بينت انها مقاومة .

تعتبر المضادات الحيوية مواد عضوية تنتجها الكائنات الدقيقة كالبكتيريا و الفطريات اثناء نموها وهي قادرة بتركيز منخفض ان تبيد او تثبط نمو الكائنات الدقيقة غير الكائنات التي انتجتها . و كان البنسيلين هو اول اكتشاف في عالم المضادات الحيوية و كان عام ١٩٢٩ و قد توسع التعبير ليشمل المواد المشتقة التي تنتج بالتخليق جزئيا او كليا وهناك بعض المضادات الفعالة ضد انواع الاورام الخبيثة . مضادات واسعة المفعول (Broad

spectrum) و منها الامبسيلين و اخرى مضادات ضيقة المفعول (narrow spectrum) و منها الاريثرومايسين .
و يجب عند استخدامها ان تستخدم الاستخدام الصحيح لانها قد تضر :
١- يجب قبل البدء في المعالجة عمل زراعة جرثومية المسببة للمرض لمعرفة المضاد المؤثر لها.
٢- يجب استخدام المضاد الحيوي حتى الشفاء كاملا و غالبا من الاصابات البسيطة من ٥ -٧ ايام حتى لا يحدث عند الميكروب مناعة من الدواء المستخدم .
٣- مراعاة مدة تأثير الجرعة فالبعض يكون كل ٦ ساعات و البعض كل ٨ ساعات بالنسبة للدواء الذي يؤخذ عن طريق الفم و هي قصيرة المفعول
يمكن تقسيم عمل المضادات الحيوية الى :
١.مضادات حيوية تعمل على جدار الخلية البكتريا BACTERIAL CELL WALL:مثل البنسلين والسيفالو سبورين .
٢.مضادات حيوية تعمل على الجدار السايتو بلازمي CYTOPLASMIC MEMBRANE:حيث أنها تؤثر على خلية البكتريا وخلايا العائل ولذا فأن لها تأثير ضار على الخلية مثل البوليكسين .
٣.مضادات حيوية تعمل على تكوين البروتينات داخل الخلية : مثل الباروماسين واللنكوميسين .
٤.مضادات حيوية تعمل على حمض النيو كليك NYCLEIC ACID:مثل الرفيا مايسين والاكتينو ميسين.

الفصل الثاني

مواد البحث

وطرائقه

مواد البحث وطرائقه:

١. **جمع العينات : جمعت بشكل عشوائي 5 عينات من ترب ملوثة با لزيت بواقع ثلاثة مكررات من محافظة الديوانية وبوزن 200 غرام لكل عينة وحفظت العينات في مكان مظلم في عبوات بلاستيكية سعة 500 غرام لاجراء عملية العزل والغربلة عليها لاحقآ..**

٢. **بكتيريا *pseudomonas aeruginosa* agar لتنمية البكتريا المعزولة من الترب ولتحضير هذا الوسط .نأخذ البودر ونضع منه حوالي 50 غرام ونضيف عليه ماء مقطر 1 لتر ثم نضعه في autoclave لمدة 30 دقيقة ثم نستخرجه من autoclave ونتركه ليبرد ليصبح بدرجة حرارة تقريبا 50 م ثم نصبه في اطباق بتري ويضهر لنا با للون الاصفر ..**

٣. **تحضير التربة وعزل البكتريا pseudomonas aeruginosa:استخدمت طريقة نثر التربة وذالك بأخذ ٥،٠ غرام من كل مكرر من عينات الترب المذكورة سابقآ بعد مزجها جيدآ وتجفيفها هوائيآ وطحنها ومن ثم نثرها فوق طبق بتري يحوي وسط الـnutrint agar,حضنت الاطباق بواقع ثلاث مكررات لكل عينة في درجة حرارة 37م مدة اسبوع وبظلام مسمتر ومراقبتها يومين للحصول على مستعمرات ذات لون اخضر او اخضر مصفر الخاص با لبكتريا او بطريق تخفيف محلول التربة حيث تم وضع كمية 10غرام من التربة لكل مكرر ضمن دورق مخطوطي سعة 250مل يحوي على90مل من الماء المقطر المعقم ولقحت بطبق بتري فوق مستنبت الاكار المغذي ثم حرك الطبق حركة رحوية لضمان توزيع التخفيف على سطح المستنبت بحيث تم تحضير ثلاث اطبقاء لكل مكرر وتم التأكد من هوية هذه البكتريا من خلال انها نمطت بمستشفى الديوانية التعليمي العام ..**

٤.اختبار حساسية عزلات السيدوموناس للمضادات الحيوية :
اتبعت طريقة baur وجماعته لقياس حساسية السيدوموناس المختلفة لمضادات حيوية وفق الخطوات الاتية :

١.تحضير الوسط الزرعي : استخدام وسط (muller_hinton) لهذا الغرض . اذ حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة للوسط ثم عقم با لموصدة بعد ذلك برد الى درجة حرارة 45م ثم صب في الاطباق المعقمة وبعد تصلبه وضع في الثلاجة لحين استخدامه .

٢.تحضير عالق البكتريا : تم نقل مستعمرة واحدة نامية على وسط الاكار المغذي بواسطة ناقل الزرع الـloop الى انبوبة حاوية على 5مل من المرق المغذي المعقم ثم وضع في الحاضنة لمدة24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ثم خفف الزرع البكتيري با ستعمال المحلول الفسيولوجي الى التخفيف 100/1.

٣.تلقيح اطباق الاختبار : نقل 10/1 من الزرع البكتيري المخفف بواسطة mitropipette muller_hinton باستخدام الناشر بصورة متجانسة ثم تركت الاطباق حرارة الغرفة لمدة (10_20)دقيقة.

٤.وضع الاقراص : بواسطة ملقط معقم تم نقل اقراص مضادات حيوية باوعيتها الى سطح المزروع بعزلات السيدو موناس وضغط على سطح القرص بخفة حيث وضع 5 اقراص من المضادات الحيوية في كل طبق وتم اسنخدام طبقين لكل عزلة وتلافياً لحصول تداخل بين مناطق التثبيط فقد تركت مسافة بين قرص واخر ثم

حضنت الاطباق بوضع مقلوب على درجة حرارة 37م لمدة 24ساعة وقد شملت مضادات الحيوية المستخدمة وهى: streptomycin_neomycin _ rifampicin_erythromycin_gentamycin_ciprofioxacin_tetracyclin_lincomycin_chloromphenicol_nalidixc acid

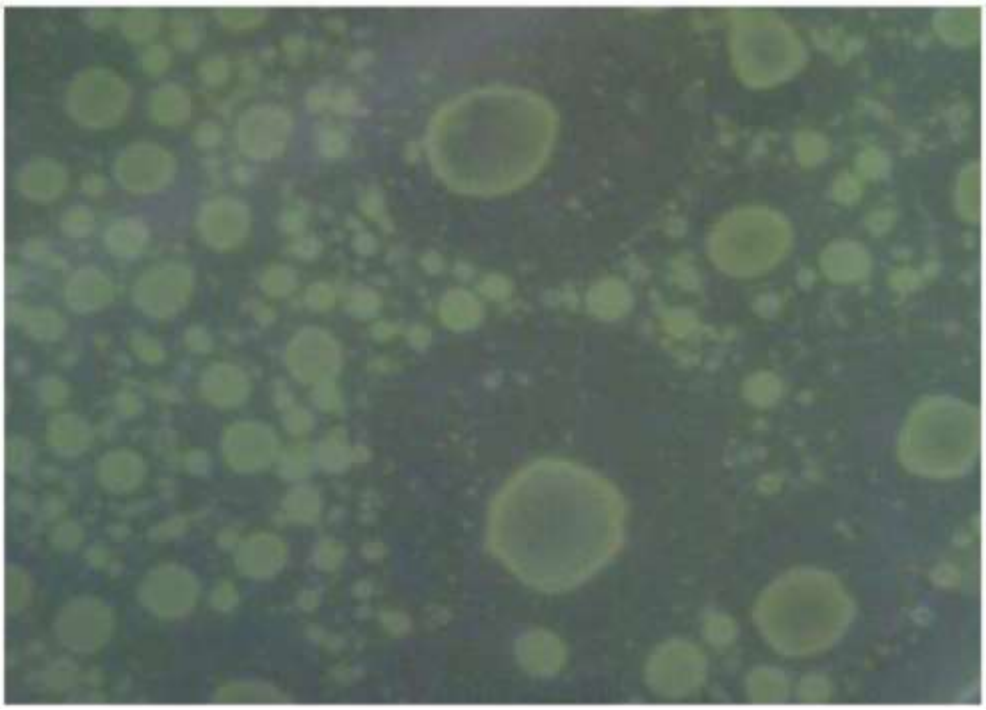
****

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

النتائج والمناقشة :

بينت نتائج فحص خمس عينات لترب ملوثة با لزيت على البيئة المغذية nutrient agar على نمو بعض المستعمرات البكتيرية من p.aeruginosa من عينات ترب محافظة الديوانية بعد ايام من التحضين بدرجة حرارة ٣٧م وبنسبة ٢٠% من العينات الكلية المدروسة في حين استبعدت عينات اخرى لم يظهر بها نمو في المستعمرات بشكل ملحوظ وقد تميزت المستعمرات الايجابية والنامية في الاطباق بلون اخضر او اخضر مصفر محاطة بهالة شفافة حولها ومتفاوتة في قطر هالتها وقد بين الفحص تحت المجهر مع صبغة كرام بانها بكتريا عصوية سالبة بصبغة كرام عرضها ٠,٥ الى ٠,٨ ما يكرون وطولها من ١,٥ الى ٣ مايكرون واكد تنميطها النامي في المزارع النامية وتشخيصها بواسطة api في مستشفى الديوانية التعليمي

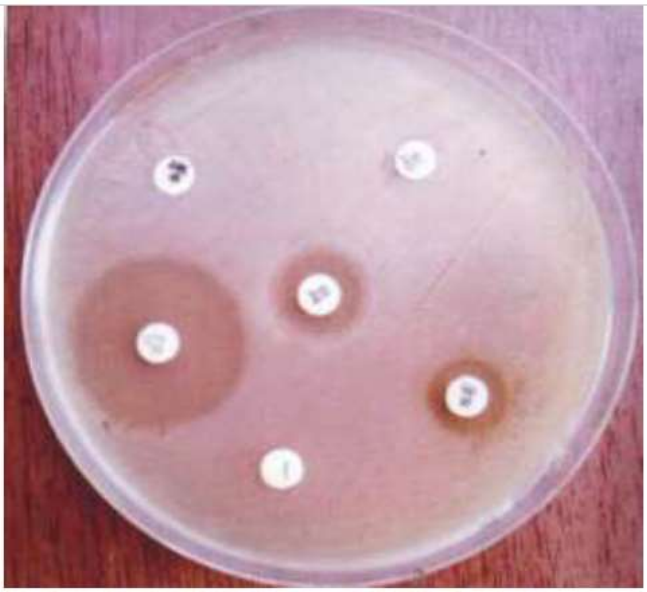


عند قراءة نتائج اقراص المضادات الحياتية وجد ان تم قياس(منطقة التثبيط) هي منطقة شفافة محيطة بالقرص المضاد الحيوي ومن ضمنها قطر القرص نفسه الخالية من النمو الجرثومي بالمليمتر بواسطة مسطرة مدرجة .

اوضحت نتائج اختبار خمس عزلات من p.aeruginosa التي تم الحصول عليها من مواقع ترب مختلفة تجاه مضادات حيوية مختلفة تباين هذه العزلات في حساسيتها لتلك المضادات اذ كانت جميع p.aeruginosa حساسة بدرجة عالية ١٠٠% للمضادين الحيويين gentamycin و ciprofloxacin ومن جانب اخر ظهرت هذه العزلات مقاومة عالية تجاه المضادات rifampicin , erythromycin , tetracyclin ويبدو من خلال النتائج هذه ان مقاومة هذه العزلات لهذه المضادات قد يكون بسبب انتشار العديد من البكتريا الخيطية في التربة وانتاجها للمضادات الحيوية الذي ادى الى امتلاك هذ العزلات للمقاومة بمرور الزمن كما قد تكون كمية الاقراص المستخدمة في الاختبار غير كافية لتثبيط هذه البكتريا او بسب المقاومة الطبيعية للعصيات السالبة لصبغة كرام للعديد من المضادات الحيوية مع العلم ان تراكيز هذه الاقراص هي من شركات عالمية ..

جدول (1) يوضح اقطار التثبيط القياسية للمضادات الحيوية عن :
(National Committee of Clinical Laboratory Standard) (NCCLS)

No	المضادات الحيوية antibiotics	التركيز ميكروغرام / قرص	قطر التثبيط بالمليمتر		
			حساسة	متوسطة المقاومة	مقاومة
1-	Ciprofloxacin	5	21	16-20	15
2-	Gentamycin	10	15	13-14	12
3-	Chloromphenicol	30	18	13-17	12
4-	Nalidixc Acid	30	19	15-18	14
5-	Tetracyclin	30	18	15-18	14
6-	Lincomycin	10	15	10-14	9
7-	Rifampicin	5	8	-	8
8-	Erythromycin	15	18	14-17	13
9-	Neomycin	30	18	13-17	12
10	Streptomycin	5	8	9	10
			29.6	33.3	37



صورة (1) : حساسية جرثومة Ps. aeruginosa المعزولة من الحالات المرضية للمضادات الحياتية.

صورة (2) حساسية جرثومة Ps. aeruginosa المعزولة من التربة للمضادات الحياتية

REFERENCES

1- Pallen , M.J ., Lam , A.C ., Antonio ,A., and Dunbar ,K.(2001).Tenvs, Microbial.9:97 – 101 .
2- Arpigni, J. L; Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. J. Biochem, 343, 177-183.
3- Bergey, N. R. and Holt, J. G. (1994). Bergey's Manual of Systematic
4- Bacteriology 9th ed. Williams & Wilkins Baltimore.Cardenas, J., Alvarez, E, de Castro-Alvarez M-S, Sanchez-Montero J-M,
5- Valmaseda M, Elson SW, Sinisterra J-V. (2001). Screening and catalytic
6- activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. J. Mol .Catal B: Enzym.;14:111–23.