وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بابل -كلية العلوم للبنات
قسم علوم الحياة

(التحري عن البكتريا السالبة لصبغة كرام في المياه واختبار حساسيتها للمضادات الحياتية)

بحث مقدم الي مجلس كلية العلوم للبنات /جامعة بابل
كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

تقدمت به الطالبات
ضحى ماجد صادق / ضحى زياد فاضل

(المرحلة الرابعة /قسم علوم حياة)

اشراف
أ.م.د. فاطمة معين عباس

١٤٤٤ ٢٠٢٣

بسم الله الرحمن الرحيم

(هُوَ الَّذِي بَعَثَ فِي الْأُمِّيِّينَ رَسُولًا

مِّنْهُمْ يَتْلُو عَلَيْهِمْ آيَاتِهِ وَيُزَكِّيهِمْ

وَيُعَلِّمُهُمُ الْكِتَابَ وَالْحِكْمَةَ وَإِن

كَانُوا مِن قَبْلُ لَفِي ضَلَالٍ مُّبِينٍ)

سورة الجمعة- الآية 2.

الاهداء

إلى من علماني ابجدية الوجود

امي وابي

وكُل من وقف معي وساندني بوجوده.

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على صادق الوعد الأمين وأهل بيته الطيبين الطاهرين ومن سار على هديهم إلى يوم الدين.

نتقدم بوافر الشكر والتقدير وفائق الامتنان إلى الدكتورة

أ. م . د فاطمة معين عباس لاقتراحها موضوع البحث والأشراف على انجازه ودعمها المتواصل لنا طيلة مراحل البحث دون أن تبخل علينا بالنصح والإرشاد .

كما نتقدم بجزيل الشكر والتقدير والامتنان إلى عمادة كلية العلوم , قسم علوم الحياة .

وأخيرا واجب الوفاء يحتم أن نتقدم بالتقدير والامتنان إلى كل من مد يد العون والمساعدة لنا لإتمام هذا البحث.

الخلاصة :-

تم خلال الدراسة جمع 10 عينات مياه من مصادر مختلفة للفترة من 2023/ 1/10 الى 2023/3/1.

تم نقل العينات الى المختبر مباشرة وزراعتها على الاوساط الزرعية الخاصة بالجراثيم البكتيرية بعد إجراء عملية الطرد المركزي للعينة .

اظهرت النتائج سيادة البكتريا السالبة 8(80%) لصبغة كرام مع عزلتين للبكتريا الموجبة لصبغة كرام 2(20%).

يتم فحص العزلات البكتيرية بطريقة كيربي باور لاختبار فحص الحساسية الدوائية تجاه بعض المضادات الحيوية وتميزت العزلات بمقاومة المضادات الحيوية المستخدمة

الفهرس

الموضوع	الصفحة
الخلاصة	5
1.1 Introductionالمقدمة	7
1.1.1 العائلة المعوية Enterobactriacea	8
2.1.1بكتريا *Escherichia coli*	8
Materials and methodsالمواد وطرائق العمل	11
2.2 طرائق العمل	12
3.3 النتائج والمناقشة	13
جدول (1) الانواع البكتيرية المعزولة من مصادر المياه	14
جدول (2) مقاومة الانواع البكتيرية للمضادات	14
4.4 التوصيات	15
5.5 المصادر	16

1.1 المقدمة :Introduction

منذ القدم والمياه تعد مصدراً مهماً لكثير من الأمراض الوبائية التي تشمل الجهاز المعوي أو التنفسي أو الأمراض الجلدية وغيرها والتي راح ضحيتها الملايين نتيجة الاستخدامات البشرية المختلفة لها وتمثل الأمراض المنقولة بالماء اكثر فئة من فئات الأمراض السارية التي تسهم في وفيات الأطفال في البلدان النامية بصورة خاصة حيث هناك أكثر من مليون ونصف حاله إسهال كل عام يذهب ضحيتها ملايين الأطفال دون سن الخامسة وبذلك تحتل المرتبة الثانية في معدل الوفيات العالمي بعد وفيات مرض السل في الكبار.(Gershon et al, 2004; Kummar, 2004; WHO, 2006 ; Nath et al, 2006)

تشكل الجراثيم المعوية إحدى أهم مسببات الأمراض المنقولة بواسطة المياه ولعل أبرز هذه الجراثيم وأكثرها انتشاراً جرثومة *E.coli* وكذلك بقية افراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae ولا سيما جرثومة Shigellaو Salmonella وغيرها ،وعلاقة تلك الجراثيم الملوثة ببعض الحالات المرضية المتزايدة وعلى رأسها مرض الإسهال لدى الأطفال والتي تسبب حوالي ثلث الوفيات من الأطفال دون سن الخامسة عالمياً(Nester et al., 2001 ; Brooks et al., 2004 ; Appenzeller et al., 2005)

البكتيريا سالبة غرام أو بكتيريا سلبية الغرام:-

(بالإنجليزية: Gram-negative bacteria) هي البكتيريا التي لا تحتفظ بصبغة الكريستال البنفسجي في بروتوكول صبغة غرام.

الفرق بين البكتريا الموجبة لصبغة جرام والسالبة

هو تركيب جدار الخلية الكيميائي حيث الموجبة لصبغة جرام تحتوي على أحماض أمنية أقل من السالبة لصبغة جرام و تحتوي مواد دهنية في البكتيريا السالبة لجرام أعلى من الموجبة لجرام , والجدار الخلوي في البكتيريا الموجبة لصبغة جرام أقل تعقيدا من البكتيريا السالبة حيث إن الجدار الخلوي في البكتيريا الموجبة لصبغة جرام تتكون من طبقتين وهما طبقة mucopeptide وتعرف بـــ peptidoglycan و الطبقة الثانية مكون من حمض Teicoic Acid , أما الجدار الخلوي للبكتيريا السالبة لصبغة الجرام تتكون من ثلاث طبقات هي طبقة mucopeptide وتعرف بـ peptidoglycan و طبقة دهنية سكرية lipo polysaccharidesو طبقة دهنية بروتينية lipo protein .

1.1.1 العائلة المعوية Enterobactriaceae

تضـم العائلة المعوية مجموعة كبيرة ومتباينة من الأنواع البكتيرية التي تعيش في امعاء الانسـان والحيوان بصـورة طبيعية. تكون افرادها عصـوية الشـكل، سـالبة لصـبغة كرام، لا هوائية اختيارية anaerobic facultative، يمكن لأفرادها ان تسـبب العديد من الامراض للإنسـان والحيوان منها اصـابات الجروح، الإصابات المكتسبة في المستشفياتnosocomial infections، اصابات الجهاز التنفسي respiratory infections ، اصـابات الجهاز البولي urinary tract infections و اصـابات الجهاز التناسـلي genital infections. (Oliveira et al., 2017)

وتمتلك عوامل ضـراوة مختلفة كالسـموم والإنزيمات، ايضـا تخمر مجموعة واسـعة من الكربوهيدرات و معظم افرادها مخمرة لسـكر اللاكتوز Lactose، كما انها تكون سـالبة لاختبار الاوكسـيديز oxidase، موجبة لاختبار الكتاليز catalase، لها القابلية على اختزال النترات nitrate الى النتريت nitrite لغرض انتاج الطاقة، معظمها تتحرك بوسـاطة الاسـواط flagella، غير مكونة للأبواغ و درجة الحرارة المثلى لنموها 36(Jawetz et al., 2016)

2.1.1بكتريا *Escherichia coli*

هـي احـدى افـراد العائلـة المعويـة Enterobacteriaceaeالسـالبة لصـبغة كـرام، عصـو يـة الشـكل، متحركـة او غيـر متحركـة، هوائيـة او هوائيـة اختياريـة ، facultative anaerobicمخمـرة لسـكر الالكتـوز lactoseواغلبهـا مخمـرة لسـكر الرامنـوز ramenoseوسـكر السـوربتول Sorbetole، منتجـة لإنـزيم β-glucoronidase، درجـة الحـرارة المثلـى لنموهـا (36-37)(al et Jawetz,. 2016 ; Wanger et al., 2017)

موجبـة لإختبـار الكتـاليز catalase وسـالبة لاختبـار الاوكسـيديز oxidase، منتجـة للانـدول indole وغيـر مسـتهلكة للسـترات citrate، موجبـة لاختبـار المثيـل الاحمـرmethyl red وسـالبة لاختبار الفوكس بروسكاور Vogase-Proskauer (Hemraj et al., 2013).

تعـيش بصـورة طبيعيـة فـي امعـاء الانسـان والحيـوان وهـي فـي الوقـت نفسـه بكتريـا انتهازيـة opportunistic pathogens، مسـببة للعديـد مـن الامـراض مثـل الاسـهال diarrhea، التهـاب السـحايا meningitis، تسـمم الـدم sepsis، تجـرثم الـدم bacteremia و تعـد مـن اكثـر الانـواع البكتيريـة المسـببة لاصـابات المسـالك البوليـة urinary tract infections (Hadi et al., 2014 ; شويخ وجاسم،)

تعـود إمراضـيه هـذه البكتريـا الـى امتلاكهـا العديـد مـن عوامـل الضـراوة ، ومـن هـذه العوامـل هـي هـي امتلاكهـا siderophores،و cytotoxic necrotizing factor ، وامتلاكهـا للتراكيـب السـطحية مثـل الاسـواط flagella والمحفظـة capsule و السـكريات المتعـددة الدهنيـة lipopolysaccharides (LPS)، التـي تمـنح البكتريـا صـفات مستضـدة وذلـك بإنتاجهـا والمستضـد somatic antigen O والمستضـد flagellar antigen H ايضـا تمتلـك الاهـداب

fimbreae او pilli التي تساعدها على الالتصاق في انسجة المضيف فتمنحها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي biofilm (Terlizz et al., 2017; Zowawi et al., 2015)

تتميز بكتريا *E. coli* بامتلاكها صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multidrug Resistance اذ تمتاز بمقاومتها العالية للمضادات الحيوية نتيجة امتلاكها انزيمات المقاومة مثل انزيمات البيتالاكتاميز β-lactamases التي تمنح المقاومة لمضادات β-lactams، والإنزيمات التي تمنح المقاومة لمضادات الامينوكاليكوسايد aminoglycosides و لمضادات الكينولينات quinolones. كما تمتلك هذه البكتريا اليات اخرى تمنحها المقاومة للمضادات الحيوية مثل تغيير نفاذية الغشاء الخلو ي، تغيير في الموقع الهدف، تثبيط تصنيع البروتينات وامتلاك البكتريا لمضخات الدفق efflux pumps، اذ تمنح البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية مثل مجاميع macrolides و novobiocin و rifamicn (Kapoor et al., 2017)

الفصل الثاني

(المواد وطرائق العمل)

2.2 المواد وطرائق العمل Materials and methods

المواد Materials

- **الأجهزة المختبرية Laboratory equipments**

الاجهزة	الشركة المصنعة
جهاز الطرد المركزي centrifuge	Daiham (South Korea)
كابينة الزرع laminar air flow (hood	Labtech (Korea)
مؤصدة autoclave	Webco (Germany)
مجهر ضوئي light microscope	Kruss (Germany)
ثلاجة refrigerator	Kelon (Korea)
ميزان كهربائي حساس sensitive electric balance	Denver (Germany)

الصبغات Stains

الصبغات	الشركة المصنعة
Gram stains	Switzerland

محاليل صبغة كرام

صبغة البنفسج البلوري stain violet crystal

صبغة السفرانين stain safranin

الايودين iodine

الكحول الاثيلي ethanol 96%

- **الاوساط الزرعية الجاهزة Ready- made culture media**

الوسط	الشركة المصنعة
Muller-Hinton Agar	Oxoid (England)
Nutrient agar	Oxoid (England)

- **مواد اخرى Other Materials**

اطباق بتري petri dishes

فلاسكات بيكرات انابيب flasks ,beakers ,tubes

ناقل loop

2.2طرائق العمل Methods

1.2.2 التصبيغ بصبغة غرام

تم تصبيغ العزلات البكتيرية بصبغة غرام وتم تصنيفها على اساس الصبغة الى موجبة لصبغة غرام واخرى سالبة لصبغة غرام

2.2.2 الحساسية الدوائية

يتم تحضير عالق بكتيري مساوي لكثافة (0.5) McFarland

يتم نقل 0.1 مل من العالق الى الوسط الزرعي Muller-Hinton Agar المحضر سابقا ووضعت اقراص المضادات الحيوية على الوسط الزرعي بواسطة ملقط معقم

حضنت الاوساط بدرجة حرارة 37 لمدة 18 ساعة

بعد استخراج الاطباق من الحاضنة تم مقارنة قطر التثبيط مع الارقام المثبتة في Clinical Laboratory Standard Institute Guidelines CISI (CISI,2010) لتحديد البكتريا المقاومة والحساسة

الفصل الثالث

(النتائج والمناقشة)

3 النتائج والمناقشة

تم خلال الدراسة جمع 10 عينات من مصادر مختلفة للمياه في مدينة الحلة للتحري عن البكتريا الملوثة للمياه وصفة مقاومتها للمضادات الحياتية

جدول (1) الانواع البكتيرية المعزولة من مصادر المياه

نوع البكتريا	العدد	النسبة المئوية %
بكتريا سالبة لصبغة غرام	8	%80
بكتريا موجبة لصبغة غرام	2	%20
العدد الكلي	10	%100

اظهرت النتائج وجود نسبة عالية من البكتريا السالبة لصبغة غرام 80% في حين كانت نسبة البكتريا الموجبة لصبغه غرام 20% وهذا يعود الى احتمالية تلوث مصادر هذه المياه بالبكتريا السالبة (نتيجة لرمي المخلفات المنزلية ، مخلفات المناطق الزراعية ،مخلفات المستشفيات ..)

جدول (2) مقاومة الانواع البكتيرية للمضادات

نوع البكتريا	نوع المضاد الحياتي							
	Ampicillin		**Amoxicillin clavulanic acid**		**Cefotaxime**		**Imipenem**	
	S	R	S	R	S	R	S	R
بكتريا سالبة لصبغة غرام	R		R		R		S	
بكتريا موجبة لصبغة غرام	R		R		R		R	

R:Resist

S: Sensitive

اظهـــرت نتـــائج جـــدول (2) المقاومـــة للمضـــادات الحياتيـــة والتـــي تـــم اختبارهـــا وكانـــت غالبيـــة العـــزلات ذات مقاومـــة عاليـــة لهـــذه المضـــادات وذلـــك نتيجـــة لكثـــرة اســـتخدام هـــذه المضـــادات فـــي المجـــال الســـريري وانتقـــال صـــفة المقاومـــة الـــى العـــزلات البكتيريـــة الملوثـــة للمصادر الطبيعية كالمياه

4 التوصيات

1 اجـراء العديـد مـن الدراسـات للكشـف عـن اسـباب زيـادة مقاومـة البكتريـا السـالبة لصـبغة غـرام المعزولة للمضادات الحيوية من خلال الكشف عن جينات المقاومة للمضادات الحيوية .

2 نشـر الـوعي الصـحي بـين المـواطنين حـول اسـتعمال المضـادات الحيويـة بـدون وصـفة طبيـة، لمنع ظهور السلالات البكتيرية المقاومة لها.

3 وضـع الحلـول للمخلفـات التـي يـتم رميهـا فـي الميـاه سـواء المخلفـات المنزليـة ، مخلفـات المناطق الزراعية ،مخلفات المستشفيات مخلفات المصانع وغيرها .

5 المصادر

المصادر العربية

- **الجبوري، محسن حمد ادهام. (٢٠٠٥). دراسة الدلائل الجرثومية للتلوث الاحيائي وبعض العوامل الفيزيائية والكيميائية المؤثرة عليها لمياه نهر دجلة ونهر الزاب الاسفل في منطقة الحويجة وتكريت. رسالة ماجستير، كلية التربية / احياء مجهرية ، جامعة تكريت**
- **لجبوري، محيميد مد الله. (١٩٩٠). علم البكتريا الطبية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.**
- **الرحالي، إبراهيم محمد خضر. (١٩٨٨). بعض مظاهر الاشريكية القولونية الممرضة للأمعاء المعزولة من أطفال مصابين بالأسهال وراقدين في المستشفى وأطفال طبيعين في دور الحضانة. رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة الموصل.**
- **الراوي، اميرة محمود والنعيمي ، اسامة محمد سعيد. (٢٠٠٢). دراسة على خط تلوث في نهر دجلة المار في مركز مدينة الموصل. مجلة علوم الرافدين، المجلد 15، العدد 5: ١١٨ - ١٢٦.**
- **الشريفي، حيدر مهدي و عبد الله، إبراهيم احمد. (٢٠٠٢). دور نمط المسكن وماء الشرب في انتشار الطفيليات المعوية بين تلاميذ عدد من المدارس الابتدائية في منطقة ريف محافظة التاميم. مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد ٨: ٨٣ - ٨٩**
- **الهاشمي، أنعام سامي نوح حيدر. (٢٠٠٢). مرضية جرثومة Citrobacter freundii وذيفاناتها المعزولة في بعض حالات الاسهال عند الرضع بمدينة الموصل. رسالة ماجستير، كلية العلوم / أحياء مجهرية ، جامعة الموصل.**
- **المشرقي، جلال حزام سعيد محمد. (2003). دراسة تشخيصية وامراضية على جرثومة Enterobacter aerogenes المعزولة من حالات الاسهال عند الاطفال الرضع ضمن مدينة الموصل. رسالة ماجستير، كلية العلوم/ الإحياء المجهرية ، جامعة الموصل.**
- **البوصالح، رواء ماجد دمحم.)4102(. التحري عن عوامل الضراوة لبكتيريا اشيريشيا القولون المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية وقياس نمط بعض الحركيات الخلوية لديهم . رسالة ماجستير . كلية العلوم \جامعة القادسية**
- **جعاز، وداد سمير وهميم ، سعد سلمان(. التنميط المصلي والكشف الجزيئي لبعض جينات المقاومة لجرثومة الاشيريشيا القولونية المعزولة من الأطفال المصابين بأخماج المجاري البولية في مدينة الناصرية . مجلة جامعة ذي قار.**
- **حران، عمر حسين التحري عن جينات المقاومة لمضادات البيتا لاكتام من البكتريا المعزولة من بعض الإصابات السريرية في الديوانية . رسالة ماجستير . كلية العلوم جامعة القادسية .**

- الخفـاجي، زهـرة محمـود التقنيـة الحيويـة الميكروبيـة)توجهـات جزيئيـة(. دار طباعـة . دمشق
- شـويخ، رحـيم صـبر و جاسـم فـرح علـي حميـد انـواع البكتريـا المسـببة الالتهابـات المسـالك البوليـة ومـدى مقاومتهـا للمضـادات الحيويـة فـي بعـض مستشـفيات بغـداد . مجلـة القادسـية للعلوم الصرفة
- الشويخ، رنا مجاهد عبد هللا المضادات الحيوية و استعمالاتها . دار دجلة الاردن

المصادر الاجنبية

- Abdelhamid, S. M. and Abozahra, R. R. (2017). Expression of the
- Fluoroquinolones Efflux Pump Genes Acra And Mdfa in Urinary Escherichia coli Isolates. PJM. 66(1):25-30.

- Abdu, A. ; Kachallah, M. and Yusuf Bolus, D. (2018). Antibiotic Susceptibility Patterns of Uropathogenic Escherichia coli Among Patients with Urinary Tract Infections in a Tertiary Care Hospital in Maiduguri, North Eastern, Nigeria. J .Biosci Biotechnol Discov. 3: 14-24.

- Abujnah, A. A. Zorgani, A. ; Sabri, M. A. M. ; El-Mohammady, H.; Khalek, R .A. and Ghenghesh, K. S. (2015). Multidrug Resistance and Extended-Spectrum β-Lactamases Genes Among Escherichia coli from Patients with Urinary Tract Infections in Northwestern Libya. Libyan J Med. 10(1): 26412-3402.

- Afzal, A. M. S. (2017). Antibiotic Resistance Pattern of Escherichia coli and Klebsiella Species in Pakistan: A Brief Overview. J Microb. Biochem. Technol .9.279-277 :(6)

- **Alav, I. ; Sutton, J. M. And Rahman, K. M. (2018). Role of Bacterial Efflux Pumps in Biofilm Formation. J Antimicrob Chemother. 1-18.**

- **Ali, I. ; Kumar, N. ; Ahmed, S. and Dasti, J. I. (2014). Antibiotic Resistance in Uropathogenic E. coli Strains Isolated from Non-Hospitalized Patients in Pakistan .J of Clin and Dia Res. 8(9): 1-4.**

- **Ali, J ; Rafq, Q. A. and Ratcliffe, E. (2018). Antimicrobial Resistance Mechanisms and Potential Synthetic Treatments. Future Sci. 4(4):1-6.**

- **Ibrahim, I. A.; Al-Shwaikh, R. M. and Ismaeil, M. I. (2014). Virulence and Antimicrobial Resistance of Escherichia coli Isolated from Tigris River and Children Diarrhea. Infect Drug Resist. 7: 317- 322.**

- **Jawetz, E.; Melnick, J. A. and Adelberg, E. A. (2016). Review of Medical Microbiology 27thed . McGraw-Hill education , Inc : 851pp.**

- **Levinson, W. (2016). Review of Medical Microbiology and Immunology. 14thed. McGraw-Hill education, Inc. PP 821.**