

## عزل بكتريا الزوائف الزنجارية من عينات سريرية مختلفة ودراسة تأثير صبغة

### البايوسيانين على بعض الجراثيم المرضية

تارا فخرالدين رحيم جاف<sup>1</sup> صلاح سلمان زين العابدين<sup>2</sup> نجدت بهجت مهدي<sup>3</sup>

كلية العلوم ، جامعة كركوك<sup>1,2,3</sup>

[Najdat\\_b@yahoo.com](mailto:Najdat_b@yahoo.com)<sup>3</sup>

[mts.m1963@gmail.com](mailto:mts.m1963@gmail.com)<sup>2</sup>

[tara.jaf2014@yahoo.com](mailto:tara.jaf2014@yahoo.com)<sup>1</sup>

تاريخ قبول البحث: 2016/3/23

تاريخ استلام البحث: 2015/10/26

### الخلاصة

جمعت 300 عينة سريرية من المرضى الراقدين والوافدين الى المستشفيات (آزادي التعليمي, كركوك العام, والأطفال العام) وبيواقع 140 عينة من الإناث بنسبة 46.6% و160 عينة من الذكور 53.3% ومن خلالها تم عزل (50) عزلة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* حيث 24 عينة وبنسبة 17.14% كانت تمثل الحالات الموجبة للزرع الجرثومي من الإناث و 26 عينة وبنسبة 16.25% تمثل الحالات الموجبة للزرع الجرثومي من الذكور. درست قابلية عزلات جرثومة *Pseudo.aeruginosa* على إنتاج البايوسيانين على الأوساط المختلفة وتبين أن 43 عزلة سريرية (86%) أنتجت صبغة البايوسيانين على الوسطين (*Nutrient agar, Muller hinton agar*) و30 (15%) أنتجت الصبغة على وسط *Macconky agar* و24 عزلة 48% على وسط *blood agar* . وتمت دراسة تأثير صبغة البايوسيانين على نمو عزلات جرثومية مرضية مختلفة إذ أظهرت النتائج بأن مجموعة الجراثيم الموجبة لصبغة كرام مثل *Staphylococcus aureus* كانت أكثر حساسية لصبغة البايوسيانين ولكن تقل تأثيرها

على مجموعة الجراثيم السالبة لصبغة الكرام *klebsiella pneumoniae, E.coli* عند نموها على وسط

*Muller hinton agar* أو *Nutrient agar*.

الكلمات الدالة : *Pseudomonas aeruginosa* ، البايوسيانين، المضادات البكتريا

## Isolate the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* from different clinical samples and study the effect of pyocyanin pigments of some pathogenic bacterial

Tara Fakhreddin raheem- Al-Jaff<sup>1</sup> Salah. S. Zain al-abdeen<sup>2</sup>

Najdat .B. Mahdi<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>College Of Science/University Of Kirkuk

<sup>1</sup>[tara.jaf2014@yahoo.com](mailto:tara.jaf2014@yahoo.com)

<sup>2</sup>[mts.m1963@gmail.com](mailto:mts.m1963@gmail.com)

<sup>3</sup>[Najdat\\_b@yahoo.com](mailto:Najdat_b@yahoo.com)

Received date:26/10/2015

Accepted date:23/3/2016

### abstract

Three hundred clinical sample were collected from patients admitted and comers to (Azadi Teaching, Kirkuk General, kidsGeneral) hospitals, 140 sample from females with percentage (46.6%) and 160 sample from male (53.3%), and through it found that 24 samples with percentage (17.14%) represented positive for bacterial growth in females and 26 samples with (16.25%) represented positive bacterial growth of male cases. The ability of *Pseudo. aeruginosa* to produce pyocyanin on various media were show that 43 clinical isolates of *Pseudo.aeruginosa* (86%) produced pyocyanin on two media (*Nutrient agar*, *Muller hinton agar*) and 15 (30%) produced the pigment on *Macconky agar* and 24 isolates (48%) on *blood agar*. While the effect of pyocyanin pigment on the growth of different pathogenic bacterial isolates the results showed that a gram positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* was more sensitive to the pyocyanin pigment than gram negative

*bacteria (E.coli, klebsiella pneumonia) when grown on Nutrient agar or Muller hinton agar.*

**Key word:** *Pseudomonas aeruginosa , pyocyanin , Antibacteria*

## **1. المقدمة ( Introduction )**

تُعد جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* من المسببات المرضية الانتهازية Opportunistic Pathogens واسعة الانتشار في الطبيعة بسبب امراضيتها للإنسان والنبات والحيوان, لهذه الجرثومة القدرة على العيش في بيئات متنوعة, فهي حرة المعيشة تعيش في المستنقعات البحرية ومياه الأنهار والتربة والمناطق الساحلية [1], تشكل خطرا حقيقيا على المرضى الراقدين في المستشفيات بشكل خاص والأشخاص المصابين بالحروق ومرضى السرطان وزراعة الأعضاء ومرضى نقص المناعة فهي احدى أهم انواع البكتريا المسببة لما يعرف بعدوى المستشفيات Nosocomial infection [2]. تستوطن هذه الجرثومة صالات العمليات و ردهات المستشفيات , والأدوات الجراحية وغيرها , كما يمكن لجرثومة *Pseud. aeruginosa* البقاء على المواد المطهرة وبعض المعقمات الجرثومية فهي قادرة على إصابة العديد من أنواع الأنسجة مما تسبب التهابات حادة ومزمنة لضحايا الحروق وكذلك ضعيفي المناعة والذين يعانون من التليف الكيسي من المرضى أكثر عرضة للإصابة بجرثومة *Pseudomonas aeruginosa*, إن الطيف الواسع من الأمراض التي تسببها الجرثومة يعتمد على إمتلاكها للعديد من عوامل الضراوة [3]. ان هذه الجرثومة تنتج الصبغة البايوسيانين وهي احدى الصبغات التي تنتجها *pseudo.aeruginosa* ذات اللون الأخضر المزرق وتركيبها الكيميائي ( Methylene-1hydroxy phenazine) والتي تقوم بتحطيم الالهاب الموجودة في الجهاز التنفسي [4] البايوسيانين تنتج خلال عملية الأيض metabolism وتكون ذات لون اخضر مائل الى زرق في الماء وتطرح خارج الخلية تنتجها بعض الاصناف من الزوائف الزنجارية عندما تنمو في المنابت الملائمة وتزداد قابلية ظهور هذه المادة عند الحضان على درجة (28-30)م° اذ ان البايوسيانين مثبط واسع المدى للجراثيم [5]. إن استعمال المضادات الحيوية بشكل واسع في علاج هذه البكتريا أدى الى تطوير المقاومة للمضادات الحيوية, والتي قد تكون سبب امتلاكها البلازميدات اذ ظهرت لها سلالات جديدة اكثر مقاومة للمضادات الحيوية وصعبة المعالجة [6]. لهذه الجرثومة آليات متنوعة من المقاومة , اهمها تغيير موقع الهدف وتغيير

نفاذية الغشاء الخارجي وإنتاج إنزيمات محطمة للمضادات الحيوية مثل إنزيمات B-lactamases التي تجعلها مقاومة للمضادات , Cephalosporins , Penicillins ان انتشار هذه الجرثومة في مختلف مناطق الجسم ,وتعرضها المستمر للمضادات الحيوية, أدى الى ظهور سلالات جديدة تمتاز بصفة تعدد المقاومة للمضادات الحيوية[7].وتهدف الدراسة الى عزل وتشخيص جرثومة *pseud.aeuginosa* من عدة مصادر سريرية واستخلاص صبغة البايوسيانين وتأثير الصبغة على نمو أنواع الجراثيم المرضية.

## 2.طرائق العمل (Materials and Methods)

### 1.2 جمع العينات السريرية

شملت الدراسة جمع 300 عينة من مصادر سريرية مختلفة(الحروق -الجروح -الادرار- البراز-المهبل) من كلا الجنسين ومن مختلف الفئات العمرية (1شهر -70 سنة) من الوافدين و الراقدين في مستشفى آزادي التعليمي ومستشفى كركوك العام و مستشفى الأطفال العام في مدينة كركوك للفترة من 2013/11/24 لغاية 2014/3/24.

### 2.2التشخيص الجرثومي Identification of Bacteria

للتشخيص الدقيق للأجناس الجرثومية تم إجراء عدد من الاختبارات والفحوصات وذلك للتأكد من نقاوة العزلات اعتمادا على الفحوصات المظاهر الزرعية والفحوصات المجهرية و الفحوصات الكيموحيوية مثل الاوكسيديز والكاتليزواختبار Imvic [9,8] وتم تأكيد التشخيص باستخدام نظام ( API20E ).

### 3.2 إختبار إنتاج البايوسيانين Pyocyanin Production Test.

زرعت جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* على وسط ( الأكار المغذي,أ كار الدم ,أ كار الماكونكي,أ كار المولر هنتون) للتعرف على تأثير الأوساط على إنتاج البايوسيانين بعدها حضنت الأطباق في 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة إن تلون الوسط باللون الأخضر المزرق يعطي دلالة ايجابية على إنتاج صبغة البايوسيانين [10].

### 4.2 تأثير صبغة البايوسيانين على أنواع أخرى من الجراثيم المرضية

زرعت خمس عزلات من *Pseudomonas aeruginosa* على وسط Nutrient agar لإنتاج الصبغة بعد الحضانة لمدة 24 ساعة كشتت الخلايا الجرثومية بواسطة شريحة زجاجية نظيفة وعرضت الأطباق للكوليفورم لقتل الخلايا المتبقية. بعد ذلك تم زرع بعض العزلات مثل *E coli*, *Staphylococcus aureus* وغيرها على سطح الوسط المعرض للكوليفورم ويستدل على فعالية البايوسيانين على هذه العزلات الجرثومية المرضية من خلال تثبيط نمو العزلات المرضية للتأكد من الفعالية زرعت مستعمرة من جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* في وسط Nutrient broth بعد 24 ساعة من الحضانة ثم سحبت الصبغة باستخدام Millipore filters ذات الأقطار (0.45m-0.22m) ثم شبت بها أقراص من أوراق ترشيح معقمة ذات أقطار ثابتة لمدة (3-5) دقائق وبعد ذلك زرعت الجراثيم الأخرى على الوسط الزرعى المستخدم ثم وضعت الأقراص بإستخدام ملقط معقم على الطبق المزروع وحضنت لمدة 24 ساعة بعدها تم قياس قطر التثبيط [11].

### 3. النتائج والمناقشة (Results and Discussion)

#### 1.3 جمع العينات

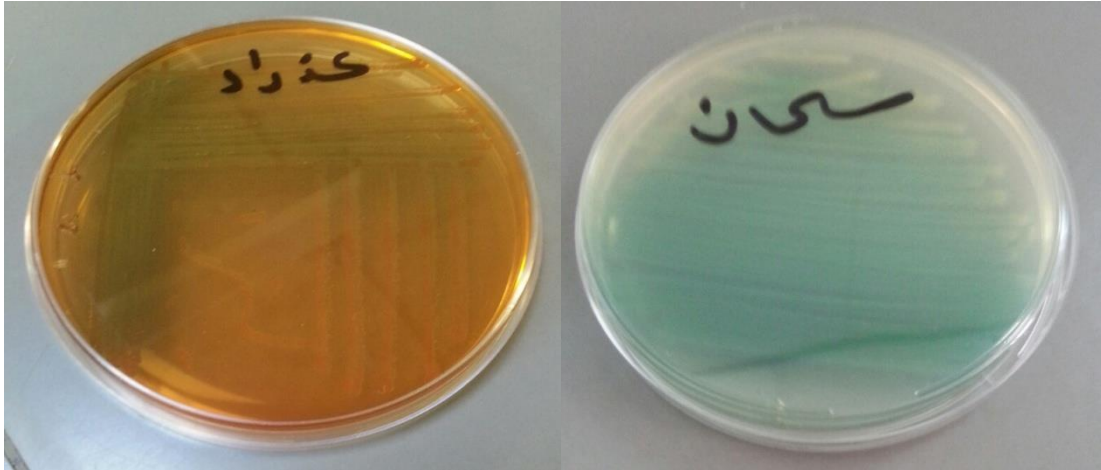
تم الحصول على 50 عزلة *Pseudomonas aeruginosa* من 300 عينة من مصادر السريرية مختلفة (الحروق، الجروح، الإدرار، عينات الدم، العينات البراز، مسحات المهبلية) إذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان الحصول على 16 عزلة من جرثومة *pseudo.aeruginosa* من الحروق 38% وهي اعلى نسبة تم الحصول عليها وهذه النتيجة انت نوعا ما قريبة من دراسة [12] والتي عزلت الجرثومة من الحروق بنسبة 48.5% من اخماج الحروق في حين ان الباحثة [13] عزلت هذه الجرثومة من عينات الحروق بنسبة 67.6%. ان التقارب والاختلاف في نسبة عزل الجرثومة من العينات قد تعزى الى اختلاف اماكن العزل أو قد تعزى الى التباين في جمع العينات التي تم جمعها من قبل الباحثين. ايضا اظهرت نتائج الدراسة الحالية الحصول على 12 عزلة من الجرثومة *pseudo.aeruginosa* من الجروح بنسبة 21% التي تم الحصول عليها وهذه النتيجة تقريبا تمثل نصف نسبة التي حصلت عليها [12] والتي عزلت الجرثومة بنسبة 41.4% من الأخماج الجروح ولم تتفق نتائجنا نتائج [14, 15] والتي كانت نسبة العزل في دراستها 68.2% وكذلك تم الحصول في الدراسة الحالية على 10 عزلات من جرثومة *pseudo.aeruginosa* بنسبة 20% من عينات الإدرار وهذه النتيجة لم يتفق

مع نتائج [16] بنسبة 51.1% الذين اوضحوا ان اعلى نسبة إصابة بالجرثومة في اخماج المسالك البولية بلغت 47% وبنسبة 51.1% جاءت حالات اخماج المسالك البولية بهذه الجرثومة في الدراسة الحالية بالدرجة الثالثة بعد حالات الحروق والجروح مما يدل على دور هذه الجرثومة في التهاب المسالك البولية خاصة لدى المرضى الذين يخضعون لعملية القثطرة وقد يعود الى عوامل الالتصاق التي تمتلكها هذه الجرثومة والتي تسهل عملية التصاقها بمواد القثطرة ومقاومتها للعديد من المضادات الحيوية [17]. ايضا تم الحصول على 8 عزلات من هذه الجرثومة وبنسبة 15% بالرغم من اشارته [18] الحصول على نسبة متقاربة مما حصلنا عليه إلا ان هذه النتيجة متوقعة كون عينات البراز المشمولة في هذه الدراسة هي من الأطفال المصابين بالاسهال بسبب كون هذه الجرثومة من الانواع الانتهازية وربما تردها هو اظهارها للقابلية الامراضية نتيجة لضعف المناعة في الاطفال الراقدين في المستشفى او نتيجة حصول عدوى المستشفيات بهذه الجرثومة [19]. ايضا تم الحصول على عزلة واحدة من عينات الدم بنسبة 20% من الجرثومة وهذه نتيجة تتفق مع دراسة [18] الذي حصل على عزلة واحدة فقط وغير متفقة مع نتيجة [20] اذ حصلت في دراستها على هذه الجرثومة بنسبة 9.62% وكذلك حصلت على 3 عزلات من مسحات المهبل وبنسبة 20% إذ أن هذه النسبة تكون غير متفقة مع دراسة [21] والذي عزل هذه الجرثومة بنسبة 0.4%.

### 2.3 إنتاج البايوسيانين pyocyanin production

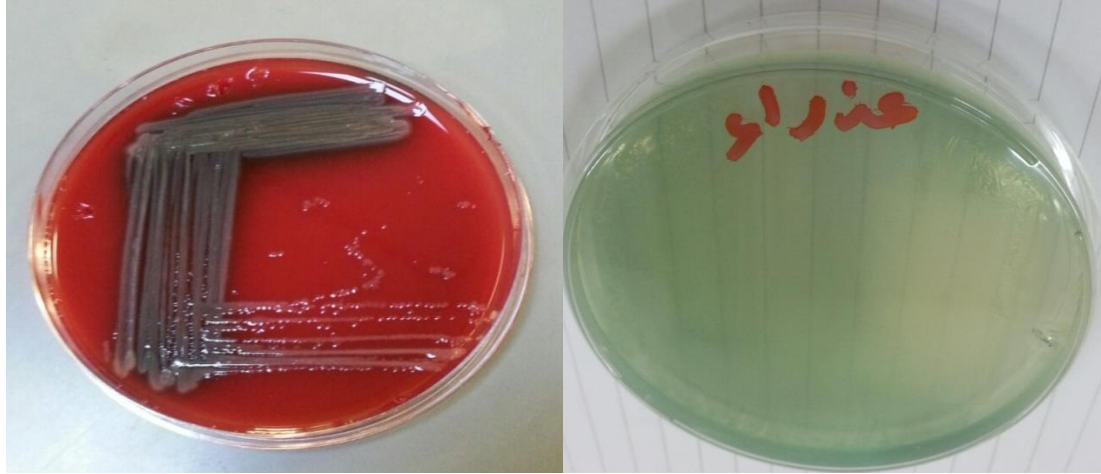
أظهرت النتائج المبينة في الصور (1) و(2) و(3) و(4) والجدول (1) بأن 43 عزلة سريرية من *pseudo.aeruginosa* (86%) أنتجت صبغة البايوسيانين على الوسطين (Muller hinton agar و Nutrient aga) و15 (30%) أنتجت الصبغة على وسط Macconky agar و 24 عزلة (48%) على وسط Blood agar, وهذه النتيجة مقارنة لما توصل إليه [11] ان أكثر العزلات إنتاجا للصبغة اثناء الدراسة هي العزلات الحروق وايضا كان اكثر الاوساط انتاجا لبايوسيانين هي الوسط Nutrient agar.





الصورة (2) إنتاج صبغة بايوسيانين  
على وسط MaConky agar

الصورة (1) إنتاج صبغة بايوسيانين  
على وسط Nutrient agar



الصورة (4) إنتاج صبغة بايوسيانين  
على وسط Blood agar

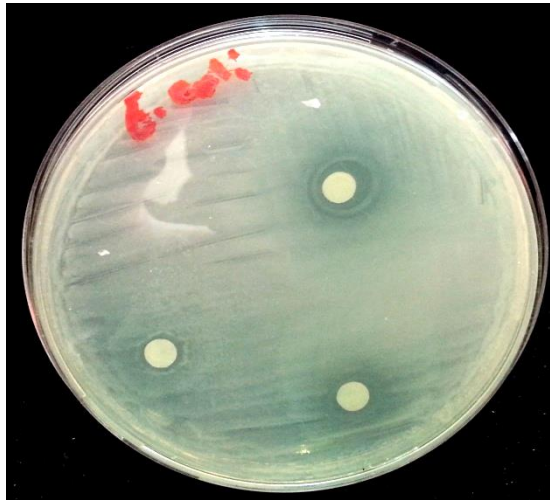
الصورة (3) إنتاج صبغة بايوسيانين  
على وسط Muller hinton agar

الجدول (1): إنتاج البايوسيانين من قبل *Pseudomonas aeruginosa* على الأوساط المختلفة.

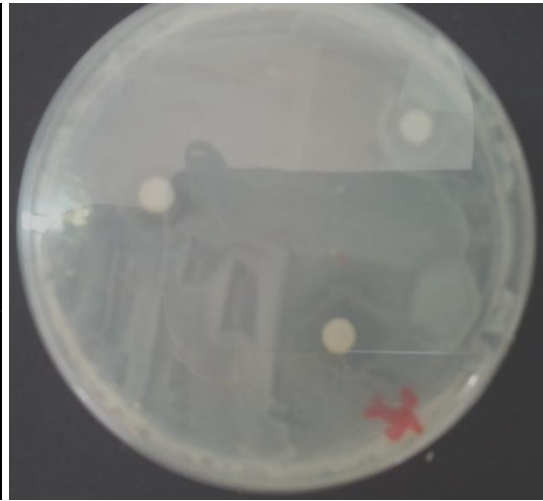
وسط Blood agar	وسط MacConky agar	وسط Muller hinton agar	وسط Nutrient agar	الأوساط العزلات
48%	30%	86%	86%	العزلات السريرية

3.3 إختبار حساسية بعض الجراثيم لصبغة البايوسيانين

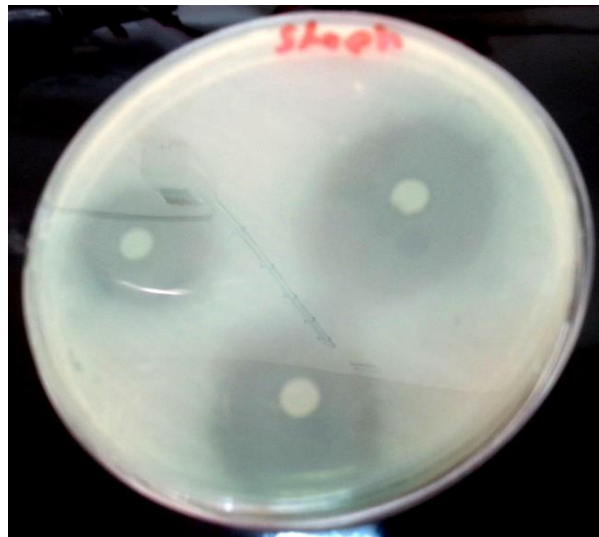
أظهرت النتائج المبينة في الصور (5) و(6) و(7) والجدول (3) أن جرثومة *Staphylococcus aureus* كانت أكثر حساسية عند زرعها على الوسط الزرعي Nutrient agar أو Muller Hinton agar الحاويتين على صبغة البايوسيانين في حين الجراثيم السالبة لصبغة كرام مثل *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae* و *Pseud.aeruginosa* كانت مقاومة لصبغة البايوسيانين. وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه الباحث [11] إن البايوسيانين هي مركبات فعالة حيث تثبط نمو جميع الجراثيم الموجبة لصبغة الكرام مقارنة مع الجراثيم السالبة.



الصورة (6): نمو بكتريا *E.coli* على وسط حاوي على صبغة بايوسيانين.



الصورة (5): نمو بكتريا *K.pneunoniae* على صبغة بايوسيانين وسط حاوي على صبغة بايوسيانين.



الصورة (7): نمو *staph.aureus* على وسط حاوي على صبغة بايوسيانين.



الجدول (2): يبين حساسية الكائنات الدقيقة لصبغة البايوسيانين .

الكائنات الدقيقة	عدد العزلات	Pseud 1	Pseud 2	Pseud 3	Pseud 4
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	S	S	S	S
<i>Escherchia coli</i>	4	S	S	R	I
<i>Klebsiella pneumonia</i>	4	R	R	I	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	R	R	R	R

4.المصادر (References)

[1] K. Todar. *Pseudomonas aeruginosa* . (2004)University of Wisconsin-Madison , Department of Bacteriology.

[2] جميلة راضي ، إسماعيل; بلسم ميرري المحنة ، سجي مهدي. دراسة البكتريولوجية لجرثومة *pseudo.aeruginosa* المعزولة من بعض الحالات المرضية في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال واختبار حساسيته لبعض المضادات الحياتية .المجلة الطبية البيطرية العراقية ,المجلد 33(2009). العدد 33.2

[3] R. T .Sadikot; T. S .Blackwell ; J. W. Christman and A.S. Prince. Pathogen- host Interactions in *pseudomonas aeruginosa* pneumonia .J.Respiratory in Critical care medicine (2005).vol 171:1209.

[4] G.M Denning;L.A.Wollenweber and M.A Railsback;cox,C.D L.L.Stoll and B.E.Britigan *pseudomonas* pyocyanin increases interleuking-8 Expression by human airway Epithelial cells.infect.immune,66,(1998),pp(5777-5784).

[5] W.Levinson Reviw of medical microbiology and immunology .macgraw-Hill(2004).

[6] N. M. Moore ; M. L. Flaws Epidemiology and pathogenesis. *Pseudomonas aeruginosa* infection.J.clinl lab science 24(1). (2011). Pp.(6-4).

[7] E.W. Koneman, S.D.Allen; W.M Janda ;P.C. Schreckenberger and W.C.J. Winn. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology.6thed. (2006).Lippincott William and Wilkins. Philadelphia.USA.

[8] B.A. Forbe; D.F Sahn, and A.S. Weissfeld.(2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology . 12<sup>th</sup> ed. .(2007)Mosby. Inc. St. Louis. USA ., Pp:166-167 .

[9] D. Greenwood; R. Finch; P. Davey; and M. Wilcox Antimicrobial chemotherapy . Oxford University Press, (2007). NewYork.

[10] E.B. Alfred Bensons Microbiological applications Laboratory Manual in general microbiology 9<sup>th</sup> ed. (2005). McGraw- Hill componies.

[11] W. A EL-Shouny; A. R. H. AL-Baidani and W.T. Hamza Antimicrobial Activity of pyocyanin produced by *pseudomonas aeruginosa* isolated from surigical wound-infections .J.Pharmacy and medical sciences 1(1). (2011). pp (2-3,4 ).

[12]خولة جبر خلف, المحمداوي. دراسة بروتين A-كعامل من عوامل ضراوة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من بيئات مختلفة مع التأكيد على الطبيعة الجزيئية الإنتاجية .أطروحة دكتوراه. كلية العلوم .الجامعة المستنصرية . (2006).

[13] الهام جواد كاظم ، بلال. التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز في العزلات السريرية في بكتريا الزوائف الزنجارية في مدينة النجف .رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات .جامعة الكوفة. (2010).

- [14] لهيب ,رجب حماد, المحمدي .عزل وتشخيص بكتريا *pseudo.aeruginosa* مع إمكانية رسم الخارطة الافتراضية لحركة هذه البكتريا بين المصادر المختلفة . رسالة ماجستير .كلية العلوم – جامعة المستنصرية. (2000).
- [15] A.F ,Orretti Antimicrobial susceptibility survey of P.aeruginosa strain isolated from Cilinical sources. J.Microbiol.96(8) .(2004). Pp(1065-1069).
- [16] A.T ,Olayinka., B. A, Onile and B. O , Olayinka. Prevalence of multi-drug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in surgical unit of Ahmadu Bello university Teaching hospital, Ziria, Nigeria: an indication for effective control measures . Annals of African Medicine. 3(1). (2004) Pp( 13-16).
- [17] J.S , AL-Bedri . Urinary tract infection in the medical city, teaching hospital. Diploma dissert, College of Medicin. Baghdad University.(1987).
- [18] كوكب إدريس محمود حسين، المشهداني. دراسة تشخيصية و أمراضية لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من المصادر المختلفة في مدينة الموصل . أطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة الموصل. (2004).
- [19] A. Guarino; G. Capano ; B. Malamisura ; M. Alessio; S . Guandalini and A. Rubino. Production of Eschericia coli STa - Like heat - stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 25(1). ( 1987 ). Pp( 110-114) .
- [20] A. K. Mane ; N. V. Nagde and V. R. Thombare. Study of Neonatal Septicemia in a Tertiary Care Hospital in Rural Nagpur. Department of Microbiology, NKP Salve Institute of Medical Sciences and Research Center and Lata Mangeshkar Hospital, Journal of Recent Advances in Applied Sciences (Jraas) 25. (2010). pp(19-24).



[21] رنا خالد أحمد غائب، الطريا. تأثير بعض المستخلصات النباتية في نمو جرثومتي *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* المعزولتين من مناطق مختلفة من جسم الانسان . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل . (2002).