عزل وتشخيص أنواع من الـ *Streptomyces* المنتجة للمواد المثبطة لبعض البكتيريا المرضية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية في مدينة كركوك

صلاح سلمان زين العابدين الجراح ، نجاة عبد القادر زمان ، صهيب صباح قاسم ألصالحي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة كركوك ، كركوك ، العراق

(تاريخ الاستلام: ١٦ / ١٢ / ٢٠٠٩ ---- تاريخ القبول: ١٣ / ١٢ / ٢٠١٠)

الملخص

عزلت وشخصت ستة عزلات من *الـ Streptomyces* (St.K6,St.K5,St.K4,St.K3,St.K2,St.K1) من التربة ومن مواقع مختلفة في مدينة كركوك وتبين أن خمسة من هذه العزلات قد أظهرت تأثيرا تثبيطيا تجاه نوعين من البكتيريا الممرضة *Streptococcus pyogenes* و *taphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية في حين لم تظهر أي تأثير تثبيطي على البكتيريا السالبة لملون كرام *Escherichia. coli* و *Proteus mirabilis* وكانت البكتريا الممرضة المعزولة من عينات سريرية تتصف بصفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، كما تبين أن العزلات الخمسة من *Streptomyces* تنتج المواد المثبطة عند تنميتها في الوسطين السائل والصلب.

المقدمة:

تعتبر الـ *Streptomyces* من الكائنات البدائية النواة وحيدة الخلية موجبة لملون كرام واسعة الانتشار في الطبيعة وتعود إلى عائلة Streptomycetaceae ضمن رتبة الـActenomycetales. و(١، ٢ و ٣).

غالبا ماتنتج هذه الكائنات غزلا دقيقا قد يكون متفرع وعلى نوعان ارضيا ويعرف Substrate mycelium بالغزل الارضي أو معقد تتضمن غزلا ارضيا وهوائيا .Arial mycelium ، ويتميز الغزل الارضي بكون قطره اصغر من الهوائي الذي يتجزءا مكونة ابواغا تختلف في الشكل والحجم فمنها الاسطوانية أو البيضوية وغيرها(٤، ٥)

تبدأ دورة حياة الـ *Streptomyces* في الوسط الغذائي الصلب بإنبات الابواغ ثم تكوين الغزل الارضي وتتبعها تكون الغزل الهوائي وهذه الأخيرة تتقسم بشكل منتظم من قمتها باتجاه الطرف الأدنى مكونة سلاسل من الابواغ التي تختلف باختلاف الأنواع فمنها القصيرة والطويلة التي تصل إلى ٥٠ بوغا في السلسلة الواحدة وتحاط الابواغ بغلاف ليفي مشكلا مظهرا مميزا لسطحها إذ تكون ملساءSmooth أو شوكيه ٍSpinyاوشعريةHairy أو تحتوي على زوائد Warty.(٦،٧).

تظهر الـ *Streptomyces* في الأوساط الزرعية الصلبة بشكل مستعمرات صلبة شديدة الالتصاق بسطح الوسط ألزرعي وان شكل المستعمرات وحجمها للنوع الواحد يعتمد على نوع وتركيب الوسط الزرعي وظروف التحضين (٨) أما في الأوساط السائلة وخاصة عند تحضينها في الحاضنات الهزازة تظهر المستعمرات بأشكال كروية صغيرة وهذا النوع من النمو يكون مرغوبا به في الصناعات التخميرية لسهولة فصلها من الوسط الزرعي الحاوي على المنتوج .وممكن أن تظهر بعض الأنواع عكورة في الوسط الزرعي السائل وقد يكون نتيجة للتحلل الذاتي أو لوجود العاثيات Actinophage (٩).

.إن الرائحة المميزة التي تنبعث من التربة تكون بسبب وجود الـ *Streptomyces* التي تنتج بعض المواد العطرية مثل Acelyaldehyde و Isobutanol و (٦,) أو لاحتوائها على مادة Geosmin التي يفرزها الغزل (١٠) من المنتجات الطبية لبعض أجناس الـ *Streptomyces* هي الـPolyketides المستخدمة في المجال الدوائي والتي تشمل المضادات الفطرية مثل الـNystatin والمضادات البكتيرية مثل الـTetracycline وبعض المضادات الطفيلية مثل الـAremectin إضافة إلى مواد مثبطة للمناعة Rapamycinومضادات سرطانية مثلDaunorubicin (١١) إضافة إلى إنتاج بعض الأنزيمات مثل Lipase و Cellulase و Protease(١٢ و ١٣).

تتميز الـ *Streptomyces* بكونها غير ممرضة للإنسان والحيوان ومع ذلك أشارت بعض المصادر الى عزل بعض الأنواع من الإنسان والحيوان مثل *Streptomyces malseusis* و *paranayensis Streptomyces* في حين هناك أنواع أخرى تسبب بعض الأمراض النباتية مثل مرض جرب البطاطا (١٤).

تهدف الدراسة الى عزل وتشخيص افراد من– *Streptomyces* المنتجة للمواد المثبطة لنمو بعض البكتيريا الممرضه ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ودراسة قابليتها على انتاج المواد المثبطة في الأوساط الزرعية الصلبة والسائلة.

المواد وطرائق العمل:

العينات:

جمعت العينات من ستة مواقع مختلفة في مدينة كركوك (الجدول١) ومن عمق ١٠ سم بعد إزالة ٣ سم من سطح التربة ونقلت العينات إلى المختبر في حاويات معقمة معدة لهذا الغرض وتم تصفية عينات التربة بنخلها في مناخل بقطر ٢ ملم مربع . وزن ١ غم من التربة ووضع في ١٠ ملليلتر من الماء المقطر والمعقم ومزج بشكل جيد وحضر منها سلسلة من التخافيف العشرية إلى حد التخفيف السادس واخذ ١ ملليلتر من التخفيف الأخير ووضع في طبق بتري معقم وصب عليه الوسط الزرعي Potato Dextrose Agar المعقم والمبرد إلى ٤٥ درجة مئوية وبواقع ثلاث مكررات لكل عينة. وتم

ISSN:1813 – 1662

اختيار الأطباق التي ظهرت فيها (٢٠ – ٢٠٠) مستعمرة واختيرت عدد من المستعمرات المفردة وأعيد زراعتها في وسط PDA للحصول على مزارع نقية (١ ، ١٥, ١٦)

الجدول(١) مواقع جمع عينات التربة ورمز العزلات

ت	الموقع	الرمز
١	طريق ليلان	St . K1*
٢	الحي العسكري الأولى	St.K2
٣	الحي العسكري الثانية	St.K3
٤	الجسر الثالث	St.K4
٥	حي ١ آذار	St.K5
٦	طريق بغداد	St.K6

St.k1:*Streptomyces* Kirkuke isolate code NO:1*

عزل وتشخيص بكتيريا الاختبار:

جمعت عينات البكتيريا من مختبرات مستشفى الأطفال في محافظة كركوك إذ تم الحصول عليها ومن نماذج مرضية مختلفة (الجدول ٢)

الجدول (٢) مصادر عزل البكتريا الممرضة قيد الدراسة.

ت	العينه	البكتيريا المعزولة	العمر
١	الحبل السري	*Staphylococcus aureus*	حديث الولادة
٢	اللوزتين	*Streptococcus pyogenes*	٥ سنة
٣	البراز	*Escherichia. coli*	١ سنة
٤	الادرار	*Proteus mirabilis*	٤ سنة

شخصت عزلات البكتيريا في مختبرات مستشفى الأطفال بشكل أولي وتم تأكيد التشخيص في مختبرات كلية العلوم وحسب الطرائق المتبعة في التشخيص(١٧، ١٨)

حساسية عزلات البكتيريا للمضادات الحيوية:

درست حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية اعتمادا على (١٩) وتم استخدام المضادات الحيوية الموضحة في (الجدول ٣)

الجدول (٣) أسماء وتركيز ومنشأ المضادات الحيوية المستخدمة

ت	اسم المضاد	الرمز	التركيز	المنشأ
١	Ampicillin	AmP	10 mcg	Bioanalyse
٢	Penicillin G	PG	10 mcg	Bioanalyse
٣	Erythromycin	E	15 mcg	Bioanalyse
٤	Tetracyclin	TE	30 mcg	Bioanalyse
٥	Augmontin	Amc	30 mcg	Bioanalyse
٦	Ciprofluxacin	Cip	5 mcg	Bioanalyse
٧	Azoerythromycin	Azn	15 mcg	Bioanalyse
٨	Cloxacillin	Cx	1.0 mcg	Bioanalyse
٩	Amoxacillin	Ax	25 mcg	Bioanalyse
١٠	Sulfamethoxazole	SMX	100 mcg	Bioanalyse

تنمية عزلات الـ*Streptomyces* في الوسط السائل:

زرعت عزلات الـ *Streptomyces* في دوارق بحجم ٢٥٠ ملليلتر حاوية على ١٠٠ ملليلتر من الوسط Trypton soy broth وحضنت في ٢٧ درجة مئوية لمدة ٢٥ يوم.

تنمية عزلات الـ*Streptomyces* في الوسط الصلب:

زرعت عزلات الـ *Streptomyces* في وسط PDA و Yeast malt extract ager (16) ووسط Moullar hinton ager (٢١) .

إختبار قدرة الـ *Streptomyces* لتثبيط عزلات الاختبار على الوسط السائل:

تم تنمية العزلات البكتيرية في الوسط Trypton soy broth وحضنت في ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة وحضر منها التخفيف 10^{-2} اخذ ٥ ملليلتر من المزارع السائلة لعزلات .Streptomyces ونبذت بسرعة ١٠٠٠0دورة / دقيقة(fisher scientific /USA)لحين الحصول على راشح رائق ثم أضيف١ ملليلتر من الراشح إلى أنبوبة تحتوي على ٤ ملليلتر من المزرعة البكتيرية المنشطة والمخففة إلى حد 10^{-2} وحضنت الأنابيب في ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة . إضافة إلى ذلك تم تشبيع أقراص من ورق الترشيح Watmman No.1 بالراشح ثم وضعت على سطح أطباق بتري حاويه على وسط MHA والمزروعة بالعزلات البكتيرية اعتمادا على(١٩)وحضنت في ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة (٢١).

إختبار قدرة الـ *Streptomyces* لتثبيط عزلات الاختبار على الوسط الصلب :

تم زرع عزلات الـ *Streptomyces* في الوسط (MHA) وحضنت لمدة أربعة أيام في ٢٨°م وبعد ظهور المستعمرات تم تلقيح العزلات البكتيرية المحضرة بشكل خط عمودي على الخط الأفقي لعزلات الـ *Streptomyces* وحضنت الأطباق في ٣٧ °م لمدة ٢٤– ٤٨ ساعة. (١٩، ٢١ و ١٦).

النتائج:

تم الحصول على ستة عزلات من الـ *Streptomyces* الجدول (١) وتم التأكد من تشخيصها اعتمادا على خصائصها الشكلية وعدد الابواغ التي كانت متعددة ووصلت إلى ٥٠ بوغا وتأكيدا للتشخيص أرسلت العزلات إلى جامعة الموصل لتاكيد التشخيص .

أظهرت نتائج دراسة حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية أنها تمتلك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (الجدول ٤)

الجدول(٤) مقاومة عزلات البكتيريا للمضادات الحيوية

عزلات البكتيريا	AM	P	E	TE	Amp	CIP	AZN	CX	AX	SMX
Streptococcus pyogenes	R	R	R	R	+	+	R	R	R	R
Staphylococcus aureu	R	R	R	+	R	R	R	R	R	R
Proteus mirabilis	R			R	R	+	R		R	R

Escherichia.coli	R			R	R	+	R		R	R

R= مقاومة ، + = حساسة

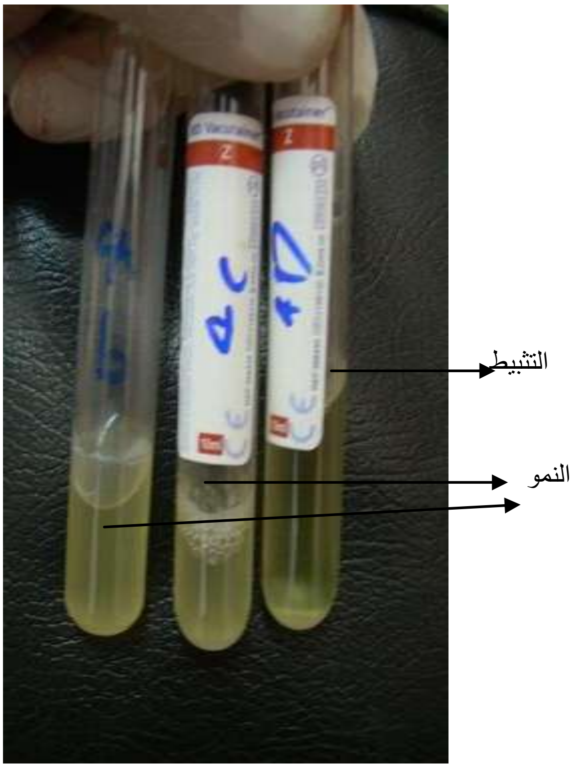
يظهر (الجدول ٥)والشكل (١) إنتاجية عزلات *Streptomyces* للمواد المثبطة في الوسط السائل إذ تبين أن راشح خمسة عزلات ثبطت نمو البكتيريا الموجبة لملون كرام *pyogenes Streptococcus* و *Staphylococcus aureus* في حين أن العزلة St.K5 لم تظهر أي تثبيطا من جانب أخر فان راشح عزلات *Streptomyces*الستة لم تظهر تأثير تثبيطي على البكتيريا السالبة لملون كرام والمستخدمة في هذه الدراسة . وقد ظهرت نفس النتيجة عند دراسة قابلية عزلات الـ *Streptomyces*علـى إنتـاج المـواد المثبطـة للبكتيريـا فـي الوسـط الصلب.شكل (٢).

الجدول (٥) الفعالية التثبيطية للبكتيريا في الوسط السائل والصلب

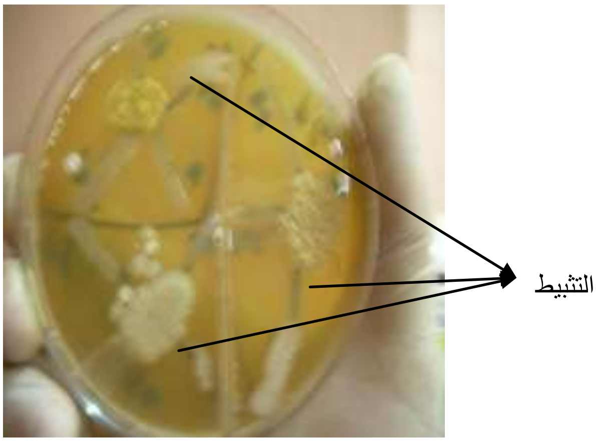
عزلات البكتيريا	عزلات *Streptomyces*					
	St.K1	St.K2	St.K3	St.K4	St.K5	St.K6
Staphylococcus aureus	+	+	+	+	_	+
Streptococcus pyogenes	+	+	+	+	_	+
Escherichia.coli	_	_	_	_	_	_
Proteus mirabilis	_	_	_	_	_	_

+ ايجابية الفعالية التثبيطية للـ Streptomyces للبكتريا في الوسطين السائل والصلب.

– سلبية الفعالية التثبيطية للـ Streptomyces للبكتريا في الوسطين السائل والصلب.



شكل (١) : إلتاثير التثبيطي لعزلات Streptomyces في الوسط السائل



شكل (٢): التاثير التثبيطي لراشح العزلات لمستعمرات *Staphylococcus aureus.*.

المناقشة:

تبين أن عينـات الترب التـي جمعت من المواقـع المختلفة فـي مدينـة كركوك كانت ذات محتوى من الـ*Streptomyces* (الجدول ١) كما تبين أن العزلات المؤشرة أمام كل موقع هي السائدة فيها .

تبـين أن نـوعي البكتريـا ألموجبـه لملـون كـرام والمسـتخدمة فـي هـذه الدراسـة *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes* والمتأثرة بمنتجات خمسة عزلات من الـ *Streptomyces* هـي مـن البكتريـا التـي تتصـف بصـفة المقاومـة المتعـددة للمضـادات الحيوية إضافة إلـى ذالك فان هذه العزلات البكتيرية تعتبر من العوامل الممرضـه حسـب مصـادر عزلهـا فـي المختبـرات الطبيـة (22) وان العديد من الدراسات السابقة استخدمت هذه الأنواع عند اختبار تأثير منتجات الـ *Streptomyces* على البكتريا ألممرضة (21 ، ٣، ١٦ و٢٣)

من خلال دراسة التأثير التثبيطي لعزلات الـ *Streptomyces* في الوسطين الزرعيين السائل والصلب تبين أنها تنتج المواد المثبطة لنمو البكتيريا المرضية المستخدمة في هذه الدراسة وفي الوسطين الزرعيين ، كما تبين اغلب التأثير كان ضد البكتيريا الموجبة لملون كرام *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes* وهذه النتيجة تتفق مع ما أكدته دراسة أخرى استخدمت الوسط الزرعي السائل(٢١) ودراسة أخرى استخدمت الوسط الصلب (١٦) . إضافة إلى ذلك أوضحت دراسة أجريت للحصول على المواد المثبطة للبكتيريا من عزلات *Streptomyces*أن هذه المواد تؤثر على البكتيريا الموجبة لملون كرام *Streptococcus pyogenes* *Staphylococcus aureus*)(٣) . من جانب أخر أظهرت إحدى الدراسات التأثير التثبيطي لبعض عزلات الـ *Streptomyces* ليس فقط على بكتيريا *Staphylococcus aureus* بل على Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA)(١٦).

بالرغم من عدم ظهور أي تأثير لمنتجات الـ *Streptomyces*المستخدمة في هذه الدراسة على البكتيريا السالبة لملون كرام إلا أن بعض الدراسات أشارت إلى تأثير منتجات بعض الـ *Streptomyces*على بعض البكتيريا السالبة لملون كرام (٢٤ ٢٥).

إن هذه الدراسة تعطي أفق لدراسات لاحقة للبحث عن أنواع من الـ *Streptomyces* المنتجة للمثبطات البكتيرية خاصة لتلك الأنواع من البكتيريا التي تتصف بصفة المقاومة للمضادات الحيوية وبالأخص المضادات الحيوية المتوفرة في الأسواق .

المصادر

1. Vercesi, A.; Nasini, G; and Locci, R.(1992) Biological and chemical characterization of the Antibiotic Activity of Streptomyces isolated from grapenvine carpevine carposphere. Actinomyces Vol. 3. No.1 .

٢. Holt ,JC.;krieg , N.R, Sneath, P.H.; Staley, J.T nd Williams, ST. (1994). Bergys manual of determination bacteriology.9th ed. Williams and Willkins Co. Baltimore.

3. ifaat, H.M. (2003) The biodiversity of Actinomycetes in the river Nile exhibiting antifungal activity .Journal of Mediterranean Ecology vol.4 NO.3-4.

٤. Waksman, S.A. (1976). The actinomycets: a summary of current knowledge. The roland oress Co; New York.

5. Farid ,M.A; EL. Diwany. A.I; and EL. Enshasy.H.A. (1996) Selection and characterization of high producing Rifamycins colony from Amycolatopsis mediterranei . Acta pharmaceutica Turcica (4) ,91-100.

6. Cross,T. and Good fellow. M. (1984) . Taxanomy and classification of the Actinomycetes. In (Sykes .G, and skinner, F.A eds.) PP.11-112. Actinomycetales, Characteristics and practical importance. Academic press, London .New York .

7. M. Zakir sultan.; Nazuin Arakhatune , Zakia Sultana Sathi , Md shah Alam Bhuiyan , M. Golam sadik , M.Akferuzzaman chondury , M.A. Gafur and Md. aziz Abdur Rahman. (2002). In vitro Antibacterial Activity of an Active Metabolite isolated from *streptomyces* species . Biotechnology , volum 1 No: 2-4: 100-106.

8. Gilberto ,H .(1983) Aspecds of the genomic organization in *Streptomyces* gluceseens .ph. D. Thesis. Swiesfedral institnte of technology Zaerich .

9. Todar , K. (2008) university of Wisconsin Madison Department of bacteriology .

10. Locci ,R. (1989). Streptomyces and related genera. In (Williams,T.T.; Showp ,ME. And Holt ,J. G eds) 4:2451-2508. Bergeys of manual of systemic bacteriology. Williams and wilkins co. , Baltimore .

11. Brantaset, T.; Sekurova, O.N.; Sletta .H.; Ellingsen, T.E.; Strom, A.R.; Valla, S. AND Zotchev, S.B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatine in *streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of gere cluster and deducation of the biosynthetic pathway . chem. Biol. , 7: 395-403 .

12. Petinate, S.D.G; Martins, R.M; Coelho, R.R.R; Meirelles, M.N.L; Branquinha ,M.H. and vermelho, A.B. (1999) Influence of growth medium in proteinase and pigment production by *Streptomyces caneus*. Mem inst oswaldo cruz , Riode Janeiro , vol . 94 (2):173 – 177.

13. Ravel,J.; Wellington, M.H. and Hill; R.T. (2000) Inter specific transfer of *streptomyces* inear plasmids in sterile amended soil micro organisms . Applied Environ microbial ., 66: 529-534 .

14. Chater , K.F; Hopwood,D.A; kieser ,T. A and Thompson T.C (1982) . Gene cloning *Streptomyces* ,Curr.Top.Microbial immunol : 95-96 .

15. Saadoun and F.AL-Momani.(1997). Streptomycetes from Jordan soils active agains Agrobacterium tumfaeiens . Actinomycetes. Vol.8 , part 1 and 2 .pp:29-36 .

16. Geylan,O; Okmen.G; and Uzgur .A.(2008) Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic – resistant bacteria .Eurasia J.Bio sci 2,73-82.

17. Baron ,E .J and finegold, S. M . (1990). Baily and Scotts diagnostic microbiology 8Th ed.the Mosby company .USA.

18. Colle, G.; Fruser, A. G.; Marmion, B.P and Simmons, G.;(1996).Makie and MeCatney-Practical Microbiology ,14th ed.New-york.

19. Baure, A.W.; Kirby,W.A.M; Sherris, j.S and Turk ,M. (1966) .antibiotic succeptibility testing by a standardized single disc methode. American -J . clini. Pathol . 45:493-496.

20. Krishna Kumari , K., ponmurugan ,p.and Kannan, N.(2006) Isolation and characterization of *streptomyces* sp. From soil samples for secondary metabolite production . Biotechnology 5(4): 478 -480 .

21. Patrick R. Murray. Ken S. Rosenthal, Gorge S. Kobayashi and Micheal A. Paller. (1998). medical microbiology. 3rd ed:481-483.

22. Valan, A. M. and Duraipandijan. V. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces Spp.* Er-3 isolated from westeren rock soil (India). Jornal of medical mycology Volum 19 :issue 1 ,March 2009 ;pp: 22-28

23. Mustafa Y. El -Naggar , Samy A. El-Assar and Sahar M. Abdul-Gawad. (2006). *Meropramyces Sp* . production by newly isolated *Streptomyces Sp* . strain MARO1: Taxonomy, Fermentation, Purification and structural Elucidation. The jornal of microbiology Aug P:432-438.

24. Salha H. M Alzahrani ,(2007) .Studies on the antimicrobial activity of *streptomyces Spp* isolated from jazan .JKAU :Sci ,Vol 19 .PP:127-138.

Isolation and Characterization Of Inhibitory materials Producing by *Streptomyces* sp in Kirkuk city against multiple antibiotics resistance pathogenic bacteria

Salah S . Zain-Al-abdeen Algarah , Najat . A . Zaman , Sohaib S. Al-salihi
Department Of Biology , College Of Science, University Of Kirkuk , Kirkuk , Iraq
(**Received:** 16 / 12 / 2009 ---- **Accepted:** 13 / 12 / 2010)

Abstract:
In this study six isolates of *Streptomyces* (St.K6,St.K5, St.K4, St.K3, St.K2, St.K1) were obtained from the soil in different area in kirkuk city . Five of these isolates showed antibacterial activity against two gram positive bacteria *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* and all these bacteria were isolated from different clinical sources and showed multiple antibiotics resistence . The results indicate that the *streptomyces* isolates showed antibacterial activity in both liquid and solid culture