التاثير البايولوجي لبعض مشتقات البنزوترايازول على جرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات مرضية وغير مرضية♦

محمد طه محمود عبد الرزاق خضر محمود

فرع العلوم الطبيةالأساسية/كلية التمريض قسم علوم الحياة/ كلية التربية

جامعة الموصل

Abstract

In this study, coagulase positive *staphylococci* bacteria were isolated and diagnosed from various environments represented by tonsilitis patients and healthy persons not affected with tonsilitis. The study samples includes university students, workers and the productive sections of Nineveh Drugs Factory. Bacterial isolated were diagnosed by using a number of biochemical test and Api Staph. System test to be conformed to the diagnosis.

The study also includes preparing some chemicals from benzotriazole derivatives and studying their inhibitory effect on bacteria and determining (MIC) and (MBC) of these compounds against the isolated bacteria, chemical compounds show various effects in bacteria according to its environment.

الملخص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جراثيم المكورات العنقودية الموجبة لانزيم مخثر البلازما Coagulase positive من اربع بيئات متباينة ، متمثلة بالمرضى المصابين بالتهاب اللوزتين والاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين من طلبة الجامعة والعاملين في مصنع ادوية نينوى وحيز الاقسام الانتاجية في المصنع المذكور . شخصت العزلات الجرثومية باستخدام عدد من الاختبارات الكيموحيوية ، وباستخدام اختبار Api staph . system للتاكد من صحة التشخيص . كما شملت الدراسة تحضير عدد من المركبات الكيميائية من البنزوترايازول ودراسة تاثيرها التثبيطي على الجراثيم قيد الدراسة ، وتحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز القاتل الادنى (MBC) لهذه المركبات ضد الجراثيم المعزولة ، وقد اظهرت المركبات الكيميائية تاثيرات متباينة في الجراثيم بحسب البيئة التي عزلت منها الجرثومة .

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4-5 أيلول 2007

المقدمة

تعد المكورات العنقودية *Staphylococcus* من اكثر الجراثيم انتشارا في الطبيعة ، اذ توجد على الجلد ، الاغشية المخاطية والقناة التنفسية العليا ، في الهواء والتربة ، تشكل هذه الجراثيم جزءا من النبيت الطبيعي Normal flora لجسم الانسان ، اذ يقدر الحاملين لجراثيم *S.aureus* في مقدمة مناخرهم بـ 40-50% لكنها تعد من الجراثيم التي يمكن ان تسبب اصابات خطيرة عند حدوث خلل اواضطراب في دفاعات جسم المضيف المناعية [1] . منذ اكتشاف البنسلين ودخوله حيز المعالجة الطبية في بداية الاربعينات من القرن العشرين وهو يكافح بنجاح جميع حالات الاصابة بالمكورات العنقودية وغيرها من الجراثيم ، لكن لم تمضي فترة طويلة على استخدام البنسلين حتى ظهرت جراثيم *S.aureus* المقاومة له وذلك من خلال قدرتها على انتاج انزيم الـ Beta – lactamase الذي له القدرة على شطر حلقة الـ B – lactame في تركيبه وتحويله من الشكل الفعال الى غير الفعال ، وبذلك اصبحت نسبة كبيرة من جراثيم *S.aureus* مقاومة للبنسلين بسبب انتاجها لانزيم البيتا – لاكتام [2] . ان ظهور وانتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين الجراثيم الموجبة لصبغة كرام بما فيها جراثيم المكورات العنقودية دفع العديد من المختصين بالكيمياء والاحياء المجهرية الى البحث المتواصل من اجل ايجاد مواد بديلة مضادة للجراثيم ، ومن تلك البدائل النباتات الطبية وما تحويه من مكونات فعالة اضافة الى تصنيع مواد كيميائية جديدة بحيث تستطيع ان تتغلب على المقاومة التي بنتها الجراثيم ضد المضادات الحيوية المتداولة[3]. وبالنظر للاهمية الكبيرة لمركبات الترايازول وتطبيقاتها الواسعة في المجالات البايولوجية والصيدلانية والزراعية والصناعية ، فقد نجح الباحثون في تحضير معوضات مختلفة لها ودراسة فعاليتها ، اذ اظهرت بعض مركبات الترايازول فعالية في تدمير الخلايا السرطانية وايقاف انتشار السرطان الى مناطق اخرى من الجسم وتحفيز خلايا النخاع لانتاج الهيموغلوبين [5,4] كما تدخل مشتقات الترايازول في تركيب بعض المضادات الحيوية مثل الريبافرين Ribavirin والذي يمتلك فعالية مضادة للفايروسات Antiviral [6] وقام Jantovaوجماعتة [7] بتحضير عدد من مشتقات4,2,1 ترايازول ودراسة تاثيراتها التثبيطية على عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 200 عينة من اربع بيئات مختلفة وبواقع 50 عينة لكل بيئة متمثلة بالمرضى المصابين بالتهاب اللوزتين الحاد الوافدين الى المستشفى (مع الاخذ بنظر الاعتبار انقطاعهم عن اخذ المضادات الحيوية لمدة ثلاثة ايام) ، والاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين

(طلبة الجامعة / المرحلة الرابعة) ، والاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين (العاملين في مصنع ادوية نينيوى) وحيز الاقسام الانتاجية في مصنع ادوية نينوى واستخدمت لجمع العينات ماسحات قطنية معقمة (Cotton swab) وباستخدام وسط نقيع المخ والقلب Brain heart infusion broth كوسط ناقل للعينات لحين جلبها الى المختبر وبفترة زمنية لاتتعدى الثلاث ساعات .

الزرع والتشخيص

تم زرع العينات على اطباق حاوية على وسط اكار الدم Blood agar وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 18-24 ساعة وبعد ظهور النمو تم اختيار المستعمرات المنفردة ذات المواصفات المطلوبة واعيد زرعها على وسط اكار المانيتول الملحي ،وبعد ظهور النمو اخذت مستعمرات منفردة وشخصت بالاعتماد على الصفات المزرعيه والاختبارات الكيموحيوية التي شملت اختبار تجلط البلازما والانزيم المحلل للحامض النووي ،اختبار تخمر المانيتول ،الكاتاليز ،تميع الجيلاتين بالاضافة الى التشخيص باستخدام نظام Api Staph System.

تحضير المركبات الكيميائية

حضر في هذه الدراسة اربعة مركبات كيميائية من مشتقات البنزوترايازول لغرض اختبار تاثيرها على الجراثيم قيد الدراسة وتم تحضير هذه المركبات في مختبرات علوم الكيمياء والمركبات هي :N (2-كلورو ،4 مثيل فنيل) ازو 5 -كلوروبنزوترايازول (C1)، N (فنيل) ازو 5-كلوروبنزوترايازول (C2)، N(باراهيدروكسي فنيل) ازو5 - كلوروبنزوترايازول (C 3) ، N -فنيل ازوبنزوترايازول (C 4) [8].

اختبار الفعالية المضادة للمركبات الكيميائية المحضرة على الجراثيم قيد الدراسة

اختبرت الفعالية المضادة للمركبات الكيميائية المحضرة باتباع طريقة [9] لاختبار حساسية الجراثيم وذلك باضافة 1 سم^3 من كل تركيز من المركب الى قنينة حاوية على 100 قرص معقم ، ثم ثبتت الاقراص بطريقة معقمة على اطباق حاوية على الاكار المغذي Nutrient agar والملقح بالجراثيم وحضنت بدرجة 37مْ لمدة 18-24 ساعة وبعد انتهاء فترة التحضين تم قياس اقطار المناطق الخاليه من النمو حول القرص ومقارنتها مع المضادات الحيوية القياسية المستخدمة واختيرت مضادات لها تاثير قاتل على الجراثيم من نوع Tetracycline (30µg) ، Chloramphenicol(30µg) و Gentamicin (10µg) كعينة سيطرة موجبة للجراثيم وحسب توصيات منظمة الصحة العالمية .

تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز القاتل الادنى (MBC) للمواد الكيميائية المحضرة على الجراثيم قيد الدراسة

تم تحديد التركيز المثبط الادنى لنمو الجراثيم للمركبات الكيميائية المحضرة (C4 - C3- C2- C1) باستخدام طريقة العكارة ، وذلك بتحضير التخافيف الاتية من كل مركب (20,10,5,2.5,1.25,0.0625,0.312)ملغم /سم3 وذلك باضافة 0,1 سم3 من كل تركيز من المركب الى انابيب حاوية على 9,8 سم^3 مرق مغذي معقم بعدها لقحت الانابيب بـ 0,1 سم^3 من المعلق الجرثومي الذي يعادل 10^8 خلية/ سم^{3}بالمقارنه مع انبوب السيطره وبواقع ثلاث مكررات لكل عينة ، وتم استخدام جهاز مقياس الكثافة الضوئية Spectrophotpmeter نوع Series Cecil 1021 , 1000 عند طول موجي 595 نانوميتر في هذا الاختبار واعتبر اقل تركيز من المركب يمنع نمو الجراثيم نهائيا هو التركيز الادنى المثبط MIC [10]وذلك بالمقارنة مع انبوب السيطرة الحاوي على 9,8 سم^3 مرق مغذي مضافا له 0,1 سم^3 من المعلق الجرثومي و 0,1 سم^3 من كل تركيز من المركب .في حين تم تحديد التركيز القاتل الادنى MBC للمركبات الكيميائية عن طريق اعادة زرع الانابيب التي لم تظهر نمو والتي اظهرت نمو قليل بطريقة العكارة وذلك بسحب 0,1 سم^3 من العالق الجرثومي لكل انبوب ونشره على سطح اطباق حاويه لوسط الاكار المغذي ثم حضنت الاطباق بدرجة 37مْ لمدة 18_24 ساعة ، قيم MBC اخذت من الاطباق التي لم تظهر نموا جرثوميا بعد انتهاء فترة التحضين [11].

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات ومعالجتها احصائيا باستخدام تحليل التباين واختبار دنكن للمقارنات البعدية عن طريق تشغيل برنامج SPSS للتحاليل الاحصائية .

النتائج والمناقشة

عزلت جرثومة *S. aureus* باعلى نسبة 75% من المرضى المصابين بالتهاب اللوزتين ، وجاءت هذه النتيجة قريبة لما توصلت اليهاالصفاوي [12]اذ عزلت جرثومة *S. aureus* بنسبة 78,6% من المرضى المصابين بالتهاب اللوزتين ، ولم تتفق مع النتائج التي حصلت عليها [13] اذ بلغت نسبة عزلها لجرثومة *S. aureus* من المرضى المصابين بالتهاب اللوزتين بـ 7% ، وقد يعزى ذلك الى الاختلاف في الفترة الزمنية التي جمعت فيها العينات اضافة الى احتمال تناول المرضى للمضادات الحيوية الامر الذي يؤدي الى التغاير في عزل أعداد الجراثيم وفق الظرف المعين . وفي هذه الدراسة عزلت جرثومة *S. aureus* من الاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين من طلبة الجامعة بنسبة 36% وبنسبة 57% من

الاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين من العاملين في مصنع ادوية نينوى ، واختلفت هذه النسب الى حد ما مع ما توصلت اليهAbdul-Rahman [14]عند عزلها جرثومة *S. aureus* لمجموعة من الاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين .

يوضح الجدول 1 الخواص الفيزيائية للمركبات الكيميائية المحضرة ، بعد تحضير المركبات الكيميائية اختبرت تأثيراتها على العزلات الجرثومية قيد الدراسة وباستخدام طريقة الانتشار بالاقراص ، حيث أظهرت المركبات الكيميائية تاثيرات متباينة على العزلات الجرثومية ، واختلف هذا التاثير بحسب نوع المركب الكيميائي والتركيز المستخدم اضافة الى البيئة التي عزلت منها الجرثومة .

جدول (1) . الخواص الفيزيائية للمركبات الكيميائية المحضرة قيد الدراسة

اسم المركب	رمز المركب	درجة الانصار / مْ	النسبة المئوية للناتج %	مذيب التبلور
N (2 كلورو ، 4 مثيل فنيل) ازو 5 –كلورو بنزوترايازول .	C1	137-130	52,6	Ethanol
N (فنيل) ازو5 – كلورو بنزوترايازول .	C2	162-160	62	Ethanol
N (بارا هيدروكسي فنيل) ازو 5 –كلورو بنزوترايازول .	C3	150-148	53	Ethanol
N – فنيل بنزوترايازول	C4	76-74	27	Tolueen

. [8]

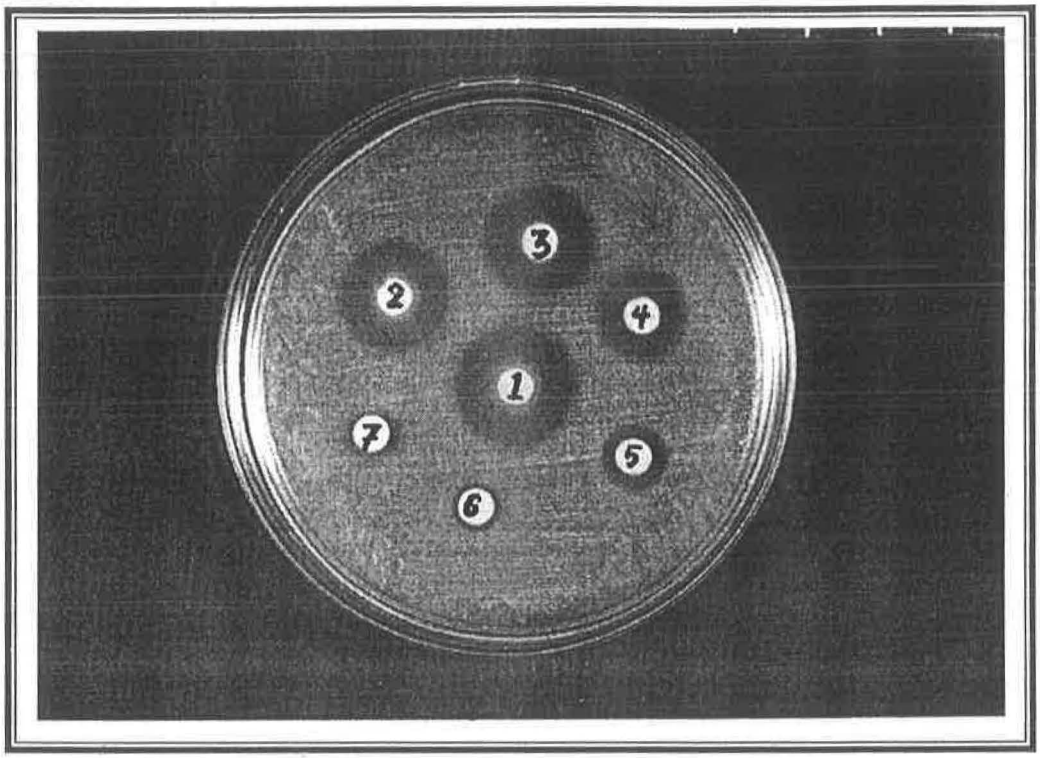
يوضح الجدول 2 تاثير المركبات الكيميائية المحضرة بتراكيز مختلفة على عزلات جرثومة *S.aureus* ، واظهرت المركبات تاثيرات متباينة في الجراثيم حسب التراكيز المستخدمة، اذ يلاحظ من نتائج الجدول 2 بان المركب (C3) اظهر تفوقا تثبيطيا واضحا على الجراثيم مقارنة مع بقية المركبات من جهة ومع مضاد الجنتامايسين من جهة اخرى والذي استخدم مع المضادات الاخرى كمعاملات مقارنة ، في حين اظهر المركبان (C1 و C2) فعالية تثبيطية جيدة ، ولم تلاحظ اي فعالية تثبيطية للمركب (C4) وعلى جميع عزلات جرثومة *S. aureus* ، وربما يعزى السبب في عدم تاثير هذا المركب على الجراثيم الى عدم وجود ذرة الكلور (CL) على الحلقة الأروماتية [8].

جدول (2). التاثير التثبيطي للمركبات الكيميائية المحضرة بتراكيز مختلفة على عزلات جرثومة *S. aureus* (قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم) .

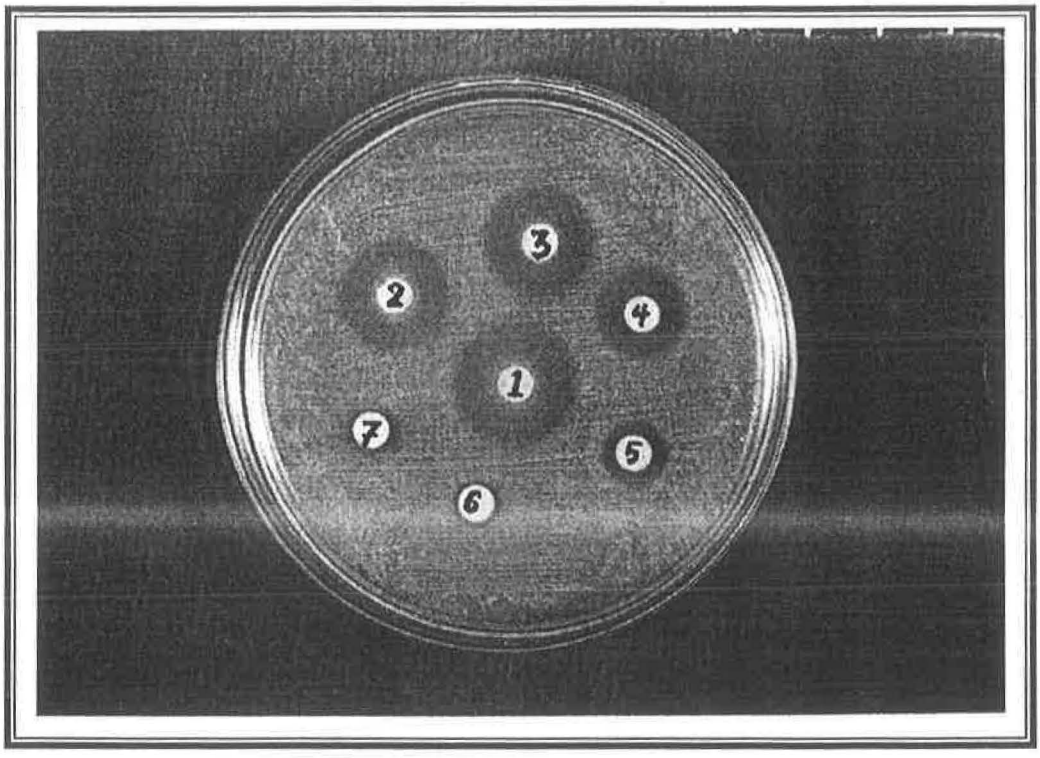
مصدر العزلات الجرثومية	رمز المركب الكيمائي	تركيز المركب الكيمائي (ملغم / سم^3)							السيطرة		
		20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	Te.	Ge.	Ch.
المرضى المصابون بالتهاب اللوزتين الحاد	C1	18a	17ab	15ac	13c	10d	0.0e	0.0e	24c	18a	22bc
	C2	16a	15a	12b	10b	0.0c	0.0c	0.0c			
	C3	19a	18a	16a	12b	10b	0.0c	0.0c			
الأصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين (طلبة الجامعة)	C1	20a	18a	16ab	12bc	10c	0.0d	0.0d	26b	18a	24ab
	C2	19a	17a	15ab	12bc	10c	0.0d	0.0d			
	C3	22a	19a	17ab	13bc	10c	0.0d	0.0d			
الأصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين (العاملين في مصنع أدوية نينوى)	C1	16a	15a	13ab	10b	0.0c	0.0c	0.0c	22b	16a	26c
	C2	17a	15ab	12bc	10c	0.0d	0.0d	0.0d			
	C3	19a	17ab	16ab	13bc	10c	0.0d	0.0d			
حيز الأقسام الإنتاجية في مصنع أدوية نينوى	C1	19a	17a	15ab	12bc	10c	0.0d	0.0d	-	17b	20a
	C2	15a	14a	12ab	10b	0.0c	0.0c	0.0c			
	C3	17a	16ab	13bc	10c	0.0d	0.0d	0.0d			

- Chloramphinicol : Ch ، Gentamicin : Ge ، Tetracycillin : Te
- معدل قطر التثبيط حسب باستخدام ثلاث عزلات جرثومية .
- معدلات قطر التثبيط التي تتميز بالحرف نفسه لا توجد بينها فروق معنوية عند مستوى احتمال ($p \leq 0.05$) .

الصورة (1). تاثير المركب الكيميائي (C2) بتراكيز مختلفة على جرثومة *S.aureus* .
1 (20 ملغم /سم^3) ، 2 (10ملغم /سم^3) ، 3 (5ملغم /سم^3)، 4 (2,5ملغم /سم^3) ، 5 (1,25ملغم /سم^3) ، 6 (0,625ملغم /سم^3) ، 7 (0,3125ملغم /سم^3) .



الصورة (2). تاثير المركب الكيميائي(C3) بتراكيز مختلفة على جرثومة *S.aureus* .



يبين الجدول 3 التركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز القاتل الادنى (MBC) للمركبات الكيميائية على الجراثيم واظهرت النتائج ان التركيز المثبط الادنى للمركب C1 ضد العزلات الجرثومية قيد الدراسة مساويا تقريبا لـ 0,0125 ملغم /سم^3 ما عدا جرثومة *S.aureus* المعزولة من الاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين من العاملين في مصنع ادوية نينوى فقد كان الـ (MIC) لهذا المركب ضدها مساويا تقريبا لـ 0,025 ملغم / سم^3 بينما كان التركيز القاتل الادنى (MBC) للمركب C1 مساويا لـ 0,2 ملغم /سم^3 على جميع العزلات الجرثومية قيد الدراسة .

جدول (3). التركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز القاتل الادنى (MBC) للمركبات الكيميائية على عزلات جرثومة *S.aureus* (ملغم / سم^3).

المركب الكيمائي	مصدر العزلات الجرثومية							
	المرضى المصابون بالتهاب اللوزتين		الاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين (طلبة الجامعة)		الاصحاء غير المصابين بالتهاب اللوزتين (العاملين في مصنع ادوية نينوى)		حيز الاقسام الانتاجية في مصنع ادوية نينوى	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
C1	0.0125	0.2	0,0125	0,2	0,025	0,2	0,0125	0,2
C2	0,025	0,2	0,0125	0,2	0,025	0,2	0,025	0,2
C3	0.0125	0,2	0,0125	0,2	0,025	0,2	0,025	0,2

المصادر

1.**Jawets ; Melnik and Adelberg's.** Medical microbiology. 22nd ed. Printed in USA by Appleton & Lange. **(2001).**

2.**Mini, E. ; Nobili, s. and Periti, P.** Drugs. 54(6) : 39-52. **(1997).**

3.**Essawi, T. and Srour, M.** J. Ethnopharmacol. 70 : 343-349. **(2000).**

4.**Matsomoto, S. S. ; Fujitaki, J. M. ; Nord, L. D. and Willis, R. C.** Biochem. Pharmacol. 39 : 456. **(1990).**

5.**Ellis, C.** National cancer institute. Science News. 134 : 225 **(1993)**

6.**Nosik, D.N. ; Aspectow,R.D. and Novokhatskii, A.S.** Antibiotiki. 27(1) : 49-54. **(1982).**

7.**Jantova, S ; Greif, G. ; Pavlovicova, R. and Cipak, L.** Folia. Microbial. Praha. 43 : 75-78. **(1998).**

8.**الخفاف ، انوار عبد الغني** رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل . **(1989)**.

9.**Bauer, A. W. ; kirbay, W. A. M. ; Sherris, J. S. and Turk, m.** Am. J. Ciln. Pathol. 45 : 493-496. **(1966).**

10.**Kelmanson, J. E. ; Jager, A. K. and Staden, J. V.** J. Ethnopharmacol. 69 : 241-246. **(2000).**

11.**Grace, O. O.** Letters In. Appli. Microbiol. 9(3) : 105-108. **(1989).**

12.**الصفاوي ، نوار طلال حامد** رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل . **(2001)**.

13.**حسين ، سها حسين احمد** . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل **(2001)**.

14.**Abdul-Rahman, G.Y.** Al-Raffedin .J.sci13(3) : 1-4.(2001).