

عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة

إيمان هندي كاطع\* ، هادي رحمن رشيد الطائي\*\* ، عصام حامد حميد\*\*

## عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة

إيمان هندي كاطع\* ، هادي رحمن رشيد الطائي\*\* ، عصام حامد حميد\*\*

وزارة العلوم والتكنولوجيا/دائرة المواد الخطرة، جامعة ديالى/كلية العلوم/قسم علوم الحياة والأحياء المجهرية

استلام البحث: ٢٢-١١-٢٠١٠ - قبول النشر: ٠٣-٠٢-٢٠١١

### الخلاصة

جمعت نماذج بيئية عديدة لمياه المجاري العامة ومجاري مستشفيات مدينة بغداد وزيت القطع من مصانع المعدات الكهربائية المصابة بالتلف البايولوجي إضافة إلى نماذج تربة مختلفة. زرعت هذه النماذج على أوساط زرعية عامة وتفريقية محتوية على تراكيز مختلفة من الفورمالديهايد. أوضحت النتائج وجود نسب متفاوتة للمقاومة المايكروبية للفورمالديهايد تمثلت ببكتريا *E. coli* و *Pseudomonas spp.* في نماذج مياه المجاري العامة والمستشفيات وزيت القطع ، وعدم وجود تلك المقاومة في المجتمع المايكروبي بنماذج التربة، كما شملت الدراسة قابلية بعض الأنواع البكتيرية لتخمير سكر اللاكتوز من عدمه، حيث إن هذا قد يعطي دليلا على وجود تلوث وتسربات للمادة السامة من مصادرها إلى منظومات المجاري.

أشارت النتائج إلى أن العزلات المقاومة للفورمالديهايد أبدت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية (الجنتاميسين، الامبيسيلين، حامض الناليدكسك، السيفالوكسين، الاموكسيسيلين، الريفامبين، التتراسايكلين والارثرومايسين) مما يشير إلى وجود مقاومة مشتركة للفورمالديهايد والمضادات الحيوية. كما أظهرت النتائج احتواء العزلة *Pseudomonas spp.* حزمة بلازميدية كبيرة واحدة وبكتريا *E. coli* ثلاث حزم بلازميدية. أجريت طريقة طرد البلازميد Curing وأظهرت النتائج ان البلازميدات تحمل صفة مقاومة الفورمالديهايد.

**الكلمات المفتاحية:** بكتريا اشريشريا القولون، بكتريا الزوائف، فورمالديهايد، مضادات حيوية

## عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة

المقدمة

يعرف الفورمالديهايد على انه مادة ذات سمية عالية للنظام الحياتي، لذلك فقد استخدم وبنطاق واسع في المواد المعقمة (Germicides) و المواد الحافظة (Preservatives) لتأثيره الكيماوي الشديد والسريع على بروتينات وإنزيمات الخلية الحية مما يؤدي إلى وقف الفعاليات الحيوية، واسمه النظامي هو الميثانول (Methanol)<sup>(١،٢)</sup>.

يستخدم الفورمالديهايد بشكل محلول بإذابة غاز الفورمالديهايد شديد السمية بالماء ويدعى عادة بالـ (الفورمالين Formalin) حيث يحضر بتركيز ٤٠% (v/v) في الماء، صيغته الجزيئية هي  $(\text{CH}_2\text{O})$  HCHO بوزن جزيئي يبلغ ٣٠,٠٣ كيلو دالتون<sup>(٣،٤)</sup>.

نتيجة للاستعمال الواسع لهذه المادة الشديدة السمية في المعقمات بشكل محاليل مركزة وقابليته على التبخر حيث بلغ إنتاجه ٢١ مليون طن في عام ٢٠٠٥. ونظراً لتعرض الإحياء المجهرية للفورمالديهايد على الدوام في أجواء المستشفيات و ردهات العمليات، وكذلك استخدامها في حفظ الجثث والأنسجة الحيوانية والنباتية، كل ذلك أدى إلى طرحها بكميات لا بأس بها إلى منظومات المجاري ومعالجة المياه الثقيلة وبالتالي تعرض مثل هذه البيئات إلى ضغوط جديدة تتمثل بالتأثير السمي لهذه المادة، مما يؤدي إلى ظهور مقاومة للإحياء المجهرية تجاه الفورمالديهايد<sup>(٥)</sup>.

إن ظهور مثل هذه المقاومة الميكروبية ارتبطت بتطور المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية (multidrug resistance) والتي تؤدي إلى مشاكل صحية كثيرة نتيجة الإصابات صعبة المعالجة والتي تتطلب عناية طبية مركزة وتشكيلات من المضادات الجديدة التي لم تتطور ضدها مقاومة ميكروبية<sup>(٦،٧)</sup>. ونتيجة لما سبق فإن هذه الدراسة تهدف إلى تحديد مديات المقاومة الميكروبية للفورمالديهايد في نماذج بيئية مختلفة وتعيين مقاومتها للمضادات الحيوية وذلك لاهمية هذه المقاومة وتأثيرها على الصحة العامة.

## عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة

المواد وطرق العمل

١- جمعت ٣٠ عينة مختلفة من مياه مجاري مستشفيات مدينة بغداد ومياه المجاري العامة وزيوت القطع لمصانع المعدات الكهربائية المصابة بالتردي الحيائي (حيث يتم تعقيم المكان المستخدم فيها الزيوت بالفورمالديهايد)، إضافة إلى نماذج تربة من مناطق متعددة لمدينة بغداد.

٢- استخدمت طريقة النشر بالإطباق وزراعة تخافيف عشرية للنماذج، ومن ثم عدت الخلايا الحية Total Viable Count وباستخدام جهاز عد الخلايا Colony Counter. زرعت النماذج المذكورة في الوسط المغذي الصلب المضاف له تراكيز (0.1, 1, 5 mM) فورمالديهايد لحساب عدد الخلايا المقاومة للمادة نسبة لإطباق السيطرة (Control Plates).

٣- أعيدت الخطوة ٢ بزراعة تخافيف النماذج على أوساط الايوسين مثيلين الازرق (EMB) والماكونكي والستريمايد الصلبة المدعمة بنفس تراكيز الفورمالديهايد المذكورة في أعلاه لحساب عدد بكتريا القولون *E. coli* والبكتريا المعوية المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز (Lactose fermentors and non-lactose fermentors)، ومجموعة بكتريا الزوائف *Pseudomonads spp.* على التوالي. تم تشخيص العزلات المختارة باستخدام الفحوصات المظهرية والكيموحيوية<sup>(٨)</sup>، واستخدام نظام Api-20E.

٤- اختيرت العزلات المقاومة لتركيز 5mM فورمالديهايد. لاختبار مقاومتها لمجموعة من المضادات الحيوية (Cephalexin-، Nalidixic acid-NA/30µg، Erythromycin-E/15µg، Tetracyclin-TE/30µg، Ampicillin-، Gentamycin-Gm/10µg، Rifampicin-Rif/30µg، Amoxicillin-AMC/10µg، KF/30µg، A/10µg) باستخدام طريقة الأقراص (Disc diffusion assay)<sup>(٩)</sup>.

٥- اختيرت العزلات المقاومة للمضادات الحياتية لاختبار قابليتها على مقاومة تراكيز مختلفة من الفورمالديهايد (٢،٥-١٢،٥ mM) بواسطة طريقة العدد الحي.

٦- عزل الدنا البلازميدي: أجريت عملية عزل الدنا البلازميدي للبكتريا للتعرف على المحتوى البلازميدي باتباع الطريقة<sup>(١١)</sup> وباستخدام مادة Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). أجريت عملية طرد البلازميدات باستخدام درجات حرارة تراوحت ما بين (٤٠-٥٠) م° باتباع طريقة<sup>(١٠)</sup>.

## عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة

النتائج والمناقشة

يظهر جدول (1) معدلات النسب المئوية لإعداد البكتريا المعزولة محليا المقاومة لتراكيز الفورمالديهايد الثلاث (5, 1, 0.1) ملي مولار ولأربع مجموعات من النماذج البيئية المختلفة والتي كان متوقعا إن تظهر في محتواها المايكروبي مقاومة للفورمالديهايد. حيث تبين النتائج الانخفاض الواضح في نسبة المقاومة بزيادة التركيز السام وكما متوقع، إذ إن التنوع الحياتي يقل بزيادة الشد البيئي أو التأثير السام للمواد الملوثة في البيئة<sup>(12)</sup>.

أبدت مجاميع البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز وبكتريا *E. coli* مستويات من المقاومة عالية نسبيا ولجميع النماذج البيئية المفحوصة، مما يشير إلى وجود تلوث بيئي من مصادر معينة بمادة الفورمالديهايد والتي أكدتها وجود المقاومة الميكروبية لهذه المادة أن قدرة بعض الجراثيم على تحليل وأحيانا استهلاك المطهرات الكيميائية هي أحد أسباب مقاومتها لتلك المطهرات.

كما أظهرت النتائج ظهور سلالات من بكتريا *Pseudomonads spp.* مقاومة للتراكيز المستخدمة من الفورمالديهايد والذي يعني تحمل هذه البكتريا للفعل السام للمادة الكيميائية حيث تمتاز هذه البكتريا بمقاومتها للسيتول. بالرغم من امكانية القضاء على عدد كبير من الجراثيم وبضمنها الأبواغ عند القيام بعملية خلط مطهرات مختلفة مثل الفينول كلوتارالديهايد والفورمالديهايد مع ملاحظة الانتباه إلى مدى التوافق بينها حيث قد يلغى بعضها عمل الآخر. لم تظهر نتائج زرع نماذج التربة المختلفة أي نسبة ولو كانت بسيطة للمقاومة الميكروبية للفورمالديهايد، مما قد يعني عدم تسرب مثل هذا التلوث إلى التربة أو صعوبة وصول مثل هذا التلوث مقارنة بما موجود في البيئات المائية.

شكل (1) يبين مدى مقاومة ثلاث عزلات منتخبة لتراكيز مختلفة من الفورمالديهايد وتأثيره على معدلات نمو البكتريا بزيادة تركيز المادة مقارنة بنمو السيطرة، حيث يظهر الشكل (1) ان بكتريا *E. coli* اكثر مقاومة مقارنة ببكتريا الزوائف *Pseudomonads spp.* وقد يفسر ذلك نتيجة للاختلاف الوراثي بين العزلتين وكذلك حجم القنوات الموجودة في الغشاء الخارجي outer membrane لكونها بكتريا سالبة لملون غرام.

درست العلاقة بين مقاومة البكتريا للفورمالديهايد مع مقاومتها للمضادات الحيوية، حيث يبين جدول (2) نتائج فحوص المضادات لثلاث مجاميع من العزلات البكتيرية lactose and non lactose fermented bacteria ، *E. coli* ، *Pseudomonads spp.* المقاومة للفورمالديهايد والتي تم عزلها في أوساط زرعية مختلفة، حيث تباينت نسبة

## عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة

المقاومة للمضادات لجميع العزلات ما بين ١٠%-٩٠% وتركزت بنسبة أعلى في العزلات التي كان مصدرها نماذج مياه المجاري للمستشفيات ومخلفاتها (الحمأة)، وبنسبة أوطأ منها في نماذج زيوت القطع، مما قد يوضح تعرض بيئة مياه ومخلفات المجاري إلى تلوث كيميائي بالفورمالديهايد وتسربه إلى بقية منظومات المعالجة سواء في المستشفيات أو محطات معالجة المجاري إذ تبين النتائج في جدول (٢) إن زيادة التعرض للفورمالديهايد يؤدي إلى زيادة ظهور أو تكرار المقاومة للمضادات الحيوية كما هو الحال في العلاقة بين المقاومة الميكروبية للمعادن الثقيلة والمضادات الحيوية كون إن عواملها الوراثية (الجينات) غالباً ما تحمل على نفس البلازميدات أو البؤر الجينية (loci) المحملة على الكروموسومات وتنتقل سوية إلى مواضع أخرى في الكروموسوم أو عزلات ميكروبية أخرى<sup>(٣)</sup>. هناك العديد من التشابه بين الطرائق التي تقاوم بواسطتها الخلية البكتيرية للمضادات الحياتية وتلك التي تقاوم بواسطتها المطهرات الكيميائية، كما في حالة تكس المادة المضادة للبكتريا، تغير حاجز النفاذية تحوير موقع الهدف أو تحوير المادة المضادة للبكتريا<sup>(٢)</sup>.

أظهرت النتائج احتواء العزلة *Pseudomonas spp* على حزمة بلازميدية كبيرة (Megaplasmid) واحدة وبكتريا *E. coli* على ثلاث حزم بلازميدية صغيرة وباستخدام طريقة الترحيل الكهربائي، واعتمدت الطريقة على استخدام مادة CTAB والتي تعد من المنظفات الأيونية الموجبة Cationic detergent ذات القابلية على ترسيب DNA بعد الارتباط به شكل (١).

أظهرت نتائج طرد البلازميد أن صفة المقاومة للفورمالديهايد وبعض المضادات الحياتية كانت محمولة بلازميدياً حيث لم تستطع البكتريا التي طرد بلازميدها من تحمل تراكيز الفورمالديهايد. إن ظهور مثل هذه المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية له أهمية وتأثير على الصحة العامة للعاملين في المؤسسات الصحية ومحطات معالجة المياه الثقيلة إذ إن الإصابات الناتجة عن العمل ستكون بالمقابل صعبة المعالجة وتؤدي إلى نتائج خطيرة تؤثر على بيئة العاملين وصحتهم وانتشار الإصابات بسبب محدودية الخيارات العلاجية اللازمة وحتى الوقائية منها أيضاً.

### References

- 1- Kaulfers, P. M. and Brandt, D. (1987). Isolation of a Conjugative Plasmid in *E. coli* Determining Formaldehyde Resistance. FEMS Microbiol. Letts. 43: 161-163.
- 2- Atlas, R. M. (1995). Principles of Microbiology. 1<sup>st</sup> (ed), Mosby, Inc. Missouri.
- ٣- Hingst, GeissHK, Sonntag HG. (1985). Spectrum of gram– negative rods in waste water from Jeddah/ Saudi Arabia, Control Bacterial Microbial Hygb.
- ٤- Susan, B.; et al, (1989). The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. (11th. ed.) . Merck and Co., N. J., USA.
- ٥- Kaulfers, P.M. and Brandt, D. (1987) . Isolation of a conjugative plasmid in *E.coli* determining formaldehyde resistance. FEMS Microbial. Letts. 43:161-163.
- ٦- Reiss, J. and Klingmuller, W. (1987). Direct selection of recombinant plasmids with chlorate. FEMS Microbiol. Letts. 43: 201-205.
- ٧- Kaulfers, P.M. and Wollmann, A. (1988) . Cloning and expression of formaldehyde resistance from *E.coli*. FEMS Microbiol. Letts.55: 299-302
- ٨- Holt, J. G.; Kreig, N. R.; Sheath, P. H.; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Genus Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (9<sup>th</sup>). William, R. H. (ed.). William Wilkins. Baltimor. USA.
- 9- National Committee for Clinical Laboratory Standareds (2002). Performance Standared for Antibiotics Suceptibility Testing. NCCLS. Villanova, P. A.
- 10- Brodn, P. (1979). Plasmids. 1<sup>st</sup> (ed). W. H. Freeman Company. Oxford. Sanfrancisco.
- 11- Al-Taai, H. R. R. (2005). Bacteriological, Biochemical and Molecular Study of *Proteus mirabilis* Isolated from Urinary Tact Infection in som Hospitals of Baghdad City. PhD. Thesis, College of Science, Al-Mustansiriya University, Iraq.
- ١2- Gunther Reuss,Walter Disteldorf, armin DttoGamer, Albrecht Itilt Formaldehyde, in Ullmanns Encyclopedia of industrial Chemistry, 2002, Wiley –VCH , wein heim. Doi : 10. 10021/1435,007 al 619

## عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة

جدول (١) النسبة المئوية لأعداد الأحياء المجهرية المقاومة لتراكيز الفورمالديهايد المستخدمة في الوسط الغذائي في نماذج بيئية.

| تراكيز الفورمالديهايد (Mm) |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |                                    |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------------------------------------|
| 5                          |     |     |     | 1   |     |     |     | 0.1 |      |     |     | مجموعة الأحياء المجهرية            |
| Se                         | Cu  | Sd  | Ss  | Se  | Cu  | Sd  | Ss  | Se  | Cu   | Sd  | Ss  |                                    |
| 15                         | 12  | 5   | 0.0 | 35  | 45  | 20  | 2   | 40  | 4.5  | 26  | 4   | العدد الكلي الحي                   |
| 3                          | 9   | 3   | 0.0 | 7   | 23  | 16  | 1   | 35  | 30   | 80  | 1   | البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز     |
| 18                         | 20  | 15  | 0.0 | 30  | 25  | 25  | 1   | 35  | 35   | 30  | 3   | البكتريا غير المخمرة لسكر اللاكتوز |
| 12                         | 5   | 0.0 | 0.0 | 22  | 36  | 3   | 1   | 33  | 65   | 17  | 4   | بكتريا القولون <i>E.coli</i>       |
| 0.4                        | 0.3 | 0.5 | 0.0 | 2.0 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.5 | 0.07 | 0.3 | 0.1 | بكتريا الزوائف <i>Pseudomonas</i>  |

أنواع النماذج البيئية:

Sewage Sludge = Sd مخلفات مياه المجاري

Cutting oil = Cu زيوت القطع

Sewage Water = Se مياه مجاري المستشفيات

Ss = نماذج من ترب مختلفة

عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة

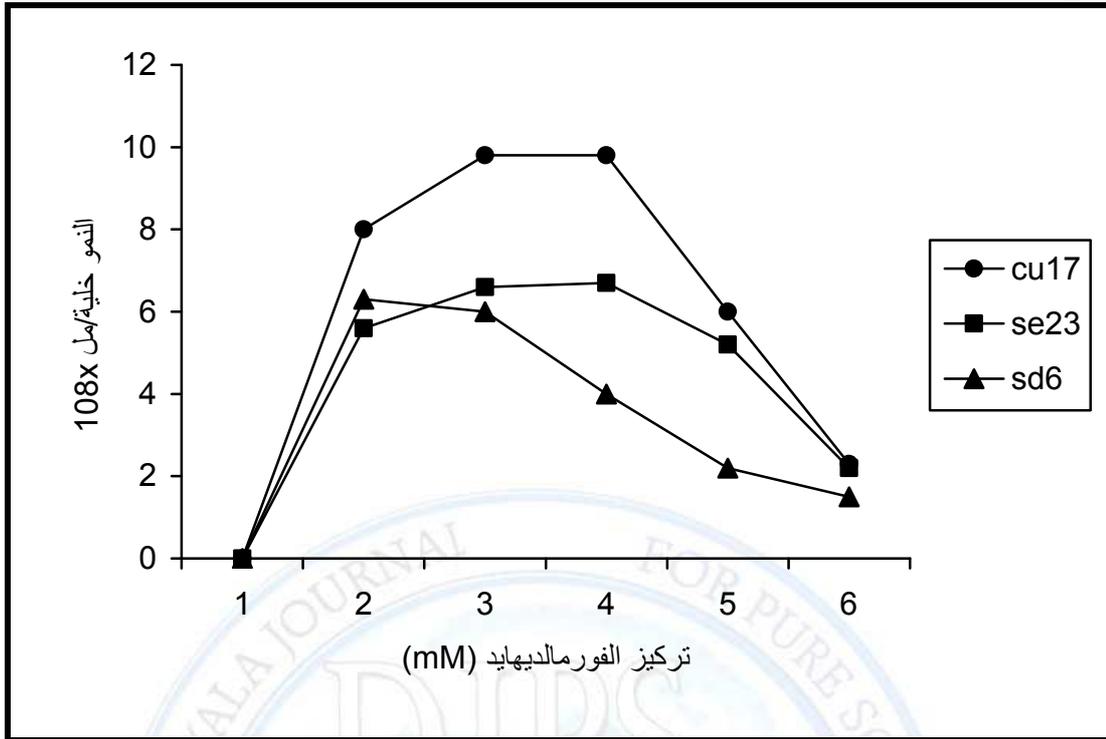
جدول (٢) مقاومة بعض العزلات المحتملة للتركيز 5mM من الفورمالديهايد للمضادات الحيوية .

| المضادات الحيوية                           |    |     |     |    |    |   |    | رمز العزلة |
|--|----|-----|-----|----|----|---|----|------------|
| E  | TE | Rif | AMC | KF | NA | A | Gm |            |
| <i>E.coli</i>                              |    |     |     |    |    |   |    |            |
| +  | -  | +   | +   | +  | -  | + | +  | Sd13       |
| +  | -  | +   | +   | +  | -  | + | +  | Sd12       |
| +  | -  | +   | +   | +  | +  | + | +  | Sd         |
| <i>Pseudomonas spp.</i>                    |    |     |     |    |    |   |    |            |
| -  | +  | -   | -   | -  | -  | - | -  | Cu3        |
| +  | +  | -   | +   | -  | -  | + | +  | Cu11       |
| +  | +  | +   | +   | -  | +  | - | +  | Cu17       |
| lactose and non lactose fermented bacteria |    |     |     |    |    |   |    |            |
| -  | +  | -   | -   | -  | +  | - | -  | Se 4       |
| +  | -  | +   | +   | +  | -  | + | +  | Se 7       |
| +  | -  | +   | +   | -  | -  | + | +  | Se 13      |
| +  | -  | +   | +   | +  | +  | + | +  | Se 23      |

+ = Resistant

- = Sensitive

## عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة



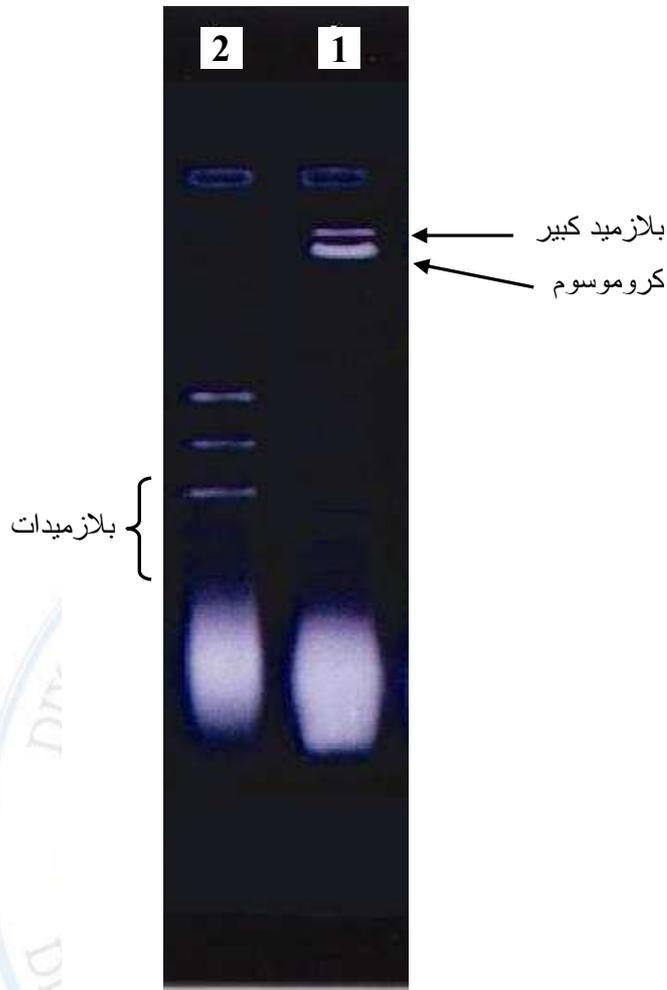
شكل (1) مقاومة العزلات البكتيرية لتراكيز مختلفة من الفورمالديهايد وتأثيره السام على النمو.

sd6 = *E.coli*

se23 = lactose and non lactose fermented bacteria

cu17 = *Pseudomonas* spp.

عزل بكتريا مقاومة للفورمالديهايد من نماذج بيئية مختلفة



شكل (2) المحتوى البلازميدي المعزول من بكتريا *Pseudomonas* و *E. coli*

العمود (1): المحتوى البلازميدي لبكتريا *Pseudomonas spp.*

العمود (2): المحتوى البلازميدي لبكتريا *E. coli*