الترافق بين مقاومة الكلورين المتبقي ومقاومة الصادات الحيوية عند الجراثيم غيرية التغذية في شبكة توزيع مياه الشرب

نـزيـه داؤد

قسم علم النبات ـ كلية العلوم ـ جامعة تشرين ـ اللاذقية

تاريـخ الإيداع 2004/05/24
قبل للنشـر في 2004/12/26

الملخص

تم تحليل 73 عينة مياه شرب من شبكة التوزيع العام في مدينة اللاذقية بهدف الكشف عن الجراثيم غيريات التغذية ودراسة مقاومتها للكلورين وللصادات الحيوية. اختبرت حساسية الجراثيم المعزولة تجاه عشرة صادات حيوية بطريقة التمديد في الآغار (طريقة MIC) والصادات الحيويـة المـستخدمة هـي: امبيسيللين، كلورامفينيكول، تتراسكلين، اميكاسـين، سيبروفلوكـساسين، سيفوناكـسيم، جينتاميـسين، اريثرومايسين، بيبراسيللين/ تازوباكتام، سيفالوتين.

تم عزل 133 سلالة جرثومية توزعت على الأجناس الجرثوميـة الآتيـة: زوائـف, ايروموناس, اسينيتوباكتر، كروموباكتر، فلافوباكتر، ميتيلوباكتر. تراوح محتوى العينات من الكلورين المتبقـي بـين 0.1 ملغ/ل و 3.8 ملغ/ل. أظهر القسم الأعظم من الجراثيم المعزولة مقاومة مختبرية للكلورين بالإضـافة إلى مقاومة مرتفعة للصادات الحيوية المستخدمة.

الكلمات المفتاحية: جراثيم غيريات التغذية، كلورين، صادات حيوية، مقاومـة، مـاء شرب.

Accompany of residual chlorine resistance with antibiotic resistance among heterotrophic bacteria isolated from drinking water systems

Nazih Daood

Department of Plant Biology -Faculty of Sciences-Tishreen University- Latakia

Received 24/05/2004
Accepted 26/12/2004

ABSTRACT

A total of 73 drinking water samples were collected from distribution system in Lattakia city, the aim was to search for hetrotrophic bacteria and investigate their resistance to chlorine and antibiotics. The antibiotic susceptibility tests were: carried out by using agar dillution method (MIC) and the antibiotics tested were: Ampicillin, Chloramphenicol, tetracycline, Amikacin, Ciprofloxacin, Cefotaxim, Gentamicin, Erythromycin Piperacilin/ Tazobactam, and cephalothin.

A sum of 133 bacterial strains were isolated and included by five genera: pseudomonas, acinetobacter, flavobacter, chromobacter, and methylobacter. The samples content of residual chlorine were ranged between 0.1 to 3.8 mg/l.

The majority of bacterial strains isolated were resistance to chlorine. The multiple antibiotic resistances were common amongst isolated bacterial strains.

Key words: Heterotrophic bacteria, Chlorine, Antibiotics, resistance, Drinking water.

المقدمة

لا تعد مياه الشرب (مياه الصنبور tap water) من الوجهة الميكروبيولوجية مياهاً عقيمة، فهي لا تحتوي فعلاً العوامل الممرضة النموذجية ولكنها غالباً ما تكون حاوية أحياء دقيقة غيرية التغذية Heterotrophic microorganisms تشكل الجراثيم Bacteria النسبة الغالبة فيها,والجراثيم غيرية التغذية هي أحياء تستعمل جزيئات عضوية جاهزة مرجعة كمصدر كربوني (*Prescott et al 1993*) وهذه يتم تحديدها من خلال إجراء اختبار زرع جرثومي يعرف باختبار تعداد غيريات التغذية بالطبق عند الدرجتين 22 مْ و37 مْ، وتسميتها هذه غير تصنيفية، والقيم الدلائلية المرضية لها هي 100 خلية عند الدرجة 22مْ و10 خلايا عند الدرجة 37مْ (EEC 1980)، وتختلف هذه عن الجراثيم التي تعد دالات indicators (مثلاً *E.coli*) للدلالة على احتمال وجود عوامل ممرضة في المياه بصورة عامة، ففي مياه الشرب يجب أن تكون قيمة هذه الدالات مساوية للصفر في 100 مل ماء. وقد زاد الاهتمام بالجراثيم غيرية التغذية من منطلق مسؤوليتها عن حدوث بعض الالتهابات المعدية المعوية gastroenterititis، وإن حدوث حالات أو وبائيات الأمراض هذه عند الإنسان وترافقها مع استهلاك مياه الشرب دون تحديد عامل ممرض محدد ومعروف قد أدى إلى اقتراح أن الجراثيم غيرية التغذية والتي تكون موجودة في المياه يمكنها أن تكون المسبب لمثل هذه الأمراض. ويفترض ذلك جدلاً مقاومة هذه الجراثيم للكلورين المستعمل في معالجة مياه الشرب هذه، إذ أثبت مقاومة الكلورين عند جراثيم مختلفة مثل الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* (*Grobe et al 2001*)، والعصيات القولونية Coliform bacilli (*King et al 1988*)، والعديد من العصيات إيجابية الغرام المكونة للأبواغ و الأكتينومايسيت Actenomycetes وبعض المكورات الدقيقة Micrococci (*Ridgway and Olson 1982*) وغيرها من الجراثيم. أما بالنسة للجراثيم غيرية التغذية فهناك الكثير من البحوث التي أشارت بوضوح إلى عزلها من شبكة التوزيع للمياه المكلورة، إذ تبين أن العديد من هذه الجراثيم يتمكن من النمو في شبكة توزيع المياه حيث تستوطن الأفلام الحيوية biofilm النامية داخل الأنابيب وداخل الصنابير (*Sutcliffe 1997*)، أما فيما يرتبط بمقاومة الجراثيم المعزولة من مياه الشرب للصادات الحيوية فهناك دراسات عديدة أكدت وجود هذه المقاومة عند جراثيم متنوعة معزولة من مياه الشرب (*Armstrong et al 1981, papapertropoulou et al 1994, Kuchta et al 1983,Papandreou et al 2000)*، وقد درس تأثير الكلورة في مقاومة الصادات الحيوية عند جراثيم معزولة من مياه الصرف الصحي المعالجة (*Morozzi et al 1988*). أما عن مسؤولية هذه الجراثيم عن إحداث أمراض وإصابات عند الإنسان المستهلك لمياه الشرب فمعظم التقارير في هذا الشأن أشارت إلى إمكانية حدوث ذلك وإن الأشخاص مكبوحي المناعة immunocompressed هم الأكثر تعرضاً

لهذه الخطورة وكذلك الأطفال (*Moore et al 1993,Ghanen et al 1993,Egorov et al 2002*) أما بالنسبة للترافق بين مقاومة الكلورين مع المقاومة للصادات الحيوية فهناك ندرة في الدراسات التي تناولت هذا الأمر، وقد هدفنا من خلال هذه الدراسة الأولية التحري عن هذا الترافق حقلياً ومخبرياً لما لذلك من أهمية في كشف الدور المحتمل للجراثيم الغيرية التغذية في إحداث الالتهابات المعدية المعوية السابقة وأخذنا شبكة التوزيع في مدينة اللاذقية نموذجاً للدراسة.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات: جمعت 73 عينة مياه شرب من شبكة التوزيع في مواقع مختلفة من مدينة اللاذقية في الفترة الواقعة بين شهري شباط وتموز من عام 2003، وذلك باستعمال عبوات زجاجية عقيمة في شروط ميكروبيولوجية من حيث طريقة الأخذ والنقل والزرع، وقسمت كل عينة إلى جزأين الأول للتحليل الجرثومي والآخر للتحليل الكيميائي بهدف تقدير محتواها من الكلورين المتبقي.

تحديد الكلورين المتبقي: اعتمدت طريقة معايرة الكلورايد بمحلول نترات الفضة في وسط حمضي وتكوين كلورايد الفضة غير المذابة (*Mackereth et al 1989*).

زرع العينات: فور وصول العينات إلى المختبر وفي زمن لايتجاوز ساعة واحدة رشحت حجوم مختلفة من العينة على أغشية سليلوزية ذات ثقوب 0.45 µm (ماركة Millipore) وزرعت على الوسط الزرعي R2A medium(*Reasoner and Geldreich 1985*)، حضنت الأوساط المزروعة عند الدرجتين 22 م° و37 م°، ولمدة ثلاثة أيام، وتمت مطابقة المستعمرات الجرثومية الناتجة مجهرياً و بيوكيميائياً (*Murray et al 1999*).

اختبار التحسس للصادات الحيوية: اختبرت حساسية جميع السلالات الجرثومية المعزولة تجاه عشرة صادات حيوية (Oxoid *Ltd*)، هي: امبيسيللين Ampicillin AM, كلورامفينيكول Chloramphenicol CH، تتراسكلين Tetracycline TE، اميكاسين Amikacin AK، سيبروفلوكساسين Ciprofloxacin CP، سيفوتاكسيم Cefotaxim CT، جينتاميسين Gentamicin GN، اريثرومايسين Erythromycin ER، بيبراسيللين/ تازوباكتام Piperacilin/Tazobactam PT، سيفالوتين Cephalothin CF، واختيرت هذه الصادات لأنها تصنيفيا تمثل معظم المجموعات الرئيسة للصادات الحيوية ولكونها تؤثر في معظم الجراثيم غيرية التغذية السالبة لصبغة غرام وهي الناتجة في الاختبارات المجراة، بالإضافة إلى اعتمادها من قبل معظم الدراسات ذات العلاقة. وقد اعتمدت طريقة التخفيف في الآغار Agar dilution method وفق معايير هيئة مواصفات المختبرات الطبية (*NCLLS 1997,2000*) بغية تحديد الجرعة الدنيا المثبطة MIC (minimum inhibitory concentration) مقدرة بالميكروغرام /مل (µg/ml) كذلك

تحديد MIC_{90}، ووصفت السلالات الجرثومية بكونها مقاومة أو حساسة للـصاد الحيـوي المعني حسب معايير الهيئة أعلاه.

اختبار حساسية الجراثيم للكلورين: أجريت اختبارات حساسية السلالات الجرثوميـة المعزولة تجاه الكلورين في المختبر وفق الطريقة الموصوفة في هذا المجـال (*Hiraishi et al 1995*) بتحقيق تراكيز محددة من الكلورين الحـر فـي محلـول فوسـفاتي مـوقٍ (buffered) ذي درجة حموضة معتدلة (pH=7) وذلك بتحضير محاليل مائية ذات تراكيز محددة من هيبوكلوريت الصوديوم, وقد حضرت محاليل فوسفاتية معقمة في ارلنمـايرات سعة 300 مل بحيث تحقق تركيزاً مقداره0.1 ملغ/ل كلورين حر، وفي هذه المحاليل حقنت السلالة الجرثومية المراد اختبارها والمنماة مسبقاً علـى وسـط Trypticase Soy Agar (Amersham Ltd) بحيث يكون التركيز النهائي في المحلول الفوسفاتي في حـدود 10^5 خلية /مل وحضنت عند الدرجة 30 مْ، وأخذت عينات صغيرة من هذه المحاليل بفواصل زمنية محددة وزرعت على وسط TSA وحضنت مدة 7 أيام عند الدرجة 30 مْ.

تعد السلالة مقاومة للكلورين إذا أعطت نمواً مقداره أكبر مـن 10% مـن التركيـز الأولي المحقون في المحلول الفوسفاتي الكلوريني بعد خمس دقائق من التماس.

النتائـج والمناقشـة

اختبرت 73 عينة مياه شرب مأخوذة من شبكة التوزيع العام في مدينة اللاذقية، وقـد تراوحت نسبة الكلورين المتبقي في هذه العينات بين0.1 إلى 3.8 ملغ/ل وكانت موزعـة كما يأتي: 32 عينة تراوح محتواها الكلوريني بـين 0.5-0.1 ملـغ /ل، 30 عينـة ذات محتوى كلوريني (1-0.5 ملغ/ل) و11 عينة ذات محتوى كلوريني (3.8-1 ملغ/ل) وقـد يعود هذا التفاوت جزئياً إلى اختلاف المسافة الفاصلة بـين محطـة المعالجـة الرئيـسة والمواقع المختلفة لجمع العينات، ومن الجدير بالذكر أنه لم يلاحظ تـدرج واضـح فـي انخفاض المحتوى الكلوريني للعينات المائية مع الابتعاد عن محطة المعالجة، أو أي فرق ذي أهمية في نسبة الكلورين باختلاف الأشهر أو ساعات النهار، في حين أنه لوحظ وجود فروقات ذات أهمية في نسبة الكلورين بين مواقع جمع العينات، وكانت درجة حموضـة الماء بمتوسط (pH=8).

وعزلت 133 سلالة جرثومية من غيريات التغذية (جدول 1) وينتمي جميعهـا إلـى الأجناس الآتية: الزوائف *Pseudomonas*,الأيروموناس *Aeromonas*، الاسـينيتوباكتر *Acinetobacter*، الفلافوبـاكتر *Flavobacter*، الكروموبـاكتر *Chromobacter*، الميتيلوباكتر *Methylobacter*. ومن الملاحظ سيادة الـسلالات الجرثوميـة الـصباغية pigmented، ومن المعروف أن الجراثيم المنتجة للصبغة تترافق مـع البيئـات الفقيـرة تغذوياً مثل مياه الشرب المكلورة (*Reasoner et al 1989*).

الجدول (1) الجراثيم المعزولة وأعدادها ومجالات الكلورين المتبقي في 73 عينة مياه الـشرب جمعت من شبكة التوزيع في اللاذقية خلال الفترة الممتدة بين شهري شباط وتمـوز من عام 2003 .

الجرثوم/كجنس		عدد العزلات	عدد العزلات تبعا لكمية الكلورين المتبقي في العينات (ملغ/ل)		
			0.1-0.5	0.5-1	1-3.8
الزوائف	Pseudomonas	37	17	11	9
ايروموناس	Aeromonas	20	8	6	6
فلافوباكتر	Flavobacterium	26	20	6	0
كروموباكتر	Chromobacterium	20	13	7	0
اسينيتوباكتر	Acinetobacterium	18	10	5	3
ميتيلوباكتر	Methylobacterium	12	7	3	2

وقد تراوحت أعداد الجراثيم في العينات المدروسة بين0 - 145 خلية جرثوميـة فـي 100 مل ماء، في حين خلت العينات المدروسة من العصيات المعوية البرازيـة faecal coliform المعتمدة كدالات تلوث. وازداد معدل عزل الجراثيم مع انخفاض درجة حرارة المياه (الجدول 2)، وقد يعود ذلك إلى انخفاض تأثير الكلـورين مـع انخفـاض درجـة الحرارة، ومن ثم تحرر الجراثيم من القدرة الكابحة له وتحـسن اسـتمراريتها الحيويـة (البقيا).

الجدول (2) درجة حرارة الماء وعدد الجراثيم فيها تبعاً للشهر في 73 عينة مياه الشرب جمعت من شبكة التوزيع في اللاذقية خلال الفترة الممتدة بين شهري شباط وتموز من عام 2003.

الشهر	شباط	آذار	نيسان	أيار	حزيران	تموز
متوسط درجة حرارة الماء (م°)	15	18	20	23	24	26
متوسط عدد الجراثيم الكلي/100 مل ماء	12	8	14	35	105	130

ويتضمن الجدول 3 قيم MIC وMIC_{90} للجراثيم المعزولة بالنسبة للصادات الحيوية المستعملة، ويتضمن الجدول 4 نسب المقاومة لهذه الصادات عند الجراثيم المعزولة، فـي حين يتضمن الجدول 5 النتائج الاختبارية لحساسية الجراثيم المعزولة للكلورين.

الجدول (3) أ ـ مجال تراوح قيم MIC وقيم MIC90 لكل صاد حيوي بالنسبة إلى الجراثيم.

الجرثوم	مجال تراوح قيم الـ MIC وقيم الـ (MIC_{90}) لكل صاد حيوي				
	AM	PT	TE	ER	GN

2-8 (4)	1->16 (16)	4-32 (>16)	32/4->128/4 (64/4)	4->128 (>64)	**الزوائف Pseudomonas**
1-128 (4)	0.5->16 (>8)	2-128 (16)	16/4->64/4 (64/4)	4->256 (>256)	**ايروموناس Aeromonas**
4-128 (>64)	6->128 (>64)	4-64 (32)	8/4->32/4 (16/4)	16->64 (>32)	**Flavobacterium فلافوباكتر**
2-8 (4)	1->16 (>8)	2->8 (4)	16/4->128/4 (64/4)	8->64 (16)	**Chromobacterium كروموباكتر**
2-32 (8)	0.5->16 (>1)	4->16 (>4)	16/4->128/4 (32/4)	4->32 (16)	**Acinetobacterium اسينيتوباكتر**
2-16 (4)	0.25->16 (1)	4-16 (4)	16/4->128/4 (32/4)	8->32 (16)	**Methylobacterium ميتيلوباكتر**

فيما يتعلق بالزوائف فهي عوامل ممرضة انتهازية بالنسبة للإنسان وعلى نحو خاص عند الأشخاص ضعيفي المناعة (*Grabow et al 1974*)، وتبين الاختبارات في هذه الدراسة أن النوع السائد هو الزوائف الزنجارية *Psd.aeruginosa*، إذ كانت نسبته 86% إضافة إلى عزل نوعين آخرين هما *Psd.flurescence* و*Psd.putida*، ومن المعروف أن الزوائف متحملة للبيئة الفقيرة تغذوياً (oligocarbo-tolerant)، مما يفسر وجودها بكثرة في مياه الشرب التي تحتوي القليل جداً من المغذيات، فإذا ترافقت هذه الخاصية مع قدرتها على تحمل الكلورين والصادات الحيوية، إذ تؤكد معظم الدراسات ذات العلاقة مقاومة معظم سلالات الزوائف المعزولة من مياه الشرب المكلورة للعديد من الصادات الحيوية ومنها ER,TE,CH,KA، (وتتوافق نتائج هذه الدراسة مع وجهة النظر هذه) فإنها بذلك تعد عوامل ممرضة كامنة (*Papapertropoulou et al1994*)**.**

والملاحظة المهمة في هذه الدراسة هي إنتاج الزوائف لمستعمرات مخاطية على الأوساط الأغارية، وتؤكد الدراسة المرجعية أن أفراد الزوائف، خلال وجودها في مياه الشرب المكلورة، تلجأ إلى تكوين طبقة مخاطية حولها مكونة من الالجينات عديدة السكريد (alginate polysaccharides) وتفيد هذه الطبقة في حمايتها من تأثير الكلورين فيها (*Grobe et al 2001*)، ومما لاشك فيه أن ذلك يمنحها فوعة Virulence إضافية عند دخولها جسم الإنسان، أما في المختبر فقد كانت جميع سلالات الزوائف مقاومة للكلورين على نحو مطلق، إذ استمرت حية أكثر من ساعة، وكانت مقاومة الصادات الحيوية مرتفعة بصورة عامة، وفي هذه الدراسة كان الصاد الأكثر تأثيراً في أفراد الزوائف AK (MIC_{90}=8)، وكانت نسبة مقاومته 8%، أما الصاد الأقل فاعلية فكان CH (MIC_{90}=32) مع نسبة مقاومة بلغت 100%.

الجدول (3) ب ـ مجال تراوح قيم MIC وقيم MIC_{90} لكل صاد حيوي بالنسبة إلى الجراثيم.

الجرثوم	مجال تراوح قيم الـ MIC وقيم الـ (MIC_{90}) لكل صاد حيوي				
	CH	CF	CP	CT	AK
الزوائف Pseudomonas	16->64 (32)	32->128 (>64)	0.2-2 (1)	2->16 (8)	4-16 (8)
ايروموناس Aeromonas	8->64 (>32)	6->64 (64)	0.25-4 (1)	4->64 (8)	0.5-128 (8)
فلافوباكتر Flavobacterium	8->64 (>32)	32->128 (>64)	1-16 (2)	16->128 (>128)	4-16 (8)
كروموباكتر Chromobacterium	4->32 (8)	16->128 (>128)	0.5-4 (1)	4->32 (8)	16-128 (>32)
اسينيتوباكتر Acinetobacterium	4->64 (>8)	16->64 (>32)	2-16 (8)	8->64 (>32)	16-128 (>64)
ميتيلوباكتر Methylobacterium	8->64 (>16)	8->64 (>32)	1-8 (1)	8->64 (>32)	16-128 (64)

أفراد الأيروموناس Aeromonas عصيات سالبة غرام تسبب أمراضاً عند الحيوانـات المائية ولكنها تترافق مع العديد من الأمراض المعدية عند الإنسان مثل التهـاب الأمعـاء عند الأطفال والبالغين وتجرثم الدم والتهاب البريتـوان (*Deodhar et al 1991,Ko and Chuang 1995*). وتؤكد الدراسات أن أفراد الأيروموناس تقتل بـالكلورين والمطهـرات الأخرى المستعملة في معالجة مياه الشرب (*HMSO 1999*)، ولكن إذا دخلت هذه الجراثيم شبكة التوزيع بعد محطة المعالجة أو عند انخفاض تركيز الكلورين في أنابيب التوزيع فإن بإمكانها النمو والتكاثر إلى درجة كبيرة، ومن ثم فإن وجود أفراد الأيروموناس في عينات مياه الشرب المكلورة التي جمعت من شبكة التوزيع باللاذقية يعطي فكرة عـن حـدوث مقاومة الكلورين عندها ولاسيما أن ست سلالات منها عزلت من العينات ذات المحتـوى الكلوريني الأعلى (1-3.8 ملغ/ل)، أما في المختبر فكانت جميع سـلالات الأيرومونـاس مقاومة للكلورين ولكنها لم تستمر أكثر من 15 دقيقة في تماسها مـع الكلـورين، وتبـين الدراسات أن أفراد الأيروموناس جيدة التأثر بالـصادات TE,CF (*Brooks et al 1998*)، غير أن ذلك في هذه الدراسة لم يكن واضحاً على نحو جيد إذ لم تنخفض مقاومتهما عـن 30%، وقد يرجع ذلك إلى مقاومة الكلورين ولاسيما أن دراسات أكـدت هـذه العلاقـة (*Le Chevallier et al 1980*)، أما الصاد الأكثر فاعلية ضد أفراد الأيروموناس المعزولة في هذه الدراسة فكان CP (MIC_{90}=1) إذ كانت نسبة مقاومته 5%، وكان الصاد الأقـل فاعلية PT (MIC_{90}=64/4) مع نسبة مقاومة 95%، ومن الجـدير بالـذكر أن خطـورة

الأيروموناس تتضاعف مع قدرتها على إنتاج الهيموليزين وذيفان معـوي enterotoxin، وذيفانات خلوية cytotoxins في بعض الحالات (*Brooks et al 1998*).

الجدول (4) أ ـ نسب المقاومة للصادات الحيوية عند الجراثيم.

الجرثوم	عدد العزلات	عدد و(%) العزلات المقاومة لكل صاد حيوي				
		AM	PT	TE	ER	GN
الزوائف Pseudomonas	37	36 (97)	6 (16)	32 (86)	34 (92)	20 (54)
ايروموناس Aeromonas	20	18 (90)	19 (95)	11 (55)	12 (60)	2 (10)
فلافوباكتر Flavobacterium	26	21 (81)	4 (15)	20 (77)	25 (96)	25 (96)
كروموباكتر Chromobacterium	20	17 (85)	7 (35)	3 (15)	18 (90)	2 (10)
اسينيتوباكتر Acinetobacterium	18	6 (33)	9 (50)	2 (11)	8 (44)	4 (22)
ميتيلوباكتر Methylobacterium	12	6 (50)	3 (25)	1 (8)	4 (33)	2 (17)

وأفراد الفلافوباكتر عصيات طويلة سالبة غرام غير متحركة لاتخمرية أو أنها تخمرية ضعيفة محللـة للبـروتين تـشكل مـستعمرات صـفراء اللـون (*Vancanneyt et al 1996,Vandamme et al 1994*)، وهي تسبب أمراضاً مهمة عند الإنسان التهاب عضلة القلب، وتجرثم الدم، والتهاب السحايا، وذات الرئة (*Bucei and Holland 1991,Lee et al 1976,Sundia et al 1991*)، أما عن مقاومة السلالات للكلورين فقد عزل معظمها في هذه الدراسة من العينات المائية ذات المحتوى الكلوريني المنخفض والمتوسط (الجدول1)، ولكنها أظهرت جميعاً مقاومة للكلورين في المختبر. وتتميز معظم سلالات الفلافوبـاكتر المعروفة بمقاومتها للعديد من الصادات الحيوية بمـا فيهـا صـادات زمـرة بيتالاكتـام والأمينوغليكوزيـدات والكلورامفينيكـول (*Braun 1987,Aber et al 1978,Fass and Barnishan 1980*)، وكان الصاد الأكثر فاعلية ضد أفراد الفلافوباكتر في هذه الدراسـة PT(MIC=16/4) ونـسبة مقاومتـه 15%، وكانـت الـصادات الأقـل فاعليـة GN (MIC_{90}=64) و CT (MIC_{90}=128) و ER (MIC_{90}=64) مع نسبة مقاومـة لكـل منهـا 96%.

الجدول (4) ب ـ نسب المقاومة عند الجراثيم .

الجرثوم	عدد العزلات	عدد و(%) العزلات المقاومة لكل صاد حيوي				
		CH	CF	CP	CT	AK
الزوائف Pseudomonas	37	37 (100)	34 (92)	4 (11)	3 (8)	3 (8)

2 (10)	3 (15)	1 (5)	6 (30)	17 (85)	20	**ايروموناس Aeromonas**
13 (50)	25 (96)	12 (46)	24 (92)	19 (73)	26	**فلافوباكتر Flavobacterium**
11 (55)	3 (15)	2 (10)	19 (95)	6 (30)	20	**كروموباكتر Chromobacterium**
16 (89)	15 (83)	16 (89)	16 (89)	5 (28)	18	**اسينيتوباكتر Acinetobacterium**
10 (83)	11 (92)	5 (42)	10 (83)	9 (75)	12	**ميتيلوباكتر Methylobacterium**

وأفراد الأسينيتوباكتر مكورات عصوية أو مكورات سالبة غرام واسعة الانتشار في الطبيعة Ubiquitous كما توجد على الجلد وفي الأغشية المخاطية والمفرزات (*Baumann 1968,Bifulco et al 1989, Brooks et al 1998*) وتتميز بقدرتها على مقاومة الصادات الحيوية ولكنها حساسة للصادات GN,AK,CF (*Bergogne-Berezin 1995,Towner 1997*)، وكان الصاد الأكثر فاعلية ضد أفراد لأسينيتوباكتر في هذه الدراسة TE (MIC_{90}>4) ونسبة مقاومته 11%، أما الصادات الأقل فاعلية فكانت AK (MIC_{90}>64) و(MIC_{90}>32) CF مع نسبة مقاومة لكل منها 89%، أما في المختبر فقد قاومت السلالات المعزولة الكلورين باستثناء سلالتين كانتا قد عزلتا من العينات المائية ذات المحتوى الكلوريني الأخفض.

الجدول (5) النتائج المختبرية لتأثير الكلورين في الجراثيم المعزولة تبعاً للزمن.

الجـــرثـــوم	**عدد العزلات**	**النسبة المئوية (%) للعزلات المستمرة حيويا بتماس 0.5 ملغ/ل كلورين خلال الأزمنة الآتية (مقدرة بالدقائق)**				
		≥5د	**10– 5 د**	**15-10 د**	**20-15 د**	**≤30 د**
الزوائف Pseudomonas	37	100	100	100	100	100
ايروموناس Aeromonas	20	100	90	80	0	0
فلافوباكتر Flavobacterium	26	100	100	100	100	100
كروموباكتر Chromobacterium	20	100	100	0	0	0
اسينيتوباكتر Acinetobacterium	18	83.33	83.33	83.33	83.33	83.33
ميتيلوباكتر Methylobacterium	12	100	100	100	75	75

وتوجد أفراد الكروموباكتر من عصيات سالبة غرام في المياه والتربة وتنتج صباغاً بنفسجي اللون وتصيب الإنسان عبر الجلد والأمعاء مسببة حدوث خراجات وإسهالات والعديد من الوفيات (*Holmes et al 1995, Silvendra et al 1975, Suarez et al 1986*)، وهي غالباً حساسة للصادات CH,TE,GN (*Brooks et al 1998*)، وكان الصاد الأكثر فاعلية

ضد أفراد الكروموباكتر في هذه الدراسة GN (MIC=4) وCP (MIC=1) ونسبة مقاومته لكل منهما10%، أما الصاد الأقل فاعلية فكان CF (MIC_{90}=128) مع نسبة مقاومة 95%. وكانت جميع سلالات الكروموباكتر مقاومة للكلورين في المختبر ولكنها لم تستمر حية أكثر من عشر دقائق.

وأفراد الميتيلوباكتر عبارة عن عصيات سالبة غرام هوائية تنتمي إليها تسعة أنواع، والنوع النمط هو *M.organophilum*، توجد في مختلف البيئات الطبيعية: التربة والغبار والهواء والماء العذب والرسوبيات المائية وتظهر أيضاً في البيئات الصنعية مثل شبكات توزيع مياه الشرب والحمامات والمغاسل (*Patt et al 1976,Furuhata and Matsumoto 1992*)، ومن الجدير بالذكر أن معظم االدراسات تؤكد أن معظم سلالات الميتيلوباكتر المعزولة من هذه البيئات المختلفة كان مقاوماً جداً للكلورين (*Furuhata Kaneko and Hiraishi 1991, and Koike 1993*) وهذا ما يفسر وجودها الغزير في البيئات الصنعية أعلاه، يضاف إلى ذلك أن بعض السلالات المعزولة كانت عوامل ممرضة انتهازية تم عزلها من مصادر طبية ومتنوعة ومن المستشفيات (*Furuhata and Koike 1990*)، لذلك فإن وجودها في مياه الشرب يعد خطراً صحياً كامناً، وقد تبين في هذه الدراسة أن جميع االسلالات المعزولة ذات قدرة عالية على مقاومة الكلورين في المختبر وقد استمر معظمها حياً لأكثر من 20 دقيقة من زمن تماسها مع المحلول الكلوريني، وتتوافق هذه النتيجة مع ماهو معروف عن مقاومة أفراد هذا الجنس للكلورين (*Furuhata and Koike 1993*)، وفيما يتعلق بمقاومة سلالات الميتيلوباكتر للصادات الحيوية فالمعروف أن سلالات الميتيلوباكتر حساسة للصادات GN,KA,TE (*Hiraishi et al 1995*)، وقد تبين في هذه الدراسة أن المقاومة مرتفعة بصورة عامة لمعظم الصادات المستعملة والصاد الأكثر تأثيراً كان TE(MIC_{90}=4) مع نسبة مقاومة 8% وكان الصاد الأضعف CT (MIC_{90}>32).

وهكذا فقد أكدت الاختبارات المختلفة في هذه الدراسة الآتي:

1- كانت خاصية مقاومة الكلورين في المختبر عامة تقريباً لجميع السلالات الجرثومية المعزولة من عينات مياه الشرب المكلورة، ولم يتعلق ذلك بمحتوى الكلورين المتبقي في العينات المائية المعزولة منها .
2- أظهرت جميع السلالات الجرثومية المقاومة للكلورين مقاومة متعددة للصادات الحيوية، إذ قاومت أكثر من ثلاثة صادات حيوية مجتمعة بل أكثر من خمسة.
3- كان الصاد الحيوي الأكثر فاعلية في التأثير في هذه الجراثيم المعزولة مجتمعة بصورة عامة سيبروفلوكساسين CP. والصاد الأقل فاعلية سيفالوتين CF وامبيسيللين AM .

4- كانت الجراثيم الأكثر مقاومة للـصادات الحيويـة بـصورة عامـة سـلالات الفلافوباكتر والجراثيم الأكثر تحسساً كانت الكروموباكتر.

وهكذا فمن المؤكد حدوث انتخاب للجراثيم المقاومة للكلورين مع الزمن وذلك بفعـل تطبيق الكلورة على مياه الشرب، وهذه المقاومة تمنح الجراثيم ميـزات إضـافية أهمهـا بالنسبة لصحة الإنسان هـي مقاومـة الـصادات الحيويـة (*Armstrong et al 1881, Ridgway et al 1982*.)، ومن خلال مقارنة نتائج هذه الدراسة مـع نتـائج الدراسـات المرجعية تبين أن مقاومة الكلورين والصادات الحيوية عند سـلالات الجـراثيم غيريـة التغذية المعزولة من مياه الشرب باللاذقية لم تكن منخفضة أو أخفض مما هي عليه فـي هذه الدراسات، بل زادت في كثير من السلالات المعزولة وقد يعود ذلك إلى تحمل هـذه الجراثيم لجرعات أكبر من الكلورين هي في الأصل غير نظامية في معالجة مياه الشرب، إضافة إلى الاستعمال العشوائي للصادات الحيوية بصورة عامة، وهذا ما يقتضي ضرورة الاهتمام بهذه المسألة من منظور صحة مياه الشرب تحديداً، بالإضافة إلى أهميـة تحديـد كمية الكلورين الحر المتبقي المطلوبة وزمن التماس المناسب مع الأخـذ فـي الحـسبان الظروف المحلية مثل درجة حرارة الماء وتغيراتها الفصلية وقيمة دالة الهيـدروجين pH وذلك بغية تحقيق معالجة مثلى لمياه الشرب باللاذقية أو ما يماثلها.

REFERENCES المراجـع

Aber, R. C., Wennersten, C., and Moellering, R. C. 1978. Antimicrobial susceptibility of flavobacteria. *Antimicrob.Agents Chemother*.14:483-487.

Armstrong, J. L., Shigeno, D. S., Calomiris, J. J., and Seidler, R. J. 1981. antibiotic-resistant bacteria in drinking water.*Appl.Environ.Microbiol*.42(2): 277-283.

Baumann, P. 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriology*. 96: 39-42

Bergogne-Berezin, E. 1995. The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp: the need for control and new agents.*J.Hosp.ifect.* 30:441-452.

Bifulco, l. M., Shirey, J. J., and Bissonnatte, G. K. 1989. Detection of *Acinetobacter* spp. In rural drinking water supplies, *Appl. Environ. Microbiol*. 55: 2214-2219.

Braun, B. 1987. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium meningosepticum* strains identified by DNA-DNA hybridazation. *Acta Pathol. Microbiol .Immunol. Scand. Sect.* B.95:95-101.

Brooks, G. F., Butel, J. S., and Morse, S. A. 1998. Medical microbiology, twenty-first edition, Appelton&Lange publication.

Bucei, F. A. Jr., and Holland, E. J. 1991. *Flavobacterium meningosepticum* keratitis successfully treated with topical trimethoprim-sulfamethoxazole.*Am.J.Ophthalmol*.111:116-118.

Deodhar, L. P., Sarawathi, K., and Varudkar, V. 1991. *Aeromonas* spp. And their association with human diarreal disease. *J.Clin.Microbiol*. 29: 863-866.

EEC. 1980.EC Directive relating to the quality of water intended for human consumption, 80/778/EEC,*Official Journal* L229.

Egorov, A., Ford, T., Tereschenko, A., Drizhd, N., Segedevich, I., Fourman, V. 2002. Deterioration of drinking water quality in the distribution system and gastrointestinal morbidity in a Russian city, *International Journal of Health Research*, Sept; 12 (3):221-233.

Fass, R. J., and Barnishan, J. 1980. Invitro susceptibilities of non-fermentative gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* to 32 antimicrobial agents. *Rev. Infect.Dis*.2:841-853.

Furuhata, K., and Koike, K. A. 1990.Characteristics and antibiotic susceptibility of *Methylobacter extroquens* isolated from drinking water and air in hospital.*Nikkanshi* 5:47-51.

Furuhata, K., and Koike, K. A. 1993. Isolation of *Methylobacterium spp* from drinking-tank water and resistance of isolates to chlorine.*Koshou* 40:1047-153.

Furuhata, K., and Matsumoto, A. 1992. Some bacteriological studies on the pinkish slimy films formed on tiles using bathrooms and washstands. *Annu. Rep. Tokyo Metrop.Res.LabPublic Health* 43:197-204.

Ghanen, E. H., Mussa, M. E., AND Eraki, H. M. 1993. Aeromonas associated gastroenteritits in Egypt.*Zentrablatt fur Mikrobiologie*,148,441-447.

Grabow, W., Prozesky, W., and Smith,L.S. 1974. Drug resistant coliforms, call for review of water quality standards.*Water.res*.8:1-9.

Grobe, S., Wingender, J., and Felmming, H. C. 2001. Capability of mucoid *pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorenated water. *Int. j. Hyg. Environ. Health*. Nov; 204 (2-3):139-142.

Hiraishi, A., Furuhata, K., Matsumoto, A., Koike, K. A., Fukuyama. M., and Tabuchi. K. 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from varius environments.*Appl and Environ Microbiol*, Jun,2099-2107.

HMSO. 1999. The microbiology of water, part 1-Drinking water.Report of public health and medical subjects.No 71.HMSO publications,London,UK.

Holmes, B., Pickett, M. J., and Holl, D. 1995. Unusual gram-negative bacteria,including Capnocytophaga,Fikenella,Pasteurella,p.499-508 In Murry, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Yolken,R.H.(ed), Manual of clinical microbiology,6th ed.ASM Press,Washington,D.C.

Kaneko, M., and Hiraishi,A. 1991.Physico-chemical and microbiological research on pink-colored aggregates found in a potable water treatment and distribution system.*J.Jpn.WaterWorks Assoc.* 60:23-34.

King, C. H., Shotts, E. B., Wooley, R. E., and Porter, K. G. 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl.Environ. Microbiol*.54(12): 3023-3033.

Ko, W.C., and Chuang , Y.C. 1995. *Aeromonas* bacteremia: review of 59 episodes. *Clin. Infect. Dis*. 10: 980-996

Kuchta, J. M., States, S. J., McNamara, A. M., Wadowsky, R. M., and Yee, R. B. 1983. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water.*Appl.Environ.Microbiol*. 46(5):1134-1139.

Le Chevallier, M. W., Seidler, R. T., and Evans, T. M. 1980. Enumeration and chracterization of standard plate count,Appl.*Environ Microbiology*, Nov; 40(5):922-930.

Lee, E. L., Robinson, M. J., Thong, M. L., and Puthucheary.1976. Rifamycin in neonatal flavobacteria meningitis.*Arch.Dis.Child*.51:209-213.

Mackereth, F. J. H., Heron, J., Talling, J. F. 1989. Water analysis, *Freshwater Biological Association*,scientific publication No 36,UK.

Morozzi, G., Cenci, G., Caldini, G., Sportolari, R., and Bahojbi, A. G. 1988. Development of antibiotic resistance in purified sewage effluents subjected to chlorination. *Ann.Ig*. 1(1-2):351-362

Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Yolken, R. H. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Moore, A. C., Herwaldt, B. L., Craun, G. F., Calderon, R. L. 1993. Surviellance of waterborne disease outbreaks-United States, 1991-1992, *MMWR*, 42,1-22.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, pa.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed., vol.20.no.2. Approved standard M7-A5, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, pa.

Papandreou,S.,Pagonopoulou,O.,Vantarakis, A., and Papapertropoulou, M. 2000. Multiantibiotic resistance of gram-negative bacteria isolated from drinking water samples in southwest Greece.*J.Chemother*,Aug; 12:267-273.

Papapertropoulou, M., Iliopoulou, J., Rodopoulou, G., Detorakis, J., and Paniara, O. 1994. Occurrence and antibiotic- resistance of *Pseudomonase* species isolated from drinking water in Southern Greece.*Journal of Chemotherapy*. 6:111-116.

Patt, T. E., Cole, G. E., and Hanson, R. S. 1976. *Methylobacterium*, a new genus of faculatively methylotrophic bacteria.*Int.J.Syst.Bacteriol*,26:226-229.

Prescott, L. M., Harley, j. p., and Klein, D. A. (Eds). 1993.*Microbiology*. William G Brown,Iowa.

Reasoner, D. J., and Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan.1-7.

Reasoner, Blannon, J. C., Geldreich, E. E., and Barnick. 1989. Nonphosynthetic pigmented bacteria in a potable water treatment and distribution system, *Applied and Environmental Microbiology*. Apr. 912-921

Ridgway,H.F., and Olson, B. H. 1982. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl.Environ. Microbiol*. 44(4): 972-987.

Silvendra, R., Lo, H. S., and Lim, K.T.1975. Identification of *Chromobacterium*: pigmented and non pigmented strains,*J.Gen.Microbiol*.90:21-31.

Suarez, A. E., Wenokur, B., Jo hnson,J.M., and Saravolatz,L.D.1986. Nonfatal chromobacterial sepsis.*South.Med.J*.79:1146-1148.

Sundia, D., Gold, B. D., Berkowitz, F. e., Schwartz, D, A., and Goo, D. 1991. Community-acquired *Flavobacterium meningosepticum* meningitis, pneumonia and septicemia in a normal infant.*Pediatr.Infect.Dis.J*. 10:73-76.

Sutcliffe, D. W. 1997. The microbiological quality of water,Freshwater Biological Association,UK.

Towner, K. J. 1997. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp.*J.Med.Microbiol*.46:721-746.

Vancanneyt, M., Segers, P., Torek, U., Host, B., Bernadet, J. F., Vandamme, P., and Kersters, K. 1996. Reclassificatin of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains to a new genus,*Myroides* as *Myroides odoratus* comb.nov.and *Myroides odoratum* sp.nov .*J.Syst.Bacteriol.* 46:926-932.

Vandamme, P., Bernadet, J. F., Segers, P., Kersters, K and Holmes, B. 1994. New prespectives in the classification of the flavobacteria: descreption of *Chrysobacterium* gen .nov.*Bergeyella* gen.nov., and *Empedobacter* nom.rev. *Int.J. Syst.Bacteriol*. 44:827-831.