تأثر فاعلية المضادات الحيوية المضادة لبكتريا STAPHYLOCOCCUS AUREUS بالأشعة فوق البنفسجية والأحماض الأمينية[+]

THE EFFECT OF ULTRA VIOLET , SOME AMINO ACIDS AND VITAMINS ON THE SUSCEPTIBILITY TO SOME ANTIBIOTICS AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS

مي حاتم شفيق [*] سحر قاسم الزبيدي [**] عبد الله لفتة المعموري [***]

المستخلص :

اجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير بعض الأحماض الأمينية والفيتامينات على نمو بكتريا العنقوديات وحساسيتها للأشعة فوق البنفسجية إذ لوحظ تثبيط قليل للنمو البكتيري لأن الأحماض الأمينية والفيتامينات كانت تعمل على اصلاح الضرر الناتج عن تأثير تلك الأشعة .

كما درس تأثير مجموعتين من المضادات الحيوية على النمو والفعالية الكيمياحيوية لبكتريا العنقوديات الذهبية ومدى امكانية تداخل هذه الأحماض الأمينية والفيتامينات مع فعالية المضادات الحيوية ضد البكتريا لأن هذه الأحماض الأمينية والفيتامينات توفر حماية للبكتريا ضد مضادات الحيوية وتعمل على اصلاح الضرر الناتج عن عمل المضاد .

Abstract :

This research was performed to study the effect of some amino acids and vitamins on the growth of bacteria Staphylococcus aureas and its sensitivity against *UV* light .

The results showed low inhibition in bacterial growth because amino acids repairs the damges caused by *UV* light .

Besides ,the effect of two groups of antibiotics (β - lactame and tetracycline) on the growth of S. aureus and the possible interference of amino acids and vitamins in the activity of the antibiotics against this bacteria in the presence of *UV* light were studied.

The result show increase in the sensitivity towards these antibiotics and provided protection against the antibiotics .

المقدمة :

تعتبر جرثومة العنقوديات الذهبية Staphylococcus aureus من الجراثيم الملوثة للأغذية والمسببة للعديد من التسممات وذلك لكونها تعزز السموم المعدية

[+] تاريخ استلام البحث : ٢٠٠١/٣/١٩ ، تاريخ قبول النشر : ٢٠٠١/٩/١٩

[*] أستاذ مساعد / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد .

[**] مدرس مساعد / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد .

[***] مدرس مساعد / المعهد الطبي الفني / بغداد .

Enterotoxins من الأغذية المـــــلوثة بهـــا ، يعتبر الأنســـان من اهم المـصادر الرئيسية لتـــلوث الأغذية بهذه الـــجرثومة وذلك لـــكونها تستوطن الأنف واللوزتين والحنجرة لغـــــالبية النـــــاس [1] . وتستخدم الـــعديد من العوامل الفـيزيـــائية والكيـميـائية للحد من هـذه الجرثومـة فمثـــلا تستـخدم الأشعة فوق البنـفسجية للتـــعقيم في معـــامل المعـلبـات وفي صـــالات العمـليـــات حيث ان هذه الأشعة تحـدث تأثيرات بايولـوجية مختـلفة في خلايا البكتريا [2] . كـما ان لجرثومـة العنقوديـــات الذهبية القـــابلية على مقـاومة تأثير الكثير من المضادات الحيوية بسبب امتلاكها آليات متعددة للمقاومة [3] . وقد ذكرت [4] امكانية حدوث تداخل سلبي في العلاج بمضـادات الحيوية مـع العـــلاج بمحلول فامين المغذي (وهو محـلول يحتوي على 20 حامضاً امينياً) والـذي يعطـي عـادة للـمرضى وخاصة بعد العمليات الجراحية وحالات الأغماء الطويلة الأمد .

وقد اجريت هذه الدراسة لمعرفة تـأثير كل من الأشعة فوق البنفسجية وبعض الأحمـاض الأمينيـة والفيتامينـات على نمو جرثومة العنقوديات الذهبية وكذلك لمعرفة مدى حساسيتها للمـضـــادات الحيويـة المتداولة حاليـا وذلك من اجل السيطرة على نمو هذه الجرثومة والتقليل من خطورتها .

المواد وطرق العمل :

تم الحصول على 100 عزلـة لجرثومة العنقوديات الذهبية من الأغذية المستخدمة في المستـشفيات وقد نميت في وسط المرق المغذي Nutrient broth وحضنت لـمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م ثم زرعت على أطباق المانيتول الملحي (Mannitol Salt Agar) شخصت المستعمرات حـسب الطـرق القياسية باستخدام ملون غرام والأختبـارات الكيميـاحيوية [5] وتم ايجاد منحنى النمو لعدد من عـزلات جرثومة العنقوديـات الذهبية للتعرف على الطور اللوغارتمي لها والوقت الذي تستغرقه الجرثومة للتوصل لهذا الطور حيث بلغ (3) ساعات وكان معدل عدد الخلايا cell ☜ ml (10^6 – 10^5) .

اختبار المعاملة مع الأحماض الأمينية :

أضيفت الـتراكـيز المختارة من محاليل الأحمـاض الأمينيـة (المثـــيونين Methionine) و (الأسبـارجين Aspargin) وبعض الفيتـامينـات (حـامض الفوليك Folic acid) و (الحديد Iron) الى انابيب حاوية على محـــلول الملح الأساس (B . S .) Basal salt والـذي يحـضر بـــاذابة 250غم كلوريد الصوديوم و 20 غم من كبريتـات المغنيسيوم المائية ، 2 غم من كلوريد البوتاسيوم و 3 غم من ثلاثي سترات الصوديوم في 1000 مل من الماء المقطر ويعدل الباء هاء الـى 7.2 بـــاستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم 1 عياري ويعقم بجهـاز الموصدة ويترك أنبوب اضـافي كسيطرة Control . لقحت الأنـــابيب بمزروع لجرثومة العنقوديـات الذهبية بعمر (18 ساعة) . حضنت الأنـابيب لمدة (18 ساعة) بدرجة حرارة 37 م للتعرف على نمو الجرثومة .

اختبار التعرض للأشعة فوق البنفسجية

نميت العزلات في أنابيب حـاوية على 10 مل من وسط مـزق القلـب والـدماغ Brain heart infusion broth لمدة (3 ساعات) في 37م بشكل يكون تعدادها cell ☜ ml (10^6 – 10^5) تم

تعريضها الى الأشعة فوق البنفسجية ولمدة 30 دقيقة ، بعدهـــا تم احتساب التـــعداد البكـــتيري ، وقد تم اجراء هذه التجربة حسب طريقة [6] بعدهـــا تم تنمية العزلات المعرضة للأشعة على أطباق وسط المرق المغذي الحاوي على أحماض أمينية أو فيتامينات كل على انفراد وتم حساب التعداد البكتيـــري بعـــد حـــضن الأطباق لمدة (24 ساعة) بدرجة ٣٧ ° م.

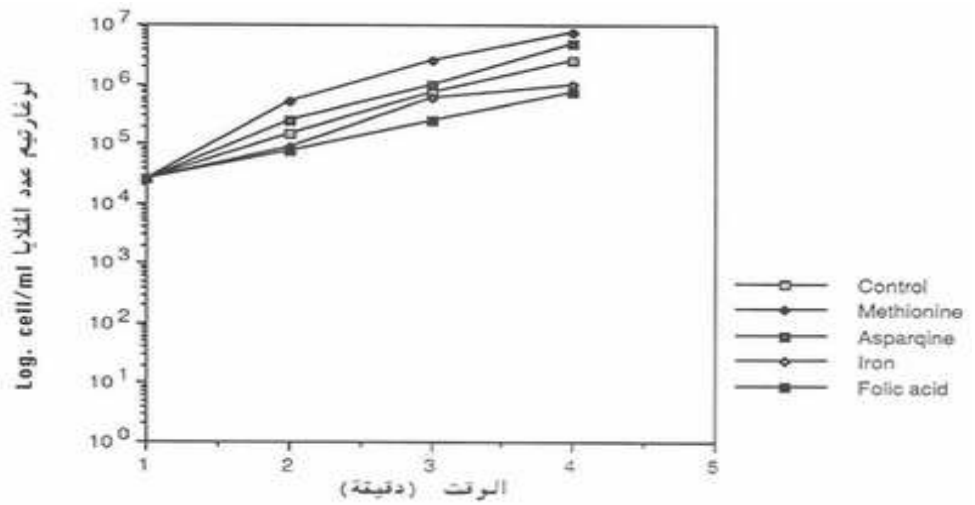
اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

أجريت اختبارات الحساسية قبل وبعد التعرض للأشعة فـــوق الـــبنفـــــسجية حـــسب طريقـــة[7] واستـــخدمت أقراص للمضادات الحيوية والمجهزة من شركة Oxoid والمقاسة بالملغرام / قرص : بنسلين (Peni) Penicillin (2.5) أموكسلين (Amo) Amoxylin، تتراســـايكلين (TE) Tetracyclin ، سيفوتاكسيم (CTX) Cefotaxime (30) . سجـــلت النتـــــائج بقيـــاس قطر منطقـــة التثبـــــيط Inhibition zone بالملمترات حول القرص وقورنت بالمعدلات القياسية لقطر منطقة التثبـــيط للمـــضادات الحيوية [8] .

النتائج والمناقشة

التعرض للأحماض الأمينية

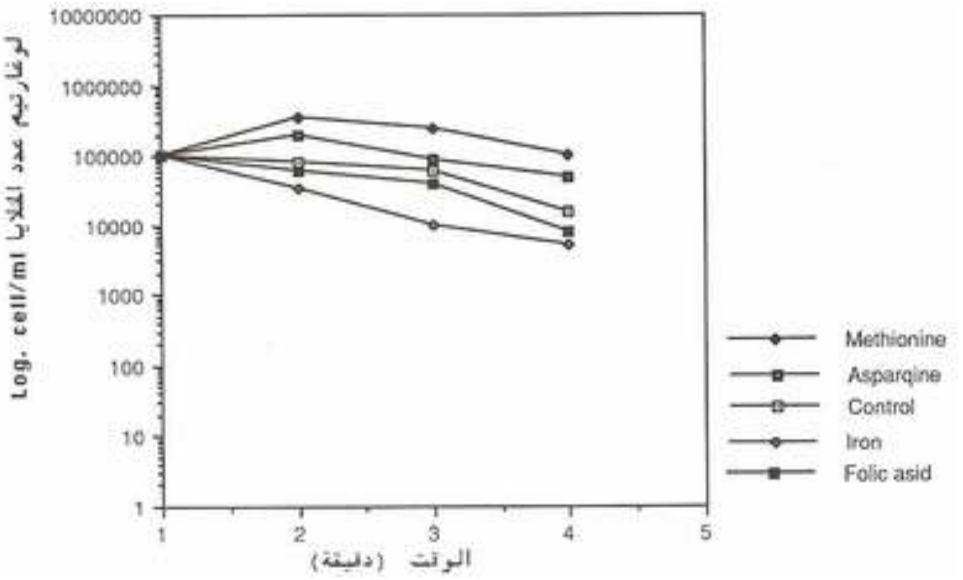
يـــلاحظ من نتـــــائج شكـــل (1) ان تنميـــة جرثومـــة العنقوديـــــات الـــــذهبية علـــى وســـط حـــــــــاوي على المثيونين أو الأسبـــارجين يؤدي الى تحفيز الجرثومة مقـــــارنة بعزلة السيـــطرة فـــي حين يقـــل النمو عند تنمية الجرثومة عـــلى وسط حـــــاوي على حـــامض الفوليك او الحـــــــديد ويعـــود الـــــــسبب في تحفيز النمو هو أن للأحمـــــاض الأمينية دورا مهمـــــا في تخليق كل من الببتيدو كلايكان Peptidoglycan والبروتين في الخلايا البكتيرية [9 ، 4]. أمـــا حـــــــــامض الفوليـــك فهـــو مـــن الفيتـــــامينات الأســـــاسية وخاصة للبـــــائن لأنه يدخل مع العديد مـــن الأنزيمـــات كمرافقـــات انزيميـــة خصوصـــا تـــــــــلك التي تشترك في تمثيل المواد الحـــــاوية على ذرة كاربون واحدة مثل الفورمـــــات Formate ومجـــــــاميع المثيـــل Methyl – group عنـــد تخـــــــليق الحـــوامض الأمينيـــة والنيوكـــــليوتيدات وللعـــــديد من البـــكتريـــــا القـــــابـــــلية على تكـــوين حـــــامض الفوليك [10] .



شكل (1): عزلات جرثومة العنقودية الذهبية المعاملة بالأحماض الأمينية والفيتامينات

<u>إختبار التعرض للأشعة فوق البنفسجية :</u>

يلاحظ من شكل (2) أن الأشعة فوق البنفسجية قد ثبطت النمو البكتيري لجميع العزلات ، ولكن العزلات المعاملة بالأحماض الأمينية كالمثيونين والأسبارجين هي الأكثر مقاومة مقارنة بعزلة السيطرة والعزلة المعاملة بحامض الفوليك أو الحديد وقد ذكر [2] أن الأشعة فوق البنفسجية تؤثر بشكل رئيسي على الحوامض النووية Nucleic acid والتي تشكل المادة الوراثية للخلية ، كما وتسبب تمسخ البروتينات Denaturation وتؤثر الأشعة في الـ DNA أكبر من الـ RNA حيث تكون مزدوجات البايريميدين في جزيئة الـ DNA وخاصة مزدوجات الثايمين [11] كما وجدت [12] انها تؤثر في مجالات تخليق الأحماض الأمينية ، أما اصلاح ضرر الأشعة فيتم بازالة المزدوجات المتكونة في الحامض النووي بعمليات تصليح انزيمية مختلفة عند توفر الظروف المناسبة للخلايا [13] وان وجود الأحماض الأمينية والفيتامينات في الوسط يساعد في عملية الأصلاح أو التقليل من أثر الأشعة على البكتريا . وقد ذكر [10] أن وجود آيون الحديد في الوسط يساعد على زيادة مقاومة البكتريا للعوامل الخارجية غير الطبيعية ، وأن قلة تركيز آيون الحديد في الوسط يقلل من مقاومة البكتريا للحرارة .

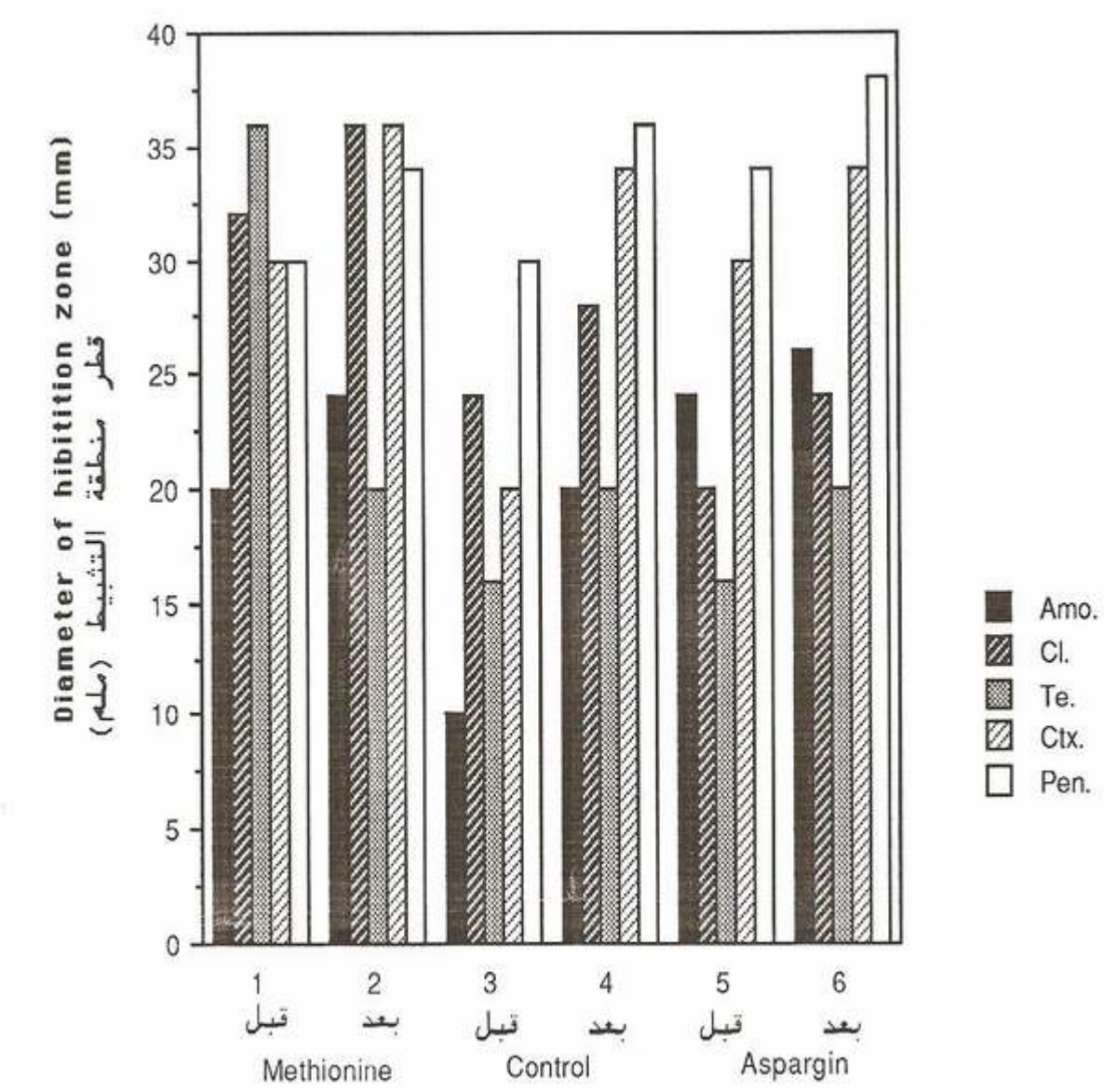


شكل (2): تـأثير الأشعة فوق البنفسـجية على عزلات جرثومة العنقوديـات الذهبية المعاملة بالأحماض الأمينية والفيتـامينات

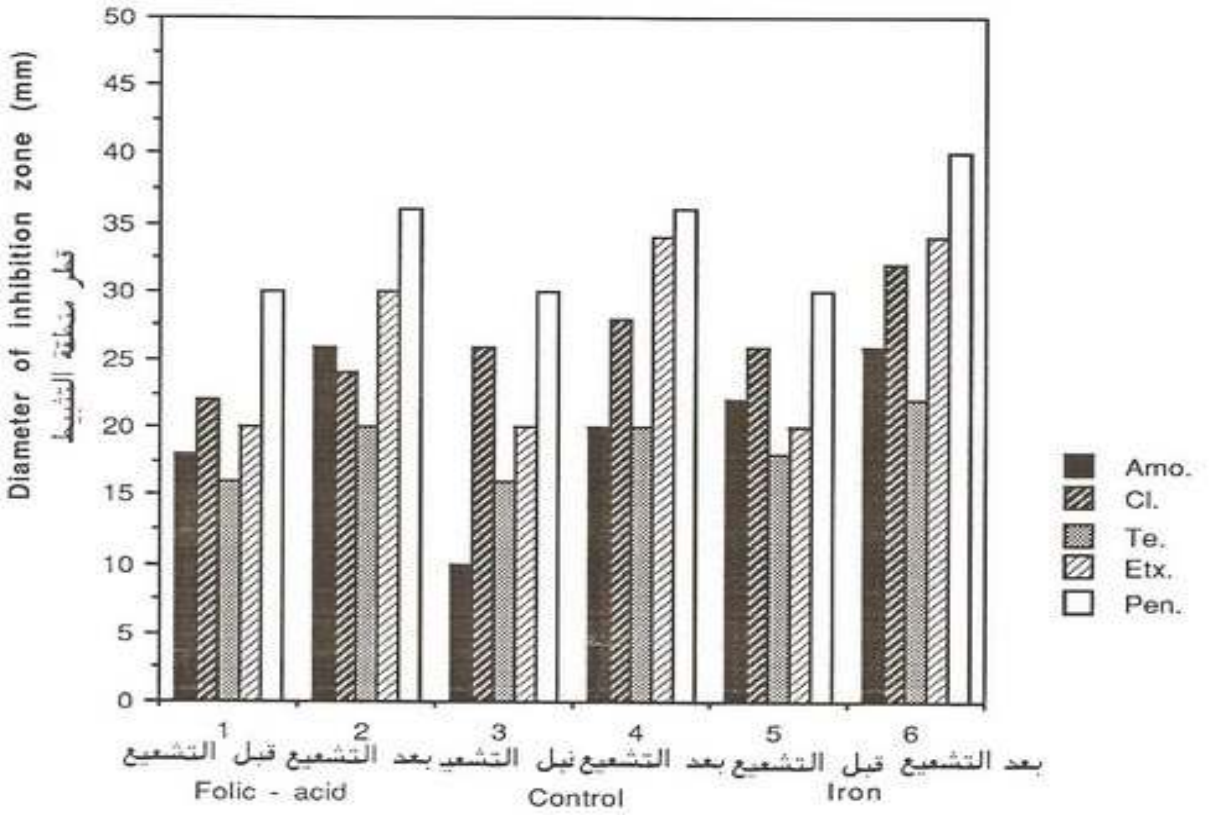
<u>اختبار الحساسية للمضادات الحيوية</u>

يـلاحظ في شـكل (3) أن جرثومة العنقوديـات الذهبيـة المعـاملة بـالمثيونين كـانت مقـاومة لمضادات الأموكسيلين قبل وبعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية ولـكنهـا كـانت حسـاسة لبقية المضـادات وبقيت حساسـة لها حتى بعد التعرض للأشعة . أما العزلات المعامـلة بالأسبارجين لـوحظ أنها كانت مقاومة للمضـادات (الأموكسيلين والتتراسايكلين) ولكن بعد التعرض للأشـعة بقيـت مقاومـة للأمـوكسيـلين وأصبحت حسـاسة للتتراسـايكلين . أما عزلات السيطرة فأنها كانـت مقاومـة لكـل المضادات ما عدا مضادي السيفـالـكسين والبنسـلين فأنها كانت حسـاسة لـهما ، وربمـا يرجع السبب في هذا الى نوع السلالة المحلية المعزولة .

أما بعد التعرض للأشعة فقد أصيـحت العـزلات حـساسة لكـل المـضـادات الحيويـة مـا عدا مضـاد الأموكسيـلين فقد بقـيت الـعزلات مقاومة له وربما يرجع السبب الى كثرة الأستعمال المحلي لمضاد الأموكسيلين في بلدنا .



شكل (3): حساسية العنقوديات الذهبية المعاملة بالمثيونين أو الأسبارجين لبعض المضادات الحيوية قبل وبعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية



شكل (٤): حساسية العنقوديات الذهبية المعاملة بحامض الفوليك أو الحديد لبعض المضادات الحيوية
قبل وبعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية

في الشكل (4) نلاحظ ، كل العزلات المعاملة بحامض الفوليك والحديد كانت مقاومة لمضادات الموكسيلين والتتراسايكلين والسيفاتوكسيم . ولكن بعد التعريض للأشعة اصبحت العزلات حساسة للتتراسايكلين والسيفاتوكسيم.

ان تاثير المضادات البيتالاكتامية β−lactame والتي تضم كل من (البنسلين ، الأموكسيلين ، والسيفاتوكسيم) تؤثر وبشكل قاتل actericidal وذلك من خلال تثبيط تخليق طبقة البيبتيدوكلايكان وذلك عن طريق منع حصول ارتباط التصالب Cross linkage وهو الأرتباط الذي يحصل بين سلسلتي الأحماض الأمينية ضمن الخطوة الأخيرة في تخليق الجدار الخلوي للخلية البكتيرية [4] اما التتراسايكلين فأنه يتداخل مع عملية تصنيع البروتين في الخلية البكتيرية كما تتداخل بعض المضادات مع تخليق حامض الفوليك إذ انها تؤثر على الأنزيمات المشتركة في تخليق حامض الفوليك [10] ولكن اضافة الأحماض الأمينية الى الوسط ساعد على حماية البكتريا من تأثيرات المضادات الحيوية وهذا يتفق مع ماتوصلت اليه [4] عند دراسة تأثير محلول الفامين المغذي الى وسط MBS على نمو بكتريا E. coli المعاملة بالمضادات البيتالاكتامية (البنسلين ، الكلوكساسيلين ، والأمبيسيلين) كما أشارت [4] الى ان وجود الأحماض الأمينية في الوسط الزرعي يعوض عن النقص الذي قد يحصل داخل الخلية البكتيرية المعاملة بالمضادات . وقد ذكرت [٤] أن اضافة كل

من حامض الميثيومين والأسبارجين الى الوسط الزرعي يسبب مقاومة بكتريا E. coli للمضادين الحيـــويين الجنتامايسين والستربتومايسين .

References :

1. Kloss W.E. " Natural population of the genus Staphyiococcus " *An . Re .Microbial* . Vol. 34 , pp. 559 – 592 , 1980 .
2. Eisenstark A. " Mutagenic and lethal effect of visible avd nearultraviolet light on bacteria cell E.W. caspari (ed)" *Advances in Genetics ,* Vol. 12, academic press New York , pp. 167 – 198 , 1971 .
3. Al-Najjar A.R. and Al-Salmman H. "Studies on the epidemiology of S. aureus drug resistance " *J.Fac.Med. Baghdad ,* Vol. 21, No. 1, pp. 61 – 63 , 1979 .
4. Amash H.S. & S. kassim " Inactivaition of β - lactam antibiotics against E. coli by vamin nutritional supplementation Accepted for presentation " *5th scientific conference of the Scientific research council Baghdad, Iraq* . April 28th – May 2nd 1989 , 1988 .
5. Kloss W.E. & Schleifer K.H. " Genus Staphylococcus " *Bergeys manual of Systematic bacteriology [Sneath P.H.A. Mair N.S. and HOH J.G.eds]* Vol. 2 Williams and Wilkins Co. Baltimore Md. U.S.A. PP. 1013 – 1035 , 1984 .
6. Al – Shaickly M.A.S.A.B.gones & A. Tallentire . " Response to gamma radiation of dried B.shaericus C.A. spores and reletave resistance of spores & vegetative cells of B. shaericue , B. megaterium and B. pumilus to ultraviolet and gamma radiations " *Spore research , Baker A.N.,GW. could and J.wolf (Ed.) academic press . London ,* 1971 .
7. Barry A.L. Garcia F. & Thrupp . L.D. " An improved single – disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens " *Am. G.clin. path.* Vol. 53, pp. 149 – 158 , 1970 .
8. "National Committee of clinical laboratory standards " *performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests* Vol. 7 , No. 10 , 1988 .
9. Amash H.S. & S. Kassim " Effect of amino acid supplementation on the toxicity of two aminoglycoside antibiotics to E. coli " 1988 b.
10. Brock T.D." Biology of microorganism Prentic – Hall " *Inc Englwood cliff . new jersey ,* 1979 .
11. Setlow R.B. & W.L. Carrier " Pyrimidine dimmers in ultraviolet irradiated DNA" *S.J.Mol.Bjol.* Vol. 17 , pp. 237 – 254 , 1966 .
12. Amash H.S. " Free radicals effects on metabolic processes " *PHD Thesis University of Missouri U.S.A.* , 1983 .
13. SetlowR.B. & W.L. Carrier " Disappearance of thymine dimmers from DNA an error Correcting Mechanism " *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.* Vol. 51 pp. 226 – 232 , 1964 .
14. Hugo , W.B. & A.D. Russell " Pharmaceutical microbiology . 3rd ed . " *Blackwell scientific puplication . Oxford , London . England* . 1963 .