تأثير بعض المواد على حساسية Actinomycetes ضد بعض المضادات الحيوية

أوس إبراهيم سليمان
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة الموصل

الاستلام	القبول
2011 / 10 / 03	2011 / 12 / 08

ABSTRACT

The effect of EDTA and $CuSo_4$ on sensitivity of two species of Actinomycetes group including *Rhodococcus* and *Kocuria* to antibiotics (Ciprofloxacin and Gentamicin) was studied and the results showed that *Rhodococcus* was inhibited very well by Ciprofloxacin with inhibition zone 34 mm and *Kocuria* was inhibited by Gentamicin with inhibition zone 38 mm.

Minimum inhibitory concentration for these antibiotics was determined the results revealed that the MIC for ciprofloxacin against *Rhodococcus* was 0.3 µg /ml and for Gentamicin against *Kocuria* was 1.2 µg/ml.

The effects of EDTA and CuSo4 on the MIC of the two antibiotics appear to decrease them to 0.1 µg/ml.

الخلاصة

درس تأثير مادتي EDTA و $CuSo_4$ في حساسية نوعين من البكتريا تابعين لمجموعة الاكتينومايسيتات وهما *Rhodococcus* و *Kocuria* لمضادات حيوية معينة شملت (Ciprofloxacin و Gentamicin)، حيث أجري اختبار الحساسية لهما تجاه المضادات الحيوية قبل إضافة هذه المواد وتبين بأن *Rhodococcus* قد ثبطت بصورة كبيرة بالمضاد الحيوي Ciprofloxacin وبنطاق تثبيط 34 ملم، أما النوع *Kocuria* فقد ثبط بصورة كبيرة بالمضاد الحيوي Gentamicin وبنطاق تثبيط 38 ملم، بعدها تم تحديد التركيز المثبط الأدنى

فتبين أن قيمة MIC للنوع الأول كانت 0.3 مايكرو غرام/مل بينما قيمة MIC للنوع الثاني كانت 1.2 مايكرو غرام/مل.

اجري اختبار تأثير مادتي EDTA و $CuSo_4$ على قيمة MIC لكلا النوعين وأظهرت النتائج أن استخدام هاتين المادتين كل على حدى أدت إلى خفض قيمة MIC لكلا النوعين إلى 0.1 مايكرو غرام/مل.

المقدمة

تعد مجموعة الاكتينومايسيتات من البكتريا الموجبة لصبغة كرام والتي تمتلك محتوى عالي من الكوانين والسايتوسين (اكبر من 55 %) في جينومها وتميل إلى أن تتجمع بهيئة سلاسل أو خيوط ولقد اعتبرت في الأساس على إنها مجموعة وسطية بين البكتريا والفطريات ولكن في الوقت الحاضر شخصت على أنها كائنات بدائية النواة وتنتشر بصورة واسعة في الترب، المياه ووجد البعض منها مستعمرا للنباتات (3،5).

ويعد الجنس *Rhodococcus* احد أفراد هذه المجموعة، يمتاز بكونه غير متحرك لا يكون سبورات، موجبة لصبغة كرام هوائية وتتواجد بأشكال خيطية وهي متواجدة في الترب والمياه وتعد من أكثر الكائنات أهمية في الصناعة (13).

Kocuria بكتريا موجبة لصبغة كرام هوائية صنفت سابقا على إنها جنس تابع للـ *Micrococcus* ولكنها حاليا صنفت ضمن مجموعة الاكتينومايسيتات بالاعتماد على خصائص التحليل العنقودي والتصنيف الكيميائي لها (21).

إن مادة Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic-Acid (EDTA) مادة خالبة تستعمل في ربط ايونات المعادن وان disodium EDTA مادة كيميائية معروفة بصورة جيدة عن طريق خصائصها الكلابية داخل جسم الكائن الحي وهي تستعمل كمانع للتخثر في الزجاج وكذلك تستعمل كمواد قاتلة للبكتريا خصوصا الاخماج الناجمة عن البكتريا السالبة لصبغة كرام وحديثا جدا تم دمجها مع عوامل أخرى تستخدم لغرض السيطرة على الاخماج الناجمة عن البكتريا الموجبة لصبغة كرام(18).

ويستعمل $CuSo_4$ كمادة قاتلة للجراثيم germicidal agent و قاتلة للفطريات fungicide كما تستعمل كعوامل مضادة للبكتريا في عدد من التطبيقات وان بعض البكتريا تقاوم تأثيره عندما يكون بمستويات تحت المستوى القاتل (1).

المواد وطرائق العمل

1. عزلات البكتريا:

تم الحصول على البكتريا مشخصة من قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة الموصل. وتمت تنميتها على وسط أكار Muller-Hinton Agar (MHA) المجهز من قبل شركة LAB M Limited الانكليزية إذ تم ألتحضين لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مئوية.

2. اختبار الحساسية للمضادات الحيوية:

اجري الاختبار وذلك بتلقيح البكتريا على وسط أكار مولر-هنتون (MHA) بطريقة الانتشار المتجانس وتركت الأطباق لمدة 15 دقيقة، تم توزيع أقراص المضادات الحيوية المجهزة من قبل شركة Bioanalyse التركية التي شملت: Penicillin 10 IU , Erythromycin 15 µg , Tetracycline 30 µg , Gentamicin 10 µg , Ciprofloxacin 5 µg , Chloramphenicol 30 µg , Rifampicin 5 µg and Amoxicillin 30 µg إذ وضعت على سطح الاكار بعدها حضنت الأطباق بدرجة 35 مئوية لمدة 24 ساعة بعدها تم ملاحظة نطاق التثبيط (4).

3. تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibitory Concentration (MIC):

تم تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى باستخدام طريقة التخافيف المضاعفة في وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain Heart Infusion Broth (BHIB) المجهز من قبل شركة LAB M Limited الانكليزية إذ حضرت التخافيف (10،5،2.5،1.2،0.6،0.3،0.1) مايكرو غرام/مل من Ciprofloxacin و Gentamicin عن طريق إضافة 1مل من المضاد الحيوي بتركيز 10 مايكرو غرام/مل إلى 1مل من وسط BHIB ومن ثم تم نقل 1مل منه بوساطة ماصة مدرجة وتحت ظروف التعقيم إلى أنبوب ثاني حاوي على 1مل من وسط BHIB ثم نقل 1مل إلى أنبوب ثالث حاوي على 1مل من وسط BHIB وتم الاستمرار في عمل التخافيف لحين الوصول إلى الأنبوب السابع الذي يمثل التركيز 0.1 مايكرو غرام/مل وترك أنبوب أخر حاوي على 1مل من الوسط كعينة سيطرة، وحدد التركيز المثبط الأدنى على انه أعلى تخفيف يثبط النمو الميكروبي وللتأكد من فعالية المضاد الحيوي في قتل البكتريا نقل0.01 مل من الأنبوب الذي اظهر اقل عكورة وتم تلقيحه على وسط MHA وحضن بدرجة 35 لمدة 24 ساعة وللتأكد أيضا من قيمة MIC الحقيقية (2).

4. تأثير مادتي EDTA و CuSo4:

حدد تأثير مادة EDTA المجهزة من قبل شركة DIDACTIC الاسبانية و $CuSo_4$ المجهزة من قبل شركة Hopkin and Williams الانكليزية على قيمة MIC إذ أضيفت التراكيز (10, 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0.3, 0.1, 0) مايكرو غرام/مل (التي حضرت بنفس طريقة التخافيف المضاعفة المذكورة في الفقرة (3) أعلاه مع اختلاف بسيط هو استخدام الماء المقطر المعقم بدلا من وسط BHIB السائل) من كل مادة إلى أنابيب حاوية على التركيز المثبط الأدنى للمضاد الحيوي وبعدها لقحت هذه الأنابيب بالبكتريا قيد الدراسة وحضنت بدرجة حرارة 35 مئوية لمدة 24 ساعة ثم قيست الامتصاصية الضوئية (O.D.) عند الطول الموجي 600 نانوميتر

باستخدام جهاز المطياف الضوئي نوعCeCil CE 7200 spectrophotometer وحددت قيمة التركيز المثبط الأدنى الجديدة للمزيج بعد قياس الامتصاصية الضوئية MIC الجديدة (22،15،12).

النتائج

أظهرت نتائج الحساسية للمضادات الحيوية وكما يتبين من الجدول 1 النتائج التالية:

جدول 1: اختبار حساسية البكتريا تجاه المضادات الحيوية

المضادات الحيوية	*Rhodococcus*		*Kocuria*	
	نطاق التثبيط ملم/قرص			
Rifampicin (RA)	-	R	37	S
Chloramphenicol (C)	22	S	30	S
Penicillin (P)	-	R	36	S
Gentamicin (CN)	20	S	38	S
Ciprofloxacin (CIP)	34	S	35	S
Tetracycline(TE)	16	I	30	S
Erythromycin (E)	9	R	25	S
Amoxicillin (AMC)	-	R	25	S

حساسية البكتريا *Rhodococcus* للمضادات الحيوية Ciprofloxacin، Chloramphenicol، Gentamicin، Tetracycline وبأقطار تثبيط 34، 22، 20، 16 ملم لكل منها على التوالي فيما أظهرت البكتريا *Kocuria* حساسية لجميع المضادات المستخدمة في الدراسة والمبينة في الجدول 1 وكان أعلى تثبيط للمضاد الحيوي Gentamicin إذ كان قطر التثبيط 38 ملم.

حددت قيمة MIC للمضاد الحيوي الذي أظهر أعلى تأثير لكلا النوعين من البكتريا والذي شمل المضادان Ciprofloxacin و Gentamicin وكانت قيمة MIC 0.3 للمضاد الحيوي و 1.2 مايكرو غرام/مل على التوالي.

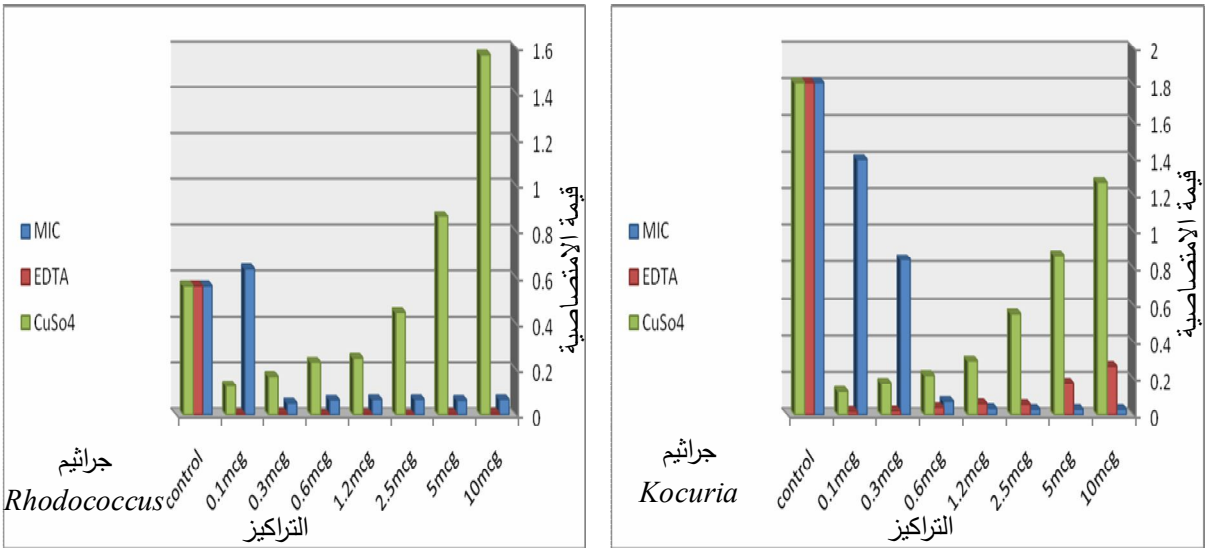
درس تأثير مادتي EDTA و $CuSo_4$ على قيمة MIC ضد نوعي البكتريا قيد الدراسة إذ أدت هذه المواد إلى التأثير في قيمة MIC إذ أدى إلى خفضها فأصبحت لكلاهما و لكلا المادتين قيمة MIC 0.1 مايكرو غرام/مل.

وإن هاتين المادتين قد أثرتا بصورة واضحة على قيمة MIC ولغرض التأكد من قيمة MIC قبل المعاملة وبعد المعاملة اجري قياس الامتصاصية عند الطول ألموجي 600 نانوميتر وسجل اقل تركيز للمضاد أدى إلى منع النمو البكتيري كما موضح بالجدول 2 و الشكل1.

جدول 2: تأثير استخدام تراكيز مختلفة من مادتي EDTA و $CuSo_4$ على قيمة MIC

تراكيز مادتي EDTA و $CuSo_4$ (مايكرو غرام / مل)	قيم الامتصاصية على الطول الموجي 600 نانوميتر			
	Rhodococcus		*Kocuria*	
	EDTA	$CuSo_4$	EDTA	$CuSo_4$
10	0.009	1.570	0.267	1.268
5	0.008	0.867	0.175	0.870
2.5	0.002	0.449	0.058	0.554
1.2	0.006	0.249	0.062	0.296
0.6	0.003	0.231	0.041	0.218
0.3	0.009	0.170	0.023	0.175
0.1	0.006	0.128	0.021	0.129
0.0(control)	0.565	0.565	1.812	1.812

إن اقل قيمة للامتصاصية لكلا النوعين *Rhodococcus* و *Kocuria* كان عند التركيز 0.1 مايكرو غرام/مل.



شكل 1: تأثير استخدام تراكيز مختلفة من مادتي EDTA و $CuSo_4$ على قيمة MIC

وللتأكد من عدم وجود نمو عند التركيز الأدنى المثبط نقلت قطرة من الأنابيب التي سجل عندها أعلى تخفيف يمنع نمو البكتريا إلى وسط MHA وحضنت عند درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة للتأكد من خلوه من النمو البكتيري.

المناقشة

إن استخدام أثنين أو أكثر من العوامل المضادة للبكتريا والتي لها دور مهم في التأثير على حساسية البكتريا للمضادات الحيوية لها دور في زيادة فعالية المضادات الحيوية العلاجية

ضد البكتريا، ويستخدم EDTA في التخلص من سمية المعادن الثقيلة عن طريق الارتباط بها ولقد أوصت باستخدامه مؤسسة الدواء والغذاء الأمريكية، ويؤثر نقص النحاس Cu على تقليل المناعة الخلطية والمناعة التي تتوسطها الخلايا بالإضافة إلى تقليل المناعة غير المتخصصة المنظمة بواسطة الخلايا البلعمية كما ويعمل النحاس على وقاية الأنسجة الحيوانية من الضرر (20،14،9).

من النتائج التي تم الحصول عليها نلاحظ أن قيمة MIC قد انخفضت عند استخدام مادتي EDTA و $CuSo_4$ مع المضادين Ciprofloxacin و Gentamicin، إذ أن مادة EDTA تمتاز بقدرتها الكلابية وخاصة عند استخدامها مع مضادات حيوية مختلفة إذ تعمل على قتل البكتريا بسرعة وعند تركيز 1مايكروغرام/مل من المضاد الحيوي، إذ تقلل هذه المادة من إستقرارية غشاء الخلية عن طريق ارتباطها بمواقع خاصة على سطحه مما يسهل دخول المضادات وتعمل أيضا في تحليل وفقدان الحيوية وازدياد حساسية البكتريا لأنواع متعددة من المضادات الحيوية، وتزيد من قدرة المضادين الحيويين Ciprofloxacin و Gentamicin عند اندماجها بهم مما يؤدي إلى قتل البكتريا بتأثير فعال أكثر من 100 مرة من استخدام المضادات الحيوية لوحدها، كما أن EDTA مع Gentamicin يلعب دورا مهما في استئصال التجمعات الميكروبية، وهذه المادة لها دور محدد إذ تؤثر على نفاذية غشاء الخلية ويكون تأثيرها قاتل عند استخدامها لمعالجة البكتريا لمدة طويلة ولكن أثناء المعالجة القصيرة فإنها تزيد من تأثير العوامل المضادة للبكتريا مثل المضادات الحيوية وتعمل على قتلها بأقل تركيز للمضاد الحيوي المضاف، وتؤثر مادة EDTA على عدد الخلايا البكتيرية حيث تعمل على اختزال عددها (2،7،11).

ولقد أشارت دراسة الباحث Jackson وزملاؤه إلى تأثير مادة EDTA على بكتريا *Shigella sonnei* عندما استخدامها مع المضاد الحيوي Ciprofloxacin إذ أثرت على هذه البكتريا وثبطت نموها، وان مثل هذه التوليفات بين EDTA والمضادات الحيوية يوصى بها لمنع حدوث مقاومة البكتريا تجاه المضادات الحيوية أثناء العلاج ولغرض الحصول على أعلى كفاءة في العلاج ضد الإصابات البكتيرية المختلفة، ولإضافتها له فائدة مهمة في تكوين علاقات تأزرية Synergistic بين بعض المواد والمضادات الحيوية، ولقد بينت هذه الدراسة فائدة استخدام مادة EDTA مع المضاد الحيوي في العلاج بأقل تركيز من المضاد عند وجودها معه (9).

وان النتائج التي حصل عليها هي مشابهة تقريبا لما أشار إليه (18) عند دراستهم تأثير مادة EDTA ضد بكتريا *Staphylococcus epidermidis* إذ لوحظ تأثير هذه المادة على زيادة تثبيط نمو البكتريا عندما توجد المضادات الحيوية وخصوصا التي تعمل على جدار الخلية

وسطحها مما أدى إلى فقدانها Slime layers وأصبحت بعدها هدفا سهلا للمضادات الحيوية وخصوصا Oxacillin و Vancomycin (18).

أشارت دراسات عديدة تأثير مادة EDTA على عدد من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام، إذ أثرت على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Salmonella typhimurium* عن طريق مهاجمتها الجدار الخلوي بواسطة عواملها المخلبية خصوصا Mg^{++} الذي يؤدي إلى تحطيم الجدار الخلوي، أما تأثيرها على بكتريا *Escherichia coli* فهي تعمل على مستوى المادة النووية حيث تتداخل في عملية استنساخ RNA، وان تأثيرها على البكتريا الموجبة لصبغة كرام قد يكون تأثير داخل خلوي مما يؤدي إلى فقدان بعض المكونات الضرورية الموجودة على سطح الخلية الميكروبية أو جدارها مما يسهل عمل المضادات الحيوية التي تؤثر عليها بأقل التراكيز.(8،19،16)

تلعب EDTA دورا مهما في تخفيض قيمة MIC للمضاد الحيوي إلى حوالي 50 % عند وجودها معه، بالإضافة إلى تأثيرها المتميز في تثبيط الفعالية الأنزيمية للبكتريا(23).

وعلى الرغم من وجود أعداد كبيرة من المعادن الأساسية لغرض النمو الميكروبي إلا أن البعض منها يكون مؤذي لحياة الخلية البكتيرية، ومنها المعادن الثقيلة وهذا ناجم عن تكوين معقدات مع الجزيئات البروتينية وتحولها إلى أشكال غير فعالة، كما أن هذه المعادن قد تؤثر في البروتينات وبذلك يكون تأثيرها مشابه للمضادات مثل المضادات الحيوية مما يحد من النمو الميكروبي، وهنالك عدد من المعادن الثقيلة مثل النحاس Cu الذي يعد أحد العوامل المضادة للبكتريا والذي يتواجد بعدة أشكال ذات تأثير مباشر في السيطرة على البكتريا خاصة عند إضافته إلى العوامل المضادة للبكتريا إذ تعمل كعوامل مطهرة، فيما يكون تأثيرها محدود عند استخدامها لوحدها على الرغم من تحديدها للنمو الميكروبي، وان لهذه المعادن الثقيلة دور في تثبيط النمو الميكروبي وفعاليتها تعتمد على سمية المعادن على تركيزها(6،10).

المصادر

1) ASM (2011). Copper resistance in bacteria may confer increased tolerance to other metals. ACTA Microbial Immunol Hung. Vol. 46(1): 25-32.

2) Banin, E.; Brady, K. and Greenberg, E. (2006). Chelator-induced dispersal and killing of Pseudomonas aeruginosa cells in a biofilm. American Society for Microbiology. Vol. 72(3):2064-2069.

3) Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J. S. and Morse, S.A. (2010). "Medical Microbiology". 25th ed. McGraw Hill Lange. USA.

4) Chau, N.T.; Hieu, N. X.; Thuan, L. T.; Matsumoto, M. and Miyajima, I. (2011). Identification and characterization of Actinomycetes antagonistic to pathogenic Vibrio spp. Isolated from shrimp culture pond sediments in Thua Thien Hue-Vietn am. J.Fac.Agr.Kyushu Univ. Vol.56 (1):15-22. Japan

5) Cwala, Z.; Igbinosa,E.O. and Okoh, A.I. (2011). Assessment of antibiotics production potentials in four Actinomycetes isolated from aquatic environments of Eastern Cape Province of south Africa. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. Vol.5 (2): Pp. 118-124.

6) Gomah, A.A.(2008). Efficiency of some copper compounds and bactericides in controlling angular leaf spot disease of cucumber.J. Agric. Sci. Mansoura Univ. Vol. 33(4):2589-2597.

7) Gray, G. W. and Wilkinson, S.G.(1965). The effect of Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic-Acid on cell walls of some gram negative bacteria. J. Gen. Microbiol. Vol.39:385-399.

8) Hukari, R.; Helander, I. and Vaara, M. (1986). Chain length heterogeneity of lipopolysaccharide released from *Salmonella typhimurium* by ethylenediaminetetraacetic acid or polycations. Eur. J. Biochem. Vol.154: 673-676.

9) Jackson, C.; Adedokun, M.; Etim, E.; Agboke, A.; Jackson, I. and Ibezim, E. (2011). Effect of EDTA on the activity of ciprofloxacin against *Shigella sonnei.*

10) Kim, S.(1985). Effect of heavy metals on natural populations of bacteria from surface micro layers and subsurface water. Marine Ecology. Vol.26:203-206.

11) Leive, L. (1974). The barriers function of the gram negative envelope. Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 235:109-129.

12) Matlock, B.C.; Beringer, R.W.; Ash, D.L.; Alen, M.W.; and Page, A.F. (2009)."Analyzing Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers".Thermo Scientific. USA.

13) Mcleod, M.P.; Warren, R.L.; Hsiao, W.W.; Araki,N.; Myhre, M.; Fernandes, C.; Miyazawa, D.; Wong, W.; Lillquist, A.; Wang, D.; Dosanjh, M.; Harra, H.; Petrescu, A.; Morin, R.D.; Yang, G.; Stott, J.M.; Schein, J. E.; Shin, H.; Samilus, D.; Siddiqui, A.S.; Marra, M.A.; Jones, S.M.; Holt, R.; Brinkman, F. S.; Miyauchi, K.; Fukuda, M.; Davies, J. E.; Mohn, W. W. and Eltis, L. D. (2006).The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. Proceeding of the National Academy of Science. Vol.103: 15582-15587.

14) Mikirova, N.; Casciari, J.; Hunninghake, R. and Riordan, N.(2011). EDTA chelation therapy in the treatment of toxic metals exposure. Medistem Inc Vol. 1(2):81-89. USA.

15) Mohi-aldeen, Z. Kh. (2011).M.Sc. Thesis. Bacteriological study of pin tract infection of fractures fixation. dept. of biology/college of Sci./Uni. Of Mosul. IRAQ.

16) Prasad, K. and. Chitnis S. (1986). Transcription but not translation is required for EDTA-induced autolysis in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 134:338-343.

17) Rollins, D.M. and Joseph, S. W.(2000). Pathogenic Microbiology (Minimal Inhibitory Concentration). University of Maryland.USA.

18) Root, J.; Mcintyre, R.; Jacobs, N. and Daghlian, C. (1988). Inhibitory Effect of Disodium EDTA upon the Growth of *Staphylococcus epidermidis In Vitro*: Relation to Infection Prophylaxis of Hickman Catheters. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 32(11): 1627-1631. American Society for Microbiology.USA.

19) Said, A. and Williams R. (1987). Expression of Hi outer-membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to sensitivity to EDTA and polymyxin B. J. Med. Microbiol. Vol. 24:267-274.

20) Stabel, J.; Spears, J. and Brown T. (1993). Effect of copper deficiency on tissue, blood characteristics, and immune function of calves challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus and *Pasteurella hemolytica*.J. ANIM. SCI. Vol.71:1247-1255.

21) Tsai, C.; Su, S.; Cheng, Y.; Chou, Y.; Tasi, T. and Lieu, A.(2010). *Kocuria varians* infection associated with brain abscess: A case report. BMC Infectious Diseases. Vol. 10: 102.

22) Vandepitte J.; Verhaegen J.; Engbaek K.; Rohner P.; Piot P. and Heuck C. C. (2003)." Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology "2nd ed. World Health Organization. Geneva.

23) Wooley, R. and Jones, M. (1983). Action of EDTA-tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. Vet. Microbiol. Vol. 8(3):271-280.