تأثير مركب النكهة ثنائي الاستيل في البكتريا المعزولة من المستشفيات

زهرة محمود الخفاجي خالدة كريم الكريمي ماجدة جمعة العبودي ليلى عبد الكريم وحيد
معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا – جامعة بغداد
قسم الأحياء المجهرية
كلية الطب – جامعة بغداد

المستخلص

تم الحصول على 191 عزلة من البكتريا الملوثة لوحدات مختلفة من مستشفيات بغداد والمنصور وغيرهما . وكانت مصادرها مسحات من الأدوات الجراحية والأرضية والمغاسل والأقنعة ومواد التعقيم ، شكلت البكتريا السالبة لصبغة كرام 52.63% ، أما الموجبة لصبغة كرام فكانت 45.26 % في حين كانت *Candida* 2.1%.

اثر مركب ثنائي الاستيل بشكل كبير واستعملت التراكيز 2.5% و5% و7.5 % و10% إذ توزعت العزلات من حساسة بشكل معتدل الى حساسة جدا بنسبة 92 % بالنسبة للبكتريا السالبة لصبغة كرام ، في حين كانت هذه النسبة 94.1 % من البكتريا السالبة لصبغة كرام.

تمت مناقشة إمكانية استعمال مركب ثنائي الاستيل في معامل الأغذية ، إذ انه مادة متطايرة وغير سام في حالة تناوله بكميات ضئيلة كما انه احد منتجات بكتريا حامض اللاكتيك المستخدمة في مجال الألبان.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(2) : 179 - 184, 2005 Al-Khafaji *et al.*

EFFECT OF FLAVOR COMPOUND DIACETYL ON HOSPITAL BACTERIAL ISOLATES

Z. M. Al-Khafaji K. K. Al-Kareemi M. J. Al-Aboodi L. A. Waheed
Genetic Engineering & Biotechnology Institute
University of Baghdad
Dept. of Microbiology – Coll. of Medicine
University of Baghdad

ABSTRACT

One hundred ninety one bacterial isolates were obtained from different units in Baghdad and Al-Mansor hospitals and others .The sources were swabs from operation wards from tools, bloods, masks and sterilants or disinfectants, and it was found that Gram negative bacteria represented 52.63%, Gram positive bacteria were 45.26%, while *Candida* was 2.1%.

Diacetyl had high inhibitory effect against most of the isolates , the percentage of moderate to very sensitive of Gram negative bacteria was 92 % , while Gram positive was 94.1%.

The possibility of using diacetyl in food factories was suggested as it is volatile compound and it represented one of different compounds produced by lactic acid bacteria during dairy fermentations.

المقدمة

لبكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria قابليات متعددة لمنافسة الاحياء المجهرية الاخرى ، لذلك تستعمل في حفظ الأغذية (1). ومن هذه القابليات إنتاج مركبات النكهة مثل ثنائي الاستيل (Diacetyl) الذي له قابلية تثبيطية للعديد من البكتريا السالبة لصبغة كرام الملوثة للأغذية او المعامل (2) وبشكل اكبر من البكتريا الموجبة لصبغة كرام.

ومن جهة ثانية يلاحظ ان الأجهزة والمعدات في معامل الاغذية والمستشفيات تتلوث بالعديد من انواع البكتريا والأحياء الأخرى مثل الخمائر والاعفان التي تلوث السطوح والماء والهواء وغيرها (3). ولهذه الملوثات مصادر عديدة مثل ايدي العاملين (4) ، اذ وجد في إحدى الدراسات ان 44 من 50 شخصا كانوا حاملين لبكتريا مرضية ، كما ان تلوث البيئات في الأماكن الحساسة مثل المستشفيات ومعامل الاغذية اثر في انتشار احياء مرضية خطرة مثل *Escherichia coli* O157:H7 وبكتريا *Helicobacter pylori* وفيروسات التهاب الكبد (5)، وكذلك أدت الى زيادة انتشار الخمائر الخطرة مثل *Candida* لتصبح اكثر خطرا ، اذ وجدت بنسبة 23.5 % مقارنة ببكتريا *Escherichia coli* 18.7% التي كانت تمثل ملوثات الدرجة الاولى ، ثم تليها بكتريا *Pseudomonas* المقاومة للمضادات الحيوية والمطهرات والمعقمات، لتصل الى 11 % (6).

ويحتاط القائمون على مثل هذه المناطق المعرضة للتلوث البيئي باستعمال المطهرات (Disinfectants) ومضادات الانتان (Antiseptic) (7). ولعل اكثرها استعمالا هو Chlorohexidine المستعمل في تحسين الظروف الصحية المحيطة بالإنسان والحيوان (9).

*تاريخ استلام البحث 2004/5/25 ، تاريخ قبول البحث 2004/12/8

استهدفت الدراسة الحالية توضيح تأثير مركب ثنائي الاستيل في الأحياء الملوثة لسطوح الأدوات وغيره من النماذج لاقتراح استعمال المركب في معالجة التلوث في معامل الأغذية لما يتصف به المركب من ميزات جيدة وملائمة، فضلا على انه أحد المنتجات المهمة في مجال تصنيع الألبان .

المواد وطرائق العمل

-مركب ثنائي الاستيل (Diacetyl) : شركة Fluka

-وسط المرق المغذي – Nutrient broth , Muller Hinton: شركة Oxoid

العزلات البكترية : تم الحصول على البكتريا من شعبة الأوبئة/المختبرات التعليمية/مدينة الطب ، والتي جمعت للمدة من كانون الثاني/2003 الى شباط 2004 وكانت من مسحات مأخوذة من معالات العمليات الجراحية لمستشفيات مختلفة شملت مستشفى بغداد ومستشفى الجراحات التخصصية ومستشفى المنصور وقسم الخدج في مستشفى بغداد ومركز الجهاز الهضمي. وكانت المصادر من الأدوات الجراحية والأرضيات والمغاسل والأقنعة المستعملة فضلا عن نماذج من مواد التعقيم.

الفعالية التثبيطية لمركب ثنائي الاستيل : تم تحديد الفعالية التثبيطية في الاطباق (*In vitro*) باستعمال طريقة الحفر في الاكر (10) ، في أطباق بتري بقطر 9 سم وارتفاع الوسط الغذائي فيها 4 ملم . زرعت الاطباق بمزروع ليلي (Over night culture) في وسط المرق المغذي الذي خفف الى 1 : 100 ثم استعمال 2، مللتير فرش على سطح وسط – Muller Hinton ، ثم عملت حفر بقطر 5 ملم ، وضعت فيها تراكيز متدرجة من مركب ثنائي الاستيل المخفف وهي:

1-التركيز الاول : 2.5 % حضر في ماء دافئ (حوالي 65–40 م) ثم استعمل منه 50 مايكروليتر لكل حفرة.

2-التركيز الثاني : 5 % حضر كما في التركيز الأول .

3-التركيز الثالث : حضر كما في التركيز الأول.

4-التركيز الرابع : حضر كما في التركيز الأول.

حضنت الأطباق لمدة ساعة بدرجة حرارة الثلاجة ثم حضنت لليوم التالي بدرجة حرارة 37 م، قرأت النتائج ثم أعيدت للحضن ليوم آخر وقرأت النتائج ثانية. وكان تحديد الفعالية التثبيطية بقياس أقطار مختلفة لمناطق تثبيط النمو (بضمنها قطر الحفرة) ، واستخرج المعدل ، وعندما يكون التثبيط كبيرا يستخدم طبق واحد لكل تركيز للعزلة الواحدة. استعمل الماء المقطر كمعاملة سيطرة.

النتائج والمناقشة

تم الحصول على 191 عزلة للمدة من كانون الثاني/2003 الى شباط 2004 تمثلت ببكتريا *Escherichia coli* بالدرجة الرئيسية ، تلتها بكتريا *Staphylococcus* الموجبة لفحص Coagulase الذي يدل على انها مرضية (11) ، ثم عزلات الجنس نفسه ولكن السالبة لفحص Coagulase ، جاءت بكتريا *Pseudomonas* في المرتبة السادسة ثم اجناس اخرى كما موضح في جدول (1).

جدول 1. نسب العزلات التي تم الحصول عليها في الدراسة

العزلات البكترية	النسبة المئوية
E.coli	28.80
Staphylococcus + ve *	25.13
Staphylococcus - ve *	18.85
Klebsiella	7.33
Enterobacter	6.81
Pseudomonas	4.71
Citrobacter	4.71
Candida	2.10
Bacillus	1.05
Proteus	0.52

* موجبة لفحص Coagulase

وعليه فان البكتريا السالبة لصبغة كرام كانت 52.63% اما الموجبة لصبغة كرام 45.26% ويوضح جدول (2) نتائج تأثير ثنائي اللاستيل في العزلات التي شملتها الدراسة.

جدول 2. تأثير مركب ثنائي الاستيل بتراكيز مختلفة في عزلات البكتريا التي شملتها الدراسة

رقم او عدد العزلات	معدل قطر منطقة التثبيط (ملم) [1]			
	التركيز الأول	التركيز الثاني	التركيز الثالث	التركيز الرابع
E. coli				
40 عزلة	NG [2]	NG	NG	NG
4	10	30	NG	NG
10	R [3]	11	20	20
11	17	25	22	22
25	38	NG	NG	NG
26	20	NG	NG	NG
44	R	R	23	30
45	11	18	28	39
46	16	19	40	41
47	15	21	50	60
48	15	19	NG	NG
49	R	R	R	R
50	R	24	30	50
51	R	14	30	38
52	22	46	50	NG
53	20	44	NG	NG
54	R	R	R	22
Staphylococcus(ve +) [4]				
26 عزلة	NG	NG	NG	NG
3	15	17	22	30
4	R	R	21	26
5	22	26	26	30
6	15	20	24	50
7	24	34	30	50
8	R	R	20	22
9	20	34	40	NG
11	14	34	40	50
4 عزلات	R	R	R	R
19	26	NG	NG	NG
21	34	NG	NG	NG
22	22	NG	NG	NG
25	46	NG	NG	NG
24	14	28	NG	NG
28	R	R	26	40
33	R	R	22	25
46	20	30	40	50
Staphylococcus(- ve) [4]				
20 عزلة	NG	NG	NG	NG
4 عزلات	R	R	R	R
3	30	30	34	NG
4	30	40	NG	NG
14	R	R	12	30
15	20	26	NG	NG
21	24	NG	NG	NG
26	26	26	NG	NG
28	26	34	NG	NG

يتبع

تابع لجدول 2.

NG	NG	12	10	29
35	25	25	15	34
31	25	19	10	35
50	30	20	11	36
Pseudomonas				
NG	NG	NG	NG	7 عزلات
R	R	R	R	عزلة واحدة
Klebsiella				
NG	NG	NG	NG	11 عزلة
40	35	35	11	12
24	20	10	11	13
NG	NG	25	15	14
Enterobacter				
NG	NG	NG	NG	5 عزلات
50	34	40	30	5
44	44	32	17	7
37	37	25	15	9
31	25	21	19	10
35	24	15	10	11
NG	NG	NG	24	12
22	15	R	R	13
Citrobacter				
NG	NG	NG	NG	6 عزلات
NG	NG	40	20	4
33	27	24	24	5
60	53	50	46	7
Bacillus spp				
R	R	R	R	عزلتان
Candida spp				
NG	NG	NG	NG	عزلتان
20	15	R	R	3
36	27	R	R	4
Proteus				
24	21	20	R	1

(1) القياس يشمل قطرة الحفرة (5 ملم)

(2) NG : No Growth أي ان العزلة حساسة جدا

(3) R : العزلة مقاومة

ويلاحظ من الجدول ان نسبة عزلات *E. coli* المقاومة لاقل تركيز (التركيز الاول) تصل الى 10.9% في حين كانت نسبة العزلات معتدلة الاستجابة لتأثير ثنائي الاستيل 21.8 % . اما ما تبقى من العزلات 67.3% فكانت حساسة جدا ولم يظهر أي نمو في الطبق حتى عند استعمال اقل التراكيز. أما مجمل البكتريا السالبة لصبغة كرام والحساسة جدا فهي 60% في حين كانت نسبة البكتريا الموجبة لصبغة كرام والحساسة جدا 54.65%.

وتشهد الأماكن الحساسة زيادة في أعداد الأحياء المجهرية سواء كانت مستشفيات او أماكن تصنيع الأغذية او إعدادها تلوثا كبيرا لما توفره هذه البيئات من المتطلبات اللازمة لنمو الأحياء ، ولعل أهم مصادر التلوث هو أيدي العاملين أي أنها ذات مصادر خارجية (12). وقد وجد ان الزيادة المذكورة تعود الى تطوير الأحياء المجهرية المقاومة للمضادات الحيوية والمطهرات ومضادات الانتان على حد سواء (9 ،13، 14) التي تكون في الكثير من الأحيان متداخلة (9 ، 15). وبصورة عامة فان البكتريا السالبة لصبغة كرام تكون مقاومة بشكل تقليدي نظرا لاحتوائها على الطبقات الخارجية التي تعيق وصول المواد المثبطة الى الأغشية الخلوية التي هي أهم الأهداف التي تستهدفها المطهرات والمعقمات فضلا على أهداف أخرى تثبطها المطهرات والمعقمات وبهذه الصفة

تختلف المطهرات والمعقمات بتعدد أهدافها مقارنة بالمضادات الحيوية التي تكون لها أهداف محددة اغلبها توجد داخل الخلايا (9 ، 13).

ويلاحظ من الجدول ان نسبة عالية من البكتريا السالبة لصبغة كرام حساسة للمركب وربما يعود ذلك الى قابلية ثنائي الاستيل على الذوبان في الدهون التي تسهل عبوره الأغشية او الطبقات الخارجية التي تمتاز بارتفاع المواد الدهنية فيها ووصوله الى الأهداف ، وتعزي الدراسات هذا التأثير الى ان لثنائي الاستيل القابلية على الارتباط بالبروتينيات المسؤولة عن نقل الحامض الأميني الارجينين (2)، كما ان لجزيئة ثنائي الاستيل الذي هو من Diketons القابلية على التفاعل لانتاج مركبات لها القابلية على الارتباط مع بعض المعادن الموجودة عند الحدود الخارجية للخلايا (الجدران والأغشية) ، والمجاميع التي تتأكسد في جزيئة ثنائي الاستيل هي مجاميع Enediol التي تكون مسؤولة عن الفعالية التثبيطية (16 ، 17) ، ولذلك اقترح ان الأهداف المستهدفة في الخلايا البكترية هي سطوحها خصوصا Adhesins والأنزيمات التي تشترك في بناء الجدران والأغشية الخلوية ، لذا يتوقع ان تكون الجزيئات الصغيرة مثل ثنائي الاستيل اكثر فاعلية في بكتريا *Pseudomonas* التي تمثل مشكلة كبيرة لمقاومتها ونشاطها في أكسدة العديد من المواد (13).

ولاستعمال المطهرات والمعقمات العديد من المساوئ منها صعوبة إزالة آثاره من الأدوات او تعقيمها وخاصة عند استعمال العضوية منها وبتراكيز عالية (18) ، في حين ان استعمال ثنائي الاستيل ربما يوفر فرصة اكبر للاستعمال لاسيما في معامل الأغذية وحتى في المستشفيات اذ انه من المواد المتطايرة والمصنفة على أنها GRAS (19 ، 20) ، كما ان فعاليته التطفيرية ضعيفة (21). وربما كان بالإمكان زيادة كفاءة ثنائي الاستيل بواسطة إعداده بشكل ملائم (Formulation) ، اذ ان فعالية ثنائي الاستيل تزداد بخفض الأس الهيدروجيني (20) ، كما أن كفاءته قد تزداد بأقرانه مع وسائل أخرى كما في استعمال بلازما الغاز (Gas plasma) خصوصا عندما يراد التعقيم بدرجات حرارية واطئة (22) ، اذ ان هذه الحالة تكون ملائمة جدا للحفاظ على أماكن التبريد في معامل الأغذية.

المصادر

1-Stiles, M. E. 1999. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70:331–345.

2-Vandenbergh, P. A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth . FEMS Microbiol. Rev. 12: 221-238.

3-Brocard--Lemort, C. 2000. Standards and recommendations for hospital environmental hygene. Ann. Biol. Clin. 58: 431-437.

4-Nogueras, M., N. Marinsalta, M. Roussel and R. Notario. 2001 . Importance of hand germ contamination in health – care workers as possible carriers of nosocomial infections . Rev. Inst. Med. Trop. Sao.. 43 :149-152.

5-Weber, D. J. and W. A. Rutala. 2001. The emerging nosocomial pathogens *Cryptosporidium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Helicobacter pylori* , and hepatitis C: Epidemiology, environmental survival, efficacy of disinfection and control measures . Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 22 : 306-315.

6-Hsueh, P. R., M. L. Chen, C. C. Sun and W. H. Chen. 2002. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan. Emerg. Infect. Dis. 8 : 63-68.

7-Garbutt, J. 1997. Essential of Food Microbiolgy. Arnold. London. Sedny.

8-Maagarinos, M. C., M. B. Reynaldo, M. B. Flores, A. Y. Infanti and S. M. Castelo. 2001. Effect of chlorohexidine on *Staphylococcus aureus* hospital isolates under different environmental conditions. Rev. Argent. Microbiol. 33: 241–246.

9-McDonnell, G. and A. D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfections: Activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. 12:147-179.

10-Barry, A. L. 1998. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media : Theoretical considerations *In* V. Lorain (ed.) "Antibiotics in Laboratory Medicine". Willams & Wilkin : Baltimore, London.

11-Brook, G. E., J. S. Butel and S. A. Morse. 1998. Jawetz, Melinck, & Adelbergs Medical Microbilogy. Appelton & Lange : London.

12-Prescott, L. M., J. Harley, D. A. Pandklein. 1999. Microbiology. 4th Edition. McGraw –Hill : Botson, London.

13-Budzikkiewicz, H. 2000. Siderophore–antibiotic conjugates used as Trojan horses against *Pseudomonas aeruginosa* .Curr. Top. Med. Chem.1:73-82.

14-Rio, Y., P. Pina, F. Jurin, P. Allouch, J. Didion, H. Chardon and D. Chine. 2002. Sensibilite de Pseudomonas Aeruginosa aux antibiotiques, isoles chezdes malades

de soins infensifs francais 1998. Phenotypes de resistance aux beta lactamsines. Pathol. Biol. 50:12-17.

15-Al-Ghamidi, S., M. Gedebou and N. E. Bilal. 2002. Nosocomial infections and misuse of antibiotics in provincial community hospital, Saudi Arabia. J. Hosp. Infect. 50:115-121.

16-Pinherio, A. J., B. J. Liska and C. E. Parmelee. 1968. J. Dairy Sci. 51: 223-224.

17-Myrivk, Q. N. and W. A. Volk. 1954. Comparative study of the antibacterial properties of ascorbic acid and reductogenic compounds. J. Bact. 68: 622-626.

18-Quinn, P. J. and M. P. Scarlon. 2000. Elimination of volatile chemicals in disinfectant evaluation procedures by freeze drying. Lett. Appl. Microbiol. 31:223\227.

19-Stoner, G. D., M. B. Shimkin, A. J. Kniazzeff, J. H. Weisburger, E. K. Weisburger and G. B. Gori. 1973. Test for carcinogenicity of food additives and chemotherapeutic agents by the pulmonary tumor response in strain A mice . Cancer Res.33: 3069-3085.

20-Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl . Appl. Microbiol. 44 :525-532.

21-Florin, I., L. Rutberg, M. Curvall and C. R. Emzel. 1980. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. Toxicology 18 :219- 232 .

22-Mayworm, D. 1988. Low temperature sterilization revisited. Infect. Control Steril. Tech. 4:18- 35.