تأثير بعض الاحماض الامينية على الغشاء الحيوي (Biofilm) لبكتريا *Staphylococcus aureus*.

حسين محمود عباس **محمد فخري احمد**

*قسم علوم الحياة-كلية العلوم-الجامعة المستنصرية . humaster-88@yahoo.com

** أستاذ مساعد - قسم علوم الحياة-كلية العلوم-الجامعة المستنصرية .

المستخلص

في هذه الدراسة، تم جمع ١١٥ عينة سريرية من مرضى يعانون من مجموعة متنوعة من الاصابات. وتم توزيع عدد العينات التي تم جمعها وأنواع الاصابات كما يأتي :

51 عينة من اصابات الجروح والحروق , ٢٨عينة من اصابات القناة البولية (UTIs) , ١١ عينة من اصابات العيون ,25 من اصابات الاذن . التشخيص الاولي للعينات تضمن الخصائص المظهرية للعينات على الاوساط الزرعية في المستشفيات التي تم عزلها منها واظهرت نتائج التشخيص الاولي ان ٤٣ عينة مشخصة كـ *Staphylococcus spp.* وبنسبة ٣٧.٣٩% من مجموع العينات الكلي.

اخضعت جميع العزلات للفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية واستخدام نظام (Api20) بغية تشخيصها حتى النوع , واظهرت النتائج ان ٢٤ من ٤٣ عزلة تعود الى بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus. aureus* .

واظهرت النتائج ان ١٣عزلة من ٢٤ جمعت من الجروح والحروق و ٥ من ٢٤ عزلة من اصابات القناة البولية (UTIs) و ٤ من ٢٤ عزلة من اصابات الاذن وعزلتين من ٢٤ عزلة من اصابات العيون.

تم اختبار جميع عزلات *S. aureus* لمضاد المثيسلين لتحديد العزلات المقاومة والحساسة Methecillin Resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) واظهرت النتائج ان ٢١ من ٢٤ عزلة وبنسبة ٨٧.٥% كانت مقاومة للمثيسلين و٣ من٢٤ عزلة وبنسبة ١٢.٥% كانت حساسة لنفس المضاد.

تم استخدام ستة انواع مختلفة من الاحماض الامينية لدراسة تأثيرها على تشكيل الغشاء الحيوي (Biofilm)للبكتريا وكانت الاحماض الامينة هي (فالين , سستين , تربتوفان , فنل النين , تايروسين , مثيونين) , وتم استخدام التراكيز التالية من الاحماض الامينية (٠ ملي مولر , ٥٠ ملي مولر , ١٠٠ ملي مولر , ٥٠٠ ملي مولر) واوضحت النتائج ان معدل التثبيط يزداد بزيادة تركيز الحامض الاميني بالوسط ويمنع من تشكيل الغشاء الحيوي تدريجيا وبعلاقة طردية .

الكلمات المفتاحية : الاحماض الامينية , الغشاء الحيوي , *Staphylococcus aureus* .

المقدمة

معظم أنواع البكتيريا تشكل مجتمعات مصفوفة مغلقة، أو أغشية حيوية والتي تعرف بالـ(Biofilm) والذي يمكن تعريفه بشي من التوضيح على انه عبارة عن تجمعات حيوية وغير حيوية على سطوح الاجسام وهو تركيب فائق التعقيد بالنسبة للبكتريا وهو يعرف ايضا بالطبقة الخارج خلوية (Exoplysaccharide)(EPS) وهذه الطبقة تتشكل عادة من البروتينات والجزئيات الدقيقة الاخرى

تاريخ استلام البحث ١٩ / ٦ / ٢٠١٣ .

تاريخ قبول النشر ٢٠ / ١٠ / ٢٠١٣ .

والكربوهيدرات والأحماض النووية مثل DNA (Branda وآخرون , ٢٠٠٥). في المجالات الصحية, عندما تنمو البكتريا على السطوح فان تشكيل الأغشية الحيوية تعد مشكلة خاصة حيث أنها تميل إلى تشكيل مثل هكذا تجمعات على أجهزة المضيف وتسبب له التهابات مستمرة وتعفن الدم(Sepsis)في حال أنها نمت على الجسم نفسه أو سطح الجسم كالأسنان مثلا إن تجمعات الأغلفة الحيوية للبكتريا(Biofilm) تكون اقل حساسية للمضادات الحيوية مما يجعلها مقاومة ومتعلقة أيضا بالإصابات صعبة العلاج (Mah و O Toole , ٢٠٠١ ؛ Costerton وآخرون ,1999). ونتيجة لذلك ، قد وضعت أساليب لمنع تشكيل هذا الغلاف (Biofilm) حيث أظهرت الأبحاث الأخيرة أن الأحماض الأمينية ذات الشكل الايزومري(D) فئة نموذجية من هذه المركبات التي من شانها تمنع تطور هكذا أغشية (Ilana وآخرون , ٢٠١٢ ؛ Romero وآخرون , ٢٠١١) .

بعض أنواع الأحماض الامينية عزلت من تفكيك الغلاف الحيوي الطافي و المتشكل من البكتريا العصوية (*Bacillus subtilis*) , وقد لوحظت بانها تمنع نمو وتشكل (Biofilm) في المزارع الفتية وذلك من خلال تعطيل الاتصال ما بين بروتينات الطبقة الخارجية(EPS) والخلية البكتيرية .

التأثير التثبيطي المتماثل للـ (Biofilm) لبكتريا*S. aureus* وبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* قد اقترح ان الاحماض الامينية (D) تشكل الاستراتيجية الجيدة لمنع وتثبيط هذا الغلاف من قبل انواع البكتريا الانتهازية (Romero واخرون , ٢٠١١). ان الية عمل الاحماض الامينية تجاه الغلاف الحيوي وتثبيطه غير معروفة بشكل كامل.

لقد وجد ان الاحماض الامينية نوع (D) توثر على تشكيل الغلاف الحيوي للمكورات العنقودية (*S.aureus*) وبنفس التأثير التثبيطي لبكتريا (*B.subtilis*) من خلال منع توطين البروتين على سطح الخلية ومنع لصق وتجاذب الخلايا البكتيرية المتجاورة من بعضها البعض (Geoghegan وآخرون ,٢٠١٠).

المواد وطرائق البحث

المواد

١- **الاحماض الامينية :** تم استعمال ستة انواع مختلفة من الاحماض الامينية في هذه الدراسة وكانت الاحماض الامينية هي (الفالين , السستين , التربتوفان , الفينل النين , التايروسين , المثيونين) .

٢- **حامض الخليك الثلجي** (Glacial acetic acid) : استخدم حامض الخليك الثلجي المخفف بتركيز ٣٣% .

٣- **صبغة الكريستال فيوليت البنفسجية** (Crystal Violet) : استعملت بتركيز ٢% .

٤- **ميثانول (Methanol) :-** استعمل بتركيز٩٥ % .

٥- **صفيحة اختبار جهاز الايلايزا :** (Tissue Culture plate) (96-Well) **.**

٦- **الاوساط الزرعية :** تم استعمال مجموعة من الاوساط وهي وسط المانيتول الملحي الخاص بالبكتريا (Mannitol Salt Agar (MSA ووسط اكار الدم (Blood Agar) ووسط المغذي السائل (Trybticase Soya Broth (TSB ووسط الماكونكي اكار (MacConkey agar) ووسط المولر هنتون(Muller Hinton Agar) الخاص في اختبار الحساسية.

٧- **شريط التشخيص الخاص بالبكتريا (Api 20) :** لغرض تشخيص البكتريا .

٨- **عدة التشخيص الخاصة بالبكتريا (Mast Staph Kit) :-** لتشخيص المكورات العنقودية الذهبية (*S. aureus*) وتمييزها عن الاجناس الاخرى التابعة لمجموعة بكتريا (*Staphylococcus* spp.) .

٩- **(Gram stain) :-** استعملت صبغة كرام (Gram stain) لتشخيص البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام تحت المجهر الضوئي .

طرائق البحث :

١ـجمع العينات :

تم جمع ١١٥ عينة سريرية من الاشخاص الراقدين في مستشفيات مدينة بغداد خلال الفترة من تشرين الثاني ٢٠١٢ لغاية شباط ٢٠١٣. تشمل هذه العينات (الجروح والحروق واشخاص عاملين في المستشفيات ومن اشخاص يعانون من التهاب المجاري البولية التناسلية (UTIs)ومن اصابات الاذن Ear infection.وبعد الزرع الاولي للعينات تم شخيص٤٣عزلة على انها تابعة الى *Staphylococcus* spp. وكان ٢٤ عزلة منها *S. aureus* .

٢ـتشخيص البكتريا :

تم تشخيص جميع العزلات البكتيرية بالاختبارات الكيموحيوية وطرق الزرع على الاوساط الانتقائية فضلا عن استخدام نظام (Api 20 staph system) لتشخيص البكتريا وايضا شخصت جميع العزلات باستعمال عدة التشخيص (Mast Kit) لبيان التلازن البكتيري مع العدة التشخيصية الخاصة ببكتريا المكورات العنقودية وهذا التشخيص يميز بكتريا *S. aureus* عن بقـــــية الاجــــــناس التابـــــعة للـ *Staphylococcus spp.* واستخدمت صبغة كرام (Gram stain) لتشخــــــيص البكتريا على انها موجبة لصــــبغة كــــرام (Brooks واخرون , ٢٠٠٧) .

٣ـاختبار الحساسية :

تم اختبار جميع العزلات البكتيرية لعشرة من المضادات الحيوية (فانكومايسين , ريفامبسين , كلورامفينكول , تتراسيكلين , توبرامايسين , بنسلين , كلندامايسين , ارثرومايسين , سيبروفلوكساسين , سيفوكستين والذي يعوض عن اختبار المثيسلين)على وســـــــــــــط (Muller Hinton Agar) (Clinical and Laboratory Standards Institute، ٢٠١١).

ان اجراء هذا الفحص يحدد فيما اذا كانت العزلات مقاومة للمثيسلين فان كانت مقاومة فأنها تكـــــــــون (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA) او تكون حساسة فيشار اليها (Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*)(MSSA).

٤ـالاحماض الامينية المستعملة :

تم استخدام ستة انواع من الاحماض الامينية هي : (tryptophan ، phenylalanine ، methionine valine ، tyrosine ، glycine) .وتم تحضير اربعة تراكيز مختلفة من كل حامض اميني وهـــي(500mM ، 100mM،50mM ، ٠mM) بالاعتماد على معادلة التركيز المولاري ادناه وفقا للوزن الجزيئي لكل حامض اميني :

$$M = \frac{Wt}{M.Wt} \times \frac{1000}{V}$$

حيث ان (M) هو التركيز المولاري مقاسا بالمول وان (Wt.)هو وزن المادة الصلبة المراد تحضيرها مقاسا بالغرام و(M.Wt.)هو الوزن الجزيئي للمادة الصلبة مقاسا بالغرام/مول ويمثل (V) الحجم المطلوب لإذابة المادة الصلبة فيه مقاسا بالمل وبما ان التركيز المراد تحضيره هو بالملي مول فيكون التركيز المولاري النتاج يضرب في 10^{-6} لان ١مول = $١٠^{٦}$ ملي مول .

الأوساط الزرعية :

وسط اكار الدم (Blood agar) :

زرعت عزلات البكتريا على وسط اكار الدم لتنشيط العزلات واختبار انتاجها لانزيم اليهمولايسين المحلل للدم كأحد عوامل الضراوة المهمة في تشخيص البكتريا حيث زرعت العزلات بدرجة حرارة ٣٧ مئوية لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

وسط الماكونكي (MacConkey agar) :

زرعت العزلات على وسط الماكونكي اكار وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٧ مئوية لمدة ١٨-٢٤ ساعة وهو وسط خاص بمجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام.

وسط المانيتول الملحي (Mannitol Salt Agar):

تم زرع جميع عزلات البكتريا على وسط المانيتول الملحي بدرجة حرارة ٣٧ مئوية لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

وسط Trybticase Soya Broth (TSB) وتخفيف البكتريا :

تم زرع جميع عزلات البكتريا على وسط (Trypticase Soya Broth)(TSB) وتم وضع جميع العزلات المزروعة في حاضنة هزازة(Shaker incubator)بدرجة حرارة ٣٧ مئوية لمدة ١٨-٢٤ ساعة وتم تخفيف العينات المزروعة في اليوم الثاني باستخدام ماء مقطر معقم ومقارنة عكورة محلول العالق البكتيري بمحلول ماكفرلاند القياسي(1.5×10^8 CFU/ml)ومن ثم تم استخدام وسط (TSB)مزود بـ (NaCl) 3% وكلوكوز ٠.٥% مع اضافة التراكيز المحضرة من الاحماض الامينية المختلفة الى الوسط الزرعي (TSB) (Cava واخرون , ٢٠١١) .

طريقة (Micro titer assay)(MTP) :

تم اختبار ٢٤ عزلة من بكتريا *S. aureus* ونقل ٢٠٠ مايكروليتر من وسط(TSB) إلى (MTP 96-wells) , وتم نقل مقدار٢٠مايكروليترمن العالق البكتيري المخفف الى كل حفرة حاوية على الوسط الزرعي المحضر مع استخدام حفر سيطرة سالبة حاوية على وسط (TSB) لوحده , حضنت بدرجة ٣٧ م لمدة 18-٢٤ ساعة , بعد ذلك أزيلت محتويات الحفر وغسلت ٣ مرات بمحلول دارئ الفوسفات ، تم تثبيت الخلايا الملتصقة بالإيثانول بتركيز٩٥% وتركت لمدة ١٠ دقائق . تم تصبيغ الحفر بصبغة Crystal violet تركيزها ١% بإضافة ١٠٠مايكروليترمن الصبغة لكل حفرة لمدة ١٥دقيقة بعدها غسلت الحفر بماء مقطر معقم لإزالة الصبغة الغير ملتصقة ، وبذلك يمكن تقدير قابلية البكتريا على الالتصاق كميا بملاحظة كمية الصبغة الملتصقة في الحفر، ولتقدير قدرة البكتريا على إنتاج المادة المخاطية نوعيا تم استخلاص الصبغة الملتصقة بالحفر بإضافة ١٠٠ مايكرو ليتر من حامض الخليك الثلجي (glacial acetic acid) بتركيز ٣٣% ومن ثم قياس الامتصاصية على الطول الموجي ٦٣٠ نانوميتر بجهاز(Human reader ELISA HS) (Mathur وآخرون , ٢٠٠٦ ؛ Christensen وآخرون , ١٩٨٥).

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص البكتريا :

في هذه الدراسة تم جمع ١١٥ عينة من مصادر سريرية مختلفة وشخصت ٤٣ عزلة بكتريا تعود الى جنس *Staphylococcus spp.* من اماكن العزل وكانت نسبتها ١٧ عزلة من الجروح والحروق و١١

عزلة من اصابات القناة البولية التناسلية و١٣ عزلة من اصابات الاذن و٣ عزلات من اصابات العيون وهي نتائج التشخيص الاولي تحت المجهر الضوئي .

التشخيص الزرعي :

زرعت جميع العزلات التي تعود الى جنس *Staphylococcus spp.* على وسط اكار الدم واظهرت النتائج وجود تحلل واضح للدم نوع الفا وبيتا حسب انواع البكتريا التي تعود الى نفس النوع وهي احد عوامل الضراوة المهمة في تشخيص البكتريا (Haque وBaldwin, ١٩٦٤) وتم زرع العزلات ايضا على وسط الماكونكي اكار واوضحت النتائج ان جميع عزلات البكتريا لم تنمو على هذا الوسط لوجود املاح الصفراء وصبغة الكريستال فايوليت المضادة لمجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كـرام(Luis وآخرون ,٢٠٠٤) . كما وتم زرع العزلات على وسط المانيتول الملحي وأوضحت النتائج ان ٢٤ عزلة فقط أبدت نمو واضح على هذا الوسط مع مستعمرات صفراء ذهبية مخاطية وتحول لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر نتيجة تخمر الوسط واستهلاك سكر المانيتول وهي من الصفات التشخيصية المهمة التي تعود إلى جنس *S. aureus* على هذا الوسط فضلا عن تحملها للملح الموجود في الـوسط بنـسبة ٧.٥% (Davis وآخرون , ٢٠٠٦) .

التشخيص بنظام (Api20 staph system) :

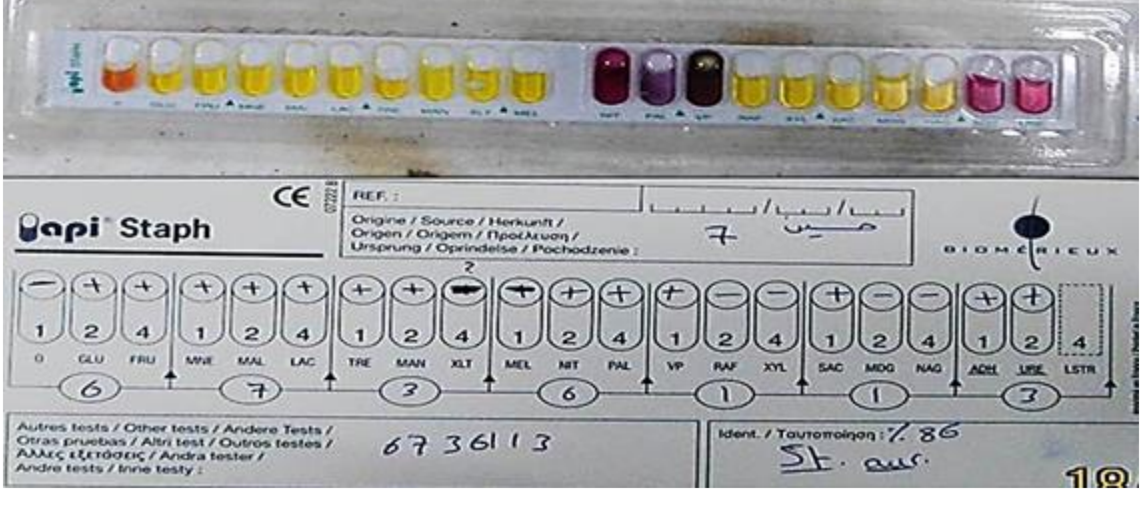
شخصت العزلات البكتيرية باستخدام شريط التشخيص الخاص بالبكتريا (Api 20) كما في الشكل (١) واوضحت نتائج التشخيص ان ٢٤ عزلة بكتريا تعود الى جنس المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* من ٤٣ عزلة بكتريا تعود الى جنس *Staphylococcus spp.* .

التشخيص بعدة التشخيص (Mast Kit) :

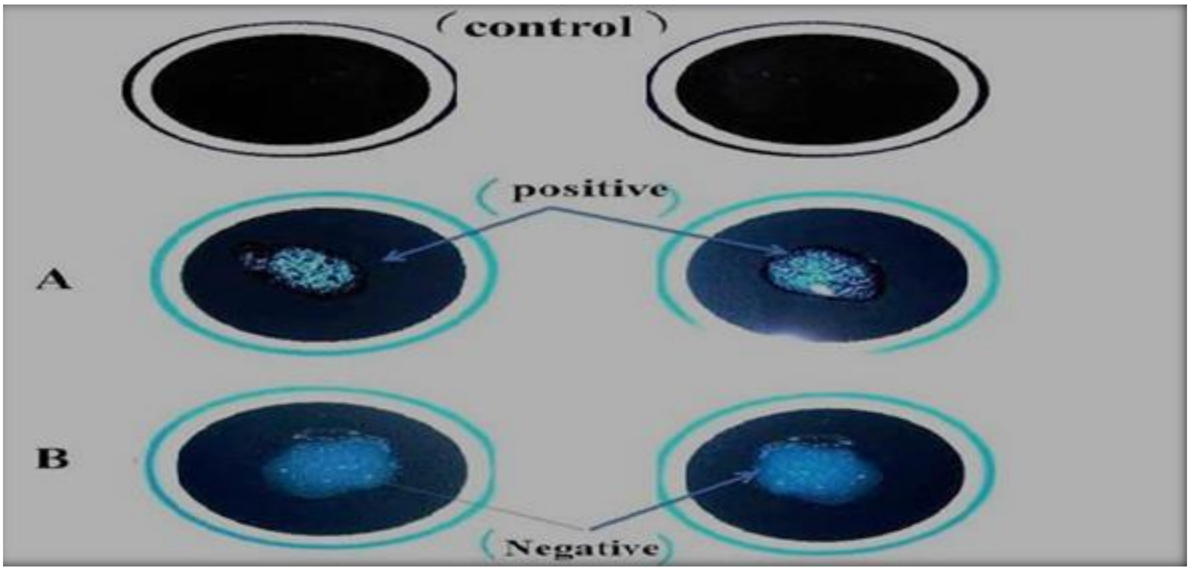
تم تشخيص جميع العزلات بعدة التشخيص Mast Kit لتمييز العزلات التي تعود الى بكتـــــــريا *S. aureus* وتمييزها عن الانواع الاخرى التـي تعـــود الـــــــى جنس *Staphylococcus spp* كما في الشكل (٢) .

التشخيص بالاختبارات الكيموحيوية (Biochemical test) :

تم اختبار ٢٤عزلة بكتريا تعود الى جنس *S. aureus* لفحص الكتليز والاوكسيديز واظهرت النتائج ان ٢٤ عزلة كانت موجبة للكتليز وسالبة لفحص الاوكسيديز (Brooks واخرون , ٢٠٠٧).



شكل ١. التشخيص بنظام (Api 20 staph system) لبكتريا *S. aureus* .



شكل ٢. عدة التشخيص (Mast Kit)العزلة (A) تمثل بكتريا *S. aureus* وهي موجبة للفحص بوجود تلازن واضح والعزلة (B) هي بكتريا *Staphylococcus epidermidis* وهي تمثل النتيجة السالبة للاختبار .

اختبار فحص الحساسية لمضاد السيفوكستين :

تم زرع ٢٤ عزلة على وسط (Muller Hinton agar) بوجود مضاد السيفوكستين الذي يعوض عن اختبار المثيسلين واظهرت النتائج ان ٢١ عزلة كانت مقاومة لهذا المضاد وبنسبة ٨٧.٥% و٣ عزلات كانت حساسة وبنسبة ١٢.٥% وهي نتائج اتفقت مع نتائج (Kader واخرون , ٢٠١١) حيث أظهرت نتائجه ان ٨٨.٢٤% من عزلات البكتريا كانت مقاومة للمثيسلين و١١.٤٦% كانت حساسة .

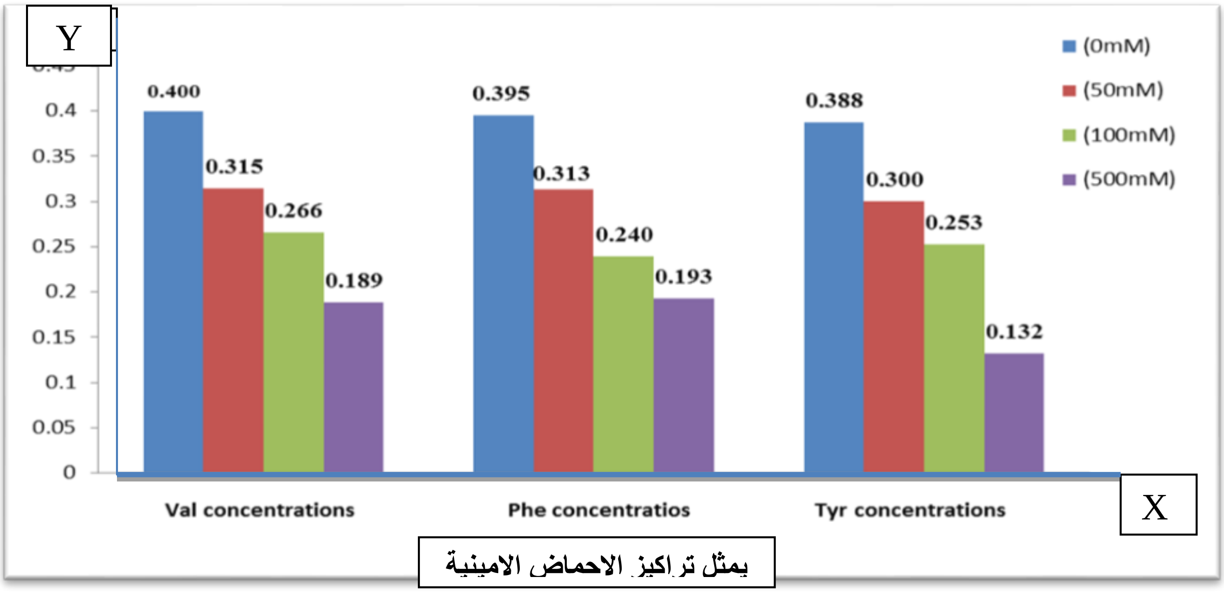
تأثير الاحماض الامينية :

تم استخدام ستة انواع مختلفة من الاحماض الامينية وهي (الفالين , السستين , المثيونين , التربتوفان , الفنل النين , التايروسين) وباربعة تراكيز مختلفة لكل حامض اميني وكانت التراكيز كالآتي : (٠ مايكرومولر و ٥٠ ميكرومولر و١٠٠ مايكرومولر و٥٠٠ مايكرومولر) .

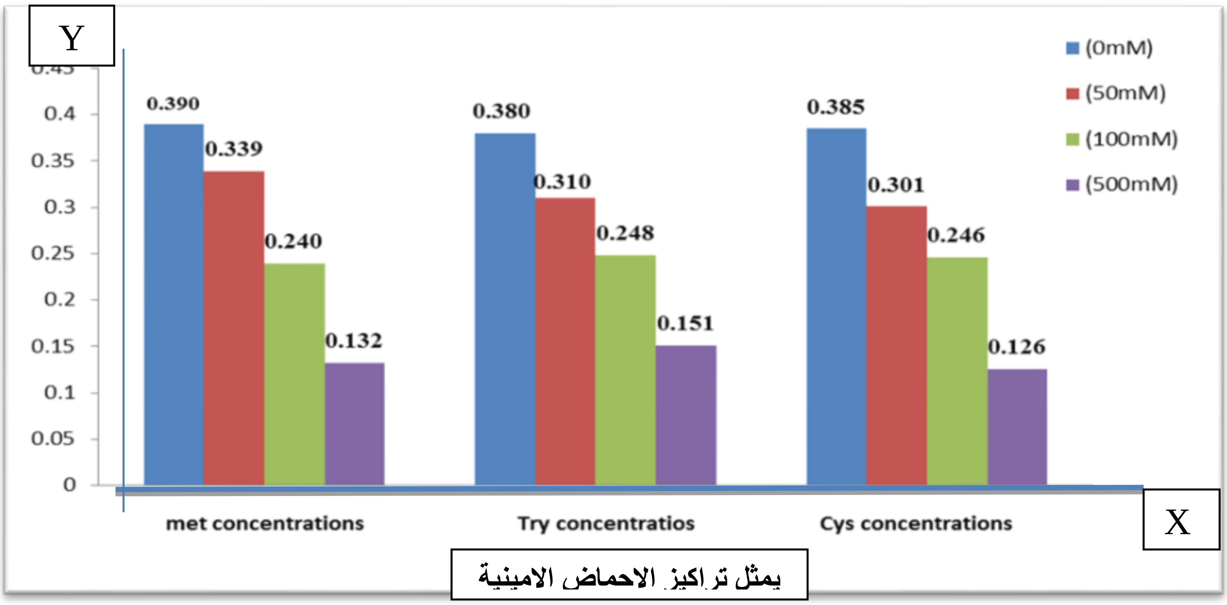
اظهرت النتائج ان الغشاء الحيوي للبكتريا (Biofilm) يزداد بخفض تركيز الحامض الاميني في الوسط حيث بينت النتائج ان تركيز ٠ مايكرومولر هو اقل تأثيرا واستخدم ككونترول لكل عزلة بكتريا وكان معدل القراءات لهذا التركيز ٠.٣٩٠ نانوميتر لكل انواع الاحماض الامينية المستخدمة ، واظهرت النتائج ان معدل قراءات تركيز ٥٠ مايكرومولر لكل الاحماض كانت ٠.٣١٣ نانوميتر ومعدل قراءات تركيز ١٠٠ مايكرو مولر ٠.٢٤٨ نانوميتر وتركيز ٥٠٠مايكرومولر كانت ٠.١٥٣ نانوميتر .

من النتائج اعلاه يتضح ان تأثير الاحماض الامينية كان سلبيا على تشكيل الغشاء الحيوي حيث بزيادة تركيز الحامض يقل مستوى تشكيل الغشاء والشكلين ٣ و ٤ يبينان النتائج التي تم الحصول عليها .

الشكل(٣) يوضح النتائج التي تم الحصول عليها بجهاز الايلايزا(Human reader HS) وبطول موجي ٦٣٠نانوميتر وتحت تأثير اربع تراكيز مختلفة من كل حامض اميني كما موضح بالأشكال(٣ ، ٤ و ٥) .



شكل ٣. قراءات ثلاث من الاحماض الامينية وهي(الفالين, الفنل النين , التايروسين) .



شكل٤. قراءات لثلاث من احماض امينية اخرى وهي(المثيونين والتربتوفان والسستين) .

حيث يمثل المحور(X) في الشكلين الى تراكيز الاحماض الامينية بالوسط الزرعي والمحور (Y) في الشكلين يمثل القراءات على طول موجي ٦٣٠ نانوميتر.

العديد من البكتريا ومن ضمنها *S. aureus* تنتج احماض امينية(D-amino acids) عند مرحلة الوصول الى طور الثبات العددي للبكتريا (Stationary phase)Lam واخرون , ٢٠١١).حيث ان هذه الاحماض الامينية تندمج مع سلاسل وجسور طبقة الببتيدوكلايكان في جدار الخلية) Cave وآخرون , ٢٠١١).أوضحت النتائج أن الأحماض الامينية L-tyrosine, L-tryptophan, (L-methionine) ذات فاعلية عالية في تثبيط تكوين الغلاف الحيوي للبكتريا وهذا ما يتفق مع نتائج Hochbaum واخرون (٢٠١١) حيث اوضح ان هذه الاحماض كانت فعالة ضد بكتريا *B. subtilitis* المكونة للغلاف الحيوي(biofilm)حيث ادى استعمال نفس التراكيز من الاحماض الامينية المذكورة الى تفكيك البايوفلم المتكون من قبل البكتريا. كما اوضحت النتائج ايضا ان الحامض الاميني (L-

phenylalanine) ابدى فاعلية في تفكيك الغشاء الحيوي المتشكل في المكورات العنقودية وهذه النتيجة متناقضة بالنسبة لفاعلية نفس الحامض الاميني تجاه بكتريـــــــا *B. subtilitis* حيث اتضح ان تأثير هذا الحامض الاميني على تثبيط تشكيل الغشاء الحيوي لبكتريـــــا *B. subtilitis* كان خاملا(Hochbaum واخرون , ٢٠١١) .يعود سبب ذلك الاختلاف بين المكورات العنقودية *S. aureus* و *B. subtilitis* في ميكانيكية التشكيل في جدار الخلية البكتيرية وعلى وجه التحديد في طبقة الببتيدوكلايكان (Hochbaum واخرون , ٢٠١١) .

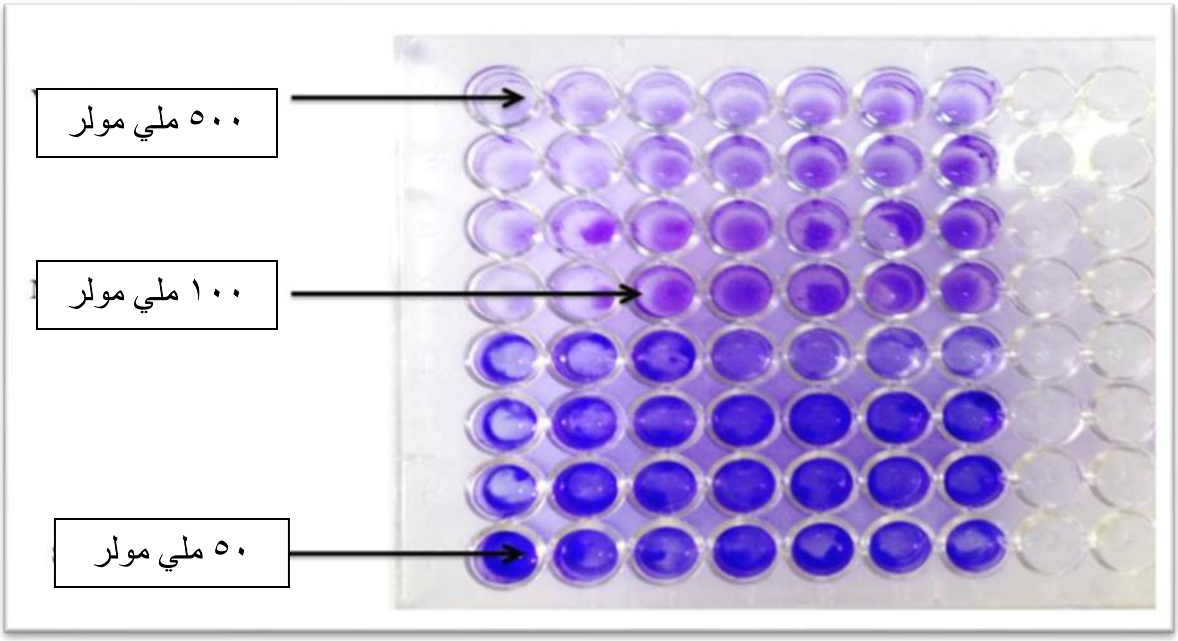
يتضح من الشكل(3) أن الفالين (Valine) أبدى فاعلية تثبيطية تجاه تكوين الغشاء الحيوي للمكورات العنقودية وهذا ان دل على شيء فيدل على طبيعة التركيب العام لطبقة الببتيدوكلايكان للمكورات العنقودية وهذا لا يتفق مع نتائج Bernier واخرون (٢٠١١) حيث اوضحت دراسته والنتائج التي تم الحصول عليها خلال دراسته لبكتريا الزائفة الزنجارية *P. aeruginosa* ان الحامض الاميني الفالين هو واحد من اهم الاحماض الامينية التي اوضحت دورا فاعلا في تشكيل الغشاء الحـــــيوي لبكتريـــــــا *P. aeruginosa* ويعود سبب ذلك الى ان هذا الحامض الاميني تستخدمه البكتريا كمصدر للكاربون و مصدر للطاقة كي تنمو(Bernier واخرون , ٢٠١١) .

كما ان النتائج اوضحت ان الاحماض الامينية (Tyrosine ، Methionine ، Cysteine ، Tryptophan) ابدت فاعلية تثبيطية للغلاف الحيوي للبكتريا ويعود سبب ذلك الى ان البكتريا عند وجود احماض امينية تتحفز لإنتاج بروتينات اخرى اثناء عمليات الايض التي تقوم بها مثل انزيم Protease وهو احد عوامل الضراوة المهمة في هذه البكتريا وهذا الانزيم يتسبب في تثبيط تشكيل الغشاء الحيوي للبكتريا (Muzaffar واخرون ,١٩٩٧).

كما ان التركيب الكيميائي للغشاء الحيوي يختلف بين انواع البكتريا بصورة عامة وحتى بين الانواع التابعة لنفس العائلة اذ ان لكل بكتريا تركيبها الخاص وان الببتيدات قد تتداخل مع هذه الاغشية وتسبب بوجود خلخلة في تركيبها وبعض الانواع البكتيرية تستهلك تلك الببتيدات فتساهم في تشكيل عوامل ضراوة البكتريا (Arvanati واخرون , ١٩٩٤) .

كما ان هذه الاحماض لم توثر على بكتريا *S. epidermidis* بشكل كبير ويعود سبب ذلك الى قلة عوامل الضراوة في هذه البكتريا قياسا بكثرة عوامل الضــــــــراوة في بكتـــــريا *S. aureus* والتي من شانها ان تثبط تشكيـل الغـشاء الحـيوي (Muzaffar وآخرون ,١٩٩٧) .

كما ان سبب تفكك الغشاء الحيوي لبكتريا *S. aureus* بفعل الاحماض الامينية يعود الى تداخل هذه الاحماض مع (poly N-acetyl glucosamine) الموجود في جدار الخلية البكتيرية مما يسبب في تفكيك وتحلل الغشاء الحيوي (Ilana واخرون , ٢٠١٢) .



شكل ٥. يوضح معاملة العزلات البكتيرية بمجموعة مختلفة من الاحماض الامينية وبتراكيز مختلفة حيث يلاحظ من الشكل التدرج الواضح بالصبغة نتيجة معاملة البكتريا بالأحماض الامينية نتيجة اختلاف التراكيز حيث بزيادة تركيز اي حامض فانه يتسبب في تفكيك الغشاء الحيوي .

المصادر

Arvanati, A., N. K. Karamanos., G. Dimitracopoulos and E. D. Anastassiou.1994. Isolation and characterization of a novel 20 kDa sulfated polysaccharide from the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. Arch. *Biochem. Biophys*. 308:432–438.

Bernier, S. P., D. G. Ha., W. Khan., J. H. Merritt and G.A. O'Toole. 2011. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Res. in Microbiol*.162, 680-688.

Branda ,S. S., A. Vik., L. Friedman and R. Kolter . 2005. "Biofilms: the matrix revisited," *Trends in Microbiology*, 13(1). 20–٢٦.

Brooks, G.F., K.C. Carroll., J.S. Butel and S.A. Morse. 2007. Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 24th.ed. *The McGraw-Hill Companies, Inc. New York*..224-232.

Cava, F., H. Lam., M. A. de Pedro and M. K. Waldor. 2011. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol. Life Sci*. 68:817–831.

Cava, F., M. A. de Pedro., H. Lam., B. M. Davis and M. K. Waldor. 2011. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *EMBO J*. 30:3442–3453.

Christensen, G.D, W.A. Simpson ., J.A. Younger., L.M. Baddour., F.F. Barrett and D.M. Melton .1985. Adherence of cogulase negative Staphylococi to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol*.22:996-1006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) . 2011.Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-First informational supplement. M100-S21. 31(1) .

Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284:1318–1322.

Davis, J.A., S.R. Farrah and A.C. Wilkie 2006. Selective growth of *Staphylococcus aureus* from flushed dairy manure wastewater using acriflavine-supplemented mannitol salt agar. *Letters in Applied Microbiology* . 0266-8254.

Geoghegan, J. A., M.C. Rebecca., T.G. Dominika., S. Pietro., P.O. James., R.P. Jennifer and J.F.Timothy . 2010. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. 192:5663–5673.

Haque, R., and J.N. Baldwin.1964.Types of Hemolysins Produced by *Staphylococcus aureus*, As Determined by The Replica Plating Technique. *J. Bacteriol*. 88(5):1442-1447.

Hochbaum, A. I., I. Kolodkin-Gal., L. Foulston., R. Kolter., J. Aizenberg., R. Losick . 2011. Inhibitory effects of d-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. *J. Bacteriol*. 193(20), 5616-5622.

Ilana, K., C. Shugeng., C. Liraz., B. Thomas., K. Roberto., C. Jon., and L. Richard. 2012. A Self-Produced Trigger for Biofilm Disassembly that Targets. *Exopolysaccharide*.149: 684–692.

Lam, H., Dong-Chan Oh., C. Felipe., N. Constantin., J. Takacs., Clardy., A. Miguel., de Pedro., K. Matthew and Waldor. 2009 . D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria. *Science* . 325:1552–1555.

Luis, M., De LA Maza., Pezzlo., T. Marie., T. Janet., Shigei., Peterson., M. Ellena . 2004. Color Atlas of Medical Bacteriology. Washington, D.C: ASM Press. 103. ISBN 1-55581-206-6.

Mah, T. F., and G. A. O’Toole. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 9:34–39.

Mathur, T., S. Singhal., S. Khan., D.J. Upadhyay., T. Fatma and A. Rattan. 2006. Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods. Indian *J. Med. Microbiol*. 24(1):25-29.

Muzaffr, H., H. Mathias., V.E. Christof., P.R. Francoise and P. Gerog.1997. A 140-Kilodalton Extracellular Protein Is Essential for the Accumulation of *Staphylococcus epidermidis* Strains on Surface. *Infection and immunity* . 65(2):519–524.

Romero, D., H. Vlamakis., R. Losick and R. Kolter. 2011. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibers in *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol. Microbiol*. 80:1155–1168.

EFFECT OF SOME AMINO ACIDS ON BIOFILM FOR STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Hussein Mahmood Abas* **Mohammad Fakhri Ahmad***

*Dept. of Biology – College of Sciences- University of Mustansiria.

ABSTRACT

In this study , one hundred and fifteen clinical samples were collected from patient suffering from a variety of infections. Number of collected samples and types of infections were distributed as follows , Fifty one from wounds and burns infections , twenty eight from (UTI) infections , eleven from eye infections and twenty-five from ear infections .The initial identification , which included morphological features on culture media were done at the hospital site , and demonstrated that forty three 43 isolates were diagnosed as *Staphylococcus spp*.Twenty four isolates (from this forty three isolates) isolates were diagnosed as *S. aureus*. All the isolates (43) were tested for the cultural examination at the site of isolation and biochemical tests were performed , and the use of the system (Api20) in order to be diagnosed until species. The results showed that (24) from (43) isolates were diagnosed as *Staphylococcus aureus*. The results showed that (13) from (24) isolates were collected from wounds and burns infections, (5) from (24) isolates from (UTIs) , (4) from (24) isolates from Ear infections , and (2) from (24) isolates were collected from Eyes infections. All isolates were tested for methicillin antibiotics to determine the resistance and sensitive isolates for this antibiotics, the results showed that (21) from (24) isolates (87.5%) were resistant to methicillin and (3) from (24) isolates (12.5%) were sensitive for the same antibiotics. Six type of amino acids were used to study the impact or effects on the formation of (Biofilm) in bacteria and the

amino acids are (Valin , Cysteine , Tryptophan , Phenylalanine , Tyrosine and Methionine) , the following concentrations of amino acids were used in the current study (0mM , 50mM , 100mM and 500mM) , the results showed that the rate of inhibition increases with the concentration of amino acids in the media and it prevent the biofilm formation with the gradually and proportional relationship .

Keyword : Amino acids , Biofilm , *Staphylococcus aureus* .