قياس نسب الاحماض الدهنية لبعض الجراثيم السالبة لصبغة كرام*

أميرة محمود محمد الراوي غادة عبد الرزاق محمد الطائي شفق طارق برهان
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

ABSTRACT

Fatty acids were analyzed from cell wall and cell membrane of some gram negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Plesimonas shigelloides* and *Proteus mirabilis* by using gas liquid chromatography (GLC). Extraction and methylestrification analysis were done and compared with standard fatty acids. The results showed that the major percent of fatty acids was lionleic acid (14.137%) in *Ps. aeruginosa* followed by palmitic acid (10.059%) the other fatty acids percent myrestic acid, stearic acid, oleic acid, capric acid, lauric acid were different and it was 0.527%, 8.042%, 6.261%, 1.205%, 0.527% respectively. While the higher percent of fatty acids in *Plesimonas shigelloides* was palmitic acid (20.621%) followed by oleic acid (15.816%), stearic acid (15.373%) and myrestic acid (10.897%). The minor percent which was less than 1% belonged to lauric acid, capric acid, docosahexanoic acid, eicosapentanoic. For *Proteus mirabilis*, myristic acid and lauric acid appeared with higher percent 17.349%and 13.130% respectively.

الخلاصة

تضمنت الدراسة قياس نسب الاحماض الدهنية لبعض الجراثيم السالبة لصبغة كرام *Pseudomonas aeruginosa* , *Plesiomonas shigelloids* , *Proteus mirabilis* باستخدام تقنية Gas liquid chromatography. (GLC) تم استخلاص الاحماض الدهنية وأسترتها وتحليلها وبالمقارنة مع عدد من الاحماض الدهنية القياسية بينت النتائج ان اعلى نسبة مئوية كانت للحامض الدهني (14.137 %) lenoleic acid لجرثومة *Ps.aeruginosa* يليها Palmatic acid (10.059%) وتفاوتت النسب المئوية للاحماض الدهنية الاخرى Lauric acid, Capric acid, Oleic acid, Stearic acid, Myrestic acid حيث بلغت 8.042 % ، 6.261 % ، 4.513 % ، 1.205 % ، 0.527 % على التوالي وبالنسبة لجرثومة *Plesiomonas shigelloid* كانت اعلى نسبة مئوية لحامض الدهني palmitic acid بلغت 20.621 % يليها الحامضان الدهنيان Stearic acid ,

* البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

Oleic acid بنسب متقاربة 15.816 % ، 15.373 % على التوالي وبلغت بنسبة Myrestic acid 10.897 % بينما كانت نسب الاحماض الدهنية Docosahexanoic acid , Capric acid , Lauric acid , Eicosapentanoic acid اقل من 1 % بينما تم استخلاص Myrestic acid بنسبة 17.349 % و Lauric acid بنسبة 13.130 % من جرثومة *Proteus mirabilis* .

المقدمة

تمتلك الجراثيم (مثلها مثل كل أشكال الحياة) غشاءاً سايتوبلازمياً كمكون لغلافها الخلوي والذي يتكون من 50 % دهن تقريباً .وتكون دهون الاغشية كمجاميع متنوعة من الجزيئات التي تستخدم احياناً مؤشراً للتصنيف والتعريف عن الاحياء المجهرية (1 و 2) . نادرا ما توجد الدهون داخل الكائن الحي بصورة حرة ولكنها تكون عادة وعلى الاغلب مرتبطة مع البروتينات او الكاربوهيدرات مثل البروتينات الدهنية او السكريات المتعددة الدهنية (3).

تتواجد الاحماض الدهنية في معظم الجراثيم الموجبة لصبغة كرام في الغشاء السايتوبلازمي ، وتمتلك الجراثيم السالبة لصبغة كرام الاحماض الدهنية ايضا في غشائها السايتوبلازمي كما انها يمكن ان تتواجد في قطع الجدار الخلوي وبصورة عامة في متعدد السكر الدهني LPS (4 و 5) يمكن التعرف على الاحياء المجهرية المهمة طبيا بطرق عديدة اذ تعتمد طرائق العمل التقليدية Conventional method على تعبير الخصائص الاساسية والتي عادة ما تتوسطها الفعالية الانزيمية بشكل مباشر .

وقد توسعت هذه الطرائق لتضم نظم التعريف العددية Numerical identification او الانظمة التعريفية لتحليل النتائج التي غالبا ما تكون صعبة التحليل ، ويعد التصنيف الكيميائي دقيقا ويمكن ان يعطي نتائج نوعية في تعريف الخصائص المميزة بدقة عالية . ويضع تحليل الاحماض الدهنية الخلوية Celluar Fatty Acid (CFA) في هذا الصنف (6 و 7) . يتم تحليل الأحماض الدهنية بالطريقة الشائعة وهي Gas Liquid (GLC) Chromatography وهذه الطريقة يمكن تطبيقها على العينات البايولوجية التي تحوي مركبات طول سلاسلها الكربونية مابين C_{10}-C_{24} . ويحدث تحليل GLC للاحماض الدهنية بعد تحويل مشتقات الاستر المثيلي حيث تستخدم الأعمدة ذات الاطوار القطبية مثل Polyethylene glycol لتغطية العمود الشعري (8) .

نجحت امكانية تطبيق تحليل الاحماض الدهنية باستخدام جهاز الاستشراب الغازي GLC لعدة اغراض حيث ان الخبرة والممارسة في تحليل CFA لمجاميع الميكروبات لاغراض التشخيص المايكروبي قد طورت بصورة سريعة وعدت كأداة قوية فضلا عن انظمة

تشخيص CFA يمكن تطبيقها على عدة مايكروبات وصولا الى مستوى النوع ويمكن انجـاز النتائج بسرعة مع بقاء التطبيقات الاخرى بمستوى تخصصي عالي ، من بين عدة دراسـات شملت تطوير مستقبل تحليل CFA في علم الاحياء المجهرية السريري وايجاد طرائق دعمت حساسية ومقاومة الاحياء المجهرية للمضادات الحيوية واساس هذه الدراسات مبني على تحديد التأثير المباشر للمضادات المايكروبية على دهون الاغشية او التحليل الكمي لنسبة بناء وتنظيم الاحماض الدهنية فيها (6) .

وعليه استهدفت الدراسة تعيين المحتوى الكلي من الأحماض الدهنية لعدد من الجراثيم السالبة لصبغة كرام وايجاد النسبة المئوية لكل من الأحماض الدهنية المشبعة وغير المـشبعة لأهميتها في مقاومة الخلايا للمضادات الحيوية اعتماداً على ترتيب هذه الدهون وتوزيعها في الخلية فضلاً عن اهميتها كصفة تصنيفية.

المواد وطرائق العمل

ـ العينات الجرثومية :

تم الحصول على كـل مـن جرثومـة *Plesiomonas shigelloides* وجرثومـة *Pseudomonas aeruginosa* وجرثومة *Proteus mirabilis* من قسم علوم الحياة /كلية العلوم/ جامعة الموصل .وقد تم التأكد من نقاوتها باجراء الاختبارات التشخيصية المتـضمنة للفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية الخاصة بكل جرثومة (9 و 10) .

ـ الاحماض الدهنية :

<u>اولاً</u> : استخلاص الاحماض الدهنية (الصوبنة) :

تم اضافة 5 سم3 من محلول هيدروكسيد الـصوديوم 7.5 عيـاري المحـضر فـي الميثانول المخفف بالماء المقطر بنسبة 4:6 ، (حجم : حجم)الى 0.2 من المغلق الجرثـومي المحضر من كل جرثومة ثم سخن المزيج بدرجة 105 م لمدة ساعة ونصف ، بعـدها تـرك المزيج ليبرد ثم اضيف اليه 6 سم3 من الماء المقطر ، ثم استخدم محلول حامض الكبريتيـك بتركيز 20 % لضبط الدالة الحامضية pH على 2 بالاستعانة بجهاز قياس الحموضـة . ثـم استخلصت الاحماض الدهنية باستخدام 30-50 سم3 من ثنائي اثيل ايثـر Diethyl ether (11 و 12) .

<u>ثانياً</u> : استرة الأحماض الدهنية :

تمت استرة الأحماض الدهنية بعد اتمام عملية الصوبنة والاستخلاص باعتماد طريقـة BF3 لتكون جاهزة للتحليل في جهاز GLC اذ اضيف 5 سم3 من 14 % مـن Boron triflouride methanol (BF3) (13) وسخن المزيج في درجة حـرارة 85 م لمـدة 15

دقيقة للاسترة ، بعدها استخلصت الاحماض الدهنية المؤسترة باضافة 1 سم 3 من مزيج البنتان مع ثنائي اثيل ايثر بنسبة 1:1 (حجم:حجم) نقلت مستخلصات الايثر ــ بنتان الحاوية على استر مثيل الأحماض الدهنية إلى أنابيب اختبار بحجم 5 سم3 وتم تركيزها تحت ظروف مشبعة ببخار غاز النتروجين ثم اضيف كبريتات الصوديوم اللامائية الى مستخلص استرات مثيل الأحماض الدهنية للتخلص من الرطوبة . نقلت النماذج الى أنابيب اختبار وخزنت بدرجة حرارة –20 م لحين القياس .

ثالثاً : تحليل الاحماض الدهنية :

1 – جهاز الاستشراب الغازي /السائل Gas-Liquid Chromatography(GLC) :

استخدم جهاز GLC نوع SHIMADZU / 2010 المزود بكاشف التأين الحراري Flame ionization detector (FID) ويتكون الجهاز من عمود شعري نوع TR-WAX يبلغ طوله 30 متراً وقطره الداخلي 0.32 (mm ID) وتصل درجة حرارته 240 م° وضغط 32.5 KPA ، ويبلغ معدل الجريان الكلي 8.5 mL/min ومعدل الجريان في العمود 0.50 mL/min . اما السرعة الخطية فكانت 14.3 سم/ثا. استخدم النتروجين / الهواء كغاز ناقل .رفعت درجة حرارة العمود بمعدل 5 م° في الدقيقة من 175 م° الى حد 240 م° . وللحصول على اللهب فقد نظمت درجة حرارة الكاشف على 250 م واستخدم غازي الهيدروجين والهواء 40 و 400 مايكروليتر/دقيقة على التوالي .

2– الاحماض الدهنية القياسية : تم الحصول عليها من مركز التقييس والسيطرة النوعية في دمشق / سوريا .

Capric acid ($C_{10:0}$)	Lauric acid ($C_{12:0}$)	Myristic acid($C_{14:0}$)
Palmiticacid($C_{16:0}$)	Palmitoleic($C_{16:1}$)	Steari acid ($C_{18:0}$)
Oleic acid($C_{18:1}$)	Linoleic acid ($C_{18:2}$)	Linolenic acid ($C_{18:3}$)
Arachidonic($C_{20:4}$)	Eicosapentanoic($C_{20:5}$)	Docosahexaenoic($C_{22:6}$)

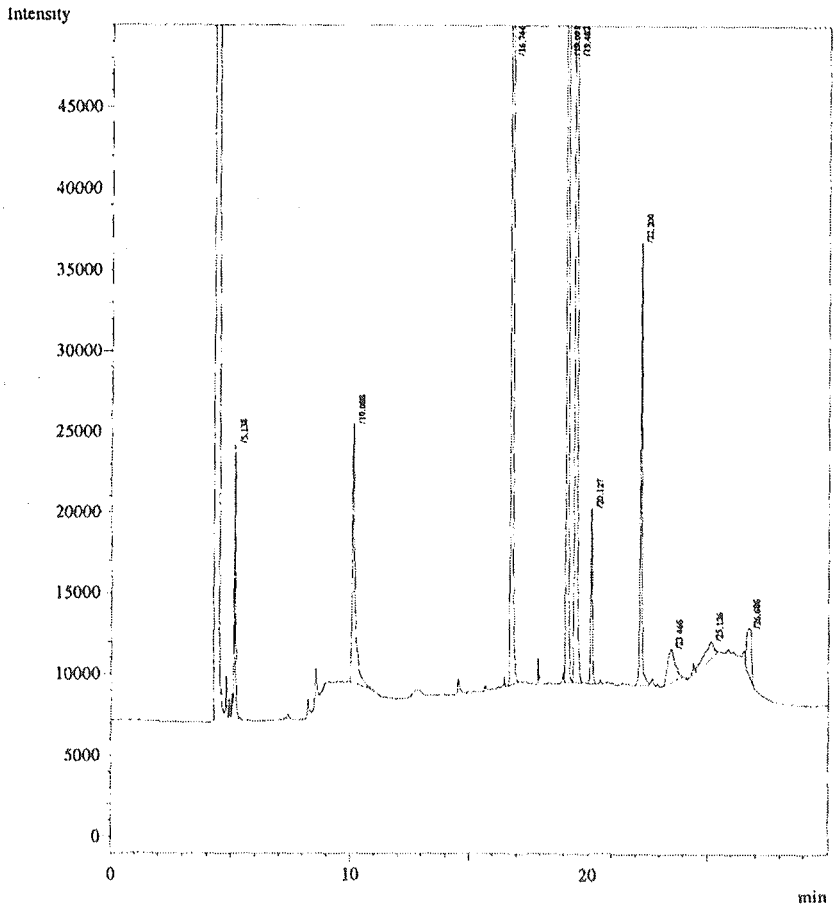
بعد اتمام استرتها تذاب في 10 سم^3 هكسان ويحقن (1) مايكروليتر من كل حامض دهني قياسي في جهاز GLC .

3– طريقة التحليل :

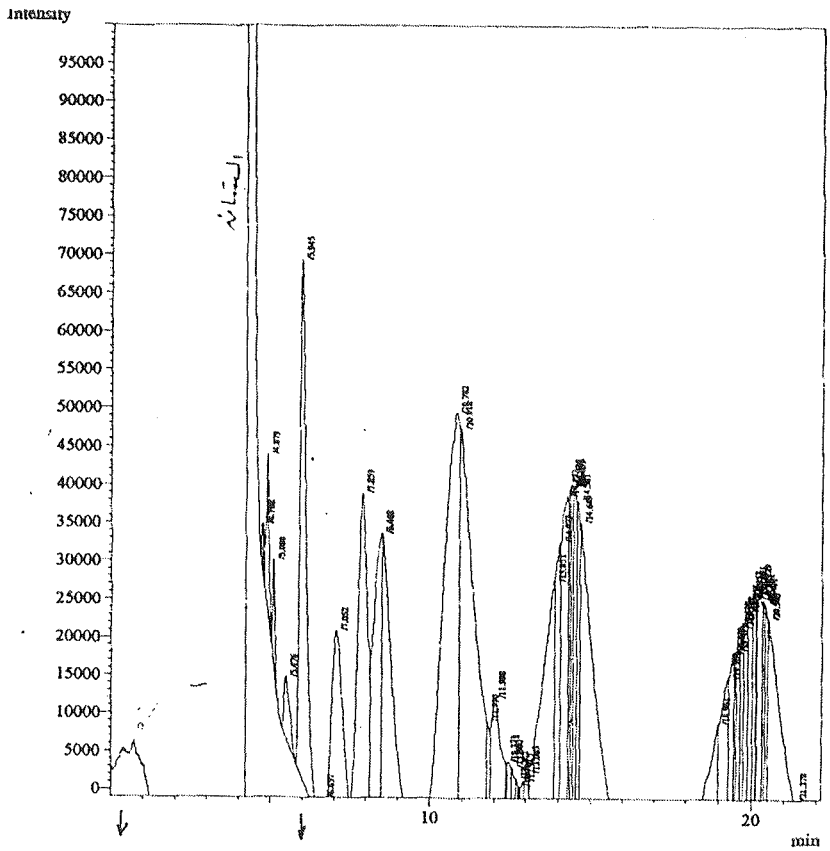
يحقن 1 مايكروليتر من كل عينة في جهاز GLC ويتم الحصول على فصل لهذه الأحماض بشكل ذروات Peaks حيث ترسم على مسجل خطي ، بعدها يتم مقارنة زمن احتباس الأحماض الدهنية مع زمن احتباس الأحماض الدهنية القياسية وبذلك يتم التعرف على ماموجود في كل عينة من أحماض دهنية .

النتائج والمناقشة

تم الحصول على نتائج زمن الاحتباس Retention time لكل من الأحماض الدهنيـة القياسية المذكورة في الفقرة 2 من المواد وطرائق العمل بعد تحليلها في جهـاز GLC وتـم حساب النسبة المؤية لكل حامض دهني في كل عينة على اساس مقارنة هذه النتائج مع نتائج زمن الاحتباس للأحماض الدهنية لكل عينة (لكل جرثومة) كما موضح في الشكل 1 و 2 و 3 و 4 وبذلك تم التعرف على الأحماض الدهنية الموجودة في كـل عينـة . والـشكل (1) يوضح نتائج فصل الاحماض الدهنية القياسية .



الشكل (1) نتائج فصل الاحماض الدهنية القياسية



الشكل (2) نتائج فصل الاحماض الدهنية لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa*

الشكل (2) يوضح المنحنيات التي تمثل الاحماض الدهنية المستخلصة من لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* حسبت النسب للاحماض الدهنية بجمع النسب المئوية للمساحات حسب المدة الزمنية لزمن الاحتباس لاي حامض دهني ومقارنتها مع زمن الاحتباس للحامض الدهني القياسي .

و يوضح الجدول (1) الأحماض الدهنية التي تمتلكها جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* والنسبة المئوية لكل حامض دهني فيها . حيث يتبين ان اعلى نسبة مئوية كانت للحامض الدهني Linoleic acid اذ بلغت 14.137 % تلتها نسبة الحامض الدهني Palmitic acid حيث بلغت 10.059 % وجاءت بعدها النسبة المئوية 8.042 % التي تعود للـ Myristic acid ثم كل من الأحماض الدهنية Stearic acid و Oleic acid و Capric acid بنسب مؤية 6.261 % و 4.513 % و 1.205 % على التوالي ، فيما احتلت نسبة الحامض الدهني Lauric acid المرتبة الأخيرة وبلغت 0.527 % .

الجدول (1) الاحماض الدهنية ونسبها المئوية في جرثومة *Pseudomonas aeruginosa*

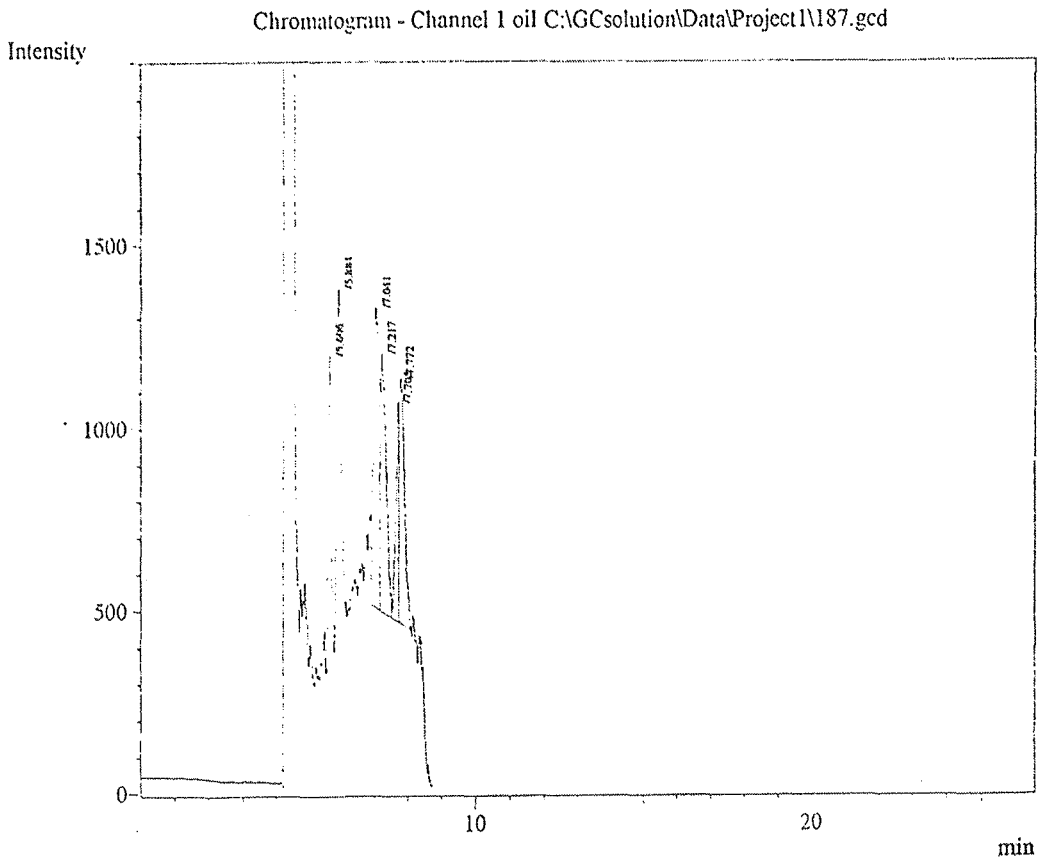
الاحماض الدهنية		%
Capric acid	($C_{10:0}$)	1.205
Lauric acid	($C_{12:0}$)	0.527
Myristic acid	($C_{14:0}$)	8.042
Palmitic acid	($C_{16:0}$)	10.059
Stearic acid	($C_{18:0}$)	6.261
Oleic acid	($C_{18:1}$)	4.513
Linoleic acid	($C_{18:2}$)	14.137

ان الاهمية المستفيضة لانواع هذه الجراثيم في اصابات الانسان تؤكد الحاجة الى انظمة دقيقة ومقنعة لتشخيصها (6) هذه الجراثيم هي عوامل انتهازية للاصابات التي تحدث عادة بعد المعالجة بالمضادات الحيوية والادوية المثبطة للمناعة إذ تتواجد مرتبطة مع امراض السكري والسرطانات فضلا عن انها ملوثات لمعدات المستشفيات ، كما عدت مسببات رئيسة للاصابات المكتسبة للمستشفيات وعزلت من العديد من العينات السريرية وباعداد متزايدة . وبسبب اختلاف الحساسية للمضادات الحيوية بأختلاف الأنواع والتي تؤثر على إحداث المرض لذا فمن الضروري تشخيص مثل هذه الجراثيم بشكل دقيق . وقد اقترح تصنيف الاحياء المجهرية اعتماداً على تركيبها الكيميائي في عام 1963 (14). وان تسهيل استخدام هذا المنهج قد طور بشكل معنوي من خلال تقنيات التحليل الحساسة مثل GLC ، واوضحت نتائج الدراسات السابقة بان الاحماض الدهنية المشتقة من مستخلصات الخلايا الكاملة مفيدة في التفريق بين انواع *Pseudomonas* المعزولة من عينات سريرية (14) .

يبين الجدول (2) انواع الاحماض الدهنية المستخلصة من جرثومة *Proteus mirabilis* ونسبها المئوية حيث يبدو ان اعلى نسبة فصل تعود للحامض الدهني Myristic acid بلغت 17.349% كما تم فصل الحامض الدهني Lauric بنسبة مئوية قدرها 13.130% وهذا موضح في الشكل (3) .

الجدول 2 الاحماض الدهنية ونسبها في جرثومة *Proteus mirabils*

%	الاحماض الدهنية	
13.130	($C_{12:0}$)	Lauric acid
17.349	($C_{14:0}$)	Myristic acid

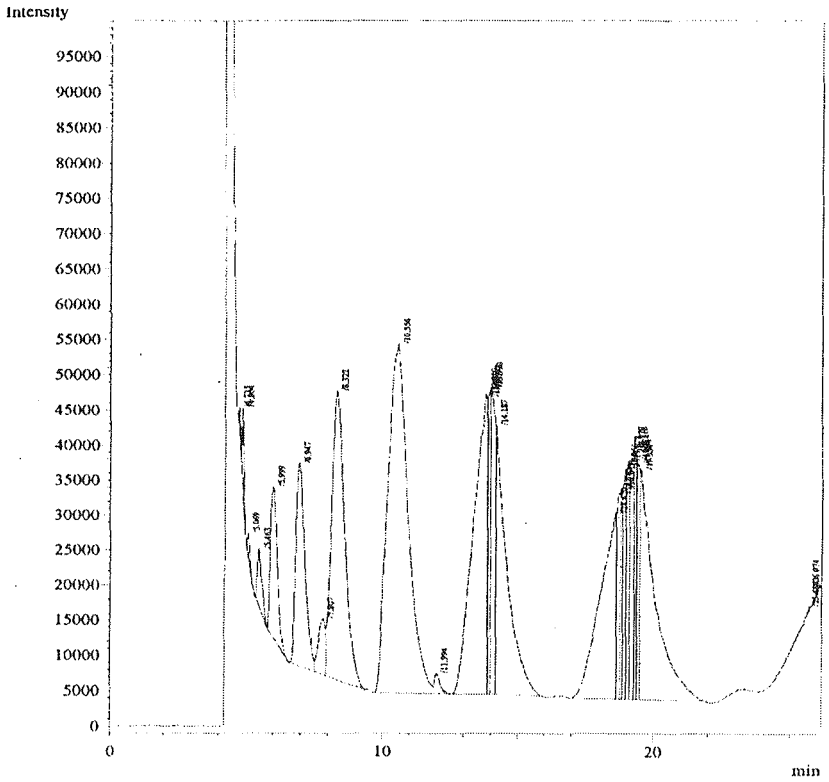


الشكل (3) نتائج فصل الاحماض الدهنية لجرثومة *Proteus mirabilis*

هذه النتائج جاءت مقاربة لدراسة تشخيصية لمركبات CFA لافراد العائلة المعوية بهدف تفريق الاجناس عن بعضها وبصورة اكثر تخصصية لتفريق الانواع حيث تم فصل جنس *Morganella* عن جنس *Proteus* اعتمادا على وجود كميات معنوية من الحامض الدهني Lauric acid في جراثيم *Proteus* .

وبنفس طريقة حساب الاحماض الدهنية لجرثومتي *Pseudomonas aeruginosa* تم حساب النسب المئوية للاحماض الدهنية التي تحويها جرثومة *Plesiomonas shigelloides* اذ يشير الجدول (3) الى الاحماض الدهنية التي تمتلكها والنسبة المئوية لكل منها حيث يوضح ان Palmitic acid قد احتل المرتبة الاولى من بين الاحماض

الدهنية اذ بلغت 20.621 %، فيما كانت نسبتا كل من الحامضين الـدهنيين Oleic acid و Stearic acid متقاربتين حيث بلغتا 15.816 % و 15.373 % على التوالي .وانخفـضت نسبة الحامض الدهني Myristic acid الى 10.897 فيما اظهر كل مـن Lauric acid و Capric acid و Docosahexaenoic acid و Eicosapentanoic نسباً ضئيلة تمثلـت بـ 0.926% و 0.503 % و 0.057 % و 0.025 % على التوالي وهـذا موضـح فـي الشكل (4) .



الشكل (4) نتائج فصل الاحماض الدهنية لجرثومة *Plesiomonas shigelloides*

اتفقت نتائج البحث مع نتائج دراسة اخـرى (16) مـن حيـث الحـامض الـدهني Palmitic acid ($C_{16:0}$) إذ أعطت دراسته أيضا أعلى نسبة لهذا الحامض والتي بلغت 33 % وهو المعدل لـ 29 سلالة إلا أنها أعلى من النـسبة التـي حـصلنا عليهـا.و بالنـسبة لـ Stearic acid ($C_{18:0}$) و Oleic acid ($C_{18:1}$) و Myristic acid ($C_{14:0}$) فقد جاءت نسبتها في دراسته اقل مقارنةً بالنسب التي حصلنا عليها اذ بلغت في دراسـته 6 % و 9 % و5 %على التوالي .وفيما يخص الحامض الدهني Lauric acid ($C_{12:0}$) فقد اختلفت النسبة بين الدراستين اختلافا كبيرا ففد وصلت في دراسته الى 6 % . ولم تظهر في دراسـتنا ايـة نسبة للـ Palmitoleic acid ($C_{16:1}$) بينما احتلت في دراسته المرتبة الثانية وكان معـدل النسب المئوية للسلالات المدروسة 28 % وقد يعود السبب في ذلك الى الاختلاف في السلالة

وفي الوسط المستخدم في تنمية الجرثومة وقد يؤثر المذيب المستخدم وطول العمود وسـرعة الجريان والحرارة فضلا عن اللزوجة والتهيج والكاشف في إختلاف نسب الاحماض الدهنية التي يتم الكشف عنها باستخدام تقنية GLC.

الجدول 3 الاحماض الدهنية ونسبها في جرثومة *Plesiomonas shigelloides*

الاحماض الدهنية		%
Capric acid	($C_{10:0}$)	0.503
Lauric acid	($C_{12:0}$)	0.926
Myristic acid	($C_{14:0}$)	10.897
Palmitic acid	($C_{16:0}$)	20.621
Stearic acid	($C_{18:0}$)	15.373
Oleic acid	($C_{18:1}$)	15.816
Eicosapentanoic acid	($C_{20:5}$)	0.025
Docosahexaenoic acid	($C_{22:6}$)	0.057

المصادر

1-Tornabene T.G. Metho. Microbiol. 18:209-234 (1985).
2-Gunstone F.D. "In Lipid Analysis :APractical Approach". Oxford, IRL Press . (1992).
3-Nester E.W., Anderson D.G., Roberts G.E., Pearsall N.N., Nester M.T., "Microbiology. A Human Perspective". 3rd Ed. McGraw-Hill Companies, New York. (2001).
4-Komagata K. and Suzuki K. Metho. Microbiol. 19:161-207 (1987).
5-Stanier R.Y., Lngraham J.L., Wheelis M. L., and Painter P.R. "General Microbiology". 5th Ed. Acmillan Education LTD . Hong Kong (1988)
6-Welch D.F. J. Clinc. Microbiol. Rev. 4: 422-438 (1991).
7-Evershed R.P. "Gas Chromatography of Lipids In Lipid Analysis: A Practical Approach". Oxford, IRL Press (1992).
8-www.cyberlipid.org/fattyt/fatt0003.htm
9-Koneman E.W., Allen S.D., Janada W.M., Sehrechken P.C. and Winn W.C. "Color Atlas and berger, Textbook of Diagnostic Microbiology". 5th Ed. J.B. Lippincott Company, New York (1997).
10-Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.H., Staley J.T. and Wiiliams S.T. "Bergy's Manual of Determinative Bacteriology". 9th Ed. Williams and Wilkins Comp. U.S.A. (1994).
11-Fourche J. J. Chrom., 487: 142-146 (1989).
12-Al-Kaisy M.T., Hadwan H.A., Humod M. and Hussen A.K. Iraqi. J. Microbiol., 3: 170-174 (1991).
13-Morrison W.R. and Smith L.M. J. lipid R. 5: 151-159 (1964).
14-Moss C.W. and Dees S.B. Clinic. Microbiol. 4: 492-501 (1976).
15-Abel K., de Schmertzing H. and Peterson J. I. J. Bacteriol. 85:1039-1044 (1993).
16- Chou S., ALdova E. and Kasatiya S., J, Clin. Microbiol., 29: 072-1074(1991).