دراسة أنتاج صبغة البرودجيوسين من بكتريا *Serratia marcescens* المعزولة من مصادر سريرية وبيئية وتأثيرها في بعض المكروبات المرضية

د. صالح عبد الرضا البكري* د. مكرم ضياء شكارة* فرزدق ناظم حربي*

تاريخ التسلم:4\1\2010
تاريخ القبول:6\5\2010

الخلاصة

نقيت صبغة البرودجيوسين باستعمال المذيبات العضوية الكلوروفورم والميثانول بطريقة كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة. درست الفعالية التثبيطية لصبغة البرودجيوسين على بكتريا *Staphylococcus epidermidis*،*Staphylococcus aureus* في تجارب *in vitro* , واظهرت درجه عالية من التثبيط، وكذلك ظهورعملية التثبيط بشكل واضح لصبغة البرودجيوسين في تجارب *in vivo* على الموديل الحيواني.

Study of the Prodigiosin productivity from Serratia marcescens isolated from environmental and clinical sources and the effect on some microbial pathogens

Abstract

The Prodigiosin pigment was purified by using the organic solvents chloroform and methanol with thin layer chromategraphy method. The biological activity for prodigiosin pigment was studied on the*Staphylococcus epidermidis* ,*Staphylococcus aureus* bacteria in *in vitro* tests , it has shown highly degree of inhibition, also the *in vivo* tests showed that clearly inhibition in animal model.

المقدمة

تعد صبغة البرودجيوسين من النواتج الايضية المهمة لبكتريا *Serratia marcescens*، فهي صبغة حمراء غير قابلة للانتشار في الوسط ولا تذوب في الماء وأنما تذوب في المذيبات العضوية مثل الكلوروفورم والميثانول والاسيتون وخلات الأثيل [1] تعرف الصبغه بصيغة 2-methyl-3-amyl-6-methoxyprodigiosin

وتركيبها الكيميائي عبارة عن مركب خطي ثلاثي حلقات البايرول تتكون من أتحاد مركبين معاً هما البايرول الاحادي 2- methyl-3- amylpyrrole (MAP) وهومركب طيار، مع البايرول الثنائي 4-methyl-2,2-bipyrrole-5-carboxyaldehyde (MBC)

وهو مركب مستقر [2], وينتج عن هذا الأتحاد صبغة البرودجيوسين، صيغتها الكيميائية $C_{20}H_{25}N_3O$، وهي قاعدة ضعيفة وذلك لأحتوائها على ذرات النايتروجين في تركيبها، قيمة ثابت تفكك الحامض لها Water/acetonitrile تبلغ 7.2. تمتاز هذه الصبغة بفعاليتها البايلوجية ضد البكتريا G^{+ve} و G^{-ve} لملون كرام [3،4].

اهداف البحث

1. استخلاص وتنقية صبغة البرودجيوسين من خلال الأيض الثانوي لبكتريا *Serratia marcescens* وباستعمال طريقة كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC.
2. أختبار التأثير التثبيطي للصبغة في تجارب خارج الجسم الحي *in vitro*

* قسم العلوم التطبيقية , الجامعة التكنولوجية / بغداد

https://doi.org/10.30684/etj.28.16.19
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

وتجارب داخل الجسم الحي *in vivo* تجاه بكتريا الأختبار المرضية.

طرائق العمل

استخلاص وتنقية صبغة البرودجيوسين.

أستعملت الطريقة [5] في استخلاص وتنقية صبغة البرودجيوسين من بكتريا *Serratia marcescens* وكما ياتي :-

- نميت العزلة البكتيرية من النوع *Serratia marcescens*.
- أضُيف الميثانول الى المزروع نسبة (1:1) حجم:حجم.
- استحصل الرائق وبخر الميثانول وحفظ النموذج للاذابة المتعاقبة.
- ذوب المتبقي بالكلوروفورم وكُررت هذه العملية وذلك للتخلص من ألاجزاء غير الذائبة.
- استحصل الرائق وبخر الكلوروفورم وحفظ النموذج.
- استعمل نظام المذيب خلات الاثيل/ وكلورفورم/ وأسيتون كطور متحرك.
- نشطت صفيحة السيليكا ووضعت الانموذجات عليها.
- ركزت الانموذجات على الصفيحه.
- وضعت الصفيحة في خزان نظام الاذابة.
- حسبت قيمة السريان النسبي.
- جمعت الصبغة ونبذت مركزيا بعد الاذابة.
- قيست امتصاصية الصبغة ضمن الطيف المرئي.
- ووضعت في انابيب محكمة السد ومغلفة.
- حفظت في البراد بدرجة 4 °م.

أختبار الفعالية التثبيطية لصبغة البرودجيوسين ضد ألانواع البكتيرية المرضية:

اولاً:- الإختبارات خارج الجسم الحي *In vitro* وحسب [6]

- حضرمُستخلص الصبغة الذي إجري تنقيته كما في الفقرة السابقة وبتركيز95 ملغم/ مل، وذلك من خلال تجفيف مستخلص صبغة البرودجيوسين المنقى بوساطة المجفف الخزفي بدرجة حرارة الغرفة وبظروف معقمة لمدة 24 ساعة، قشطت الصبغة المجففة الموجوده بالطبق الزجاجي بالكامل ووزنت بالميزان الالكتروني، ثم حُضرمنها تراكيز للتخافيف 95،75،50،25 ملغم \مل وذلك بأذابتها بالميثانول وبأستعمال قانون التخفيف العام.
- تم تنشيط البكتريا المرضية *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus aureus* والمراد أختبار فعالية الصبغة ضدهما بتنميتهما في وسط مرق نقيع القلب والدماغ بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة، وضبطت عكورة المزروع البكتيري للعزلات مع عكورة المحلول القياسي(Macfarland standard) والمحضر حسب [7]، للحصول على عدد خلايا (1.5×10^8) خلية/ مل.
- نشر100 مايكرولتر من كل مزروع بكتيري، على وسط أكار نقيع القلب والدماغ وباستعمال ناشر زجاجي معقم على كامل مساحة الطبق، وتركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة مدة 5 دقائق لتجف.
- أستعمل ثاقب الفلين المعقم لعمل حفر وبقطر (5) ملم وبواقع خمس حفر في كل طبق من الاطباق المحضرة.
- أضيف 100 مايكرولترمن كل تركيز من التراكيز95،75،50،25 ملغم \مل لمستخلص الصبغة النقيه مع أضافة الميثانول الى الحفره الوسطية بوصفه معاملة سيطرة Control، وبوساطة ماصة دقيقة وتحت ظروف معقمة، ثم حضُنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م مدة 24 ساعة.
- حسبت الفعالية التثبيطية لمستخلص الصبغة النقية، بقياس قطرمنطقة التثبيط الظاهرة حول الحفر.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ثانياً: -أختبارات داخل الجسم الحي *In vivo* لصبغة البرودجيوسين أذ أختيرت الفئران المختبرية بالمواصفات (Male,) *Mus muscules* Balb\c(swiss) لاحداث الاصابات الجلدية ومعالجتها بالصبغة على وفق [8] وكما في خطوات الطريقة ادناه: -

- أزيل الشعر في منطقة الظهر وبقطرين متعامدين (5 سم × 3 سم) تقريباً للفئران المختبرية بعدد 8 فئران.
- عُقمت المنطقة بالكحول ألاثيلي وبشكل أصولي.
- خُدشت المنطقة (Truma) وبشكل متماثل لجميع حيوانات ألاختبار وبلطف.
- لُوثت الخدوش الجلدية لفئران الاختبارعدد 6 بالنوعين البكتيريين المرضيين *Staphylococcus epidermidis* وبعدد 3 فئران، *Staphylococcus aureus* بعدد 3 فئران وبمقدار 100 مايكرولترمن1 ماكفرلاند للعالق المايكروبي وبوساطة ألأبر النبيذة 1مل .
- تحققت الأصابة بعد 4-5 أيام بالنسبة للمكورات العنقودية الذهبية والجلدية.
- عولجت مناطق الألتهاب برش الصبغة النقية بتركيز95 ملغم /مل واستعمالها كمضاد حياتي. مرتين باليوم مع توقف المعالجة عند ظهور الشعر وشفاء منطقة الاصابة.

النتائج والمناقشة

نتائج استخلاص وتنقية صبغة البرودجيوسين.

بينت نتائج الأستخلاص والتنقية لهذه الصبغة بأستعمال تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة (T.L.C) التي تمخضت عن قيمة الـــRF بمقدار 0.61 وكما في الشكل (1). هذه النتيجة جاءت متوافقة مع[5،9] إذ بينوا أن قيمة الـــ RF هي بمقدار 0.61.

نتائج الفعالية التثبيطية لصبغة البرودجيوسين ضد الانواع الميكروبية المختلفة:

اولاً: - إختبارات خارج الجسم الحي *In Vitro*

يبين الشكلين (3,2) تاثير تثبيطي واضح لصبغة البرودجيوسين المنقاة وبتراكيزها المحضرة (0،25،50،75،95 ملغم/ مل) تجاه بكتريا *Staphylococcus epidermidis* و *Staphylococcus ureus* من خلال مساحة التثبيط، وان هنالك تناسب طردي بين اقطار التثبيط وتراكيز الصبغة من الاعلى الى الادنى. أذ كانت قيم اقطار التثبيط بالملم للنوعين البكتيرين وعلى التوالي ومن التركيز الادنى الى الاعلى هي: (0،14،14،15،16) و(0،13،13،13،15).

نتائـــج التأثيـــر العلأجـــي لصبغـــة البرودجيوسيسن في تجارب الموديل الحيواني animal model

ثانياً: - أختبارات داخل الجسم الحي *Vivo In*

- **تجربة الأصابة بالمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus***

تبين الاشكال (4،5،6) إن الأصابة ببكتريا المكورات الذهبية العنقودية *S. aureus* قد اظهرت نمط التهابي مصلي دموي (serous & low hemorrahagic) من حيث الافرازات (Exudate) في أول ثلاثة أيام من إحداث الأصابة، ثم أصبحت هذه الافرازات مصلية رائقة (Edema fluid) في اليوم الرابع من الأصابة، وعدت هذه الأصابة على وفق هذه الملاحظات أنها من الالتهابات الجلدية شبه الحاده (Semi acut) على أساس الفترة (Duration) علماً أن الأصابة قد أحتلت منتصف المنطقة الجلدية الظهرية المنزوعة الشعر (5سم ×3سم) ومتلونة باللون الوردي المحمر وعولجت هذه الاصابة الجلدية بصبغة البرودجيوسين المنقاة بالتركيز 95ملغم /مل وكان التاثير العلاجي لهذه الصبغة واضحا

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

من خلال تحدد منطقة الالتهاب في اليوم الثاني من العلاج واستمرت المعالجة الى اليوم الخامس حيث كان الجلد متماثلا الى الشفاء واختفاء الاصابة.

- **تجربة الأصابة بالمكورات العنقودية الجلدية *S. epidermidis***

أظهرت هذه التجربة الاشكال (7،8،9) أن الأصابة بهذا النوع البكتيري أمتدت الى منطقة التهابية أكبرقياساً بالأصابة بالمكورات الذهبية العنقودية وأكثر إحمراراً مع نزرة بالمخرجات المصلية من حيث المفرزات (Exudate)، وعدت هذه الأصابة من النوع تحت الحاد (Sub acute) بعد مرور خمسة أيام من إحداث الأصابة وعولجت هذه الاصابة الجلدية بصبغة البرودجيوسين المنقاة بالتركيز 95ملغم /مل حيث كان التاثير العلاجي واضحا لهذه الصبغه من خلال انحسار منطقة الاصابة البكتيرية في اليوم الثاني من العلاج واستمرت المعالجة الى اليوم السادس حيث تماثلت المنطقة المصابة للشفاء.

المصادر

[1]Wasserman, H. H. and Lombardo, L. J. (1989). The Chemistry of Vicinal Tricarbonlys. A Total Synthesis of Prodigiosin. Tetrahedron lett, 30 (13): 1725 – 1728.

[2]Melvin, M.S.; Calcutt, M.; Noftle, R. and Manderville, R. (2002). Influence of the a-Ring on the Redox and Nuclease Properties of the Prodigiosins: Importance of the Bipyrrole Moiety in Oxidative DNA Cleavage. Chem. Res. Toxicol., 15(5):742-748.

[3]VanHoudt, R.; Givskov, M. and Michiels, C. (2007). Quorom Sensing in *Serratia*. FEMS. Microbiol. Rev., 31:407-424.

[4]La, J.Q-H.; Michaelides, A. and Manderville, R. (2007). Tautomeric Equilibria in Phenolic A- Ring Derivatives of Prodigiosin Natural Products. J. Phys. Chem., 111(40): 11803-11811.

[5]Nakashima, T.; Kato, Y.; Yamaguchi, K. and Oda, T. (2005a). Evaluation of the Anti- Trichophyton Activity of a Prodigiosin Analogue Produced by γ-Proteobacterium, Using Stratum Concerum Epidermis of the Yucatan Micropig. J. infect Chemother., 11: 123 – 128.

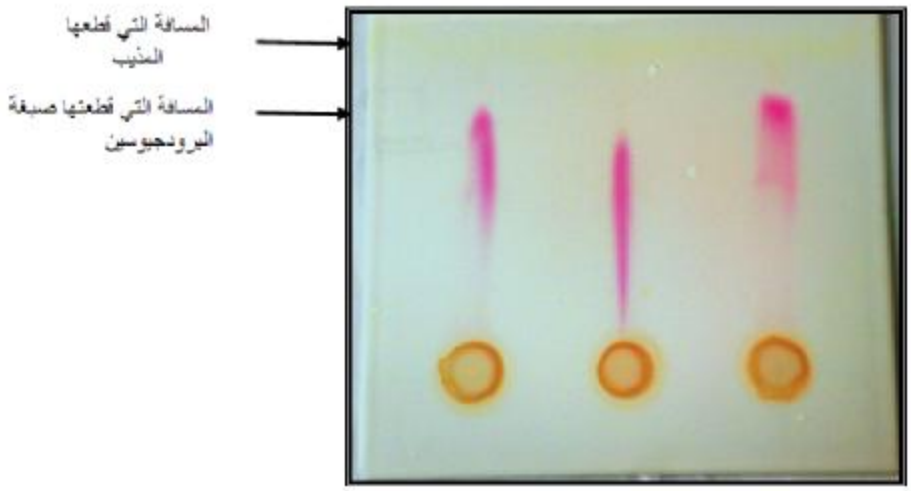
[6]Atlas, R.M.; Brown, A. and Parks, C. (1995). Laboratory Manual Experimental of Microbiology. By Mosby – Year book, Inc. USA.

[7]Collee, J.G.; Fraser, A.; Marimon, B. and Simmons, A. (1996). Macki & MacCartney Practical Medical Microbiology (eds.). Churchill Linvingston, 14th ed.

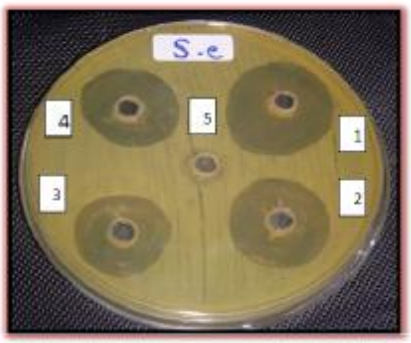
[8]Kugelberg, E.; Norstrom, T.; Petersen, T.K.; Duvold, T.; Andersson, D.I. and Hughes, D. (2005). Establishment of Superfitcial Skin Infiction Model In Mice by Using *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus Pyogenes* Antimicrob. Agents chemother., 42(8): 3435-3441.

[9]Nakashima, T.; Kurachi, M.; Kato, Y.; Yamaguchi, K. and Oda, T. (2005b). Characterization of Bacterium Isolated from the Sediment at Coastal Area of Omura Bay in Japan and Several Biological activities of Pigment Produced by this Isolated. Microbiol. Immunol., 49 (5): 407 – 415.

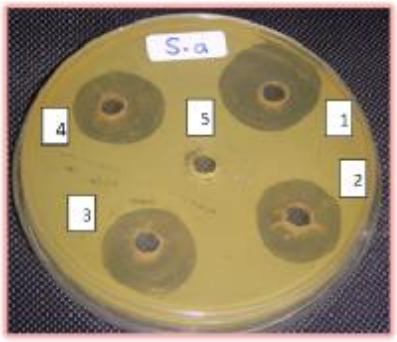
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



الشكل (1) فصل صبغة البرودجيوسين من بكتريا *Serratia marcescens* بأستعمال كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC



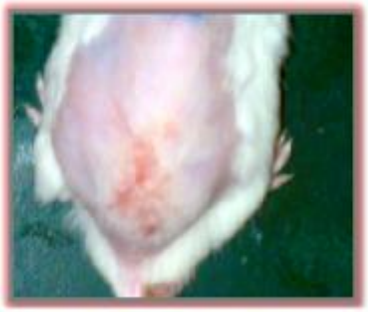
شكل (2) الفعالية التثبيطية لصبغة البرودجيوسين ضد بكتريا *S. epidermidis*
(تراكيز صبغة البرودجيوسين 1=95 ، 2=75 ، 3=50، 4 =25، 5 =0 ملغم/مل)



شكل (3) الفعالية التثبيطية لصبغة البرودجيوسين ضد بكتريا *S.aureus*
(تراكيزصبغة البرودجيوسين 1=95 ، 2=75 ، 3=50 ، 4 =25، 5 =0 ملغم/مل)

الشكل (4) منطقة الألتهاب جراء الأصابة ببكتريا اليوم الرابع من حدوث *Staphylococcus aureus* الأصابة في فئران الأختبار

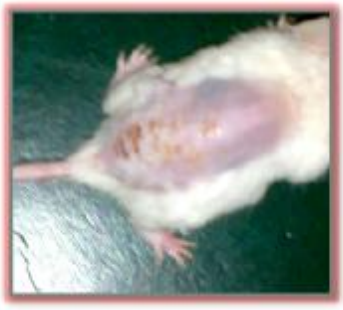
الشكل(5) تحدد منطقة الألتهاب جراء المعالجة بصبغة البرودجيوسين بعد يومين من العلاج



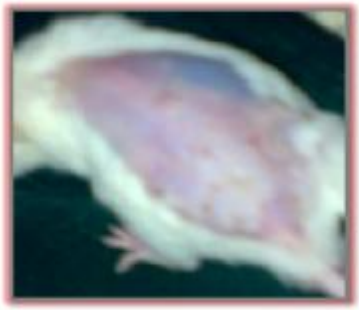
الشكل (6) يظهرالجلد متماثلا الى الشفاء من الأصابة البكترية في اليوم الخامس من العلاج بالصبغة

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الشكل (7) منطقة الألتهاب جراء الأصابة ببكتريا *Staphylococcus epidermidis* في اليوم الخامس من حدوث الأصابة



الشكل (8) أنحسارمنطقة الأصابة البكتيرية بعد مروريومين من المعالجة بصبغة البرودجيوسين



الشكل (9) ثماثل منطقة الأصابة الجلدية للشفاء بعد اليوم السادس من العلاج بالصبغة

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com