

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr Józef Parnas

Stanisław POPŁAWSKI

**O współzależności między syntezą ryboflawiny a antybiotykoopornością
u gronkowców**

**О зависимости между синтезом рибофлавина и резистентностью
стафилококков к антибиотикам**

**On the Mutual Dependence of the Riboflavin Synthesis
and the Antibiotic Resistance of *Staphylococci***

Zagadnienie nabywania oporności szczepów *Staphylococcus aureus* na antybiotyki oraz wpływ tych ostatnich na mutacje i dziedziczenie cechy biosyntezy ryboflawiny dotychczas nie było badane. Prace Watanabe (9) wyrażają pogląd, że mutacje bakterii wywołane antybiotykami mogą być jedną z przyczyn powstawania form różniących się od hodowli wyjściowej. Badania Mosischita (6) określiły zdolność gronkowców do biosyntezy ryboflawiny. Biernecki (1), Kryński (5) i inni wykazali, że u nas, podobnie jak w innych krajach, z materiału chorobowego wyosobnia się znaczny odsetek szczepów antybiotykoopornych, co wskazuje na dużą zmienność tego zarazka. Zmienność bakterii w kierunku utraty zdolności do biosyntezy witamin może być przyczyną zwiększenia ich patogenności prowadzącej przez awitaminozę do wtórnej infekcji. Zagadnienie biosyntezy ryboflawiny przez gronkowce złociste odporne na antybiotyki było celem naszych badań.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto gronkowców wyosobnionych z materiału chorobowego u ludzi (wymazy z nosa, ucha i gardła, posiewy z moczu i kału). Przebadano morfologię kolonii, kształt bakterii i zdolność do wytwarzania barwnika po 24-godzinnej ekspozycji w świetle dziennym. Wykonano próbę na ureazę, fosfatazę, koagulazę i hemolizynę (tab. 1), oraz określono wrażliwość szczepów na antybiotyki według metody Gawędy - Dzierżyńskiej (3). Dla określenia zdolności szczepów do biosyntezy ryboflawiny stosowano technikę mikrobiologiczną, podaną przez Gyorgy. (4). Jako szczepu wskaźnikowego używano *Lactobacillus casei*

ATCC 7469. Pożywkę bez ryboflawiny przygotowano według metodyki podanej przez Snella i Stronga (7). Ekstrakt drożdży nie zawierający ryboflawiny przygotowano według techniki Firsa (2). Ekstrakcję ryboflawiny z materiału badanego przeprowadzono według techniki Stronga i Carpentera (8). W celu ilościowego określenia biosyntezy ryboflawiny przez gronkowce wysiewano je na bulion zwykły i inkubowano przez 48 godzin. Po upływie tego czasu określano ilość bakterii według skali Mc Farlanda. Równocześnie jako kontrolę określano ilość bakterii odpowiadającą danemu zmętnieniu skali. W tym celu przygotowano kolejne rozcieńczenia gronkowca i wysiewano na płytkę agaru z krwią. Po 48-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C liczono ilość kolonii. Hodowlę bulionową gronkowców wirowano w ciągu 0,5 godz. przy 3000 obr./min. Odwirowany płyn używano do przygotowania ekstraktu ryboflawiny. Próbę kontrolną stanowił bulion nie wysiany.

Dla odróżnienia bakterii ryboflawinozależnych od pozostałych konieczne było wykazanie całkowitej utraty biosyntezy ryboflawiny, przy równoczesnym stwierdzeniu zapotrzebowania na tę witaminę przez badany szczep gronkowca. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu pożywki nie zawierającej ryboflawiny. Pożywka bez ryboflawiny, na którą wysiewano gronkowce składała się, podobnie jak dla szczepu wskaźnikowego, z peptonu poddanego działaniu NaOH, ekstraktu drożdży potraktowanego $Pb(CH_3COO)_2$, glikozy, soli nieorganicznych, i 2,5% agaru. Na tę pożywkę wysiano gronkowce, a w środku płytki kładziono krążek bibuły o średnicy 1 cm zawierający jedną kroplę roztworu standardowego sporządzonego z chemicznie czystej ryboflawiny o stężeniu 10 gamma/ml. Po 48-godzinnej inkubacji odczytywano wzrost szczepu. W ten sposób ustalono zależność szczepu od ryboflawiny.

BADANIA WŁASNE

Własności biochemiczne przebadanych 186 szczepów gronkowców złocistych zebrano w tab. 1. Szczepy ryboflawinozależne były odporne na penicylinę i streptomycynę. Z trzech napotykanych szczepów ryboflawinozależnych szczepy nr 1 i nr 2 były ponadto odporne na chloramycetynę, aureomycynę, terramycynę i erytromycynę. Wszystkie szczepy

Tab. 1. Charakterystyka biochemiczna szczepów *Staphylococcus aureus*
Biochemical characteristics of the *Staphylococcus aureus* strains

Charakterystyka szczepów	koagulazę wytwarza	hemolizyny wytwarza	ureazę wytwarza	fosfatazę wytwarza
Liczba szczepów	160	127	24	149
% badanych szczepów	86,02	68,27	12,90	80,10
% szczepów zależnych od ryboflawiny	1,87	0,77	4,44	2,01



Ryc. 1. Płytką Petriego zasiana gronkowcami. W środku krążek bibuły o średnicy 1 cm nasycony ryboflawiną. Strefa wzrostu gronkowców ryboflawinowych ogranicza się do przestrzeni leżącej w pobliżu krążka

Petri plate with *Staphylococcus*. In the central place there is a blotting paper disc of 1 cm saturated with riboflavin. The growth zone for the *Staphylococcus* depending on riboflavin is limited to the disc

ryboflawinozależne wytwarzały koagulazę i fosfatazę, szczep nr 1 wytwarzał ponadto hemolizyny, a szczep nr 2 ureazę. Szczepy ryboflawinozależne nie rosły na pożywce bez tej witaminy. Na płytkach, na których położono krążek bibuły nasyconej ryboflawiną strefa wzrostu gronkowca ograniczała się do przestrzeni około 30 mm wokół krążka. Załączona fotografia (ryc. 1) przedstawia płytkę, na której wysiano gronkowce ryboflawinozależne obok syntetyzujących tę witaminę.

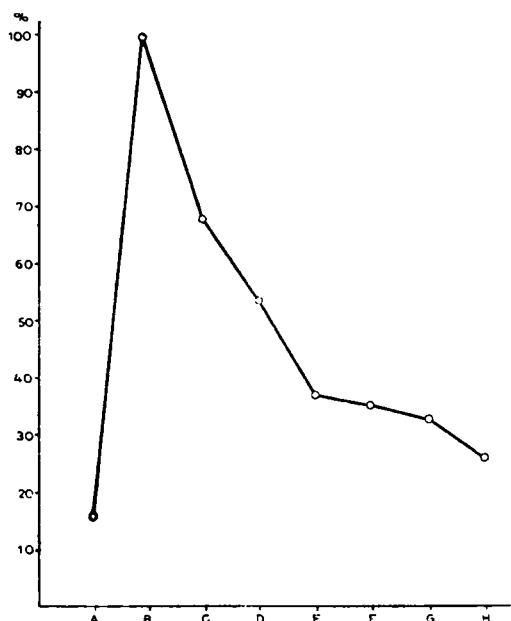
W tab. 2 zestawiono wyniki badań nad opornością szczepów na poszczególne antybiotyki. Wśród przebadanych 186 szczepów gronkowców złocistych odporne na penicylinę stanowią 68,8%, streptomycynę 54,8%. Mniej licznie występują gronkowce odporne na terramycynę (37,1%), aureomycynę (35,5%), chloromycetynę (32,8%) i erytromycynę (26,8%). Gronkowce wrażliwe na wszystkie antybiotyki stanowią 15% przebadanych szczepów. Odsetek szczepów opornych na antybiotyki przedstawiony jest na wykresie (ryc. 2). Największy odsetek gronkowców zależ-

Tab. 2. Zależność szczepów *Staphylococcus aureus* od ryboflawiny a oporność na antybiotykiRiboflavin dependence and resistance of the *Staphylococcus aureus* strains to antibiotics

Charakterystyka szczepu	liczba szczepów	% badanych szczepów	% szczepów zależnych od ryboflawiny
Wszystkie przebadane	186	100	1,61
Wrażliwe na wszystkie badane antybiotyki	28	15,05	0,00
Oporne na penicylinę	128	68,76	2,34
Oporne na streptomycynę	102	54,83	2,94
Oporne na terramycynę	69	37,09	2,89
Oporne na aureomycynę	66	35,43	3,03
Oporne na chloromycetynę	61	32,79	3,27
Oporne na erytromycynę	50	26,87	4,00

nych od ryboflawiny przypada na szczepy erytromycynooporne (4,0 %, ryc. 3), następnie na chloromycetynooporne (3,2 %), aureomycynooporne (3,0 %) streptomycynooporne (2,9 %), terramycynooporne (2,9 %) i penicylinooporne (2,3 %). Wśród szczepów wrażliwych na wszystkie antybiotyki nie napotkano na ryboflawinozależne.

Zestawione w tab. 3 liczby szczepów przedstawiają grupę 128 szczepów penicylinoopornych, z której wydzielono szczepy równocześnie oporne na inne antybiotyki. Ryc. 4 ilustruje odsetki szczepów opornych na penicylinę i inne antybiotyki, w stosunku do liczby wszystkich przebadanych szczepów. Ryc. 5 natomiast przedstawia kształtowanie się odsetka szczepów ryboflawinozależnych wśród szczepów opornych na penicylinę i równocześnie inne antybiotyki. Jak więc wynika z przedstawionych badań, wśród szczepów opornych na penicylinę i erytromycynę, penicylinę i chloromycetynę oraz penicylinę i streptomycynę występowało najwięcej szczepów zależnych od ryboflawiny. Wśród szczepów



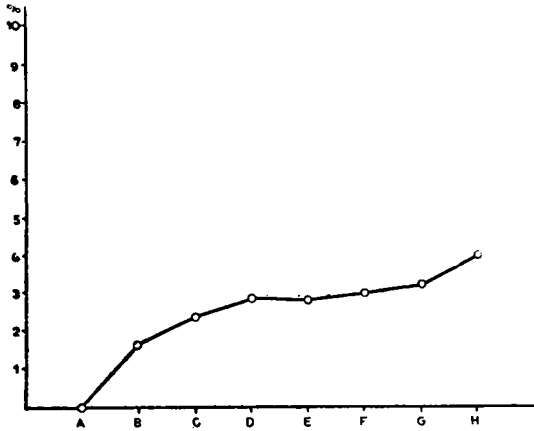
Ryc. 2. Oporność przebadanych szczepów na antybiotyki; % — odsetek szczepów opornych w stosunku do badanych; A — szczepy wrażliwe na antybiotyki; B — wszystkie szczepy badane; C — szczepy penicylinooporne; D — szczepy streptomycynooporne; E — szczepy terramycynooporne; F — szczepy aureomycynooporne;

G — szczepy chloromycetynooporne; H — szczepy erytromycynooporne

The resistance of the investigated strains to antibiotics; % — percentage of resistant strains in relation to the tested ones; A — sensible to antibiotics; B — investigated strains; C — Penicillin resistant strains; D — Streptomycin resistant strains; E — Terramycin resistant strains; F — Aureomycin resistant strains; G — Chloromycetin resistant strains; H — Erytromycin resistant strains

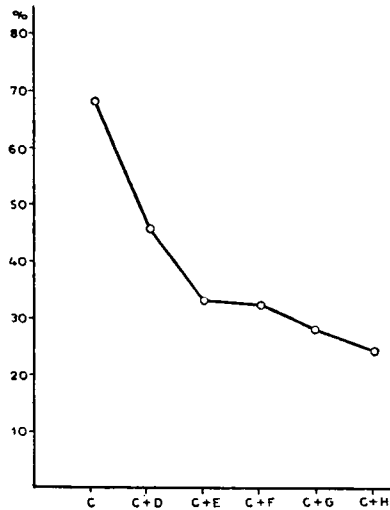
penicylino-terramycynoopornych i penicylino-aureomycynoopornych odsetek szczepów zależnych od ryboflawiny był najmniejszy.

Zebrane w tab. 4 wyniki odnoszą się do grupy 84 szczepów opornych na penicylinę i streptomycynę, z której wyróżniono jednocześnie szczepy odporne na trzeci antybiotyk. Ryc. 6 i 7 ilustrują odsetek szczepów opornych na antybiotyki i zależnych od ryboflawiny, zebranych w tab. 4. Przedstawione wykresy potwierdziły stały wzrost ilości szczepów zależnych od ryboflawiny przy nabywaniu oporności przez gronkowce na coraz większą ilość antybiotyków. Kolejność antybiotyków, na które szczepy odporne były w malejącym odsetku zależne od ryboflawiny przedstawiała się następująco: penicylina + streptomycyna + erytromycyna, penicylina + streptomycyna + chloromycetyna, penicylina + streptomycyna + aureomycyna i penicylina + streptomycyna + terramycyna.



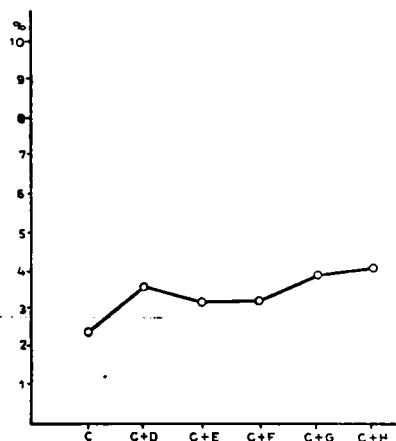
Ryc. 3. Ryboflawinozależność a oporność szczepów na antybiotyki; % — odsetek szczepów ryboflawinozależnych wśród opornych na antybiotyki; inne objaśnienia jak na ryc. 2

Riboflavin dependence and the resistance of the strains to antibiotics; percentage of strains depending on riboflavin among those resistant to antibiotics; Explanation as in Fig. 2



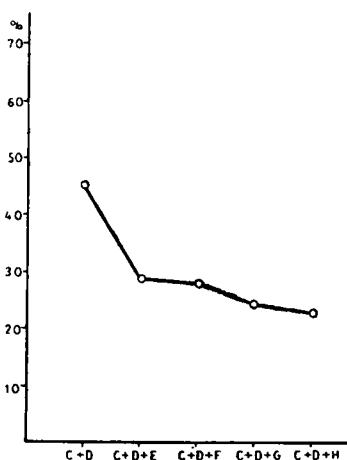
Ryc. 4. Oporność szczepów na penicylinę oraz inny antybiotyk; % — odsetek szczepów opornych w stosunku do badanych; C — szczepy penicylinooporne; D — szczepy streptomycynooporne; E — szczepy terramycynooporne; F — szczepy aureomycynooporne; G — szczepy chloromycetynooporne; H — szczepy erytromycynooporne

The resistance of the strains to Penicillin and other antibiotics; % — percentage of resistant strains related to the investigated ones; C — Penicillin resistant strains; D — Streptomycin resistant strains; E — Terramycin resistant strains; F — Aureomycin resistant strains; G — Chloromycetin resistant strains; H — Erythromycin resistant strains



Ryc. 5. Ryboflawinozależność a oporność szczepów na penicylinę oraz inny antybiotyk; % — odsetek szczepów ryboflawinozależnych wśród opornych na antybiotyki; objaśnienia jak na ryc. 4

The riboflavin dependence and the resistance of the strains to Penicillin and other antibiotics; % — percentage of strains depending on riboflavin among those resistant to antibiotics; Explanation as in Fig. 4

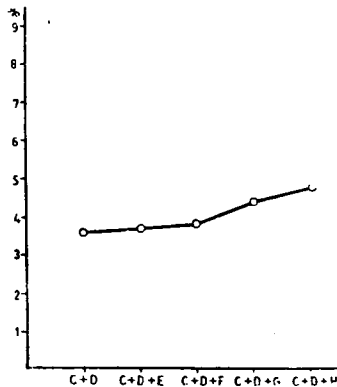


Ryc. 6. Oporność szczepów na penicylinę, streptomycynę oraz inny antybiotyk; % — odsetek szczepów opornych w stosunku do badanych; objaśnienia jak na ryc. 4

Tab. 5 zawiera zestawienie gronkowców jednocześnie opornych na cztery antybiotyki. Odpowiednie wykresy (ryc. 8 i 9) przedstawiają odsetek szczepów opornych i zależnych od ryboflawiny. Podobnie jak

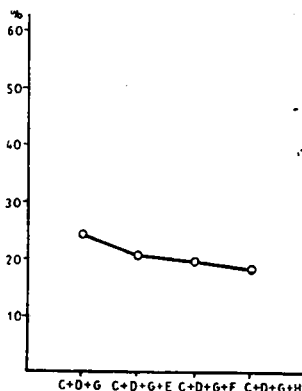
Tab. 3. Zależność szczepów *Staphylococcus aureus* od ryboflawiny a oporność na penicylinę i inne antybiotyki
 Riboflavin dependence and resistance of the *Staphylococcus aureus* strains to Penicillin and other antibiotics

Charakterystyka szczepu	liczba szczepów	% badanych szczepów	% szczepów zależnych od ryboflawiny
Oporne na penicylinę	128	68,76	2,34
Oporne na penicylinę i streptomycynę	84	45,16	3,57
Oporne na penicylinę i terramycynę	65	34,94	3,07
Oporne na penicylinę i aureomycynę	64	34,40	3,12
Oporne na penicylinę i chloromycetynę	54	29,08	3,96
Oporne na penicylinę i erytromycynę	50	26,87	4,00



Ryc. 7. Ryboflawinozależność a oporność szczepów na penicylinę, streptomycynę oraz inny antybiotyk; % — odsetek szczepów ryboflawinozależnych wśród opornych na antybiotyki; objaśnienia jak na ryc. 4

The riboflavin dependence and the resistance of strains to Penicillin, Streptomycin and other antibiotics; % — percentage of strains depending on riboflavin, among those resistant to antibiotics; Explanation as in Fig 4

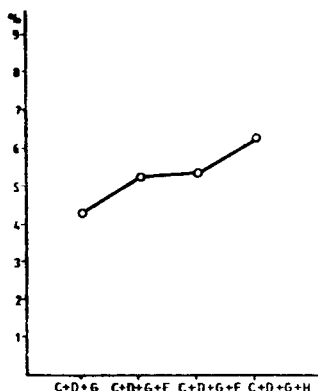


Ryc. 8. Oporność szczepów na penicylinę, streptomycynę, chloromycetynę oraz inny antybiotyk; % — odsetek szczepów opornych w stosunku do badanych; objaśnienia jak na ryc. 4

Resistance of strains to Penicillin, Streptomycin, Chloromycetin and other antibiotics; % — percentage of resistant strains in relation to the investigated ones; Explanation as in Fig. 4

Tab. 4. Zależność szczepów *Staphylococcus aureus* od ryboflawiny a oporność na penicylinę, streptomycynę i inny antybiotyk
Riboflavin dependence and resistance of the *Staphylococcus aureus* strains to Penicillin, Streptomycin and other antibiotics

Charakterystyka szczepu	liczba szczepów	% badanych szczepów	% szczepów zależnych od ryboflawiny
Oporne na penicylinę i streptomycynę	84	45,16	3,57
Oporne na streptomycynę i terramycynę i penicylinę	55	29,57	3,63
Oporne na penicylinę streptomycynę i aureomycynę	53	28,49	3,77
Oporne na penicylinę streptomycynę i chloromycetynę	46	24,73	4,34
Oporne na penicylinę streptomycynę i erytromycynę	42	22,58	4,52



Ryc. 9. Ryboflawinozależność a oporność szczepów na penicylinę, streptomycynę oraz inny antybiotyk; % — odsetek szczepów ryboflawinozależnych wśród opornych na antybiotyki; objaśnienia jak na ryc. 4

The riboflavin dependence and the resistance of strains to Penicillin, Streptomycin, Chloromycetin and other antibiotics; percentage of strains depending on riboflavin among those resistant to antibiotics: Explanation as in Fig. 4

Tab. 5. Zależność szczepów *Staphylococcus aureus* od ryboflawiny a oporność na penicylinę, streptomycynę, chloromycetynę i inny antybiotyk
Riboflavin dependence and resistance of the *Staphylococcus aureus* strains to Penicillin, Streptomycin, Chloromycetin and other antibiotics

Charakterystyka szczepu	liczba szczepów	% badanych szczepów	% szczepów zależnych od ryboflawiny
Oporne na penicylinę streptomycynę i chloromycetynę	46	24,73	4,34
Oporne na penicylinę streptomycynę chloromycetynę i terramycynę	38	20,43	5,26
Oporne na penicylinę streptomycynę chloromycetynę i aureomycynę	37	19,87	5,40
Oporne na penicylinę streptomycynę chloromycetynę i erytromycynę	32	17,20	6,25

poprzednio dało się zauważyć dalszy wzrost odsetka szczepów ryboflawinozależnych przy nabywaniu przez gronkowce oporności na coraz większą ilość antybiotyków.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Wyniki badań rzucają światło na zagadnienie oporności gronkowców na antybiotyki i zależności ich od ryboflawiny. Ryc. 2, 4, 6 i 8 przedstawiają zależność między antybiotykoopornością a zależnością gronkowców od ryboflawiny. Jak można sądzić na podstawie otrzymanych wyników, szczepy ryboflawinozależne stanowią mały odsetek szczepów wyosobnionych z materiału chorobowego. Przy ocenie podanych wyników należy pamiętać, że wśród szczepów wyosobnionych są różne odmiany, u których biosynteza ryboflawiny może być bardzo mała, ale które nie mogą zostać zaliczone do ryboflawinozależnych, gdyż rosną, choć słabo, na pożywce bez ryboflawiny. Przedstawiona ocena antybiotykooporności polegała na kwalifikowaniu szczepów do antybiotykoopornych takich, których strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z antybiotykiem wynosiła powyżej 30 mm, zgodnie z zaleceniami wytwórci do celów terapeutycznych. Tego rodzaju ocena nie jest jednoznaczna z biologicznym pojęciem antybiotykooporności. Stosowanie takich określeń podyktowane było możliwością porównania badanego materiału z aktualnie wykazywanym stanem antybiotykooporności u gronkowców.

Biorąc pod uwagę proporcję liczby szczepów antybiotykoopornych do ryboflawinozależnych należy wnioskować, że cecha ryboflawinozależności nie jest sprzężona z cechą oporności na jakikolwiek z przebadanych antybiotyków. Wzrastający odsetek szczepów ryboflawinozależnych wśród opornych na większą liczbę antybiotyków może być spowodowany działaniem mutagennym antybiotyków lub skłonności gronkowców do równoczesnej mutacji obydwu cech. Przedmiotem dyskusji może być odsetek szczepów ryboflawinozależnych w stosunku do przebadanych. Należy tutaj wziąć pod uwagę, że analizowane szczepy były pasażowane przez 1 do 4 lat na podłożach sztucznych, z reguły ubogich w ryboflawinę, istniała więc możliwość selekcji negatywnej szczepów ryboflawinozależnych. Kolejność następujących po sobie antybiotyków mających wpływ na powstawanie ryboflawinozależności u gronkowców przedstawia się następująco: erytromycyna, chloromycetyna, streptomycyna, aureomycyna, terramycyna i penicylina. Stosunkowo mały materiał badany nie pozwala na stosowanie szerszych uogólnień.

PIŚMIENNICTWO

1. Biernacki M., Jabłoński L.: Charakterystyka gronkowców wyosobnionych od personelu kliniki pediatrycznej. Przegląd Epidemiol. 4, 417, 1957.
2. First U.: 1944, cyt. Gyorgy P.: Vitamin Methods. I, 346. Acad. Press. New York, 1950.
3. Gawęda Dzierżyńska J., Wasiewicz J.: Oznaczanie wrażliwości bakterii na antybiotyki za pomocą krążków bibułowych. Med. Dośw. i Mikrob. 8, 79, 1956.
4. Gyorgy P.: Vitamin Methods. I, 340—360. Acad. Press. New York 1950.
5. Kryński S., Niemirowicz A., Belca E.: Ustalenie pułapu oporności gronkowca złocistego na antybiotyki. Pol. Tyg. Lek. 3, 87, 1962.
6. Mosischita M.: Biosynthesis of Riboflavin by Intestinal Bacteria, and Its Distribution inside and outside of Bacteria. I. Med. s. c. i. 19, 165—168, 1957.
7. Snell E. E., Strong F. M.: cyt. Gyorgy P.: Vitamin Methods. I, 343. Acad. Press. New York 1950.
8. Strong F. M., Carpenter L. E.: 1942, cyt. Gyorgy P.: Vitamin Methods. I, 341. Acad. Press. New York. 1950.
9. Watanabe T., Fukasawa T., Uschiba D.: Probable Absence of Direct Induction of Bacterial Resistance to Streptomycin. Journ. Bact. 73, 770, 1957.

РЕЗЮМЕ

Автор исследовал зависимость роста штаммов *Staphylococcus* от уровня рибофлавина в питательной среде при помощи кружков из фильтрационной бумаги. Кружки были насыщены рибофлавином. Исследовалось 186 штаммов *Staphylococcus aureus*. Согласно мнению автора, штаммы, не синтезирующие рибофлавина, являются резистентными к антибиотикам. Между штаммами, зависимыми от рибофлавина, больший процент антибиотика составляют по очереди штаммы, резистентные к эритромицину, хлоромидетину, стрептомицину, аурамицину, тетраамицину и пенициллину.

Рис. 1. Чашка Петри с растущими стафилококками. В центре кружок бумаги (диаметром 1 см), насыщенный рибофлавином. Зона роста стафилококков, усваивающих рибофлавин из субстрата, ограничивается пространством, расположенным поблизости кружочка.

Рис. 2. Резистентность исследованных штаммов к антибиотикам. А — штаммы, чувствительные к антибиотикам, В — все исследованные штаммы, С — штаммы, резистентные к пенициллину, Д — штаммы, резистентные к стрептомицину, Е — штаммы, резистентные к тетраамицину, F — штаммы, резистентные к аурамицину, G — штаммы, резистентные к хлоромидетину, H — штаммы, резистентные к эритромицину.

Рис. 3. Зависимость исследованных штаммов от рибофлавина и резистентность к антибиотикам. Все обозначения те же, что и на рис. 2.

Рис. 4. Резистентность штаммов к действию пенициллина совместно с другим антибиотиком. Процентное отношение количества резистентных штаммов ко всем исследованным. С — штаммы, резистентные к пенициллину, D — штаммы, резистентные к стрептомицину, E — штаммы, резистентные к тетрациклину, F — штаммы, резистентные к ауромину, G — штаммы, резистентные к хлорометицину, H — штаммы, резистентные к эритромицину.

Рис. 5. Зависимость исследованных штаммов от рибофлавина и резистентность штаммов к пенициллину совместно с другим антибиотиком. Процент штаммов, зависящих от рибофлавина по отношению к общему количеству резистентных к антибиотикам. Все обозначения те же, что и на рис. 4.

Рис. 6. Резистентность штаммов к пенициллину, стрептомицину, действующих совместно с другим антибиотиком. Процент резистентных по отношению к исследованным. Все обозначения те же, что и на рис. 4.

Рис. 7. Зависимость исследованных штаммов от рибофлавина и резистентность штаммов к пенициллину, стрептомицину и другим антибиотикам. Процент штаммов, зависящих от рибофлавина среди резистентных к антибиотикам. Все обозначения те же, что и на рис. 4.

Рис. 8. Резистентность штаммов к пенициллину, стрептомицину, хлорометицину в присутствии других антибиотиков. Процент резистентных штаммов по отношению к общему количеству исследованных. Обозначения те же, что и на рис. 4.

Рис. 9. Зависимость исследованных штаммов от рибофлавина и резистентность к пенициллину, стрептомицину, хлорометицину в присутствии других антибиотиков. Процент штаммов, зависящих от рибофлавина среди резистентных к антибиотикам. Объяснения те же, что и на рис. 4.

Табл. 1. Биохимическая характеристика штаммов.

Табл. 2. Зависимость штаммов *Staphylococcus aureus* от рибофлавина и их резистентность к антибиотикам.

Табл. 3. Зависимость штаммов *Staphylococcus aureus* от рибофлавина и их резистентность к пенициллину и к другим антибиотикам.

Табл. 4. Зависимость штаммов *Staphylococcus aureus* от рибофлавина и их резистентность к пенициллину, стрептомицину и другим антибиотикам.

Табл. 5. Зависимость штаммов *Staphylococcus aureus* от рибофлавина и их резистентность к пенициллину, стрептомицину, хлорометицину и другим антибиотикам.

SUMMARY

For testing riboflavin dependence among *Staphylococci* the disc method was used. 186 *Staphylococcus aureus* strains were examined; it was stated that riboflavin depending strains are simultaneously resistant to antibiotics. Among the resistant strains the highest percentage of riboflavin dependence was found among strains resistant to Erythromycin, Chloromycetin, Streptomycin, Aureomycin, Terramycin and Penicillin.

