تعيين الظروف المثلى لانتاج انزيم Superoxide Dismutase (SOD) المنتج من عزلة محلية لبكتريا *Staphylococcus aureus*

Determination the optimum condition for production of superoxide dismutase (SOD) from a local isolate of *Staphylococcus aureus*

حلا عبد الكريم رشيد غازي منعم عزيز

قسم التقنيات الاحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد

Hala Abd- Alkariem Rasheed Ghazi Munim Aziz

Biotechnology Dept./ College of science / Baghdad University

المستخلص

تم الحصول على 33 عزلة بكتيرية تعود الى النوع *Staphylococcus aureus* من 183 عينة مختلفة شملت مسحات من الجروح والحروق والدمامل والتقرحات والاذن والانف والمهبل وعينات من الدم والادرار والقشع والسائل المنوي والسائل المخي الشوكي . اختبرت قدرة هذه العزلات على انتاج انزيم (SOD) Superoxide dismutase بإستخدام المزارع المغمورة , فتبين ان العزلة *S. aureus* HM_{86} هي الاغزر انتاجاً للانزيم . حددت الظروف المثلى لإنتاج انزيم SOD من البكتريا بطريقة المزارع المغمورة بإستخدام المانوز مصدراً للكاربون بتركيز 0.5% ، والببتون بتركيز 0.5% ، وPancreatic digest of casein بتركيز 2% بوصفها مصادر نايتروجينية وبرقم هيدروجيني ابتدائي 7 بعد 12 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 37م بالحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/ دقيقة وبنسبة تهوية (1:6.6) . وجد ان افضل طريقة لإستخلاص الانزيم من البكتريا إستخدام الموجات الصوتية الفائقة لمدة 15 دقيقة ، وان الوقت الامثل لإضافة مركب الـ Paraquat بعد 6 و8 ساعات من النمو بتركيز 0.5 ملي مولار .

Absrtact

Thirty three isolates classified as *Staphylococcus aureus* were isolated from 183 different samples that included wounds, burns, boils, abscesses, ear, nose, vaginal swabs, blood, urine samples, sputum, seminal fluid and cerebrospinal fluid. The ability of these isolates to produce superoxide dismutase (SOD) was tested by using submerged culture. It has been found that the isolate *S.aureus* HM86 has the highest productivity of the enzyme. The optimal condition for SOD enzyme production from the isolate *S.aureus* HM86 by the submerged culture method were determined using (0.5 %) Mannose as carbon source and peptone (0.5%) and pancreatic digest of casein (2%) as nitrogen sources with initial pH of 7 after 12 hours of incubation at 37^{o}C, in shaker incubator at 150 rpm and with aeration ratio (1: 6.6). It has been found that the best method for enzyme extraction is by using ultrasonication for 15 min, the optimal time for addition of paraquat at concentration of 0.5 mM is after 6 and 8 hours of growth.

المقدمة :

تعد العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* من الممرضات الانتهازية (Opportunistic pathogens)؛ لكونها جزء من النبيت الطبيعي اذ تستقر بصورة طبيعية على الجلد والاغشية المخاطية لـ 30% من الاصحاء ، واكثر من 90% للعاملين بمجال الصحة. كما تعد احد المسببات الرئيسة لعدوى المستشفيات (Nosocomial infection) اذ وجد ان حوالي 2 مليون من الداخلين للمستشفى كل سنة يصابون بخمج المستشفيات ويعد هذا النوع اهم الانواع التابعة لجنس *Staphylococcus* لأنها تعد من العوامل المسببة لعديد من الامراض السريرية ، وتعزى امراضيتها لقابليتها على انتاج العديد من المواد مثل الذيفانات والانزيمات . ويعد انزيم الـ SOD احد عوامل الضراوة لها حيث اشارت العديد من الدراسات الى دور هذا الانزيم في الامراض الناتجة عن الاصابةبال Staphylococci ؛ اذ وجد ان العزلات شديدة الضراوة تظهر مستويات عالية لفعالية الـ SOD وذلك من خلال دوره في مقاومة الظروف غير الملائمة وتتمثل هذه الظروف بتجمع الخلايا البلعمية النشطة في منطقة الالتهاب مسببة اكسدة شديدة تؤدي الى تحرير مركبات اوكسجينية سامة [1،2،3،4].

يعد انزيم الـ SOD احد الانزيمات التابعة لمجموعة الاكسدة والاخزال ويطلق عليه Superoxide Oxidoreductase وينتمي الى مجموعة الانزيمات المعدنية Metalloenzyme اذ يحتوي الموضع الفعال على ايون معدني للقيام بالفعالية الحفزية (Mn ,Cu ,Zn ,Fe) وتختلف عدد الوحدات المكونة للانزيم بإختلاف مصادر انتاجه [5، 6] تتضمن آلية عمل الانزيم تفاعلاً جزئياً ثنائياً (يتطلب وجود جزيئتين من الـ O_2 يشمل تفاعلين نصفيين الاول هو تفاعل اكسدة والذي يتم فيه اكسدة الـ O_2 الى اوكسجين ثنائي اما الاخر فهو تفاعل اختزال يتحول فيه الـ O_2 الى H2O2 [8,7] تأتي اهمية هذا الانزيم من دوره المهم في حماية الخلايا من الاضرار الناتجة من الاكسدة ودوره في تنظيم تركيز الـO_2 في الخلايا والذي بدوره يعد مؤكسداً قوياً وناتجاً غير مرغوب فيه نتيجة للايض الخلوي [9] وتبرز اهميته في كونه مضاداً للاكسدة (Antioxidant) والالتهاب (Anti-inflammatory) والشيخوخة((Antiaging) [10] . ونظراً لعدم وجود دراسات محلية متعلقة بإنتاج هذا الانزيم من البكتريا ولأهميته الكبيرة في المجالات الطبية والبحثية فقد هدفت الدراسة الى الحصول على عزله محليه من بكتريا *S. aureus* كفوءه بانتاج انزيم ال SOD وتحديد الظروف المثلى لانتاجه باستخدام المزارع المغموره .

طرائق العمل

جمع العينات وعزلها

جمعت 183 عينة سريرية من الجروح والحروق والقشع والدمامل والتقرحات والانف والاذن والدم والادرار والسائل المنوي والمهبل والسائل المخي الشوكي من مستشفى الكاظمية واليرموك والمنصور للاطفال في بغداد خلال المدة من نيسان الى تموز للعام 2004 .

زرعت العينات على وسط آكار الدم، ثم حضنت الاطباق بدرجة 37م° ولمدة (18- 24) ساعة ، ثم نقلت على وسط آكار العنقوديات 110 Staph (Difico) ، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة .

تشخيص العزلات

شخصت العزلات طبقاً لما وصف في [11] ، حيث درست الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على وسط الآكار المغذي ثم عمل مسحة للبكتريا وصبغة بملون كرام وفحصت بالمجهر الضوئي كما تم إعتماد الفحوصات الكيموحيوية لغرض التشخيص .

الغربلة الكمية Quantitative screening

اختبرت 33 عزلة تعود لبكتريا الـ *Staphylococcus aureus* في انتاجها لانزيم Superoxide dismutase (SOD) ، باستخدم وسط الـ Trypticase soy broth كوسط لتنمية البكتريا و انتاج الانزيم .

حضر عالق الخلايا البكتيري بنقل عدد من المستعمرات النامية في وسط Trypticase soy agar المحضر الى دورق مخروطي بسعة 200 مليلتر المحتوي على 40 مللتر Trypticase soy broth ، ووضعت في حاضنة هزازة بدرجة 37م° وبسرعة 150 دورة / دقيقة لمدة 12 ساعة [12] . ثبتت الامتصاصية الضوئية لمعلق الخلايا الى 1 عند طول موجي 600 نانوميتر الذي يحتوي على عدد خلايا 6.4×10^9 خلية / مللتر

باستخدام العد الحي للخلايا(viable count) . استخدمت طريقة المزارع المغمورة لانتاج الانزيم من العزلات البكتيرية، اذ لقح 99 مليلتراً من وسط الانتاج ذي الرقم الهيدروجيني 7 بـ 1 مللتر من عالق البكتريا .
حضنت المزارع بدرجة 37م وسرعة 150 دورة / دقيقة ولمدة 14 ساعة . بعدها اجري النبذ المركزي المبرد بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة وبدرجة 4م ليتم فصل الكتلة الحيوية عن وسط النمو . غسلت الخلايا الناتجة 3 مرات بمحلول داريء فوسفات البوتاسيوم ليتم تهيئتها لعملية الاستخلاص [12] .

تقدير فعالية انزيم Superoxide dismutase

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل Beyer وجماعتة [13] في تقدير فعالية انزيم Superoxide dismutase باستخدام المادة الاساسى Nitro blue tetrazolium (NBT) . وعرفت وحدة الفعالية الانزيمية (Unit) بانها كمية الانزيم الذي سبب انخفاضا في اختزال ال NBT بمقدار 50% تحت ظروف التقدير .

تقدير تركيز البروتين

اتبعت طريقة Bradford , [14] لتقدير تركيز البروتين في المستخلصات الخام للانزيم .

تعيين الظروف المثلى لانتاج انزيم SOD

اختبر عدد من المتغيرات الاساسية لتحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم من العزلة المحلية *Staphylococcus aureus* HM86 .

تحديد مدة التكسير المثلى

عرض عالق الخلايا بنسبه (3:1) (وزن:حجم) و المجمد بدرجة (- 15) م الى الموجات الصوتية الفائقة بمدد تعريض مختلفة (30,25,20,15,10,5) دقيقة باستخدام جهاز الموجات الصوتية (Sonicator) بسعة ترددية 10 واط /دقيقة ، اما الاستخلاص بالكرات الزجاجية فقد علقت خلايا البكتريا بمحلول داريء الترس Tris تركيزه 10 ملي مولار برقم هيدروجيني 7 . اضيف غرام واحد من الكرات الزجاجية (μm 150-212) الى عالق الخلايا، ثم بعد ذلك تم تحريكه مرتين باستعمال المازج لمدة دقيقة واحدة تخللها خطوة تبريد بالثلج . بعدها نبذ المستخلص بدرجة 4م وسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق جمع الراشح وحفظ بالثلج وتم تقدير الفعالية الانزيمية .

تعيين الوسط الامثل لانتاج الانزيم

اختبر تأثير ثلاثة اوساط زرعية هي: Brain heart infusion broth و trypticase soy broth و Complex medium(10 خلاصة اللحم ، 5 عم خلاصة الخميرة ,5غم كلوريد الصوديوم , 2غم فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na2HPO4 في لتر من دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 7) حيث تم اضافة 1 مليلتر من اللقاح المحضر في الفقرة السابقة الى دوارق بسعة 500 مليلتر محتوية على 99 مليلتر من هذه الاوساط ذات الرقم الهيدروجيني 7، وحضنت في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة وبدرجة 37م .

تعيين المصدر الكاربوني الامثل لانتاج الانزيم

اختبر تأثير سكريات مختلفة شملت الكلوكوز والكالكتوز والفركتوز والسكروز واللاكتوز والمانوز والمالتوز المعقمة بالترشيح بالمرشحات الغشائية المعقمة بقطر ثقوب 0.22 مايكروميتر بتضمينها الى وسط الانتاج وبتركيز نهائي 0.25% .

تعيين التركيز الامثل للمصدر الكاربوني

استخدم وسط الانتاج المحتوي على تراكيز مختلفة من المصدر الكاربوني المنتخب (1.5,1.25,1,0.75,0.5,0.25,0.125,0) % (وزن / حجم) لاجل تحديد التركيز الامثل للمصدر الكربوني .

تعيين التركيز الامثل للمصدر النتروجيني

اختبر تأثير تراكيز مختلفة من البيتون (0.5,0.3,0.1) % (وزن/ حجم) بتضمينها الى وسط الانتاج واضيف لكل تركيز من البيتون تراكيز مختلفة من Pancreatic digest of casein (1،1.7،2)% (وزن / الحجم) .

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم

حضر وسط انتاج الانزيم المحتوي على المصدر الكاربوني والنتروجيني الامثل بارقام هيدروجينية مختلفة (4،5،6،6.5،7،7.5،8،8.5،9،9.5) لاجل تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم .

تحديد نسبة التهوية المثلى لانتاج الانزيم

اختبر تأثير نسب تهوية مختلفة هي: (3.3:1)، و (4:1)، و(5:1)، و(6.6:1)، و(10:1) (حجم/حجم) لانتاج الانزيم من العزلة المنتخبة *Staphylococcus aureus* HM86

تحديد سرعة التحريك المثلى لانتاج الانزيم

حضر وسط انتاج الانزيم والملقح بالبكتريا *Staphylococcus aureus* HM86 بنسبه 1% ووضع في الحاضنة الهزازة بسرع مختلفة هي (200,150,100) دورة / دقيقة.

تأثير مركب الـ paraquat في انتاج الانزيم

اختبر الوقت الامثل لاضافة مركب الـ paraquat ، حيث اضيف المركب بتركيز 0.5 ملي مولار لمدة ساعتين للوسط الانتاجي بعد تنمية الخلايا على مدد زمنية مختلفة (8،6،10،14،12) ساعة.

تحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج الانزيم

تمت متابعة انتاج الانزيم في الوسط الغذائي بعد تلقيحه بالعزلة المحلية لبكتريا *S.aureus* HM86 كل ساعتين بعد 6 ساعات من النمو ولمدة 24 ساعة.

* حضن وسط الانتاج بعد تلقيحة بالبكتريا (6.4×10^9 خلية / مللتر) في التجارب السابقة بدرجة 37م , وسرعة 150دورة/ الدقيقة , وبرقم هيدروجيني 7 .

النتائج والمناقشة

العزل

امكن في هذه الدراسة الحصول على 112 عزلة تابعة لجنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* بنسبة عزل 61.2% ، وقد بلغ عدد العزلات التابعة للنوع *S.aureus* 33 عزلة بنسبة عزل 18% بالنسبة للمجموع الكلي للعينات , تم التشخيص بالاعتماد على [11 ، 15] اذ تتميز بكونها مخمرة لسكر المانيتول وانتاجها لانزيم مخثر بلازما الدم وانزيم محلل الدنا وانزيم حال الدم وكونها موجبة لفحص الاسيتون .

التحري عن قابلية العزلات المحلية لبكتريا *S.aureus* على انتاج انزيم الـ SOD

اختبرت قدرة 33 عزلة محلية عائدة لبكتريا *S.aureus* على انتاج انزيم الـ SOD وحددت العزلة الاكفأ في انتاجه ، وذلك باستخدام المزارع المغمورة ، وقد تميزت العزلة المحلية *S.aureus* HM86 المعزولة من الجروح بانتاجها العالي للانزيم قياسا بالعزلات الاخرى حيث بلغت الفعالية النوعية للانزيم 10.66 وحدة / ملغم بروتين . لوحظ من النتائج الجدول (1) التباين في انتاج الانزيم بين افراد النوع وقد يعزى هذا الى التباين الوراثي لها ومدى قدرتها على احداث المرض ، فضلا عن طبيعة الاصابة اذ وجد ان عزلات *S.aureus* المعزولة من المرضى المصابين بالعنقوديات لها القدرة على انتاج مستويات عالية من الانزيم بوصفه احد عوامل الضراوة المهمة الذي يخضع لسيطرة عدد من الجينات المتباينة من حيث تنظيمها وتعبيرها عند اصابتها للمضيف ؛ بينما وجد ان مستوى هذا الانزيم منخفض في العزلات غير الضارية المعزولة من المرضى غير المصابين بالعنقوديات [3] .

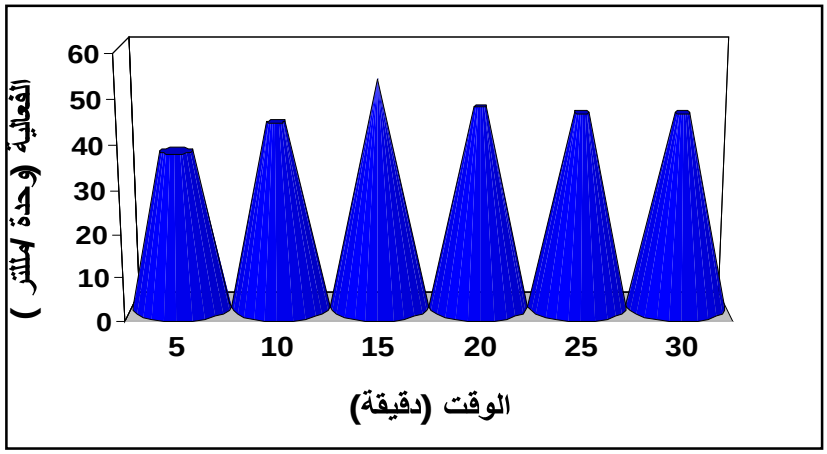
جدول (1): الغربلة الكمية لعزلات *S.aureus* المحلية المنتجة لانزيم SOD

رمز العزلة	مصدر العزل	الفعالية (وحدة/مللتر)	تركيز البروتين (ملغم / مللتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)
HM4	الانف	48.6	7.34	6.62
HM6	الادرار	41.6	5.96	6.97
HM7	الجروح	50.8	5.04	10
HM8	الجروح	60.23	6.88	8.75
HM10	الاذن	51.16	5.96	8.58
HM15	الدم	52.24	7.8	6.69
HM16	الاذن	41.72	6.8	6.13
HM19	الجروح	53.28	6.8	7.83
HM38	الدم	51.32	6.8	7.54
HM39	الاذن	47	6.8	6.91
HM40	الجروح	42.2	7.12	5.92

HM43	الادرار	40.24	6.4	6.28
HM44	السائل المنوي	54.4	5.5	9.89
HM45	الجروح	41.2	6.8	6
HM53	القشع	53	5.28	10
HM55	الجروح	51.74	6.4	8
HM56	الجروح	62.4	6.88	9
HM57	الجروح	42.4	4.2	10
HM58	الجروح	60.38	6.4	9.43
HM59	الجروح	55.6	5.96	9.32
HM60	الحروق	52	5	10.4
HM83	الادرار	44.96	4.36	10.31
HM86	الجروح	57.6	5.4	10.66
HM97	دمامل	47.68	6.4	7.45
HM98	دمامل	49.6	6.8	7.29
HM107	الجروح	43.2	6.8	6.35
HM108	القيح	47.36	6.4	7.4
HM111	الادرار	40.4	6.6	6.12
HM113	الادرار	31.48	6.8	4.62
HM128	الخراجات	44	7.2	6.11
HM146	الجروح	39.84	5.5	7.24
HM157	الادرار	37.52	5	7.5
HM183	الجروح	33.56	6.4	5.24

تحديد مدة التكسير المثلى

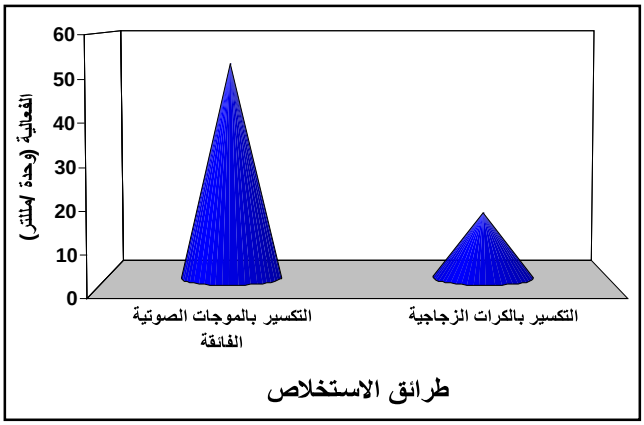
تشير النتائج المبينة في الشكل (1) الى ارتفاع قيمة الفعالية الانزيمية تدريجيا بزيادة مدة التعريض للموجات الصوتية الفائقة وبلغت اقصاها عند مدة تعريض 15 دقيقة حيث بلغت 52.56 وحدة/ مللتر ، بعدها انخفضت الفعالية قليلاً عند مدة تعريض 20 - 30 دقيقة حتى وصلت الى 45 وحدة/ مللتر بعد 30 دقيقة ؛ والذي يمكن ان يعود الى حدوث مسخ للبروتينات بسبب زيادة تعريض الخلايا للموجات الصوتية وتأثير ذلك في تركيب الانزيم . تباينت الدراسات لتحديد وقت تكسير الخلايا وذلك بسبب الاختلاف في طبيعة تركيب الجدار البكتيري و الجهاز المستخدم و السعة الترددية (16،17،18،19) .



الشكل (1): تأثير مدد تكسير مختلفة في استخلاص انزيم الـ superoxide dismutase (SOD) المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *S.aureus* HM86 بالموجات الصوتية الفائقة

تحديد الطريقة المثلى لاستخلاص الانزيم

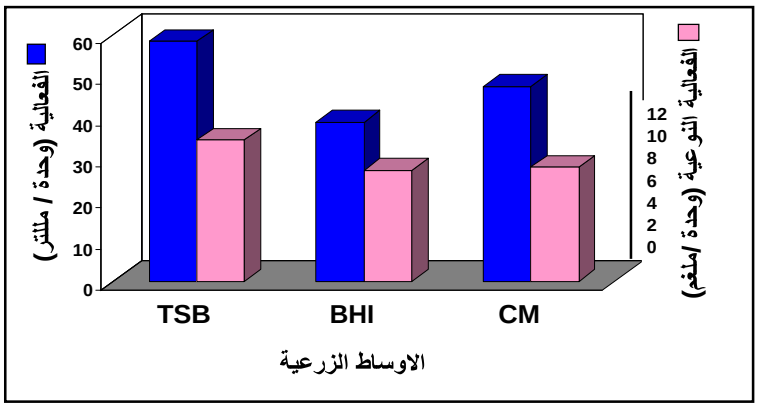
قورنت طريقتين لاستخلاص الانزيم حيث اظهرت النتائج ان فعالية الانزيم قد بلغت 52.56 وحدة/ مللتر باستعمال الموجات الصوتية الفائقة ، في حين بلغت فعالية الانزيم 16 وحدة/ مللتر عند استخدام الكرات الزجاجية في عملية الاستخلاص الشكل(2) . ويمكن ان يعزى عدم جودة الكرات الزجاجية في استخلاص الانزيم من الخلايا الى طبيعة تركيب جدار بكتريا *S.aureus* الذي يتميز بالصلابة بسبب تعدد طبقات الببتيدوكلايكان، حيث ذكر Atlas [20] ان طبقة الببتيدوكلايكان سميكة جدا في البكتريا الموجبة لصبغة كرام وتؤلف حوالي 90% من جدار الخلية.



شكل (2) : فعالية انزيم superoxide dismutase (SOD) عند استخلاصة بطريقة الكرات الزجاجية وطريقة الموجات الصوتية الفائقة في استخلاص الـ SOD من العزلة المحلية لبكتريا *S.aureus*

اختيار الوسط الامثل لانتاج SOD

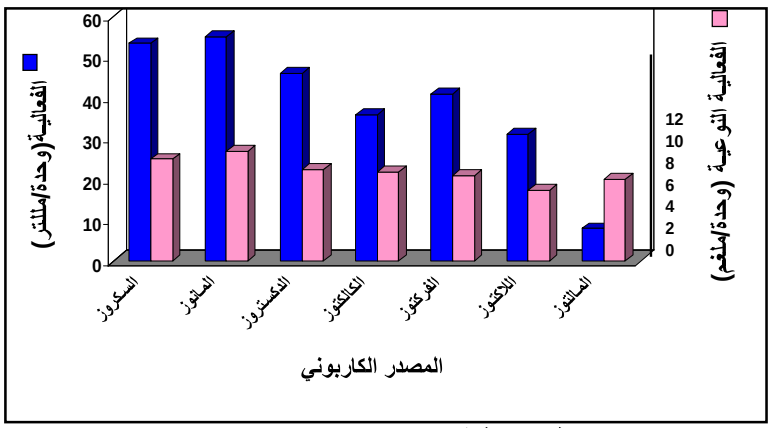
استخدمت ثلاثة اوساط زرعية مختلفة لانتاج الـ SOD ، بينت نتائج هذه الدراسة ان وسط مرق الصويا تربتكيز (Trypticase soy broth) (TSB) المحتوي على Papaic digest of soya meal pancreatic digest of casein, بوصفها مصادر نتروجينية قد اعطى اعلى انتاجية للانزيم اذ بلغت فعالية الانزيم 58.4 وحدة/ مللتر وبفعالية نوعية 10.39 وحدة/ملغم بروتين ، ثم تلاه وسط Complex media (CM) المحتوي على مستخلص الخميرة ومستخلص اللحم بوصفها مصادر نتروجينية بفعالية 47.44 وحدة/ مللتر وفعالية نوعية 7.78 وحدة/ملغم بروتين ، ثم وسط مرق نقيع القلب والدماغ (BHI) اذ سجل اقل فعالية بلغت 38.8 وحدة/ مللتر وفعالية نوعية مقدارها 7 وحدة/ملغم بروتين الشكل(3) . وفي ضوء النتائج المذكورة يمكن القول : ان الوسط الامثل لانتاج الـ SOD من العزلة المحلية هو وسط Trypticase soy broth . ان انخفاض انتاجية الانزيم في الاوساط الزرعية الاخرى يمكن ان يعزى الى طبيعة مكونات الوسط الزرعي والى نوعية المصادر النتروجينية القادرة على تحفيز انتاج الـ SOD من العزلة البكتيرية ، ففي دراسة اجريت من قبل [2] وجد ان الاعتماد على مصادر غير كاربوهيدراتية لوسط Trypticase soy yeast extract قد حفز على انتاج الانزيم بشكل عالٍ.



الشكل (3) : كفاءة الاوساط الغذائية المختلفة في انتاج الـ SOD من العزلة المحلية لبكتريا *S.aureus* HM86 بدرجة حرارة 37 م وسرعة تحريك 150 دورة /دقيقة ونسبة تهوية (1:5) ورقم هيدروجيني 7

تحديد مصدر الكاربون الامثل لانتاج الانزيم

اختبرت سبعة مصادر كاربونية في انتاج الـ SOD وتبين النتائج الموضحة في الشكل (4) ان سكر المانوز افضل تلك المصادر المستخدمة في انتاج الانزيم اذ بلغت فعالية الانزيم 55وحدة/مليلتر بفعالية نوعية 9.35 وحدة/ملغم بروتين يليه الوسط الغذائي المحتوي على السكروز الذي بلغت فعاليته الانزيمية والنوعية 53.28 وحدة/ مللتر و8.59 وحدة/ملغم بروتين على التوالي ، بينما بلغت فعالية الانزيم والفعالية النوعية 45.92 وحدة/ مللتر و 7.7 وحدة/ملغم بروتين على التوالي عند استخدام سكر الدكستروز. في حين شهد انتاج الانزيم انخفاضا كبيرا عند استخدام سكر اللاكتوز والمالتوز بوصفها مصادر كاربونية لانتاج الانزيم .



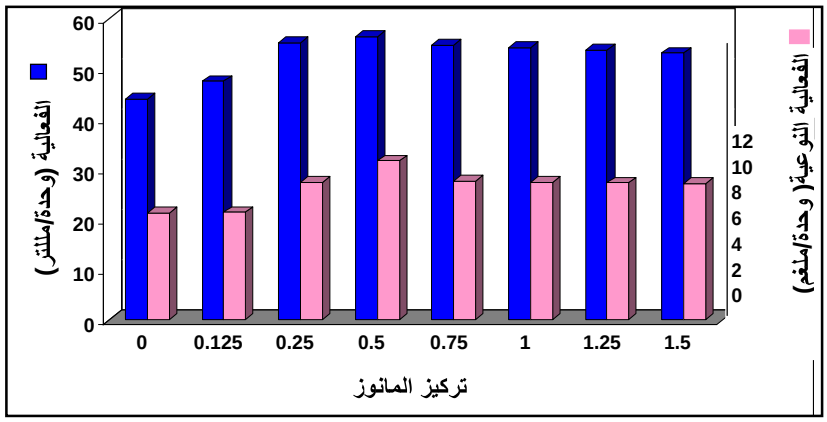
الشكل (4): تاثير مصادر كاربونية مختلفة في انتاج انزيم ال(superoxide dismutase (SOD من العزلة المحلية لبكتريا *S.aureus* HM86,عند وجودها في وسط التنمية بتركيز 0.25% ورقم هايدروجيني 7 ودرجه حراره 37 م وسرعة تحريك 150 دورة /دقيقة ونسبة تهوية (1:5)

تحديد التركيز الامثل لسكر المانوز

اعتمد سكر المانوز مصدراً للكاربون في انتاج الـ SOD ، لوحظ من النتائج الموضحة في الشكل (5) ان استخدام المانوز بتركيز 0.5% قد اعطى اعلى فعالية انزيمية وفعالية نوعية بلغت 56.5 وحدة/مليلتر و10.7 وحدة /ملغم بروتين على التوالي ، وتميز الوسط الغذائي الخالي من المانوز بانخفاض انتاجية لانزيم حيث بلغت الفعالية للانزيم والفعالية النوعية حوالي 44 وحدة / مللتر و 7.38 وحدة / ملغم بروتين على التوالي .

تأتي أهمية المصدر الكاربوني بتجهيز الطاقة التي تحتاجها الخلايا في النمو والتكاثر والانتاج ، ويمكن ان يعزى انخفاض الانتاجية للانزيم عند التراكيز العالية من السكر الى انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط الانتاجي

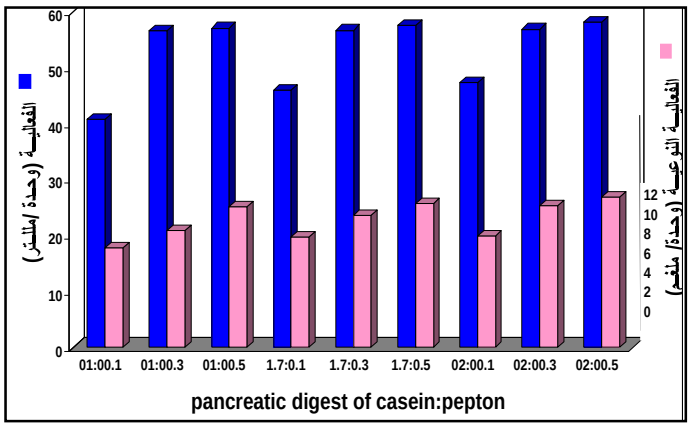
اذ يصبح الوسط حامضياً نتيجة لتجمع حامض اللاكتيك واحماض عضوية اخرى ناتجة من استهلاك السكر، فضلا عن المعدل الواطيء لانتاج الـ O_2 بالوسط [22 ، 21].



الشكل (5): تاثير تراكيز مختلفة من المانوز (0-1.5) % في انتاج الSOD superoxide dismutase من العزلة المحلية *aureus* HM 86. باستخدام الوسط TSBبرقم هيدروجيني 7 ودرجه حراره 37 م وسرعة تحريك 150 دورة /دقيقة ونسبة تهوية (1:5)

تحديد التركيز الامثل للمصدر النايتروجين

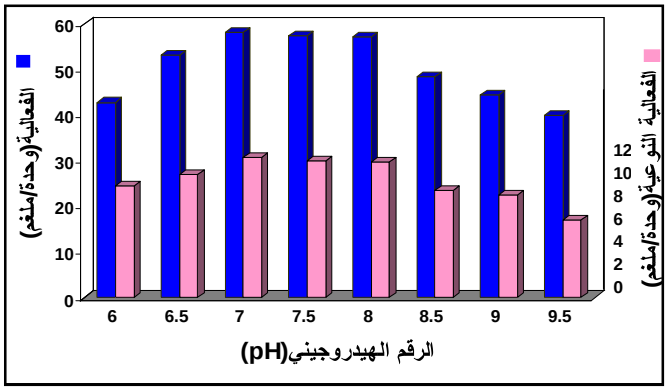
اختبر تأثير تراكيز مختلفة من الببتون و Pancreatic digest of casein كمصدرين للنايتروجين في انتاج الانزيم . وتبين ان اعلى فعالية للانزيم بلغت 58 وحدة /مليلتر وفعالية نوعية 12 وحدة /ملغم بروتين باستعمال 2% من Pancreatic digest of casein و 0.5% Peptone الشكل (6) . وفي دراسة اجريت (1978) وجد ان للمصدر النايتروجيني دوراً في زيادة فعالية الـ SOD وذلك من دوره في رفع الرقم الهيدروجيني المنخفض للوسط الزرعي الناتج من استهلاك الكلوكوز وزيادة سرعة التنفس الذي يكون مصدرا لانتاج O_2 المحفز لانتاج الـ SOD ومن ثم يحدد من الفعل التثبيطي للسكر .



الشكل (6) :تأثير تراكيز مختلفة من ال Peptone و Pancreatic digest of Casein في انتاج انزيم الـ SOD من العزلة المحلية لبكتريا *S.aureus* HM86 برقم هيدروجيني 7 ودرجه 37 م وسرعة تحريك 150 دورة /دقيقة ونسبة تهوية (1:5)

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم

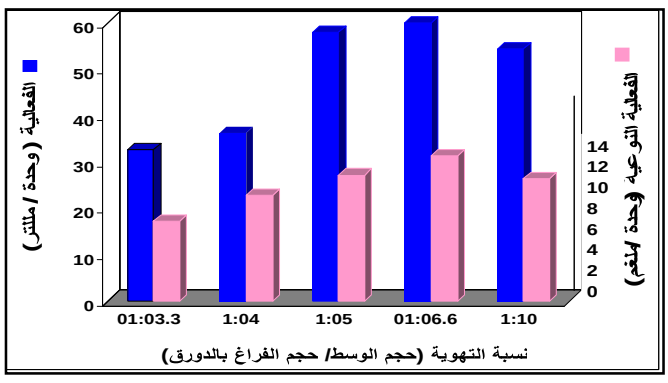
وجد ان انتاج الانزيم من العزلة المحلية يزداد بزيادة الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط اذ بلغت هذه الزيادة اقصاها عند الرقم الهيدروجيني 7 حيث كانت الفعالية الانزيمية 58.3وحدة/ مللتر وبفعالية نوعية 12 وحدة/ملغم بروتين ، بينما لوحظ انخفاض في انتاجية الانزيم عند القيم الحامضية (6-6.5) والقيم القاعدية (8-9.5) اذ بلغت فعالية الانزيم حوالي 40 وحدة/ مللتر بفعالية نوعية 6.23 وحدة/ملغم بروتين عند الرقم الهيدروجيني 9.5 الشكل (7) ، فضلا عن اختزال شديد للنمو عند الرقم الهيدروجيني 4 و5. لقد عرفت بكتريا المكورات العنقودية بقابليتها على النمو في ارقام هيدروجينية عدة تتراوح بين (4.5-9.3) تقريبا ، ولكن الرقم الهيدروجيني الامثل لنمو هذه البكتريا هو 7- 7.5 [23] لذا يمكن ان يعزى انخفاض انتاج الانزيم عند الارقام الهيدروجينية المتطرفة الى تأثيره في نمو العزلة وثباتية الانزيم المنتج. كما بين ان تعبير الجين المسؤول عن تكوين ال SOD يكون ثابتا في الرقم الهيدروجيني 7 [1] .



الشكل (7): تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج الـ SOD من العزلة المحلية لبكتريا *S .aureus* HM86 بدرجه حراره 37 م وسرعة تحريك 150 دورة /دقيقة ونسبة تهوية (1:5)

تأثير مستوى التهوية في انتاج الانزيم

اظهرت النتائج الشكل (8) زيادة متدرجة في انتاجية الانزيم بزيادة نسب التهوية حتى تضاعفت الانتاجية عند نسبة تهوية (6.6:1) (حجم:حجم) مقارنة مع النسبة (3.3:1) ، وبلغت انتاجية الانزيم اقصاها بفعالية انزيمية مقدارها 60 وحدة/ مللتر وفعالية نوعية 13.8 وحدة/ ملغم بروتين ، بعدها انخفضت انتاجية الانزيم عند نسبة تهوية (10:1) (حجم: حجم) اذ بلغت الفعالية والفعالية النوعية 54.4 وحدة/ مللتر و 11.7 وحدة/ ملغم بروتين على التوالي . وبناء على هذه النتائج عدت نسبة التهوية (6.6:1) هي المثلى لإنتاج الانزيم. اشارت الدراسات [3] الى ان تنمية خلايا *S. aureus* عند ظروف تهوية (25:1) وسرعة تحريك 225 دورة/ دقيقة يمكنها من الحصول على زيادة في مستوى تعبير الجينات المسؤولة عن انتاج الـ SOD بمقدار مرتين .

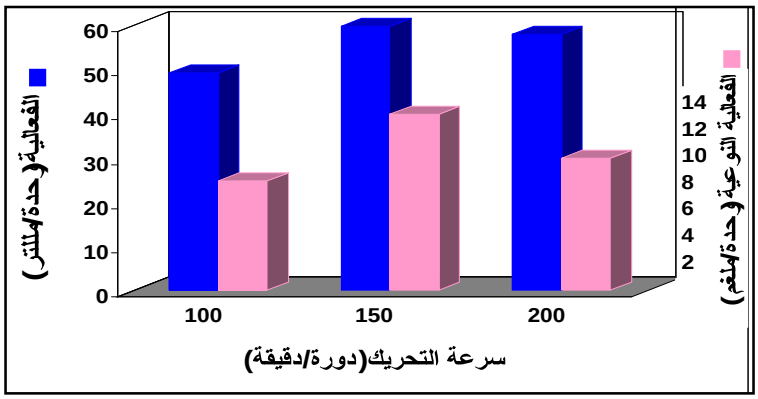


الشكل (8): تأثير نسب تهوية مختلفة في انتاج الـ SOD من العزلة المحلية لبكتريا *S. aureus* HM86 برقم هيدروجيني 7 ودرجه 37 م وسرعة تحريك 150 دورة /دقيقة ونسبة تهوية (1:6.6)

تحديد سرعة التحريك المثلى لإنتاج الانزيم

تم متابعة انتاجية الانزيم في ظروف هوائية تحت التحريك المستمر للاوساط الزرعية الملقحة بالعزلة بسرع مختلفة 100 و150 و200 دورة/ دقيقة. ولوحظ انحضن المزارع في حاضنة هزازة وبسرعة 150 دورة/ دقيقة قد اعطت زيادة في انتاجية الانزيم بفعالية 60 وحدة/ مللتر وفعالية نوعية 13.9 وحدة/ ملغم بروتين ، بعدها انخفضت الانتاجية قليلاً عند سرعة تهوية 200 دورة/ دقيقة اذ اعطت فعالية انزيمية بمقدار 58وحدة/ مللتر وفعالية نوعية 10 وحدة/ ملغم بروتين الشكل (9).

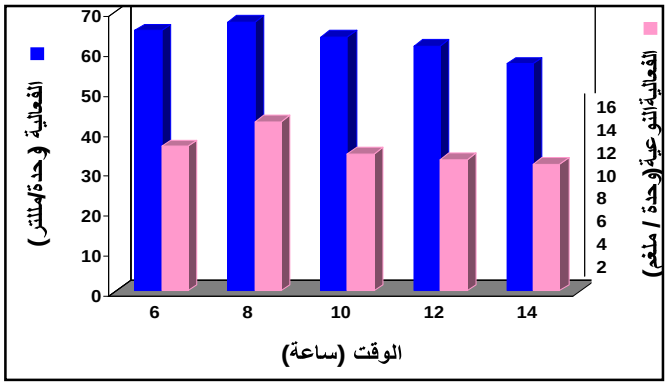
يلاحظ مما تقدم ان زيادة انتاج الانزيم إستجابة لزيادة سرعة التهوية يعود الى دورها المهم في توزيع المادة الاساس O_2 في وسط تنمية الكائن المجهري والذي بدوره يقوم بتحفيز استنساخ الجينات المسؤولة عن انتاج الانزيم [24] وتختلف نسبة التحفيز بإختلاف الكائن المجهري ونوع الانزيم المنتج [25] ويعزى الانخفاض في انتاجية الانزيم عند سرعة تهوية عالية الى كون الكمية المتولدة من الـ O_2 تفوق قدرة الخلية على انتاج الـ SOD ومن ثم تؤدي الى الاضرار بالخلية [26].



الشكل (9): تاثير سرع التحريك المختلفة في انتاجيه انزيم ال SOD من العزله المحلية *S.aureus M86* برقم هيدروجيني 7 ودرجه حراره 37 م ونسبة تهوية (1:6.6)

تأثير مركب Paraquat في إنتاج الانزيم

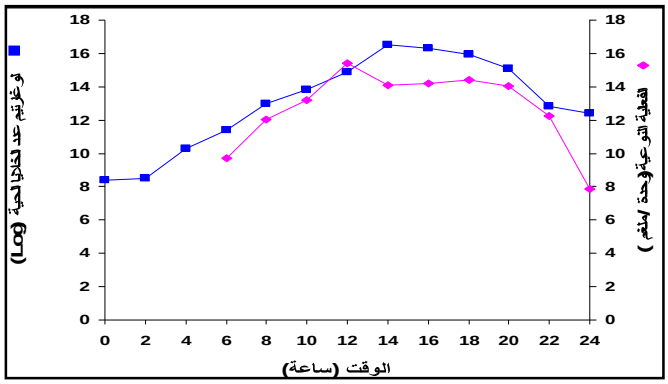
يلاحظ من النتائج المبينة في الشكل (10) ان تأثير هذا المركب كان عند اضافته بعد 6 و8 ساعات من النمو؛ اذ بلغت الفعالية الانزيمية 65.38 وحدة/ مللتر و67.5 وحدة/ مللتر على التوالي ، والفعالية النوعية 12.94 وحدة/ ملغم و15 وحدة/ ملغم بروتين على التوالي . في حين كان تأثيره قليلاً في انتاجية الانزيم عند اضافته الى وسط الانتاج بعد (10-14) ساعة ، حيث اشارت الدراسات الى ان تحفيز هذا المركب لإستنساخ الجينات المسؤولة عن انتاج الـ SOD معتمداً على طور النمو ، ويحدث عادة بعد بداية الطور اللوغارتمي Post- exponential بغض النظر عن وقت اضافة المركب للمزرعة . اما في حالة اضافته بعد طور الثبوت (Stationary phase) فلا يؤدي الى تحفيز التعبير الجيني لإنتاج الانزيم، وفي دراسة اخرى وجد انه لايؤثر في نسبة النمو في طور النمو اللوغاريتمي ، في حين وجد انه يؤدي الى اختزال قليل في النمو عند الدخول في طور الثبوت بالنسبة لبكتريا *S. aureus*; [18,1] وهذا يفسر انخفاض الفعالية الانزيمية عند اضافة المركب في الاوقات بين (10-14) ساعة .



الشكل (10) : تأثير اضافة المركب Paraquat بتركيز 0.5 ملي مولار بأوقات مختلفة في انتاجية االنزيم SOD من العزلة لمحلية لبكتريا *S. aureus* HM_{86} برقم هيدروجيني 7 ودرجه حراره 37 م وسرعة تحريك 150 دورة /دقيقة ونسبة تهوية (1:6.6)

منحنى النمو وتحديد وقت انتاج الانزيم

تم متابعة انتاج الانزيم خلال نمو العزلة المحلية لبكتريا *S. aureus* HM_{86} (بعد التلقيح بعدد خلايا 6.4×10^9 خلية / مل) عن طريق حساب لوغاريتم عدد الخلايا وقياس الفعالية النوعية للانزيم خلال 24 ساعة في الوسط الانتاجي . تشير النتائج المبينة في الشكل (11) الى حصول زيادة متدرجة في انتاج الانزيم مع زيادة مدة الحضانة لتصل اقصاها بعد مرور 12 ساعة من بدء الحضن، وهو الوقت الذي وصلت فيه خلايا البكتريا الى نهاية الطور اللوغاريتمي تقريباً ؛ اذ بلغت الفعالية الانزيمية 63.7 وحدة/ مللتر بفعالية نوعية مقدارها 15.42 وحدة/ ملغم بروتين ، وحصول ثبوت في اعداد الخلايا تقريباً بين 14-18 ساعة . وهذا يعكس ان الانزيم المنتج من هذه العزلة المحلية قد بلغ افضل مستوياته الانتاجية عند نهاية الطور اللوغاريتمي . واكدت هذه النتائج ماتوصل اليه [1] الذي اشار الى ان تعبير الجينات المسؤولة عن انتاج الانزيم في عزلات *S. aureus* تعتمد على طور النمو ويكون اقصاه في منتصف ونهاية الطور اللوغارتمي مع الاحتفاظ بالفعالية العالية خلال طور الثبوت .



الشكل (11): العلاقة بين منحنى النمو للعزلة المحلية لبكتريا *S. aureus* HM_{86} وانتاج الانزيم (SOD) تحت الظروف المثلى لنمو البكتيريا.

المصادر:

1. Clements, M. O., Watson, S.P. and Foster, S.J. (1999). Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. Journal of Bacteriology 181 (13): 3898-3903.

2. Kloos, W.E. and Bannerman, T.L (1999). Mannual of Clinical Microbiology (7th ed). (Ed. By Murray, p. R., Baron, E.J. Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Yolken, R.H.), Washington, D.C., U.S.A. P. 264-282.
3. Valderas, M.W. and Hart, M.E. (2001) Identification and characterization of a second superoxide dismutase gene (sodM) from *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 183(11): 3399-3407.
4. Valderas, M.W., Gatson J.W., Wreyford, N. and Hart, M.E. (2002). The superoxide dismutase Gene sodM is unique to *Staphylococcus aureus*: Absence of SodM in coagulase- negative staphylococci Journal of Bacteriology. 184(9): 2465-2472.
5. Beck, Y., Bartfeld, D., Yavin, Z., levanon, A., Gorecki, M. and Hartman, J.R. (1988). Efficient production of active human manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Biotechnology. 6:930-935
6. Battistoni, A., Folcarelli, S., Cervoni, L., Polizio, F., Desideri, A., Giartosio, A. and Rotilio, G. (1998). Role of the dimeric structure in Cu, Zn superoxide dismutase. The Journal of Biological Chemistry. 273(10): 5655-5661.
7. Bull, C; Niederhoffer EC. ; Yoshida, T.; Fee JA. (1991). Kinetic studies of superoxide dismutase properties of the manganese-containing protein from *thermus-thermophilus.* J. Am. Chem. Soc. 113:4069-4076.
8. Ludwig, M.; Metzger, A.; Pattridge, K; Stallings, W. (1991). Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophillus*. A structural model and refined at 1.8 A resolution. Journal of Molecular Biology. 219: 335-358.
9. Christianson, D. (1997). Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. Prog. Biophys. Molec. Biol. 67: 217-252.
10. Getzoff, E.D., Aoyagi, M., Arvai, A.S., Brudle, R.M., Bruns, C.M., Cradidonato, B.R., Forest, K.T., Garcin, E.D., Genick, U.K., Koike, C.K., Lloyd, S.J., Mylvaganam, S. E., Pellequer, J.L., Pique, M. E., Rosen Feld, M.E., Thayer, M.M., Thompson, M.J. (1999). Principles of protein structure for chemical recognition, complementarity, and catalysis. The Skaggs Institue for Chemical Biology
11. Collee, G., Fraser, A. G., Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology (14th ed.) Churchill Living stone. New York,p. 245-251.
12. Kanafani, H. and Martin, S.E. (1985). Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and non virulent *Staphylococcus aureus* isolates. Journal of Clinical Microbiology. 21(4): 607-610.
13. Beyer, W.F., JR. and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some Large consequences of minor changes in conditions. Analytical Biochemistry 161: 559-566.
14. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein. Dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

15. Kloos, W. E. and Schleifer, K.H. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Ed. By Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.) Vol.2. Williams and Wilkins. London.
16. Roberts, B. and Hirts, R. (1996). Identification and characterization of a superoxide dismutase and catalase from *Mycobacterium ulcerans.* Journal of Medical Microbiology. 45: 383-387.
17. Gort, A.S. and Imlay, J.A. (1998). Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. Journal of Bacteriology. 180(6): 1402-1410.
18. Barriere, C., Bruckner, R. and Talon, R. (2001). Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. Applied and Environmental Microbiology. 67(9): 4096-4104.
19. Janulczyk, R., Ricci, S. and Bjorck, L. (2003). MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. Infection and Immunity. 71(5): 2656-2664
20. Atlas, R.M. (1995).Principles of Microbiology. Mosby. St. Louis.
21. Hassan, H.M. and Fridovich, I. (1977). Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry. 252 (21): 7667-7672.
22. Fridovich, I. (1978). The Biology of Oxygen radicals. Science. 201: 875-880.
23. Bergdoll, M.S. (1989) Foodborne Bacterial pathogens, (Ed. By Dolye M.p.) Marcel Dekker, Inc. New York and Basal.
24. Karavolos, M.H. Horsburgh, M.J., Ingham, E. and Foster, S. J. (2003). Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. Microbiology. 149: 2749-2758.
25. Fridovich, I. (1974). Superoxide dismutase. Advances in Enzymology. 41:35-96.

Gregory, E.M. and Fridovich, I. (1973). Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. Journal of Bacteriology. 114(2): 543-548.