دراسة العلاقة بين انتاج أنزيم البروتيز القاعدي وأطوار نمو بكتريا Pseudomona aeruginosa المعزولة من المرضى

م. م. علي جعفر سليم
كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مستشفى بعقوبة العام ومستشفى البتول للولادة والأطفال في بعقوبة للكشف عن بكتريا *Pseudomona aeruginosa* حيث تم جمع 161عينة سريرية من أمراض الراقدين والمراجعين للمستشفى للفترة من 2004/12/1 ولغاية 2005/3/31 وتم الحصول على 49 عزلة للبكتريا المذكورة، واختبرت قابلية العزلات على إنتاج إنزيم البروتيز القاعدي بالطرق الكمية وانتخبت العزلة الأكفأ في إنتاج الإنزيم.

ودرست العلاقة فيما بين إنتاج إنزيم البروتيز القاعدي وأطوار نمو بكتريا *P.aeruginosa* لتحديد وقت إنتاج الإنزيم وأظهرت النتائج أنَّ العزلة المحلية المنتخبة بدأت بإنتاج الإنزيم في المراحل المتأخرة في الطور اللوغارتمي وازدادت في الإنتاج بشكل كبير في طور الثبوت، إذ بلغت أقصاها بعد مرور 48 ساعة من وقت تلقيح الوسط الزرعي حيث بلغت 159.2 وحدة/مللتر في راشح المزرعة واحتفظ الإنزيم بكامل فعاليته تقريبًا في طور الثبوت.

المقدمة

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من أهم أنواع البكتريا السالبة لصبغة غرام الممرضة للإنسان، إذ تتميز بقدرتها على إحداث أنواع مختلفة من الإصابات التي تتراوح شدتها بين المميتة والمعتدلة، وتعد هذه البكتريا من الممرضات الانتهازية (Opportunistic pathogen) إذ إنها تسبب التهابات خطيرة لاسيما لدى مرضى السرطان والذين يعانون من تثبيط في جهازهم المناعي (Immunocompromised patients) والمصابين بالحروق (Greenwood et al., 2007) (Todar, 2012)، وكما تسبب هذه البكتريا إصابات في مواقع

مختلفة من الجسم فهي تسبب خمج المسالك التنفسية وخاصة التليف الحوصلي (Cystic fibrosis) وذات الرئة (Pneumonia) وخمج المسالك البولية وخمج الاذن الوسطى (Otitis Media) وخمج العين وخاصة التهاب القرنية البكتيري (Bacterial Keratitis) والتهاب شغاف القلب (Endocarditis) والتهاب الأغشية السحائية (meningitis) وتجرثم الدم (Bacteremia) وأنتان الدم (Septicemia) وخمج العظام والمفاصل والالتهابات المعوية وخمج الجلد والحروق والجروح خاصة جروح ما بعد العمليات (Lang et al., 2004) (Pollack,2000).

واشار (Sleigh and Timbury,1998) ان هذه البكتريا تسبب التهابات في جروح الحروق مسببة إصابات خطيرة في الجلد والأنسجة وقد تؤدي الى حصول أنتان الدم ، حيث تكون جروح الحروق وسطاً غذائياً جيداً للأحياء المجهرية وعن طريقها يتم الاستيطان (Colonization) والدخول الى داخل الجسم وأحداث سلسلة من الإصابات ، كما أشار (Thomson and Smith,1994) أن استقرار البكتريا على الجلد المتضرر نتيجة الحرق يكون عن طريق ارتباطها بالغدد العرقية (Sweat glands) أو ببصلة الشعرة (hair follicles) بعدها تستطيع اختراق السطح والنفوذ داخل الجسم وإحداث الإصابة.

تعتمد قدرة بكتريا *P. aeruginosa* في غزو الأنسجة على إنتاج الإنزيمات والذيفانات الخارج خلوية لأنها تخترق حواجز الجسم وتتلف خلايا المضيف ومن هذه الانزيمات البروتيز القاعدي الذي يلعب دوراً مهماً في توفير عوامل النمو الغذائية الأساسية لهذه البكتريا مما يمكنها من غزو الأنسجة واستيطانها وصولاً الى الإصابة الشاملة من خلال توفير عوامل النمو الغذائية الأساسية (Kernacki et al.,1995)، كما يعمل على توفير الحماية لها من خلال تثبيط بعض مكونات النظام المناعي للمضيف، إذ يعمل البروتيز القاعدي على منع عملية الطهاية (Opsonization) بواسطة الأجسام المضادة (Antibodies) والمتممات (Complment)، كما يثبط الانجذاب الكيميائي لخلايا العدلة (Neutrophil Chemotaxis) ، كما يعمل على تخفيض إنتاج الكاما انترفيرون (Gamma interferon) مما يسبب انخفاض النشاط المضاد للفيروسات (Van Delden et al.,1998).

يمتلك هذا الإنزيم القدرة على تحطيم البروتينات التركيبية مثل الكولاجين والسكريات البروتينية في الأنسجة (Sakata et al.,1993) ، ويتم إفراز هذا الإنزيم خارج الخلية البكتيرية بخطوة واحدة من الغشاء الداخلي الى الغشاء الخارجي مباشرة بينما تمر البروتينات الأخرى المفرزة خارج الخلية بمرحلتين (Kadurugamuwa and Beveridge,1995).

وقد توسعت تطبيقات البروتيزات إلى العديد من المجالات الجديدة مثل الطب السريري والكيمياء الطبية والتحليلية مما ادى إلى ازدياد الطلب عليها إلى حد كبير، وتعتبر الأحياء

المجهرية اهم مصدر لانتاج انزيم البروتيز القاعدي وتكون عوائدها الاقتصادية كبيرة عن طريق تنمية هذه الاحياء على مصادر للكاربون والنتروجين منخفضة الكلفة (Kalaiarasi and Sunitha, 2009) .

ونظراً لأهمية هذا الإنزيم ودوره في أمراضية *P. aeruginosa* فضلاً عن أهمية البروتيزات عموماً في المجالات الصيدلانية والطبية والصناعية جاءت هذه الدراسة لبيان علاقة انتاج البروتيز القاعدي باطوار نمو عزلة محلية منتخبة لبكتريا *P.aeruginosa* .

المواد وطرائق العمل

جمعت 161 عينة سريرية من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى عام بعقوبة ومستشفى البتول للولادة والأطفال في بعقوبة للفترة من 2004/12/1 لغاية 2005/3/31 وشملت العينات اعماراً مختلفة ومن كلا الجنسين ومن مناطق واخماج مختلفة ، إذ تم اخذ المسحات من الحروق ومن جروح المرضى المخمجة بعد العمليات الجراحية ومن حالات خمج الاذن الوسطى والعيون بواسطة مسحات معقمة نبيذه (Disposable cotton swabs)، أما عينات القشع والإدرار فقد تم جمعها بأكواب معقمة نبيذه ذات غطاء. وجرى استنبات المسحات والعينات على وسط اكار الماكونكي ووسط اكار الدم وحفضت بظروف هوائية بدرجة حرارة 37م لمدة 24–48 ساعة للتحري عن عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وبعدها اجريت الاختبارات التشخيصية للعزلات النامية وبالاعتماد على طريقة Collee et al., (1996) (Holt et al., 1994).

تم التحري عن قابلية بكتريا *P.aeruginosa* على الفعالية المحللة للبروتين proteolytic activity باستخدام وسط اكار الحيلب الفرز تبعا لطريقة (Collee et al., 1996) ، انتخبت العزلات الكفوءة التي أعطت أعلى نسبة تحلل في الوسط الصلب ونشطت في وسط المرق المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24ساعة ، حضر عدد من الدوارق سعة 250 مل حاوية على 50 مل من وسط الكازائين السائل الموصوف من قبل (Al-Shehri and Mostafa , 2004) وبواقع مكررين لكل عزلة ولقحت باستعمال 1% لقاح من المزروع البكتيري ذي كثافة ضوئية قدرها 0.75 عند طول موجي 600 نانوميتر ، حضنت الدوارق بحاضنة هزازة (Shaker incubator) بسرعة 150 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ، بعد انتهاء مدة الحضن نبذ المزروع البكتيري بالمنبذة (Centrifuge) بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 م ، فصل الراسب عن الرائق وقدرت فعالية الإنزيم وتركيز البروتين في الرائق (المستخلص الإنزيمي الخام) لانتخاب العزلة الأغزر إنتاجاً والتي أظهرت أعلى فعالية نوعية مقارنة ببقية العزلات الأخرى لاختيار العزلة الاكفا على انتاج

الانزيم ، واعتمدت طريقة McDonald and Chen(1965) الموصوفة من قبل Ikram-ul-Hag et al.,(2004) لتقدير فعالية الانزيم واعتمدت طريقة Lowry (1951) في تقدير تركيز البروتين.

واعتمدت الظروف المثلى لانتاج الإنزيم باستخدام المزارع السائلة المتكونة من 0.75% كلوكوز و 1% تربتون و 0.1% كلوريد الكالسيوم و0.01% كبريتات المغنيسيوم المائية و1.7% فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين و0.3% فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين والملقحة بعدد 1×10^{7} خلية /مليلتر عند رقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 8 ولمدة 48 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 37 م بالحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة /دقيقة تبعا لطريقة Saleem (2007).

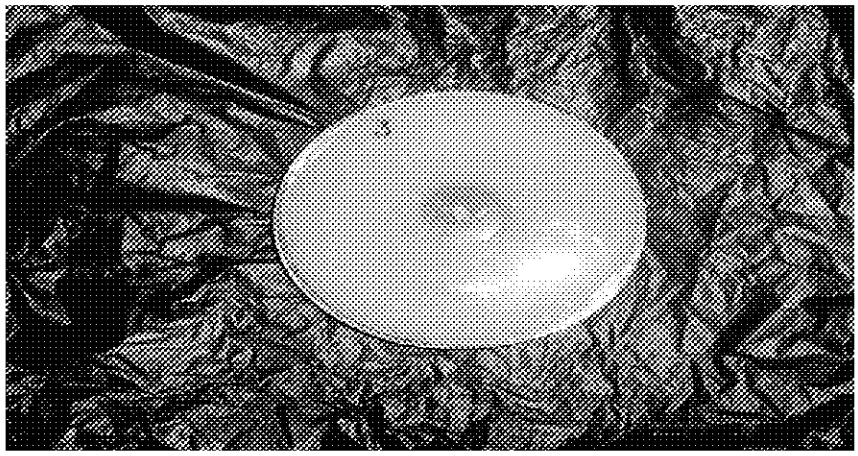
نميت العزلة المحلية المنتخبة في وسط نقيع القلب والدماغ وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة وقيست الامتصاصية الضوئية للمزروع البكتيري على طول موجي 600 نانومتر وتم تحديد العدد الحي للخلايا Viable count بطريقة عد المستعمرات النامية في الاطباق الحاوية على عدد خلايا بين 30-300 خلية ، وتم تحضير عدد من الدوارق سعة 250 مل حاوية على 50 مل من وسط الانتاج الأمثل ولقحت بالتركيز الامثل للقاح البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37م بالحاضنة الهزازة وبسرعة 150 دورة/دقيقة ، وعدت ساعة تلقيح ساعة الانتاج بالخلايا البكتيرية ساعة الصفر لبدء النمو وانتاج الانزيم وسحبت عينات من وسط النتاج بشكل دوري كل ساعتين ابتداءا من زمن الصفر الى 12 ساعة ومن بعدها كل 6 ساعات حتى دخول البكتريا طور الانحدار Decline Phase وتم تحديد العدد الحي للخلايا في العينات المسحوبة و قياس الامتصاصية الضوئية كما تم تقدير فعالية انزيم البروتيز القاعدي في وسط الانتاج للفترات الزمنية ذاتها .

النتائج والمناقشة

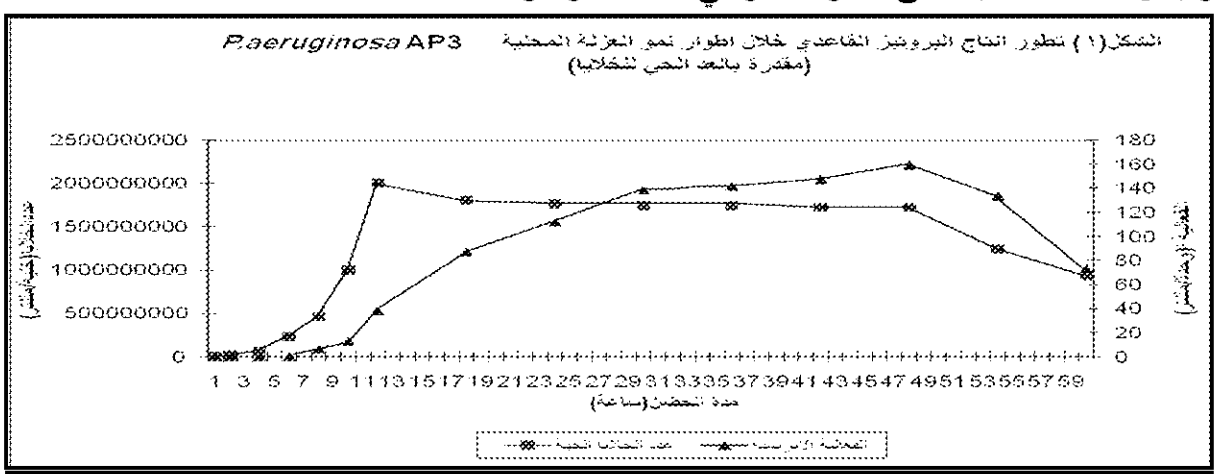
أمكن تشخيص 49 عزلة تابعة لبكتريا *P.aeruginosa* من خلال الصفات الزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية حيث أظهرت جميع العزلات القابلية على الفعالية المحللة للبروتين proteolytic activity باستخدام وسط اكار حليب الفرز من خلال تكوينها منطقة شفافة حول المستعمرات النامية.

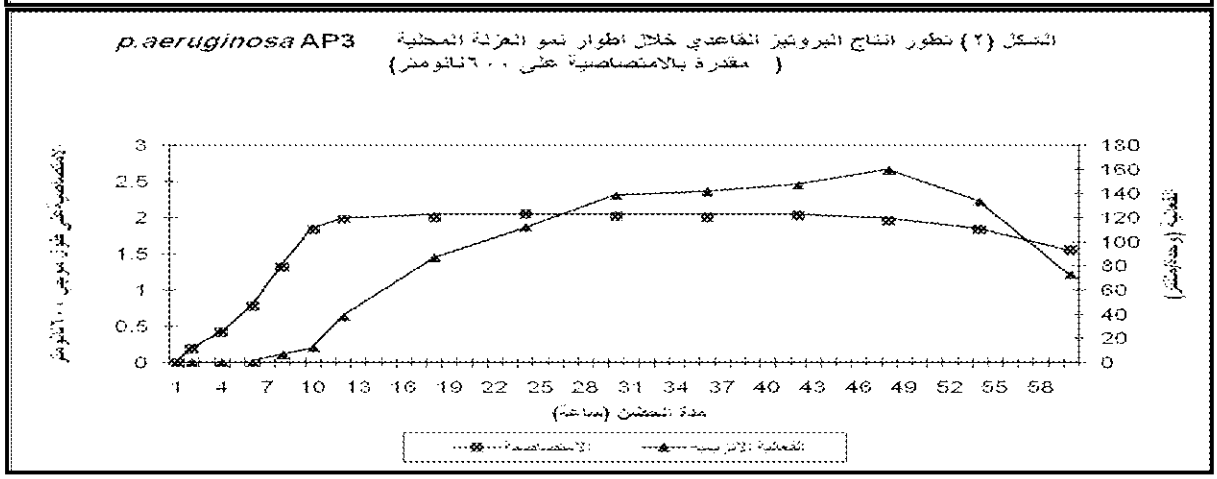
انتخبت العزلة المحلية AP3 *P.aeruginosa* المبينة بالصورة رقم (1) والمعزولة من الحروق كونها الأغزر انتاجاً للإنزيم مقارنة مع بقية العزلات باستخدام المزارع المغمورة وأعتمدت في الدراسة الحالية.

صورة (1) لنمو العزلة المنتخبة *p.aeruginosa* AP3 على وسط الحليب الفرز



تم متابعة منحنى نمو العزلة المحلية قيد الدراسة في الوسط الانتاجي المذكور سابقا وبرقم هيدروجيني 8 ودرجة حرارة 37م لمدة 60 ساعة لمعرفة اطوار النمو ووقت بدء انتاج انزيم البروتيز القاعدي خلال هذه المدة وتمت متابعة اطوار النمو عن طريق العد الحي للخلايا وقياس الامتصاصية على الطول الموجي 600 نانومتر.





حددت النتائج الموضحة في الشكل (1) والذي يبين العلاقة بين الانتاج واطوار النمو مقدرة بالعد الحي والشكل (2) الذي يبين ذات العلاقة مقدرة بالامتصاصية على طول موجي 600 نانومتر ان العزلة المحلية المنتخبة تدخل في طور الثبوت Stationary Phase بعد مرور 10 ساعة كما لوحظ ان بدء انتاج انزيم البروتيز القاعدي في راشح المزرعة بعد مرور 8 ساعة من تلقيح الوسط الزرعي حيث بلغت الفعالية الانزيمية 6.4 وحدة/مللتر واستمرت بالزيادة التدريجية حتى وصلت اقصاها بعد مرور 48 ساعة اذ بلغت 159.2 وحدة/مللتر، كما لوحظ ان العزلة المحلية قيد الدراسة تدخل طور الانحدار Decline Phase بعد هذا الزمن ولكن الفعالية الانزيمية تبقى في مستويات عالية نسبيا اذ كانت الفعالية الانزيمية 133.4 وحدة/مللتر في الساعة 54.

وتبين هذه الدراسة ان التعبير عن انتاج البروتيز القاعدي يبدا بالطور اللوغارتمي Log Phase
ويزداد بشكل ملحوظ في المراحل المتاخرة للطور اللوغارتمي و طور الثبوت ويعد اطالة طور الثبوت من النقاط الرئيسية لزيادة انتاج الانزيم .

اشارت العديد من الادبيات العلمية الى ان انتاج البروتيز يحصل في نهاية الطور اللوغارتمي وبداية طور الثبوت اذ اشار Oreilly and Day,(1983) الى ان انتاج انزيم البروتيز يحصل في نهاية الطور اللوغارتمي وبداية طور الثبوت ويبقى الانزيم فعالا في وسط الانتاج لمدة لا تقل عن 12 ساعة من دخول طور الثبوت، وهذا ما اكدته العديد من الدراسات ان الانزيمات خارج خلوية تنتج في بداية طور الركود Cheung et al., 1994; shaw et al., (2004)

وفي دراسة اخرى اشار Horsburhg et al., (2002) الى ان استنساخ الجينات المسؤلة عن انتاج البروتيزات تحدث بصورة رئيسة في المدة مابعد الطور الوغارتمي، و يسيطر الجين las R على تحفيز عملية إنتاج عوامل الضراوة من خلال دوره في عملية استنساخ جين الايلاستيز las B والبروتيز las A وجين tox A (Gambello et al.,1993).

المصادر

- Al- Shhri, M.A. and Mostafa, S.Y. (2004). Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. J. Biol. Sci. 7 (9) : 1631-1635.
- Chen, G.; Edwards, T. L.; Ysouza, V. M. and Holz, R. C. (1997). Mechanistic studies on the aminopeptidase from Aeromonas proteolytic . Biochemistry. 6(14): 4278-4286.

- Cheung AL.; Eberhardt KJ.; Chung E, et al. (1994). Diminished Virulence of sar – agr – mutant of staphylococcus aureus in the rabbit model of endocarditis. J. Clin Invest, 94: 1815-1822.
- Collee, J.G.; Marmion, B.P.; Fraser, A.G. and Simmons, A. (1996). Mackie and McCartne Practical Medical Microbiology.14th ed. Churchill Livingstone.
- Gambello, M.J.; Kaye, S. and Laglewski, B.H.(1993). Las R of *P.aeruginosa* is a transcriptional activators of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression. Infect. Immun. 61: 1180-1184.
- Greenwood, D. ; Finch, R. ; Davey, P. and Wilcox, M.(2007). Antimicrobial chemotherapy. Oxford University Press, NewYork.
- Holt, J.G.; Kreig, N.R.; Sheath, P.H.A.; Staley, T.T. and Williams, S.T.(1994). Bergey's manual of determinative bacteriology.9th ed.Williams and Wilkns, USA.
- Hoursburgh, M.; Aish, J.; White, I.; Shaw, L.l Lithgow, J. & Foster, S. (2002). Sigma B modulates virulence determinant expression and stress resistance: Characterization of a functional rsb V strain derived from Staphylococcus aureus 8325-4. J Bacterial 184, 5457-5467.
- Ikram-ul-Hag; Mukhtar, H.; Ali, Z. and Riaz, N. (2004). Protease biosynthesis by mutant strain of *Penicillium griseoroseum* and cheese formation. J. Biologic. Sci. 7(9): 1473-1476.
- Kadurugamuwa, J.L. and Beveridge, T.J. (1995). Virulence factors released from *P.aeruginosa* in associated with member vesicles during normal growth and exposure gentamicin novel mechanism of enzyme Secretion. J. Bacteriology. 14: 3998-4008.
- Kalaiarasi K. and Sunitha P.U. (2009). Optimization of alkaline protease production from Pseudomonas fluorescens isolated from meat waste contaminated soil. African J. of Biotechnology.8:7035-7041.
- Kernacki, K.A.; Hobden, J.A.; Hazlett, L.D.; Fridman, R. and Berk, R.S.(1995). In vivo bacterial protease production during *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. Invest Ophthalmol Vis. Sci. 36: 1371-1378.
- Lang AB, Horn MP, Imboden MA, Zuercher AW. Prophylaxis and therapy of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. Vaccine. 2004; 22:S44-S48.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 –275.
- McDonald, C.E. and chen, L.L. (1995). Lowry modification of the Folin reagent for determination of proteinase activity. Ann. Biochem. 10: 175.
- Oreilly ,T. and Day, D.F. (1983). Effect of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophilia*. Appl. Environ. Microbiol. 45(3) : 1132-1135.
- Pollack, M. (2000). Principles and Practice of infectious diseases. 5th ed. Churchill Livingstone. New York.
- Sakata, K. ;Yajima, H. ;Tanka, K. ;Sakamoto, Y. ;Yamamoto, K. ;Yoshida, A. and Dohi, Y. (1993). Erythromycin Inhibits the production of Elastase by *Pseudomonas aeruginosa* with Affecting its proliferation In vitro. Am. Rev. Respire Dis. 148:1061-1065.
- Saleem, A. J. (2007). Biochemical study of alkaline protease produced from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients. M. Sc. thesis. College of Education for Pure Science. University of Diyala.
- Sleigh, J.D. and Timbury. M.C. (1998). Notes on Medical Bacteriology. 5th ed. Churchill Livingston. Singapore.

- Thomson, P.D. and Smith, D.H. (1994). What is infection. Am. J. Surg. 167(1A): 75-105.
- Todar, K. (2012). Todar's Online Textbook of Bacteriology. *Pseudomonas aeruginosa*. University of Wisconsin- Madison.
- Van Delden, C.; Pesci, E.C.; Pearson, J.P. and Iglewski, B.H. (1998). Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. Infect. Immun. 66:4478-4502.

Relationship study between the alkaline protease production and the growth phases of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients

Author: Ali Jaffar Saleem
Assistant Lecturer in College of Education for Pure Science - Diyala University

Summary

This study was conducted in Ba'quba general hospital and Al-Batul hospital during 1/12/2004 to 31/3/2005.Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* was investigated in 161 samples from different clinical sources included Swabs from wounds, burns, ear, eye and samples from Urine and sputum. Which were collected from patients.

Depending on the cultural and micro features and biochemical tests, 49 isolated items of this bacteria have been diagnosed and all the isolates showed the ability to produce alkaline protease enzyme by using skim milk agar medium through forming clear zone around the growing colonies.

The local isolate *P.aeruginosa* AP3 had been selected based on the higher productivity of enzyme comparing to other isolated and thus it was used in the current study.

The relationship between the production of alkaline protease enzyme and growth phases of *P.aeruginosa* was studied to determine the time of production of the enzyme . The results showed that the local isolate *P.aeruginosa* AP3 began the production of the enzyme in the later stages in the log phase and it was increased significantly in the stationary phase reaching the maximum after 48 hours (159.2 units/ml) in leaky farm and keep the enzyme was fully functional 'almost in the stationary phase.