تحفيز إنتاج المضادات الحيوية بوساطة عزلات محلية من جنس *Streptomyces* باستخدام مطفرات كيميائية وفيزيائية

محمد بشير إسماعيل قاسم صفاء إسماعيل العبيدي أروى شوكت ذنون

قسم علوم الحياة / كلية التربية

جامعة الموصل

الاستلام القبول

2013 / 09 / 29 2013 / 12 / 11

Abstract

Three local isolates of the genus *Streptomyces* were obtained from ten soil samples collected from different places of Niniva governorate. The isolates showed bioactivity against test Gram positive and negative bacteria and two Genera of fungi. *Streptomyces* isolates were identified according to microscopic and morphological tests. The *Streptomyces* isolates were subjected to ultra violet ray for different time periods. The treated isolates showed little increase in inhibition zone and treated period of (5) minutes showed the best inhibition of the test bacteria. The *Streptomyces* isolates treated with N – methyl – N – nitro – N – nitroso guaniction at the concentration of (50) μg/ml showed clear increase of antibiotic production. The isolate *Streptomyces* III showed clear inhibition against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* and the diameter inhibition zone was (20,29,20)mm respectively.

الخلاصة

تم الحصول على 3 عزلات محلية من جنس *Streptomyces* من 10 عينات تربة جمعت من مناطق مختلفة من محافظة نينوى، بيّنت العزلات نشاطاً حيوياً ضد انواع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة گرام وجنسين من الفطريات. شُخصت عزلات *Streptomyces* على أساس الاختبارات المايكروسكوبية والشكلية. عُرضت العزلات للأشعة فوق البنفسجية (UV) لفترات مختلفة من الوقت وبيّنت العزلات المعاملة زيادة طفيفة في منطقة التثبيط، وبيّنت فترة

التثبيط (5) دقائق أعلى تثبيط للبكتريا المختبرة. ان عزلات *Streptomyces* التي عوملت بـ N – methyl – N – nitro – N – nitrosoguanidine mutagen (NTG) بتركيز (50) مايكروغرام/مل بيّنت زيادة واضحة بإنتاج المضادات الحيوية. بيّنت العزلة *Streptomyces* III تثبيط واضح ضد *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* وكان قطر منطقة التثبيط (20،29،20) على التوالي.

المقدمة

الاكتينوماسيتات (Actinomycetes) بكتريا خيطية بدائية النواة، تنتشر انتشاراً واسعاً في مختلف البيئات الطبيعية وتحت اقسى الظروف غير الملائمة في الكهوف والغابات البدائية والبحيرات وغيرها من البيئات [1]، وتلعب الاكتينوماسيتات الدور الكبير في انتاج المركبات ذات النشاط الاحيائي التضادي [2] وان المصدر الرئيسي لإنتاج هذه المركبات يعود إلى جنس *Streptomyces* إذ يعد الجنس المسؤول عن إنتاج ما يقرب من (60%) من المضادات الحيوية المعروفة [3]. الاكتينوماسيتات تنتج انواعاً مختلفة من المضادات الحيوية منها الامينوكلايكوسايدات والبولينات والتتراسايكلينات والبيبتايدات [4].

الطفرات تعني التغيير الدائمي في نيكلوتيد واحد "الوحدة البنائية للمادة الوراثية" أو أكثر في مواقع خاصة على طول شريط الـ DNA والطفرات قد تكون طبيعية أو مستحثة. والمستحثة تكون بفعل مطفرات فيزيائية أو كيميائية. فالمطفرات الفيزيائية (Physical mutagens) التي تشمل الاشعاع مثل الاشعة فوق البنفسجية ((Ultra violate (UV) التي تمتص من قبل جزيئات الـ DNA محفزة بذلك ارتباط قاعدتي الثايمين المتجاورة على نفس الشريط وبذلك يفقد الـ DNA القدرة على اضافة الادنين في جزيئة (mRNA) المسؤول على تكوين البروتين اضافة إلى دور الـ UV في كسر جزيئة الـ DNA [5]. أما المطفرات الكيميائية (Chemical mutagens) هي مواد كيميائية تغير في صفات جزيئة الـ DNA عندما تحل محل القواعد الطبيعية أو تضيف مجاميع اشباه القواعد النتروجينية أو تبدل المجاميع المرتبطة بالقواعد [6].

ومن المطفرات الكيميائية القوية المطفر N – methyl – N – nitro – N – nitrosoguanidine (NTG) وهو مطفر قوي بشكل استثنائي يتفاعل مع الـ DNA بالألكلة [7]. وأصبح تحسين السلالات البكتيرية الخيطية للحصول على الزيادة في المواد الايضية الثانوية (كالمضادات الحيوية) سمة اساسية في تفاعلات التخمر التجارية [2].

يهدف البحث الحالي عزل وتشخيص ودراسة الفعالية المضادة للجراثيم الممرضة لبعض عزلات *Streptomyces* المعزولة من ترب مناطق محلية من محافظة نينوى مع محاولة دراسة تأثير المطفر الفيزيائي UV والمطفر الكيميائي (NTG) على زيادة انتاج المضادات الحيوية من قبل ثلاثة أنواع من هذا الجنس.

مواد وطرق البحث

جمع العينات

جمعت 10 عينة ترب لعزل البكتريا الخيطية (*Streptomyces*) من انحاء ومناطق مختلفة من محافظة نينوى، وتضمنت ترب حدائق منزلية وحدائق جامعة الموصل والترب المحيطة بجذور نباتات مختلفة وعلى عمق (5 – 15) سم بعد ازالة (3) سم من سطح التربة، جففت العينات بعد معاملة التربة بمادة كاربونات الكالسيوم ($CaCO_3$) بنسبة (1:10) وتجفيفها (40 – 45)° سيليزية لمدة (4) ايام. وضعت بعدها في اكياس بولي اثيلين معقمة واغلقت بإحكام ثم وضعت في الثلاجة لحين الاستخدام. اخذ (1) غم من التربة ووضع في 10 مل من الماء المقطر والمعقم ومزج بشكل جيد وحضر منها سلسلة من التخافيف العشرية إلى حد التخفيف السادس واخذ (1) مل من التخفيف الاخير ووضع في طبق بتري معقم وصب عليه الاوساط الزرعية المعقمة والمبرد إلى (45)° سيليزية وبواقع ثلاث مكررات لكل عينة وتم اختيار الاطباق التي ظهرت فيها (20 – 200) مستعمرة واختيرت عدد من المستعمرات المفردة.

الأوساط الزرعية

- **وسط نشا – كازائين (Starch – Casien medium)**

حضر بإذابة (غم / لتر): (10) نشا، (0.3) كازائين، (2) KNO_3، (2) NaCl، (0.02) $CaCO_3$، (2) KH_2PO_4، (0.05) $MgSO_4.7H_2O$، (0.01) $FeSO_4.7H_2O$، (18) اكار في لتر ماء مقطر وضبط الاس الهيدروجيني عند (7.2) وعقم بالمعقام (Autoclave) [8]. استخدم هذا الوسط في العزل.

- **وسط اكار مستخلص الخميرة والكليسيرول**

(Glycerol yeast extract agar medium)

حضر بإذابة (غم/لتر): (5) كليسيرول، (2) مستخلص الخميرة، (0.1) K_2HPO_4، (25) بيبتون، (15) غم اكار في لتر ماء مقطر عقم الوسط بجهاز المعقام عند درجة حرارة (121) سيليزية وتحت ضغط (15) باوند/انج مربع لمدة (15) دقيقة واضيف للوسط المضاد الحيوي (Nystatin) بتركيز (50) مايكروغرام/ مل بعد ان برد إلى درجة حرارة (40)° سيليزية [9]. استخدمت نفس ظروف التعقيم المذكورة لتعقيم جميع الاوساط المستخدمة في هذا البحث. استخدم هذا الوسط في العزل.

- **وسط اكار الاسباراجين والكليسيرول (Glycerol asparagine agar medium)**

حضر بإذابة (غم / لتر): (1) اسباراجين، (10) كليسيرول، (1) K_2HPO_4، (20) غم اكار، (1) مل من محلول الاملاح الضئيلة (Trace salts

(solution)(0.64) $CuSO_4.5H_2O$، (0.11) $FeSO_4.7H_2O$، (0.79) $MnCl_2.4H_2O$، (0.15) $ZnSO_4.7H_2O$ في لتر ماء مقطر ضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.4) وعقم بالمعقام [6]. استخدم هذا الوسط في العزل. استخدم هذا الوسط في العزل.

❖ **وسط الاكار المغذي (Nutrient agar medium)**

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة (Oxiod) بإذابة (23) غم من الاكار المغذي في (1) لتر ماء مقطر وضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.2) وعقم بالمعقام. استخدم هذا الوسط للفعالية الضدية.

❖ **وسط اكار الكلوكوز ومستخلص الخميرة والتربتون**

(Trypton – yeast extract glucose agar medium)

حضر بإذابة (غم/لتر): (10) كلوكوز، (3) مستخلص الخميرة، (5) تربتون، (1) K_2HPO_4، (1) KH_2PO_4، (20) اكار في لتر ماء مقطر وعقم بالمعقام [10]. استخدم هذا الوسط في التشخيص.

❖ **وسط اكار الاملاح المعدنية والنشا (Starch mineral salts medium)**

حضر بإذابة (غم / لتر): (10) نشا، (2) $(NH_4)_2SO_4$، (2) $CaCO_3$، (1) K_2HPO_4، (1) NaCl، (20) اكار في لتر ماء مقطر وضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.0) وعقم بالمعقام [10] . استخدم هذا الوسط في العزل.

❖ **وسط اكار زابك – دوكس (Czapic – Dox agar medium)**

حضر بإذابة (غم / لتر): (30) سكروز، (3) $NaNO_3$، (1) K_2HPO_4 (0.5)، $MgSO_4.7H_2O$، (0.5) KCl، (0.01) $FeSO_4$، (15) اكار في لتر ماء مقطر وضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.3) وعقم بالمعقام [7]. استخدم هذا الوسط في العزل. استخدم هذا الوسط في العزل.

❖ **وسط إنتاج المضادات الحيوية (Antibiotics production medium)**

حضر وسط انتاج المضادات الحيوية المحور بإذابة (غم/لتر): (0.8) NaCl، (1) NH_4Cl، (0.1) K_2HPO_4، (0.1) $MgSO_4.7H_2O$، (0.04) $CaCl_2$، (10) كلوكوز، (3.0) مستخلص الخميرة في لتر ماء مقطر وضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.3) وعقم بالمعقام [11].

العزل

تشخيص عزلات *Streptomyces*

شخصت العزلات التي شك انها تابعة لجنس *Streptomyces* اعتماداً على لون وشكل المستعمرات على وسط اكار الاملاح المعدنية والنشا وشكل الغزل الهوائي والارضي وترتيب سلاسل السبورات باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية (Slid culture technique) [6، 12].

بكتريا الاختبار

استخدمت البكتريا *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aurous*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus vulgaris*، *Enterobacter aerogene*، *Candida albicans* و *Asperigillus niger*. التي تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة الموصل لغرض تحديد الفعالية التضادية لعزلات *Streptomyces* المعزولة.

اختبار الفعالية التضادية لعزلات *Streptomyces*

لغرض اختبار قابلية عزلات *Streptomyces* لإنتاج المضادات الحيوية تم استخدام طريقة الانتشار بواسطة اقراص الاكار (Agar discs diffusion method) [13].

تحضير اللقاح

حضر وسط اللقاح من مكونات وسط الإنتاج نفسها. ووزع في دوارق زجاجية مخروطية سعة (250) مل بواقع (50) مل لكل دورق عُقم ثم لُقح بنقل جزء (حملة لوب) من مزرعة بكتريا *Streptomyces* النامية على وسط اكار الاسبراجين والكليسيرول ثم وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند $(28 \pm 1)^{\circ}$ سيليزية وبسرعة رج (140) دورة/ دقيقة لمدة (3) ايام.

الظروف الزرعية

حضر وسط انتاج المضادات الحيوية في دوارق زجاجية مخروطية سعة (250) مل بواقع (50) مل لكل دورق، سدت الدوارق بإحكام ثم عُقمت بجهاز المعقام، تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت باللقاح المحضر للعزلة المنتخبة بعمر ثلاثة ايام وبنسبة (2%) حجم/حجم وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند $(28 \pm 1)^{\circ}$ سيليزية وبسرعة رج (140) دورة/ دقيقة لمدة (7) ايام.

استخلاص المضاد الحيوي للعزلة المنتخبة ودراسة فعاليته البايولوجية

تمت عملية استخلاص المضاد الحيوي محلول ايثايل استيت وحسب طريقة Sahin و Ugur [4] و Ilic وآخرون [11] ولغرض دراسة الفعالية البايولوجية للمادة المستخلصة تم

استخدام طريقة الانتشار بالأقراص حيث حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatmann No. 1) بقطر (6) سم وغمرت بالمادة المستخلصة المذابة في الميثانول ثم جففت في الهواء ووضعت في اطباق حاوية على وسط الاكار المغذي والملقح ببكتريا (*S. aureus*) حُضنت الاطباق عند (37 ± 1)° سيليزية لمدة (24) ساعة وتم قياس المنطقة الخالية من النمو للبكتريا المختبرة.

التطفير بوساطة الأشعة فوق البنفسجية (Ultra Violate Mutagens)

تم تلقيح (9) مل من وسط نشا – كازائين بالبكتريا الخيطية *Streptomyces* وحضنت عند (28 ± 1)° سيليزية في الحاضنة الهزازة طراز (Gallenkamp, England) لمدة (96) ساعة، بعدها عُرض (3) مل من اللقاح للأشعة فوق البنفسجية (UV) (Campse M330 UK) عند طول موجي (254) نانوميتر ولفترات زمنية مختلفة (5 – 10 – 15 – 20) دقيقة بعدها غلفت بأوراق الألمنيوم لمنع الأملاح لجزيئة DNA، بعد ذلك اخذ (1) مل من الوسط المعرض للأشعاع والضيف إلى (9) مل من وسط الإنتاج وترك في الحاضنة الهزازة لمدة (96) ساعة عند (28 ± 1)° سيليزية رفعت الدوارق المخروطية من الحاضنة وعمل نبذ مركزي له عند سرعة (2000) دورة/ دقيقة ثم اختبرت قدرتها التضادية تجاه عدد من البكتريا والفطريات المختبرة [14].

التطفير بوساطة المطفر الكيميائي نايتروسوكوانيدين

N – methyl – N – nitro – N – nitrosoguandine mutagens

تم تلقيح (9) مل من وسط نشا – كازائين بالبكتريا الخيطية *Streptomyces* عند (28 ± 1)° سيليزية لمدة (96) ساعة، بعدها عمل نبذ مركزي للعينة عند 3000 دورة/ دقيقة لمدة (10) دقائق اهمل الراشح واخذ الراسب واضيف اليه 2 مل من محلول (Tween 20) المعقم (1%) واضيف له (50) مايكروغرام/ مل من (NTG) حضنت القناني الزجاجية عند (28 ± 1)° سيليزية لمدة (30) دقيقة، بعدها اخذ (1) مل من المعلق المعامل (NTG) بعد التخلص من بقايا (NTG) بوساطة الغسل عدة مرات بالماء المقطر المعقم واجراء النبذ المركزي ثم اضيف الراسب إلى (9) مل من وسط الإنتاج وترك في الحاضنة الهزازة عند (28 ± 1)° سيليزية لمدة (96) ساعة. ثم عمل نبذ مركزي عند (2000) دورة / دقيقة لمدة (20) دقيقة واختيرت فعاليتها المضادة تجاه عدد من البكتريا والفطريات المختبر[14].

النتائج والمناقشة

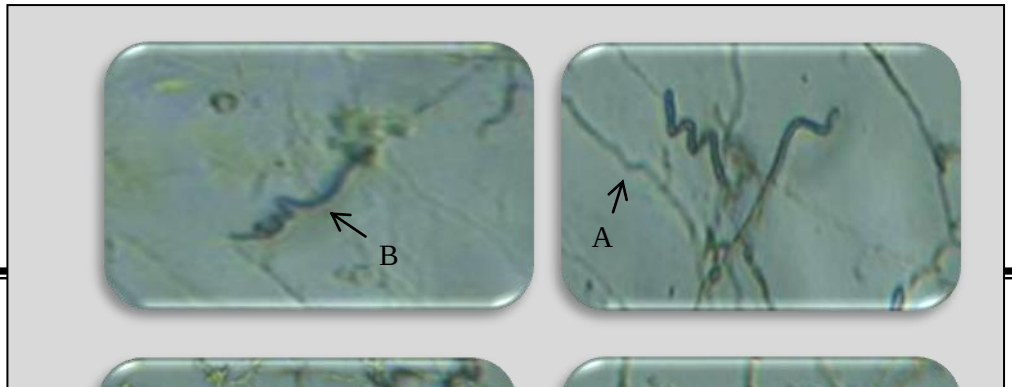
العزل

تم عزل 45 عزلة تابعة إلى جنس *Streptomyces* من (10) عينات ترب جمعت من انحاء ومناطق مختلفة من محافظة نينوى. تم التعرف على ثلاث عزلات اعتماداً على المظهر الطباشيري للمستعمرات النامية على اوساط العزل وانتاجها رائحة الأرض الرطبة [5، 15] باستخدام الاوساط الزرعية السابقة الذكر واظهر وسط نشا – كازائين افضل الاوساط لعزل البكتريا الخيطية.

بلغ معدل اعداد المستعمرات (1 – 28) مستعمرة/غم من التربة في حين بلغ معدلها في دراسة Saadoun وآخرون [16] (29.2) مستعمرة/غم وقد كان لمعاملة التربة بمادة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ نسبة (10:1) وتجفيفها (40 – 45)^{o} سيليزية لمدة اربعة ايام دور كبير في زيادة اعداد عزلات جنس *Streptomyces* في العزل الأولي ذلك ان تجفيف التربة يؤدي إلى اختزال أعداد البكتريا الخضرية من جهة وان إضافة كاربونات الكالسيوم تؤدي إلى رفع قيمة الاس الهيدروجيني الامر الذي يؤدي إلى تحديد نمو معظم الفطريات من جهة اخرى وبذلك تنمو البكتريا الخيطية [17].

التشخيص

شخصت العزلات التابعة إلى جنس *Streptomyces* باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية إذ تُعد هذه من افضل الطرق في التشخيص على مستوى الجنس لما لها من دور في اظهار ممثل الغزل الأرضي والهوائي والذي يميز الاجناس التابعة للبكتريا الخيطية عن بعضها البعض [12]. يتميز الغزل الأرضي للعزلات بكونه شديد التفرع وغير مقسم ولا يحمل سبورات، بينما ظهر الغزل الهوائي بشكل خيوط غامقة وأكثر سمكاً وأقل تفرعاً من الغزل الأرضي شكل (1). يحمل الغزل الهوائي سلسلة طويلة من السبورات المحاطة بغمد ليفي يسمى (Sporophore) وتأخذ اشكالاً مختلفة حسب ترتيب السبورات فأما ان تأخذ شكلاً مستقيماً (Rectus) أو حلزونياً (Spiral) أو مستقيماً ذات نهاية معقوفة (Retinaculum – Apertum) أو مستقيماً متموجاً (Rectus – Flexibilis) [16]. ويوضح جدول (1) تباين العزلات في الوان الغزل الهوائي عند تكرار زرعها وتنميتها على اوساط مختلفة وعدم قدرتها على انتاج صبغة الميلانين وصبغات اخرى وكان اللون الرصاصي هو السائد بين العزلات وتتفق هذه النتائج مع Saadoun وآخرون [16].



شكل (1): الغزل الأرضي والهوائي للعزلات التابعة لجنس *Streptomyces* بقوة تكبير X40
A. الغزل الأرضي B. الغزل الهوائي

جدول (1): يوضح الوان الغزل الهوائي للعزلات التابعة إلى جنس *Streptomyces* وقدرتها على إنتاج صبغة الميلانين وترتيب سلاسل السبورات في الغزل الهوائي.

الاختبارات	$S.sp_1$	$S.sp_2$	$S.sp_3$
صبغة گرام	+	+	+
لون الغزل الهوائي	رصاصي	رصاصي ابيض	ابيض
شكل سلسلة الأبواغ	حلزوني	حلزوني	مستقيم متموج
انتاج صبغة الميلانين على وسط Tyrosine Agar	–	–	–
انتاج صبغات اخرى	–	–	–

(–) نتيجة سالبة، (+) نتيجة موجبة

إنتاج المضادات الحيوية

اختبرت قدرة (45) عزلة من عزلات *Streptomyces* على إنتاج مضادات حيوية ضد بكتريا وفطريات الاختبار.

أظهرت ثلاث عزلات محلية من جنس الـ *Streptomyces* تأثير ضد جميع أنواع البكتريا والفطريات القيد البحث جدول (2)، واتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه السماك [19]. إذ أظهرت اغلب عزلات *Streptomyces* تأثيراً على الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة گرام وكان تأثيرها على الفطريات اكبر وذلك لكون جدرانها تحتوي على الكايتين وعملت العزلات على تحليله بسبب احتوائها على أنزيم الكايتينيز Chitinase [20].

جدول (2): يوضح انتاج المضادات الحيوية للعزلات الثلاثة المنتخبة بدلاله قطر منطقة التثبط.

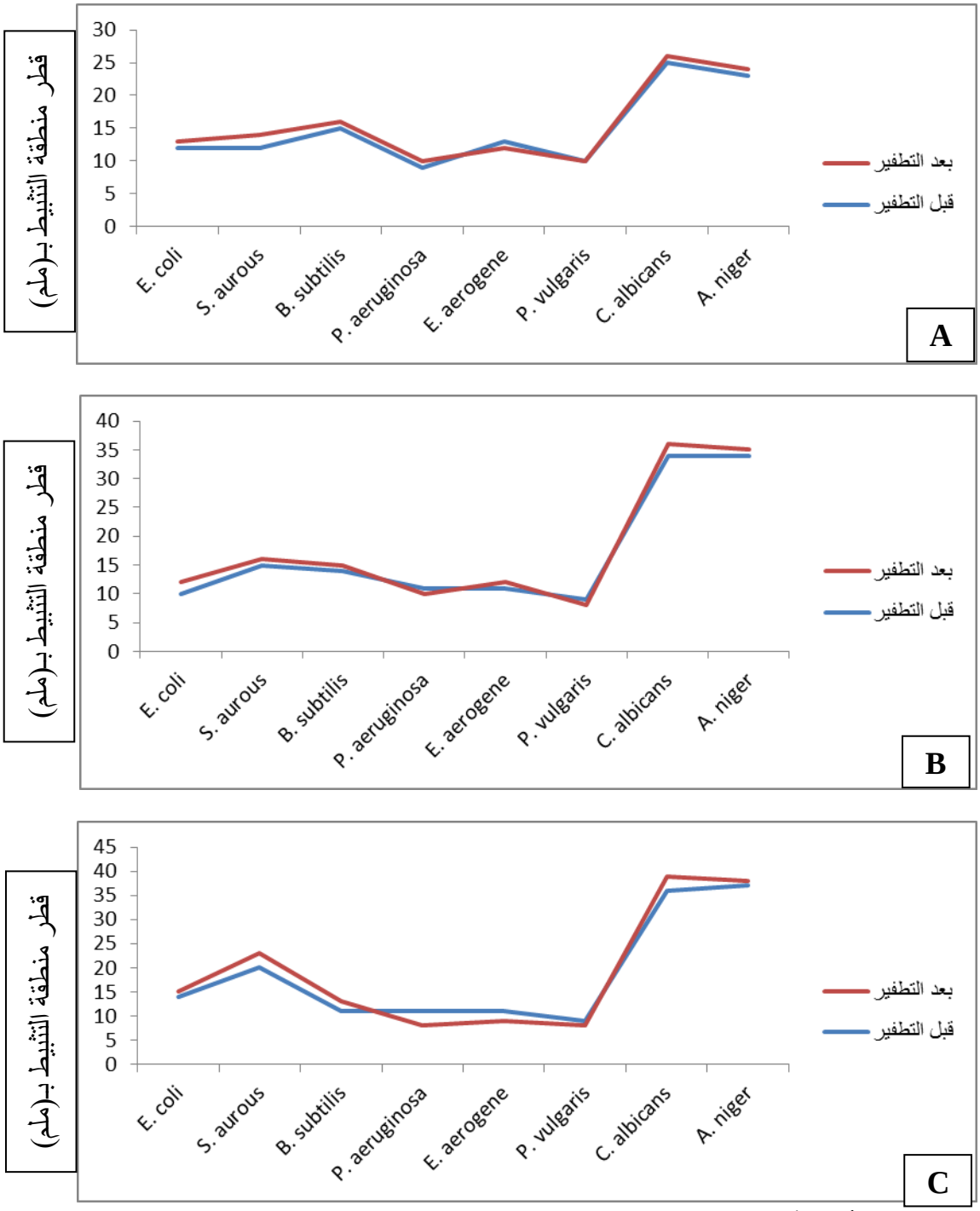
البكتريا المستخدمة / العزلات المنتخبة	*E. coli*	*S. aurous*	*B. subtilis*	*P. aeruginosa*	*E. aerogene*	*P. vulgaris*	*C. albicans*	*A. niger*
S. I	12	12	13	19	13	10	25	25
S. II	10	15	14	11	11	9	34	34
S. III	14	20	11	11	11	9	36	37

تأثير الأشعة فوق البنفسجية في انتاج المضادات الحيوية لعزلات الـ *Streptomyces* الثلاثة المنتخبة

اجريت هذه التجربة لبيان مدى تأثير الأشعة فوق البنفسجية (UV) على انتاج المضادات الحيوية من قبل العزلات الثلاثة المنتخبة شكل (2) أدى التطفير بوساطة (UV) إلى زيادة طفيفة في انتاج المضادات الحيوية لأنواع البكتريا المرضية والفطريات قيد الاختبار، إذ كانت الفترة (5) دقائق على بعد (30) سم اكثر الفترات تأثيراً على الإنتاجية (وهذا يعتمد على مقدار النمو للخلايا المعرضة مع زيادة فترة التعريض للأشعة). أظهرت العزلات المطفرة زيادة طفيفة بدلالة قطر منطقة التثبيط، بلغت ما بين (1 – 3) لأغلب انواع البكتريا والفطريات المرضية واظهرت العزلة *St.* III اعلى انتاجية للمضاد الحيوي (3) ملم بالنسبة *S. aurous* و خميرة *C. albicans*، ولوحظ نقصان في منطقة التثبيط ضد البكتريا *P. vulgaris* للعزلات الثلاثة المنتخبة، اضافة إلى حصول نقصان في منطقة التثبيط بالنسبة *P. aeruginosa* و *E. aerogene* بالنسبة للعزلة *St.* III.

وقد جاءت هذه النتائج مطابقة لما حصل عليه Siva Kumer وآخرون [14]، إذ اوضح ان استخدام الأشعة فوق البنفسجية لزيادة انتاجية المضادات الحيوية من البكتريا الخيطية المعزولة مناطق Westren Ghats في الهند. أدى إلى حصول زيادة طفيفة واحياناً نقصان في قطر منطقة التثبيط لأنواع خاصة من البكتريا، وبيّن السبب ربما يعود إلى الجين المسؤول عن فعالية انتاج المضادات الحيوية لتلك العزلات. فقد اشار Catherine وآخرون [21] ان الأشعة فوق البنفسجية تمتص من قبل البيورينات، والبريميدينات، وتؤدي إلى حدوث تغييرات في ترتيب وتعاقب القواعد النتروجينية وهذا ينعكس على تركيب المادة الوراثية مما يؤدي إلى حدوث الطفرة أو التغيير الذي يعبر عنه في تعبير جينات معينة لإنتاج مركبات خاصة [22]. وكانت النتائج التي تم الحصول عليها غير مطابقة لما حصل عليه Shafique وآخرون [23]، ان التأثير الرئيسي للأشعة فوق البنفسجية أو X – Ray أو بوساطة المواد الكيميائية كحامض النتروز وغيرها هو استحثاث أو تحوير في تسلسل القواعد الموجودة على جزيئة DNA [24]. وقد يحصل عند المعاملة بالمطفر الفيزيائي أو الكيميائي نظام إصلاح لجزيئة DNA في الخلايا

المعاملة يعرف بالاستجابة التكيفية (Adaptive respone) مما يؤدي إلى عدم حصول زيادة في الإنتاج.



شكل (2): تأثير الأشعة فوق البنفسجية في انتاج المضادات الحيوية لعزلات الـ *Streptomyces* الثلاثة المنتخبة *St.* I .A *St.* II .B *St.* III .C.

تأثير المطفر الكيميائي(NTG) N – methyl – N – nitro – N – nitrosoguanidine على إنتاج المضادات الحيوية من قبل عزلات *St.* I, *St.* II, *St.* III

لغرض معرفة تأثير الكيميائي (NTG) في زيادة انتاج المضادات الحيوية من قبل العزلات الثلاثة قيد الدراسة، فقد عوملت عزلات بكتريا *Streptomyces* بالمطفر (NTG) بتركيز (50) مايكروغرام/مل لأوقات زمنية مختلفة (30، 60، 90) دقيقة فقد وجد ان العزلات البكتيرية (*St.*I، *St.* II، *St.* III) اعطت أفضل نتائج بعد معاملتها بالمطفر (NTG).

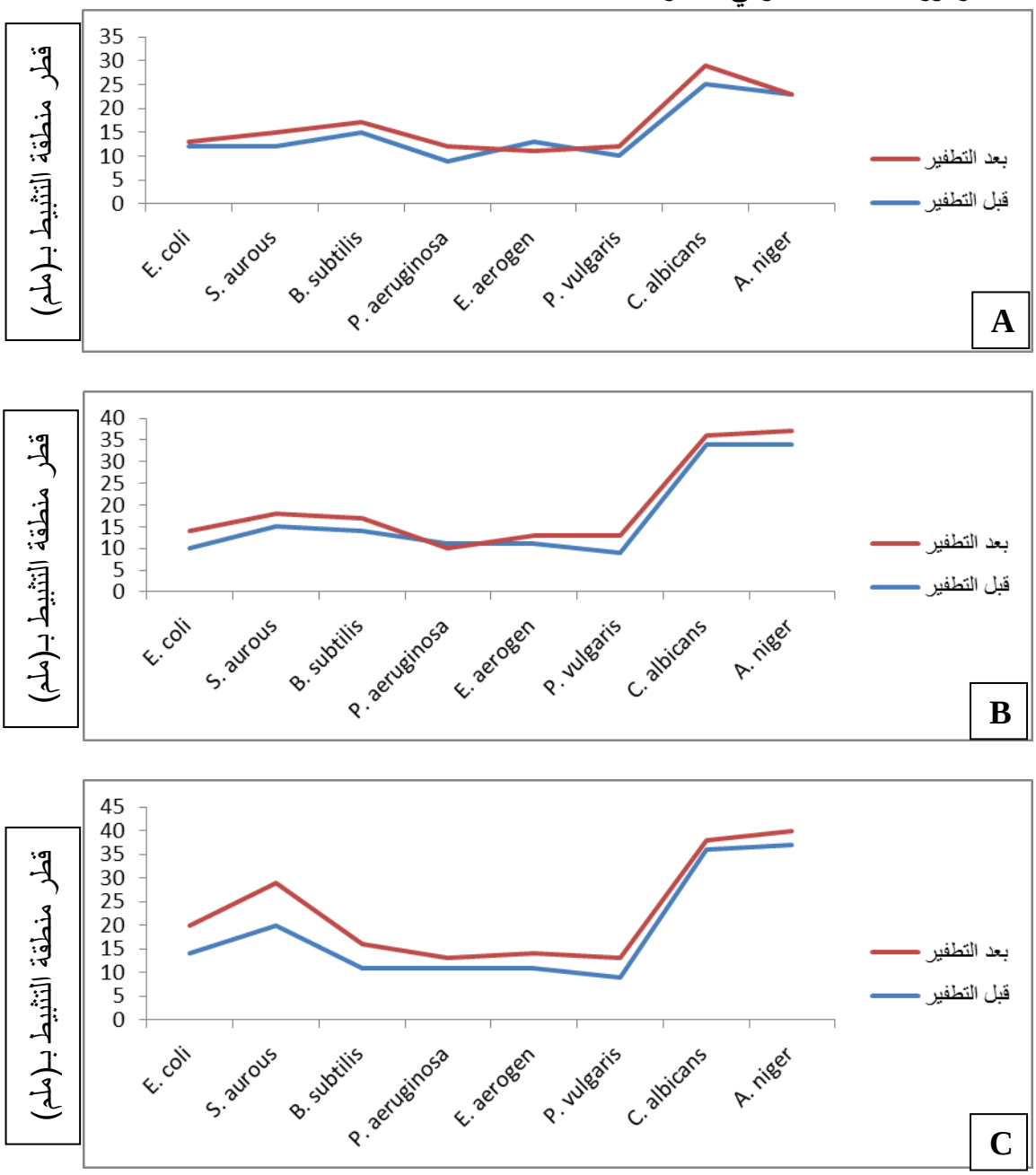
توضح النتائج ان المطفر (NTG) ادى إلى زيادة في انتاج المضادات الحيوية من قبل العزلات الثلاثة ولكافة الأوقات، إذ كانت الفترة الزمنية (30) دقيقة هي الأعلى تأثيراً في زيادة الإنتاجية للمضادات الحيوية مقارنة مع بقية الأوقات (الشكل 3) اظهرت العزلات قيد الدراسة اختلاف في منطقة التثبيط بدلالة قطر منطقة التثبيط ضد الكائنات البكتيرية والفطرية المختبرة، وعند مقارنة عزلات السيطرة الثلاثة (*St.* I، *St.* II، *St.* III) مع العزلات المطفرة اظهرت العزلة (*St.* I) زيادة في منطقة التثبيط (1) ملم، (3) ملم، (2) ملم، (3) ملم، (2) ملم ضد كلاً من *E. coli* و *S. aurous* و *B. subtilis* و *P. aeruginosa* و *P. vulgaris* في حين كان هناك نقصان في *E. aerogen* بلغ (2) ملم، وزيادة ضد الخميرة *C. albicans* بلغ (4) ملم ولم يحدث اي تغيير في الفطر *A. niger*. في حين اظهرت العزلة (*St.* II) زيادة في انتاج المضاد الحيوي بدلالة قطر منطقة التثبيط، إذ كانت (4) ملم *E. coli* و (3) ملم *S. aurous* و (3) ملم *B. subtilis* و (4) ملم *P. vulgaris* و (3) ملم *E. aerogen* وكان هناك نقصان ضد *P. aeruginosa* (1) ملم، اما بالنسبة للفطرين *C. albicans* و *A. niger* فقد كان قطر منطقة التثبيط (4) ملم و (3) ملم لكل منهما على التوالي. وكذلك أظهرت نتائج العزلة الثالثة (*St.* III) وجود زيادة ملحوظة بدلالة قطر منطقة التثبيط ضد كلاً من البكتريا *E. coli* (6) ملم و (9) ملم *S. aurous* و (9) ملم *B. subtilis* و (3) ملم *P. vulgaris* و (3) ملم *E. aerogen* و (3) ملم *P. aeruginosa*. كذلك بالنسبة للفطرين *C. albicans* و *A. niger* فقد كان هناك زيادة في الإنتاجية بلغت (2) ملم و (3) ملم لكل منها على التوالي.

واشار Schendel و Robins [25] إلى انه عند تعريض الخلايا إلى عامل الالكيلي مثل (NTG) فانه يسبب اضراراً في جزيئة الـ DNA يسبب تكوين O^6– methylguanine و O^6– methylthimine ويؤدي إلى حدوث طفرات بسبب قدرتها على الازدواج بالقواعد النتروجينية خلال التضاعف.

ومن النتائج السابقة التي تم الحصول عليها يتضح ان المدة (30) دقيقة هي الاكثر تأثيراً على انتاج المضادات الحيوية مقارنة بالفترة الزمنية (90) دقيقة ولا سيما العزلة *St.* II. وقد جاءت هذه النتيجة مطابقة لما حصل عليه Braibant وآخرون [26] إذ اشار إلى انه عند تعريض الخلايا إلى المطفر ((Ethyl Methyl Suphonate(EMS) لمدة (30) دقيقة كافية لزيادة المركبات الايضية الثانوية انزيم السليلوليز في الفطر (*Trichoderma viride*)، في حين كانت هذه النتائج مخالفة لما حصل عليه الصوفي [27] إذ كانت الفترة الزمنية (180، 90) دقيقة هي الأكثر تأثيراً في إنتاج المضادات الحيوية من قبل بكتريا (*Streptomyces lydicus*) المعاملة بالمطفر (NTG) ضد الفطرين (*Macrophomina phaseolina*) و (*Fusarium solani*).

ان الية عمل هذا المطفر هي قدرته على الألكلة القاعدة النتروجينية الكوانين منتجاً بذلك قاعدة مؤلكلة وهذه بدورها يمكن ان تزدوج مع الثايمين بدلاً من السايتوسين فتتولد طفرة من نوع

طفرات الانتقال وذلك لارتباط الثايمين مع الادنين في التضاعف اللاحق، واحتمال ان يصيب (NTG) هذه المورثات بشكل قليل أي ان هذه المورثات واقعة على الكروموسوم وليس على عناصر وراثية تضاعفية (بلازميدات) إذ لو كانت هذه المورثات واقعة على البلازميدات فان الإنتاجية ممكن ان تكون عالية وهذا ما حدث فعلاً في العزلتين (*St.* I و *St.* II)، في حين ان العزلة (*St.* III) كانت اكثر استجابة للمطفر (NTG) وقد يكون السبب ان المورثات واقعة على عناصر وراثية تضاعفية وهي البلازميدات.



شكل (3): تأثير المطفر الكيميائي(NTG) على انتاج المضادات الحيوية من قبل عزلات تعود إلى جنس *Streptomyces* (*St.* I, *St.* II, *St.* III).

.*St.* III .C *St.* II .B *St.* I .A

References

[1] Debananda, S. N.; Suchitra, S. and Salam, N. (2009). American Journal of Biochemistry and Biotechnology 5 (4): 221 – 225.

[2] Sanglier, J. J.; Wellington, E. M. H.; Behal, V.; Feidler, H. P.; Ghrobel, R. E.; Finance, C.; Hacene, M.; Kamoun, A.; Kelly, C.; Mercer, D. K.; Prinzis, S. and Tringo, C. (1993). Res. Microbiol. 144: 661 – 663.

[3] Brun, Y. V. and Skimkets, L. D. (2000). A. S. M press, P. 11 – 31.

[4] Sahin, N. and Ugur, A. (2003). Turk. J. Biol. 27: 79 – 84.

[5] Carpenter, P. L. (1977). Microbiology. 4th ed. W. B. Saunders Comp.; U. S. A.

[6] Williams, S. T. and Cross, T. (1971). In Method in Microbiology. Vol. 4 Booth, C. pp295.

[7] Lennette, E. H.; Balows, A.; Hausler, W. J. and Shadomy, H. J. (1985). Washington, USA.

[8] Kuster, E. and Williams, S. T. Nature. 202: 928 – 929.

[9] Oskay, M.; Tamer, U. and Azeri, C. (2004). Afr. J. Biotechnol. 3: 221 – 446.

[10] Wu, R. Y. and Chen, M. H. (1995). Bot. Bull. Acad Sin., 36: 201 – 205.

[11] Ilic, S. B.; Konstantinovic, S. S. and Todorovic, Z. B. (2005). Series: Medicine and Biology, 12: 44 – 46.

[12] Holt, J. G.; Kreig, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and Williams, S. T. Bergey's (1994). Williams and Wilkins, Baltimore, U. S. A.

[13] Egorov, N. S. (1992). MIR Publishers, Moscow; 62–75 and 132–176.

[14] Siva Kumer, J.; Siva Kumer, T.; Santhanam, P. and Masilamaniselvam, M. (2010) Mid – East. J. Sci. Res.

[15] Alexander, M. (1977). John wiley and Sons.

[16] Saadoun, I.; Al – Momani, F.; Malkawi, H. and Mohammad, M. J. (1999). Microbios., 100: 41 – 46.

[17] نهر، حبيب صاحب؛ معروف، بهاء الدين و المحنة علي محسن نعمة. (1997). مجلة جامعة بابل/ العلوم الصرف والتطبيقية. 3: 201 – 208.

[18] Williams, S. T.; Goodfellow, M.; Wellington, E. M. H.; Vickers, J. C.; Alderson, G.; Sneath, P. H. A.; Sackin, M. J. and Mortimer, A. M. (1983). J. Gen. Microbiol. 129: 1815 – 1830.

[19] السماك، اسراء غانم حازم محمد (2006). أطروحة دكتوراه، كلية العلوم/ جامعة الموصل/ الموصل/ العراق.

[20] العبيدي، صفاء إسماعيل رشيد. (2012). أطروحة دكتوراه، كلية التربية/ جامعة الموصل/ العراق.

[21] Catherine, A.; Carson, P. H. D.; Huch, R.; Taylor, M. D. and Fra, C. (1994). Modern Medicine of Australia.

[22] كاظم، خالد خورشيد. (1991). دار الحكمة للطباعة والنشر، جامعة الموصل، العراق.

[23] Shafique, S. H.; Bajwa, R. and Shafique, S. O. (2011). Afr. J. Biotech. 10 (84): 19590 – 19597.

[24] Devehand, M. and Gwynne, D. I. (1991). J. Biotech. 17: 3 – 10.

[25] Schendel, P. F. and Robins, P. E. (1978). Proc. Nalt. Acad. Sci. 75(12): 6017 – 6020.

[26] Braibant, M.; Guilloteau, L. and Zygmunt, M. S. (2010). 46 (9): 3050 – 3053.

[27] الصوفي، اروى شوكت ذنون. (2012). رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.