تأثير بعض الظروف البيئية في نمو الفطر *Microsprum canis* المعزول من السعفة الحلقية في الإنسان وانتاجه لانزيم البروتيز المحلل للكيراتين

رباب عمران جواد كاظم الجنابي حيدر شخير الجنابي*

كلية العلوم- جامعة بابل

الخلاصة

تم عزل الفطر *Microsprum canis* من مريض يعاني من السعفة الحلقية (Tinea corporis) في الذراع وتشخيصه بالاعتماد على الصفات المظهرية المزرعية والمجهرية. أظهرت نتائج دراسة تأثير الظروف البيئة على نمو الفطر بان أفضل نمو كان في وسط سابرويد كلوكوز اكار (SGA) يليه وسط مايكوبايوتك اكار (MBA) ثم وسط اكار البطاطا والكلوكوز (PGA) بدرجة حرارة 25م ولمدة 14 يوم, وكانت درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر في 25م , إذ بلغ معدل النمو عندها 35.5 مليمتر في حين كان معدل النمو عند درجة حرارة 20 و30 م هو 33 مليمتر و 24.3 مليمتر على التوالي، في حين اصبح النمو ضعيفا جدا في درجة حرارة37 م في وسط سابرويد كلوكوز اكار ولمدة 14 يوم. وقد تناسب معدل نمو الفطر تناسباً طردياً مع مدة الحضانة وقد ازداد معنويا (0.05) طيلة مدة الحضانة ولغاية 14 يوم . إذ بلغ أعلى معدل لنمو الفطر في اليوم الرابع عشر هو 35.5 مليمتر، في حين كان معدل نمو الفطر في الأيام 5،و 7،و10 هو 19 و25 و32.8 ملمتر على التوالي.

تم دراسة تأثير الظروف البيئية على انتاج انزيم البروتيز المحلل للكيراتين وذلك باستعمال اربعة انواع من المواد البروتينية كمصدر وحيد للنتروجين لدراسة قابلية الفطر *M. canis* على انتاج انزيم البروتيز وهذه المصادر هي الشعر 2.6 غم/ لتر، والبيتون 2.6 غم/لتر، ونخالة الحنطة 2.6 غم/لتر، والكازئين 1%. واظهرت نتائج المسح ان الفطر *M. canis* له القابلية على انتاج انزيم البروتيز باستخدام المصادر النتروجينية الاربعة. أي ان الفطر ينتج انواعاً مختلفة من البروتيز. فكانت الفعالية الانزيمية عند استخدم البيتون كمصدر وحيد للنتروجين في وسط الانتاج هي 124 وحدة/مل في حين كانت الفعالية الانزيمية لكل من وسطي الشعر ونخالة الحنطة هي 20 و48.5 وحدة/مل على التوالي. اما فعالية انزيم باستخدام الكازئين بتركيز 1% فكانت 16 وحدة/مل. تم اختيار شعر الانسان كمصدر لبروتين الكيراتين لتحفيز الفطر على انتاج البروتيز المحلل للكيراتين , اذ استعمل بتراكيز مختلفة واظهرت النتائج بان 5,2غم/لتر من شعر الانسان افضل تركيز لانتاج الانزيم اذ بلغت الفعالية الانزيمية عند هذا التركيز 40 وحدة/مل. في حين كانت الفعالية الانزيمية 3 وحدة/مل عند التركيز 13 غم/لترمن شعر الانسان.ووجد أفضل رقم هيدروجيني لانتاج الانزيم من الفطر *M. canis* هو 9، اذ بلغت الفعالية الانزيمية عنده 12 وحدة/مل. كما لوحظ ان انتاج الانزيم يكون في اقصاه بين الرقم الهيدروجيني (8-10) مقارنة مع الرقم الهيدروجيني المتعادل الحامضي الذي تكون عنده الفعالية الانزيمية أقل ما يمكن. درس تأثير درجة الحرارة عن إنتاج إنزيم البروتيز المحلل للكيراتين من الفطر *M. canis* باستعمال مصدر وحيد للنتروجين هو الشعر 5.2 غم/لتر وبرقم هيدروجيني 9 ووجد ان افضل درجة حرارة لانتاج الانزيم هي 35م ، إذ بلغت عندها الفعالية الانزيمية 45 وحدة/ مل، في حين كانت درجة الحرارة 20 م عندها اقل فعالية انزيمية وهي 5 وحدة/مل. ومن دراسة تأثير عامل التهوية والمزج على انتاج البروتيز من الفطر *M. canis* , وجد ان التهوية غير المستمرة (أي الحضانة لمدة 5 أيام بدون تهوية ومزج وثم الحضانة مع التهوية والمزج لمدة 5 أيام اخرى كانت الأفضل في انتاج انزيم البروتيز مقارنة مع ظروف التهوية المستمرة وعدم التهوية. إذ بلغت الفعالية الانزيمية باستخدام التهوية غير المستمرة 49.5 وحدة/ مل في اليوم 9 من الحضانة في حين كانت الفعالية الانزيمية باستخدام التهوية المستمرة وعدم التهوية هي 9و 44 على التوالي في اليوم التاسع من الحضانة . كذلك اظهرت النتائج ان اليوم 9 من الحضانة هو الافضل في انتاج الانزيم.

Key word: *Microsprum canis*, Keratinolytic protease, environmental conditions, Iraq.

Abstract

Microsprum canis was isolated from the arm of patient suffering from Tinea corporis . The fungus was identified according to morphological (cultural and microbial) characteristics. The effects of environmental conditions on growth of the fungus were studied , the results showed *M.canis* appaered optimum growth on Sabourauds glucose agar (SGA) then Mycobiotic agar (MBA) and Potato glucose agar (PGA) at 25˚C for 14 days. The optimum temperature for fungus growth is 25˚C (35.5 mm on SGA agar plat for 14 days), whereas the fungus growth reached 33mm and 24mm on the same medium at 30˚C and 20˚C respectively and at the same incubation period. While the fungus had no

* **البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث**

ability to grow at 37˚C. The fungus growth appeared relationship with increasing incubation period up to 14 days. The growth reached 35.5mm at 14days,wherase the growth reached to 19, 25, 32.8 mm at 5, 7, 10 days respectivelly.
The effects of environmental conditions on keratinolytic protease production from *M.canis* were studied using four type of proteins as sole nitrogenous source in medium including 2.6 gm/L of human hair, 2.6 gm/L of pepton, 2.6 gm/L of wheat bran , 1% gm/L of casein , as a result the fungus appeared an ability to produce different types of proteases . The fungus appeared enzyme activity 124U/ml in pepton broth filtrate, whereas the protease activity reached to 20 and 48.5 U/ml in wheat bran filtrate and hair medium filtrate respectivelly.while the casein medium filtrate contain 16 U/ml of enzyme activity. The fungus was induced to produce keratinolytic protease in human hair medium at different hair concentrations , the results appeared that 5.2gm/ L of human hair was the best concentration to reach maximum enzyme production (40 U/ml), whereas the activity reduced to 3U/ml at 13 gm/ L human hair.
The optimum pH of maximum enzyme production is 9 in comparison with neutral and acid pH of production media. The effect of temperature on enzyme production was studied using 5.2 gm/L human hair medium at 9pH , the results appeared the optimum temperature for enzyme production (45U/ml) was 35˚C but at 20˚C the production was reduced and the activity reached to 5U/ml. The aeration and agitation of production media is effected on enzyme production from *M.canis* , the maxium production (49.5 U/ml) occurred with non continuously aeration (without aeration for five days after that aerated for five days) in comparison with continuously or non aerated . The maximum enzyme production reached after nin days of incubation period with non continuously aeration.

المقدمة

تعد الفطريات الجلدية الخيطية Dermatophytes من الفطريات القادرة على غزو الأنسجة الكيراتينية مثل الشعر والجلد واظافر الانسان والحيوان , والإصابة التي تحدثها هذه الفطريات تعرف ب Dermatophytoses.وتضم هذه المجموعة ثلاثة أجناس هي: *Trichophyton* , *Microsporum* , *Epidermophyton*, (Matsumato, 1996). يسبب الفطر *Microsporium canis* العامل الرئيسي للإصابات الجلدية في القطط والكلاب وينتقل للانسان,اذ تزداد نسبة الإصابة في الانسان في الدول الاوربية نتيجة التماس المباشر مع الحيوانات المصابة. إذ اصبح العامل السائد المسبب للسعفة الرأسية (Tinea capitis) في الدول الاوربية وأمريكا الجنوبية والشرق الأوسط , ومن الإصابات الجلدية التي يسببها هذا الفطر هي السعفة الحلقية (Tinea corporis) والسعفة الرأسية (Tinea capitis) والقرع (Tinea favosa) وسعفة الذقن (Tinea barbea) والأورام الحبيبية (Mycetoma) (Kwon-chung & Bennett, 1992). لوحظ في دراسة عن السعفة في البرازيل ان النوع *M. canis* هو العامل السائد المسبب للسعفة الحلقية وبلغت نسبته 70.5 % وبلغ النوع الملتهب Kerion الذي يحدثه النوع نفسه حوالي 44.4% (De Moraes *et al,* 2000). اما في مدينة بورتو البرتغالية فقد بلغت الاصابة بالسعفة التي يسببها النوع *M. canis* حوالي 22.7 % مقارنة مع الانواع الاخرى (Velho *et al.*, 2000). اما بالنسبة الى الاصابات الفطرية في العراق فقد لوحظ ان الجنسين *M. ferruginum* و *T. schoenleinii* هما المسؤولان عن السعفة الرأسية في الموصل (Yehia, 1980). ,ووجد ان نسبة الاصابة بالسعفة الراسية التي يسببها الفطر *M.canis* قد بلغت55.1 % في بغداد (Ali, 1990).

إن الفطريات الخيطية الجلدية (Dermatophytes) لها القدرة على غزو الأنسجة الكيراتينية للإنسان والحيوان كالجلد والشعر والأظافر، لامتلاكها إنزيمات خارجية تقوم بتحطيم مادة الكيراتين مثل البروتيز سيما الكيراتينيز (Samdani and Albetar, 2003). وتعد هذه الإنزيمات من العوامل المهمة التي تساهم في امراضية الكثير من الأحياء المجهرية (Simpanya and Baxter, 1996). لا تستطيع الفطريات الجلدية الخيطية مهاجمة الانسجة الحية تحت البشرة إلا في حالات نادرة مثل التقيحات (Abscesses) والأورام الحبيبية

(Mycetoma) التي تحدثها هذه الفطريات في الأنسجة العميقة . ويعود سبب عدم غزو هذه الفطريات للأنسجة العميقة هو انخفاض تركيز الحديد فيها وتنافس الفطريات على الحديد مع بروتينات المصل مثل الترانسفيرين (Transferrin) أو تنشيط المتمم الذي يؤدي الى تحديد نمو الفطريات الجلدية اومنعه في المرضى حتى لو كانوا يعانون من ضعف في الجهاز المناعي ، كما ان بعض الفطريات الخيطية الجلدية لا تستطيع احتمال درجة حرارة أعلى من 35م (Myrvik and Weiser, 1988). تختلف تفاعلات المضيف باختلاف مصدر الفطريات الخيطية الجلدية واختلاف النواتج الايضية للفطر وضراوة النوع أو السلالة والموضع التشريحي للإصابة والعوامل البيئية الموقعية ، إذ ءان السلالات أو الانواع ذات الاصل الحيواني Zoophilic تكون اشد ضراوة في الإصابة وإثارة للاستجابة المناعية والالتهابية مقارنة بالانواع ذات الاصل البشري Anthropophilic وهذا يلاحظ في السعفة الرأسية (Tinea capitis) التي يسببها الفطر *M. canis* (Weitzman and Summerbell, 1995) , وتفاعلات المضيف الناتجة من تحطيم الكيراتين واستجابة المضيف الالتهابية تشمل حكةً (Itchy) وتقشراً (Squamation) وأحيانا لطخاً التهابيةً (Inflammatory patches) في الجلد وفقدان الشعر (Ellis, 1994).

تنتج الفطريات الخيطية الجلدية العديدة من الإنزيمات مثل البروتيز والكيراتينيز والايلاستيز واللايبيز والفوسفولايبيز والاميليز وانزيم DNAase (Muhsin and Salih, 2001 ; Vlani *et al.*, 2001). إن لإنزيمات البروتيز دوراً مهماً في زيادة ضراوة الفطريات الجلدية و امراضها نتيجة لنموها على الطبقة المتقرنة مثل الجلد والشعر والأظافر لتزودها بمصادر الكاربون والنتروجين (Tsubio *et al.*, 1989). ينتج النوع *M. canis* عدة انواع من إنزيمات البروتيز. تقسم انزيمات البروتيز على اساس تركيب الموضع الفعال لها إلى بروتيز السيرين وبروتيز السيستاين وبروتيز الاسبارتك والبروتيز المعدني (Rao *et al.*, 1998) , وجميع هذه الانواع تساهم في امراضية عدد كبير من الأحياء المجهرية (Simpanya and Baxter, 1996). كذلك تقسم إنزيمات البروتيز حسب الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها الى حامضية وقاعدية ومتعادلة (Borris, 1987).

يؤثر العديد من العوامل في نمو الاحياء المجهرية وإنتاج انزيمات البروتيز مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي ومكونات الوسط الزرعي التي تشمل (مصادر الكاربون والنتروجين والاملاح) ومدة الحضن فضلاً عن التهوية وطريقة التخمر المتبعة سواء كانت تخمراً سطحياً ام غاطساً (Lee *et al.*,1987).

يهدف البحث الحالي دراسة الظروف البيئية المؤثرة في نمو الفطر و انتاج انزيم البروتيز المحلل للكيراتين المنتج من الفطر الممرض *M.canis* المسبب للسعفة الحلقية في الانسان في محافظة بابل.

المواد وطرائق العمل

1- عزل وتشخيص الفطر:

تم جمع العينات من المصابين بالسعفة المراجعين لوحدة الامراض الجلدية في مستشفى مرجان التعليمي في مدينة الحلة. اخذت العينات السريرية بمعاملة منطقة الاصابة بالكحول تركيزه 70% ثم اخذت حراشف صغيرة من حافة التقرحات الجلدية باستعمال شفرة جراحة معقمة. كذلك جمع الشعر المصابة بسحبه من الأصل باستعمال ملقط معقم (Kwon- chung and Bennett,1992). فحصت عينات الشعر والجلد بوضعها في قطرة من هيدروكسيد البوتاسيوم 10% على شريحة زجاجية نظيفة وهرست عينة الجلد جيداً باستعمال إبرة معقمة. ثم تسخن الشريحة بعد وضع غطاء الشريحة بامرارها قليلاً على لهب مصباح بنزين بعدها

تترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة ثم تفحص مجهرياً لملاحظة الغزل الفطري والتراكيب الفطرية الاخرى (Koneman *et al*., 1978).

تم تنمية الفطر المتواجد في عينات الجلد والشعر على وسط سابرويد كلوكوز اكار الصلب المحتوي على المضادات الحيوية الكلورامفينكول و السايكلو هكسمايد وحضنت الاطباق بدرجتين حرارية 25 و 28م لمدة حضانة 7-14 يوم. نقيت عزلة الفطر السريرية بطريقة التخطيط على وسط سابرويد كلوكوز اكار وحفظت العزلة المنقاة بدرجة حرارة 4 مْ بعد زرعها على مائل وسط سابرويد كلوكوز اكار و تم تجديد العزلة كل 14-30 يوم (Lee *et al.* 1987).

تم تشخيص الفطر بالاعتماد على الخصائص المظهرية , وتشمل شكل المستعمرة ولونها وقوامها (Koneman *et al*.;1979; Kwon-Chung and Bennett,1992) . كذلك الخصائص المجهرية التي تشمل وجود الكونيدات الكبيرة والصغيرة وشكلها وابعادها وعدد خلاياها. اذ تم نقل جزء صغير من المستعمرة الفطرية باستعمال ابرة معقمة الى قطرة من صبغة اللاكتو فينول على شريحة زجاجية نظيفة ثم وضع غطاء الشريحة وتم تثبت العينة بامرارها على لهب مصباح بنزين قليلاً ثم تفحص بالمجهر لملاحظة الصفات المجهرية للغزل الفطري.

2-تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *Microsprum canis*:

1- الوسط الغذائي:

تم تنمية الفطر على ثلاثة اوساط هي سابرويد كلوكوز اكار (SGA) ومايكوبايوتك اكار (MBA) و وسط اكار البطاطا والكلوكوز (PGA), وذلك باخذ قرص بقطر 10 مليلتر من حافة المستعمرة الفطرية بعمر 7-10 ايام ويوضع في مركز الوسط الغذائي الصلب. وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 مْ وقدر النمو بقياس قطرين متعامدين للمستعمرة الفطرية وحساب معدل النمو بعد مدة حضانة 14 يوم (Aubaid, 1997).

2- درجة الحرارة :

تم تقدير نمو الفطر بدرجات حرارية مختلفة (20, 25, 30, 35) م وذلك باخذ قرص بقطر 10 مليلتر من حافة المستعمرة الفطرية بعمر 7-10 أيام ويوضع في مركز الطبق المحتوي على الوسط SGA لمدة 14 يوم وباستعمال نفس الطريقة في تقدير معدل النمو ((Emyanitoff and Hashimoto, 1979.

3- مدة الحضانة:

تم تقد ير نمو الفطر بعد مدد حضانة مختلفة وذلك بنقل قرص بقطر 10 مليمتر من حافة المستعمرة الفطرية بعمر7-10 يوم الى مركز طبق بتري حاوي على وسط SGA و حضنت آلاطباق بدرجة حرارة ْ25م .قدر معدل النمو بنفس الطريقة السابقة بعد مدد حضانة 5-14 يوم(Emyanitoff and Hashimoto, 1979) .

4- تقدير فعالية انزيم البروتيز

اتبعت الطريقة Kunitz ((1947 المحورة من قبل (Sabramania and Kalnitsk , 1964) في تقدير فعالية البروتيز وتتلخص باضافة 0.1 مليلتر من الراشح الانزيمي الى 0.9 مليلتر من محلول الكازين 0.5% برقم هيدروجيني 8 . وحضن المزيج بدرجة حرارة37 مْ لمدة 20 دقيقة ثم اضيف 3 مل من محلول ثلاثي كلوروحامض الخليك 5% لايقاف التفاعل.

حضر محلول الكفئ (Blank) بالطريقة نفسها عدا اضافة محلول ثلاثي حامض الخليك (Trichloro acetic acid- TCA) الى محلول التفاعل قبل اضافة الانزيم. ثم نبذت المحاليل بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة

10 دقائق وبدرجة حرارة 4 مْ. وتم قياس امتصاص الضوء للمحلول الرائق(supernatant) بطول موجي 280 نانومتر باستعمال المطياف الضوئي Spectronic 21 وقدرت وحدات الفعالية الإنزيمية استنادا الى تعريف وحدة الفعالية التي هي كمية الانزيم التي تسبب زيادة بامتصاصية الضوء على الطول الموجي 280 نانومتر مقدارها 0.001 في الدقيقة تحت ظروف القياس. وتم حساب الفعالية النوعية التي هي عدد وحدات الفعالية الانزيمية لكل ملغرام بروتين.

5- تقدير تركيز البروتين:

تم تقدير تركيز البروتين بالطريقة الواردة من قبل (Whitaker and Granum,1980) , وذلك بترسيب البروتين من المستخلص الخام باضافة 3 مليلتر من محلول ثلاثي كلوروحامض الخليك 5% لكل 2 مليلتر من المستخلص ثم نبذ المحلول بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4م ,والتخلص من المحلول الرائق واذابة الراسب في 2 مليلتر من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني 9 وتم قياس امتصاص الضوء للمحلول بطول موجي 280 نانومتر و طول موجي 235 نانومتر، واستعمل المحلول الدارئ نفسه محلولاً كفئاً وتم حساب تركيز البروتين حسب المعادلة الاتية:-

$$\text{تركيز البروتين (ملغم / مل)} = \frac{\text{الامتصاصية على 235 نانومتر} - \text{الامتصاصية على 280 نانومتر}}{2.51}$$

6 - تأثير بعض العوامل في إنتاج إنزيم البروتيز

أجريت دراسة تأثير بعض العوامل وهي الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة و المصدر النتروجيني ومدة الحضانة والتهوية في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *Microsporum canis* وذلك بتثبيت جميع الظروف باستثناء العامل المدروس ، وقدر الإنتاج بدلالة فعالية إنزيم البروتيز وحدة /مل.وحدد التركيز 0.52% من شعر الإنسان بتجربة أولية كأفضل تركيز لاستخدامه في التجارب اللاحقة .

1- المصدر النتروجيني:

استعملت المواد البروتينية التالية كمصدر وحيد للنتروجين لغرض إنتاج الإنزيم إذ وزعت الأوساط في دوارق حجمية سعة 250 مل وبواقع 50 مل لكل دورق من كل وسط باختلاف المصدر النتروجيني وهي الببتون بتركيزين (0.26%, 0.52%) ونخالة الحنطة بتركيزين (0.26%,0.52%) والكازين بتركيزين (1%, 2%) وشعر الإنسان بتركيزين(0.26%,0.52%).

وسط إنتاج الإنزيم : حضر الوسط وفقاً إلى طريقة Lee وجماعته(1987) ويتكون الوسط من 0.5غم/لتر كلوكوز و 0.6 غم/لتر وكبريتات المغنسيوم $MgSO_4.\ 7H_2O$ و0.2 مولار اورثوفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 و0.2 مولار اورثوفوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K_2HPO_4 و0.01غم/لتر ثايمين (Thiamin) و 0.01غم/لتر بايريدوكسين (Pyridoxine) و0.5 غم/لتر انوسيتول (Inositol) وتم استعمال مصادر نتروجينية مختلفة في نفس الوسط وبتراكيز مختلفة للكشف عن إنتاج إنزيم البروتيز وتحديد افضل تركيز للإنتاج.

تم استخدم شعر الإنسان بخمسة تراكيز (0.26%,0.52%,0.78%,1%,1.3%) بتجربة أولية لمعرفة افضل تركيز لانتاج الإنزيم لاستخدامه في التجارب اللاحقة. وضبط الرقم الهيدروجيني لمحلول الفوسفات الدارئ المستعمل في الوسط على الرقم الهيدروجيني 9. وعقمت جميع الأوساط بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1 بار لمدة

15 دقيقة عدا الوسط المحتوي على الكازين , فقد تم تعقيم محلول الكازين لمدة 5 دقائق ثم أضيف الى بقية مكونات الوسط المعقم بالظروف السابقة نفسها . وقد تم إضافة الثايمين والانوسيتول والبايريدوكسين إلى الوسط بعد تعقيمها بالترشيح الدقيق خلال ورق ترشيح Milipore 0.22 مايكرومتر.

لقحت الأوساط الزرعية وذلك بإضافة قرص بقطر 10 مليمتر من حافة المستعمرة الفطرية. بعمر 7–10 أيام وحضنت الأوساط بدرجة حرارة 35 م و لمدة 10 أيام بواقع 5 أيام بدون تحريك و5 أيام مع التحريك بسرعة 150 دورة/دقيقة باستعمال الحاضنة الهزازة. ثم فصل الغزل الفطري وبقايا الشعر والمواد غير المتحللة باستعمال النبذ المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4 م. ثم مرر الرائق خلال ورق ترشيح من نوع Millipore (0.45 مايكرومتر) واستعمل الرائق مستخلصاً خاماً للخطوات اللاحقة.

2- الرقم الهيدروجيني

حضر وسط الإنتاج المحتوي على 0.52 % من شعر الإنسان في أرقام هيدروجينية مختلفة (3–10) باستعمال المحاليل الدارئة المناسبة لقح الوسط بالفطر وحضنت المزارع بدرجة حرارة 35 م لمدة 10 أيام وبدون تحريك. ثم استخلص الانزيم وقدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين.

3- درجة الحرارة

حضر الوسط الخاص بالإنتاج والمحتوي على 0.52 % من شعر الإنسان كمصدر وحيد للنتروجين وبرقم هيدروجيني 9 . لقح الوسط بالفطر وحضن الوسط بدرجات حرارة مختلفة (20, 25, 30, 35) م لمدة 10 ايام وبدون تحريك. ثم قدرت فعالية الإنزيم وتركيز البروتين في المستخلصات المختلفة.

4- مدة الحضانة

حضر وسط الإنتاج المحتوي على 0.52 % من شعر الانسان برقم هيدروجيني 9 ولقح الوسط بالفطر وحضنت المزارع لمدد زمنية مختلفة (5- 10 ايام) بدرجة حرارة 35 م بدون تحريك. استخلص الإنزيم في نهاية كل مدة وقدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين.

5- التهوية

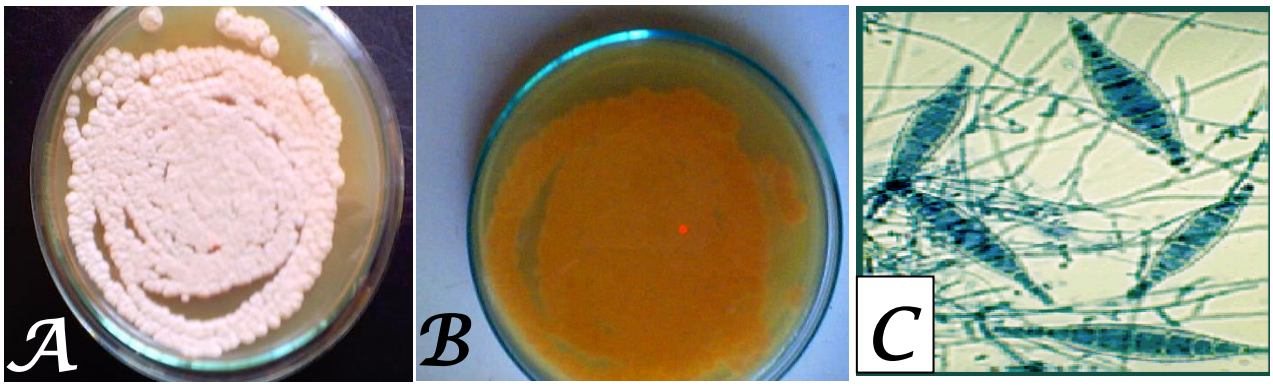
استخدم وسط الإنتاج المحتوي على شعر الإنسان بتركيز 0.52 % لدراسة تأثير التهوية في إنتاج الإنزيم وذلك باستعمال ثلاثة ظروف مختلفة هي وسط ساكن بدون تحريك لمدة 10 أيام و وسط نصف ساكن أي 5 أيام بدون تحريك و5 أيام أخرى مع التحريك بسرعة 150 دورة/دقيقة و وسط متحرك لمدة 10 أيام وبسرعة 150 دورة/دقيقة وضبط الرقم الهيدروجيني لجميع الأوساط على 9 ، حضنت المزارع بدرجة حرارة 35 م ثم قدرت فعالية الأنزيم وتركيز البروتين في المستخلصات في نهاية مدة الحضانة.

النتائج والمناقشة

1- عزل وتشخيص الفطر:

اظهرت نتيجة الفحص المجهري المباشر لعينة الجلد المصاب وجود التراكيب الفطرية المتمثلة بسلاسل من الابواغ الحرشفية Arthroconidia التي تعتبر أحد علامات وجود الفطر *M. canis* المسؤول عن الإصابة. وبعد ان زرعت عينة الجلد المصاب على وسط سابر ويد كلوكوز أكار الحاوي على المضادات الحيوية الكلورامفينكول والسايكلوهكسمايد بدرجة حرارة 25م لمدة حضانة 7–14 يوم، ظهرت المستعمرات

الفطرية مرتفعة وذات أخاديد ويتراوح لونها من الأبيض–الأصفر أو البني وغزل فطري صوفي كثيف. آما لون المستعمرة من الجهة الخلفية للطبق فكان اصفر إلى بني مصفر (شكل 1 – A&B). وتميز الغزل الفطري الذي فحص مجهرياً على قوة (X 1600) بوجود كونيدات كبيرة Macroconidia مغزلية الشكل أبعادها تتراوح بين 15–18 × 60–80 مايكرومتر وذات جدران خشنة وسميكة(شكل1– C) ، و تحتوي كذلك على عقد Knob في نهايتها البعيدة. أما الكونيدات الصغيرة Microconidia فهي معدومة أو قليلة جداً وغير واضحة. وهذا التوصيف يتفق مع نتائج العديد من الباحثين (Marchisio *et al*, 1996; Velhot *et al*., 2000) , مع اختلافات في حجم الكونيدة الكبيرة بين هذه الدراسة ونتائج بعض الباحثين الذين أشاروا الى ان حجم الكونيدات الكبيرة تتراوح بين 15–20 × 60– 125مايكرومتر واعزوا السبب إلى تأثير الظروف البيئية (Fry *et al.*,1979; Kwon-chung and Bennett,1992) .



شكل (1) الصفات المزرعية والمجهرية للفطر *Microsporum canis* المعزول من شخص مصاب بالسعفة الحلقية Tinea corporis في منطقة الذراع. صورة مستعمرات الفطر النامية على وسط سابرويد كلوكوز اكار اكار بعد 14 يوم من الحضانة وبدرجة حرارة 25°م. تمثل الصورة A مظهر المستعمرات من الجهة الأمامية و الصورة B مظهر المستعمرات من الجهة الخلفية للطبق. الصورة C تمثل الغزل الفطري و الكونيدة الكبيرة(Macroconidia) لفطر *Microsporum canis* النامي على الوسط الغذائي السابرويد كلوكوز اكار بعد مدة حضانة 14 يوم وبدرجة حرارة 25°م (X=400).

2- تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *M. canis*

تم استعمال ثلاثة أوساط غذائية هي سابرويد كلوكوز اكار (SGA)و مايكوبايوتك أكار (M BA) وأكار البطاطا والكلوكوز (PGA) . درس تأثير هذه الأوساط الغذائية على نمو الفطر بدرجة حرارة 25°م ولمدة 14 يوم. وقد بينت نتائج التجربة وجود فروقات معنوية على مستوى(0.05) في معدل نمو الفطر على وسط SGA (35.5 مليمتر) وMBA (30 مليمتر) وعلى مستوى معنوية(0.01) على وسط PGA (26.6 مليمتر) (شكل 2- A). ان الزيادة الحاصلة في نمو الفطر *M. canis* على وسط SGA ربما يكون ناتجا عن تحفيز إنبات الابواغ (Meletiadis *et al.*,2001). كما قد يرجع سبب الزيادة في معدلات النمو إلى نسبة الكلوكوز في الوسط الغذائي التي كانت 2% في SGA و 1% في MBA إضافة إلى ذلك وجود 1% من الببتون في SGA و MBA الذي يخلو منه وسط PGA خاصة ان الببتون يحتوي على نسبة من النتروجين تصل إلى 13% (Kwon-Chung and Bennet,1992; Kurbanoglur and Algur,2002) . كما لوحظ في

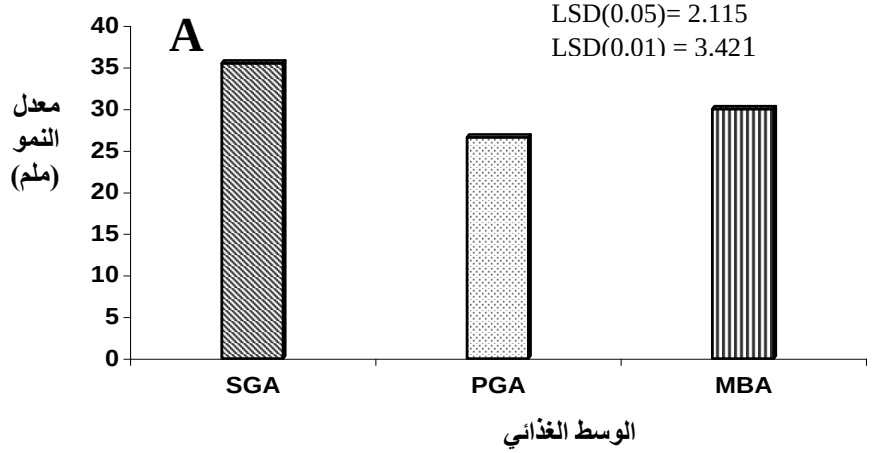
دراسة اخرى من قبل Takasuka (2000) ان وسط مرق السابرويد ديكستروز يحفز النمو الجيد للفطرين *T.rubrum* و *T. mentagrophytes* مقارنة مع النمو الضعيف على وسط Yeast Nitrogen Base. ووجد ان مرق السابرويد هو افضل من وسط Yeast Nitrogen و RPMI في تحفيزه إنبات الابواغ والكونيدات ويعطي نمو غزير لكل من الفطر *Rhizopus microsporus* والفطر *Aspergillus fumigatus* وبمعدل ثلاثة إلى أربع مرات مقارنة مع النمو على وسط RPMI (Meletiadis *et al*.,2001). و أشار Jessup وجماعته(2001) ان الوسط Heinz Oatmeal Cereal Agar هو افضل وسط لانتاج الكونيدات من الفطريات الجلدية ومنها الفطر *M. canis* . ويليه الوسط اكار البطاطا والديكستروز ثم الوسط Mycosel الحاوي على خلاصة الخميرة بنسبة 1% .

إن الفطريات الجلدية يمكنها استغلال السكريات البسيطة مثل الكلوكوز كمصدر للكربون في حين لا يمكنها تحليل السكريات المتعددة كالنشأ والسليلوز الطبيعي ومشتقاته الموجودة في البطاطا (Philpot, 1977). إن وجود الكلوكوز في الوسط الغذائي يؤدي إلى زيادة معدل النمو وزيادة الوزن الجاف أيضا، كذلك يؤدي إلى إنتاج الأحماض التي تسبب انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي وجعله ملائماً لنمو الفطريات . (Kunert, 2000) لذا يعتقد ان العامل المحدد الوحيد للنمو بالنسبة للوسطين MBA و SGA هو الكلوكوز الذي يختلف تركيزه في الوسطين. إن معدل نمو الأحياء المجهرية يتأثر بمصدر الكاربون (الكلوكوز) ويتناسب طردياً مع تركيزه في الوسط الغذائي ضمن حدود معينة (السعد،1990). اما بالنسبة للوسط PGA فانه علاوة على تركيز الكلوكوز في الوسط فانه يحتوي على العديد من المواد المعقدة كالنشا والسليلوز والمواد البكتينية والأحماض مثل حامض الكلوروجينك (Chlorogenic) والكافائيك (Caffeic) التي قد لا يستطيع الفطر استغلالها . مما ينعكس سلبا على نمو الفطر في وسط PGA مقارنة مع وسط MBA الذي يحوي على نفس تركيز الكلوكوز .ويكون نمو الفطريات الجلدية أفضل عند توفر المصادر النتروجينية مع السكريات مقارنة مع وجودها منفردة و يحفز النمو بشكل أفضل عند استخدام مزيج من الأحماض الأمينية مما لو استخدمت بصورة مفردة (Kunert,2000). وتتميز الفطريات الجلدية باستغلال البروتينات والببتيدات والأحماض الأمينية الموجودة في وسط النمو مثل الببتون والكازئين كمصدر للنتروجين والكاربون على الرغم من وجود الكلوكوز وهذا يؤدي بدوره إلى ارتفاع الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي ويكون الوسط غير ملائماً لنمو الفطريات (Drori *et al*., 2003; Kunert, 2000).

تم دراسة تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر *Microsporum canis* باختيار أربع درجات حرارة هي 20 و25 و30 و37 ْم . وبعد مدة حضانة 14 يوم. أظهرت النتائج آن 25ْم هي الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر إذ بلغ معدل نمو الفطر عندها 35.5 مليمتر في حين كان معدل النمو عند درجة حرارة 20 و30 ْم هو 33 مليمتر و 24.3 مليمتر على التوالي، في حين توقف الفطر في النمو أو أصبح نموه بطيئا جدا على درجة حرارة37 م (شكل 2- B) كما بينت النتائج عدم وجود فروقات احصائية في نمو الفطر على درجتي الحرارة 20م ْو25مْ في حين كانت الفروقات معنوية على مستوى (0.05) بين نمو الفطر على هاتين الدرجتين والنمو على درجة الحرارة 30مْ و37م. إن هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكرته بعض الدراسات حول درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر *M. canis* وبعض الفطريات الجلدية الأخرى التي تتراوح بين 25−27 مº (Marchisio *et al*.,1996 ; Muhsin *et al*.,1997; Monod *et al*.,2002) . ووجد ان الفطر *T. mentagrophytes* لا يمكنه تكوين الابواغ الحرشفية في وسط السابرويد وبدرجة حرارة 30 مº (Emyanitoff and Hashimoto,1979) . ان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات الجلدية تتراوح بين 25−35 مº ولا تنمو بدرجة

حرارة 40 °م ، كما لا ينمو الفطر *M. persicolor* ذو الأصل الحيواني (Zoophilic)بدرجة حرارة 37°م (Weitzman and Summerbell, 1995) .وأشار Norris وجماعته (1999) إلى عدم وجود اختلافات في تأثير كل من درجة الحرارة 30 و35 °م على معدل نمو الفطريات الجلدية العائدة إلى الجنس *Trichophyton spp.* . إن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات تختلف باختلاف الأنواع العائدة لنفس الجنس، بل حتى بين سلالات النوع الواحد (Kwon-Chung and Bennett, 1992) .

أجريت دراسة تأثير مدة الحضانة على نمو فطر *M. canis* باستعمال وسط سابر ويد كلوكوز أكار وبدرجة حرارة 25 م. أظهرت النتائج آن معدل نمو الفطر الذي تناسب تناسباً طردياً مع مدة الحضانة وقد ازداد معنويا (0.05) طيلة مدة الحضانة ولغاية 14 يوم . إذ بلغ أعلى معدل لنمو الفطر في اليوم 14 هو 35.5 مليمتر، في حين كان معدل نمو الفطر في الأيام 5،و 7،و10 هو 19 و25 و32.8 ملمتر على التوالي (شكل2 -C). تختلف سرعة نمو الفطريات باختلاف أنواعها وباختلاف الأوساط الغذائية، إذ يصل الفطر *Rhizopus microsporus* إلى طور الثبات (Stationary phase) عند تنميته في وسط مرق السابرويد كلوكوز بعد مدة حضانة 34,5 ساعة، في حين ان الفطر *A. fumigatus* وصل إلى طور الثبات وفي نفس الوسط بعد مدة حضانة 92 ساعة ،اما الفطر *Sclerosporium prolificans* فانه وصل إلى طور الثبات بعد مدة حضانة 75 ساعة في نفس الوسط السابق (Meletiadis *et al*.,2001). يعتمد معدل النمو للغزل الفطري على حجم اللقاح ففي اللقاح المحتوي على عدد كبير من الخلايا يكون معدل النمو أسرع من تلك المحتوية على عدد اقل من الخلايا (Cuenca- Estrella *et al* .,2001). وتستمر الزيادة في معدل النمو مع ازدياد مدة الحضانة عند توفر المواد الغذائية في وسط النمو حتى تستنفذ المواد الغذائية الضرورية لنمو الفطر او يقل تركيز أحد العناصر المحددة للنمو. وفي دراسة سابقة وجد ان مدة الحضانة ونوع الوسط الغذائي لهما تأثير كبير على تكوين الخلايا الجرثومية في الفطريات الجلدية، إذ لوحظ ان الفطر *M. canis* ينتج الكونيدات بغزارة بعد مدة حضانة 4 أيام على وسط Heinz Oatmeal Cereal Agar في حين ان الفطر نفسه لا ينتج الكونيدات على وسطي Mycosel agar و Potato Dextrose Agar إلا بعد مدة حضانة 7 أيام (Jessup *et al*.,2000).



شكل (2) تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *M. canis*

A : تأثير نوع الوسط الغذائي الصلب على معدل نمو الفطر *M. canis* بدرجة حرارة 25 م ولمدة 14 يوم من الحضانة .

B : تأثير درجة الحرارة ومدة الحضانة في نمو الفطر *M. canis* على وسط SGA ولمدة حضانة 14 يوم.

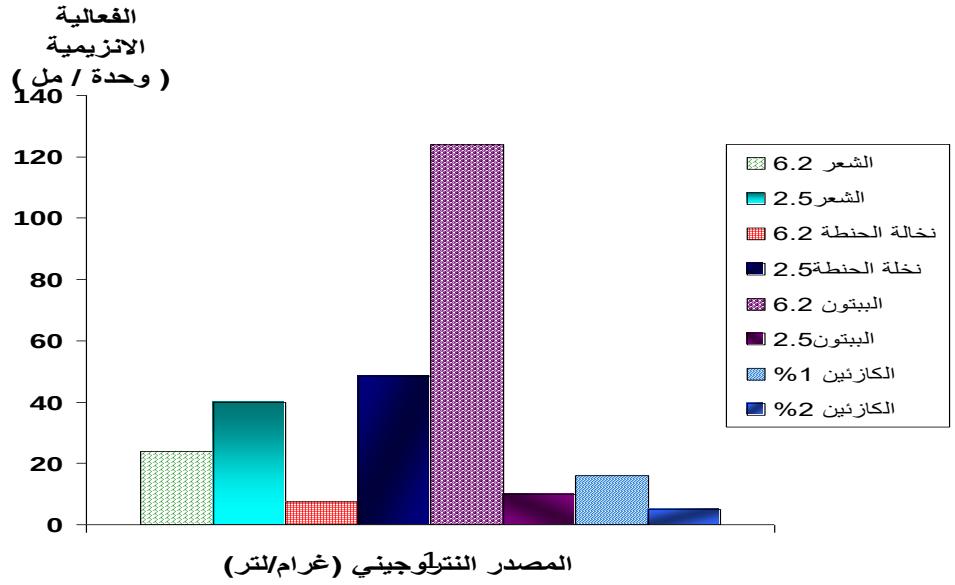
C:تأثير مدة الحضانة في نمو الفطر *M. canis* على وسط SGA وبدرجة حرارة °25م .

3- دراسة تأثير بعض العوامل في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis*

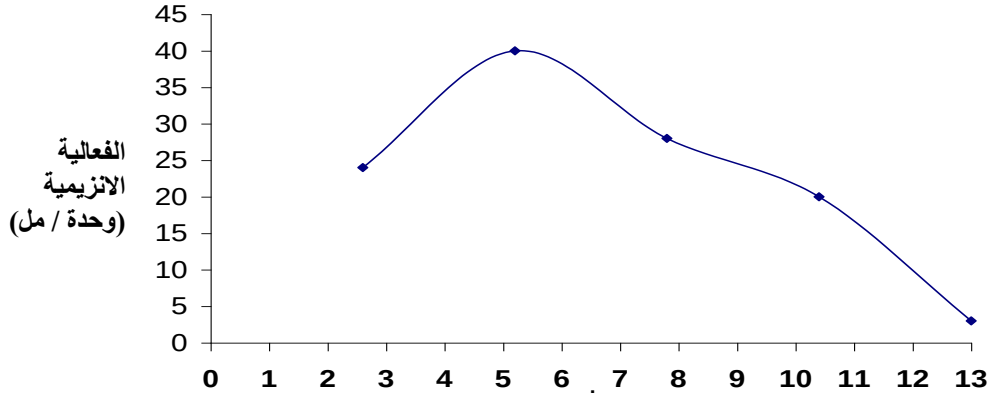
1- المصدر النتروجيني:

تم اختيار اربعة انواع من المصادر النتروجينية لدراسة قابلية الفطر *M. canis* على انتاج انزيم البروتيز وهذه المصادر هي الشعر 2.6 غم/ لتر، والببتون 2.6 غم/لتر، ونخالة الحنطة 2.6 غم/لتر، والكازئين 1%. واظهرت نتائج المسح ان الفطر *M. canis* له القابلية على انتاج انزيم البروتيز باستخدام كل من المصادر النتروجينية الاربعة. أي ان الفطر ينتج انواعاً مختلفة من البروتيز. فكانت الفعالية الانزيمية عند استخدم الببتون كمصدر نتروجين هي 124 وحدة/مل في حين كانت الفعالية الانزيمية لكل من الشعر ونخالة

الحنطة هي 20 و48.5 وحدة/مل على التوالي. اما فعالية انزيم باستخدام الكازئين بتركيز 1% فكانت 16 وحدة/مل. شكل(3). وتم دراسة تاثير تركيز الشعر كمصدر للكيراتين لتحفيز الفطر على انتاج انزيم البروتيز المحلل للكيراتين إذ وجد من الشكل (4) إن 5,2 غم/لتر كان أفضل تركيز لانتاج إنزيم البروتيز المحلل للكيراتين اذ بلغت الفعالية الانزيمية عند هذا التركيز 40 وحدة/مل. في حين كانت الفعالية الانزيمية 3 وحدة/مل في التركيز 13 غم/لتر من شعر الانسان (شكل 4).



شكل (3) تأثير نوع المصدر النتروجيني على انتاج انزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام وسط Lee وجماعته 1987 بدرجة حرارة 27 م ومدة حضانة 10 ايام (5 ايام ساكنة و5 ايام متحركة).



شكل (4) تاثير تركيز الشعر على انتاج انزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام وسط Lee وجماعته 1987 بدرجة حرارة 27 م ومدة حضانة 10 ايام (5 ايام ساكنة و5 متحركة) ايام متحركة)

إن البروتينية المعقدة الموجودة في أنسجة المضيف وتحويلها الى ببتونات بسيطة التركيب يمكن استهلاكها من قبل الخلية (Rao *et al*., 1998). اذ يبين الشكل (3) إن الفطر يستطيع استغلال المصادر النتروجينية المختلفة لإنتاج إنزيمات البروتيز وأظهرت النتائج بان تركيز المصدر النتروجيني له تأثيرا كبيرا على الانتاج. إذ بلغت الفعالية 124 وحدة /مل عند استعمال الببتون بتركيز 0.26% ، في حين انخفضت الفعالية إلى 10 وحد ة /مل عند زيادة التركيز إلى 0.52%. وعند استخدام نخالة الحنطة كمصدر نتروجيني بتركيز 0.26% بلغت الفعالية لانزيم البروتييز 5, 48 وحدة/مل إلا أنها انخفضت إلى 7,5 وحدة/مل عند زيادة تركيز النخالة إلى 0,52%. أما الكازين الذي كان اقل تاثيرا على الانتاج نجد أن التركيز 1% كان افضل لانتاج الإنزيم فقد بلغت الفعالية

الانزيمية عنده 16 وحدة/مل وانخفضت إلى 5 وحدة/مل عند التركيز 2%. وكانت الفعالية الانزيمية عند استخدام شعر الإنسان بتركيز 0.52% هي 40 وحدة/مل ثم بدأت الفعالية الانزيمية بالانخفاض التدريجي بزيادة التركيز لتصل إلى 3 وحدة/مل عند التركيز 1,3% (شكل4). واشارت الدراسات السابقة الى استخدم الشعر او مادة الكراتين بتركيز 0.52% لإنتاج إنزيم البروتيز ذو فعالية محللة للكيراتين من الفطر *M. canis* (Brouta *et al* .,2001; Mignon *et al*.,1998).

ان التباين الذي يحصل في إنتاج إنزيم البروتيز باختلاف المصادر النتروجينية ربما يعزى إلى عدة أسباب منها اختلاف أنواع ونسب المواد العضوية الموجودة في المصدر النتروجيني العضوي وخاصة البروتينات، إذ يحتوي الببتون على نتروجين بنسبة 13,8% ويحتوي الكازين على نتروجين بنسبة 10% (Kurnbanoglur and Algur,2000)، في حين تحتوي نخالة الحنطة على بروتين بنسبة 15% (حسن،1996).كما يحتوي الشعر على نتروجين بنسبة 15% وكاربون بنسبة 45% ودهون بنسبة 5% (Franbourg *et al*.,2003). او احتمال الفطر *M. canis* ينتج عدة انواع من انزيمات البروتيز التي يمكن ان يحثها المصدر النتروجيني في وسط النمو, فقد اشارت الدراسات السابقة الى فصل وتنقية انزيمات بروتيز من راشح المزرعة للفطر *M. canis* ووجد انها ثلاثة أنواع من البروتيزات ذات اوزان جزيئية مختلفة هي 31.5 كيلو دالتون ، و 34 كيلو دالتون، و48 كيلو دالتون (Hamaguchi *et al*.,2000). والسبب الآخر هو اختلاف الطبيعة الفيزيائية والكيميائية للمصدر النتروجيني وهو من العوامل المؤثرة على نمو الأحياء المجهرية وإنتاجها للإنزيمات خاصة الأوساط ذات الطبيعة غير المتجانسة مثل نخالة الحنطة والشعر، ومن أهم العوامل الفيزيائية هي المساحة السطحية التي تتعرض لفعل الأحياء المجهرية وكتل المواد المسامية وحجم الدقائق (Nigam and Singh,1994) . اما العوامل الكيميائية المؤثرة في إنتاج البروتيز هي طبيعة تركيب المواد المكونة للمصدر النتروجيني سواء كانت مواد بسيطة او معقدة او احتوائها على مواد نشوية وسليلوزية والتي تعد اكثر أهمية في إنتاج الإنزيمات المحللة من المصادر الغنية بالمواد اللكنينية (Pandey,1991).

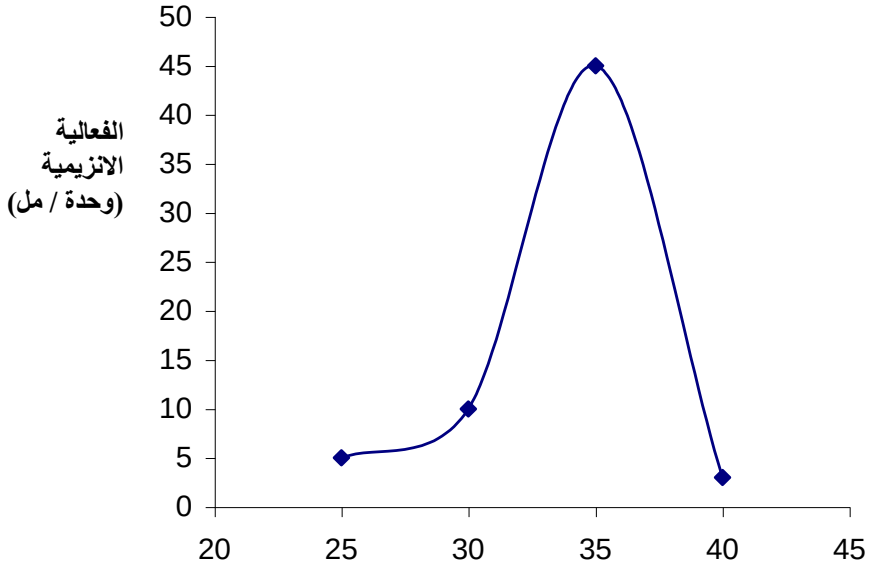
اما سبب انخفاض الفعالية الانزيمية نتيجة لزيادة تركيز المصدر النتروجيني فقد يفسر إلى ان الجينات المشفرة للانزيمات المطلوبة لاستهلاك النتروجين تنظم عادة باليات استحثاث او تحفيز متخصصة تخضع إلى آلية سيطرة رئيسية تعرف بآلية كبح ايض النتروجين (Nitrogen metabolic repression) وتبعاً لهذه الآلية فالجينات تعبر بمستويات عالية عند ظروف تحديد النتروجين فقط، اما عند النمو بوجود مصادر نتروجينية جاهزة ومفضلة (Preferred) فانه يؤدي إلى إعطاء إشارة لإيقاف التعبير الجيني للانزيمات المحللة (Marzluf,1997). وهذا ما أشار أليه Larcher واخرون (1996) إذ لاحظوا ان أعلى إنتاج لانزيم البروتيز من الفطر *Scledosporium apiospermum* يكون عند تركيز البتون 0,1% في حين ان زيادة التركيز في الوسط إلى 1% أدى إلى زيادة في معدل نمو الفطر وانخفاض كبير جداً في إنتاج الإنزيم. كما لوحظ ان كلاً من البتون والكازين يحفز تراكم إنزيم البروتيز في الوسط الزرعي لفطر *A. terreus* وبالتالي انخفاض الفعالية الانزيمية وذلك لان هذه المصادر النتروجينية البسيطة تكون حاوية على عدد كبير من الأحماض الأمينية والببتيدات الصغيرة وبذلك تؤدي إلى إيقاف إنتاج الإنزيم بالية تعرف بالية كبح الايض الهدمية (Catabolite repression) (Ashur *et al*.,1996). ان المصادر النتروجينية العضوية المعقدة تكون مصدراً لتراكيز متباينة من الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات التي يكون لها تأثيراً مهماً في تنظيم إنتاج إنزيمات البروتيز حسب الآلية المذكورة سابقاً فقد تكون الأحماض الأمينية بتراكيز قليلة غير كافية لحث إنتاج الإنزيم او بتراكيز مثلى

لحث الإنتاج فتسبب أعلى إنتاج للإنزيم او أنها قد تكون بتراكيز عالية فتسبب كظم إنتاج إنزيمات البروتيز (Egorov *et al* .,1983).

2- درجة الحرارة:

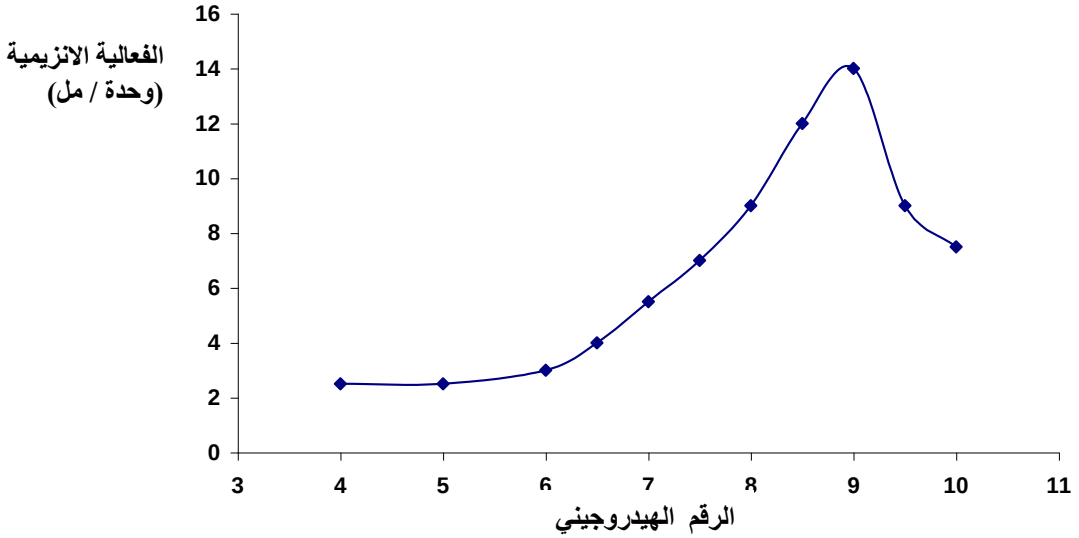
تم دراسة تأثير درجة الحرارة عن انتاج انزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستعمال مصدر وحيد للنتروجين هو الشعر 5.2 غم/لتر وبرقم هيدروجيني 9 ومن الشكل (5) لوحظ ان افضل درجة حرارة لانتاج انزيم البروتيز هي 35°م ، إذ بلغت عندها الفعالية الانزيمية 45 وحدة/ مل، في حين كانت درجة الحرارة 20°م عندها اقل فعالية انزيمية وهي 5 وحدة/مل. ازدادت الفعالية لإنزيم البروتيز في الراشح الزرعي مع ارتفاع درجات الحرارة فبعد أن كان إنزيم البروتييز المنتج بدرجة حرارة 20°م ذو فعالية إنزيمية 5 وحدة/مل ارتفعت الفعالية للراشح الزرعي بدرجة حرارة 35°م لتصل إلى 45 وحدة/مل، ثم انخفضت الفعالية الإنزيمية للراشح الزرعي عند درجة حرارة 40 °م إلى 3 وحدة / مل (شكل5).

إن ارتفاع درجة حرارة الوسط الغذائي إلى 35°م أدى إلى زيادة في إنتاج إنزيم البروتيز مقارنة بدرجات الحرارة الواطئة 25-30°م إذ أن الاختلاف في درجات الحرارة المثلى لنمو الفطر ولانتاج الإنزيم قد يعود إلى وجود بعض العوامل المنظمة لانتاج إنزيمات البروتيز التي تنتج أثناء نمو الفطر ويتوقف إنتاجها بارتفاع درجات الحرارة نتيجة لتوقف نمو الفطر وبذلك تسمح بالإنتاج الأوفر لإنزيمات البروتيز (Kunert,2000). إن نتائج دراستنا الحالية تتفق مع نتائج دراسة Dahot (1994) الذي وجد أن درجة الحرارة المثلى لانتاج إنزيم البروتيز القاعدي من الفطر *Penicillium expansum* هي 35°م . كما استخدمت درجة حرارة مماثلة لانتاج هذا الإنزيم قام بها الونداوي (1991). كذلك استخدمت درجة الحرارة 35°م لانتاج إنزيم البروتيز من الفطر *T. mentagrophytes* (Aubaid and Muhsin,1998). في حين وجد Ghahfarokhi وجماعته (2003) أن درجة الحرارة المثلى لانتاج إنزيم البروتيز من الفطر *T. mentagrophytes* هي 32°م . وتم استعمال درجة الحرارة 27°م لانتاج إنزيم البروتيز من الفطر *M. canis* من قبل (Brouta *et al*.,2001; Mignon *et al* .,1998 ; Lee *et al*.,1987).



3- الرقم الهيدروجيني:

من الشكل(6) لوحظ ان افضل رقم هيدروجيني لانتاج انزيم البروتيز من الفطر *M. canis* هو 9، اذ بلغت الفعالية الانزيمية عنده(12) وحدة/مل. كما لوحظ ان انتاج الانزيم يكون في اقصاه بين الرقم الهيدروجيني (8-10) مقارنة مع الرقم الهيدروجيني المتعادل الحامضي الذي تكون عنده الفعالية الانزيمية أقل ما يمكن.



شكل (6) تأثير الرقم الهيدروجيني على انتاج انزيم البروتيز من الفطر *M. canis* باستخدام شعر الانسان كمصدر نتروجيني وحيد بعد 10 ايام من النمو على وسط Lee وجماعته 1987 بدرجة حرارة27 م وبمعدل ثلاث مكررات.

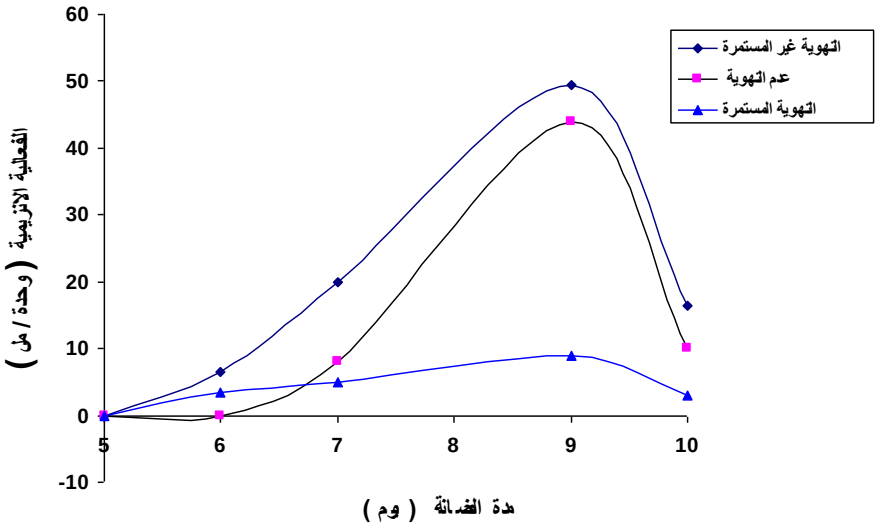
يتركز تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم البروتيز من خلال التأثير على صفات الوسط الغذائي كذوبان المواد الغذائية وانتقالها وتأينها وتركيز البيكاربونات الناتجة من ذوبان ثاني أو كسيد الكاربون الذي يؤثر على السعة الدارئة للوسط الغذائي (Bull and Bushnel,1976) . مما تنعكس هذه على نمو الفطر وانتاجه للإنزيمات ومن ناحية أخرى يؤثر الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيمات المنتجة وليس بالضرورة ان يتطابق الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنتاج مع الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم (Volesky and Luong,1985) . كما يؤثر الرقم الهيدروجيني على عملية الترجمة والاستنساخ وبناء البروتين (Ramon *et al*.,1999).

بينت النتائج أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج البروتيز هو 9 وكانت إنتاجية الإنزيم مرتفعة ضمن الحدود القاعدية 8-10 مقارنة مع الظروف الحامضية والمتعادلة (شكل6). فقد بلغت الفعالية الإنزيمية 14 وحدة/مل عند الرقم الهيدروجيني 9 وانخفضت بارتفاع الرقم الهيدروجيني بشكل تدريجي. ان هذه النتيجة

تتفق مع دراسة سابقة قام بها حسن (1996) الذي حصل على الإنتاج الأمثل لإنزيم البروتيز باستخدام الرقم الهيدروجيني 9 من الفطر *Aspergillus oryzae* . وفي دراسات سابقة عن إنزيمات البروتيز في الفطر *M. canis* استخدم الرقم الهيدروجيني 8 ,7 انتاج البروتيز ولم تشير تلك الدراسة إلى الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنتاج (Lee *et al*.,1987; Mignon *et al* .,1998; Brouta *et al*.,2001). بينما أشار Thangam وجماعته (2002) إلى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج البروتيز من البكتريا *Alcaligenes faecalis* هو 8 . كما استخدم الرقم الهيدروجيني الحامضي لانتاج بعض إنزيمات البروتيز، فقد كان الرقم الهيدروجيني لانتاج إنزيم البروتيز من الفطر *T. mentagrophytes* هو 4,5 (Aubaid,1997) .واستخدم الرقم الهيدروجيني نفسه لانتاج إنزيم البروتيز من الفطر *P. chrysogenum* (Benito *et al*.,2002). إن إنتاج كل نوع من أنواع إنزيمات البروتيز يتبع طريقة تعبير جيني مختلفة كاستجابة للرقم الهيدروجيني الخارجي أو المحيطي Ambient (pH) فالإنزيمات تنتج عند الرقم الهيدروجيني الذي تكون عنده فعالة أو مؤثرة فقط ، وبمعنى أخر أن الرقم الهيدروجيني يلعب دوراً مهماً في التعبير الجيني للبروتينات المفرزه (Ramon *et al*.,1999) .

4- التهوية والمزج ومدة الحضانة:

تم دراسة تاثير عامل التهوية والمزج على انتاج البروتيز من الفطر *M. canis* واظهرت النتائج ان التهوية غير المستمرة (أي الحضانة لمدة 5 أيام بدون تهوية ومزج ثم الحضانة مع التهوية والمزج لمدة 5 أيام اخرى كانت الأفضل في انتاج انزيم البروتيز مقارنة مع ظروف التهوية المستمرة وعدم التهوية. إذ بلغت الفعالية الانزيمية باستخدام التهوية غير المستمرة 49.5 وحدة/ مل في اليوم 9 من الحضانة في حين كانت الفعالية الانزيمية باستخدام التهوية المستمرة وعدم التهوية هي 9و 44 على التوالي في اليوم التاسع من الحضانة شكل(7). كذلك اظهرت النتائج ان اليوم 9 من الحضانة هو الافضل في انتاج الانزيم.



شكل (7) تاثير مدة الحضانة على انتاج انزيم البروتيز من الفطر *M. canis* في وسط Lee وجماعته1987 وبرقم هيدروجيني 9 وبدرجة حرارة 35 م وباستخدام شعر الانسان بتركيز 5,2 غم / لتر .

.إن السبب في كون ظروف التهوية غير المستمرة هي الأفضل في إنتاج إنزيم البروتيز قد يعود إلى أن عملية التصاق الكونيدات الفطرية التي تحتاج إلى الوقت الكافي لتتمكن من الالتصاق والإنبات والبدء بعملية النمو وانتاج الإنزيم. إذ أن عملية التصاق الكونيدات الصغيرة والكونيدات الحرشفية لبعض الفطريات الجلدية على الخلايا المولدة للكيراتين (Keratainocytes) في جلد الإنسان تحتاج إلى مدة زمنية تتراوح بين 3-4 ساعات (Zrita, 1987) لذلك فان التهوية والمزج المستمر يمنع أو يؤخر عملية التصاق الكونيدات الفطرية أو يقلل من عدد الكونيدات الملتصقة وهذا يؤدي إلى انخفاض إنتاج إنزيم البروتيز. وبما أن آلية تحطيم الكيراتين تبدأ بعملية إزالة الآمين (Deamination) التي تحدث بواسطة إنزيم L-amino acid oxidase الذي يقوم بتحويل الأحماض الأمينية إلى أحماض كيتو(إضافة ذرة أو كسجين إليها) وامونيا، لذلك فان استهلاك الأوكسجين في عملية إزالة الامين تجعل آلية تحطيم الكيراتين تحتاج إلى التهوية (Kunert,2000)

تختلف الدراسات السابقة في ظروف التهوية المستخدمة لانتاج إنزيمات البروتيز. بعضها استخدم ظروف تهوية غير مستمرة لانتاج انزيم البروتيز من الفطر (Monod *et al*.,1998; Lee *et al*., 1987). و القسم الأخر استخدم تهوية مستمرة كما في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *P. chrysogenum* (Benito *et al*. , 2002). وتستخدم ظروف التهوية المستمرة في إنتاج العديد من الانزيمات مثل البروتيز وإنزيم اللايبييز من الفطر *P. auratijgriseum* (Lima *et al*. ,2003). وإنزيم Pectatelyases من الفطر (Drori *et al*.,2003) *Colletotrichum gloeosporiodes*.

كما أن هناك بعض الدراسات لم تستخدم ظروف التهوية في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر *T. mentagrophytes* (Muhsin and Aubaid, 2000) وانتاج البروتيز من الفطر *A. oryzae* (حسن،1996).و الفطر *Scedosporium apiospermum* (Larcher *et al*.,1996).

المصادر

المصادر العربية

حسن، شذى سلمان(1996). **انتاج وتنقية وتوصيف البروتيز القاعدي من العفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمر المواد الصلبة.** رسالة دكتوراه- كلية العلوم- جامعة بغداد.

السعد، مها رؤوف (1990). **فسلجة الاحياء المجهرية** . الطبعة الثانية. جامعة بغداد، بغداد.

الوندواوي، شادان عباس(1991) **دراسة اولية عن انزيمات البروتيز المنتجة من الفطر *Aspergillus terreus*.** رسالة ماجستير - كلية العلوم- جامعة بغداد.

المصادر الاجنبية

Ali, T.M. 1990. A study on tinea capitis in Baghdad. M.Sc. Thesis. College of Medicine. Univercity of Baghdad.

Ashur, S.A.; El-Shura, H.M. ; Metwally, M. and Habib, S.A. 1996. Fungal fermentation of whey incorporated with certain supplements for the production of proteases . Microbios . 86(346): 59-69.

Aubaid, A. H. 1997. Enzymatic activity, purification of keratinase and proteinase and their roles in the pathogenicity and immunogeninieity of clinical isolates of dermatophytes and yeasts. Ph. D. thesis, Collage of education, Basrah University.

Aubaid, A. H. and Muhsin, T. M. 1998. Partail purifiation and kinetic studies of extracellular proteinase from *Trichophyton matagrophtes Var. erinacea*. Mycoses 41: 163-168.

Barson, W. J. 1985. Granulom and pseudogranuloma of the skin due to *Microsporum canis*. Arch. Dermatol., 121: 895- 897.

Benito, M. J.; Rodriguez, M. N. F.; Asensio, M.A.; Bermúdez, M. E. and Eórdoba, J. J. 2002. Purification and characterization of an extracellular protease k from *Penicillium chrysogenum Pg 222* active against ment protein. Appl. Envon. Microbiol. 68(7): 3532-3536.

Borriss, R. 1987. Biology of enzymes . In ``Biotechnology ,J. H. Reh and G. Reed eds.`` Vol.7a: pp: 35-36. VCH Deerfield Beach.

Brouta, F.; Descamps, F.; Fett, T.; Losson; B.; Gerday, C. and Mignon, B. 2001. Purification and characterization of a 43.5 Kda Keratinolytic metalloprotease from *Microspourm canis*. Med. Mycology 39: 269.275.

Bull, A. T. and Bushnel, M. E. 1976. Environmental control of fungal growth. In`` The filamentous fungi. J. E. Smith and D. R. Berry eds.`` Vol. 2: 1-26. Edward Arnold. London.

Cuenea-Estrella, M.; Diaz-Guerra, T. M.; Mellado, E. and Rodriguz-Tudela, J. L. 2001. Influence of glucose supplemntation and inoculm size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida spp*. J. clin. Microbiol. 3a (2): 525-532.

Dahot, M. U. 1994. Purification and some properties of alkaline protase for *Penicillium expansum*. J. Isla.Acad. Scie.7, 2.

De Moraes, M. S.; Gompertz, P.; Amorium, C.; Travares, H. S.; Alchorne, M. M. A.; and Fischman, O. 2000. Epidemlogy of tinea capitis .(Sao Paulo, Brazil). Rev. lberoam Micol., 17: 140.

Drori, N.; Kramer-Haimovich, H.; Rollins, J.; Dinoor, A.; Okam, Y.; Pines, O. and prusky, D. 2003. External pH and nitrogen source affect secretion of pectatelyase by *Colletrichum gloeosporioides.* Appl. Environ. Microbiol., 69(6) : 3258-3262.

Egorov, N.S.; Loriya, Z. K. and Yudina, T. G. 1983. Effect of protein on exprotease synthesis in *Bacillus thuringiensis.* Microbiol. (USSR), 52(4): 443-446.

El-Benhawi, M.; Fathy, S.; Moubsher, A. H. and Alem, N. S. 1991. Mycologic study of tinea capitis in Qatar. Int. J. Dermatol. 30(3): 204- 205.

Ellis, D. H. 1994. Clinical mycology: The human opportunistic mycoses. Gillingham Printers Pty Ltd- Anstralia. P. 166.

Emyanitoff, R. G. and Hashimoto, T .1979. The effect of temperature, incubation atmosphere, and medium composition on arthospore formation in the fungus *Trichophyton mentagrophytes.* Cand. J. Microbiol., 25(3): 362-366.

Franbourg, A.; Hallegot, P.; Baltenneck, F.; Toutain, C. and Leroy, F. 2003. Current research on ethnic hair .J. Amer. Acad. Dermat., 48: 115-119.

Fry, D. T.; Oldfield, R. J. and Bridger,R. C. 1979. A colour atlas of pathogenic fungi, Wolfe Medical Publication Ltd. London. U.K.

Fujiwara, N.; Masui, A. and Imanaka, T. 1993. Purification and properties of the highly thermostsble alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp*. J. Biotechnol, 30: 245-256.

Ghahfarokhi, M. S.; Razafsha, M.; Allameh, A. and Abyaneh, M. R. 2003. Inhibitory effects of aqueous onion and garlic extract on growth and keratinase activity in *Trichophyton mentagrophytes.* Iran Biochem. J. 7(3): 113-118.

Hamaguchi, T.; Morishita, N.; Usui, R. and Takuichi, I. 2000. Characterizaion of an extracellular keratinase form *Microsporum Canis*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 41(4): 257-262.

Jessup, C.J.; Warner, J ; Isham, N.; Hasan, I. and Ghannoum, M. A. 2000. Antifungal susceptibility testing of dermatophtes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 38(1): 341-344.

Koneman, E. W.; Roberts, G. D. and Wright, S. E. 1978. Paractical laboratory mycology, 2nd .edn, Williams and Wilkins Company, Baltimor, U.S. A. : p.13.

Kunert, J. 2000. Physiology of keradinophilic fungi. Revista Iberoamer. Cana de Micrologia: 77-85.

Kunitz, M. 1947. J. Gen. P hysiol. 30: 291-296 (Cited by Subramanian, A.R. and Kalnitsky, G 1964. The major alkaline protease of Aspergillus oryzae, Aspergilopeptidase B.I. Isolation in homogenous form. Biochemistry. 3 (12) : 1861-1867.

Kurbanoğlu, E. B. and Algur, Ö. F. 2002. Use of Ram Horn Hydrolyste as a peptone for bacterial growth. Turk. J. Biol., 26: 115-123.

Kwon-Chung, K. S. and Benett,J. E. 1992. Medical Mycogy. Williams and Wilkins,U. S. A.

Larcher, G.; Cimon, B.; Symoens, F. Trongchin, G.; Chabase, D. and Bouchara, J. 1996. A 33 Kda serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. Biochem. J. 315: 11a –126.

Lee, K. H. ; Park, K. K.; Park, H. S.and Lee, J. B. 1987. Isolation, purification and characterization of keratinolytic proteinase from *Microsporum cains.* Yonsei Med. J. 28(2): 131-138.

Lima, V. M. G.; Krieger, N.; Sarquis, M. I. M.; Mitchell, D. A.; Ramos, L. P. and Fontana, J. D. 2003. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantigriseum.* Food Technol. Biotechnol., 41(2): 105-110.

Marchisio, V. F.; Preve, L. and Tullio, V. 1996. Fungi. resporsible for skin mycoses in Turin (Italy). Mycoses, 3a : 141-150.

Marzluf, G. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolisim in the fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61(1): 17-32.

Matsumoto, T. 1996. Fungal disease in dermatology. In`` Principle and paractice of clinical mycology. D. W. Mackenzie and F. C. Odds eds. J. Wiley and Sons Ltd., USA. PP: 103-129.

Meletiadis, J.; Meis, J.F.G.M.; Mouton, J.W. and Verweij, P. E. 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. J. Clinical Microbil. 3a(2): 478-484.

Migno, B.R.; Nikkels, A. F.; pierard, G. E. and Losson, B.J. 1998. The mvitro and in-vivo production of 31.5 Kda keratinolytic subtilase from *Microsporum canis* and the clinical Status in nuturally infected cats. Dermatology 196(4): 438-441.

Mignon, B.R.; Leclipteux, T.; Focant, C.; Nikkels, A. J.; Pierard, G. E. and Losson, B. J. 1999. Humoral and cellular immnne response to a crude exoantigen and purified keratinase of *Microsporum canis* in experimental infeoted ginea pigs. Med. Mycol. 37(2): 123-129.

Mignon, B.; Swinnen, M.; Bouchara, J. P.; Hofinger, M.; Nikkels, A. Pierzrd, G.; Gerday, CH. & Losson, B. 1998. Purification and characterization of a 31.5 Kda

keratinolytic subtilisin , like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secrtion in naturally infected cats. Hed. Mycol. 36: 395-404.

Monod, M.; Capoccia, S.; Lechenne, B.; Zaugg, C.; Holdom, M and Jousson, C. 2002. Secreted proteses. from pathogenic fungi. Int. J. Med. Microbiol.

Muhsin, T.M. and Abaid, A.H. 2000. Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes Var. erinacei*. Mycopathologia 150: 121- 125.

Muhsin, T. M. and Salih, T.H. 2001. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in southern Iraq. Mycopathologia 150(2): 49-52.

Muhsin, T. M.; Aubaid, A. H. and Al-Duboon, A. H. 1997. Extracellular enzyme activites of dermatophytes and yeast isolated on solid media. Mycoses 40: 455-469.

Myrvik, Q.H. and Weiser, R.S. 1988. Fundamentls of Medical Mycology and Bacteriology. 2nd edn., Lea and Febiger Phildelphia : p: 534- 542.

Nigam, P. and Singh, D. 1994. Solid- state (substrate) fermentation system and their applications in biotechnology . J. Basic Microbiol. 34(6): 405-423.

Norris, H. A.; Elewski, B. E. and Ghannoun, M. A. 1999. Optimal growth condiditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of microdilution method. J. Am. Acad. Dermatol., 40(6 Pt2): 9-13.

Pandey, A. 1991. Effect of particale size of substrates on enzyme production in SSF. Bioersource Technol. 37: 169-172.

Papini, R. and Mancianti, F. 1995-1996. Extracellular enzymatic activity of *Microsporum Canis* isolates. Mycopathologia 132(3): 129-132.

Philpot, C. M. 1977. The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. Sabouraudia, 15: 141-150.

Ramon, A. M.; Porta, A. and Fonzi, W. A. 1999. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the pac C-related transcription factor encoded by PRR2. J. Bacteriol. 181(24): 7524-7530.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechonlgical, aspects of merobial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3): 597- 635.

Samdani, A. J. and Al-Bitar, Y. 2003. The effect of proteinases (keratinases) in the pathogensis of infection using Electron Microscope. Pakistan J. Med. Sci. 19(4): 264-267.

Simpanya, M. F. and Baxter, M. 1996. Partial charcterization of aproteolytic enzymes of *Microsporum canis* and *Microsporum cookei*. Mycoses 39(7-8): 279-282.

Subramanian, A. R. and Kalnitsky, G. 1964. The major alkaline protease of Aspergillus oryzae, Aspergillopeptidase B.I. Isolation in homogeneous form. Biochemistry, 3 (12): 1861-1867.

Takasuka, T. 2000. Amino acid- or protein – dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichsphyton rubrum.* FEMS Immnuol. and Med. Microbiol. 2a (4): 241-245.

Takuichi .I, Higuchi, D. 1977. Isolation, purification and biochemical Properties of keratinase elaborated from *Microsporum gypseum*. Jap. J. Dermatolo. 87: 305-309.

Thangam, E. B. and Rajkumar, G. S. 2002. Purification and characterization of alkaline Protease from *Alcaligenes faecalis*. Biotechnol. Appl. Biochem. 35: 149-154.

Tsuboi, R.; Ko, IK.; Takamori, K. and Ogawa, H. 1989. Isolation of keratinolytic proteinase form *Trichophyton mentagrphytes* with enzymatic activity at acidic pH. Infect. Immun. 57 (11): 3479-3483.

Velho, G.; Lopess, V.; Amorim, M. L.; Cardoso, L. ;Massa, A. and Amorin, J. M. 2000. Dermatophytes isolated at H. G. Santo Antonio, portugal. Rev. lberoam. Micol., 17: 139.

Vlani, F. C.; Dossantos, J. I.; Paula, C. R.; Larson, C. E. and Gambale, W. 2001. Production of extracelluar enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulance. Med. Mycol. 39(5): 463-468.

Volesky, B. and Luong, I. 1985. Microbiol enzymes production, purification and isolation. CRC (Critical Reviews in Biotecnology) 2 : 119-146.

Ward, O. P. 1983. Proteinases, In ``Microbial Enzymes and Biotechnology, W. M. Fogarty ed.''Applied Science Publisher. England.

Weitzman, I. and Summerbell, R. C, 1995. The dermatophytes. Cln. Microb. Rev. 8(2): 240-25a.

Whitaker, G. R. and Granum, P. E. 1980. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 250 nm. Anal. Biochem. 109: 156-159.

Yamada, T.; Makimura, K.;Hirai, A.; Kano, R.; Hasegawa, A.;Uchida, K. and Yamaguchi, H. 2004. Isolation of a promoter region of a secreted Metalloprotease gene from *Microsporum cains*. Jpn. J. infect. Dis., 57 : 25-28.

Yehia, M. M. 1980. Studies on dermatophytes in Mosul of Vincinity. M. Sc. Thesis, College of Medicine, Mosul University. Iraq.

Zrita, J. 1987. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes invitro. J. Invest. Dermatol. 89(5): 529-534.