تاثير بعض المطفرات الكيميائية والفيزيائية على قابلية بكتريا Serratia odorifer SME14 على انتاج انزيم اللاييز

د. عصام فاضل الجميلي

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية

للدراسات العليا – جامعة بغداد

الخلاصة :

في محاولة لزيادة انتاجية العزلة المحلية Serratia odorifer SME14 ، تم اخضاعها إلى المطفرات الكيميائية باستخدام الكولجسين وصبغة الاكردين البرتقالية والمطفرات الفيزيائية باستخدام الاشعة فوق البنفسجية لانتاج الطافرة البكتيرية ذات الانتاجية العالية الانزيم اللاييز وتشير النتائج الى المطفرات الفيزيائية قد اعطت فعالية انزيمية مقدارها ٩،٧٩ وحدة / مليلتر مقارنة بحصيلة انتاجية في العشر المطفرة كيميائياً

أهمية كبيرة بالنسبة للجمهوريات المستقلة وخاصة تركمانستان و كازاخستان وتقوم الرؤية الإيرانية بشأن النظام القانوني لبحر قزوين على أسس وخيارات متعددة من بينها.

أما أن يكون البحر مشاعا بين الدول المطلة علية، وأما أن يتم تقسيم البحر بالتساوي بين دولة بتسب (٢٠) % لكل دولة، وتتمسك طهران بهذه النسبة حتى تحقق مصالح اقتصادية وجغرافية هامة يكفلها موقعها الهام بين منفذين بحرين على مستوى عال من الأهمية وهما بحر قزوين والخليج العربي، وتعول ايران على أن تتولى الدور الرئيسي في ربط الدول المطلة على البحر خصوصاً أذربيجان وتركمانستان وكازاخستان وهي لا تمتلك أي منافذ بحرية مفتوحة على البحار الدولية والأسواق العالمية، وان هذه الرؤيا لا تساندها أي دولة أخرى فقد وضعت روسيا وكازاخستان ما نسبته (٤٩) من بحر قزوين تحت اتفاق فعلي بينهما في حين يتبقى (٥١) وهي النسبة المطروحة للتفاوض بين الدول الثلاث الجنوبية ايران تركمانستان، آذربيجان، وفي إطار ما صار يعرف بإعادة رسم الخريطة الجيوستراتيجية في منطقة غرب و شمال غرب آسيا، وسعيا لأبعاد ايران وعزلها وحرمانها من لعبة خطوط نقل النفط والغاز الطبيعي والعائدات الضخمة لهذه التجارة بعد من الوسائل المهمة لذلك (٤).

يتضح مما تقدم أن سياسية ايران للحصول على قسمة عادلة من ثروات بحر قزوين، وكذلك الاستنشار بنصيب أكبر في عملية نقل النفط والغاز الطبيعي تصطدم بسياسيات إقليمية ودولية رافضة لذلك المسعى من الطموحات التوسعية لإيران والرغبة في إثارة الفلافل والمتاعب للدول المجاورة.

التضاعف، وتحدث ما يسمى بطفرة ازاحة الأطاربواسطة (Fram schifi mutation) بواسطة الاضافة (addition) أو الحذف(deletion) .

هدفت الدراسة الحالية إلى استخدام طرائق التطغير مختلفة الفيزيائية والكيميائية لزيادة انتاجية اللايبيز من العزلة المحليةSerralia odorifer SME14 .

المواد وطرائق العمل

السلالة البكتيرية:

استخدم في هذه الدراسة السلالة البكتيرية Servania odorifer SME14 المعزولة محليا (٨) والتي تم تشخيصها اعتماداً على مصنف بيركي (٧).

الأوساط الزراعية:

١- وسط Tryptone yeast extract(TY) السائل (Thorne et al.. 1987) المتكون من تربتون (١%) ومستخلص الخميرة (٠,٦%).

٢-وسط الانتاج : وسط ران (١٤) : المتكون من ٥ غرام K_2HPO_4 و ٥ غرام $(NH_4)_2PO_2$و ١ غرام من $CaCl6H_20$و ١ ٠،٠٠غرام من $MgSO^4.7H^2o$ و ٥ غرام زيت الزيتون و ٠,٠٠١ غرام $FeCl_{2.}6H_2O$ و ٠٠١ غرام اكار Nacl، أذيبت جميع المحتويات في لتر ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٧,٢ و عقم بالموصدة.

تقدير فعالية اللايبيزEnzyme netivity assay

التبعت الطريقة الموصوفة من قبل (١٣) في تقدير الانزيم اللايبيز. وعرفت وحدة فعالية اللايبيز بانها : كمية الانزيم التي تحرر ١ مايكرومول من الحوامض الدهنية في الدقيقة عند ظروف القياس .

التطفير الفيزياويPhysical mutagenesis

عرضت العزلة المحلية Serratia odorifer SME14 لأحد عوامل التطفير الفيزيائية وهي الأشعة فوق البنفسجية وحسب الطريقة الموصوفة من قبل Movitz وجماعته عام (١٩٧٤). وقد استخدم لهذا الغرض مصدرا للاشعة فوق البنفسجية ١٥ واط يرسل الأشعة بطول موجي ٢٥٤ نانوميتر ليكون معدل سيل الاشعة ٠,٥-٠،٦ واط / م. سحبت بعدها عينات بمعدل ٠,٥ مليلتر في الخمسة دقائق الأخيرة من وقت التعريض لتأثير الاشعة وغسلت بوسط TY السائل (المتكون من تربتون (١%) ومستخلص الخميرة (٠,١%) ، ثم علقت في ٢ مليلتر من الوسط نفسه وحضنت بدرجة ٢٨ م لمدة ٢٤ ساعة لاتاحة الفرصة للتعبير عن الطفرات، نشر بعدها ٠,١ مليلتر من التخفيف المناسب للخلايا النامية على وسط ١٧ المتصلب بمادة الاكار والمعم بمادة الكلوكوز (١%) وحضنت بدرجة ٢٨ م لمدة ٢٤ ساعة ليتم بعدها غربلة المستعمرات النامية للتحري عن كفاءة انتاجها للايبيز.

التطفير الكيميائيChemical mutagensis

١-معاملة الخلايا بالكولجسينColchicine

لفح وسط المرق المغذي الحاوي على تراكيز مختلفة من الكولجسين بـ $١٠٤^{x٩}$ خلية / مليلتر وسط زرعي وحضنت المزراع بدرجة حرارة ٢٨ م في حاضنة هزارة بسرعة ١٢٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٤ ساعة وثم لقح وسط الانتاج وحضن لمدة ٤٨ ساعة بدرجة حرارة ٢٨ م ونبذ الزروع وقدرت الفعالية الانزيمية بطريقة المطياف الضوئي في الرائق واتبعث طريقة أخرى باضافة تراكيز مختلفة من الكولجسين إلى وسط الانتاج ران الذي لقحبالزروع البكتيري وحضن لمدة ٤٨ ساعة بدرجة حرارة ٢٨ م ونبذ المزروع وقدرت الفعالية الانزيمية في الجزء الطافي

معاملة الخلايا بصبغة الاكردين البرتقالية(Acridine orange)

لقح مزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة في ٥ مليلتر من وسط المرق المغذي بدرجة حرارة ٢٠٨ م لمدة ١٨ ساعة واضيفت صبغة الاكردين البرتقالية إلى

الوسط كما يلي-:

١٠٠ مايكروغرام / مليلتر وحضنت لمدة ساعتين بدرجة حرارة ٢٨ م.

٥٠ مايكروغرام / مليلتر وحضنت لمدة ساعة بدرجة حرارة ٢٨ م.

٢٥ مايكروغرام / مليلتر وحضنت لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة ٢٨ م.

غسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات ٧,٠ (pH ثلاث مرات للتخلص من بقايا الصبغة ولقحت الخلايا المغسولة لكل معاملة في وسط ران الصلب وتم اختيار السلالة المطفر وحضر منها لقاح لتلقيح وسط الانتاج ران وحضن بدرجة حرارة ٢٨م لمدة ٤٨ ساعة وقيست الفعالية في الجزء الطافي بعد فصله عن الخلايا بسرعة ٥٠٠٠ لمدة ١٥ دقيقة.

النتائج والمناقشة

الغرض البحث في امكانية رفع الكفاءة الانتاجية للعزلة المحلية Serratia odorifer SME14 فقد خضعت هذه البكتريا لنوعين من الطفرات هي المطفرات الكيميائية (Chemical mutagenes) والمطفرات الفيزيائية (Physical mutagenes)بمعاملة العزلة المحلية بهذه الأنواع من عوامل انزيم اللايبيز (٨) ، فقد تم التوجه إلى معاملة العزلة المحلية بهذه الانواع المختلفة من عوامل التطفير لغرض البحث في امكانية الحصول على أجيال التطفير التي تؤدي إلى زيادة كفاءتها الانتاجية . فبعد أن اثبتت تخمرات الحالة السائلة كفاءة العزلة المحلية Serraria odorifier SME14 في انتاج

جديدة من الخلايا الطاهرة تتفوق على النوع البري في انتاج اللايبيز وكانت النتائج كما يلي-:

التطير الفيزيائي(Physical mutagenesis)

للاشعة فوق البنفسجية تأثيرات مختلفة في الخلايا ، وهذه التاثيرات تعتمد على عدة عوامل منها الطول الموجي والكثافة ومدة التعرض، وتؤدي هذه التأثيرات الى حدوث طفرة أو موت الخلية (٢) ، ووفق النتائج المبينة في الشكل (١) تم الحصول على عزلة مطفرة ذات انتاجية عالية التعرض للاشعة فوق البنفسجية لمدة ١٢ دقيقة ، إذ اعطت اعلى انتاجية بلغت ٩،٧٨٧ وحدة / مليلتر . ويعزى تأثير التطفير بالاشعة فوق البنفسجية الى تكوينها المزدوجات البريميدين مما يؤدي الى توقف تضاعف الدنا . أن نتائج هذه الدراسة يبين تاثر انتاج انزيم اللايبيز بعملية التطفير الفيزيائي . وتعد هذه النتائج مماثلة لتلك التي ذكرها (٣) الذي اشار الى امكانية زيادة انتاجية اللايبيز من ١٣٠ الى ٦٧٠ مايكرومول من الاحماض الدهنية المتحرر لدى تطفير الفطر Rhizopus arrhizusباستخدام للأشعة فوق البنفسجية والأزردين (Aziridine)

توصل Gao وجماعته عام (٢٠٠٠) الى تطوير انتاجية العزلة Pseudimonas spp لانتاج الايبيز باستخدام الاشعة فوق البنفسجية ومركب (NTG (Nitrosoguanidine التي اعطت زيادة مقدارها ٣،٢٥ مرة.

التطغير الكيميائي (Chemical mutagenesis)

معاملة الخلايا بالكولجسين بعد الكولجسين من مشتقات Coleemid وهو من القلويدات ، ذو وزن جزيئي ٣٩٩ يستخلص من نبات عشبي له استعمالات عديدة منها دوره في Autopolyploidy في النبات والحيوان

والكائنات المجهرية ويستعمل لمعالجة السرطان ومعالجة Gout داء الملوك (١٢).

يوضح الشكل (٢) فعالية انزيم اللايبيز بعد معاملة وسط الانتاج بالكولجسين بتراكيز تراوحت بين(٠،٠٥-٠،٤) إذ ازدادت فعالية الانزيم بزيادة تركيز الكولجسين المضاف لوسط الانتاج إذ بلغت الفعالية الانزيمية ٩٣،١ وحدة / مليلتر عند تركيز ٠,٠٥% وازدادت الفعالية طرديا مع زيادة التراكيز ، إذ بلغت ٨،٣٨٦ وحدة / مليلتر عند تركيز ٠,٤% إذ ذكر كل من (١٢) ، أن الكولجسين يلعب دورا في زيادة انتاج الانزيم من خلال ايقاف عملية انفصال الكروموسومات اثناء دور انقسام الخلية فتبقى الكروموسومات متضاعفة في نواة واحدة بدلا من توزعها في نواتين .(Autopolyploidy) كما اتبعت عدة طرائق في معرفة تضاعف عدد الكروموسومات في الخلايا (Polyplosdy)من خلال حساب عدد الكروموسومات في النوى وقياس حجم النواة وتعيين محتوى الخلية من المادة الوراثية (٥).

استعمل الكولجسين في معاملة الخلايا الحيوانية والنباتية للحصول على خلايا تحوي متعددة من الكروموسومات والتغيرات التي تحدث لهذه الخلايا وامكانية توليد اصناف او اجيال تحمل صفات مرغوبة (٤).

جرت محاولة أخرى في زيادة انتاجية انزيم اللايبيز عن طريق الحصول على سلالات طائرة منها لتحسين الانتاجية ولكن بمعاملة اللقاحالبكتيري بالتراكيز السابقة نفسها . يلاحظ من النتائج الموضح في الشكل (٣)زيادة طفيفة في الانتاجية ، إذ ازدادت الفعالية الانزيمية عند التراكيز ٠,٠٠% و ٠,١٪ و ٠,٢٪ وانخفض عند التراكيز ٠,٤% ، وان حموضة

الوسط الزرعي لها دور في تغير مركب الكونجسين واختلاف تاثيره في انتاجية الانزيم مسببة عدم قدرة الكولجسين على نفوذه للحلية (١٢).

٢-معاملة الخلايا بصبغة الاكردين البرتقالية

جرت محاولة لزيادة انتاجية انزيم اللاييبز عن طريق المطفرات الكيميائية باستخدام صبغة الاكردين البرتقالية بتراكيز ٢٥ و ٥٠ و ١٠٠ مايكروغرام / مليلتر ، وتشير النتائج الشكل (٤) انخفاض الكفاءة الانتاجية بزيادة تراكيز الصبغة ، إذ بلغت اعلاها عند التركيز ٢٥ مايكروغرام /مليلتر بمقدار ٥،١٤ وحدة مليلتر ، بعدها انخفضت الانتاجية بشكل كبير إذ بلغت ٠،٦٧ وحدة / مليلتر عند تركيز ١٠٠ مايكروغرام / مليلتر.

اشارت المصادر العلمية الى امكانية زيادة الكفاءة الانتاجية لبكتريا ٨٠٠٠ S. Morcescens عن طريق تعريضها للمطفرات الكيميائية باستخدام وبلغت انتاجية N-methyl-N-nitro-Nitrospguandine (MNNQ) المطفر العزلة المطفرة ٩٥ وحدة / مليلتر اكثر من العزلة الاصلية (٩) وبشكل عام يلاحظ ان عملية التصفير الفيزيائي تكون أكثر فاعلية من عملية التطفير الكيميائي التي تميزت بكفاءة انتاجها العالي من الاييبز .

المصادر

1. Benedik. M.J. and Strych. U. (1998). S. Marcescens and its nucleases. FEMS Microbiology Letters. 165:1.

2. Boyed. R. And Hoerls. B.(1977). Basic Medical Microbiology Litter. Brown and Compy. Boston.

3. Chattopadhyay, M.; Banik. A.K. and Raychaudhuri, S. (1999). Production and purification of lipase by a nutant strain of Rhizopu. Foluia. Microbiology, 44 (1): 37-40.

4. Cox. D.M. (1973). A quantitative analysis of colcemide induced chromosomal

nondisjunction in chinese hamster cells in vitro. Cytogent Cell Gener. 21:165-175.

5. Essers. K. And Kuenen. R. (1967). Genetic of fungi. Springer-verlag. New York.

6. Gao. X.G.: Gao, S. G. and Zhang. K.C. (2000). Production catalysis of lipase from a newly isolated Pseudomonas strain. Enzyme and Microbial Technology.27(1-2): 74-82. (With line).

7. Holt, J.G: Krieg. N.R.: Sneath, J. Staley.J. And Williams. S. T. (1996). Bergey's Mannual of determinative Bacteriology. (9th ed.).

8. Hassan. S. Essam F. Al-Jumaily and Muntaha A. Al-Safar (2005) Production of lipase by Serratia odorifera SME14 using liquid state fermentation. J. Biotechnology. Vol.7 No. 1. P:51-62.

9. Road. E.: Akatau, H.: Sakurai, N.: Idea. A.M.: Proverbs. H. and Shibata. T. (2001).

Isolation and analysis of lipase-overproducing mutants of Serratia marcescens. J Biosci. Bioeng. 91(4):409-415.

10-Liebeton, K.; Zachariasm, A. And Karl-Erich, J. (2001). Disulfide bond in Pseudomonas.

aeruginosa lipase stabilizers the sturcture but is not required for interaction with its foldase.J. Bacteriology.vol. 183.(2):579-603.

11. Movitz. J. (1974). A study on the biosynthesis of protein A in Staphylococcus aureus. Eur. J. Biochem. 48:131-136.

12. Toyama, H. and Toyama, N. (1990). Autopolyploid formation of Trichoderma ress/QM9414 by colchicines treatment... Fermentation and Bioenginerring.

69(1):51-53.

13.Bier, M. (1955). Lipase in Methods in Enzymology, Vol.(1): 103-107.Academic press.

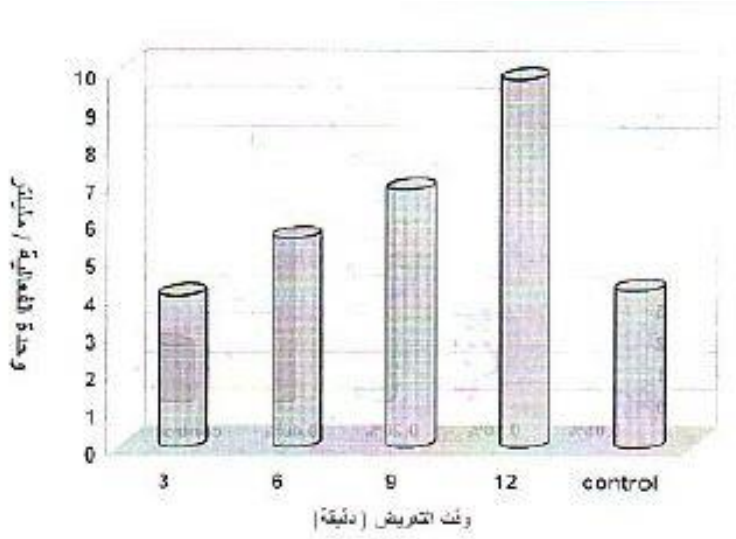
14. Rodina. A.G. (1972). Laboratory Methods in Aquatic Microbioogy.vol. 8pp:214-226.

Efect of Some Chemical and Physical Mutagens on the Serratia oderifer SME14 on Lipase production

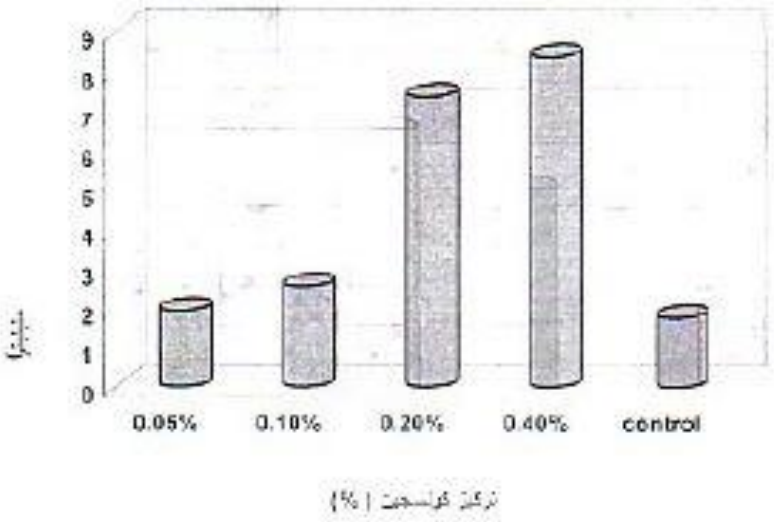
Essam F. Al-Jumaily Biotechnology Dept., Genetic Enginerring and Biotechnology Institute-Baghdad University- Iraq

Abstract

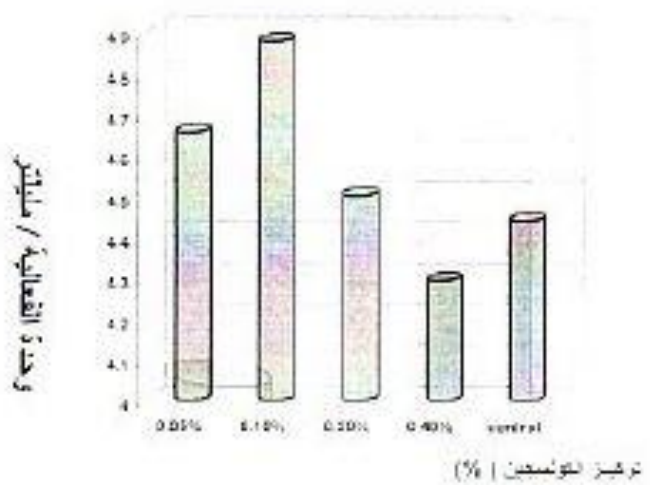
The attempt to increase lipase production, the local ioslate Serratia odorifer SME14 was subjected to some chemical mutagenes using colchicine, acridine orange and Phyysical mutagenes using UV light to produce mutant with high productivity. The results indicated that physical mutagensis produced enzyme activity about 9.79 unit/ ml in comparision with production of chemically mutagenized.



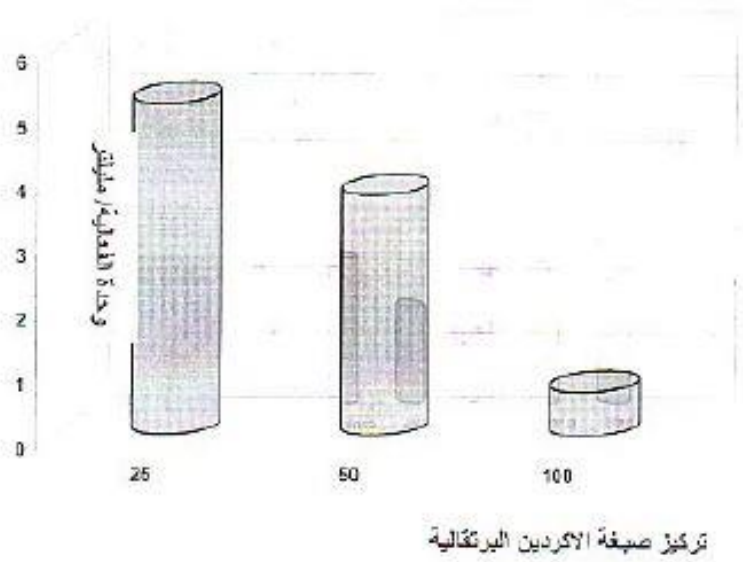
الشكل (١) تأثير التطغير الفيزيائي بالأشعة فوق البنفسجية في كفاءة انتاج الأنزيم من العزلة المحلية Sordorifera SME14



الشكل (٢) : فعالية انزيم اللايبيز للعزلة المحلية S.odorifer SME14 عند زراعتها في وسط الانتاج بعد اضافة تراكيز مختلفة من الكولجين وحضنه درجة حرارة ٢٨ م لمدة ٤٨ ساعة.



الشكل (٣) فعالية اللايبيز للعزلة المحلية S.odorifer SME14 عند معاملة اللقاح البكتيري بتراكيز مختلفة من الكولجسين (%) وزراعتها في وسط الانتاج وحضنه بدرجة حرارة ٢٨ منوي لمدة ٤٨ ساعة.



الشكل (٤) : فعالية انزيم اللايبيز للعزلة المحلية S. Odorifer SME14 عند زراعته في وسط الانتاج بعد معاملة الخلايا بتراكيز مختلفة من صبغة الاكردين البروتقالية وحضنه بدرجة حرارة ٢٨ منوي لمدة ٤٨ ساعة.