الطوافر الفاقدة لانتاج الكراميسيدين (S) من عزلة محلية *Bacillus brevis* ودورها في تكوين الابواغ

صبحي جواد حمزة[1]، حسين حسن عمر خانقاه[2]، هادي رحمن رشيد[3]، علاء شويف عباس[3]

[1] قسم التقانات الاحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد

[2] كلية العلوم، الجامعة المستنصرية

[3] قسم التقنيات الزراعية، وزارة العلوم والتكنولوجيا

الخلاصة

تم الحصول على طوافر عديدة باستخدام العامل المطفر النتروزوكوانيدين (MNNG) بتركيز 1000 مايكغم / مل والاكريدين البرتقالي بتركيز 2 ملغم / مل . وجد بان هناك علاقة بين فقدان صفة الانتاجية للمضاد من قبل العزلة *Bacillus brevis* Bh5 ومقاومتها للمضاد الحيوي الكريبتومايسين حيث ان مقاومة العزلات الطافرة ضعف مقاومة العزلة البرية . وجد بانه ليس هناك علاقة بين انتاج الكراميسيدين (S) وتكوين الابواغ حيث تكونت الابواغ الداخلية على الرغم من فقدان صفة انتاج المضاد . كذلك وجد ان جميع الابواغ تمتلك نفس المقاومة للحرارة وان المضاد الكراميسيدين (S) ليس له تأثير على مقاومة الابواغ للحرارة .

المقدمة

يتم بناء المضادات الببتيدية وفق طريقة تزامنية تشترك بها الرايبوسومات التي تسمى الطريقة اللارايبوسومية وتكون على مراحل تسمى (البداية ، الاستطالة ، الانتقال ، النهاية) . حيث تحتاج هذه العملية الى الأحماض الامينية ومجموعة الادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) وايون المغنيسيوم [1،2،3] .

المضاد الحيوي الكراميسيدين (S) عبارة عن ببتيد عشري (Decapeptide) حلقي الشكل ويشتمل على سلسلتين ببتيديتين متماثلتين خماسية الببتيد وتضم الاحماض الامينية الفالين ، الفنيل الانين ، البرولين ، الاورنيثين ، الليوسين [4] . يحتاج بناء هذا المضاد الى انزيمين هما انزيم البناء الاول والثاني (GS2 ، GS1) ، الانزيم الاول ويسمى بالانزيم الثقيل Heavy enzyme ذو وزن جزيئي (280000) دالتون ويعمل على تنشيط الاحماض الامينية (البرولين ، الفالين ، الاورنيثين ، الليوسين) والانزيم الثاني ويسمى Light Enzyme ذو وزن جزيئي (100000) دالتون ويعمل على تنشيط الحامض الاميني الفنيل الانين [5] .

ان هذين الانزيمين يشفران عن طريق اوبرون موجود على الكروموسوم ذو حجم (9.5) كيلو زوج قاعدة والذي يطلق عليه (grs) ويتكون من ثلاث جينات محمولة على نفس الكروموسوم ويسمى الجين الاول grs A ويشفر الى [536 ، 126] كيلو دالتون من انزيم البناء الاول ، والجين الثاني ويسمى grs T ويشفر الى مادة بروتينية غير معروفة ذات حجم (19 ، 30) كيلو دالتون والجين الثالث grs B حيث تشفر نهايته لانزيم البناء الثاني [1] .

هناك رأيين مختلفين حول علاقة انتاج المضادات الببتيدية بتكوين الابواغ الداخلية حيث يقر الرأي الاول بوجود ارتباط بين انتاج هذه المضادات وتكوين الابواغ الداخلية في جنس البكتريا العصوية ، فالكائنات المنتجة لهذه المضادات تحفز على تكوين الابواغ الداخلية بصورة كبيرة وينخفض تكوين الابواغ عندما يقل الانتاج ، فقد وجد ان السلالة الطافرة *Bacillus subtilis* الفاقدة لصفة انتاج المضاد الببتيدي (subtilin) لاتستطيع تكوين الابواغ الداخلية [6] . اما اصحاب الرأي الثاني فيعتقدون بانه ليس هناك ارتباط بين انتاج هذه المضادات وتكوين الابواغ الداخلية ودليلهم على ذلك ان السلالة الطافرة *Bacillus licheniformis* لاتستطيع انتاج المضاد الببتيدي (Bacitracin) [7] .

يهدف البحث الى تحديد العلاقة بين تكوين الابواغ الداخلية وانتاج المضاد الحيوي في العزلات الطافرة .

المواد وطرق البحث

دراسة التركيز الامثل للعامل المطفر

استخدمت العزلة المحلية البكتريا العصوية *Bacillus brevis* Bh5 في هذه الدراسة ، وحضنت العزلة في وسط هانسون للتبويغ في حاضنة هزازة وبدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة [8] . اتبعت الطريقة الموصوفة في [9،10] لدراسة تركيز العامل المطفر الامثل النتروزوكوانيدين (MNNG) وبتراكيز مختلفة [100 – 1250] مايكغم / مل . كما اتبعت الطريقة الموصوفة في [11] لدراسة تركيز العامل المطفر الامثل الاكريدين البرتقالي وبتراكيز مختلفة (1–5) ملغم / مل .

اجري العد الحي للخلايا باستخدام طريقة الصب بالاطباق وباستعمال وسط الاكار المغذي ، اختير افضل تركيز للعامل المطفر وفق نسبة الخلايا المقاومة للقتل ثم اعتمد في تجارب التطفير اللاحقة .

الكشف عن العزلات الطافرة

استخدمت تقنية الزرع بالبقع وحسب الطريقة الموصوفة من قبل [12] باستخدام السلالة *Staph. aureus* ATCC 25923 للاختبار ، استدل على انتاج المضاد بوجود هالة شفافة حول المستعمرة . كما استخدمت تقنية طبق

الستربتومايسين المتدرج والموصوفة من قبل [14] وباستعمال وسط المغذي الصلب الحاوي على 100 مكغم / مل من المضاد الحيوي الستربتومايسين .

تقييس حساسية العزلات للمضاد الحيوي الستربتومايسين

قدر تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) ضد العزلة قيد الدراسة باستخدام وسط المرق المغذي وتراكيز متدرجة من المضاد الحيوي الستربتومايسين (50 – 250) مكغم / مل واعتبر التركيز المثبط الأدنى ذلك المعد في اختفاء النمو

اختبار العزلات الطافرة الفاقدة انتاج المضاد

استخدم وسط كورشاو ... لتنمية العزلة قيد الدراسة وفي نفس الظروف السابقة ولمدة (6) ايام . تم تقدير كمية المضاد المنتج بالاعتماد على طريقة الاقراص الورقية وحسب الطريقة الموصوفة في [8 ، 11] . كما استخدمت طريقة التقدير الكلي للمضاد من خلال تقدير الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر باستخدام جهاز UV-spectrophotometer حسب الطريقة الموصوفة في [14] كما استخدمت طريقة الكروموتوغرافي الطبقة الرقيقة TLC لتأكيد النتائج [8] وللكشف عن المضاد اختبرت العزلات الطافرة ، وخضعت للتشخيص وفق المخططات التصنيفية المذكورة في [15 ، 16] .

دراسة مقاومة الابواغ للحرارة

اتبعت الطريقة الموصوفة في [8 ، 11] وباستخدام العالق البوغي للعزلة البرية قيد الدراسة وثلاث مجاميع اخرى حضنت الانابيب بالحمام المائي الهزاز وبدرجة (80) °م وبالاوقات (15 ، 60 ، 80) دقيقة اجري التعداد الحي للخلايا بعد انتهاء اوقات التحضين وباستخدام طريقة العد بالاطباق .

النتائج والمناقشة

التركيز الامثل للنايتروزكواندين والاكردين البرتقالي

تم عزل بكتريا من الترب العراقية لها القابلية على انتاج المضاد الحيوي الكراميسيدين (S) وشخصت العزلة ذات الانتاجية العالية وشخصت على انها *Bacillus brevis* واعطيت الرقم Bb3 [17] .

درس تأثير اضافة تراكيز مختلفة من العامل المطفر النايتروزكواندين والاكردين البرتقالي على انتاج مضاد الكراميسيدين (S) من العزلة المحلية *B. brevis* Bb3 واظهرت الدراسة ان افضل تركيز MNNG (1000) مكغم / مل حيث كانت نسبة القتل اكثر من 50 % جدول (1) ونسبة الخلايا المقاومة 3.48 % ، هذه النتيجة مطابقة مع ما توصل اليه الباحث في [9 ، 10] وقد يعزى سبب القتل الى حدوث طفرة التحول Transition mutation [12] اما في حالة العامل المطفر الاكردين البرتقالي فقد اعطى التركيزين (3 ، 2) مكغم / مل نتائج متقاربة من حيث نسبة القتل بينما التركيزين (5 ، 4) ملغم / مل اعطى نسبة ضئيلة من الخلايا المقاومة للقتل جدول (2) وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه الباحث ماراهيل وجماعته [11] عند تطفير خلايا السلالة *B. brevis* ATCC 9999 المنتجة للكراميسيدين (S) باستخدام (2) مكغم / مل من الاكردين البرتقالي حيث كانت نسبة الخلايا المقاومة للقتل 5 % وربما يعود سبب قتل الخلايا الى كون الاكردين البرتقالي يدخل بين نيوكليوتيدات الحلزون المزدوج مؤديا الى تقريب جزيئة (DNA) مما يسبب الطفرة الوراثية [18] وعليه اختير التركيز 1000 مكغم / مل و 2 مكغم / مل لاجراء تجارب التطفير.

جدول (1): تراكيز مختلفة للعامل المطفر النايتروزكواندين (MNNG) والنسبة المئوية للخلايا المقاومة للقتل.

تركيز العامل المطفر MNNG مكغم / مل	نسبة الخلايا المقاومة للقتل %
100	76.7
250	65.1
500	51.1
1000	3.48
1250	2.79

جدول (2): تراكيز مختلفة للعامل المطفر الاكريدين البرتقالي والنسبة المئوية للخلايا المقاومة للقتل.

تركيز العامل المطفر الاكريدين البرتقالي مكغم / مل	نسبة الخلايا المقاومة للقتل %
1	13.18
2	5.09
3	3.6
4	0.091
5	0.031

الكشف عن العزلات الطافرة

تم الكشف عن العزلات الطافرة باستخدام التقنيتين التاليتين :

1. تقنية الزرع بالختم

تم الكشف عن العزلات الطافرة بفعل 1000 مكغم / مل من المطفر MNNG حيث اجريت غربلة (1714) عزلة طافرة باستخدام التقنية اعلاه وضد السلالة الحساسة *Staph. aureus* حيث اظهرت الغربلة ان الغالبية العظمى من العزلات الطافرة قلت كفائتها بانتاج المضاد وان (4) عزلات طافرة فقدت صفة الانتاج بصورة نهائية ، واستخدمت كذلك التقنية للكشف عن العزلات الطافرة بفعل (2) مكغم / مل من الاكردين البرتقالي واجريت عملية غربلة (370) عزلة طافرة واظهرت النتائج ان العزلات قلت كفائتها بانتاج المضادات وان (9) عزلات فقدت صفة الانتاج بصورة نهائية .

2. تقنية طبق الستربتومايسين المتدرج

زرعت 13 عزلة طافرة فاقدة لصفة انتاج الكراميسيدين بصورة نهائية على اطباق بتري الحاوي على وسط الستربتومايسين المتدرج واظهرت جميع العزلات قابلية على النمو في الوسط المتدرج وجاءت هذه النتيجة مطابقة لما اشار اليه الباحثان ماكرجي ونالس [19] في كون جميع العزلات الطافرة من البكتريا *B. brevis* الفاقدة لانتاج المضاد

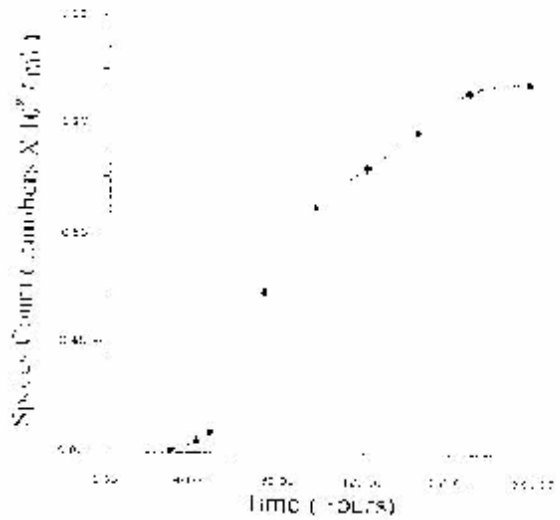
الكرامفينيكول (9) تظهر مقاومة لتراكيز عالية من المضاد الستربتومايسين بينما العزلة البرية المنتجة للمضاد تكون حساسة . اختيرت عزلتين طافرتين فاقدتين للصفة لإكمال الدراسة بعد تقييم انتاج المضاد باستخدام طريقة الأقراص الورقية وطريقة الثلاث تقسيم واعطيت رموز تصنيفية BbH55 , BbH59 واخضعتا للتشخيص واعتمادا على المخططات التصنيفية المنشورة في [15 ، 20] . واظهرت نتائج الفحوصات المظهرية والمجهرية والكيموحيوية للعزلات الطافرة عودة للنوع *B. brevis* تشير النتائج المستحصل عليها الى العاملين المطفرين اللذين استخدما ادت الى حدوث طفرة سلبية للعزلات الطافرة اما فقدت انتاجيتها او فقدتها بصورة كاملة . وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه مارشال وجماعته [?] حيث تم الحصول على عزلات فاقدة صفة الانتاج والاخرى ذات انتاجية ضعيفة باستخدام نفس التراكيز الفعالة [?] وان هذه الحالة قد تعود الى حدوث طفرة وراثية تؤدي الى انتاج انزيم البناء الاولي الفاقد لعملية تثبيط الحامض الاميني الفنيل الانين والانزيم البناء الاولي والثاني اساسيين لعملية التثبيط لجميع الاحماض الامينية [?] .

3. تحديد MIC لمضاد الستربتومايسين ضد العزلة البرية والعزلتين الطافرتين

وجد ان تركيز (20) مكغم / مل من المضاد الستربتومايسين كافي لتثبيط نمو العزلة البرية اما بالنسبة للعزلتين الطافرتين BbH55 , BbH59 *B. brevis* فان التركيز 200 مكغم / مل هو الامثل للتثبيط .

4. تكوين الابواغ من العزلتين الطافرتين

درس تكوين الابواغ للعزلتين الطافرتين *B. brevis* BbH55 , BbH59 من خلال النمو في وسط كورنشوف السائل وتبين ان العزلتين الطافرتين تكون الابواغ بصورة طبيعية رغم فقدانها صفة انتاج المضاد حيث بدأ تكون الابواغ بعد (30) ساعة من الحضن (دخول العزلتين طور الاستقرار) واستمر ازدياد اعداد الابواغ بشكل ملحوظ لغاية (130) ساعة من الحضن ليستمر بعدها عدد الابواغ بالاستقرار شكل (1) وعند مقارنتها بالعزلة البرية *B. brevis* Bb3 على تكوين الابواغ نلاحظ عدم وجود اختلاف بينهما مما يرجح عدم وجود علاقة بين انتاج مضاد الكرامسيدين [8] وتكوين الابواغ وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحثون في [8 ، 11] حيث وجدوا ان السلالات الطافرة الفاقدة لانتاج المضاد تكون الابواغ بصورة طبيعية اسوة بالسلالة البرية *B. brevis* ATCC9999 ولكنها مخالفة لرأي الباحثين في [7 ، 21] الذين يعتقدون ان هناك ارتباط بين انتاج المضاد وتكوين الابواغ الداخلية .



الشكل (1): عدد الابواغ المتكونة من العزلة الطافرة *B. brevis* BbH55 في وسط كورنشوف السائل

5. تأثير فترة التعرض للحرارة على تكوين الابواغ

درس درجة الحرارة (80) م في الوقتين (60 و 180) دقيقة على تبوغ العزلة البرية *B. brevis* Bb3 والعزلتين الطافرتين BbH55 , BbH59 *B. brevis* واظهرت الدراسة باستخدام طريقة العد بالاطباق تزايد قتل الابواغ مع الوقت مع ثبوت درجة الحرارة ومن ملاحظة الجدول (3) نجد ان نسبة الابواغ المقاومة للحرارة وللعزلات الثلاثة متقاربة جدا مما يدل على ان فقدان صفة انتاج المضاد لم تؤثر على مقاومة الابواغ للحرارة وقد يعزى سبب المقاومة الى طبيعة الجدران السميكة للابواغ [?] وجاءت هذه النتيجة مطابقة لما توصل اليه الباحثان [8] عند دراسة تأثير درجة الحرارة (80) م وباوقات مختلفة على ابواغ السلالة البرية *B. brevis* ATCC9999 المنتجة للكرامسيدين (9) وابواغ السلالات الطافرة الفاقدة لصفة الانتاج حيث وجد ان ابواغ جميع السلالات تمتلك نفس المقاومة وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه مارشال وجماعته [11] عند دراسة تأثير الحرارة على الابواغ الى السلالات السابقة ووجدوا ان ابواغ السلالات الطافرة اكثر حساسية للحرارة من ابواغ السلالة البرية .

جدول (3): مقاومة ابواغ السلالة البرية والسلالتين الطافرتين لدرجة الحرارة (80) م وباوقات مختلفة

رمز العزلة	نسبة الابواغ المقاومة للقتل % 60 دقيقة	نسبة الابواغ المقاومة للقتل % 180 دقيقة
Bb3	63.8	14.5
BbH55	62	13.7
BbH59	59.8	13.6

المصادر

1. Kurahashi, K. (1974). Biosynthesis of small peptide. Am. Rev. Biochem. 43 : 445 – 459 .
2. Kleinkauf (1979). Antibiotic polypeptide – biosynthesis on multifunctional protein templates. J. Med. Plant Res.
3. Hori, K., and Kurotsu, T. (1997) Characterization of gramicidin (s) synthetase aggregation substance : control of gramicidin (s) synthetase by its product, gramicidin (s). J. Biochem., 122 : 606 – 615 .
4. Katz, E., and Demain, A.L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, Biogenesis, and possible functions. Bacterial. Rev., 41 (2) : 449 – 472 .
5. Kratzschmar, J., Kraus, M. and Marahiel, M. A. (1989). Gramicidin (s) biosynthesis operon containing the structural genes *grs* A and *grs* B has open reading frame encoding protein homologous to fatty acid thioesterase. J. Bacteriol. 171 (10) : 5422 – 5429 .
6. Ray, B., and Bose, S.K.K. (1971). Polypeptide antibiotic negative spore forming mutant of *Bacillus subtilis*. J. Gen. Appl. Microbiol., 17 : 491 – 498 .
7. 7. Haavik, H. I. and Thomassen, S. (1975). A bacitracin – negative mutant of *Bacillus licheniformis* which is able to sporulate. J. Gen. Microbial. 46 : 451 – 458.
8. Piret, J. M. and Demain, A. L. (1983). Sporulation and spore properties of *Bacillus brevis* and its gramicidin (s) mutant. J. Gen. Microbial. 129 : 1309 – 1316 .
9. Shimura, K., Iwaki, M., Kanda, M., Hori, K., Kaji, E., Hasegawa, S. and Saito, Y. (1974). On the enzyme system obtained from some mutants of *Bacillus brevis* deficient in gramicidin (s) formation. Biochem. Biophys. Acta 358 : 577 – 587 .
10. 10. Iwaki, M., and Shimura, K. (1972). Some mutant of *Bacillus brevis* deficient in gramicidin (s) formation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 48 (1) : 118 – 153 .
11. 11. Marahiel, M. A., Danders, W., Kraus, M. and Kleinkauf (1979). Biological role of gramicidin (s) in spore functions. Studies on gramicidin (s) – negative mutant of *Bacillus brevis* ATCC 9999. Eur. J. Biochem. 99 : 49 – 55 .
12. Carlton, B. C., and Brown, B. J. (1981). Gene mutation. In "Manual of methods for general bacteriology". PP. 222 – 242. Gerhardt, P. Murray, R.G.E. Cost low, R.N., Nester, E.W., Wood, W. A., Krieg, N.R. and Philips, G.B. (eds), American Society for microbiology, Washington.
13. Egorove, N.S. (1985). Antibiotics a scientific approach. Mir publishers, Moscow .
14. 14. U.S.P (The united states pharmacopia). 1990. Gramicidin. vol. (xxii) NF (xvii) PP. 614 – 615 . United states pharmacopeial convention. Inc.
15. Claus, D., and Berkeley, R.C.W. (1986). Genus *Bacillus*. In : " Berge's manual of systematic bacteriology " vol (2), pp: 1105 – 1139. Sneath, P.H.A. Marin, N.S., Sharpe, E. (eds). The William's and Wilkins Co. Baltimore.
16. Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Logan, N.A., and Donnell, A.G. (1981). The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In : " The prokaryotes " Vol (2), pp : 1711 – 1742 . Starr, M.P., Stolp, H. Truper, H.G., Balows, A., and Schegel, H.G (eds) . Springer – velag, Co. Berlin. Heidelberg. New York .
17. Hadi Rahman Rasheed 1999. Improvement study of Gramicidin (s) produced by *Bacillus brevis* from Iraqi soil. M.Sc. thesis submitted to College of Science , Al Mustansiriya University , Iraq .
18. Venetia A.S. and Jon R. (1987). In vivo and In vitro Mutagenesis. P 163-218. In : Microbial genetics applied to biotechnology. Croom Helm London and Sydney.
19. Mukherjee, P., and Paulus, H. (1977). Biological function of gramicidin : Studies on gramicidin – negative mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 (2) : 780 – 784 .
20. Gibson, T., and Gordon, R.E. (1974). Genus *Bacillus*. In : " Bergey's manual of determinative bacteriology ", 8th ed, pp. 529 – 555. Buchaman, R.E. and Gibb sons, N.E (eds). The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
21. Sarkar, N., and Paulus, H. (1972). Function of peptide antibiotic in sporulation. Nature (London) 239 : 228 – 230 .
22. Gould, G.W. and Dring, G.J. (1975). Role and expanded cortex in resistance of bacterial endospore. In : " Spore ". Vol. (VI) Gerhardt, P. Cost low, R.N. and Sadoff, H.L. (eds). Washington D.C. American Society for Microbiology.

Abstract

A number of gramicidin negative mutants belongs to *Bacillus brevis* were developed using acridin orange and MNNG at 2 and 1000 mg/ml respectively. A five fold increase in resistance toward streptomycin was developed in gramicidin negative mutant as compared to that of wild type.

However , no relationship between gramicidin (s) production and sporulation was observed, as long as negative mutant continue to sporulate normally. Synthesis of gramicidin (s) by the strain was found having no effect on resistance of spores to heat.