دراسة بعض العوامل المؤثرة في انتاج المضاد الحيوي الكرامسيدين من جراثيم *Bacillus brevis* المعزولة محليا

صفاء عبد لطيف المعيني*

تاريخ قبول النشر 2007/1/28

الخلاصة:

درست بعض الظروف المزرعية المثلى في انتاج المضاد الحيوي الكرامسيدين من جراثيم ***Bacillus brevis*** المعزولة محليا اذ لوحظ ان افضل وسط للانتاج هو المتكون من 1% كلوكوز كمصدر كاربوني و1%كلوريد الامنيوم كمصدر نتروجيني و0.5%من فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين كمصدر للفوسفات اللاعضوي وكان التركيز 0.6%هو الامثل للفينايل النيين وكان الرقم الهيدروجيني الامثل هو 6.0 عند درجة حرارة 30 درجة مئوية .

استخلص المضاد الحيوي من وسط الانتاج من خلال الترسيب بالحامض ومن ثم الاستخلاص بالمذيبات العضوية مثل الايثر والاسيتون وتم تجزئة المضاد الحيوي الكرامسيدين الى مكوناته باستخدام تقنية كروموتوغرافا السائل عالية الكفاءة High Performance Liquid Chromatography(HPLC) اذ لوحظ بان الكرامسيدين يتكون من ثلاث انواع هي C,B,A

المقدمة :

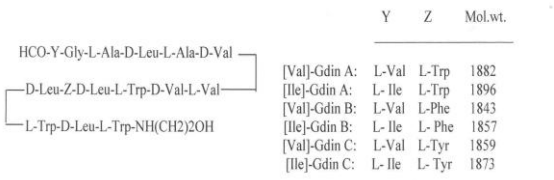
يعد المضاد الحيوي الكرامسيدين من المضادات ذات التاثير المثبط والقاتل على بعض الجراثيم الموجبة لملون غرام وبتركيز 1-30 مايكروغرام /مليليتر وكذلك له تاثير ضد الجراثيم السالبة لملون غرام عند زيادة التركيز من 10-15 اضعاف التركيز المثبط وله فعالية ضد الفطريات المرضية (1).

ينتج المضاد الحيوي الكرامسيدين من قبل جراثيم Bacillus brevis وهي جراثيم عصوية موجبة لملون غرام ،هوائية ،مكونة للابواغ(2).

يعد الكرامسيدين من المضادات الحيوية الببتيدية ويتكون من خمسة عشر حامضا امينيا،نصف هذه الاحماض تكون بالشكل D والتي تترتب بشكل منتظم مع الاحماض الامينية ذات الشكل L (3).

يتركب الكرامسيدين من ثلاث انواع وهي الكرامسيدين C,B,A وتتكون من احماض امينية خطية التي تحمل سلاسل جانبية هايدروفوبية باستثناء الكلايسين ويشغل النهاية الامينية الاحماض الامينية الفالين او الايزوليوسين اما الموقع الحادي عشر فيشغل من قبل الحامض الاميني التربتوفان في الكرامسيدين A والفنيل النين في الكرامسيدين B والتايروسين في الكرامسيدين نوع C (4).

يمثل الشكل التالي مكونات المضاد الحيوي الكرامسيدين (5).



	Y	Z	Mol.wt.
[Val]-Gdin A:	L-Val	L-Trp	1882
[Ile]-Gdin A:	L- Ile	L-Trp	1896
[Val]-Gdin B:	L-Val	L-Phe	1843
[Ile]-Gdin B:	L- Ile	L- Phe	1857
[Val]-Gdin C:	L-Val	L-Tyr	1859
[Ile]-Gdin C:	L- Ile	L- Tyr	1873

جرت محاولات كثيرة من قبل عدد من الباحثين لتجزئة الكرامسيين التجاري الى انواعه الثلاثة النقية اذ تمكن الباحث جريجوري وكرج (6) من تجزئة هذا المضاد الحيوي الى مكوناته باستخدام تقنية Counter Current Distribution اما الباحث اوكاموتو وجماعته (7) فاستخدمو تقنية Droplet Counter Current Distribution .

تتاثر قابلية الجراثيم في انتاجها للمضادات الحيوية بعدد من العوامل مثل العوامل الغذائية الموجودة في الوسط الزرعي مثل المصدر الكاربوني والنتروجيني والفوسفات والكبريت والعناصر النادرة وتتاثر ايضا بعدد من العوامل البيئية مثل درجة الحرارة والاس الهيدروجيني.....الخ( ).

لذلك ارتاينا في هذه الدراسة الى دراسة بعض العوامل المؤثرة على انتاج المضاد الحيوي الكرامسيدين من قبل جراثيم B.brevis الى استخلاص وتنقية المضاد الحيوي وتجزئته الى مكوناته باستخدام تقنية كروموتوغرافيا السائل عالية الكفاءة

*جامعة بغداد/معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية

طرائق العمل :

1- تنمية الجراثيم وتحضير اللقاح :

استخدمت هذه الدراسة جراثيم *Bacillus brevis* المعزولة محليا من الترب المحلية والمشخصة وفق باري و جماعته (8) في انتاج المضاد الحيوي الكرامسيدين اذ تم تلقيح 25 ملليلتر من الوسط الزرعي المتكون من المواد والنسب التالية (الفركتوز 1%،خلاصة الخميرة 5%، K2HPO4 0.65 %، KH2PO4 0.17 % ، الفنيل النين 1.2 %، 6H2O،% 0.02 Mg Cl 2 .6H2O 0.002 ، FeCl3 ، %0.001 Mn Cl2.4H2o ، CaCl2.4H2o 0.001 %وزن /حجم وعدل الرقم الهيروجيني الى 7.0 (9) بمستعمرات B.brevis وحضن بدرجة حرارة 37 مئوية مدة 24 ساعة بحاضنة هزازة بسرعة 200 دورة بالدقيقة.بعدها لقح 250 ملليلتر من نفس الوسط باللقاح المحضر في اعلاه و بنسبة (10%)وحضن بنفس الظروف مدة 24 ساعة. حفظ اللقاح في الثلاجة بدرجة حرارة 4 مؤية لحين الاستخدام .

2- اختبار الفعالية الحيوية :

استخدمت السلالة *Staphylococcus aureus* (مجهزة من مركز ابحاث ابن سينا للصناعات الدوائية /وزارة الصناعة و المعادن) في اجراء الفعالية الحيوية للمضاد الحيوي الكرامسيدين وباستخدام طريقة الانتشار في الحفر agar well diffusion (10) وذلك بنشر جراثيم *S. aureus* على وسط الاكار المغذي ثم عمل حفر داخل الوسط ووضع داخلها 0.1 ملليلتر من راشح المزرعة وحضن بدرجة حرارة 37 مئوية مدة 24 ساعة ثم قرأت النتيجة بقياس قطر منطقة التثبيط لنمو الجراثيم بالمليميتر واستخدم مكررين لكل دراسة واستخرج المعدل .

3- تعيين المصدر الكاربوني الامثل لانتاج المضاد الحيوي:

استخدمت المواد التالية الفركتوز ،الكلوكوز،السكروز،الكليسيرول،سترات الصوديوم،اوكزالات الصوديوم ،النشا الذائب كمصدر وحيد في وسط الانتاج المذكور في اعلاه وبتركيز 1% وزن /حجم .لقحت الاوساط الزرعية باللقاح المحضر وبنسبة 10%وحضنت بدرجة حرارة 37 درجة مئوية في حاضنة هزازة بسرعة 200 دورة /دقيقة مدة 48 ساعة .رسبت الخلايا بالطرد المكزي بسرعة 9000 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 4 مئوية مدة 15 دقيقة.اخذ الراشح واجري له اختبار الفعالية الحيوية .

4- تعيين المصدر النتروجيني الامثل في انتاج المضاد الحيوي .

استخدمت مصادر نتروجينية عضوية مثل الكازائين والببتون وخلاصة نقيع الذرة وبنسبة 5% واستخدمت مصادر نتروجينية لاعضوية بتركيز 1% مثل كلوريد الامونيوم ونترات الصوديوم و كبريتات الامونيوم .لقحت الاوساط الزرعية بنسبة 10%وحضنت بدرجة 37 مئوية بحاضنة هزازة بسرعة 200 دورة /دقيقة مدة 48 ساعة .رسبت الخلايا بالطرد المركزي المبرد بسرعة 9000 دورة / دقيقة مدة 15 دقيقة واخذ الراشح واجري له اختبار الفعالية الحيوية.

5- تعيين التركيز الامثل للفينيل النين في انتاج المضاد الحيوي :

استخدمت تراكيز مختلفة من الفينيل النين في وسط الانتاج وبتراكيز (1.6,1.4,1.2,1,0.8,0.6,0.4,0.2,0.0)% وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوية بحاضنة هزازة بسرعة 200 دورة /دقيقة مدة 48 ساعة .رسبت الخلايا بالطرد المركزي المبرد بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة واخذ الراشح واجري له اختبار الفعالية الحيوية .

6- تعيين تركيز الفوسفات اللاعضوي (K2HPO4) الامثل في انتاج المضاد الحيوي:

استخدمت تراكيز مختلفة من مادة (K2HPO4) في وسط الانتاج وبالتراكيز (1,0.8,0.7,0.5,0.3,0.2,0.1,0.0)% وكل على حدة ثم لقحت بنسبة 10% وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوية بحاضنة هزازة بسرعة 200 دورة/دقيقة مدة 48 ساعة .رسبت الخلايا بالطرد المركزي المبرد بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة واخذ الراشح واجري له اختبار الفعالية الحيوية .

7- تعيين الدرجة الحرارية المثلى في انتاج المضاد الحيوي:

لقحت الاوساط الزرعية بنسبة 10% من اللقاح المحضر و حضنت بالدرجات الحرارية(45,42,40,37,34,32,30,28) مؤية في حاضنة هزازة بسرعة 200 دورة/دقيقة مدة 48 ساعة. رسبت الخلايا بالطرد المركزي المبرد بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة وأخذ الراشح وأجري له أختبار الفعالية الحيوية .

8- تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل في انتاج المضاد الحيوي:

عدل الرقم الهيدروجيني للاوساط الزرعية بالارقام (9,8.5,8,7.5,7,6.5,6,5.5,5,4.5,4)وكل على حدة ولقحت بنسبة 10%وحضنت بدرجة حرارة30 مئوية مدة 48 ساعة رسبت الخلايا بالطرد المركزي

المبرد بسرعة 9000 دورة/دقيقة مدة 15دقيقة واخذ الراشح واجري له الفعالية الحيوية .

9- استخلاص وتنقية المضاد الحيوي :

بعد تحديد الظروف المزرعية المثلى لانتاج المضاد الحيوي الكرامسيدين استخلص المضاد الحيوي من وسط الانتاج اعتمادا على الطريقة الموصوفة سابقا (11) .اذ اخذ راشح المزرعة وعدل الرقم لهيدروجيني له الى 4.5 وحفظ بدرجة حرارة 4 مئوية مدة 24 ساعة فصل الراسب المتكون بجهاز الطرد المركزي وبسرعة 10000 دورة /دقيقة مدة 15 دقيقة وبدرجة حرارة 4 مئوية . اذيب الراسب باقل كمية من الميثانول وفصل بالطرد المركزي المبرد بسرعة 10000دورة/ دقيقة مدة 15دقيقة واخذ الراشح واضيف له محلول الملح الفسيولوجي ذو الرقم الهيدروجيني 7.5 وبنسبة حجم /حجم بعدها فصل بالطرد المركزي المبرد بسرعة 10000دورة/دقيقة مدة 15دقيقة.اخذ الراسب واضيف له حجم واحد ايثر وحجمين اسيتون وفصل بعدها بالطرد المركزي المبرد بسرعة 10000دورة /دقيقة مدة 15 دقيقة واخذ الراسب وأذيب بالميثانول ثم جزء باستخدام تقنية كروموتوغرافيا السائل ذات الاداء العالي (HPLC).

10- تجزئة المضاد الحيوي الكرامسيدين باستخدام تقنية HPLC

استخدم جهاز HPLC نوع ShimadzaGA وباستعمال العمود (C18) (2.1ملم×25 سم) واستخدم مطياف الاشعة فوق البنفسجية وعلى طول موجي 220 نانوميتر ويتكون الطور المتحرك mobile phase من محلولين هما الميثانول مع محلول كبريتات الامونيوم بعيارية 0.002 مولار وبنسبة 26:74 وتم حقن العينة بمقدار 20مايكروليتر .

11- تحديد التركيز المثبط الادنى للكرامسيدين :

لقحت عدة انابيب حاوية على 5 مليليتر من الوسط المغذي المضاف له تراكيز مختلفة من المضاد الحيوي الكرامسيدين 100,90,80,70,60,50,45,40,34,30,25,20,1 5,10,8,6,4,2,1 مايكروغرام /مليليتر من الوسط الزرعي بالجراثيم (مجهزة من مركز ابحاث ابن سينا للبحوث الدوائية / وزارة الصناعة والمعادن) التالية وكل على حدة Pseudomonase aeruginosa ,Bacillus subtilis ,S.aureus ,Escherichia coli حضنت بدرجة حرارة 37 مئوية مدة 24 ساعة وحدد التركيز المثبط الادنى للمضاد من خلال اختفاء العكورة (10).

النتائج والمناقشة :

1- تعيين المصدر الكاربوني الامثل :

نلاحظ من خلال الجدول رقم (1)ان افضل مصدر كاربوني هو الكلوكوز اذ كان التثبيط للراشح هو (14) مليميتر مقارنة بالمصادر الكاربونية الاخرى ويعد الكلوكوز من المصادر الكاربونية ذات الجاهزية العالية اذ يكون استهلاكه سريعا وخلال 10-15 ساعة الاولى من فترة الحضن وان فقدان المصدر الكاربوني من وسط الانتاج يؤدي الى دخول العزلة في طور الاستقرار Stationary phase وفي هذ الطور يحصل انتاج المضاد الذي يكون متزامنا مع تكوين الابواغ(12,7).

جدول رقم (1)تاثير المصدر الكاربوني في انتاج المضاد الحيوي الكرامسيدين

	المصادر الكاربونية /التركيز 1%							
	فركتوز	كلوكوز	سكروز	كليسيرول	سترات الصوديوم	اوكزلات الصوديوم	نشا ذائب	بدون مصدر كاربوني
الفعالية الحيوية (معدل مكررين مليميتر)	12	14	12	10	8	8	6	3

2- تعيين المصدر النتروجيني الامثل:

نلاحظ من خلال الجدول رقم (2) ان افضل مصدر نتروجيني هو كلوريد الامونيوم NH4Cl اذ كان معدل قطر التثبيط للراشح (15)مليميتر مقارنة بالمصادر النتروجينية الاخرى ويعد كلوريد الامونيوم من المصادر النتروجينية سريعة الاستغلال مما يؤدي الى تاثير هذا الامر على الانزيمات التي تعمل على المواد النتروجينية المشتركة في عملية تغليف المضادات وبالتالي يؤدي الى خلق حالة كبح او شد (stress) للعزلة الجرثومية وهذا النقص بالمواد الغذائية في الوسط يؤدي الى دخول البكتيا في حالة الاستقرار ومن ثم حصول عملية التبوغ المصاحبة لتخليق المضادات الحيوية(7).

جدول رقم (2)تاثير المصدرالنتروجيني في انتاج المضاد الحيوي الكرامسيدين

	المصادر النتروجينية						
	كازائين 5%	ببتون 5%	نقيع الذرة 5%	كلوريد الامونيوم 1%	نترات الامونيوم 1%	كبريتات الامونيوم 1%	بدون مصدر نتروجيني
الفعالية الحيوية(معدل مكررين مليميتر)	12	12	10	15	12	11	8

3- تعيين التركيز الامثل للفينايل النيين:

نلاحظ من خلال الجدول رقم (3)ان افضل تركيز لمادة الفينايل النيين هو 0.6% اذ كان معدل قطر التثبيط (17) مليميتر مقارنة مع التراكيز المعزولة اذ تحتاج هذه الجراثيم هذه المادة عند با بناء المضاد الحيوي الكرامسيدين اذ تبدا عملي البناء بتفاعل البداية initiation reaction وفيه يتم تنشيط الاحماض الامينية كخطوة اولى اذ يبدا التنشيط بالحامض الاميني الفينايل النيين من النهاية الامينية باتجاه النهاية الكاربوكسيلية (13)

جدول رقم (3) تاثير تراكيز مختلفة من الفينيل النيين في انتاج المضاد الحيوي

	تركيز الفينيل النيين غرام/100مليليتر								
	0:0	0:2	0:4	0:6	0:8	1	1.2	1.4	1.6
الفعالية ا(معدل مكررين مليميتر)	0	8	14	17	14	14	14	12	10

4- تعيين تركيز K2HPO4 الامثل

نلاحظ من خلال الجدول رقم (4) ان التركيز الامثل لمادة K2HPO4 هو 0.5% اذ كان معدل قطر التثبيط(19) مليميتر مقارنة بالتراكيز الاخرى ونلاحظ بان الفعالية تنخفض عند نقصان تركيز K2HPO4وكذلك تنخفض عند زيادة التركيز وهذا يعود الى ان جراثيم Bacillus brevis حساسة لتراكيز الفوسفات وهذا قد يعود الى حدوث التغذية الاسترجاعية بزيادة الفوسفات أو قد نقوم بتثبيط فعالية الفوسفوتيز Phosphatase (14).

جدول رقم (6) تاثير الرقم الهيدروجيني في انتاج المضاد الحيوي

	الرقم الهيدروجيني										
	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8.0	9.0
الفعالية الحيوية(معدل مكررين مليميتر)	2	2	6	17	20	17	16	14	11	4

جدول رقم(4)تاثير تراكيز مختلفة من K_2HPO4 في انتاج المضاد الحيوي.

	تركيز K_2HPo_4 غرام/100مليليتر								
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7	0.9	1
الفعالية الحيوية(معدل مكررين مليميتر)	10	10	14	14	19	15	10	10

5- تعيين الدرجة الحرارية المثلى :

نلاحظ من خلال الجدول رقم (5) ان الدرجة الحرارية المثلى كانت 30 درجة مئوية اذ بلغ معدل قطر التثبيط للراشح (22) مليميتر مقارنة بالدرجات الحرارية الاخرى اذ نلاحظ ان انتاج المضاد الحيوي يبدا بالانخفاض عند زيادة الدرجة الحرارية وذلك لان الدرجة الحرارية العالية ممكن ان تعمل على دنثرة الانزيمات المسوؤلة عن الانتاج المضاد الحيوي(11,7).

جدول رقم (5) تاثير درجة الحرارة في انتاج المضاد الحيوي

	الدرجة الحرارية (مئوية)								
	28	30	32	34	37	40	42	44	45
الفعالية الحيوية(معدل مكررين مليميتر)	16	22	16	18	16	10	10	8	3

6- تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل

نلاحظ من خلال الجدول رقم (6) ان افضل رقم هيدروجيني كان (6) اذ بلغ معدل قطر التثبيط (20) مليميتر ونلاحظ ان الانتاجية تكون قليلة عند الارقام الهيدروجينية المنخفضة والعالية وهذا يفسر بان الرقم الهيدروجيني يؤثر على النشاط الانزيمي وبالتالي يؤثر على انتاج المضاد الحيوي (11,7)

6- تجزئة المضاد الحيوي الكرامسيدين باستخدام HLPC

نلاحظ من خلال الشكل رقم (1) الذي يمثل الاجزاء المفصولة من تقنيةHLPC تكون ستة قمم اذ تمثل القمة الاولى الكرامسيدين نوع C الحاوي على الحامض الاميني الفالين من النهاية الامينية اما القمة الثانية فتمثل النوع C الحاوي على الحامض الاميني الايزوليوسين من النهاية الامينية اما القمة الثالثة فتمثل النوع A الحاوي

على الفالين من النهاية الامينية والقمة الرابعة تمثل النوع A الحاوي على الايزوليوسين من النهاية الامينية اما القمة الخامسة فتمثل النوع B الحاوي على الفالين من النهاية الامينية والقمة السادسة فتمثل الكرامسيدين من النوع B الحاوي على الايزوليوسينن من النهاية الامينية ونلاحظ ايضا من خلال الشكل ان كفاءة المضاد الحيوي هي جيدة جدا وبلغ تركيز المضاد الحيوي 180 مايكرو غرام/مليليتر وهذه النتائج جاءت متطابقة مع نتائج الباحثان اكسلنس وفوكلسانك عند تجزئتهم للكرامسيدين القياسي(5)

زمن الاحتجاز (دقيقة)

شكل رقم (1)الاجزاء المفصولة من تقنية HPLC للكرامسيدين المحضر

8- التركيز المثبط الادنى للكرامسيدين

بلغ التركيز المثبط الادنى لنمو السلالتين *Bacillus subtilis* و *S. aureus* مايكروغرام /مليميتر اما التركيز المثبط الادنى للسلالتين E.coli و *Pseudomonase aeruginosa* فكان 100 مايكروغرام /مليميتر وهذا قد يعود الى الاختلاف في تركيب الجدار الخلوي لجراثيم الموجبة لصبغة غرام والسالبة (10).

المصادر:

1-Nicholes,K.W(2000).Anti infectives.In Remington:The Science of Pharmacy.ed by:Gennaro,A.R.P.1507-1561.Published in Philadilelphia Collage of and Science.

2-Claus,D.and Berkeley,R.C.W.(1988).Genus.Bacillusc ohn.In Bergeys Manual of systemic Baceriology,ed by : Sneath,P.H.A,Mair,N.S , Sharp,M.E.and Holt, J.G..2:1105-1139. Williams and Wilkins.

3-Bondanszky ,M.and Perlman,D.(1964).Peptide antibiotics .Science ,6:353-358.

4-Katz,E.and Demain ,A.L.(1997).The Peptide antibiotic of Bacillus:Chemistry,biogenesis and possible function .Bacterial Rev., 41(2):449-476.

5-Axelsen K.S .and Vogelsang,S.H.(1997).High-Performance Liquid Chromotograghy analysis at garamicidin apolypeptide.Antibiotic.J.Chromato.,140 :174-178.

6-Okamoto,K.,Yonezwa,H.and Izumiya,W.(1974).Peperation of pure Peptides forma mixture of garamicicdin ,and Tryocidines,by Droplet Counter Current chromatograghy.J.chromato .92:147-186.

7-Egorov,N.S.(1985).Antibiotic. Ascientific approach.Mir publishers.

8-Parry ,J.M., Turnbull,P.C.B. and Gibson ,J.R.(1983).Acolour atlas of Bacillus species.Wolf medical puplic London.

9-Martin, J.F.(1977).Control of antibiotic synthesis by phosphate .Adv.Biochem.Eng.,6:105-127.

10-Snitkoff,G.(2000).Biological testing .In:Remington :The science and practice of pharmacy .ed by :Gennaro,A.R.p.540-511.published in philadelighia collage of pharmacy and science.

11-Korzybaski.T,Kowszk,K.Z.and Kurylowcz,W.(1977).Antibiotic Oringin, Nature and properties .Vol.1pergamopress.Oxford.

12-Iwai,Y.and Omura,S.(1982).Culture Conditions for Screening of new antibiotic ,J.antibiotic , 35:123-141.

13-Martin ,J.f and Demain ,A.L.(1980) control of antibiotic biosynthesis.Microbial .Rev 44(2):230-251.

14-Martin,J.F and Demain ,A.L..(1976).Control by phosphate of Garamicidin production.Biochem.Biophys.Res.Comm an.,71:1103-1109.

Study of some effective factors on the production of garamicidin from locally isolated Bacillus brevis

Safaa Abed Lateef AL-Meani*

*University of Baghdad, genetic engineering and biotechnology institute for post graduate.

Abstract:

The optimum cultural conditions for garamicidin production by local isolate B.brevis were studied.Best result was obtained when the isolate B.brevis was grown on media composed of 1%glucose as carbon source,1% ammonium chloride as a nitrogen source ,0.5% Dipotassium hydrogen orthophosphate as a phosphate source and after 48 hours of incubation at 30C .Garamicidin has been extracted and purified through acid precipition and then extracted by organic solvent (ether& acetone).Using HPLC the garamicidin antibiotic showed three types A,B and C garamicidin .