Optimal Conditions Measured for Production of Prodigiosin from *Serratia marcescens* Bacteria Isolated from Different Sources

2nd Conference on Environment and Sustainable Development 28-29-Oct-2015

Dr. Salih A. Al-Bakri
Environmental Research Center, University of Technology
Email: albakrisal2@yahoo.com
Farazdag N.H. Al-Bederi
Environment and Water Research, Ministry of Science and Technology

Abstract
Selected optimal conditions for production of prodgiosin for pathological and environmental isolates of the bacterium *Serratia marcescens* which was isolated from pathological and environmental sources, the results showed that the peanut powder medium at 2% concentration was the highest production of pigment under the conditions of pH 8, volume 50 ml from the medium in 250 ml conical flask at 28 ºC for 72 hrs without light.

Keywords: Prodigiosin, Pathogenic isolates, *Serratia marcescens*

تقييس الظروف المثلى لإنتاج صبغة البروديجيوسين من بكتريا الـ *Serratia marcescens* المعزولة من مصادر مختلفة

الخلاصة
جرى تحديد الظروف المثلى لإنتاج صبغة البرودجيوسين للعزلات المرضية والبيئية لبكتريا *Serratia marcescens* التي عزلت من مصادر مرضية وبيئية ، وتبين أن وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز (2%) كان الأعلى إنتاجاً للصبغة عند رقم هيدروجيني 8 وبحجم 50 مل من الوسط الزرعي في دورق مخروطي سعة 250 مل عند درجة حرارة 28 م° لمدة 72ساعة في ظروف بعيدة عن الضوء.

الكلمات المفتاحية: برودجيوسين، عزلات مرضية وبيئية، *Serratia marcescens*

المقدمة
إن من أكثرالخصائص المثيره للإهتمام في بكتريا *S. marcescens* هي قابليتها على إنتاج الصبغة المعروفة بـ البرودجيوسين Prodigiosin مع وجود انواع بكتيرية اخرى منتجة لها.الصبغة لها تطبقات واعدة مستقبلية في مجالات عدة ومنها الطبي لأنهاعامل ضد مايكروبي [1]،ولفعاليتها ضد الخلايا السرطانية [2]. أما بيئياً فالصبغة لها الكثير من التأثيرات ومنها: تثبيط نمو الطحالب النامية في البيئة البحرية [3] وفعاليتهاضد الطفيليات ومنها طفيلي الملاريا في بيئة الأراضي المنخفضة والرطبة والترب الغدقة والمسطحات والأهوار والمستنقعات [4]، وهكذا لغيرها من الطفيليات وكما ورد عن تأثيرها في طفيلي اللشمانيا بكونها عامل ذو تأثير تثبيطي مباشر [5].ومن خصائص الصبغة إن لونها

يتدرج من الأحمرالغامق الى البرتقالي والوردي وذلك بالإعتماد على نوع الوسط الزرعي والرقم الهيدروجيني للوسط ودرجة الحرارة ومدة الحضن وعمرالمستعمرة البكتيرية والضوء، إذ أن الصبغة في الظلام تحتفظ بلونها الغامق مدة أطول وذلك لحساسية الصبغة للضوء [6 و7]. أما عن تركيب صبغة البرودجيوسين، فانها تتمثل بمركب خطي ثلاثي حلقات البايرول متكون من إتحاد البايرول الأحادي (MAP) مع البايرول الثنائي (MBC) لتنتج صبغة البرودجيوسين:-2-methyl-3-(8amyl-6-methoxyprodigiosin).

الظـروف المثـلى لإنتـاج صبغـة البـرودجيـوسيـن

نـوع الوسـط الـزرعـي

يتباين إنتاج الصبغة بحسب مكونات الوسط إذ وجد أن إضافة الكلوكوزالى الوسط يشجع نمو البكتريا ولكن يحول دون إنتاج الصبغة لأنه يؤدي الى خفض درجة حموضة الوسط بشكل كبير بعد إستهلاكه من قبل البكتريا. وإن إضافة الزيوت ومسحوق البذور لكل من جوز الهند وفستق الحقل والسمسم وفول الصويا الوسط الإنتاج يحفز إنتاج صبغة البرودجيوسين وبكميات كبيرة منها 9و10و11]. كما أن وجود الفوسفات في الوسط يثبط إنتاج الصبغة، بينما حفز وجود كلوريد الصوديوم بتركيز 4-5% عملية الإنتاج [6]. وان إضافة بعض المضادات الحياتيةلوسط الإنتاج مثل مضادي Valinomycin و Polymyxin يسهلان إنتاج الصبغة من خلال إحداثها للتغيرات في جدارالخلية مما يساعدفي دخول الأحماض الأمينية بكميات أكبر الىالسايتوبلازم لتشارك في صنع الصبغة [12].

الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي

يؤثرالرقم الهيدروجيني في أنتاج البرودجيوسين وذلك عن طريق تأثيره في ذوبانية مكونات الوسط الزرعي وفي إتجاه سيرالعمليات الأيضية وإنتاج الصبغة، إذ أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الصبغة هو بين 8 – 8.5 [13] .

تاثير درجـة الحـرارة فـي إنتـاج الصبغـة

تؤثر درجة الحرارة في نمو الأحياء المجهرية وإنتاج الصبغة عن طريق تأثيرها في الفعاليات الأيضية للخلية، وإن درجة الحرارة المثلى لنمو الكائن الحي قد لا تتماثل مع درجة الحرارة المثلى لإنتاج الصبغة او المنتجات الأيضية الأخرى، وهي تختلف بإختلاف أنواع الأحياء المجهرية، فمثلاً تنمو بكتريا *S. marcescens* في مدى حراري يتراوح بين 4–37°م إلا أن درجة الحرارة المثلى لنموها هي 37°م، في حين أن قابليتها على إنتاج صبغة البرودجيوسين يكون ضمن المدى الحراري 12–36 °م والدرجة المثلى لإنتاجهاعند الإختبار لأكثر من درجة حرارية تجريبية بحدود 28-36 °م [14و15].

تـأثير مـدة الحضـن في إنتـاج الصبغـة

يزداد إنتاج الصبغة عندما تكون الخلايا فيما بعد التراجع وبداية طور الإستقرار Stationaryphase إذ أن إنتاج الصبغة يكون غيرواضح في طور التأقلم (Lagphase) بعدها يزداد بشكل واضح في إثناء دخول الخلايا في الطور اللوغاريتمي (Log phase) حتى تصل أعلى إنتاجية لها عند بداية طور الإستقرار، وذلك عند حضن الوسط الزرعي مدة 72 ساعة [16و17و18].

تـأثير الضـوء فـي إنتـاج الصبغـة

للضوء تاثير في إنتاج الصبغة، إذ تبقى الصبغة المنتجة في الظلام بلون أحمر غامق ولمدة طويلة، بينما في حالة إنتاج الصبغة تحت تأثيرالضوء يتحول لون الوسط تدريجيا الى الأحمر الفاتح بسبب حساسية الصبغة للضوء، إذ يظهران للضوء تأثيراً مباشراً على الصبغة بالرغم من عدم تأثيره في معدل نمو بكتريا *S.marcescens* وهذه صفة مميزه لهذه البكتريا وكما أشارت لها المصادر ومنها [19و20].

تـأثير التهويــة فـي إنتـــاج الصبغـــة

أن للتهوية أهمية في إنتاج الصبغة من بكتريا *S.marcescens* ، وتعود أهميتها الى حاجة الأحياء المجهرية للاوكسجين الذائب ولمجانسة مكونات الوسط. تختلف الوسائل المتبعة للحصول على التهوية المناسبة للوسط الزرعي، منها إستعمال الحاضنة الهزازة Shaker incubator، او زيادة مساحة السطح للوسط الزرعي الى حجمه إذ يكون لها تأثير في إنتاج الصبغة عن طريق توفيرالأوكسجين المطلوب لإنتاج الصبغة، في حين ان قلة الأوكسجين لا يؤثرفي نمو البكتريا لأنها لاهوائية إختيارية ولكن يؤثر في إنتاج الصبغة [21 و22].

الهدف من البحث

التحري عن تطبيقات الحالة المثلى Optimization من عوامل وظروف الإنتاج من وسط زرعي ودرجة حرارة ورقم هيدروجيني وتهوية وضوء ومدة حضن على بكتريا *S.marcescens* المعزولة من مصادر بيئية ومرضية لإنتاج صبغة البرودجيوسين.

طرائق العمل

تعيين الظروف المثلى لإنتاج صبغة البرودجيوسين:

تحضير الأوساط الزرعية التركيبية:

وسط لوريا بريتاني Luria-bertani broth medium طبقاً لـ [11] وكما يأتي:

المادة	الكمية
تربتون Tryptone	10غم
مستخلص الخميره Yeast extract	5غم
كلوريد الصوديوم NaCl	10غم

أذُيبت هذه المكونات في 900 مل من الماء المقطر مع الرج لغرض إتمام التجانس، ثم أُكمل الحجم الى 1000 مل، وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ، وُزع الوسط في دوارق مخروطية Flasks سعة 250 مل بواقع 50 مل لكل دورق.

تحضيرأوساط زيوت البذور وحسب [11]وكما يأتي:

وسط زيت فستق الحقل Peanut oil medium

وسط زيت السمسم Sesame oil medium

وسط زيت جوز الهند Coconut oil medium

وسط زيت فول الصويا Soybean oil medium

حُضرت الأوساط الزرعية بأضافة كل من الزيوت أعلاه بحجم 2 مل أي بنسبة 2 % الى وسط لوريا-بريتاني المحضربالفقره السابقة،وعقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند/إنج2 لمدة 15 دقيقة.

تحضير أوساط مساحيق البذور أدناه,وفقاً لـ[11,10] وكما يأتي:

وسط مسحوق بذور فستق الحقل Peanut seed medium

وسط مسحوق بذور السمسم Sesame seed medium

وسط مسحوق جوز الهند Coconut seed medium

وسط مسحوق بذور فول الصويا Soybean seed medium

حضرت الأوساط أعلاه بسحق البذور بوساطة الطاحونة الكهربائية سحقاً ناعماً، وأضُيف 2غم 2 % من مسحوق البذورالى 100 مل من وسط لوريا- بيرتاني المحضركما في الفقرة السابقة،عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 °م وضغط 15 باوند/إنج2 لمدة 15 دقيقة .

دراسة تأثير عدد من العوامل لتحديد الظروف المثلى لإنتاج صبغة البرودجيوسين من بكتريا *Serratia marcescens* المعزولة من مصادر بيئية ومرضية

مكونات الوسط الزرعي في إنتاج صبغة البرودجيوسين

نشطت العزلتين المرضية والبيئية في وسط ترب تكيزالصويا Trypticase soy broth بدرجة حرارة 37 °م للمرضية و 30 °م للبيئية ولمدة 24 ساعة، ثم لقحت الأوساط الزرعية التركيبية المحضرة كما في الفقرات السابقة وبحجم 50 مل في دوارق سعة 250 مل وبواقع مكررين لكل وسط باستعمال لقاح 1% من المزروع البكتيري المنشط الحاوي على 810 خلية/ مل، حضنت الدوارق بدرجة حرارة 37 °م في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة/ دقيقة لمدة 24 ساعة وقرأت إمتصاصية المزروع البكتيري على الأطوال الموجية 499 و620 نانومتر، وحسبت كمية الصبغة بوساطة المعادلة (1) أدناه بحسب [23]:

$$\text{Prodigiosin U/Cell} = \frac{[O.D499 - (1.3831 \times O.D620)] \times 1000}{O.D\ 620}$$

O. D499: تمثل إمتصاصية صبغة البرودجيوسين.
O. D620: تمثل إمتصاصية الخلايا البكتيرية.
1.3831 : ثابت.
1000: لتجنب التعامل مع أرقام اصغر من واحد .

تحديد أفضل تركيز للوسط الزرعي في إنتاج صبغة البرودجيوسين

حُضروسط مسحوق بذورفستق الحقل كما ورد وبتراكيز مختلفة (1 و2 و3 و4 و5 و6%)، لقح الوسط بالعزلتين المرضية والبيئية والمنشطة بنسبة 1% من المزروع البكتيري الحاوي على 108 خلية/ مل، حضنت الدوارق بدرجة حرارة 37 °م للعزلة المرضية و30 °م للعزلة البيئية في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة/ دقيقة مدة 24 ساعة، وأجُري تقدير كمية الصبغة المنتجة كما جاء في الفقرة السابقة.

تحديد درجة الحرارة المثلى في إنتاج صبغة البرودجيوسين

حُضر وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% ولقحت الأوساط ، وحضنت بدرجات حرارية مختلفة (20 و 25 و28 و 30 و 37 و 40) °م في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة/ دقيقة ولمدة 24 ساعة، وقدرت كمية الصبغة المنتجة.

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل في إنتاج صبغة البرودجيوسين:

حُضروسط مسحوق بذور فستق الحقل (2%) بإختلاف الحامضية (5 و 6 و 7 و 8 و 9) وبإستعمال هيدروكسيد الصوديوم وحامض الهيدروكلوريك للمعايرة، ولقحت الأوساط بالمزروع البكتيري، وحضُنت بدرجة حرارة 28°م في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة/ دقيقة لمدة 24 ساعة، وقدرت كمية الصبغة المنتجة.

دراسة تأثير الضوء في إنتاج صبغة البرودجيوسين

حُضنت أوساط مسحوق بذورفستق الحقل بتركيز 2% وبرقم هيدروجيني 8 بعد تلقيح الأوساط بنسبة 1% من المزروع البكتيري المنشط، وحضنت بدرجة حرارة 28°م في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة/ دقيقة بوجود الضوء (تشغيل الضوء في الحاضنة) وعدم وجود إضاءة (عدم تشغيل الضوء)، وقدرت كمية الصبغة المنتجة.

تحديد مدة الحضن المثلى في إنتاج صبغة البرودجيوسين

حضنت أوساط مسحوق بذورفستق الحقل بتركيز (2%) وبرقم هيدروجيني مقداره (8) بعد تلقيح الأوساط بنسبة 1% من المزروع البكتيري المنشط للعزلتين المرضية والبيئية، وحضنت بدرجة حرارة 28 °م في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة/دقيقة وبدون تعرض ضوئي (ظلام) ولمدد زمنية هي (18 و 24 و 36 و 48 و72 و96 ساعة)، وأُجري تقدير كمية الصبغة المنتجة.

دراسة تأثير التهوية والتقليب في إنتاج صبغة البرودجيوسين

حضر وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% وبرقم هيدروجيني 8 بدوارق سعة 250 مل وبأحجام مختلفة (50 و100 و150 مل)، ولقحت الأوساط بنسبة 1% من المزروع البكتيري المنشط، وحُضنت بدرجة حرارة 28 °م في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة/ دقيقة (ظلام) مدة 72 ساعة، وقُدرت كمية الصبغة المنتجة.

النتائج والمناقشة

تعيين الظروف المثلى لإنتاج صبغة البرودجيوسين

مكونات الوسط الزرعي

أظهرت النتائج أن الأوساط الزرعية المستعملة في التجربة والتي شملت وسط لوريا- بريتاني وأوساط مساحيق فستق الحقل، السمسم، جوز الهند وفول الصويا وأوساط الزيوت (فستق الحقل، السمسم، جوزالهند، فول الصويا). أن أفضل وسط لإنتاج صبغة البرودجيوسين كان وسط مسحوق قرنات فستق الحقل ثم بذورالسمسم. فكانت كمية الصبغة الناتجة من العزلة البيئية وبمقدار 925.89 وحدة/خلية و 876.35 وحدة/خلية من العزلة المرضية كما في الشكل 1. فيما تدنت كميات الإنتاج عند تدعيم وسط الزراعة LBB بوسطي زيت جوز الهند وقرنات فول الصويا ولكلا العزلتين . هذه النتائج جاءت متفقة مع [10 و11] فيما عد وسطي زيت ومسحوق السمسم هما الأفضل ومن ثم بعدهما وسط مسحوق قرنات فستق الحقل وهذا جاء متفقاً مع [9], كما بررسبب قلة إنتاج الصبغة في وسط مسحوق ثمارجوزالهند (وكما وجدته هذه الدراسة أيضاً)، لإحتواء هذه الثمارعلى حامض الكابرك Capric acid بنسبة تصل الى 70% وحامض اللارك Lauric acid بنسبة تصل الى 50% واللذان يمتلكان تأثيراً تثبيطياً واضحاً ضد بكتريا الدراسة مما يعرقل ويقلل نموها في الوسط وبالتالي سينعكس ذلك على أيض إنتاج الصبغة. وبشكل عام ترى الدراسة الحالية أن تباين إنتاج الصبغة قيد الدراسة في الأوساط الزرعية المختلفة يعود الى طبيعة المواد المكونة وتركيبها ودرجة تعقيدها لوسط الإنتاج، والذي قد يحتوي على مصادر كاربونية بسيطة مثل السكريات الأحادية التي تتمكن البكتريا من إستهلاكها بسرعة وبسهولة مما يؤدي ذلك الى نمو مضطردعلى حساب إنتاج الصبغة،أو قد يحتوي على مصادركاربونية معقدة يصعب تحليلها وإستهلاكها، ومن الضروري وجود مصادركاربونية ممكن إستغلالها بكتيريا ولكن من خلال الإستهلاك البطئ الذي تسيرعليه عمليات إنتاج الأيض الثانوي التي ترتبط بمعدلات النمو الواطئة كما ورد في [17] إذ يتفق ذلك مع الدراسة الحالية.وعن طبيعة مكونات الوسط الزرعي وتأثيرها في إنتاج الصبغة أيضاً، ترى الدراسة الحالية أن ذلك يعود الى مايحتويه الوسط الأساس LBB لإنتاج الصبغة من مركبات كالبيبتون مثلاً والذي يعد من المكونات الأساسية فيه، وهومصدر رئيس للنتروجين والكبريت والكاربون فضلاً عن الطاقة لنمو الخلايا البكتيرية، وكما يحتوي على مستخلص الخميرة الذي هومصدرالأحماض الامينية والفيتامينات ومرافقات الأنزيمات وهذا ماأكده [9].أما الأوساط التركيبية المدعمة للوسط الزرعي الأساس LBB كأوساط المساحيق والزيوت ذات المصادرالنباتية سالفة الذكر، فقد تبين ومن نتائج الدراسة الحالية تأثيرها الإيجابي في

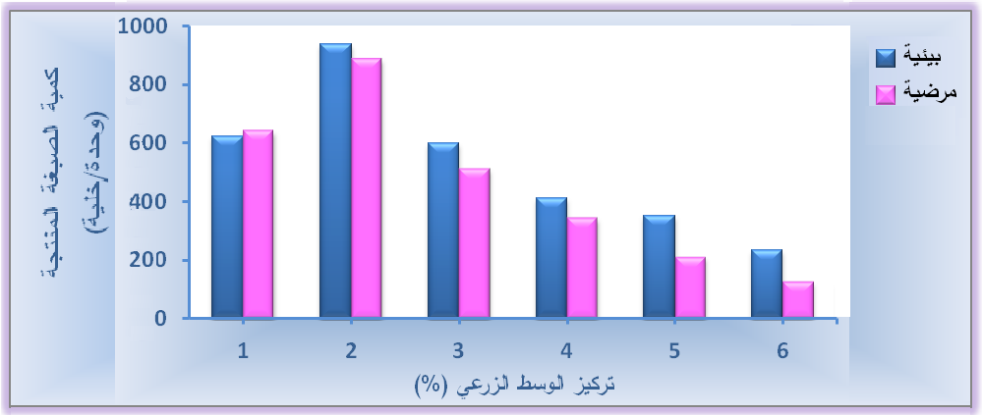
النمو وإنتاج صبغة البرودجيوسينوالذي يفسر بالإعتماد على نفس المصدر السابق أعلاهعلى أن هذه الأوساط حاوية على المعادن والفيتامينات والأحماض الدهنية المشبعة وغيرالمشبعة التي تعد مصادر للكاربون وتتغاير حسب مصدرونوع البذورالمستعملة، كما أن المشبعة منها هي الأفضل لأنها مصدر للكاربون أولاً والأفضل إنتاجاً للصبغة ثانياً قياساً بغيرالمشبعة. إذ وجد أن أعلى نسبة للأحماض الدهنية المشبعة هي في فستق الحقل والسمسم وهذا ينعكس على الإنتاج الأفضل للصبغة ويتفق مع ماوجدتهُ الدراسة الحالية في هذين الوسطين، كما أن بكتريا الدراسة ووفقاً لـ [11] تقوم بإفرازإنزيمات (Lipases) المحللة للدهون والتي تعمل على تحليل الأحماض الدهنية والإستفادة منها بوصفها مصادركاربونية وموارد للحصول على الطاقة اللازمة للأيض الخلوي للبكتريا قيد الدراسة والبحث، فضلاً عن كون هذه الأحماض تعمل كمادة أساس Substrate لتحث عملية تكوين مركبات الشد السطحي (Surfactants compounds) مثل Serrawettin إذ يسهل هذا إنتاج صبغة البرودجيوسين في مرحلة الأيض الثانوي للبكتريا.

الشكل (1). إنتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في أوساط زرعية مختلفة لمدة 24 ساعة

A: وسط لوريا- بريتاني، B: وسط بذور فستق الحقل، C: وسط بذور السمسم، D: وسط زيت السمسم ،E: وسط بذور جوز الهند، F: وسط زيت فستق الحقل، G: وسط بذور فول الصويا، H: وسط زيت جوزالهند، I: وسط زيت فول الصويا.

تركيز الوسط الزرعي

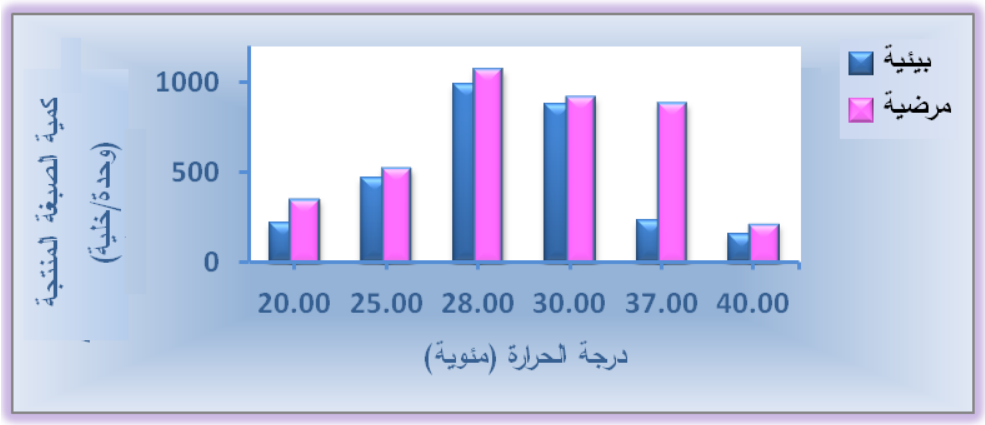
أظهرت النتائج أن تركيز وسط مسحوق فستق الحقل 2% هو الأفضل ما بين جميع التراكيز المستعملة في الدراسة (1% ، 2% ،3% ، 4% ، 5% و6%) من حيث إنتاج الصبغة، فكانت الأولوية للعزلة البيئية وبمقدار 935.82 وحدة/خلية، فيما تلتها العزلة المرضية وبمقدار 886.29 وحدة/خلية كمافي الشكل 2 وهذا يتفق مع [16,10].وأكدت بعض الدراسات بأن الوسط ذا التركيزالأوطأ هوالأفضل إنتاجاً للصبغة وأرجع ذلك الى إرتفاع لزوجة الوسط من جهة، وزيادة تركيز هذا الوسط من جهة أخرى، مما يؤدي ذلك الى إعاقة النمو البكتيري وبالتالي تقليل أيض إنتاج صبغة البرودجيوسين [11].



الشكل (2). إنتاج صبغة البرودجيوسين من العزلتين البيئية والمرضية عند تراكيز مختلفة من وسط مسحوق الفستق لـ24 ساعة

تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج صبغة البرودجيوسين

بينت نتائج تطبيقات الحاله المثلى لدرجات الحرارة (20 و25 و28 و30 و37 و40 °م) أن درجةحرارة 28 °م هي الأمثل لإنتاج الصبغة، إذ بلغ إنتاج العزلة المرضية 1066.74 وحدة/خلية والعزلة البيئية 993.16 وحدة/خلية كما في الشكل 3. إذ جاء هذا متفقاً مع ما أكده كل من الباحثون [16,10,9]، فيما بين آخرون بان درجة الحرارة الأفضل في إنتاج صبغة البرودجيوسين هي30 °م [24,15]. من خلال النتائج نجد أن الإختلاف في درجات الحرارة المقترنه بأفضل إنتاج للصبغة،قد يعود الى عوامل مباشرة وغير مباشرة، المباشرة منها تعود الى العزلة البكتيرية نفسها وعائدية عزلها ومصادرها، وغيرالمباشرة منها تتضمن ظروف الإنتاج ومنها طبيعة مكونات الوسط الزرعي، إذ لاحظت الدراسة الحالية أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الصبغة في وسط LBB هي 30 °م في العزلات البيئية، وهذا يتماشى مع [10] التي أكدت على أن الإنتاج الأفضل للصبغة في درجتي حرارة 28 و30 °م. كما أن التجربة أثبتت فشل العزلة البيئية في إنتاج الصبغة عند درجة حضن 37 °م إذ كان تغير لون الوسط قليلاً جداً ولايمكن الإستدلال عليه بسهولة وهذا ما طرحه وبينه [10] . أيضاً، أذ بينوا بان هذه الدرجة الحرارية غير ملائمة في تطبيقات الحالة المثلى،كما أشير الى إمكانية الإنتاج حتى في درجة حرارة 42 °م بشرط أن تكون التنمية في أوساط المستخلصات الخاصة ببذوربعض النباتات الزيتية مثل فستق الحقل والسمسم. كما أن الدراسة الحالية تعزي سبب قلة إنتاج الصبغة مع إرتفاع درجة حرارة التحضين الى عدة أسباب، قد يكون العامل الوراثي ذو الدورالمباشر في ذلك وهذا ماأكده [12]، اللذان بينا أن درجات الحرارة العالية تؤدي الى كبت الجينات المسؤولة عن التعبيرلإنتاج الصبغة دون التأثير في نموالبكتريا.فيما يفسرها [25] من جانب وراثي فسلجي، إذ يكون الكبت هنا أنزيمياً ويكون على الأنزيم المسؤول عن تكثيف مولدات الصبغة (C. E. P.)، إلا أن بعض الباحثين إتجه في تعليل السبب (إنخفاض الإنتاج مع إرتفاع الحرارة) الى الجانب الفسلجي لأن الصبغة هي منتج أيضي ثانوي Secondary metabolite مما يفسركون العزلات السريرية غير منتجة للصبغة وذلك لأن نموها في درجة حرارة جسم الانسان (37)°م لايؤهلها لإنتاج الصبغة بشكل يسير وإن إنتاجها يتطلب عاملاً إضافياً مجهداً لها، لذا فانها تدخرهذه الطاقة من خلال أيضها لإنتاج مواد أخرى تساعدها في إستعمارهاالبكتيري للمضيف [27,26].



الشكل (3). إنتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز2% بدرجات حرارة مختلفة مدة 24 ساعة

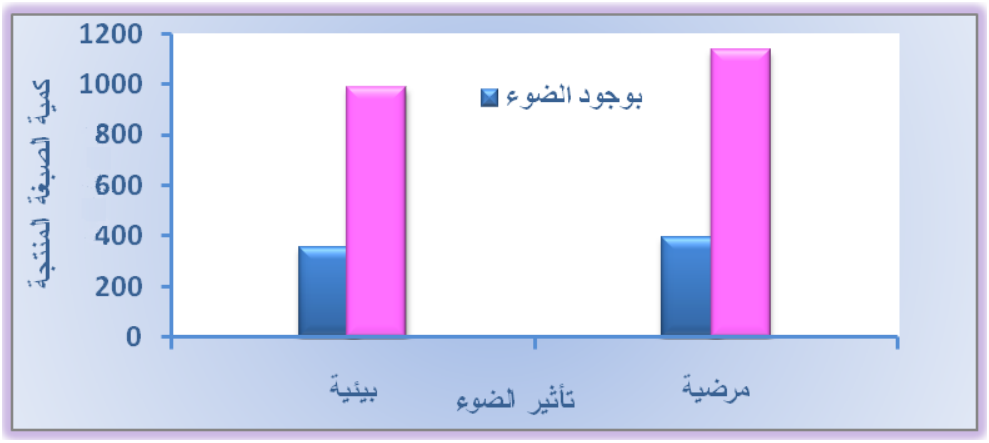
تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج صبغة البرودجيوسين

أظهرت النتائج أن هنالك دور مهم للرقم الهيدروجيني في إنتاج صبغة البرودجيوسين كونها أحد المنتجات الأيضية للخلايا البكتيرية خلال عمليات الأيض الثانوي،أذ تبين أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الصبغة كان 8 بين خمسة أرقام هيدروجينية (5 و6 و7 و8 و9)، إذ أعطى أعلى إنتاج للعزلة المرضية وبمقدار 1097.84 وحدة/خلية والعزلة البيئية وبمقدار 987.32 وحدة/خلية وكما في الشكل 4. وهذا يتفق مع [10 و28] الذين أكدا أن إنتاج الصبغة في الأوساط القاعدية هو الأفضل. وتعزي الدراسة الحالية ذلك الى كون الوفرة العالية من البروتونات (الحامضية) عند إنخفاض الرقم الهيدروجيني قد يؤثر ذلك في بعض المحفزات او مساعدات إنتاج الصبغة. ومن الباحثين من فسروا هذه الآلية من خلال تثبيط فعالية أنزيم Proline oxidase الذي يسبب هدم البرولين عند الرقم الهيدروجيني 8 والذي يعد الحامض الأميني الأساس في تخليق بادئ الصبغة البايرول الثنائي MBC، إذ أن تثبيط هذا الأنزيم يؤدي الى زيادة تركيز حامض البرولين في الوسط والإستفادة من هذه التراكيز في بناء حلقة البايرول للـ MBC، مما يؤدي الى زيادة كمية الصبغة المنتجة، في حين يؤدي إرتفاع او إنخفاض pH عن 8 الى حدوث خلل اوقطع في المسارات الحيوية المؤدية لتخليق الصبغة لتأثيره في فعالية الانزيمات التخليق[13].

الشكل (4). انتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز2% بارقام هيدروجينية مختلفة وبدرجة حرارة 28°م ولمدة يوم

دراسة تاثير الضوء في إنتاج صبغة البرودجيوسين

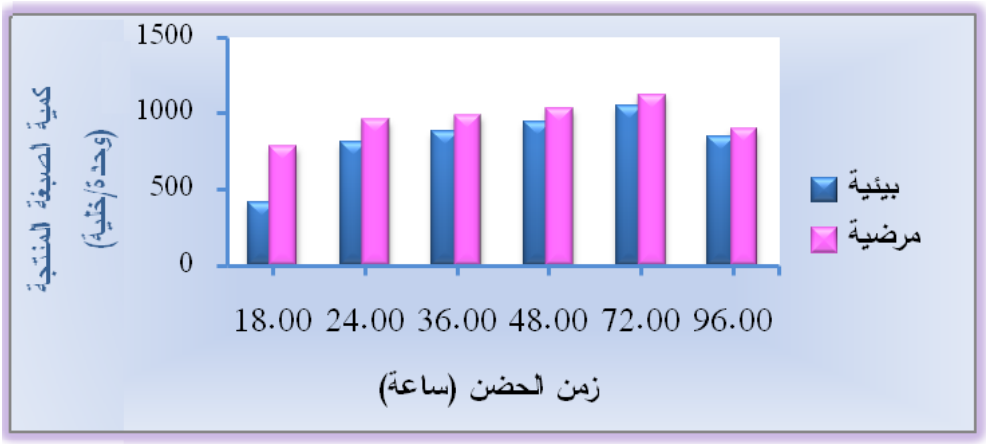
لوحظ أثناء دراسة دورالضوء في إنتاج صبغة البرودجيوسين بأن هنالك تاثيراً كبيراً لهُ في الصبغة وإنتاجها ، إذ وجد أن الصبغة بوجود الضوء تفقد لونها الاحمرالغامق وتتحول الى اللون الفاتح جداً ممايدل على تأثرها بالضوء كما موضح في الشكل 5. إذ بلغ إنتاج الصبغة بعدم وجود الضوء للعزلة المرضية 1099.94 وحدة/خلية والعزلة البيئية 987.32 وحدة/خلية، وهذا يتفق مع [19 و20] الذين أكدا أن صبغة البرودجيوسين تبقى في الظلام بلون أحمر غامق مدة طويلة بينما يتحول لونها تحت تأثيرالضوء تدريجياً الى الأحمر الفاتح المائل الى الوردي بسبب تأثر وتحسس الصبغة بالضوء،كما أن التحضين للإنتاج تحت الظلام كان أفضل من التحضين في الضوء. وتتماشى نتائج الدراسة الحالية مع [29] عند حضن بكتريا الدراسة تحت ظروف ضوئية مختلفة (الأشعة الحمراء وتحت الحمراء والأشعة المرئية البيضاء اوالزرقاء)، من حيث أن هذه الظروف لاتؤثرفي نموالبكتريا ولكنها تؤثر بشكل واضح في إنتاج الصبغة، بسبب تاثرإستقرارية الصبغةوإنتاجها نتيجة لتحسس الصبغة للضوء، كما أن كمية إنتاج الصبغة لايتأثر بالأشعة الحمراء وتحت الحمراء ولكنها تتأثر بشكل واضح بالأشعة المرئية البيضاءوكما بينت النتائجفي هذه الدراسة.



الشكل (5). إنتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز2% و بدرجة حرارة 28 °م ورقم هيدروجيني 8 وبظروف ضوئية مختلفة لمدة 24 ساعة

تحديد مدة الحضن المثلى لإنتاج صبغة البرودجيوسين

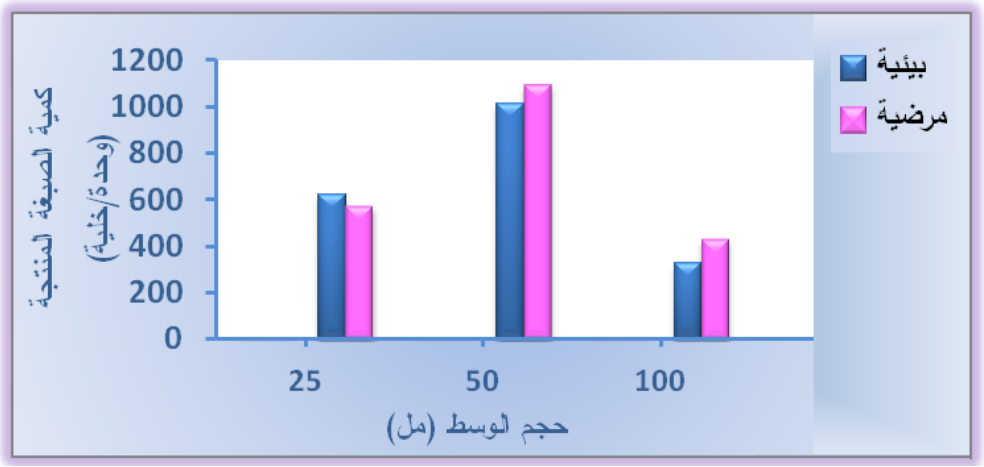
تبين في تجارب تحديد فترة الحضن المثلى لأنتاج الصبغة ومن خلال عدة فترات زمنية مختلفة (18 ، 24 ، 36 ، 48 ، 72 ،96 ساعة) ،أن الحضن مدة 72 ساعة هو الأمثل والأنسب لإنتاج الصبغة، إذ بلغ عندها إنتاج العزلة المرضية 1125.30 وحدة/خلية والعزلة البيئية 1032.36 وحدة/خلية كما في الشكل 6. وقد يعود السبب في ذلك الى أن الأطوار المتأخرة في النمو، تفرز منتجات أيضية ثانوية وأن مدة 72 ساعة تعد ممثلة لطور الإنقسامات السريعة وقد تصل الى الأطوار اللاحقة وهذا مايوضح إنتاج الصبغة في طور الإستقرارStationary phase، وذلك لحاجة الخلايا الى فترة زمنية كافية حتى تبدأ بتخليق الصبغة وإفرازها كمنتج أيضي ثانوي. كما لوحظ بعد مرور يوم من الحضن أن إنتاجاً للصبغة يلون الوسط باللون الأحمر ثم يغمق اللون الى الأحمر القاتم مع فترات الحضن وصولاً لـ72ساعة. ويفسر ذلك على ماجاء به[16] و [18]الذين بينوا أن إنتاج الصبغة يكون ذا علاقة بطاقة الخلية ATP اي الطاقة التي تستهلكها بكتريا *S. marcescens* في أيضها المهم للنمو، لكن عند دخول الخلية الى طور الإستقرار Stationary phase فان كمية الطاقة المستهلكة تقل لان معدلات النمو واطئة ولكن كمية إنتاج الصبغة يكون أعلى في هذا الطور.



الشكل (6). انتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز2% و بدرجة حرارة 28 °م ورقم هيدروجيني 8 وبعدم وجود الاضاءة وبمدد زمنية مختلفة

دراسة تاثير التهوية والتقليب في إنتاج صبغة البرودجيوسين

أظهرت النتائج بان هنالك دوراً مميزاً ومحدداً للتهوية في إنتاج الصبغة قيد الدراسة، عن طريق إختيار ثلاثة حجوم من الوسط الأفضل وعلى وفق التجربة (مسحوق فستق الحقل) وهي (25و50و100) مل في دوارق (250) مل وعند الدرجة الحرارية المثلى 28 °م والمدة الفضلى 72 ساعة ووفق ماتبين من نتائج تطبيقات الحالة المثلى. كانت إنتاجية الصبغة المثلى عند الحجم 50 مل، بواقع 1195.75 وحدة/خلية للعزلة المرضية و1045.19 وحدة/خلية للعزلة البيئية. بينما قل إنتاج الصبغة عند الزيادة اوالنقصان في حجم الوسط الزرعي عن 50 مل وكما في الشكل 7، وتبرر النتائج بان تناقص حجم الوسط الزرعي الى 25 مل فستكون نسبة مساحة سطح الوسط الى الحجم كبيرة، يعني توافر نسبة عالية من الاوكسجين تجعل النمو أسرع على حساب إنتاج الصبغة التي تنتج في الطور المتأخر للأيض الثانوي [1,30] ، إذ أن حجم الوسط القليل لايمد البكتريا بالمغذيات الكافية مما يؤدي الى نفاذها وقلة فعاليات الأيض والإنتاج. اما زيادة حجم الوسط فان الدراسة الحالية توصلت الى أن هذه الزيادة تؤدي الى قلة الاوكسجين لقلة مساحة السطح الزرعي الى الحجم الكلي مما ينتج عن ظروف اقرب الى اللاهوائية، كما ان الظروف اللاهوائية تمنع تخليق بوادئ صبغة البايرول الأحادي (MAP) والبايرول الثنائي (MBC) مما يؤدي الى تثبيط عملية تكثيفهما معاً لتكوين الصبغة [17و22].



الشكل (7). إنتاج الصبغة من العزلتين البيئية والمرضية عند نموها في أحجام مختلفة من وسط مسحوق بذور الفستق 2% وبدرجة 28°م و 8 pH وبعدم وجود الضوء مدة 72ساعة.

الإستنتاجات

أن تنوع مصادر العزلات قيد الإختبار مابين المرضية والبيئية أعطى وضوحاً ودلالات أكثر للتفضيل من حيث الأيض الثانوي البكيتري لصبغة البرودجيوسين، ولكلٍ أهميته البحثية و أن تباين تنوع الأوساط المدعمة للإنتاج وتراكيزه, جعل تباين في كميات وتراكيز البرودجيوسين المنتجة أيضياً صعوداً ونزولا. أن مسار إنتاج الصبغة يرتبط أولاً وآخراً بالبيئة المايكروبية وجميع معطياتها وظروفها المحيطة ومواطنها لبكتريا الـ *Serratia marcescens* .

References

[1] Nakashima,T.; Kurachi,M.; Kato,Y.; Yamaguchi,K.and Oda,T., "Characterization of bacterium isolated from the sediment at coaster area of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolated", Microbial.Immunol., 49(5), 407-415, 2005.

[2] SaezDiaz, R.I.; Bennett,S. and Thompson, A., "Amido-functionalised prodigiosines: Synthesis and anticancer properties", Chem.Med. Chem., 4(5),742-745, 2009.

[3] Nakashima, T.; Miayazaki, Y.; Matsuyama, Y.; Muraoka, W.; Yamaguchi, K. and Odd, T., "Producing mechanism of Algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium- proteobacterium", Appl. Microbiol. Biotechnol. 73(3), 684-690, 2006.

[4] Isaka, M.; Jaturapat, A.; Kramyu J.; Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y., "Potent in vitro Anti-Malarial activity of metacycloprodigiosin isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC4785", Antimicrob. Agents. Chemother., 46(4), 1112-1113, 2002.

[5] Morase, C.S.; Seabar, S.; Cunha-A, J.; Castro, D.; Genta, F.; Souza, W.D.; Brazil, R.; Garcia, E. and Azambuji, P., "Prodigiosin is not a Determinant Factor in Lysis of *Leishmania (Vinnia) braziliensis* after Interaction With *Serratia marcescens* D-Mannose Sensitive Fimbriae", Exp. Parasitol.,122, 84-90, 2009.

[6] Rjazantseva, I.N.; Andreeva, I. and Ogorodnikova, T., "Effect of various growth conditions on pigmentation of *Serratia marcescens*" , Microbios., 79, 155,1994.

[7] Hejazi, A. and Falkiner, F., "*Serratia marcescens"*, J. Med. Microbiol., 46, 903- 912, 1997.

[8] Wasserman, H.H. and Lombardo, L.J., "The chemistry of vicinal tricarbonlys, a total synthesis of prodigiosin", Tetrahedron let., 30(13), 1725-1728,1989.

[9] Khanafari, A.; Assadi, M. and Fakhr, F., "Review of Prodigiosin Pigmentation in *Serratia marcescens*", Online J. Biol. Sci., 6(1), 1-13, 2006.

[10] Giri, A.V. ; Anandkumar, N. ; Muthukumaran, G. and pennathur, G., "Anovel Medium for the Enhanced Cell Growth and Production of Prodigiosin from *Serratia marcescens* Isolated from Soil", BMC Microbiol., 4(11), 2-14, 2004.

[11] Wei, Y.H. and Chen, W.C. "Enhanced production of prodigiosin – like pigment from *Serratia marcescens* SMAR by medium improvement and oil – supplementation strategies", J. Biosci. Bioeng., 99(6), 616- 622, 2005.

[12] Haddix, P.L. and Werner, T.F., "Spectrophotometric assay of gene expression *Serratia marcescens* pigmentation", Bioscence., 26(4), 3-13, 2000.

[13] Sole, M.; Francia, A.; Rius, N. and Lorean,J., "The role of pH in the glucose effect' on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*", Lett. Appl. Microbiol., 25, 81- 84, 1997.

[14] Holt, J.G.; Krieg, N. ;Sneath, H. ; Staley, J. and Williams, S., "Berge's Manual of Determinative Bacteriology", (9thed.), Williams and Wilkins, USA., 1994.

[15] Tanikawa,T.; Nakagawa,Y. and Matsuyama, T., "Transcriptional downergulator HexS controlling prodigiosin and serrawettin W1 biosythesis in *Serratia marcescens*", Microbiol. Immunol., 50(8), 587-596, 2006.

[16] Cang, S.; Sanada, M.; Johdo, O.; Ohta, S. and Yoshimoto, A., "High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* growth in ethanol", Biotechnol.Lett., 22(22), 1716-1765, 2000.

[17] Williamson, N.R.; Simonsen, H.; Ahmed, R.; Golder, G.; Slater, H.; Woodley, L.; Leeper, F. and Salmond, G., "Biosynthesis of the red antibiotic , prodigiosin , in *Serratia* : Identification of anovel 2– methyl–3 – n – amyl – pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing anzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*", Mol. Microbiol., 56(4), 971- 989, 2005.

[18] Haddix, P.L.; Jones, S.; Patel,P. ;Burnham, S.; Kinghts, K.; Powell, J. and Laform, A., "Kinetic analysis of growth rate ,ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens*", J. Bacteriol., 190(22), 7453-7463, 2008.

[19] Nester,E.W.; Anderson,D.; Roberts, C.; Pearsall, N. and Nester, M., "Microbiology", 3 ed., McGraw- Hill, 2001.

[20] Forbes, B.A.; Sahm, D. and Weissfeld, A., "Baily Scott's Diagnostic Microbiology", 11thed., Mosby, 2002.

[21] Heinemann, B.; Howard, A.J. and palcoz, H.J., "Influence of dissolved oxygen levels on production of l–asparginase and prodigiosin by *Serratia marcescens*", Appl. Microbiol., 19(5), 800- 804, 1970.

[22] Kobayashi, N. and Ichikawa, Y., "Diversity of prodigiosin content in the stationary phase organisms of *Serratia marcescens* fractionated by ficoll density gradient centrifugation", Microbiol. Immunol., 27(10), 897-899, 1983.

[23] Haddix, P.L. and Werner, T.F., "Ampicillin sensitivity in *Serratia marcescens*: A model system for undergraduate genetic studies", Bioscene., 28(2), 16-21, 2002.

[24] Greenwood, D. ; Slack, R.C.B. and Peutherer, J.F., "Medical Microbiology", 6th ed., Churchill Livingston., 2002.

[25] Furstner, A., "Chemistry and Biology of Rosephilin and the Prodigiosin Alkaloids :A Survey of the Last 2500 Years . Angew. Chem. Ed., 42, 3582-3603, 2003.

[26] Carbonell, G.V.; DallaColleta, H. ; Yano, T.; Levy, C. and Fonseca, B. "Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*", FEMS Immunol. & Medical. Microbiol., 28(2), 143-149, 2000.

[27] Nystrom,T., "Stationary–PhasePhysiology.Annu.Rev", Microbiol., 58, 161-181, 2004.

[28] Wei, Y. ; Yu, W. and Chen, W., "Enhanced undecylprodigiosin production from *Serratia marce*scens SS-1 by medium formulation and amino–acid supplementation", J. Biosci. Bioeng., 100(4), 466- 471, 2005.

[29] Someya, N.; Nakajimi, M.; Hamamoto, H.; Yamaguchi, I. and Akutsu, K., "Effects of light conditions on prodigiosin stability in the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2", J. Gen. Plant. Pathol., 70, 367-370, 2004.

[30] Srijith, V.M., "Analysis of *Serratia marcescens* Genome-Identifying Biosynthetic Pathway of the Pigment Prodigiosin, Aomputational Approach", Center for Bioinformatics,UK., 1-4, 2006.