مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2015) المجلد (31) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 195-211

غربلة عزلات محلية من بكتريا *Streptomyces* لتقييم قدرتها على إنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز

سهى حبيب[1] و صباح يازجي[2] ولينا الأمير[3]

الملخَّص

عزلت 40 عزلة من بكتريا *Streptomyces* من ترب محلية من مناطق مختلفة من سورية (دمشق– السويداء– درعا- حمص– اللاذقية– الحسكة– دير الزور) خلال عام 2012. شخصت العزلات مورفولوجياً وفيزيولوجياً تبعاً للطرائق المتبعة في المشروع الدولي للستربتوميسيس ISP (International Streptomyces Project)، أثبت التشخيص أن العزلات تنتمي إلى تسعة وعشرين نوعا مختلفا من *Streptomyces*. غربلت العزلات لتقييم مقدرتها على إنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز باستخدام أوساط انتقائية صلبة بالاعتماد على كثافة النمو كمؤشر على استهلاك سكر الزيلوز كمصدر للكربون ومن ثم أوساط سائلة لاختبار الفعالية الإنزيمية. استخلص الإنزيم باستخدام الـ CTAB بتركيز 0.1%، من ثم قُدرت فعاليته باستعمال الغلوكوز كمادة أساسية (ركيزة) وقيس الناتج بطريقة لونية باستخدام المطياف الضوئي عند طول موجة 560 نانومتر، وكان أفضل إنتاج للإنزيم من قبل العزلة SH10 (*S. roseiscleroticus*) حيث بلغت الفعالية الإنزيمية 4.9 وحدة/مل.

الكلمات المفتاحية: التربة، عزل ستربتوميسيس، تشخيص، غلوكوز إيزوميراز، سورية.

[1] طالبة دكتوراه، [2] أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
[3] أستاذ مساعد، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، قسم التقانات الغذائية والصناعية، دمشق، سورية.

Screening of local isolates of *Streptomyces* bacteria for glucose isomerase enzyme production

S. Habeeb[(1)], S. Yazaji [(2)] and L. Al-Amir[(3)]

Abstract

Forty Isolates of *Streptomyces* bacteria were obtained from soil samples from different regions of Syria (Damascus, Sweida, Daraa, Homs, Latakia, Damascus, Hasakeh, Deir-ezzor) during 2012. The isolates were identified using ISP (International Streptomyces Project) methodology based on morphological and physiological criteria. Isolates were grown on selective solid media depending on growth density as an indicator of the consumption of xylose as an unique carbon source then on liquid media to determine their ability to produce the glucose isomerase enzyme. The crude enzyme was extracted using CTAB 0.1% solution, the enzyme activity was estimated using glucose as a substrate and the end product was measured colorimetrically at 560 nm. Results showed that the 40 isolates belong to 29 different species of *Streptomyces*. All isolates were able to produce glucose isomerase but they varied in their efficiency. Isolate SH10 (*S. roseiscleroticus*) was distinguished by its high level of enzyme production reaching 4.9 units /ml.

Keywords: *Sterptomyces* isolation, Ientification, Gucose isomerase.

[(1)]Ph.D student, [(2)] Profe., Food Sci. Dept., Fac. .Damascus Univ., Syria.

[(3)]Assistant professor، Nat. Commi.Biotechnol., Dept. Food and Indus. Biotechnol. Syria.

المقدمة

الإنزيمات عوامل محفزة ذات طبيعة بروتينية، تكون مسؤولة عن عدد من التحولات الكيميائية الضرورية، ولها دور هام في مجالات الحياة كافة، فهي تستخدم في صنع العصائر والمعجنات والأدوية والمنظفات (Novo، 2004).

يتبع إنزيم غلوكوز إيزوميراز (GI) إلى إنزيمات التماكب، وهو ثالث الإنزيمات من حيث الأهمية الصنعية والتطبيقية والطبية، بعد إنزيمي أميلاز وبروتياز (Prashant وزملاؤه، 2010)، فهو يحفز المماكبة العكسية من D- غلوكوز إلى D- فركتوز وكذلك من D- زيلوز (سكر الخشب) إلى D-زيلولوز (Juan وAnders، 2013). اكتسب اكتشافه أهمية من الناحية الصنعية والتجارية لما يتميز به الفركتوز من خصائص فيزيائية ووظيفية جعلته يؤدي دوراً مهماً في التطبيقات الصنعية (Borges وزملاؤه، 2006)، حيث استعمل شراب الذرة الغني بالفركتوز (HFCS) High Fructose Corn Syrup كبديل طبيعي للسكروز في صناعة المشروبات الغازية والمعجنات والأغذية المصنعة (Schenck، 2000)، كما أن الفركتوز أقل ميلاً للتبلور وأكثر ذوباناً في الماء من الغلوكوز وبالتالي يمنع ظاهرة التسكر، كما يمنع ظاهرة الترمل لذلك فقد استعمل في صناعة المثلجات والألبان (Sangeetha وزملاؤه، 2005).

يستعمل الفركتوز في صنع المعجنات لمنح المنتج اللون البني الجذاب والنكهة المميزة وإطالة مدة الخزن (Lima وزملاؤه، 2011)، كما يسهم الفركتوز في منع ظهور الطعم المر في أثناء التذوق في المنتجات التي تستعمل كمواد تحلية صناعية مثل السكرين، وقد استعمل في تحلية غذاء المصابين بمرض السكر وذلك لارتفاع حلاوته (Pritham، 1998). ولأسباب اقتصادية تم تفضيل الطريقة الإنزيمية على الطريقة الكيميائية في تحويل غلوكوز إلى فركتوز، وشجع ارتفاع أسعار السكر مقارنة بأسعار شراب الذرة الغني بالفركتوز على التوسع في إنتاج هذا الأخير (Stephen و Suraez، 2003).

ينتج إنزيم غلوكوز إيزوميراز من قبل أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة كالبكتريا والخمائر والأعفان (Borges وزملاؤه، 2006). وتعد البكتريا المصدر الرئيس لإنتاج الإنزيم ولاسيما البكتريا الخيطية منها الأكتينوميسيتات التي تعد مصدراً غنياً في إنتاج الصادات الحيوية والإنزيمات الصنعية (Ningthoujam وزملاؤه، 2009)، حيث أنتج إنزيم غلوكوز إيزوميراز GI من بكتريا ستربتوميسيس المعزولة من حقول الباربهاني في الهند، وقيس نشاطه وأظهرت النتائج أن أنواع ستربتوميسيس كانت منتجة للإنزيم بكميات جيدة (Prashant وزملاؤه، 2010).

بما أن إنزيم غلوكوز إيزوميراز هو من الإنزيمات الداخلية Intracellular enzyme لذا يتطلب استخلاصه استعمال إحدى الطرائق التي تؤدي إلى تحلل أو تحطم جدر الخلايا

(Belfaquih و Penninckx، 2000)، وقام Bhasin وزملاؤه (2013) بمقارنة كمية إنزيم غلوكوز إيزوميراز المنتج داخلياً وخارجياً من بكتريا ستربتوميسيس واستنتجوا أن الكمية المنتجة داخلياً كانت أكبر.

واستخلص Chen وزملاؤه (1979) الإنزيم من بكتريا *Streptomyces flavogrises* بوساطة المذيبات العضوية بوجود منظم يحوي على 0.1% من ستيل ثلاثي مثيل بروميد الأمونيوم (CTAB) الذي يعمل على مهاجمة الروابط في جدر الخلايا لدى الحضن عند درجة حرارة 37 °س مدة ساعتين والتحريك المستمر يعقبها الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة ثم فصل الراسب واستعمل الرائق كمحلول إنزيمي خام. وتمكن Wang وزملاؤه (1998) من استخلاص إنزيم غلوكوز إيزوميراز المنتج من بكتريا *Streptomyces lividans* باستعمال إنزيم ليزوزيم بتركيز 2 مغ/مل.

واستخدمت طرائق متعددة لاستخلاصه وتقدير فعاليه، حيث تعتمد هذه الطرائق على استعمال الغلوكوز كركيزة ويتم إجراء التفاعل الإنزيمي تحت ظروف خاصة من الرقم الهيدروجيني لمحلول التفاعل ووجود بعض الأيونات المعدنية بدرجة حرارة معينة ولفترة محدودة، حيث بوجود الإنزيم يتحول الغلوكوز إلى الفركتوز ونتيجة لذلك يحدث تغير لوني، ويتم قياس الناتج اللوني بطرائق طيفية ضوئية باستخدام المطياف الضوئي عند طول موجة 560 نانومتر منها طريقة Dische و Borenfreund (1951).

ونظراً للأهمية التجارية والصناعية لإنزيم غلوكوز إيزوميراز، وعدم وجود دراسات في سورية تتعلق بإنتاج هذا الإنزيم من الأحياء الدقيقة فقد هدف البحث إلى: عزل بكتريا ستربتوميسيس من ترب محلية مختلفة وتشخيصها واستخلاص الإنزيم واختيار أفضل عزلة منتجة له.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات: جمعت 50 عينة من التربة من مناطق مختلفة من سورية (دمشق، السويداء، درعا، حمص، اللاذقية، الحسكة، دير الزور) خلال عام 2012 لعزل وتشخيص بكتريا ستربتوميسيس في مخبر التقانات الحيوية الغذائية والصناعية/الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

عزل البكتيريا: علقت عينات التربة بوزن 1غ من كل عينة تربة في 9 مل من الماء المقطر المعقم، ثم عملت سلسلة من التخفيفات العشرية لكل عينة تربة ولغاية التخفيف السادس. ثم أخذ 100 ميكروليتر من كل تخفيف ونشر على الوسط الأساسي Gausa agar (20غ نشاء ذواب، 1غ KNO_3، 0.5غ NaCl، 0.5غ $MgSO_4.7H_2O$، 0.5غ K_2HPO_4، 15 مغ $FeSO_4.\ 7H_2O$ و20غ آغار في لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني

إلى 7 ثم عقم) في طبق بتري. حضنت الأطباق عند درجة حرارة °30 س لمدة 3 أيـــام. واختيرت المستعمرات المناسبة لإعادة زرعها على الوسط ذاته عدة مرات للحصول على عزلات نقية، ثم فحصت العزلات مجهرياً بهدف تشخيصها، وللـــزرع الأولـــي للتربـــة، أضيف الأكتيديون (Cycloheximide) إلى الوسط وذلك بتركيز 100µg/ml لمنـــع نمـــو الفطريات (Raykovska وزملاؤه، 2001).

تشخيص البكتريا: شخصت العزلات تبعاً للطرائق المتبعة فـــي المـــشروع الـــدولي للستربتوميسيس ISP (International Streptomyces Project)، وذلك باستخدام الطرائق المورفولوجيـــة والفيزيولوجيـــة (Shirling و Gottlieb، 1966) تـــضمنت الطرائـــق المورفولوجية التحري عن الصفات المظهرية والمجهرية التالية: لون المشيجة الهوائيـــة المتبوغة، لون المشيجة التحتية، إنتاج الصبغات، شكل سلسلة الأبواغ. وتضمن التشخيص الفيزيولوجي اختبار المقاومة للمضادات الحيوية، باستخدام أقراص المـــضادات الحيويـــة التالية:

Tetracyclin -(30mg) Rifampicin-(5mg) Ciprofloxacin-(15mg) Clarithromycin (10mg) Ampicillin_G -(30mg) Cefotaxim-(30mg) Ceftazidim-(30mg) -(50mg) Chloramphenicol - (50mg) Oxytetracycline -(10mg) Penicillin– -(50mg) Streptomycin -(50mg) Neomycin-(50mg) -(50mg)TylosinColistin (50mg) Amoxicillin-(50mg) Chlortetracycline

حيث نشر 0.1 مل من المعلق البكتيري ذي التركيز 10^5 بوغ/مل ووزعت على وسط العزل بطريقة النشر على كامل سطح الطبق بواسطة القضيب الزجاجي، ووضعت فوقها أقراص المضادات الحيوية بعدد 4 أقراص في الطبق وحضنت عند درجة حرارة °30 س لمدة 72 ساعة.

كما تضمن التشخيص الفيزيولوجي التحري عن قدرة العزلات على تمثيل و استخدام السكريات التالية: D–غلوكوز، سكروز، I-إينوســـيتول، D-فركتـــوز، D-غـــالاكتوز، رافينوز، L-أرابينوز، D-زيلوز، D-مانيتول، رامنـــوز (Bergey وزمـــلاؤه، 2012)، ولاختبـــار تمثيـــل الـــسكريات حـــضر وســـط Basal mineral Salts agar بإذابـــة: 2.64غ 2 SO4 (NH4) و2.38غ KH2PO4 اللامائيـــة و5.65غ K2HPO4.3H2O و1غ MgSO4.7H2O و1مل من وسط trace salts (B) في ليتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7 ثم أضيف 18غ آغار ثم عقم بالأوتوكلاف عند درجة حرارة 121°C لمـــدة 20 دقيقـــة؛ ويتـــألف وســـط trace salts (B) مـــن المكونـــات التاليـــة: 0.64غ CuSO4.5H2O، 0.11غ FeSO4.7H2O، 0.79غ MnCl2.4H2O، 0.15غ ZnSO4.7H2O و100 مل ماء مقطر، تعقم السكريات دون استخدام الحرارة بطريقة الترشيح باســـتخدام مرشح بكتريولوجي بقطر ثقوب 0.2µm، وتضاف إلى الوسط الأساســـي بعـــد تعقيمـــه

وتبريده إلى درجة حرارة 40 ° س وبوجود الشاهد الحاوي على جميع مكونات الوسط باستثناء السكر (Ozgur وزملاؤه، 2008).

غربلة البكتريا لتقييم قدرتها في إنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز: جرت عملية الغربلة على مرحلتين، الغربلة الأولية وتسمى بالغربلة شبه الكمية حيث زرعت العزلات بنقل عروتين بإبرة التلقيح (2-Loopfull) من مزارع العزلات إلى وسط الإنتاج الصلب الحاوي على مادة حاثة على إنتاج الإنزيم وهي سكر زيلوز ثم قورنت كثافة النمو بين العزلات، إذ تتناسب قابلية العزلات على إنتاج الإنزيم طردياً مع كثافة النمو اعتماداً على عدد المستعمرات، واستخدم الوسط التالي للغربلة: 10غ ببتون، 2.5 غ مستخلص الخميرة، 10 غ زيلوز، 5 غ كلوريد الصوديوم، 5 غ مستخلص اللحم البقري، 0.5 غ كبريتات المغنزيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$)، 18غ آغار في ليتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6.8، المرحلة الثانية هي الغربلة الثانوية (الغربلة الكمية) بالوسط السابق مع استبعاد الآغار، حيث جرت المقارنة بين العزلات على أساس تقدير الفعالية الإنزيمية للمستخلصات الخام للإنزيم المنتج بوجود سكر الغلوكوز كركيزة (Manhas و Bala، 2004).

استخلاص إنزيم غلوكوز إيزوميراز من البكتريا المعزولة: استخلص الإنزيم من بكتيريا ستربتوميسيس وذلك باتباع الخطوات التالية:

علقت الخلايا البكتيرية في 50 مل من محلول الاستخلاص 0.1% من ستيل ثلاثي مثيل بروميد الأمونيوم (CTAB) في دوارق بسعة 300 مل، ووضعت في حاضنة هزازة وعلى سرعة 150 دورة/دقيقة ودرجة حرارة °30 س مدة 24 ساعة. ثم نبذ السائل الناتج مركزيا بسرعة 8000 دورة/ دقيقة مدة 15 دقيقة وحرارة 4 ° س. وأهمل الراسب وجمع الرائق الذي عُدَّ مستخلصاً خاماً للإنزيم، ومن ثم قدرت فعاليته الإنزيمية (Bhasin، 2011).

تقدير فعالية إنزيم غلوكوز إيزوميراز: اتبعت طريقة Dische و Borenfreund (1951)، وتعتمد هذه الطريقة على إجراء تفاعل لوني بين السكريات الكيتونية مثل الفركتوز مع كاشف Cysteine-carbazole في ظروف حامضية. إذ يعطي الفركتوز مع الكاشف لونا بنفسجياً يمكن قياس شدته بالمطياف الضوئي بطول موجي مقداره 560 نانومتر والذي يعبر عن تركيز الفركتوز الناتج وبالاستعانة بمنحنى قياسي لمحلول الفركتوز.

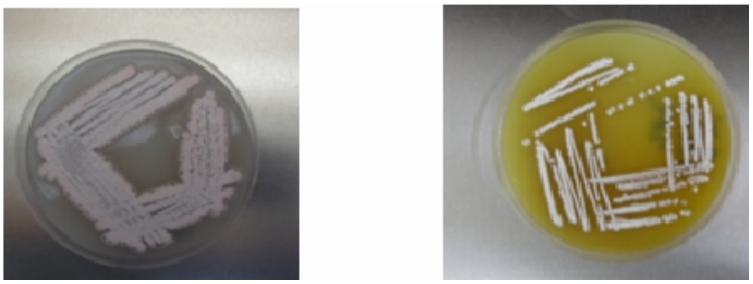
قياس فعالية الانزيم: قدرت فعالية الإنزيم بإضافة 0.1 مل من مستخلص الإنزيم إلى محلول التفاعل المكون من 0.5 مل من محلول منظم فوسفات البوتاسيوم (0.1 مولار، pH 8) والمحضر بإضافة 94 مل K_2HPO_4 1 مولار إلى 6 مل KH_2PO_4 1 مولار،

و0.2 مل من محلول $MgSO_4.7H_2O$ (0.05 مولار)، و0.5 مل من محلول ركيزة الغلوكوز (1 مولار) وحضن مزيج التفاعل في حمام مائي عند درجة حرارة °60 س، واستمر التفاعل الإنزيمي مدة 60 دقيقة. ثم أوقف التفاعل بإضافة 1مل من محلول حمض بيركلوريك $HClO_4$ (0.5 مولار)، وللكشف عن الفركتوز الناتج بفعل الإنزيم أضيف 0.2 مل من محلول Cysteine-Hydrochloride (بتركيز 1.5%)، و6 مل من حمض الكبريت بتركيز 70% و0.2 مل من محلول الكاربازول (بتركيز 0.12% المحضر بالكحول الاثيلي) إلى محلول التفاعل ورج الخليط جيداً بواسطة الـ Vortex. (Bhasin، 2011)، وقيست الامتصاصية بالمطياف الضوئي عند طول موجي 560 نانومتر. قدر تركيز الفركتوز المتحرر بفعل الإنزيم بالاستعانة بالمنحنى القياسي لمحلول الفركتوز (الشكل1). وتعرف وحدة الإنزيم Unit بأنها كمية الإنزيم التي تحرر واحد ميكرومول من الفركتوز خلال دقيقة واحدة عند ظروف التفاعل (Kozak، 2005).

التحليل الإحصائي: حسبت المتوسطات الحسابية وانحرافاتها المعيارية بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز للفركتوز مع حساب فروقها المعنوية وذلك عند مستوى ثقة 1% باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS الإصدار 17.

النتائج والمناقشة

الصفات المظهرية و المجهرية لعزلات *Streptomyces*: أظهرت العزلات تبايناً من حيث النمو ولون المشيجة الهوائية والتحتية، وكذلك من حيث إنتاج الصبغات أو عدمه (الجدول1). بين الفحص المظهري على وسط العزل أن البكتريا تكون مستعمرات صلبة ذات سطح ناعم ولون أبيض طباشيري وقوام مسحوقي (شكل1) تفوح منها رائحة التربة المبتّلة بشكل واضح.



الشكل (1) مستعمرات بكتريا ستربتوميسيس على وسط غاوزا.

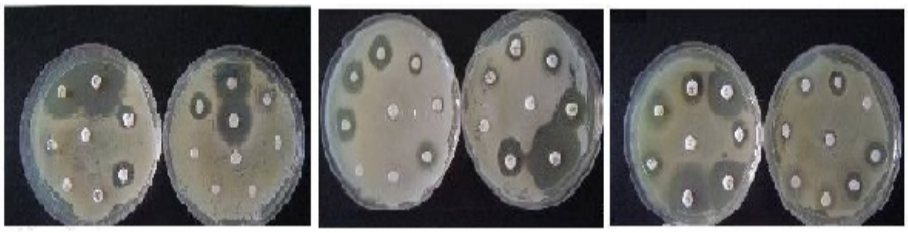
وبالفحص المجهري تبين أن المشيجة الهوائية متفرعة وغير مقسمة وحاوية في نهايتها على سلسلة طويلة من الأبواغ يتراوح عددها من 3 إلى 15 بوغة. كما اختلفت العزلات في لون المشيجة الهوائية والتحتية وفي إمكانيتها لإنتاج الصبغات (الجدول 1).

الجدول(1) صفات العزلات المختلفة من ستربتوميسيس المعزولة محلياً على وسط الغاوزا:

العزلة	النمو العام	المشيجة الهوائية		المشيجة التحتية		لون الصبغة
		اللون	النمو	اللون	النمو	
RH1	جيد	وردي	جيد	قشدي	جيد	بني
RH2	متوسط	رمادي قاتم	جيد	قشدي	جيد	وردي
RH3	جيد جدا	رمادي	جيد	رمادي	ضعيف	عسلي
RH4	جيد	أخضر	جيد	قشدي	جيد	-
RH5	جيد	وردي	جيد	بني فاتح	ضعيف	بني
RH6	جيد جدا	وردي	جيد	قشدي	ضعيف	-
RH7	ضعيف	رمادي قاتم	جيد	قشدي	ضعيف جدا	-
RH8	جيد	وردي فاتح	جيد	قشدي	جيد	-
RH9	جيد	رمادي قاتم	جيد	قشدي	جيد	بني فاتح
RH10	جيد	وردي	جيد	قشدي	جيد	-
RH11	وسط	رمادي	وسط	قشدي	ضعيف	بني
RH12	جيد جدا	وردي	جيد	قشدي	جيد	عسلي
RH13	جيد	أخضر	جيد	قشدي	جيد	-
MS1	جيد جدا	أحمر	جيد	قشدي	وسط	-
MS2	جيد	رمادي قاتم	جيد	بني فاتح	وسط	عسلي
MS3	جيد جدا	رمادي قاتم	جيد	قشدي	وسط	-
MS4	جيد	رمادي	جيد	قشدي	ضعيف	عسلي
MS5	جيد جدا	رمادي مبيض	جيد	وردي	وسط	-
MS6	جيد جدا	رمادي مبيض	جيد	قشدي	جيد	-
MS7	جيد	أبيض	جيد	قشدي	جيد	بني
MS8	جيد	وردي	جيد	قشدي	جيد	بني
MS9	جيد	أبيض	جيد	قشدي	وسط	-
MS10	وسط	رمادي	وسط	قشدي	ضعيف	أحمر
MS11	جيد جدا	رمادي قاتم	جيد	أصفر	وسط	عسلي
MS12	وسط	رمادي	وسط	قشدي	وسط	بني
MS13	جيد	رمادي	جيد	قشدي	ضعيف	-
SH1	وسط	أصفر ليموني	وسط	قشدي	ضعيف	-
SH2	جيد	رمادي مبيض	جيد	قشدي	وسط	-
SH3	جيد	أبيض	جيد	قشدي	ضعيف	بني فاتح
SH4	جيد جدا	رمادي	جيد	قشدي	وسط	أحمر
SH5	جيد	رمادي	جيد	قشدي	وسط	-
SH6	ضعيف	أصفر	ضعيف	أصفر	ضعيف	بني
SH7	جيد	رمادي قاتم	جيد	قشدي	وسط	-
SH8	جيد	رمادي	جيد	وردي	وسط	أحمر
SH9	جيد	أخضر	جيد	قشدي	وسط	-
SH10	جيد	أخضر	جيد	قشدي	وسط	-
SH11	جيد	أخضر	جيد	أصفر	جيد	-
SH12	جيد جدا	وردي	جيد	قشدي	جيد	-
SH13	جيد	وردي	جيد	قشدي	وسط	بني
SH14	جيد	رمادي	جيد	قشدي	ضعيف	أحمر

- عدم ظهور لون

مقاومة العزلات للمضادات الحيوية: زرعت عزلات بكتريا *Streptomyces* (40 عزلة) على وسط غاوزا، ووضعت فوقها أقراص المضادات الحيوية، ثم تم قياس أقطار تثبيط النمو حول المستعمرات (Bauer وزملاؤه، 1966) ولوحظ اختلاف في أقطار التثبيط ضمن العزلات وبالتالي اختلاف المقاومة لأنواع ستربتوميسيس تجاه المضادات المدروسة (الشكل2)، وهذا يتفق مع ما ذكره Webb وزملاؤه (1997).



الشكل (2) تثبيط نمو بكتريا ستربتوميسيس بأقراص المضادات الحيوية

وكانت أفضل العزلات في تحمل المضادات الحيوية هي RH9 وMS3 وSH3 وSH10 كما هو موضح في الجدول(2).

الجدول (2) مقاومة عزلات بكتريا *Streptomyces* للمضادات الحيوية المستخدمة.

قطر منطقة التثبيط/ مم																
amo	Clt	Str	neo	tyl	col	Clm	Oxt	Pen	amp	Cfx	Cfz	tet	Rif	Cip	Cla	المضاد / العزلة
R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	**RH1**
R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	**RH2**
R	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	**RH3**
S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	**RH4**
R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	**RH5**
S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	**RH6**
S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	**RH7**
S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	**RH8**
S	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**R**	**RH9**
R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	**RH10**
S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	**RH11**
S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	**RH12**
R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	**RH13**

تتمة الجدول (2)...

R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	**MS1**
S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	**MS2**
R	**S**	**S**	**R**	**S**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**S**	**MS3**
R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	**MS4**
S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	**MS5**
S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	**MS6**
R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	**MS7**
R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	**MS8**
S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	**MS9**
R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	**MS10**
R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	**MS11**
S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	**MS12**
R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	**MS13**
S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	**SH1**
R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	**SH2**
R	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**R**	**SH3**
R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	**SH4**
R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	**SH5**
R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	**SH6**
R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	**SH7**
S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	**SH8**
R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	**SH9**
R	**S**	**S**	**S**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**S**	**S**	**R**	**S**	**SH10**
R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	**SH11**
S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	**SH12**
S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	**SH13**
R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	**SH14**

R: مقاومة للمضاد (قطر التثبيط < 8 مم)، S: حساسة (قطر التثبيط > 8 مم) علماً أن قطر أقراص المضادات الحيوية = 6 مم، كانت العزلات مقاومة لأغلب المضادات المدروسة وتميزت جميعها بمقاومة Ceftazidim و Ampicillin_G و Penicillin و Oxytetracycline و Chloramphenicol و Colistin بينما كانت جميعها حساسة تجاه Rifampicin و Streptomycin و Chlortetracycline.

ثالثاً: **قابلية تمثيل السكريات من قبل عزلات *Streptomyces* المعزولة محلياً**: يبين الجدول (3) قابلية العزلات المدروسة للنمو على وسط Basal minerals Salts agar، الذي أضيف له السكريات المذكورة كمصدر حصري للكربون.

الجدول (3) قابلية عزلات *Streptomyces* على استخدام وتمثيل السكريات

السكر العزلة	شاهد	د-غلوكوز	د-زيلوز	ل-أرابينوز	رامنوز	د-فركتوز	د-غالاكتوز	رافينوز	د-مانيتول	إينوسيتول	سكروز
RH1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RH2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
RH3	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
RH4	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
RH5	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
RH6	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
RH7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
RH8	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
RH9	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
RH10	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RH11	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RH12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RH13	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
MS1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
MS3	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
MS4	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
MS5	-	+	+	-	+	+	+	_	+	_	-
MS6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS7	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	_
MS8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS9	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
MS10	-	+	_	-	+	-	+	+	+	+	-
MS11	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
MS12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
MS13	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
SH1	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
SH2	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
SH3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SH4	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
SH5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SH6	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
SH7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SH8	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SH9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SH10	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SH11	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
SH12	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
SH13	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SH14	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-

(-) لانمو (+) نمو

تشخيص العزلات: أكد التشخيص بالاختبارات المختلفة أن جميع العزلات البكتيرية الأربعين تابعة للجنس *Streptomyces*، وأمكن أيضاً تصنيف 33 منها على مستوى النوع حيث توزعت على 28 نوع مختلف من الجنس المذكور أما الأنواع السبعة المتبقية فلم نتوصل إلى تصنيف أنواعها بالطرائق المعتمدة في هذه الدراسة، وبمقارنة النتائج المذكورة في الجدول (3) مع تصنيف Bergey (2012) يمكن القول إن جميع العزلات تابعة لجنس *Streptomyces* وعائدة للأنواع الموضحة في الجدول (4):

الجدول (4) تشخيص عزلات بكتريا ستربتوميسيس على مستوى النوع

Streptomyces janthinus	**MS8**	*Streptomyces cyanoalbus*	**RH1**
Streptomyces spp	**MS9**	*Streptomyces griseomycini*	**RH2**
Streptomyces ogaensis	**MS10**	*Streptomyces coeliatus*	**RH3**
Streptomyces pseudovenezuelae	**MS11**	*Streptomyces mitakaensis*	**RH4**
Streptomyces spp	**MS12**	*Streptomyces castaneoglobisporus*	**RH5**
Streptomyces cellulosae	**MS13**	*Streptomyces hirsutus*	**RH6**
Streptomyces acrimycini	**SH1**	*Streptomyces spheroids*	**RH7**
Streptomyces spp	**SH2**	*Streptomyces piedadensis*	**RH8**
Streptomyces cyanoglomerus	**SH3**	*Streptomyces fluorescens*	**RH9**
Streptomyces albovirids	**SH4**	*Streptomyces janthinus*	**RH10**
Streptomyces canarius	**SH5**	*Streptomyces spp*	**RH11**
Streptomyces cellulosae	**SH6**	*Streptomyces coerulatus*	**RH12**
Streptomyces flaveolus	**SH7**	*Streptomyces spp*	**RH13**
Streptomyces coerulatus	**SH8**	*Streptomyces caracoi*	**MS1**
Streptomyces spp	**SH9**	*Streptomyces rubrolavendulae*	**MS2**
Streptomyces roseiscleroticus	**SH10**	*Streptomyces lazureus*	**MS3**
Streptomyces coerulatus	**SH11**	*Streptomyces indigocolor*	**MS4**
Streptomyces daghestanicus	**SH12**	*Streptomyces microflavus*	**MS5**
Streptomyces syringae	**SH13**	*Streptomyces albochromogenes*	**MS6**
Streptomyces spp	**SH14**	*Streptomyces castaneoglobisporus*	**MS7**

غربلة عزلات ستربتوميسيس لإنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز: أعيدت تنمية العزلات على الوسط الأساسي الصلب الحاوي على سكر زيلوز كمصدر وحيد للكربون وعند درجة حرارة 30° س مع متابعة يومية لكثافة نموها الظاهري وتبين أن تسع عزلات منها وهي RH3 وRH5 وRH6 وRH9 وRH10 وMS1 وMS12 وSH10 وSH14 اتسمت بكثافة نموها وبشكل جيد وهي صفة هامة اتخذت معياراً للتمييز في مرحلة الغربلة الأولية (الجدول5).

الجدول (5) كثافة نمو عزلات البكتريا المنتجة لإنزيم غلوكوز إيزوميراز (الغربلة الأولية)

العزلة	كثافة النمو	العزلة	كثافة النمو	العزلة	كثافة النمو	العزلة	كثافة النمو
RH1	+	RH11	+++	MS8	+++	SH5	++
RH2	+	RH12	++	MS9	+	SH6	++
RH3	++++	RH13	+	MS10	+	SH7	+++
RH4	+	MS1	++++	MS11	++	SH8	++
RH5	++++	MS2	++	MS12	++++	SH9	+
RH6	++++	MS3	+	MS13	++	SH10	++++
RH7	++	MS4	+++	SH1	+++	SH11	++
RH8	+++	MS5	+	SH2	+	SH12	+
RH9	++++	MS6	++	SH3	++	SH13	+++
RH10	++++	MS7	+	SH4	+	SH14	++++

(+) نمو قليل 10-1 مستعمرة / الطبق، (++) نمو متوسط 25-10 مستعمرة/ الطبق، (+++) نمو جيد 45-25 مستعمرة/ الطبق، (++++) نمو غزير > 45 مستعمرة / الطبق.

قياس فعالية الإنزيم:

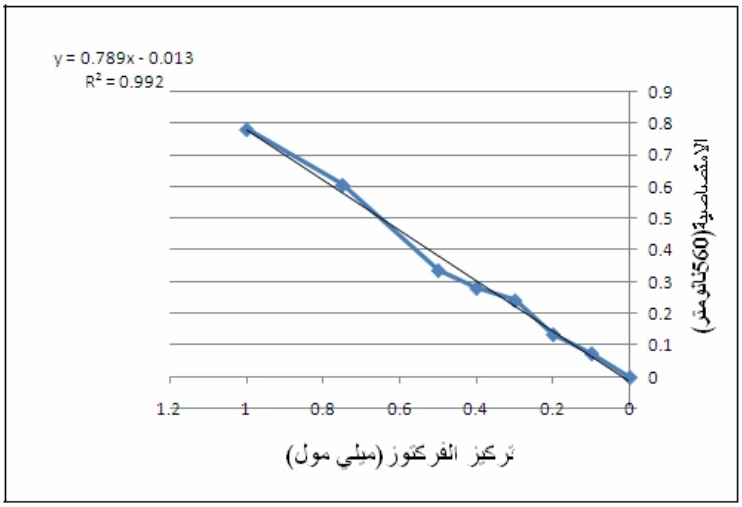
المنحني القياسي للفركتوز: حضرت تراكيز متدرجة من الفركتوز كالتالي mmol 0-0.1-0.2-0.3-0.4-0.5-0.75-1، نقل 1 مل من المحاليل المحضرة إلى أنبوب اختبار وأضيف إليها 0.2 مل من محلول Cysteine-Hydrochloride بتركيز1.5%، و6 مل من حمض الكبريت بتركيز 70% و0.2 مل من محلول الكاربازول بالكحول الإيثلي بتركيز 0.12% ومزج الخليط بشدة في رجاجة الأنابيب Vortex. قيست الامتصاصية على طول موجي 560 نانومتر في المطياف الضوئي (Spectrophotometer) الذي تم تصفيره باستعمال محلول الشاهد (Blank) المؤلف من المحاليل المستعملة بدون الفركتوز كما هو مبين في الجدول (6).

الجدول (6) قيم الامتصاصية لتراكيز الفركتوز المستخدمة في رسم المنحني القياسي

عدد المكررات	تركيز الفركتوز/ميلي مول	المتوسط الحسابي للامتصاصية ± الانحراف المعياري
3	0.1	**0.075 ± 0.00473**
3	0.2	**0.135 ± 0.00306**
3	0.3	**0.242 ± 0.0026**
3	0.4	**0.281 ± 0.01000**
3	0.5	**0.337 ± 0.01155**
3	0.75	**0.606 ± 0.02082**
3	1	**0.781 ± 0.00361**

رسم المنحنى القياسي لقيم الامتصاصية مقابل تركيز الفركتوز بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز حيث وجد فرق معنوي بين تراكيز الفركتوز على مستوى ثقة 1% بعد

استخدام تحليل التباين ANOVA، حيث بلغت أدنى قيمة للامتصاصية 0.075 للتركيز 0.1 ميلي مول، بينما بلغت أعلى قيمة 0.781 للتركيز 1 ميلي مول من سكر الفركتوز (الشكل3).



الشكل (3) المنحنى القياسي لتركيز الفركتوز بطريقة Cysteine-carbazole قيمة الامتصاصية الضوئية على طول موجة 560 نانو متر، X الفعالية الإنزيمية

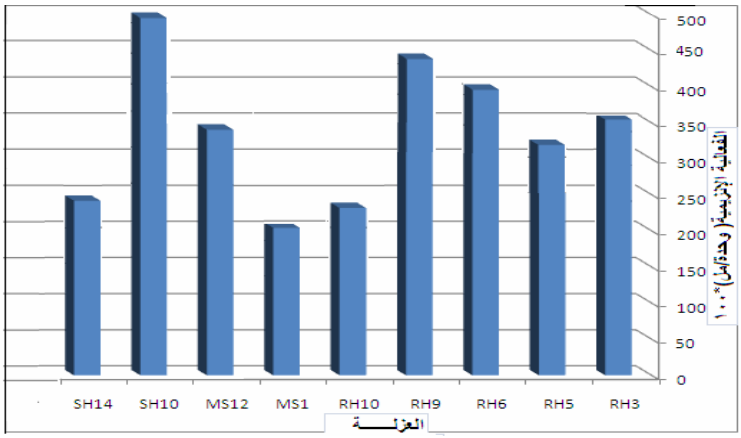
قيست كمية الفركتوز الناتجة عن تحول الغلوكوز بوجود إنزيم غلوكوز إيزوميراز بالطريقة اللونية باستخدام المطياف الضوئي وعلى طول موجة 560 نانومتر بالمعادلة التالية:

$Y= 0.789X - 0.013$ بمعنوية ($P< 0.001$)، كما كان معامل الانحدار معنوياً ($P < 0.001$) ومعامل التحديد $R^2= 0.992$ أي أن تركيز الفركتوز مسؤول عن 99% من الامتصاصية الناتجة. وقدرت فعالية الإنزيم في المستخلص الخام وتم الكشف عن تركيز الفركتوز الناتج بفعل الناتج بحسب الطريق التي ذكرها (Disch و Borenfreun، 1951) وبالاستعانة بالمنحني القياسي لتركيز الفركتوز.

بينت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية في الفعالية الإنزيمية للعزلات وأن العزلة SH10 المعزولة من تربة دمشق (كلية الزراعة) تفوقت معنوياً على باقي العزلات بإنتاجيتها لذلك تم اختيارها، حيث بلغت فعالية الإنزيم المنتج منها 4.9 وحدة/مل، بينما تراوحت فعالية بقية العزلات التسع المنتقاة ما بين 2–4.4 وحدة/مل كما هو موضح في الشكل (4).

توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسات أخرى تخص الجنس *Streptomyces*، إذ بينت دراسة Chen وزملائه (1979) أن بكتريا *Streptomyces flavogriseus* أنتجت الإنـــزيم وبفعالية 3.5 وحدة/مل، بينما أنتجت العزلة *Streptomyces sp. SB-P1* المدروسة من قبل Bhasin (2011) الإنزيم بفعالية مقدارها 4.88 وحدة/مل. تفوقت العزلة المدروسة فـــي هذه الدراسة (SH10) على العزلة *Streptomyces sp.SB - AII4* المستخدمة في دراسة Bhasin وزملائه (2013) والتي بلغت فعاليتها الإنزيمية 2.8 وحدة/مل.

لذا تـــم اختيـــار العزلـــة SH10 التـــي صـــنفت ضـــمن النـــوع (*Streptomyces roseiscleroticus*) والتي أعطت أعلى فعالية إنزيمية لمتابعة الدراسة.



الشكل (4) الفعالية الإنزيمية للعزلات المتفوقة مقدرة بالوحدة/مل

الاستنتاجات

مما تقدم يمكن أن نستنتج أن التربة السورية غنية بأنواع مختلفة من بكتريـــا الفطـــور الشعاعية *Actinomycetales* وعلى وجه الخصوص بكتريا جنس *Streptomyces* حيث تم تصنيف 40 عزلة من هذا الجنس ضمن ثلاثين نوعاً من ستربتوميسيس، وقد بين البحـــث أن جميع العزلات لها القدرة على إنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز بنـــسب متفاوتـــة وقـــد تفوقت العزلة SH10 (*Streptomyces roseiscleroticus*) عن باقي العزلات بفعاليتهـــا الإنزيمية التي بلغت 4.9 وحدة /مل، وبناءً على ذلك تم اختيـــار هـــذه العزلـــة لمتابعـــة الدراسات اللاحقة.

References

Bauer, A.W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol.45 (4):493:496

Belfaquih, N. and M.J. Penninckx.2000. A bifunctional b-xylosidase-xylose isomerase from *Sterptomyces sp.* Enzyme Microb. Technol. 27: 114-121.

Bergey, W., Aidan P., Michael. G., Peter. K, Hans.J. B, Martha E. T, Wolfgang L, and S. Ken. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology , Volume 5: The *Actinobacteria*, Parts 1-2

Bhasin S. 2011. Studies on glucose isomerase from *Streptomyces sp.* [Ph.D. thesis], Gujarat University, Ahmedabad, Gujarat, India.

Bhasin S., Sharma P., Rajpal P. and H.A. Modi. 2013. comparative study of extraction methods for intracellularly produced glucose isomerase by *Streptomyces sp.SB–AII4*, Inter.Res. J. Bio. Sci., 2(10): 43-50.

Borges E.A., Souza A.A.U.,Rodrigues A.E. and S.M. Souza. 2006. isomerization in simulated moving bed reactor by glucose isomerase, Brazilian Archives of Biology and Technology, 49 (3): 491-502.

Chen, W. P.; Anderson, A. W. and Y. W. Han. 1979. Extraction of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. Appl. Environ. Microbiol. (37): 785-787.

Dische.Z. and A. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugar and trioses. J. Biol. Chem. (192): 583-587.

Juan, A. M. and R. Anders. 2013. Efficient Isomerization of Glucose to Fructose over Zeolites in Consecutive Reactions in Alcohol and Aqueous Media, J. Am. Chem. Soc, 135 (14): 5246–5249.

Kozak.M.J. 2005. Glucose isomerase from *Streptomyces rubiginosus*; potential molecular weight standard for small angle X-ray scattering. Appl. Cryst.(38): 555–558.

Lima. D. M., Fernandes., Nascimento.P., Ribeiro.F. and A. Sandra. 2011. Fructose Syrup: A Biotechnology Asset. Food Technol. Biotechnol. 49 (4): 424–434.

Manhas. R. K. and S. Bala. 2004. Thermostable glucose isomerase production by some bacteria and *Streptomyces*, Ind. J. Microbiol., 44(2): 129-132.

Ningthoujam. D. S., Sanasam.S., Nimaichand. S. and P. Sanjenbam. 2009. Screening and optimization studies of native anticandidal *actinomycetes* from Manipur (Indo-Burma Biodiversity Hotspot), India. 15th International Symposium on the Biology of *Actinomycetes* (ISBA'15), Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 20-25.

Novo N.A.S. 2004. Enzymes at work. Bagsvaerd, Denmark.

Ozgur. C., Gulten. O., and U. Aysel. 2008. Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. Eur. Asia J Bio. Sci (2): 73-82.

Prashant. S., Saurabh. S., Sanjay. K. C., and V. S. Gomase. 2010. Isolation, Purification and Characterization of Glucose Isomerase Enzyme form *Streptomyces* species isolated from Parbhani Region. J. Enz. Res., 1(2): 1-10.

Pritham.G. H. 1998. Andersons Essentials in Biochemistry. P. 74, Mosby, New York.

Raykovska. V., Angelova. P. D., Paskaleva. D., Stoeva. S., Abashev. J., Kirkov. L., and W. Voelter. 2001. Isolation and characterization of a xylose–glucose isomerase from a new strain *Streptomyces thermovulgaris 127*, var. 7-86, Biochemistry and Cell Biology, 79(2): 195–205.

Sangeetha. P. T., Ramesh.M.N., and S. G. Prapulla. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides Trends Food Sci. Tech. 16: 442–457.

Schenck. F. W. 2000. High Fructose syrups-review. Int. sugar. (102): 285-288.

Shirling E. B., and D. Gottleib. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340.

Stephen. H., and N. Suraez. 2003. Sugar and sweetener: Situation and outlook. U. S. department of Agriculture.

Wang. F., Whitaker. R. D., and C. A. Bath. 1998. Production of glucose isomerase in a recombinant strain of *Streptomyces lividans*. Appli. Microbiol. Biotechnol. 50: 65-70.

Webb. C. D., Teleman. A., Gordon. S., Straight. A., Belmont. A., Lin. D. C., Grossman. A. D., Wright, A., and R. Losick. 1997. Bipolar localization of the replication regions of the chromosomes in vegetative and sporulating cells.88: 667-672.

Received	**2014/02/13**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2014/08/06**	**قبول البحث للنشر**