

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

2<sup>nd</sup> 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](mailto:albakrisal2@yahoo.com)

Farazdag N.H. Al-Bederi

Environment and Water Research, Ministry of Science and Technology

### Abstract

Selected optimal conditions for production of prodigiosin 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 °C 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 البروديجيوسين للعوائل 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 الزراعي في دورق مخروطي سعة 250 مل عند درجة حرارة 28 م° لمدة 72 ساعة في ظروف بعيدة عن الضوء.

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

#### المقدمة

إن من أكثر الخصائص المثيرة للاهتمام في بكتريا *S. marcescens* هي قابليتها على إنتاج الصبغة المعروفة بـ البروديجوسين Prodigiosin مع وجود أنواع بكتيرية أخرى منتجة لها الصبغة لها تطبيقات واعدة مستقبلية في مجالات عدة ومنها الطبي لأنها عامل ضد مايكروبي [1]، وفعاليتها ضد الخلايا السرطانية [2]. أما بيئياً فالصبغة لها الكثير من التأثيرات ومنها: تثبيط نمو الطحالب النامية في البيئة البحرية [3] وفعاليتها ضد الطفيليات ومنها طفيلي الملاريا في بيئة الأراضي المنخفضة والرطوبة

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 الأحمر الغامق إلى البرتقالي والوردي وذلك بالإعتماد على نوع الوسط الزراعي والرقم الهيدروجيني للوسط ودرجة الحرارة ومدة الحضان وعمر المستعمرة البكتيرية والضوء، إذ أن الصبغة في الظلام تحتفظ بلونها الغامق مدة أطول وذلك لحساسية الصبغة للضوء [6 و7]. أما عن تركيب صبغة البرودجوسين، فإنها تتمثل بمركب خطي ثلاثي حلقات البايروول متكون من إتحاد البايروول الأحادي (MAP) مع البايروول الثنائي (MBC) لتنتج صبغة البرودجوسين: 2-methyl-3-(8-amyly-6-methoxyprodigiosin).

### الظروف المثلى لإنتاج صبغة البرودجوسين نوع الوسط الزراعي

يتباين إنتاج الصبغة بحسب مكونات الوسط إذ وجد أن إضافة الكلوكوز إلى الوسط يشجع نمو البكتريا ولكن يحول دون إنتاج الصبغة لأنه يؤدي إلى خفض درجة حموضة الوسط بشكل كبير بعد إستهلاكه من قبل البكتريا. وإن إضافة الزيوت ومسحوق البذور لكل من جوز الهند وفسق الحقل والسمسم وفول الصويا للوسط الإنتاج يحفز إنتاج صبغة البرودجوسين وبكميات كبيرة منها [9 و10 و11]. كما أن وجود الفوسفات في الوسط يثبط إنتاج الصبغة، بينما حفز وجود كلوريد الصوديوم بتركيز 4-5% عملية الإنتاج [6]. وإن إضافة بعض المضادات الحيوية للوسط الإنتاج مثل مضاد Valinomycin و Polymyxin يسهلان إنتاج الصبغة من خلال إحداثها للتغيرات في جدار الخلية مما يساعد في دخول الأحماض الأمينية بكميات أكبر إلى الخلية لتشارك في صنع الصبغة [12].

### الرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي

يؤثر الرقم الهيدروجيني في إنتاج البرودجوسين وذلك عن طريق تأثيره في ذوبانية مكونات الوسط الزراعي وفي اتجاه سير العمليات الأيضية وإنتاج الصبغة، إذ أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الصبغة هو بين 8 - 8.5 [13].

### تأثير درجة الحرارة في إنتاج الصبغة

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 أو المنتجات الأيضية الأخرى، وهي تختلف باختلاف 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 البرودجوسين يكون ضمن المدى الحراري 12-36°م والدرجة المثلى لإنتاجها عند الإختبار لأكثر من درجة حرارية تجريبية بحدود 28-36°م [14 و15].

### تأثير مدة الحضان في إنتاج الصبغة

يزداد إنتاج الصبغة عندما تكون الخلايا فيما بعد التراجع وبداية طور الإستقرار Stationary phase إذ أن إنتاج الصبغة يكون غير واضح في طور التأقلم (Lag phase) بعدها يزداد بشكل واضح في أثناء دخول الخلايا في طور اللوغاريتمي (Log phase) حتى تصل أعلى إنتاجية لها عند بداية طور الإستقرار، وذلك عند حضان الوسط الزراعي مدة 72 ساعة [16 و17 و18].

### تأثير الضوء في إنتاج الصبغة

للضوء تأثير في إنتاج الصبغة، إذ تبقى الصبغة المنتجة في الظلام بلون أحمر غامق ولمدة طويلة، بينما في حالة إنتاج الصبغة تحت تأثير الضوء يتحول لون الوسط تدريجياً إلى 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].

### تأثير التهوية في إنتاج الصبغة

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 الزراعي، منها إستعمال الحاضنة الهزازة Shaker incubator، او زيادة مساحة السطح للوسط الزراعي الى حجمه إذ يكون لها تأثير في إنتاج الصبغة عن طريق توفير الأوكسجين المطلوب لإنتاج الصبغة، في حين ان قلة الأوكسجين لا يؤثر في 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 زرعى ودرجة حرارة ورقم هيدروجيني وتهوية وضوء ومدة حضن على بكتريا *S.marcescens* المعزولة من مصادر بيئية ومرضية لإنتاج صبغة البرودجيسين.

### طرائق العمل

تعيين الظروف المثلى لإنتاج صبغة البرودجيسين:  
تحضير الأوساط الزرعية التركيبية:

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

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

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

### تحضير أوساط 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-بريناني المحضر بالفقره السابقة، وعُقت 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، وأضيف 2غم 2 % من مسحوق البذور إلى 100 مل من وسط لوريا- بيرتاني المحضر كما في الفقرة السابقة، عمقت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 °م وضغط 15 باوند/إنج لمدة 15 دقيقة .

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

### مكونات الوسط الزراعي في إنتاج صبغة البرودجوسين

نشطت العزلتين المرضية والبيئية في وسط ترب تركز الصويا Trypticase soy broth بدرجة حرارة 37 °م للمرضية و 30 °م للبيئية ولمدة 24 ساعة، ثم لقت الأوساط الزراعية التركيبية المحضرة كما في الفقرات السابقة وبحجم 50 مل في دوارق سعة 250 مل وبواقع مكررين لكل وسط باستعمال لقاح 1% من المزرع 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 المزرع البكتيري على الأطوال الموجية 499 و 620 نانومتر، وحسبت كمية الصبغة بوساطة المعادلة (1) أدناه بحسب [23]:

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

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

### تحديد أفضل تركيز للوسط الزراعي في إنتاج صبغة البرودجوسين

حُضر وسط مسحوق بذور فستق الحقل كما ورد وبتراكيز مختلفة (1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6%)، لقيح الوسط بالعزلتين المرضية والبيئية والمنشطة بنسبة 1% من المزرع البكتيري الحاوي على 108 خلية/مل، حضنت الدوارق بدرجة حرارة 37 °م للعزلة المرضية و 30 °م للعزلة البيئية في حاضنة هزازة بسرعة 180 دورة/دقيقة مدة 24 ساعة، وأجري تقدير كمية الصبغة المنتجة كما جاء في الفقرة السابقة.

### تحديد درجة الحرارة المثلى في إنتاج صبغة البرودجوسين

حُضر وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% ولقت الأوساط، وحضنت بدرجات حرارية مختلفة (20 و 25 و 28 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 البرودجوسين:

حُضر وسط مسحوق بذور فستق الحقل (2%) بإختلاف الحامضية (5 و 6 و 7 و 8 و 9) وبإستعمال هيدروكسيد الصوديوم وحامض الهيدروكلوريك للمعايرة، ولقت الأوساط بالمزرع البكتيري، وحضنت 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 بذور فستق الحقل بتركيز 2% وبرقم هيدروجيني 8 بعد تلقیح الأوساط بنسبة 1% من المزرع 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 الحضانة المثلى في إنتاج صبغة البرودجيوسين**

حضنت أوساط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% وبرقم هيدروجيني مقداره (8) بعد تلقیح الأوساط بنسبة 1% من المزرع 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 و 72 و 96 ساعة)، وأُجري تقدير كمية الصبغة المنتجة.

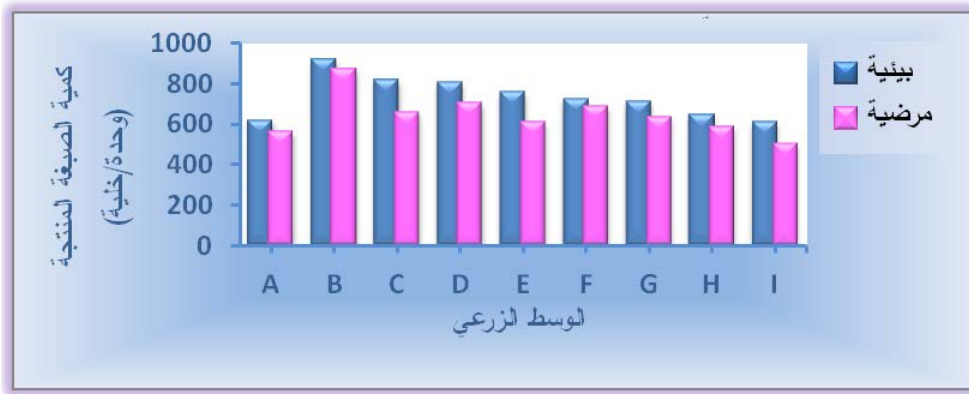
**دراسة تأثير التهوية والتقليب في إنتاج صبغة البرودجيوسين**

حضر وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% وبرقم هيدروجيني 8 بدوارق سعة 250 مل وبأحجام مختلفة (50 و 100 و 150 مل)، ولقحت الأوساط بنسبة 1% من المزرع 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 الزراعي**

أظهرت النتائج أن الأوساط الزراعية المستعملة في التجربة والتي شملت وسط لوريا- بريثاني وأوساط مساحيق فستق الحقل، السمسم، جوز الهند وفول الصويا وأوساط الزيوت (فستق الحقل، السمسم، جوز الهند، فول الصويا). أن أفضل وسط لإنتاج صبغة البرودجيوسين كان وسط مسحوق قرنات فستق الحقل ثم بذور السمسم. 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 و 11] فيما عد وسط زيت ومسحوق السمسم هما الأفضل ومن ثم بعدهما وسط مسحوق قرنات فستق الحقل وهذا جاء متفقاً مع [9]، كما برر سبب قلة إنتاج الصبغة في وسط مسحوق ثمار جوز الهند (وكما وجدته هذه الدراسة أيضاً)، لإحتواء هذه الثمار على حامض الكابريك Capric acid بنسبة تصل إلى 70% وحامض اللارك Lauric acid بنسبة تصل إلى 50% واللذان يمتلكان تأثيراً تثبيطياً واضحاً ضد بكتريا الدراسة مما يعرقل ويقلل نموها في الوسط وبالتالي سينعكس ذلك على أبيض إنتاج الصبغة. وبشكل عام ترى الدراسة الحالية أن تباين إنتاج الصبغة قيد الدراسة في الأوساط الزراعية المختلفة يعود إلى طبيعة المواد المكونة وتركيبها ودرجة تعقيدها لوسط الإنتاج، والذي قد يحتوي على مصادر كربونية بسيطة مثل السكريات الأحادية التي تتمكن البكتريا من إستهلاكها بسرعة وبسهولة مما يؤدي ذلك إلى نمو مضطرب على حساب إنتاج الصبغة، أو قد يحتوي على مصادر كربونية معقدة يصعب تحليلها وإستهلاكها، ومن الضروري وجود مصادر كربونية ممكن إستغلالها بكتيريا ولكن من خلال الإستهلاك البطئ الذي تسير عليه عمليات إنتاج الأيض الثانوي التي ترتبط بمعدلات النمو الواطئة كما ورد في [17] إذ يتفق ذلك مع الدراسة الحالية. وعن طبيعة مكونات الوسط الزراعي وتأثيرها في إنتاج الصبغة أيضاً، ترى الدراسة الحالية أن ذلك يعود إلى مابحتويه الوسط الأساس LBB لإنتاج الصبغة من مركبات كالبيبتون مثلاً والذي يعد من المكونات الأساسية فيه، وهو مصدر رئيس للنتروجين والكبريت والكاربون فضلاً عن الطاقة لنمو الخلايا البكتيرية، وكما يحتوي على مستخلص الخميرة الذي هو مصدر الأحماض الامينية والفيتامينات ومرافقات الأنزيمات

وهذا ما أكدته [9]. أما الأوساط التركيبية المدعمة للوسط الزراعي الأساس LBB كأوساط المساحيق والزيوت ذات المصادر النباتية سألفة الذكر، فقد تبين ومن نتائج الدراسة الحالية تأثيرها الإيجابي في النمو وإنتاج صبغة البرودجوسينو الذي يفسر بالإعتماد على نفس المصدر السابق أعلاه على أن هذه الأوساط حاوية على المعادن والفيتامينات والأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة التي تعد مصادر للكربون وتتغير حسب مصدر ونوع البذور المستعملة، كما أن المشبعة منها هي الأفضل لأنها مصدر للكربون أولاً والأفضل إنتاجاً للصبغة ثانياً قياساً بغير المشبعة. إذ وجد أن أعلى نسبة للأحماض الدهنية المشبعة هي في فستق الحقل والسمن وهذا يعكس على الإنتاج الأفضل للصبغة ويتفق مع ما وجدته الدراسة الحالية في هذين الوسطين، كما أن بكتريا الدراسة ووفقاً لـ [11] تقوم بإفراز إنزيمات (Lipases) المحللة للدهون والتي تعمل على تحليل الأحماض الدهنية والإستفادة منها بوصفها مصادر كربونية وموارد للحصول على الطاقة اللازمة للأبيض الخلوي للبكتريا قيد الدراسة والبحث، فضلاً عن كون هذه الأحماض تعمل كمادة أساس Substrate لتحت عملية تكوين مركبات الشد السطحي (Surfactants compounds) مثل Serrawettin إذ يسهل هذا إنتاج صبغة البرودجوسين في مرحلة الأبيض الثانوي للبكتريا.

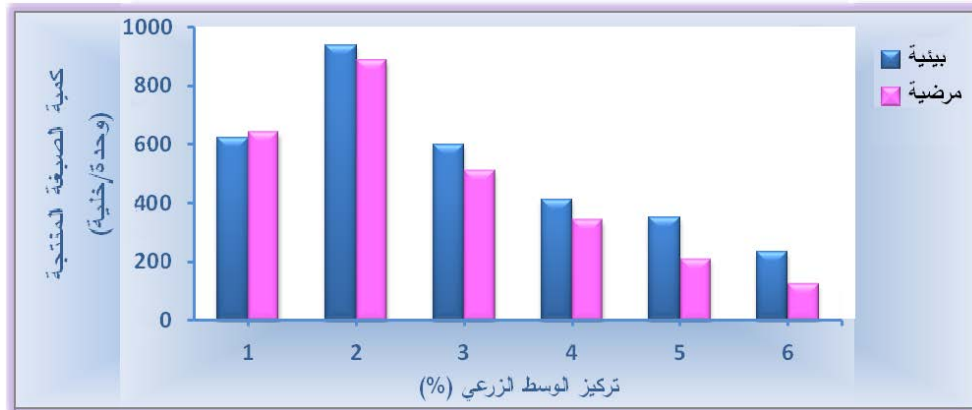


الشكل (1). إنتاج صبغة البرودجوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في أوساط زرعية مختلفة لمدة 24 ساعة

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

#### تركيز الوسط الزراعي

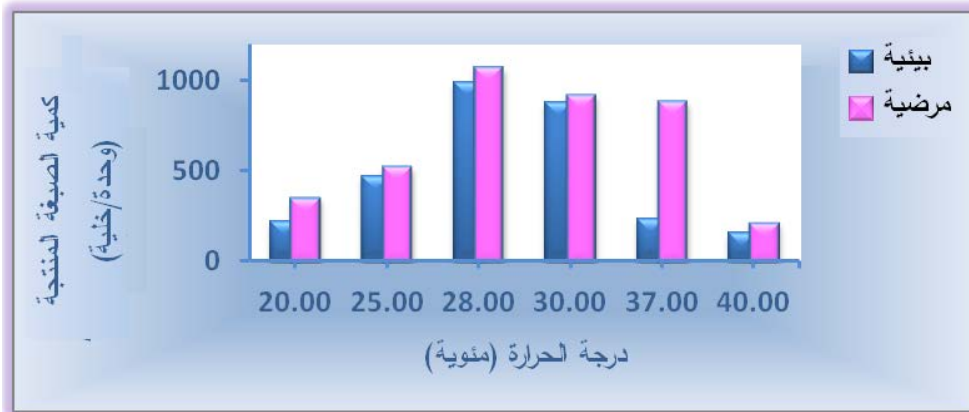
أظهرت النتائج أن تركيز وسط مسحوق فستق الحقل 2% هو الأفضل ما بين جميع التراكيز المستعملة في الدراسة (1%، 2%، 3%، 4%، 5%، 6%) من حيث إنتاج الصبغة، فكانت الأولوية للعزلة البيئية وبمقدار 935.82 وحدة/خلية، فيما تلتها العزلة المرضية وبمقدار 886.29 وحدة/خلية كما في الشكل 2 وهذا يتفق مع [16,10]. وأكدت بعض الدراسات بأن الوسط ذا التركيز الأوطأ هو الأفضل إنتاجاً للصبغة وأرجع ذلك إلى ارتفاع لزوجة الوسط من جهة، وزيادة تركيز هذا الوسط من جهة أخرى، مما يؤدي ذلك إلى إعاقة النمو البكتيري وبالتالي تقليل إنتاج صبغة البرودجوسين [11].



الشكل (2). إنتاج صبغة البروديجيوسين من العزلتين البيئية والمرضية عند تراكيز مختلفة من وسط مسحوق الفستق لـ 24 ساعة

#### تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج صبغة البروديجيوسين

بينت نتائج تطبيقات الحالة المثلى لدرجات الحرارة (20 و 25 و 28 و 30 و 37 و 40 °م) أن درجة حرارة 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 البروديجيوسين هي 30 °م [24,15]. من خلال النتائج نجد أن الاختلاف في درجات الحرارة المقترنه بأفضل إنتاج للصبغة، قد يعود الى عوامل مباشرة وغير مباشرة، المباشرة منها تعود الى العزلة البكتيرية نفسها وعائدية عزلها ومصادرها، وغير المباشرة منها تتضمن ظروف الإنتاج ومنها طبيعة مكونات الوسط الزراعي، 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 و 30 °م. كما أن التجربة أثبتت فشل العزلة البيئية في إنتاج الصبغة عند درجة حضانة 37 °م إذ كان تغير لون الوسط قليلاً جداً ولا يمكن الاستدلال 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 ببذور بعض النباتات الزيتية مثل فستق الحقل والسمسم. كما أن الدراسة الحالية تعزي سبب قلة إنتاج الصبغة مع ارتفاع درجة حرارة التحضين الى عدة أسباب، قد يكون العامل الوراثي ذو الدور المباشر في ذلك وهذا ما أكده [12]، اللذان بينا أن درجات الحرارة العالية تؤدي الى كبت الجينات المسؤولة عن التعبير لإنتاج الصبغة دون التأثير في نمو البكتيريا. 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 تحليل السبب (إنخفاض الإنتاج مع ارتفاع الحرارة) الى الجانب الفسلجي لأن الصبغة هي منتج أيضي ثانوي Secondary metabolite مما يفسر كون العزلات السريرية غير منتجة للصبغة وذلك لأن نموها في درجة حرارة جسم الانسان (37 °م) لا يؤهلها لإنتاج الصبغة بشكل يسير وإن إنتاجها يتطلب عاملاً إضافياً مجهداً لها، لذا فانها تدر هذه الطاقة من خلال أيضا لإنتاج مواد أخرى تساعدها في إستعمارها البكتيري للمضيف [27,26].



الشكل (3). إنتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% 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، إذ 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 أكدوا أن إنتاج الصبغة في الأوساط القاعدية هو الأفضل. وتعزي الدراسة الحالية ذلك إلى كون الوفرة العالية من البروتونات (الحامضية) عند انخفاض الرقم الهيدروجيني قد يؤثر ذلك في بعض المحفزات أو 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 البايروول الثنائي MBC، إذ أن تثبيط هذا الأنزيم يؤدي إلى زيادة تركيز حامض البرولين في الوسط والإستفادة من هذه التراكمات في بناء حلقة البايروول للـ MBC، مما يؤدي إلى زيادة كمية الصبغة المنتجة، في حين يؤدي ارتفاع أو انخفاض pH عن 8 إلى حدوث خلل أو قطع في المسارات الحيوية المؤدية لتخليق الصبغة لتأثيره في فعالية الانزيمات التخليقية [13].



الشكل (4). إنتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% بأرقام هيدروجينية مختلفة وبدرجة حرارة 28°م ولمدة يوم



## دراسة تأثير الضوء في إنتاج صبغة البرودجيوسين

لوحظ أثناء دراسة دور الضوء في إنتاج صبغة البرودجيوسين بأن هنالك تأثيراً كبيراً له في الصبغة وإنتاجها ، إذ وجد أن الصبغة بوجود الضوء تفقد لونها الاحمر الغامق وتتحول الى اللون الفاتح جداً مما يدل 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 و 20] الذين أكدوا أن صبغة البرودجيوسين تبقى في الظلام بلون أحمر غامق مدة طويلة بينما يتحول لونها تحت تأثير الضوء تدريجياً الى الأحمر الفاتح المائل الى الوردى 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 او الزرقاء)، من حيث أن هذه الظروف لا تؤثر في نمو البكتريا ولكنها تؤثر بشكل واضح في إنتاج الصبغة، بسبب تأثير استقرارية الصبغة وإنتاجها نتيجة لتحسس الصبغة للضوء، كما أن كمية إنتاج الصبغة لا يتأثر بالأشعة الحمراء وتحت الحمراء ولكنها تتأثر بشكل واضح بالأشعة المرئية البيضاء وكما بينت النتائج في هذه الدراسة.



الشكل (5). إنتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% و بدرجة حرارة 28 °م ورقم هيدروجيني 8 وبظروف ضوئية مختلفة لمدة 24 ساعة

## تحديد مدة الحضن المثلى لإنتاج صبغة البرودجيوسين

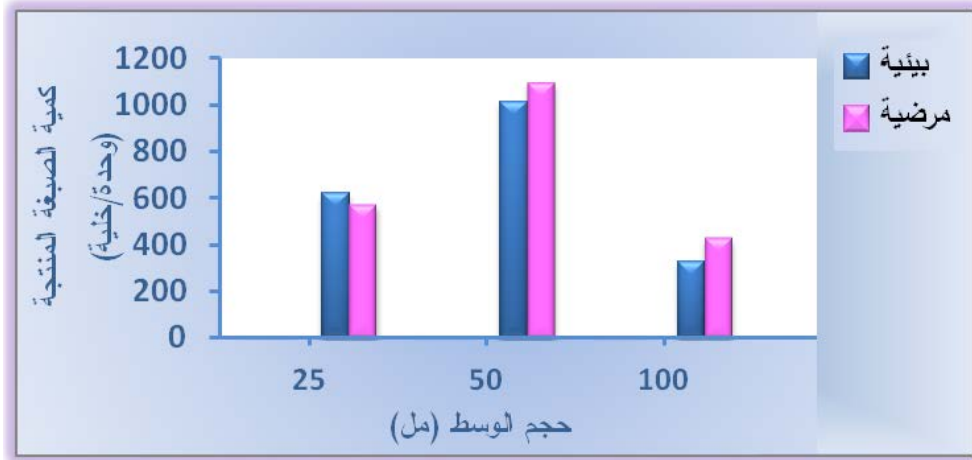
تبين في تجارب تحديد فترة الحضن المثلى لإنتاج الصبغة ومن خلال عدة فترات زمنية مختلفة (18 ، 24 ، 36 ، 48 ، 72 ، 96 ساعة) ، أن الحضن مدة 72 ساعة هو الأمثل والأنسب لإنتاج الصبغة، إذ بلغ عندها إنتاج العزلة المرضية 1125.30 وحدة/خلية والعزلة البيئية 1032.36 وحدة/خلية كما في الشكل 6. وقد يعود السبب في ذلك الى أن الأطوار المتأخرة في النمو، تفرز منتجاتاً أيضاً ثانوية وأن مدة 72 ساعة تعد ممثلة لطور الإنقسامات السريعة وقد تصل الى الأطوار اللاحقة وهذا ما يوضح إنتاج الصبغة في طور الإستقرار Stationary 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 لـ 72 ساعة. ويفسر ذلك على ما جاء به [16] و [18] الذين بينوا أن إنتاج الصبغة يكون ذا علاقة بطاقة الخلية ATP اي الطاقة التي تستهلكها بكتريا *S. marcescens* في أعضائها 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). إنتاج صبغة البرودجيوسين من العزلة البيئية والعزلة المرضية عند نموها في وسط مسحوق بذور فستق الحقل بتركيز 2% و بدرجة حرارة 28 °م ورقم هيدروجيني 8 وبعدم وجود الاضاءة وبمدد زمنية مختلفة

#### دراسة تأثير التهوية والتقليب في إنتاج صبغة البرودجيوسين

أظهرت النتائج بان هنالك دوراً مميزاً ومحددًا للتهوية في إنتاج الصبغة قيد الدراسة، عن طريق إختيار ثلاثة حجوم من الوسط الأفضل وعلى وفق التجربة (مسحوق فستق الحقل) وهي (25 و50 و100) 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 او النقصان في حجم الوسط الزراعي عن 50 مل وكما في الشكل 7، وتبرر النتائج بان تناقص حجم الوسط الزراعي 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 للأبيض 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 الزراعي الى الحجم الكلي مما ينتج عن ظروف اقرب الى اللاهوائية، كما ان الظروف اللاهوائية تمنع تخليق بوادئ صبغة الباييرول الأحادي (MAP) والبايرول الثنائي (MBC) مما يؤدي الى تثبيط عملية تكثيفهما معاً لتكوين الصبغة [17 و22].



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

#### الإستنتاجات

أن تنوع مصادر العزلات قيد الإختبار مابين المرضية والبيئية أعطى وضوحاً ودلالات أكثر للتفضيل من حيث الأبيض الثانوي البكتيري لصبغة البرودجوسين، ولكل أهمية البحثية و أن تباين تنوع الأوساط المدعمة للإنتاج وتراكيزه، جعل تباين في كميات وتراكيز البرودجوسين المنتجة أيضاً صعوداً ونزولاً. أن مسار إنتاج الصبغة يرتبط أولاً وأخراً 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", *Microbiol. Immunol.*, 49(5), 407-415, 2005.
- [2] Saez Diaz, 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”, Bioscience., 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”, (9<sup>th</sup>ed.), Williams and Wilkins, USA., 1994.
- [15] Tanikawa,T.; Nakagawa,Y. and Matsuyama, T., “Transcriptional downregulator HexS controlling prodigiosin and serrawettin W1 biosynthesis 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.; Sahn, D. and Weissfeld, A., “Baily Scott’s Diagnostic Microbiology”, 11<sup>th</sup>ed., 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”, 6<sup>th</sup> 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 marcescens* 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.