دراسة تأثير الكروميوم على كفاءة البكتيريا في إنتاج انزيم الاسبراجينيز

فضا مهجع سليمان العنزي

إشراف : د. علوية محمد الحبشي الهاشمي

المستخلص

إنزيم الاسباراجينيز الرباعي له نشاط مضاد للأورام السرطانية في الخلايا البشرية. إن إنتاج الأنواع الأوكسجينية المتفاعلة هي الآلية الرئيسية للسمية الوراثية للكروميوم، تلك السمية للكروميوم قد تم إثباتها خلال قدرته على إنتاج ذرات الأوكسجين الحرة المتفاعلة كنوع من ذرات الأوكسجين المتفاعلة. لذلك ومن هذا المنطلق، تم الكشف والتعريف عن أنواع بكتيرية منتجة لإنزيم الاسباراجينيز والتحقق من تأثير الكروميوم على إنتاج تلك الأنواع البكتيرية لهذا الإنزيم. في هذه الدراسة، تم عزل خمسين عزلة من منطقة الجذور لأربعة نباتات(الشبت، الرجلة، الجرجير ونبات الفاصوليا)، إضافة إلى عينة واحدة تم عزلها من تربة المنطقة الزراعية في منطقة الجموم، مكة المكرمة، المملكة العربية السعودية. قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الاسباراجينيز تم التحقق منها باستخدام اختبار الفحص على الأطباق البيئية إم تسعة التي تحتوي على حمض الأسباراجين مع صبغة الفينول الأحمر كمؤشر. لقد أظهرت النتائج أن هناك أربع عزلات بكتيرية لها قدرة كبيرة على إنتاج إنزيم الاسباراجينيز. استنادا على نتائج الاختبارات للخصائص المظهرية والكيموحيوية، إضافة إلى بيانات التسلسل الجيني للوحدة ١٦ للحامض النووي الرايبوزومي، وقد تم اختيارها وتعريفها على أنها(HO6) *Acinetobacter baumannii* ، *Acinetobacter haemolyticus* (FA3) ، *Acinetobacter lwoffii* (FA1) و *Tatumella ptyseos* (FA2). تم تقديم التسلسل الجيني للسلالات إلى المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية تحت ارقام خاصة كالتالي.KY313625 للسلالة(FA1) *A. lwoffii* ، KY313626 للسلالة (FA2) *T. ptyseos* ، KY313627 للسلالة *A. haemolyticus* (FA3) و KY313633 للسلالة (HO6) *A. baumannii*. ثم تم تحديد السلالة *T. ptyseos* كأول سلالة لها قدرة عالية على إنتاج إنزيم الأسباراجينيز. بالإضافة إلى ذلك ، تم اختبار تأثير المضادات الحيوية على نمو البكتيريا لكل سلالة كنوع من التعريف وأظهرت النتائج أن جميع السلالات حساسة لكل من Streptomycen, Levofloxacin، Tigecycline،Tobramycin ، Vancomycin و Clindemycin بينما كانت مقاومة لكل من Ampicillin/Sulbactam و Metronidazol. بالإضافة إلى اختبار تعريفي آخر وهو عزل البلازميدات ، حيث أظهرت النتائج أن ثلاث سلالات تحتوي على نوع واحد من البلازميد بينما السلالة (FA1) *A.lwoffii* تحتوي على اثنين من البلازميد. علاوة على ذلك، تم استخدام هذه السلالات لاختبار التأثير السام لتراكيز مختلفة للكروميوم على نشاط الانزيم. أظهرت نتائج التحليل الطيفي انخفاضا ملموسا لنشاط الإنزيم في السلالات التالية *A. baumannii* (HO6) و(FA2) *T. ptyseos* في حيث كانت هناك زيادة في نشاط الإنزيم للسلالة (FA3) *A. haemolyticus* . تم اختيار السلالة (HO6) *A. baumannii* لدراسة تأثير الكروميوم السام على التعبير الجيني لإنزيم الأسباراجينيز باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للتقدير الكمي وذلك للتحقق من مستويات التعبير الجيني للإنزيم في هذه السلالة قبل وبعد المعاملة بالكروميوم. أظهرت نتائج التحليل الكمي انخفاضا ملموسا في مستوى تعبير جين الأسباراجينيز بعد المعاملة بالكروميوم. أيضا تم اختبار تأثير الكروميوم على البلازميد في السلالة (HO6) *A. baumannii* وكانت النتيجة اختفاء البلازميد.

Studying the effect of chromium on efficiency of L-asparaginase – producing bacteria

Fada Mohajji Soliuman AL-Enazi

Supervised by Dr. Alawiah Mohammad AL-Hebshi

ABSTRACT

L-Asparaginase is a tetrameric protein, having anti leukemic activity on human cells. Reactive oxygen species (ROS) production is the central mechanism for Chromium genotoxicity, which was demonstrated through its ability to generate superoxide radical anions as a type of ROS. Therefore, screen and identify L- asparaginase bacteria and verify the effect of chromium CrO3- [Cr (VI)] on bacterial L-asparaginase production and activity were required. In this study, fifty isolates were obtained from the rhizospheres of four plants (Anethum graveolens, Portulaca oleracea, Eruca sativa and Phaseolus vulgaris), and one isolate was obtained from the soil in Algamom, Makkah, Saudi Arabia. The fifty bacterial isolates were screened for potential L-asparaginase production using a rapid assay plate method on M9 medium containing L-asparagine with phenol red as an indicator. Four isolates showed promising enzyme activity. Based on morphological, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequencing data. The most potent isolates were selected, identified and designated as Acinetobacter baumannii (HO6), Acinetobacter haemolyticus (FA3), Acinetobacter lwoffii (FA1) and Tatumella ptyseos (FA2). The sequences were submitted to the NCBI GenBank under accession numbers, KY313625 for A. lwoffii (FA1), KY313626 for T. ptyseos (FA2), KY313627 for A. haemolyticus (FA3) and KY313633 for A. baumannii (HO6) isolates. FA2 is the first T. ptyseos strain was identified with high levels of L-asparaginase enzyme production. Moreover, the effect of antibiotics on bacterial growth of each strains as a sort of identification was examined and results showed that all strains were sensitive to Streptomycen, Levofloxacin, Tigecycline, Tobramycin, Vancomycin and Clindemycin, whereas were resistance to Ampicillin/Sulbactam and Metronidazole. In addition, another identification was the plasmid profile where results showed that the three strains harbored one plasmid whereas A. lwoffii (FA1) harbored two plasmids. Furthermore, these strains were used to examine the toxic effects of low concentrations of chromium (VI) on enzyme activity. Spectrophotometric analysis revealed that the three CrO3 [Cr(VI)] concentrations (0.05, 0.1 and 0.15 mM) reduced the enzyme activity of A. baumannii (HO6) and T. ptyseos (FA2) whereas enhanced the enzyme activity of A. haemolyticus (FA3). Therefore, A. baumannii (HO6) was selected to examine the toxic effects of low concentrations of chromium (VI) on L-asparaginase gene expression using quantitative real time PCR (qRT PCR) to verify of L-asparaginase gene expression levels in A. baumannii (HO6) before and after treatment with three different CrO3 [Cr(VI)] concentrations. Quantitative analysis of asparaginase gene mRNA showed that addition of three CrO3 [Cr(VI)] concentrations (0.05, 0.1 and 0.15 mM) reduced significantly the expression level of L-asparaginase gene compared with control where (P-value < 0.05). Also, the

plasmid content within A. baumannii (HO6) was examined before and after treatment with the three chromium concentrations and the results showed plasmid curing.