تحديد قابلية العزلات البكتيرية من مصابين باخماج المسالك البولية في انتاج انزيم L-Asparginase

مروة حسن عبدالوهاب[1] ، كركز محمد ثلج[2]

[1] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2] كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

انجزت الدراسة بهدف عزل وتشخيص الأنواع البكتيرية المسببة لخمج المسالك البولية لدى المراجعين لمستشفى تكريت التعليمي من الجنسين وباعمار متنوعة. كما تم تحديد قابلية الانواع البكتيرية المعزولة في انتاجها لانزيم L-asparginase وبيان الظروف البيئية وتركيبة الوسط المناسبة للوصول الى اعلى انتاج منها. بينت النتائج ان 142 عينة كانت ايجابية في العزل المايكروبي منها (94.67%) من مجموع عينات الدراسة التي كانت 150 عينة، وان نسبة العزل المرتفعة كانت من الاناث بنسبة 58% ومن الفئة العمرية بين 51 الى 75 سنة ومن الجنسين. تبين ايضا ان النوع البكتيري *E.coli* كان الاعلى في نسبة العزل تبعه النوع *Citrobacter diversus* و *Enterobacter aerogenes* والنوع *Klebsiella pneumonia* التي كانت عند 54.2، 21.1، 17.6 و 7.04% على التوالي.

ان تقدير قابلية العزلات على انتاج انزيم L-asparginase وضح بان العزلات من بكتريا *E.coli* كانت الاكثر انتاجا اذ وصل الانتاج من العزلة رقم 3 الى 70.4 وحدة دولية/مل. وعند اختبار الظروف البيئية وتركيبة الوسط المثالية للوصول لاعلى انتاج من الانزيم تبين ان الظروف المثلى للانتاج من العزلة E.coli-Iso.3 كانت في حالة التنمية عند 35 ° م و 7.0 pH لمدة تحضين 24 ساعة وتحريك عند 150 دورة/دقيقة في وسط يتكون من كل من المالتوز، L-asparginase ، NaCl و KH2PO4 عند 10 و 100 و 5.0 و 0.75 غم/لتر على التوالي.

الكلمات الدالة: *E.coli*، اخماج المسالك البولية، انزيم L-asparginase.

المقدمة

ينتمي انزيم L-Asparginase الى مجموعة انزيمات الاميديز (Amidase) وتاتي اهميته من امتلاكه للنشاط المضاد لسرطان الدم لاسيما اللمفاوي[22]. اكتشف الانزيم وفاعليته العلاجية من خلال استخلاصه من خلايا انسجة خنازير غينيا. الذي لم يتم العثور عليه في اي نوع من خلايا البشر [13]. وعلى الرغم من وجود انزيم L-Asparginase في الانواع المختلفة من الكائنات الحية كالنباتات او الحيوانات ونظرا لصعوبة طرق استخلاصه من المصادر اعلاه، فقد اتجهت الأبحاث الى انتاج الانزيم من تنمية الاحياء المجهرية وقد تبين بان المنتج منها ذا فاعلية في تثبيط الاورام السرطانية وكانت فاعليته مشابهة لفاعلية الانزيم المستخلص من مصل خنازير غينيا [29]، كما تعد الاحياء المجهرية بانها اكثر المصادر كفاءة لانتاج الانزيم، لكونها تتميز بان طرائق تنميتها لاتحتاج الى تعقيدات فضلا عن قصر الوقت اللازم للحصول على المنتج وقلة التكاليف اضافة الى سهولة عمليات استخلاص وتنقية الانزيم وامكانية انتاج الكميات الكبيرة منها بسهولة مقارنة مع المصادر الاخرى [20، 25]. دلت التقارير العلمية بأن خصائص الانزيم تختلف من كائن مجهري لاخر, كما ان الخصائص الحركية والكيموحيوية له تختلف مع الطبيعة الجينية للسلاله الميكروبية المستعملة [12، 32].

ان اهمية الاحياء المجهرية كمصدر لانزيم L-Asparginase قد تم التركيز عليها منذ ان تم الحصول على هذا الانزيم من بكتريا *E.coil* [5]. التي تم استعمالها بشكل تجريبي كعامل مضاد لسرطان الدم في البشر [34]. مما تقدم فان هدف الدراسة كان في الحصول على العزلة الميكروبية المنتجة لتراكيز مقبولة من انزيم L-Asparginase وتحديد تاثير بعض الظروف البيئية او المتعلقة بتركيبة الوسط الزرعي في قابليتها الانتاجية.

مواد وطرائق العمل

جمع العينات Samples Collection:

جمعت 150 عينة من عينات الادرار للمرضى من الجنسين بأعمار تراوحت بين 5 الى 75 عام الراقدين والمراجعين لمستشفى تكريت التعليمي للمدة من بداية تشرين الثاني 2013 لغاية ايار 2014 ألذين يعانون من أعراض أخماج المسالك البولية وهي حرقة وصعوبة البول. جمعت العينات في قناني بلاستيكية معقمة وروعي ان يتم التوصية بان يكون جمع العينة من الادرار الوسطي بعد غسل المنطقة التناسلية باستعمال المنظفات لتجنب حصول التلوث بانواع الأحياء المكونة للنبيت الطبيعي الموجود في هذه المنطقة [35]. سجلت ألمعلومات المتعلقة بالعمر والجنس ووجود او عدم وجود إصابات سابقة باخماج المجاري البولية ونوع البكتريا المسببة للخمج لكل مريض على حده.

زرع العينات Samples Culture:

تم زرع العينات على الأوساط الزرعية الاتية: وسط أكار الدم، وسط أكار اليوريا، وسط الحليب الفرز، وسط أكارالماكونكي، وسط أكار الدم، وسط ازرق المثيلين وكما في [2].

تشخيص العزلات البكتيرية

: Identification of bacterial Isolates

شخصت العزلات البكتيرية اوليا بملاحظة ألشكل المظهري للمستعمرات من حيث حجم المستعمرة وقطرها وارتفاعها ولونها وشكل حافتها كذلك درست صفات المستعمرات المفردة على وسط Blood agar ووسط Eosin Metheline Blue (EMB) وشخصت مدى قابليتها على تخمير سكر اللاكتوزالموجود في وسط MacConkey's agar. إستخدمت الطرق المتبعة من قبل [38] حيث حضرت مسحات رقيقة من المستعمرات لملاحظة قابليتها للاصطباغ بصبغة كرام والتعرف على أشكال الخلايا. كما أجريت الأختبارات الكيموحيوية إعتمادا على ماذكر [7] التي تضمنت كل من اختبار الاوكسيديز، إختبار تخمر اللاكتوز، فحص الكتاليز، إختبار الحركة، إختبار تميع الجيلاتين، إختبار أزرق المثلين والأيوسين ومجموعة اختبارات IMVIC التي تضمنت كل من اختبار الاندول واختبار المثيل الأحمر، اختبار فوكس بروسكر واختبار استهلاك السترات. حفظت العزلات الجرثومية بعد تشخيصها على أوساط زرعية مائلة slants من الاكار المغذي Nutrient agar في الثلاجة بدرجة 4°م واستمرت عملية الادامة بشكل دوري شهريا من خلال تجديد زرعها على اوساط جديدة لضمان بقائها نشطة طيلة مدة الدراسة، هذا الحفظ يعد قصير الامد. اما لغرض حفظ العزلات لفترات طويلة دون احتمال تعرضها لفقدان بعض مواصفاتها الوراثية فقد أستخدم وسط نقيع القلب والدماغ Brain-heart infusion broth المضاف اليه الكليسيرول بنسبة 15%’اذ تم تلقيح انبوبة اختبار حاوية على (5-10) مل من الوسط بمستعمرة واحدة وحضن المزروع لمدة 24 ساعة ثم نقل 0.85 مل من المزروع الى قناني ذات غطاء محكم تحوي 0.15 مل من الكليسيرول المعقم ومزج المزيج بقلب الانبوبة الى الاسفل والاعلى عدة مرات بعد غلقها وخزن المزروع بدرجة -20 م لحين الاستعمال وتم تجديد المزارع كل ستة اشهر [4 ، 36] .

تحديد قابلية العزلات البكتيرية في انتاج انزيم L-Asparginase

انتاج الانزيم Enzyme production:

سحب 1 مل من معلق البكتريا بعمر 24 ساعة ولقح به 100 مل من وسط الانتاج الذي تكون من غم/لتر: 5 غم من NaCl ، 100 غم من L-asparagine، 10 غم من Maltose، 0.75 غم من KH2PO4 وكان مستوى الـ pH عند 7.0 المعقم باستعمال الموصدة عند 121 ° م لمدة 15 دقيقة في دورق حجمي بسعة 250 مل. تم التحضين عند 35 ° م لمدة 48 ساعة مع التحريك عند 100 دورة/ دقيقة في حاضنة هزازة.

تنقية الانزيم: Enzyme purification:

اعتمدت الطريقة المحورة من قبل [10] التي تضمنت اجراء الطرد المركزي عند 10000 دورة لمدة 12 دقيقة للحصول على الراشح الذي تم احتسابه لتحديد كمية سلفات الامونيوم اللازمة لتمليحة وهي عند 70% . نقل الراشح الى دورق حجمي وادخلت معه قطع ممغنطة (Magnatic stirrer) في ظرف تجميد باستعمال صندوق ثلجي. مسحوق سلفات الامونيوم تم اضافته تدريجيا لحين اكمال سحب الماء بالكامل من قبلها ثم تركت للترسيب والتكتل في الثلاجة لمدة 24 ساعة. بعدها جمعت القطع المترسبة واعيد اذابتها في 10 مل من 50 mM لمحلول Tris hydrochloric . المحلول المتحصل عليه تم تنقيته باستعمال الديلزه من خلال تقنية كروماتوكرافيا التبادل الايوني التي استعمل فيها عمود معبأ مع 2% DEAE cellulose وتم غسله مرتين باستعمال الماء المقطر. استعمل لتنشيطة محلول منشط يتكون من 25 mM HCl و 25 mM NaCl . محلول الانزيم تم اضافته الى العمود مع المحلول المنظم المخفف المتكون من 25 mM من Tris HCl ثم تمت ازاحة الانزيم من خلال اضافة تركيز محلول NaCl المتسلسل التركيز بين (50, 75 and 150 mM) وتم جمع الانزيم المزاح في نفس انابيب الجمع.

تقدير نشاطية الانزيم Assay of Enzyme activity:

قدرت نشاطية الانزيم اعتمادا الى ماجاء في [26] حيث سحب 0.5 مل من محلول الانزيم المنقى واضيف اليه 0.5 مل من محلول L-Aspargine و 0.5 مل من داريء الفوسفيت 0.1 مولاري (pH 8) و 0.5 مل من الماء المقطر ليتكون محلول بحجم 2 مل الذي تم تحضينه عند 37 ° م لمدة 30 دقيقة. تم ايقاف التفاعل بعدها باضافة 0.5 مل من 1.5 مولاري من حامض Tri chloro acetic . بعدها اضيف 3.7 مل من الماء المقطر الى 0.1 مل خليط المحلول و 0.2 مل من محلول Nessler’s . اللون المتطور عن تفاعل المضافات في المحلول تم قراءته بعد حضن المزيج عند 20 ° م لمدة 20 دقيقة عند الطول الموجي nm450 باستعمال جهاز Spectrophotometer. الانزيم مع المادة الخاضعة استعملوا كمجموعة قياس. وتم اعداد سبعة انابيب لتراكيز متسلسلة من L-Aspargine لاستعمالها في اعداد المنحنى القياسي. وقد اعتبر الانبوب الاول في انه القياسي (الجدول 1). رسم المنحنى القياسي من خلال العلاقة بين الامتصاصية عند 450 نانوميتر مع تركيز الاسبارجين L-Aspargine (ملغم/مل) بعدها تم قياس نشاطية الانزيم المنتج باستعمال المنحنى القياسي. القياسات تم تحديدها باستعمال 3 مكررات لكل عينة وقيست النشاطية بالوحدة الدولية/ مل (IU/ml) (شكل 3-1).

جدول 1. التراكيز المتسلسلة من L-Aspargine لاعداد المنحنى القياسي

رقم الانبوبة	كمية L-Aspargine (مل)	كمية الماء المقطر (مل)	تركيز L-Aspargine (ملغم/مل)	تركيز L-Aspargine (مايكرو مول/مل)
1	0	1.0	0	0
2	0.1	0.9	0.2	0.71
3	0.3	0.7	0.6	1.92
4	0.5	0.5	1.0	3.02
5	0.7	0.3	1.4	4.15
6	0.8	0.2	1.6	4.65
7	1.0	0	2.0	5.98

تأثير المعاملات المختلفة في قابلية البكتريا لانتاج الإنزيم:

1. تـأثير الظـروف البيئيـة: environmental conditions Effect of

اولا: تـأثير درجـة حرارة الحضـن: Effect of incubation temperature :

صُممت التجربة لغرض معرفة تأثير درجة حرارة تنمية النوع البكتيري *E.coli* في قابليته على إنتاج الإنزيم وفعاليته عند درجات حرارة مختلفة هي 20 و 25 و 30 و 35 و 40 و 45 ° م بعد التنمية على وسط إنتاج الإنزيم عند أس هيدروجيني 7 لمدة 48 ساعة والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة.

ثانيا: تأثير الأس الهايدروجيني: Effect of pH :

تم في هذه التجربة تغيير مستوى الاس الهيدروجيني لوسط الانتاج عند قيم مختلفة هي 6 و 6.5 و 7 و 7.5 و 8.0 والتنمية عند درجة حرارة 35 م لمدة 48 ساعة والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة لمعرفة تأثيرها في نمو سلالات النوع البكتيري *E.coli* ومقدار فعالية الإنزيم المنتج لكل منها.

ثالثا: تأثير مدة التحضين: Effect of incubation period:

لغرض معرفة أفضل مدة حضن داعمة لإنتاج الإنزيم ونمو النوع البكتيري *E.coli* من خلال تحضين النوع البكتيري *E.coli* لفترات زمنية عند 24، 48 و 72 ساعة عند درجة حرارة 35 م وأس هيدروجيني 7 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة.

رابعا: تاثير سرعة الرج Effect of agitations speed:

صُممت التجربة لمعرفة تأثير سرعة الرج عند 0.0 و 50 و 100 و 150 دورة/ دقيقة في تنمية النوع البكتيري *E.coli* وقابليته في إنتاج الإنزيم وفعاليته عند درجة حرارة 35 ° م بعد التنمية على وسط إنتاج الإنزيم عند أس هيدروجيني 7 لمدة 48 ساعة.

2. تأثير تركيب الوسط الزرعي:

اولا: تـأثير التراكيز المختلفة من المالتوز Effect of maltose concentration:

صُممت هذه التجربة لدراسة تأثير إضافة التراكيز المختلفة من المالتوز عند 5 ، 10 و 15 (غم / لتر) في مقدار فعالية الإنزيم عند التحضين عند درجة حرارة 35 ° م لمدة 48 ساعة واس هيدروجيني 7.0 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة.

ثانيا: تأثير التراكيز المختلفة من L-Aspargine، Effect of L- Aspargine concentration :

أضيفت مادة L-Aspargine بتراكيز عند 50 ، 100 و 150 (غم / لتر) في مقدار فعالية الإنزيم عند التحضين عند درجة حرارة 35 ° م لمدة 48 ساعة واس هيدروجيني 7.0 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة.

ثالثا: تأثير التراكيز المختلفة من كلوريد الصوديوم، Effect of sodium chloride concentration : أضيفت مادة كلوريد الصوديوم بتراكيز 2.5 ، 5.0 و 7.5 (غم / لتر) في مقدار فعالية الإنزيم عند التحضين عند درجة حرارة 35 ° م لمدة 48 ساعة واس هيدروجيني 7.0 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة.

رابعا: تأثير التراكيز المختلفة من ثنائي فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4، Effect of KH_2PO_4 concentration :

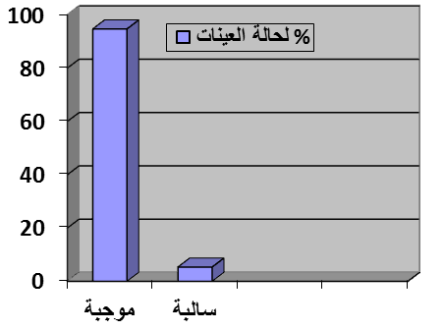
تم إضافة مادة KH_2PO_4 بتراكيز 0.50 ، 0.75 و 1.0(غم / لتر) في مقدار فعالية الإنزيم عند التحضين عند درجة حرارة 35 ° م لمدة 48 ساعة واس هيدروجيني 7.0 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة.

تم تنفيذ التجربة بموجب التصميم العشوائي الكامل (Complete Randomized Design) وأُجري تحليل التباين بإستخدام النموذج الخطي العام (General Linear Model) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز [33]، وفي حالة وجود فروقات معنوية استخدم إختبار دنكن [11] لتحديد معنوية الفروقات مابين المتوسطات المختلفة عند مستوى إحتمالية 0.05 .

النتائج والمناقشة

اعداد النموات البكتيرية المأخوذة من عينات اخماج مختلفة ونسبها:

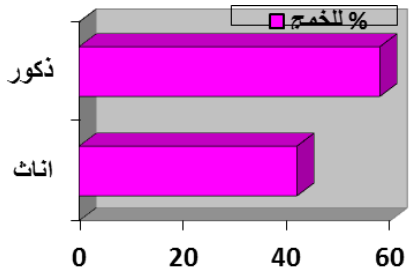
شملت الدراسة الحصول على 150 عينة من المصابين باخماج السبيل البولي التي كانت موجبة منها للعزل من الانواع السالبة لصبغة كرام عند 142 (94.67%) اما العينات السالبة للعزل فقد كانت عند 8 (5.33%) اعتمادا الى مصدر العزل الشكل (1).



شكل 1. نسبة العينات الموجبة والسالبة للعزل الجرثومي

ان وجود نسبة من العينات ظهرت في انها سالبة للاختبار المايكروبي ولم تعطي نموا مايكروبيا في العينات السريرية المأخوذة من المرضى يمكن ان يعزى الى احتمال تناولهم جرعات من المضادات الحيوية قبل اخذ العينه او ان نوع المسبب المرضي قد يكون مصدره من بعض انواع الممرضات الاخرى التي تتميز بصعوبة الكشف عنها عند استعمال الطرق الروتينية الاعتيادية، وانها تحتاج الى طرائق خاصة للكشف عنها، منها على سبيل الذكر الفايروسات و Chlamydia [14]. كما قد يكون السبب عائدا الى الاختلاف في حجم وطبيعة العينات المأخوذة، وكذلك التفاوت في درجات الحرارة والرطوبة وأختلاف الحياة الاجتماعية للمصابين.

علاقة أخماج المسالك البولية بالجنس والعمر Relationship of UTI with Sex and age : تبين من النتائج إن الأناث كانت أكثر عرضة للاصابة بأخماج المسالك البولية UTI مقارنة مع حالات الاصابة في الذكور الشكل (2). فقد تبين ان نسبة إصابة الأناث بلغت عند (58%) في حين كانت نسبة الأصابة عند الذكور (42%).



شكل 2. توزيع أخماج المسالك البولية (UTI) حسب الجنس

يمكن ان يعزى سبب إختلاف نسبة الإصابة في كلا الجنسين الى الاختلاف الفسيولوجي لاسيما قصر الأحليل في الأناث وقربه من فتحة الشرج الذي يتيح الفرصة لانواع البكتريا في الدخول وإستعمار الأحليل والمثانة، فضلا عن العامل الجنسي في تسهيل أنتقال البكتريا المرضية من المناطق المحيطة بالأحليل الى المثانة حيث تكون النساء أكثر عرضة للاصابة بالـ UTI بسبب التغيرات الهرمونية والتشريحية التي تحدث خلال هذه المدة، اضافة الى وجود بعض المثبطات الطبيعية أذ إن وجود عنصر الزنك في سائل البروستات لدى الرجال يكون عمله كمادة قاتلة للانواع البكتيرية عند وجودها (Germicidal) وبذلك يساهم في خفض نسبة أصابة UTI عند الرجال مقارنة بالنساء [21] وهذا يتفق مع ماتوصلت اليه العديد من الدراسات في هذا المجال [15،23].

ان نسبة الاصابة في ألفئة العمرية الأقل من 20 سنة قد بلغت عند (10%) توزعت بين الذكور باعداد 5 (35.71 %) والأناث عند 9 (64.29 %) الجدول (4-1). اتفقت هذه النتيجة مع النتائج المستحصل عليها من قبل [8] الذي أشار الى إن نسبة إصابة الفئة العمرية الأقل من 20 سنة بلغت عند 24% كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية ايضا مع [24، 31]. يمكن ان تعزى قلة نسبة الاصابة في هذه الفئة العمرية في الدراسة الحالية الى إن الطفل السليم لايتعرض للاصابة بالأخماج البولية لاسباب تتعلق في الوضع التشريحي والفسيولوجي للمجرى البولي، الذي يكون فيه جريان الإدرار احادي الاتجاه (Unidirectional urinary flow) ويتم التفريغ الكامل للمثانه من البول خلال فترات منتظمة التي تحمي بدورها الأطفال من الإصابة [1]. لذلك فإن العدوى البكتيرية التي تحصل مع الرضع والأطفال الذين تقل أعمارهم عن 3 سنوات في كثير من الأحيان لايمكن اعتماده كالتهاب مجاري بولية وذلك لأن الأعراض والدلائل تكون غيرمحدده فضلا عن الصعوبة في الية جمع الادرار لذلك فان تفسير النتائج تكون ليست بالحالة المبسطة في هذه الفئة العمرية وبالتالي لايكون من الممكن دائما تاكيد التشخيص في نوع من الثقة [6]. اضافة الى ماتقدم فان الفئة العمرية المشار اليها تكون في مرحلة عدم اكتمال الجهازالمناعي وضعف البنيه الجسدية التي تكون كعامل سلبي يزيد من احتمالات حصول الاصابة بالاخماج.

جدول 2. توزيع اخماج المسالك البولية حسب الجنس والفئة العمرية

الفئة العمرية (سنة)	التوزيع حسب الجنس				اعداد الاصابات الموجبة	(%)
	اناث		ذكور			
	اعداد	(%)	اعداد	(%)		
الاقل من 20	9	64.29	5	35.71	14	10
50-21	21	61.76	13	38.24	34	24
75-51	60	63.83	34	36.17	94	66
المجموع	90	63.38	52	36.62	142	100

يعد الرجال اقل عرضة للاصابة بأخماج المسالك البولية مقارنة مع النساء على الرغم من امكانية اصابة الرجال وفي أعمار مختلفة لكن نسبة الإصابة وكما بينته النتائج كانت مرتفعة في الاشخاص المسنين حيث بلغ عدد الذكور المسنين والمصابين بأخماج المسالك البولية الذين تراوحت اعمارهم بين (51-75) سنة عند 34 شخصا (**36.17%**) وكما مبين في الجدول (1) الذين كانوا يعانون في الغالب من التهاب غدة البروستات(Prostatitis). على الرغم من انخفاض حالات الاصابة باخماج السبيل البولي لدى الذكور بشكل عام الا ان الكثير من العوامل التي تزيد من فرص حصولها اذ تعد المزاولة الجنسية من اهم المسببات في انتقال الخمج من الطرف المصاب الى الطرف السليم لذلك فان النصح يكون في تفريغ المثانة بشكل كامل بعد كل عملية جماع للحيلولة دون الإصابة بالصدمة الاحليلية Ureteral Syndrome او إصابة المثانة [18، 23].

تبين من نتائج الدراسة الحالية ايضا حصول زيادة في نسبة الإصابة بالـ UTIفي النساء بعد سن الياس أذ بلغ عدد الأناث المصابات بالتهاب المسالك البولية للاعمار بين (51-75) عند 60 مصابة

(63.83 %) وكما مبين في الجدول (4–1) . توافقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه الدوري، (2011) الذي وجد إن نسبة إصابة الفئات العمرية الاكبرمن40 هي عند (27.5%). يمكن ان يعزى السبب في ذلك الى نقص افرازهورمون الإستروجين لدى النساء في الفئة العمرية المشار اليها الذي في حالة افرازه فانه يحفز من تكاثرانواع بكتريا حامض اللاكتيك Lactobacillus في الخلايا الطلائية المبطنة للمهبل حيث تسبب في خفض مستوى الاس الهيدروجيني مما يخلق بيئة غيرمفضلة لنمو الانواع البكتيرية المرضية لاسيما من انواع العائلة المعوية Enterobacteriaceae وعدم قدرتها في استيطان المهبل واحداث الامراضية وهذا مايحصل في الفئات العمرية قبل سن الياس في النساء [30]. ان ارتفاع نسبة الاصابات بالاخماج في النساء يمكن ايضا ان يكون راجعا الى حالات الحمل لدى بعض النساء المعتمدين في الدراسة حيث ان المراة الحامل تعاني من استمرار الإصابة بالأخماج البكتيرية في جهازها البولي بنسبة اكبرمن غيرالحامل، وذلك بسبب حصول حالة الركودة البولية المرافقة للحمل والتي تؤهب لنومستعمرات بكتيرية وحدوث التهابات المسالك البولية.

عزل وتشخيص البكتريا ألمسببه لإلتهاب المسالك البولية Isolation and Identification of Bacterial caused of (UTIs) :

تم تشخيص بكتريا *E.coli* إعتماداً على استجابتها لكل من الإختبارات الشكلية والمزرعية والكيموحيوية (الجدول 3). ظهرت مستعمرات بكتريا *E.coli* باشكال دائرية محدبة بحافة كاملة، ذا لون وردي على وسط الماكونكي الصلب، كما ظهرت المستعمرات بلون اسود مع بريق أخضر معدني على وسط الأيوسين مثلين الأزرق. اما الاشكال المجهرية لها فقد ظهرت كعصيات قصيرة سالبة لملون كرام. بينت الاختبارات الكيموحيوية ان جميع العزلات كانت مخمرة للاكتوز على وسط الماكونكي كذلك كانت جميعها منتجة لأنزيم الكاتليز والأندول إذ كانت ممتلكة للقدرة على شطر التربتوفان Tryptophan، وغير منتجة لإنزيم الاوكسديز، وسالبة لإختبار الفوكس–بروسكور، أما بالنسبة لإختبار المثيل الأحمرفقد اعطت جميع العزلات نتيجة موجبة لهذا الاختبار .تبين من إختبار الحركة على العزلات قيد الدراسة بانها كانت موجبة لفحص الحركة بينما كانت العزلات سالبة لإختبار إنتاج السترات وانها موجبة في قدرتها لتخمير انواع الكاربوهيدرات ماعدا سيليبايوز والاينوسيتول والرافينوز التي لم تتمكن من تخميرها. وكما في الجدول (3).تشابه النوع البكتيري *Citrobacter diversus* في الصفات الكيموحيوية مع النوع *E.coli* ماعدا الاختلاف في قدرتها على أستهلاك السترات وكذلك قابليتها في تخمير سكر السليبايوز وعدم قدرتها في تخمير سكر المليبايوز. اما نوعي البكتريا *Enterobacter aerogenes* و *Klebsiella pneumonia* فانه اضافة الى الاختلافات المظهرية للمستعمرات على الوسط الغذائي فانها تميزت عن النوعين السابقين في اختلافها التام في اختبارات IMVIC وكذلك اختلافاتها في القدرة على تخمير السكريات مما يؤكد ان هذه الانواع هي المشار اليها اعتمادا الى صفاتها الموضحة في الجدول (3) ومقارنة مع صفات الانواع التي ذكرت في [16].

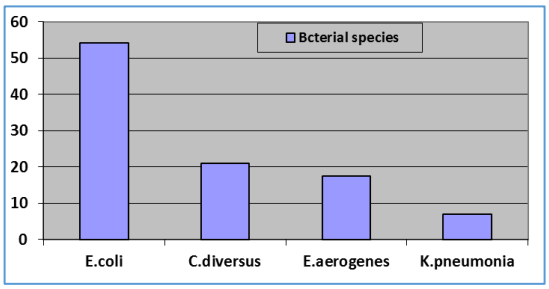
جدول 3. الفحوصات المظهرية والكيموحيوية للعزلات قيد الدراسة المعزولة من أخماج المسالك البولية.

انواع الأختبارات		الانواع البكتيرية			
		E.coli	*C.diversus*	*Ent. aerogenes*	*K. pneumonia*
أختبار الكتاليز		+	+	+	+
أختبار الأوكسيديز		-	-	-	-
أختبار الأندول		+	+	-	-
أختبار المثيل الأحمر		+	+	-	-
أختبار فوكس بروسكور		-	-	+	+
أختبار أستهلاك السترات		-	+	+	+
أختبار إنتاج غاز H_2S		-	-	-	-
أختبار تحلل اليوريا		-	-	-	+
أختبار إسالة الجلاتين		-	-	+	-
أختبار الحركة		+	+	+	-
أختبار تخمر السكريات	كلوكوز Glucose	+	+	+	+
	لاكتوز	+	+	+	+
	مانيتول	+	+	+	+
	سيليبايوز Celiobiose	-	+	+	+
	اينوسيتول	-	-	+	-
	رافينوز Raffinose	-	-	+	+
	زايلوز	+	+	+	+
	ارابينوز Arabinose	+	+	+	+
	رامنوز Rhamnose	+	+	+	+
	المليلبايوز Meliobiose	+	-	+	+
	سوربيتول	+	+	+	+

+ تعني ايجابية الاختبار – تعني سالبية الاختبار

توزيع اصابة المسالك البولية اعتمادا على الانواع البكتيرية:

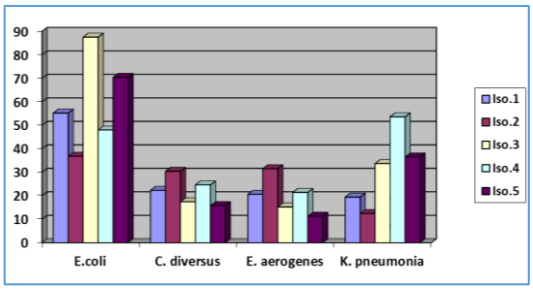
أظهرت نتائج العزل والتشخيص ان 77 عزلة من الانواع المسببة لاخماج المسالك البولية كانت تعود لبكتريا *E.coli* أي بنسبة (54.2%) اما بالنسبة للعزلات البقية فكانت 30 منها تعود للنوع *Citrobacter diversus* أي بنسبة (21.1%) و25عزلة منها كانت تعود الى النوع *Enterobacter aerogenes* أي بنسبة (17.6%) و10عزلات كانت تعود الى *Klebsiella pneumonia* وبنسبة (7.04%) وثمانية عينات لم تظهر أي نمو بكتيري (الشكل 3).



شكل 3. نسب الانواع البكتيرية المسببة لأخماج المسالك البولية (UTI).

تقدير انزيم L-Asparginase المنتج من العزلات البكتيرية:

قدرت كمية انزيم L-Asparginase المنتج من انواع العزلات بعد تنميتها على الوسط الخاص بالانتاج لمدة 24 ساعة. وقد بينت النتائج في الشكل (4) ان العزلة الاكثر انتاجا كانت احدى عزلات النوع *E.coli* حيث تبين ان العزلات منها بارقام 1، 2، 3، 4 و5 كان انتاجها من الانزيم عند 55.17، 36.8، 87.5، 48.0 و 70.4 وحدة دولية/مل على التوالي. اما في حالة عزلات النوع البكتيري *C. diversus* فقد تراوح انتاج عزلاتها بين 15.8 الى 30.4 وحدة دولية/مل. وتراوح الانتاج من الانزيم في حالة عزلات النوع *E. aerogenes* بين 11.3 الى 31.5 وحدة دولية/مل. بينما كان انتاج عزلات النوع *K. pneumonia* بين 12.4 الى 53.6 وحدة دولية/مل. تبين من النتائج ان العزلة (Iso.3) من النوع البكتيري *E.coli* كانت الاكثر انتاجا من العزلات البكتيرية الاخرى في الدراسة. يمكن ان يرجع ذلك الى امتلاكا القدرة الوراثية من خلال امتلاكها للجينات التي يمكن ان تعبر في انتاج انزيم L-Asparginase خلال تنميتها على وسط الانتاج [9]. لذلك تم استعمال العزلة اعلاه (Iso.3) لاتمام التجربة وانتاج الانزيم.



شكل4. قابلية العزلات في انتاج انزيم L-Asparginase

تأثير العوامل البيئية في قابلية بكتريا *E.coli* في إنتاج L-Asparginase: بعد ان تم اختيار العزلة البكتيرية الاكثر انتاجا التي كانت بالرمز Iso.3 من النوع البكتيري *E.coli* فقد تم اعتمادها لتحسين انتاجها من الانزيم بعد تجربة مجموعة من الظروف البيئية وكذلك التوليفة الافضل من مكونات الوسط للمكونات الكاربونية والنايتروجينية والتي كانت كالاتي:

تأثير درجة الحرارة: يبين الجدول (4) تأثير درجات الحرارة المختلفة في تنمية العزلة البكتيرية ***E.coli*-Iso-3** في وسط الانتاج السائل عند الرقم الهيدروجيني 7.0 لمدة 24 ساعة في مستوى إنتاج L-Asparginase. بينت النتائج ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم هي عند 35 م° حيث بلغت الفعالية الانزيمية 91,4 وحدة/ مل بينما انخفضت الفعالية الانزيمية في حالة انخفاض او ارتفاع درجات الحرارة عند 25، 30، 40، 45 م° .

جدول (4): تأثير درجات الحرارة المختلفة في انتاج L-Asparginase من بكتريا *E.coli*.

العزلة	التراكيز المنتجة من L-Asparginase (IU/ml) عند درجات حرارية مختلفة (م°)				
	25	30	35	40	45
***E.coli*-Iso-3**	e46.0 1.35±	c 78.7 2.95±	a91.4 3.04±	b87.5 4.74±	d73.5 3.74±

a–e: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

يمكن ان يعود السبب في ذلك الى ان درجة حرارة التنمية تعد من العوامل المهمة المحددة لقابلية نمو اي ميكروب وكذلك في تحديد قابليته على انتاج المركبات الايضية. اذ ان انخفاضها يسبب في تثبيط عمل معظم الانزيمات المسؤولة عن المسارات الايضية في الخلية المايكروبية. وان ارتفاعها يكون ذا علاقة مع زيادة نشاطية الانزيمات في الخلية المايكروبية الى حدودها التي يمكن ان تبدأ في احداث حالة المسخ للانزيمات المسؤولة عن المسارات الايضية المذكورة. وفي حالة العزلة Iso.3 فقد تبين ان الدرجة الحرارية 35 م° تعد هي الحرارة المثلى لعمل الانزيمات الخاصة في المسارات الايضية لانتاج انزيم L-Asparginase في افضل كمية وان الدرجات الحرارية الاخرى المستعملة في الدراسة كانت غير ملائمة لانتاج الانزيم بالكمية المشار اليها في درجة الحرارة 35 م° التي يمكن ان يكون فعلها في تثبيط الانزيمات او مسخها[7 ، 19].

تأثير الأس الهيدروجيني:

ان تأثير المستويات المختلفة من الأس الهيدروجيني في قابلية العزلة البكتيرية بكتريا *E.coli*-Iso.3 عند تنميتها في وسط الانتاج السائل عند درجة حرارة 35 م لمدة 24 ساعة على انتاج انزيم **L-Asparginase** قد وضحها الجدول (5). اشارت النتائج الى زيادة مستوى الاس الهيدروجيني من 6 الى 8 قد سببت في زيادة كمية الانزيم L-Asparginase المنتج من النوع البكتيري وكان افضل

انتاج هو عند اس هيدروجيني 7.0 و 7.5 الذي كان عند 93.2 و 92.8 وحدة دولية/ مل على التوالي اللتان لم يختلفان معنويا عند ($p<0.05$). وقد انخفض معنويا الانتاج في حالة ارتفاع الاس الهيدروجيني الى 8 الذ كان الانتاج عنده 86.0 وحدة دولية/ مل وكذلك الحال كان الانتاج منخفضا في حالة الاس الهيدوجيني 6.0 و 6.5 اذ كان عند الانتاج عند 31.5 و 82.2 وحدة دولية/ مل على التوالي. ان تاثير الانخفاض او الارتفاع في الاس الهيدروجيني يمكن ان يكون له تاثير ايضا في كمية الانزيم المنتج وذلك لان التغير في مستوى الاس الهيدروجيني عن المجال المثالي سيؤثر في فاعلية الانزيمات المشتركة في المسلك الايضي لانتاج الانزيم والتي تسبب في ترسيبها او تثبيطها على الاقل عندما يكون وسط التفاعل قريبا من نقطة التعادل الكهربائي (Iso Electric Point) لتلك الانزيمات.

جدول (5): تأثير مستويات الاس الهيدروجيني المختلفة في انتاج L-Asparginase من بكتريا *E.coli*.

العزلة	التراكيز المنتجة من L-Asparginase (IU/ml) عند مستويات مختلفة من الاس الهيدروجيني				
	6.0	**6.5**	**7.0**	**7.5**	**8.0**
***E.coli*-Iso-3**	^{d}31.5 1.01±	^{c} 82.2 3.84±	^{a}93.1 2.57±	^{a}92.8 3.47±	^{b}86.0 5.59±

d–a: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

كما ان احتمالية حدوث المسخ للانزيم تكون ناتجة عن التداخل مع المركبات الاخرى في وسط التنمية والانتاج او قد يكون بسبب نفاذ المواد الغذائية والاتجاه لتكوين مركبات جانبية اخرى في وسط التنمية. كما ان التغير في الاس الهيدروجيني يكون تاثيره مباشرا في حالة نفاذية الغشاء الخلوي للكائنات الحية ومنها البكتريا حيث بينت الدراسات ان افضل حالة لنفاذية الايونات الموجبة والسالبة عبر الغشاء البلازمي للبكتريا يحدث عند الاس الهيدروجيني بين 6.5 الى 7.0 وان زيادة الاس الهيدروجيني او انخفاضة يسبب في زيادة او انخفاض نفاذية الايونات الموجبة على حساب الايونات السالبة مما يخلق حالة من عدم التوازن في كميات الايونات النافذة عبر الغشاء الخلوي. مما يسبب في تثبيط نمو الكائن المجهري. كما ان الاس الهيدروجيني يؤثر في جاهزية العناصر المعدنية التي يحتاجها الكائن حيث ان الكائنات المجهرية تستغل العناصر المعدنية بصورتها الايونية وهذه الصورة تتوفر عندما يكون الأس الهيدروجيني عند 7.0 اما اذا كان الأس الهيدروجيني مرتفعا او منخفضا عن ذلك فانه يسبب في تشكيل المعقدات من العناصر المعدنية مع المركبات الاخرى وبالتالي لاتكون جاهزة للكائن كعناصر المغنيسيوم والخارصين والفوسفات [28].

تأثير مدة التحضين:

ان تأثير فترات التحضين في قابلية العزلة البكتيرية *E.coli*-Iso.3 عند تنميتها في وسط الانتاج السائل عند درجة حرارة 35 م لمدة 18، 24 ، 48 و 72 ساعة على انتاج انزيم **L-Asparginase** قد وضحها الجدول (6). بينت النتائج ان مدة التحضين كان لها تاثيرا في مستوى تركيز الانزيم المنتج اذ ان افضل مدة تحضين للنوع الميكروبي التي يحصل معها افضل انتاج معنويا عند ($p<0.05$) من الانزيم هي بعد 24 و 48 ساعة اذ بلغ تركيز انزيم **L-Asparginase** عند 95.0 و 93.8 وحدة دولية/ مل على التوالي. ان بقاء الميكروب في التنمية على الوسط الى 72 ساعة سبب في انخفاض تركيز الانزيم المنتج الى 42.63 وحدة دولية/ مل. ان حصول الانتاج العالي من الانزيم عند 24 و 48 ساعة يدلل على ان المدتين الزمنيتين يحصل معهما توفير المغذيات من الوسط الغذائي للعزلة البكتيرية المنتجه للانزيم في افضل حالاتها، وان استمرار التنمية الى 72 ساعة قد سبب في حصول تثبيط لقابلية العزلة البكتيرية في انتاج الانزيم الذي ياتي من خلال نفاذ بعض المغذيات المهمة للعملية الايضية في انتاج الانزيم او من خلال انتاج مركبات ذات تاثير تثبيطي لانتاج الانزيم من خلال تداخلها مع عملية انتاج الانزيم.

جدول (6): تأثير فترات التحضين المختلفة في انتاج L-Asparginase من بكتريا *E.coli*.

العزلة	التراكيز المنتجة من L-Asparginase (IU/ml) عند مدد تحضين مختلفة (ساعة)			
	18	**24**	**48**	**72**
***E.coli*-Iso-3**	^{b} 57.29 2.46±	^{a}95.0 4.14±	^{a}93.8 5.63±	^{c}42.63 2.45±

a–c: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

تباينت الدراسات المتعلقة في تحديد مدة الحضن اللازمة لانتاج L-asperginase تبعا لاختلاف الكائن المجهري وظروف انتاج الانزيم لاسيما مايتعلق منها بدرجة الحرارة والاس الهيدروجيني الا انها بشكل عام تراوحت بين 24 و 48 ساعة [17].

تاثير سرعة التحريك Effect of agitations speed:

الجدول (7) يبين تاثير سرعة التحريك عند 0.0 و 50 و 100 و 150 دورة/ دقيقة في تنمية العزلة البكتيرية **E.coli-Iso.3** وقابليتها في إنتاج انزيم L-Asparginase وفعاليته عند درجة حرارة 35 ° م بعد التنمية على وسط إنتاج الإنزيم عند أس هيدروجيني 7 لمدة 24 ساعة. وضحت النتائج ان سرعة التحريك كانت في افضلها لانتاج الانزيم عند سرعة التحريك 100 و 150 دورة/ دقيقة حيث بلغ معدل الانتاج عند 90.3 و 90.5 (IU/ml) على التوالي بينما كان انتاج الانزيم منخفضا معنويا ($p<o.o5$) في حالة التحريك عند 50 دورة/ دقيقة اذ كان عند 87.79 (IU/ml) وان حالة عدم التحريك قد اثرت معنويا في انخفاض مستوى انتاج الانزيم الذي كان عند 84.2(IU/ml). إن زيادة إنتاج الأنزيم مع استعمال التحريك لوسط تنمية العزلة البكتيرية **E.coli-Iso.3** يمكن إن يكون ناتجاً عن انتقال الجزيئات وكذلك الحرارة الموجودة في الوسط فضلا عن مساعدتها في تجانس المكونات الكيمياوية والظروف الفيزياوية لوسط التنمية مع استمرار التحريك كذلك مساعدته في زيادة إدخال الأوكسجين إلى وسط

التنمية وتأثيره في سلوك الخلية المايكروبية لطريقة التخمير؛ وذلك لاختلاف مستوى O_2 و CO_2 في الوسط [4، 19].

جدول (7): تأثير سرع الرج المختلفة في انتاج L-Asparginase من بكتريا *E.coli*.

العزلة	التراكيز المنتجة من L-Asparginase (IU/ml) عند سرع رج مختلفة (دورة/دقيقة)			
	0.0	50	100	150
E.coli-Iso-3	^{c} 84.02 ±3.10	^{b} 87.79 ±2.84	^{a}90.3 ±3.51	^{a}90.5 ±4.75

c–a: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

تأثير التراكيز المختلفة من المالتوز:

ان تأثير تأثير إضافة التراكيز المختلفة من المالتوز عند 5 ، 10 و 15 (غم / لتر) في قابلية العزلة *E.coli*-Iso.3 على انتاج انزيم **L-Asparginase** عند تنميتها في وسط الانتاج السائل عند درجة حرارة 35 ° م لمدة 24 ساعة واس هيدروجيني 7.0 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة قد وضحها الجدول (8). بينت النتائج ان افضل تركيز من سكر المالتوز الذي حصل معه اعلى انتاج معنوي ($p<0.05$) من انزيم **L-Asparginase** كان في حالة التركيز 10 غم/ لتر، وان حالةالانخفاض من هذا التركيز الى 5 غم/ لتر او الارتفاع الى 15 غم/ لتر قد سببا في انخفاض انتاج الانزيم معنويا حيث كانا عند 71.6 و 87.2 (وحدة دولية/ مل) على التوالي. يعتبر سكر المالتوز بانه مصدر الكاربون والطاقة الرئيس للعزلة البكتيرية المنتجة للانزيم لذلك فان الزيادة او الانخفاض في تركيزه يكون ذا تاثيرا معنويا في مستوى الانتاج من الانزيم. اذ ان انخفاضه يسبب في عدم كفايته كمصدر طاقة للقيام بالوظائف الحيوية التي تحتاجها العزلة البكتيرية فضلا عن عدم قدرة الخلية البكتيرية في بناء هيكل المركبات العضوية من احماض امينية وانزيمات وغيرها التي تحتاجها للنمو وكذلك لاتمام فعالياتها الايضية ومنها حالة انتاج الانزيم التي ستنعكس في قلة الكمية المنتجه منه وكما اشارت اليه النتائج اعلاه. اما حالة الزيادة من السكر فانها تسبب في زيادة لزوجة الوسط وبالتالي اضافة عوامل مجهدة كزيادة الشد السطحي وعدم توازن نسبة الكاربون الى النايتروجين C/N لتجعلها غير مناسبة لاستخدامه لأنها تكون ذات علاقة مهمة في قابلية خلايا النوع البكتيري *E.coli* في انتاج منتجاتها الايضية في وسط التنمية وبالتالي انخفاض معدلات انتاج الانزيم [27، 28].

جدول (8): تأثير التراكيز المختلفة من المالتوز في انتاج L-Asparginase من بكتريا *E.coli*.

العزلة	التراكيز المنتجة من L-Asparginase (IU/ml) عند تراكيز مختلفة من المالتوز (غم/لتر)		
	5	10	15
E.coli-Iso-3	^{c} 71.6 ±3.28	^{a}91.7 ±2.25	^{b}87.2 ±4.31

c–a: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

تأثير التراكيز المختلفة من L-Aspargine:

بين الجدول (9) تأثير تأثير إضافة تراكيز مختلفة من مادة L-Aspargine بتراكيز عند 50 ، 100 و 150 (غم / لتر) في قابلية العزلة *E.coli*-Iso.3 على انتاج انزيم **L-Asparginase** بعد تنميتها في وسط الانتاج السائل عند درجة حرارة 35 ° م لمدة 24 ساعة واس هيدروجيني 7.0 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة. بينت النتائج ان افضل مصدر نتروجيني لانتاج انزيم L-Asparginase من عزله E.coil-Iso.3 هو باستعمال مركب Asparagine بتركيز 100,150غم/ لتر حيث بلغ الانتاج لهذا الانزيم عند 94,2 وحدة دولية/ مل لكل منهما. بينما اعطى التركيز 50 غم /لتر انتاجية من الانزيم عند 81,7 وحدة دولية/ مل.

جدول (9): تأثير التراكيز المختلفة من L-Aspargine في انتاج L-Asparginase من بكتريا E.coli.

	التراكيز المنتجة من L-Asparginase (IU/ml) عند تراكيز مختلفة من **L-Aspargine** (غم/لتر)		
	50	**100**	**150**
***E.coli*-Iso-3**	^{b}81.7 ±5.16	^{a}94.2 ±4.73	^{a}94.2 ±6.27

b–a: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

يعد Asparagine بانه المادة البروتينية الاساس التي يعمل عليها انزيم L-asparginase ، وان وجوده في الوسط الغذائي لتنمية النوع البكتيري يسبب في اختصار العمليات الايضية لتكوينه في حالة عدم وجوده. لذلك فان حصول زيادة في انتاج الانزيم مع زيادة تركيز هذه المادة في الوسط الغذائي تعتبر حالة طبيعية الى الحد الذي يكون تركيزها لايؤدي الى حصول عدم توازن في مكونات الوسط التركيبية. الذي اكدته النتائج المتحصل عليها في ان وجوده قد سهل من عملية التخليق الحيوي للنوع البكتيري المنتج لهذا الانزيم [3]. وهذا لايتوافق مع ماذكره [17] الذي ذكر ان وجود Asparagine يقلل من انتاج انزيم L-asparginase.

تأثير التراكيز المختلفة من كلوريد الصوديوم: ان تاثير إضافة كلوريد الصوديوم بتراكيز عند 2.5 ، 5.0 و 7.5 (غم / لتر) في قابلية العزلة *E.coli*-Iso.3 على انتاج انزيم **L-Asparginase** عند تنميتها في وسط الانتاج السائل عند درجة حرارة 35 ° م لمدة 24 ساعة واس هيدروجيني 7.0 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة وضحها الجدول (10). بينت النتائج ان اضافة كلوريد الصوديوم بتركيز 5.0 في وسط التنمية للعزلة البكتيرية Iso.3 قد كان التركيز الامثل لانتاج انزيم L-asparginase تحت الظروف المشار اليها. وان حالة نقان التركيز الى 2.5 اوزيادته الى 7.5 غم/ لتر قد سببت في الحالتين انخفاض في تركيز الانزيم المنتج اذ كان عند 87.5 و 81.6 وحدة دولية/ مل على التوالي. ان حالة انخفاض تركيز الانزيم المنتج في حالة انخفاض او زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في وسط الانتاج عن

المستوى المثالي لـه يمكن ان تكون ذا علاقة مع توازن الضغط الازموزي للخلية اذ ان لمستوى تركيز كلوريد الصوديوم دورا كبيرا في توازنه اذ ان زيادة التركيز منه في وسط التنمية يسبب في تركيز المواد المذابة الايونية خارج الخلية مما يسبب في حصول حالة البلزمة Plasmolysis وخروج الماء الموجود في الخلية الى الخارج.

جدول (10): تأثير التراكيز المختلفة من كلوريد الصوديوم في انتاج L-Asparginase من بكتريا E.coli.

العزلة	التراكيز المنتجة من L-Asparginase (IU/ml) عند تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (غم/لتر)		
	2.5	**5.0**	**7.5**
***E.coli*-Iso-3**	^{b}87.5 2.38±	^{a}92.8 3.55±	^{c}81.6 2.46±

a–c: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

اما في حالة انخفاض التركيز الملحي في الوسط الغذائي فان الماء سوف يدخل الى داخل الخلية مسببا في انتفاخ او انفجار الخلية وتسمى الحالة بـ Plasmoptysis وفي كلا الحالتين تكون الحالة لموازنة الضغط الازموزي بين محتويات الخلية ووسطها الغذائي [16].

تأثير التراكيز المختلفة من ثنائي فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4:

وضح الجدول (11) تاثير إضافة KH_2PO_4 بتراكيز عند 2.5 ، 5.0 و 7.5 (غم / لتر) في قابلية العزلة E.coli-Iso.3 على انتاج انزيم **L-Asparginase** عند تنميتها في وسط الانتاج السائل عند درجة حرارة 35 ° م لمدة 24 ساعة واس هيدروجيني 7.0 والتحريك عند 100 دورة/ دقيقة. وجد من النتائج ان افضل تركيز من مادة KH2PO4 في وسط تنمية العزلة البكتيرية الملائمة لحصول اعلى انتاج من انزيم L-asparginase كانت عند التركيز 0.75 و 1.0 غم/ لتر من الوسط الغذائي حيث اعطت معنويا ($p<0.05$) افضل تركيز من الانزيم عند 90.1 و 90.0 وحدة دولية/ مل على التوالي.

جدول (11): تأثير التراكيز المختلفة من KH2PO4 في انتاج L-Asparginase من بكتريا E.coli.

العزلة	التراكيز المنتجة من L-Asparginase (IU/ml) عند تراكيز مختلفة من KH_2PO_4 (غم/لتر)		
	0.5	**0.75**	**1.0**
E.coli-Iso-3	^{b}88.7 3.63±	^{a}90.1 5.22±	^{a}90.0 4.51±

a–b: الاحرف المختلفة في السطر الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

يمكن ان يكون السبب في ذلك الى ان وجود مادة KH2PO4 تكون المصدر الاساسي لتوفير الفوسفات في الوسط الغذائي الذي له علاقة مع حالات انقسام الخلايا وتكاثرها حيث يعد الفوسفات المكون الاساس في تركيب الاحماض النووية للخلية DNA و RNA . كما ان احتواء مركب KH2PO4 على الجذر الهيدروجيني يجعله ذا علاقة في حالات توازن حامضية الوسط الانتاجي [37].

المصادر

1) Abu-shagra, Q. 2000. Occurance and antibiote sensitivity of Enterobacteriaceae isolated from group of Jordanian patients with community acquired urinary Tract Infection. Cytobios.

2) Alfred , E.B. 2005. Microbiological application in the laboratory manual in general microbiology .(9th) ed. MC Grow Hill companies.

3) Aung, H.P., M. Bocola, S. Schleper and K.H. Rohm, 2000. Dynamics of a mobile loop at the active site of Escherichia coli asparaginase. Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol., 1481: 349-359.

4) Atalla, M.M ; M. M. Farag ; R. H. Eman ; M. S. Abd-El-lataif and E. A. Nehad , 2009 . Malaysian J. of microbiology , vol. 5(1) 2009, p.45-50.

5) Boyse, E.A., L.J. Old, H.A. Campbell and L.T. Mashburn, 1967. Suppression of murine leukemias by L-asparaginase. Incidence of sensitivity among leukemias of various types: Comparative inhibitory activities of guinea pig serum l-asparaginase and Escherichia coli L-asparaginase. J. Exp. Med., 125: 17-31.

6) Cohn, E.B. and Schaeffer, A.J. 1998. Urinary tract infection in adults. Northwestern Medical School, J. of Urol.77:122-130.

7) Collee, J.G.; Franser, A.G.; Marmion, B.P. and Sinmons, A. 1996. "Mackie and MacCartney practical medical microbiology". 4th. (Ed.). Churchill Livingstone, London.

8) Delzell, J.E. and Lefevre, M.L. 2000. Urinary tract infection during pregnancy. Am. Academy of Family Physicians, 35(3):40-66

9) Derst C, Wehner A, Specht V, Rohm KH. 1994. States and functions of tyrosine residues in Escherichia coli asparaginase. Eur J Biochem. 224:533-540.

10) Dhevagi, P. and E. Poorani, 2006. Isolation and characterization of L-Asparaginase from marine actinomycetes. Ind. J. Biotech., 5: 514-520.

11) Duncan.D .B. 1955.Multiple range and multiple Ftest,Biometric,11,1-42.

12) Eden, O.B., M.P. Shaw, J.S. Lilleyman and S. Richards, 1990. Non-randomised study comparing toxicity of Escherichia coli and Erwinia asparaginase in children with leukaemia. Med. Pediatric Oncol., 18: 497-502.

13) El-Bessoumy, A.A., M. Sarhan and J. Mansour, 2004. Production, isolation and purification of L-asparaginase from Pseudomonas aeruginosa 50071 using solid-state fermentation. J. Biochem. Mol. Biol., 37: 387-393.

14) Eykan, S.J. 2001. Value disease: Endocarditis: basics. Heart. 86 – 480.

15) Fowler, B. A. ; Nordberg , G. F. Nordber, M. and Friberg g, L. 2007 . Hand book on the Toxicology of metals . Academic Press, Inc.

16) Gillespie, S.A., and Hawkey, P.M. 2006. Principles and practice of clinical bacteriology, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd.

17) Givry, S. and F. Duchiron .2008 .Optimization of culture medium and growth condition for production L-arabinose isomerase and D-xylose by *lactobacillus bifermentans*. *Microbiology*. 77 : 281-287

18) Hummers-Pradier. E. 2004. Ohse AM, Koch M, Heizmann WR, Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M (1973). Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. J Gen Microbiol: 76, 85-99.

19) Kumar, K. and N. Verma, 2012. The various sources and application of L-asparaginase. Asian J. Biochem. Pharma. Res., 3: 197-205.

20) Krasotkina, J., A.A. Borisova, Y.V. Gervaziev and N.N. Sokolov, 2004. One-step purification and kinetic properties of the recombinant l-asparaginase from Erwinia carotovora. Biotechnol. Appl. Biochem., 39: 215-221.

21) Mesas, J.M., J.A. Gil and J.F. Martin, 1990. Characterization and partial purification of l-asparaginase from Corynebacterium glutamicum. J. Gen. Microbiol., 136: 515-519.

22) Narta, U.K., S.S. Kanwar and W. Azmi, 2007. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 61: 208-221.

23) Nester, E.W.; Anderson, D.G.; Robert, C.E.; Pearsall, N.N. and Nestor, M.T. 2001. Microbiology a human perspective.3 rd ed.Mc Graw-Hill Higher Education .,291-295.

24) Orenstein, R. and Wong, E. 1999. Urinary tract infection in adults. American Academy of Family Physicians, 34(3): 70-79 .

25) Patro, K.K.R., S. Satpathy and N. Gupta, 2011. Evaluation of some fungi for L-asparaginase production. Indian J. Fundam. Applied Life Sci., 1: 219-221.

26) Pourhossein, M. and H. Korbekandi, 2014. Cloning, expression, purification and characterisation of Erwinia carotovora L-asparaginase in Escherichia coli. Adv. Biomed. Res., Vol. 3. :10-41.

27) Prakasham, R.S., Ch.S. Rao, R.S. Rao, G.S. Lakshmi and P.N. Sarma, 2007. L-asparaginase production by isolated Staphylococcus sp. -6A: Design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. J. Applied Microbiol., 102: 1382-1391.

28) Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. Procaryotic Cell Structure and Function. In: Introduction to Microbiology. 7th ed. New York, USA, The McGraw-Hill, 2010, pp37-72

29) Raha, S.K., S.K. Roy, S.K. Dey and S.L. Chakrabarty, 1990. Purification and properties of an L-asparaginase from Cylindrocarpon obtusisporum MB-10. Biochem. Int., 21: 987-1000.

30) Raz, R. (2001). Post menopausal woman with recurrent UTI. Int. J. Antibiotic Agents. 17: 269 – 271.

31) Rehman, K;. Rajoka, M. I.; Tabish, T. and Zia, M. A. , 2006. J. of microbiology & biotechnology, 22: 288-291.

32) Reynolds, D.R. and J.W. Taylor, 1993. The Fungal Holomorph: A Consideration of Mitotic Meiotic and Pleomorphic Speciation. CAB International, Wallingford, UK.

33) SAS users (2004).Guid personal computer (ver.7) inst. Inc. Cary. Nc. USA.

34) Story, M.D., D.W. Voehring, L.C. Stephens and R.E. Mern, 1993. L-asparaginase kills lymphoma cells by apoptosis. Cancer Chemother. Pharmacol., 32: 129-133.

35) Vandepitte, J; Eng back, K.; Piot P Heuck, C.C. 2003. and Basic Laboratory procedures in clinical bacteriology, World Health Organization, Geneva.

36) Vandepitte, J; Eng back,K.; Piot P. and Heuck, C.C. 1991. Basic Laboratory procedures in clinical bacteriology, World Health Organization, Geneva.

37) Verma, N., K. Kumar, G. Kaur and S. Anand, 2007. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. Crit. Rev. Biotechnol., 27: 45-62.

38) Winn, J. W. ; Allen, S. ; Janda, W. ; Koneman, E. ; Procop, Schreckenberger, P. and Woods, G. 2006. "Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology" 6th ed., Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A

39) Yoon ,S.H , P.Kim and D. Koh .2003. Properties of L- arabinose isomerase from Escherichia coil as biocatalyst for tagatose production World J .Microbiol. , 19:47-51 .

Determine the Ability of Bacterial Isolates from Urinary Tract Infections on L-Asparginase Production

Marwa H. AbdAlwahab [1] , Karkaz M. Thalij [2]

[1] *Department of Biology, College of Science, University of Tikrit, Tikrit, Iraq*
[2] *College of Agriculture , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

Abstract

This study was conducted to isolate and identify the pathogenic bacterial species from urinary tract of patients that reviewers to Tikrit hospital education from tow gender and different age periods. It was also the determination of bacterial species isolated in their ability to production of the L-asparginase enzyme and assay the environmental conditions and the production media ingredients for high concentration of enzyme production. Results showed that 142 samples was positive in microbial isolation (91.64%) from the total study samples that were at 150 samples, and high isolation percentage was from female at 58% and from aged period between 15 to 75 years for two gender. It also found that the species of bacterial *E.coli* was appear as highest in isolation percentage followed by *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumonia* which was at 54.2, 21.1, 17.6 and 7.04% respectively. The assay of bacterial isolates to L-asparginase produce illustrate that the *E.coli* species appear as the most production and the isolate no. 3 was the top one at 70.4 IU/ml of media. When the assay of environmental conditions and ingredients combination for media to access for higher production from enzyme, shows that the optimal conditions for production of E.coli-Iso.3 was in development at 35 º c, pH 7.0 for 24 hours with agitation at 150 rpm in the media consists of maltose, L-asparginase, NaCl and KH2PO4 at 10, 100, and 5.0 and 0.75 g/l respectively.

Key words: *E.coli*, Urinary tract infections, L-asparginase enzyme.