طريقة لانتاج مضاد حيوي نيوكليوسيدي جديد SH_1 من البكتريا الخيطية *Streptomyces rimosus* المعزولة محليا

كوثر هواز مهدي مروان ياسين سبتي

أفروديت عبد الرزاق صالح

كلية العلوم-جامعة البصرة ، البصرة - العراق.

الخلاصة

عزل المضاد الحيوي النيوكليوسيدي (SH_1) الفعال تجاه الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام من البكتريا الخيطية *S.rimosus* المعزولة من تربة زراعية (حقول قصب السكر في ميسان).

عزل المضاد الحيوي بشكل مسحوق قهوائي اللون وبواقع 3غم/لتر في درجة حرارة (28-30)م^{o} . درست صفات المضاد الفيزيائية والكيميائية بأستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ، وطيف الاشعة تحت الحمراء IR-Spectrum وطيف الاشعة فوق البنفسجية UV-Spectrum وكذلك النسبة المئوية لعناصر الكاربون-النيتروجين-الهيدروجين (CHN%) ودرجة الانصهار ،كما درست ذائبيته في المذيبات العضوية واللاعضوية فضلا عن اجراء بعض الكشوفات اللونية الكيميائية عليه.

حددت الفعالية الحيوية للمضاد الحيوي المستخلص من خلال تقدير التركيز المثبط الادنى (MIC) تجاه عشر عزلات جرثومية اذ تراوحت بين (1-250) مايكروغرام/مل، وتم قياس الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) التي بلغت 250مليغرام/كغم تجاه الفئران المختبرية. ودرست ايضا سمية المضاد الحيوي المستخلص اتجاه كريات الدم الحمراء للانسان وثباتيته في مديات مختلفة من الاس الهيدروجيني (pH) و درجة الحرارة.

درس كذلك تأثير تراكيز مختلفة من المضاد الحيوي (SH_1) على الدنا DNA المعزول من الجرثومة القياسية *Staphylococcus aureus* NCTC 6751 ، واظهر التركيز 0.75 مايكروغرام/مل من المضاد اعلى عكورة في محلول الدنا DNA للجرثومة القياسية مما يشير ذلك الى تأثير هذا التركيز على الدنا وانفكاك الخيوط المزدوجة للـ DNA .

A method for production of a novel nucleosidal antibiotic SH_1 from *streptomyces rimosus* isolated locally

Mehdi, K.H. Yassin, M. S. Salih, A.A.

Summary

SH_1 antibiotic active against gram positive and gram negative bacteria was isolated from strain resembling *Streptomyces rimosus* isolated from soil of southern Iraq.

The antibiotic was isolated as hygroscopic brown powder with maximum yield 3 gm/L at (28-30)^oC. physiochemical properties (thin layer chromatograph (TLC) ; IR. Spectrum; UV-spectrum; CHN percent, melting point, solubility in organic and inorganic solvents and coloumetric testes) of extracted antibiotic was determined. It's minimal inhibitory concentration (MIC) was determined against bacterial isolates which varied between (1-250) mg/ml.

The a cute toxicity (LD_{50}) in laboratory animals was of 250 mg/kg. The toxicity of extracted antibiotic (SH_1) against human red blood cells and it's stability in different range of pH and temperature were studied.

The effect of extracted antibiotic (SH_1) on reference strain Staphylococcus aureus NCTC 6571 DNA was studied and the concentration 0.75 mg/ml of (SH_1) appeared the high turbidity in DNA solution of S. aureus NCTC 6571.

المقدمة

يعد جنس *Streptomyces* من الكائنات الحية الدقيقة المهمة صناعيا لكونه مصدرا جيدا لانتاج العديد من الايوض الثانوية مثل المضادات الحيوية النيوكليوسيدية المهمة جـدا بأعتبارهـا مضادات ضد العديـد مـن الامـراض السـرطانية (Rao *et al*., 1969) ؛ (Haque *et al*., 1993).

استخدم عدد كبير من الباحثين*Streptomyces* rimosus كمصدر جيد لانتاج العديد من المضادات الحيوية مثل المضاد Oxytetracyline وهو مضاد فعال تجـاه الجـراثيم الموجبـة والسالبة لصبغة كرام (Egorov,1985) ، اضافة الى قابلية هذه العزلة على انتاج العديـد مـن المضادات النيوكليوسيدية المضادة للامراض السرطانية مثل سرطان الدم (Leukemia) واهـم هذه المضادات المضـاد Sangivamycim (Rao and Renn,1963) و المضاد الحيوي Toyocamycin . لذلك هدفت الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص نوع جديـد

من المضادات الحيوية النيوكليوسيدية والذي اطلق عليه اسم SH_1 من العترة العراقية *S.rimosus* المعزولة من قبل (Mehdi,1997) من تربة حقول قصب السكر في ميسان، وذلك لاهمية هذا النوع من المضادات والاسهام في احدى الحلقات العلمية التي تشمل سلسلة من البحوث التي تجري في العالم والتي تهدف الى تكامل الجهود في البحث عن علاجات كيميائية او مضادات حيوية (مخلقة حيويا) لحصر الامراض السرطانية او السيطرة عليها مستقبلا.

المواد وطرائق العمل

اولا: المواد:-

1- العترة:-استخدمت العترة *S.rimosus* المعزولة من تربة زراعية في حقول قصب السكر (ميسان) من قبل (Mehdi,1997) ، والمشخصة اعتمادا على المفاتيح التشخيصية الحديثة مثل :-

(Holt *et al*., 1994; Goodfellow *et al*., 1992; Williams *et al*., 1983; Pridham and Tresner, 1974 ;and Shirling and Gottlibe,1966).

2- العزلات الجرثومية القياسية:-

(1) *Staphylococcus aureus* NCTC 6571
(2) *S. aureus* ATCC 29213.
(3) *S. aureus* (Clinical isolate).
(4) *Escherichia coli* NCTC 5933.
(5) *Pseudomonas auroginosa* NCTC 6750.
(6) *Proteus vulgaris* NCTC 4175.
(7) *Bacillus subtilis* PCI 219.
(8) *B.pumilis* NCTC 8241.
(9) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.
(10) *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6308.

زرعت العزلات القياسية اعلاه وحفظت على وسط Nutrient agar.

3- الاوساط الزرعية الجاهزة:-

1- Yeast-malt extract agar

استخدم هذا الوسط في تنمية العزلة المنتجة.

2-Nutrient agar (Difco).
3-Muller-Hinton agar (Difco).

4-Nutrient broth (Difco).

حضرت الاوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المصنعة.

4- الاوساط الزرعية المحضرة

1- وسط الاستنبات Seed medium (Mehdi,1997).

2- وسط التخمر Fermentation medium:- استخدم هذا الوسط المحور عن (Rao and Renn,1963) في انتاج المضاد الحيوي من العزلة *S. rimosus* .

ثانيا: طرائق العمل:-

1- الغربلة الاولية:-استعمل لهذا الغرض عزلات جرثومية قياسية موجبة وسالبة لصبغة كـرام وهي *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 و *Escherichia coli* NCTC 5933 ، وذلك لتحديد القدرة التثبيطية للمضاد الحيوي المستخلص من العترة المنتجة عن طريـق قيـاس اقطار مناطق التثبيط مقاسة بالمليمتر (mm) (Joreme *et al*., 1997) .

2- استخلاص وتقنية المضاد الحيوي SH_1 :-تم عزل المضاد الحيوي مـن راشـح المزرعـة التخمرية للعترة *S. rimosus*_بعد انتهاء فترة الحضن في الحاضنة الهزازة بدرجة (28-30) م^{o} و بسرعة 180 دورة/دقيقة ولمدة اربعة ايام، وقد اعتمدت الطريقة المحورة عـن (Rao and Renn , 1963) في استخلاص المضاد وعزله:-

(3-) تشخيص المضاد الحيوي المستخلص:-

اعتمدت الاختبارات التشخيصية الواردة في (Fried and Sherman,1986) و (Lambert *et al*., 1987) و(Most,1988) و (Saadalla , 1980) و (Fieser and Willamson,1975) وكما يلي:-

(أ) **كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة** Thin Layer Chromatography (TLC):-

لتحديد نقاوة المضاد الحيوي استخدمت تقنية الـ (TLC) وتحديد معدل الانسياب له (Rf) ، اذ اذيبت كمية قليلة من المضاد الحيوي المستخلص في (3) مل من الماء المقطر و حملت منه كمية تقارب (5) مايكرولتر على صفائح زجاجية (5x20) سم مطلية بهـلام السـليكا Mercks (Silica Gel Gf_{245})، ثم وضعت الصفائح في حوض زجاجي مشبع بأبخرة نظـام التصـعيد (بيوتانول: حامض الخليك: ماء) بنسبة (5:1:4) ، ظهرت البقع المفصـولة بأسـتخدام محلـول النهايدرين وبدرجة حرارة (200)م^{o} لمدة (3-5) دقائق.

(ب) **الذائبية** Solubility :-اختبرت ذائبية المضاد الحيوي في عدد من المذيبات العضوية واللاعضوية تمثلت بما يلي:-

الماء المقطر، الاسيتون، الايثر، الايثايل اسيتيت، كحول الميثانول، كحول الايثانول و الكلوروفورم.

(جـ) **قياس الانصهار Melting Point**

قيست درجة الانصهار بأستخدام جهاز **Melting Point Electrothermal** .

(د) طيف الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Spectrum :-

قيس طيف الاشعة فوق البنفسجية للمضاد الحيوي المستخلص بأستخدام جهاز Pye-Unicam SP 8-100 Spectrophotometer ضمن المدى (200-400) نانومتر و بأستخدام الماء المقطر كمذيب.

(هـ) طيف الاشعة تحت الحمراء Infrared Spectrum :-

استخدم جهاز Pye-Unicam SP 300 s infrared Spectrophotometer لتحديد مطيافية الاشعة تحت الحمراء للمضاد الحيوي المستخلص لمعرفة المجاميع الكيميائية الفعالة الداخلة في تركيب المضاد الحيوي وبأستخدام طريقة الاقراص (KBr-disk).

(و) تحديد نسبة عناصر الكاربون-الهيدروجين-النيتروجين (CHN%) :-

حددت نسبة (CHN%) بأستخدام جهاز CHN BA 1108 Carlo-erba

(ز) كشوفات المجاميع الفعالة:-

اجريت مجموعة من الكشوفات والتفاعلات اللونية على المضاد الحيوي المستخلص للتعرف عن اهم المجاميع الكيميائية الداخلة في تركيبه، وكالاتي:-

1- **كشف مولش**:-

اضيف (1مل) من محلول الفا-نفثول الكحولي (α -naphthol) الى (1مل) من محلول المضاد الحيوي ورج التفاعل بقوة ثم اضيفت قطرات من حامض الكبريتيك المركز ($Conc.H_2SO_4$) على جدران انبوب التفاعل وبدون تحريك، ان ظهور الحلقة البنفسجية دليل على وجود مجموعة كاربوهيدراتية.

2- كشف بيال:-

اضيف (1مل) من كاشف بيال الى (1مل) من محلول المضاد الحيوي وسخن المزيج بدرجة (90-100)م^{o} لمدة (10) دقائق، ان ظهور المعقد الاخضر المزرق دليل على وجود سكر خماسي في تركيبه المضاد.

3- كشف الامين:-

نسخن المزيج المتكون من (1مل) من محلول المضاد الحيوي مع (1مـل) مـن كاشـف النهايدرين بدرجة (120) م° لمدة (3) دقائق وذلك لتحديد وجود مجموعة الامـين الحـرة فـي تركيبة المضاد الحيوي من خلال ظهور اللون البنفسجي للمزيج.

4- الكشف عن اصرة الاميد:-

ذوب ما يقارب (0.005) غم من المضاد الحيوي المستخلص في (2مـل) مـن محلـول NaOH (20%) وسخن المزيج بدرجة (70) م° لمدة دقيقة واحدة، ان تغير لون ورقـة زهـرة الشمس دليل على ايجابية التفاعل.

5- الكشف عن المجموعة النيوكليوسيدية:-

اجري هذا الاختبار للكشف عن طبيعة المضاد الحيوي النيوكليوسيدي وذلك بأخذ (0.1) غم من المضاد الحيوي المستخلص واذابته في (3مل) مـن محلـول TCA (10 %) وسـخن المزيج بدرجة (95) م° لمدة (15) دقيقة، برد المزيج واخذ منه (1مل) وخفف بالماء المقطـر و اضيف اليه (5) مل من الكاشف (2,4-Di phenyl amine) وسخن التفاعل بدرجة (95)م° مدة (15) دقيقة، ان ظهور اللون الاخضر-المزرق الفاتح يدل على ايجابية التفاعل.

(4) دراسة الصفات الحيوية للمضاد الحيوي المستخلص:-

(أ) تحديد التركيز المثبط الادنى Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

اعتمدت طريقة (Spooner and Sykes,1972) لتحديد التركيز المثبط الادنى للمضـاد الحيوي المستخلص بأستخدام عدة تراكيز تراوحت بين (1-250) مايكروغرام/مل، تجـاه عشـر عزلات جرثومية قياسية وسريرية موجبة وسالبة لصبغة كرام وهي :

(1) *Staphylococcus aureus* NCTC 6571
(2) *S. aureus* ATCC 29213.
(3) *E. coli* NCTC 5933.
(4) *S. aureus* (Clinical isolate).
(5) *Pseudomonas auroginosa* NCTC 6750.
(6) *Proteus vulgaris* NCTC 4175.
(7) *Bacillus subtilis* PCI 219.
(8) *B.pumilis* NCTC 8241.
(9) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.
(10) *Streptococcus Pneumoniae* ATCC 6308.

(ب) تقدير ثباتية المضاد الحيوي SH_1 في مدى واسع من الاس الهيدروجيني ودرجة الحرارة:-

درست ثباتية المضاد الحيوي المستخلص في مديات مختلفة من الاس الهيدروجيني (pH) و درجات الحرارة وذلك ضمن فترات زمنية مختلفة (Mehdi,1997).

(جـ) تعيين الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) Median Lethal Dose (LD_{50}) :-

استخدمت في هذه التجربة فئران مختبرية بيضاء Albino mice سلالة BALB/c(ذكور) اذ استخدمت (56) فأرا قسمت الى سبع مجاميع ضمت كل مجموعة (8) فئران.اعتبرت المجموعة الاولى مجموعة سيطرة (Control) اذ حقنت حيواناتها تحت غشاء البريتون بـ (1مل) من الماء المقطر المعقم، بينما حقنت الحيوانات للمجاميع الاخرى الست بـ (1مل) من الماء المعقم يحتوي على التراكيز التالية من المضاد الحيوي المستخلص SH_1 (800,600,500,350,250,150) ملغم/كغم وتمت مراقبة الفئران لمدة (72) ساعة ودونت الوفيات الحاصلة. حللت النتائج بأستخدام طريقة (Armitage,1971) Probit-analysis وذلك لتحديد قيمة الـ LD_{50} .

(د)اختبار السمية الخلوية Cytotoxicity assay

اختبرت سمية المضاد الحيوي المستخلص SH_1 تجاه كريات الدم الحمراء للانسان باستخدام معلق يتكون من (1 مل) من محلول الدم مذاب في (20 مل) من المحلول الفسيولوجي Normal Saline ، وحضرت تراكيز مختلفة من المضاد SH_1 المذاب في الـ DMSO)اضيف بعد ذلك (100) مايكروليتر منه الى (2 مل) من محلول الدم ولوحظت عكورة المحلول بعد (10 ، 30 ، 60) دقيقة اذ ان تحول محلول الدم الى محلول رائق عديم اللون دلالة على تحلل كريات الدم الحمراء بفعل المضاد الحيوي المستخلص (Nair *et al*., 1989) .

(هـ)دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المضاد الحيوي SH_1 على الدنا DNA

عزل DNA العزلة القياسية *S. aureus* NCTC 6571 وحسب طريقة (Marmuer, 1961) ثم وضع الدنا المعزول في محلول *نظم* (Deley *et al*, 1970) ، بعد ذلك حدد تركيز الـ (DNA) باستخدام جهاز المطياف الضوئي نوع Pye-Unicam SP 8-100 Spectrophotometer اذ كانت الكثافة الضوئية له بحدود (0.1) عند الطول الموجي 254 نانوميتر. ثم اضيف الى محلول الـ DNA المحضر في اعلاه تراكيز مختلفة من المضاد الحيوي المستخلص SH_1 تراوحت بين (0.1-5) مايكروغرام/مل وبعد كل اضافة قرأت الامتصاصية للمحلول الناتج في جهاز المطياف الضوئي لتحديد عكورة محلول الـ (DNA) نتيجة اضافة المضاد الحيوي المستخلص اليه وبتراكيز مختلفة .

النتائج

1-العترة المنتجة : شخصت العزلة المنتجة *S. rimosus* من قبل (Mehdi, 1997) ، وهي عترة تسجل لاول مرة في القطر ، ودرست قابليتهاعلى انتاج مضاد حيوي نيوكليوسيدي جديد اطلق عليه اسم SH_1 ولاول مرة في القطر وبواقع (3 غم/لتر) .

2- الغربلة الاولية : اظهر المضاد الحيوي المستخلص فعالية واضحة ومميزة ضد الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وفعالية اقل ضد الجراثيم السالبة لصبغة كرام (جدول 1) .

جدول (1) فعالية المضاد الحيوي المستخلص SH_1 تجاه العزلات الجرثومية القياسية *S. aureus* NCTC 6571 و *E. co*li NCTC 5933

العزلة القياسية	فترة الحضن (ساعة)	قطر منطقة التثبيط (ملم)
S.aureus NCTC 6571	48-24	30
E. coli NCTC 5933	24	13.5

3- تشخيص المضاد الحيوي SH_1 :

أ-عزل المضاد الحيوي : استخلص المضاد الحيوي SH_1 من راشح المزرعة التخمرية للعزلة *S. rimosus* بشكل مسحوق قهوائي اللون وبواقع (3 غم/لتر) .

ب-تحديد نقاوة المضاد الحيوي :

اظهرت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) لتحديد نقاوة المضاد الى امتلاك المضاد الحيوي المستخلص بقعة واحدة زرقاء اللون على صفائح هلام السليكا عند تظهيرها بمحلول النهيدرين وكانت قيمة R_f= (0.54) .

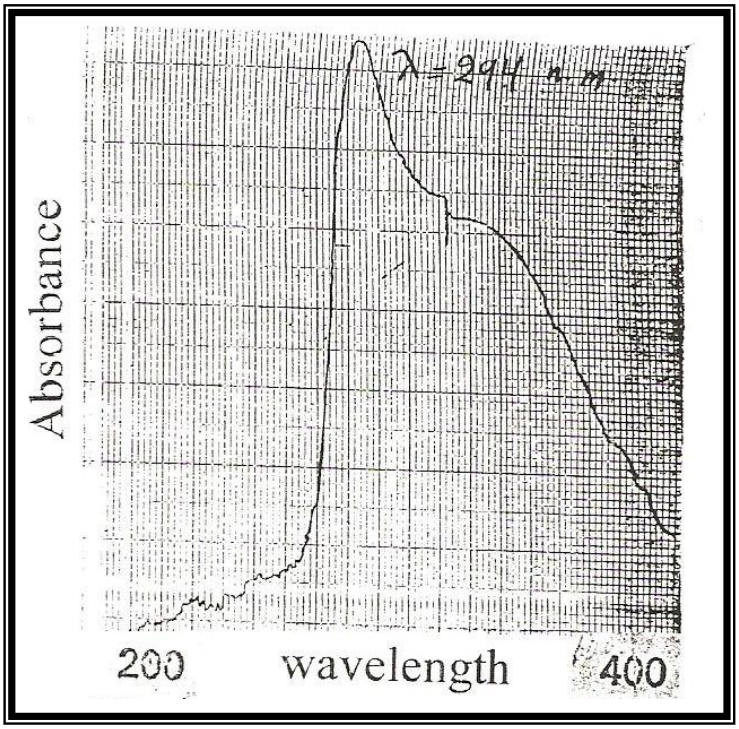
ج-الذائبية : اوضحت النتائج ذائبية المضاد الحيوي SH_1 بصورة واضحة في المـاء المقطـر وعدم ذوبانه في المذيبات الاخرى مثل الاسيتون والايثر والايثايل- اسيتيت وكحـول الميثـانول وكحول الايثانول و الكلوروفورم.

ء-درجة الانصهار :

امتلك المضاد الحيوي المستخلص درجة انصهار حادة مقدارها (180)^{o} م .

هـ طيف الاشعة فوق البنفسجية(UV)

امتلك المضاد الحيوي SH_1 المستخلص قمة واحدة بلغت اعلى امتصاصية لهـا عنـد الطول الموجي (294) نانوميتر(شكل 1).



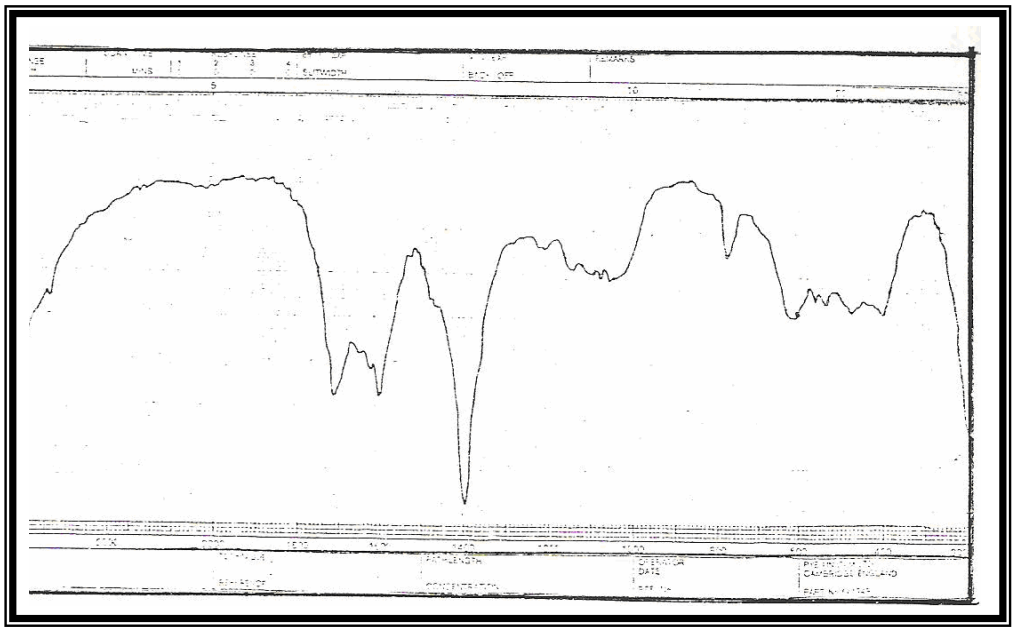
شكل (1) : طيف الاشعة فوق البنفسجية للمضاد الحيوي المستخلص SH_1

و-طيف الاشعة تحت الحمراء

يوضح (الشكل 2) و الجدول (2) اهم حزم الامتصاص في طيف الاشعة تحت الحمراء والمجاميع التركيبية العائدة لها للمضاد الحيوي المستخلص SH_1.

جدول (2) اهم حزم الامتصاص والمجاميع التركيبية العائدة لها في طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد الحيوي المستخلص SH_1.

Band frequency (cm^{-1})	Band	Mode of Vibration	Functional group
3420	-NH	Stretch	Amine (NH_2)
3120	=CH	Stretch	Aromatic (=CH)
1710	C=O	Stretch	Carbonyl of amide
1600	C=C	Stretch	Aromatic (C=C)
1400	C-N	Stretch	Aliphatic (C-N)



شكل (2) : طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد الحيوي المستخلص SH_1

ز- تحديد النسب المئوية للعناصر الكاربون- الهيدروجين- النيتروجين) (CHN%) :

اظهرت النتائج وجود عناصر الكاربون والهيدروجين والنيتروجين في تركيب المضـاد الحيوي المستخلص وبنسبة (4.761-14.21-11.871) % على التوالي .

ل- الكشوفات اللونية

يوضح الجدول (3) نتائج اهم الكشوفات اللونية العائدة للمضـاد الحيـوي المسـتخلص SH_1 والمجاميع الفعالة العائدة له .

جدول (3): **الكشوفات اللونية العائدة للمضاد الحيوي المستخلص** SH_1

الكشف	النتيجة	الملاحظات
مولش	(+) حلقة بنفسجية	وجود مجموعة سكرية في تركيب المضاد
بيال	(+) معقد اخضر-مزرق	وجود سكر خماسي في تركيب المضاد
الامين	(+)محلول بنفسجي	وجود مجموعة NH_2 حرة
الامايد	(+)تلون ورقة زهرة الشمس	وجود اصرة C=O (امايد)
المجموعة النيوكليويسدية	(+)معقد اخضر-مزرق فاتح	طبيعة المضاد الحيوي النيكوكليوسيدية .

4-الصفات الحيوية للمضاد الحيوي SH_1 .

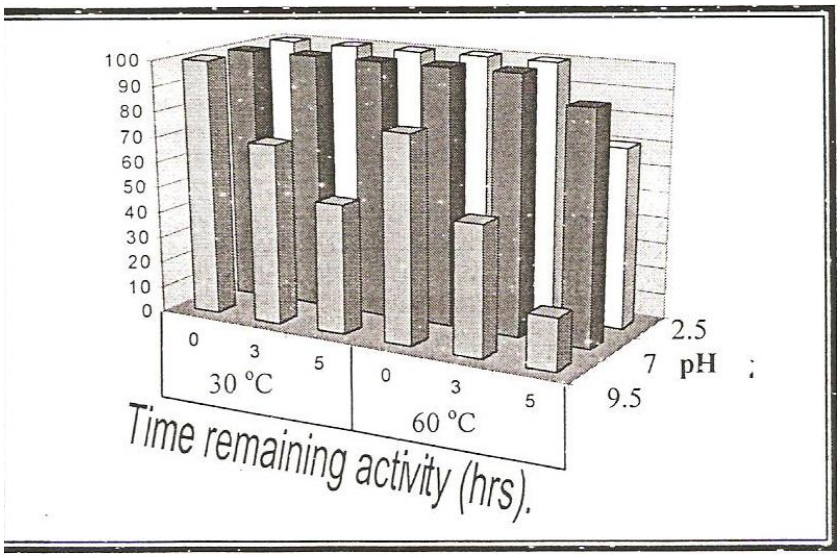
أ-تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) : اظهر المضاد الحيوي المستخلص SH_1 فعالية عالية تجاه الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وفعالية اقل منها ضد الجراثيم السالبة لصبغة كرام وكما موضح في الجدول(4).

ب-تقدير ثباتية المضاد الحيوي المستخلص SH_1 في مديات مختلفة من (pH) و درجات الحرارة :

اظهر المضاد الحيوي SH_1 ثباتية عالية في المديات المدروسة من الاس الهيدروجيني و درجات الحرارة (شكل 3) .

جدول (4):التراكيز المثبطة الدنيا للمضاد الحيوي SH_1 تجاه العزلات القياسية والسريرية المختبرة.

التركيز المثبط الادنى (MIC) (مايكروغرام/مل)	عزلة الجرثومية
1.5	*Staphylococcus aureus* NCTC 6571
1	*S. aureus* ATCC 29213
<50	*Escherichia coli* 5933
0.8	*S aureus.* (Clinical isolate)
<100	*Pseudomonas auroginosa* NCTC 6750
<50	*Proteus vulgaris* NCTC 4175
0.5	*Bacillus subtilis* PCI 219
0.5	*B. pumilis* NCTC 8241
<100	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
10.5	*Streptococcus pneumoniae* ATCC 6308



شكل (3): ثباتية المضاد الحيوي SH_1 في مديات مختلفة من pH ودرجات الحرارة

ج-تعيين الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) :

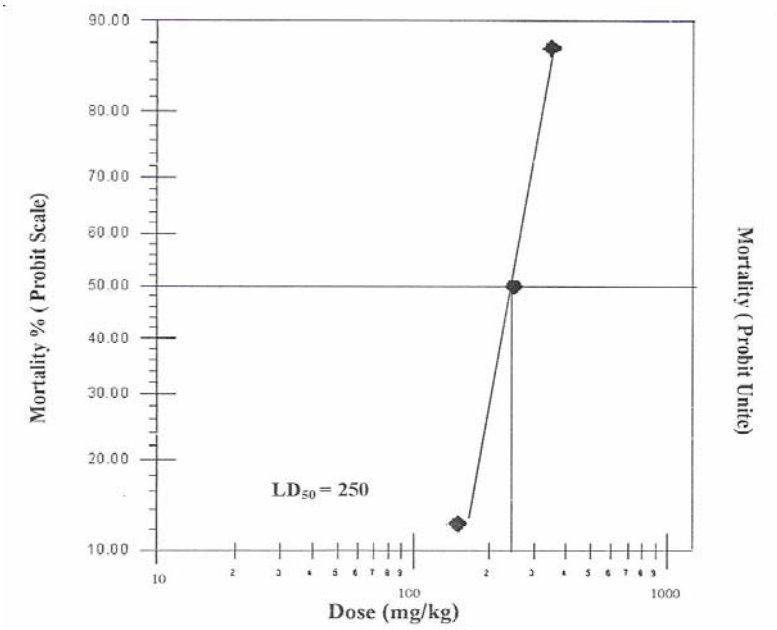
ظهرت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام ورقة وحدة الاحتمالية (شكل 4) ان قيمة الجرعة القاتلة الوسطى للمضاد الحيوي المستخلص SH_1 هي (250 ملغم/كغم)

جدول (5) **اعداد ونسب وفيات الفئران في تقدير الجرعة القاتلة الوسطى** (LD_{50}) **للمضاد الحيوي المستخلص** SH_1.

رمز المجموعة	الجرعة ملغم/كغم	عدد الوفيات		النسبة المئوية للوفيات
		اليوم الاول	اليوم الثاني	
C	0	0	0	0
t_1	150	1	0	%12.5
t_2	250	2	2	%50
t_3	350	3	4	%87.5
t_4	500	2	6	%100
t_5	600	7	1	%100
t_6	800	8	0	%100

ملاحظة :

*عدد الفئران (8) في كل مجموعة C= مجموعة السيطرة (Control) t= مجموعة الفئران المعاملة



شكل (4): ورقة وحدة الأحتمالية لتعيين الجرعة القاتلة الوسطى للمضاد الحيوي المستخلص SH_1

د) **اختبار السمية الخلوية:-**

اظهر المضاد الحيوي SH_1 سمية واضحة تجاه كريات الدم الحمراء للأنسان وضمن التركيزين 100 و150 جزء بالمليون (Ppm)، جدول (6).

جدول (6) سمية المضاد الحيوي SH_1 تجاه كريات الدم الحمراء للانسان

Compound	Conc.Ppm	RBC toxicity at 1hr.
DMSO	-	NT
SH_1	1	NT
	2	NT
	10	NT
	50	NT
	75	NT
	100	T
	125	T

	150	T

NT=Nontoxic
T=Toxic
DMSO=Dimethyl Sulf Oxide
SH_1=extracted antibiotic

هـ - تـأثير التراكيـز المختلفـة مـن المضـاد SH_1 علـى DNA العزلـة القياسـية *S. aureus* NCTC 6571 .

يشير الجدول(7) إلى ان عكورة محلول (DNA) المعزول من العزلـة القياسـية *S. aureus* ، بدأت تزداد بزيادة تركيز المضاد الحيوي (SH_1) المضاف الى محلول الـ (DNA) ، مما يشير الى زيادة تحلل وانفتـاح خيـوط الـدنا (DNA) أي حـدوث عمليـة مسـخ لـه (denaturation) كلما ازداد تركيز المضاد المضاف الى المحلول .

جدول (7): تأثير تراكيز مختلفة من المضاد الحيوي SH_1 على DNA العزلة القياسية *S. aureus* NCTC 6571.

Antibiotic Conc. (Mg/ml)	O.D.	Antibiotic Conc. (Mg/ml)	O.D.*
0.1	0.1	0.6	0.4
0.2	0.1	0.65	0.488
0.25	0.167	0.7	0.5
0.3	0.199	0.75	0.5
0.35	0.2	0.8	0.5
0.4	0.258	0.85	
0.45	0.288		
0.5	0.3		
0.55	0.389		

***O.D.= Optical Density**

المنافشة

درس خلال هذا البحث قابلية العزلة المحلية *S.rimosus* المعزولة من تربة زراعية في حقول قصب السكر في ميسان ، على انتاج مضاد حيوي نيوكليوسيدي لاهمية هذا النـوع مـن المضادات من خلال استخدامها كمضادات للامراض السرطانية . وقد تمكنا بالفعل مـن عـزل مضاد حيوي جديد ذو طبيعة نيوكليوسيدية اطلق عليه اسم SH_1 من الوسط التخمـري المحـور النامية فيه العزلة *S.rimosus* ، ونعتقد بانه مضاد حيوي نيوكليوسيدي جديد معزول مـن هـذه العترة ، وذلك من خلال مقارنة صفاته الفيزيائية والكيميائية مـع مجموعـة مـن المضـادات النيوكليوسيدية التي تنتجها العزلات العالمية العائدة للنوع *S.rimosus* وبالاعتماد على المصادر الحديثة ، وقد لوحظ ان هنالك صفات للمضاد SH_1 تتشـابه مـع صـفات المضـاد الحيـوي النيوكليوسيدي Sangivamycin المعزول من قبل Rao and Renn عام 1963 مـن راشـح المزرعة التخمرية للعزلة *S.rimosus* ATCC 14, 673 .

امتلك المضاد الحيوي المستخلص درجة انصهار حادة و بقعـة واحـدة علـى صـفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ، مما يشير ذلك الى ان المضاد الحيوي SH_1 قـد تـم عزله بصورة نقية من راشح المزرعة التخمرية *S.rimosus* مع اعادة عملية البلورة له وازالة الشوائب العالقة منه .

ويتضـح مـن الشـكل (1) الخـاص بطيـف الاشـعة فـوق البنفسـجية للمضـاد الحيـوي المسـتخلص SH_1 ، ظهـور حزمـة امتصـاص واحـدة عنـد الطـول الموجي (294) نانوميتر ناتجة عن حدوث الانتقالات الالكترونية من نوع عائدة الى وجود الاواصـر المزدوجـة فـي تركيبـة المضـاد مـن نـوع (C=O) و (C=C) (Lambert *et al.*, 1987).

ومن ملاحظة طيف الاشعة تحت الحمراء (شكل 2) و (جدول 2) الذي يفسر اهم الحـزم الموجودة في المضاد الحيوي المستخلص ، يلاحظ وجود حزمة مميزة لمجموعة الامين (NH_2) المتداخلة معها حزمة الهيدروكسيل (-OH) عند الموقع (3420) سم$^{-1}$ ، ووجود اصرة (=CH) الاروماتية التي تظهر حزمتها بحدود (3120)سم$^{-1}$. ويحتوي المركب ايضـا علـى الاصـرة (C=O) الكاربونيلية العائدة الى مجموعة الأميد، وتظهر حزمتها عند الموقع (1710) سـم$^{-1}$ تتداخل معها الاصرة (C=N) الاروماتية عند نفس الموقع. ويلاحظ من خـلال الطيـف ايضـا وجـود حزمـة معتدلـة الشـدة فـي الموقـع (1600) سم$^{-1}$ تعود الى الاصرة الثنائية (C=C) ، ووجود حزمة قويـة الشـدة فـي الموقـع (1400) سم$^{-1}$ تدل على اصرة (C-N) ضـمن تركيبـة المضـاد الحيـوي SH_1 ان ظهـور تلك الحزم في طيـف الاشـعة تحـت الحمـراء للمضـاد الحيـوي الجديـد SH_1 يتوافـق

مع اهم حزم الامتصاص الظاهرة في طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد الحيوي النيوكليوسيدي Sangivamycin والمعزولة من *S rimosus* (Rao, 1968) .

هذا وقد جاءت نتائج (%CHN) والكشوفات اللونية لاهم المجاميع الداخلة في تركيبة المضاد الحيوي المستخلص(SH_1) معززة لطيف الاشعة تحت الحمراء ، فيلاحظ من خلال ايجابية الكشف عن مجموعة الامين وجود مجموعة (NH_2) حرة في الصيغة الكيميائية للمضاد وان تغيير لون ورقة زهرة الشمس الى الازرق في الكشف عن الاماين ما هو الا دليل ايجابي على احتواء المضاد الحيوي SH_1 على اصرة اماين في تركيبه و كذلك احتواء المضاد على مجموعة كاربوهيدراتيه ظاهرة بشكل حلقة بنفسجية في كشف مولش وقد عزز ذلك كشف بيال الذي شخص طبيعة تلك المادة الكاربوهيدراتية على انها سكر خماسي بعد ظهور المعقد الاخضر-المزرق . وتاكيدا لطبيعة المضاد الحيوي المستخلص SH_1 والمجموعة الكيميائية العائد لها يوضح ظهور المعقد الاخضر المزرق الفاتح للمضاد في كشف المجموعة النيوكليوسيدية باستخدام الكاشف (2، 4- داي فينايل امين) ان المضاد الحيوي المستخلص SH_1 هو مضاد حيوي عائد الى مجموعة المضادات الحيوية النيوكليوسيدتيه من المضادات الحيوية (مضاد حيوي نيوكليوسيدي).

يمتلك المضاد الحيوي SH_1 فعالية مميزة تجاه الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وبقطر تثبيط عالي بينما تاثيره على الجراثيم السالبة لصبغة كرام اقل في تجربة الغربلة الاولية (جدول 1) . كذلك فان تاثيره المثبط الادنى (MIC) تراوح بين (0.5-10.5) مايكروغرام/مل تجاه الجراثيم الموجبة لصبغة كرام .

في حين بلغ (MIC) بين (250>-50>) مايكروغرام/مل تجاه الجراثيم السالبة لصبغة كرام وبذلك يتضح تشابه المضاد الحيوي SH_1 مع العديد من المضادات الحيوية النيوكليوسيديه المعزولة من انواع جنس *Streptomyces* وبالاخص النوع *S. rimosus* (Rao and Renn, 1963) .

كما اشارت النتائج الى ان للمضاد الحيوي SH_1 ثباتيه عالية في مدى واسع من الاس الهيدروجيني (2.5-7) وفي درجات حرارة مختلفة (30-60) $م^5$ ، اذ بقيت فعاليته بنسبة (100%) في المديات المذكورة اعلاه من اس هيدروجيني ودرجة حرارة في حين انخفضت فعاليته الى (20-80) % في pH (9.5) مما يشير ذلك الى تاثير المضاد في الاوساط القاعدية ، تتطابق هذه النتائج مع العديد من المضادات الحيوية النيوكليوسيدية المعزولة من جنس *Streptomyces* (Suhadolnik, 1970) .

ان الدراسة الاولية للسمية الخلوية للمضاد الحيوي المستخلص SH_1 تشير ذلك الى انه مضاد سام وبهذا فانه يشابه العديد من المضادات الحيوية النيوكليوسيدية المضادة للسرطان والمعزولة من جنس *Streptomyces* مثل Sangivamycin و Tubercidin و Toyocamycin (Suhaddnik, 1970) .

بلغت الجرعة القاتلة الوسطى LD_{50} للمضاد الحيوي SH_1 ، 250 ملغم/كغم جدول (5) و شكل (4) وهي واقعة ضمن المضادات ذات السمية العالية والمستخدمة عادة في علاج الأورام السرطانية.

ومن خلال دراسة تاثير التراكيز المختلفة من المضاد الحيوي المستخلص على انفتاح خيط الحلزون المزدوج لـ DNA الجرثومة القياسية *S. aureus* NCTC 6571 ، اتضح ان للمضاد تاثير مباشر على كسر الاواصر الهيدروجينية والتي تربط حلزوني (DNA) وذلك بزيادة عكورة محاليل (DNA) مع زيادة التراكيز المستخدمة من المضاد الحيوي ابتداءا من التركيز (0.25) مايكروغرام/مل وقد كانت اعلى عكورة عند التركيز (0.75) مايكروغرام/مل ، مما يشير الى تاثير المضاد الحيوي المباشر على خيوط الـ (DNA) وبهذا يتشابه مع عمل بعض المضادات النيوكليوسيدية التي تستخدم كمضادات ضد الاورام السرطانية .

الاستنتاجات

1-الحصول على عزلة محلية معزولة من التربة العراقية لها قابلية على انتاج مضاد حيوي نيكليوسيدي جديد SH_1 .

2-تشخيص المضاد الحيوي المنتج كيميائيا باستخدام طرائق التشخيص مثل IR و UV و MP و CHN% و TLC والكشوفات اللونية .

3-دراسة فعالية المضاد المعزول اتجاه الجراثيم القياسية الموجبة والسالبة لصبغة كرام ودراسة التركيز المثبط الادنى لهذا المضاد كذلك تحديد سميته (LD_{50}) ضد الفئران المختبرية وتحديد السمية الخلوية ضد كريات الدم الحمراء .

4-دراسة تاثير تراكيز مختلفة من المضاد المعزول SH_1 على DNA المعزول من الجرثومةالقياسية *S. aureus* وتحديد التركيز الذي يسبب له مسخ .

5-ان المضاد الحيوي المنتج هو مضاد جديد ونامل في تشخيصه مستقبلا بطرائق التشخيص الأكثر تطوراً مثل NMR و Mass spectra وذلك لتحديد هويته الكيميائية المضبوطة .

Referencs

[1]Armitage, P. (1971). Statistical methods in medical Research.Blakwell Scientific Publication, U.S.A.

[2]Fieser, L. F. and Williamson, K. L. (1975). Organicexperiments. D.C. Health and Company, London.

[3]Holt, J. G. ; Krieg, N. R.; Sneath, P.H. ; Staley, J.T. and Williams, S. T. (eds.) (1994). Bergey's manual ofdeterminative Bacteriology. 9th ed. Williamsand Wilkins.

[4]Lambert, J. B.; Herbert, F.S.; Davied, L.; Grahamcooks, R.(1987). Introduction of organic spectroscopy.Macmillan Publishing Company/New York.Macmillan Publishers/London.

[5]Mehdi, K.H. (1997). Isolation , Identification anddevelopment of *Streptomyces aureofaciens* HighlyProducing chloro tetracycline strains from soils of southern Iraq. Ph.D. thesis. College of Sci. BasrahUniversity.

[6]Most, C.F. (1988). Experimental organic chemistry. JohnWiley and Sons, INC. U.S.A. 586 pp.

[7]Nair, M. G. ; Putnam, A.R.; Mishra, S.K. ; Mulks, M.H.;Taft, W.H. Keller, J.E. ; and Miller, J.R. (1989). Faeriefungin, anew broad spectrum antibiotic from*Strepomyces griseus* var. *autotrophicus* J. Natural
products 52 (4) : 797-809.

[8]Spooner, D.F. and Sykes, G. (1972). Laboratory assessment of antibacterial activity. In: Norris, J. R. and [9]Ribbons, D. W. (ed.) . Methods in Microbiology. Academic Press. INC. London Ltd. Vol. 7B: 211-276.

[10]William, S. T. ; Good fellow, M. ; Alderson, G. ; Wellington, E. M. ;Sneath; P. H. and Sackins, M. J. (1983).Numerical classification of *Streptomyces* andrelated genera, J. Gen. Microbiol. 192: 1743-1813.

[11]Joreme, J. ; Berry, J. and Staley, T. (1997). MicrobiologyDynamic and divesity. Sannders college Publishing:880-881.

[12]Fried, B. and Sherman, J. (1986). Thin-layer chromatography techniques and applications chromato graphy Science series, Vol. 35, Marcel Dekker, INC. 394 pp.

[13]Haque, S. F. ; Sen. , S.K. and Pal. , S.C. (1993). Survey of antibacterial Actinomycetes from soils of different parts of west Bengal. Indian Biologist. 25 (1) : 51-55.

[14]Egorov, N.S. (ed.) (1985). Antibiotic a scientiffic approach.MIR. Publishers, Moscow.

[15]Pridham, T.G. and Tresner, H.D. (1974) "A family VII "*Streptomyces*" Waksman and Henrici (1943). In: "Bergey's manual of determinative bacteriology". 8th ed. R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), Baltimore, Williams and Wilkins. Pp
. 758-829.

[16]Marmur, A. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganis ms. J. Mol. Biol., 3: 208-218.

[17]Good fellow, M. ; Elayne, V. and Sanglier, J.J. (1992)Numerical classification and identification of *Streptomyces* SPP. A review. Gene, 115: 225-233.

[18]Deley, J., Cattais, H.and Reynaerls, A.(1970):The quantitative measurement of DNA hybridation from renaturation rates Europ.J.Biochem.,12:133-142.

[19]Shirling, E.B. and Gottlieb, D.(1966). Methods for Characterization of *Streptomyces* spp. Inter. J.Syst.Bacteriol.,16:313-340.

[20]Rao,K.V Renn,D.W.(1963). Antimicrobial agents. Chemotherapy.77. Rao,K.V.(1968).J.Med.chem.11.939.

[21]Rao,K.V,Marsh.W.S.,and Renn.D,W.(1969).;U.S.Part.862,423,398.

[22]Saadalla,R.A.(1980).Biochemistry Practical Manual Basrah University Press.Basrah.Iraq.(111)Pp.Suhado Lnik