ISSN: 1991-8941

مقارنة المحتوى الدهني لجراثيم *Serratia marcescens* المنتجة وغير المنتجة للصبغة باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الغاز–السائل

أديبة يونس شريف* عامرة علي احمد** مهدي ضمد القيسي***
* جامعة الموصل– كلية العلوم ** جامعة الموصل كلية التمريض . ***وزارة الزراعة

تاريخ الاستلام:١١ / ١٢ /٢٠٠٩ تاريخ القبول: ٢٣ / ٥ /٢٠١٠

الخلاصة:تم مقارنة محتوى الأحماض الدهنية لسلالات جرثومة S. marcescens المنتجة وغير المنتجة للصبغة باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الغاز – السائل حيث سجلت الدراسة وجود سبعة أنواع من الأحماض الدهنية تضمنت : Lauric acid (C12:0), Lanoleic acid (C18:2), Palmitic acid (C16:0), Myristic acid (C14:0), Palmitoleic acid (C16:1), Oleic acid (C18:1), Arachidic acid (C20:0). في كلا النوعين .وشكل الحامض الدهني Lauric acid (C12:0) أعلى نسبة في كلا النوعين ولوحظت اختلافات قليلة في نسبها المئوية بين النوعين .

كلمات مفتاحية المحتوى الدهني ، *Serratia marcescens* ، صبغة ،كروماتوغرافيا الغاز–السائل

المقدمة

تعد جرثومة *Serratia marcescens* من الجراثيم السالبة لصبغة كرام التي تصنف ضمن العائلة المعوية والتابعة لجنس *Serratia* وكغيرها من الجراثيم المعوية تنمو على الأوساط الاعتيادية تحت ظروف هوائية أو لاهوائية اختياراً ، وهي تصيب الإنسان وعدد كبير من المضائف الأخرى(1) وتسبب العديد من الإصابات منها إصابات المجاري التنفسية والبولية وإصابات الإذن والغشاء البريتوني وشغاف القلب والتهاب المفاصل البكتيري والتهاب العظام والتهاب السحايا وإصابات العين والجلد (2,1) ولبعض سلالاتها القابلية على إنتاج صبغة prodigiosin التي تملك فعالية مضادة للفطريات وللتكاثر الخلوي (antiproliferative activity)كما وتسبب تثبيط الجهاز المناعي(3) .

تعد الأحماض الدهنية مكوناً أساسياً في العمليات الايضية الخلوية حيث تدخل في الوحدات البنائية الأساسية للغشاء البلازمي للجراثيم (4) ، حيث تلعب دوراً مهماً في تحديد الصفات الفيزياوية والكيمياوية في دهون الخلية والغشاء إذ تمتلك الجراثيم السالبة والموجبة أشكالا خاصة للأحماض الدهنية لكل نوع (6) .

يعد الباحثون Abel, Schmertzing, Peterson (5) أول من استعملوا تقنية كروتوعرافيا – الغاز السائل في تحليل الأحماض الدهنية طريقة في تصنيف إحدى عشر مجموعة تعود إلى العائلة المعوية .

اعتمد العديد من الدراسات على تحليل الأحماض الدهنية طريقة بديلة للطرق المظهرية والجينية المعتمدة في تشخيص وتصنيف العديد من الجراثيم لاسيما المهمة طبياً (6) ، وتم إجراء دراسات حول طبيعة توزيع الأحماض الدهنية كجزء من تركيب الجراثيم حيث أوضحت هذه الدراسات اختلافات في أنواع الأحماض الدهنية في أنواع الجراثيم المختلفة حيث تتواجد الأحماض الدهنية بأشكال متعددة منها الأحماض المشبعة مستقيمة السلسة أو غير المشبعة أحادية ومتعددة أو أحماض متفرعة مثيلية أو أحماض تحوي حلقات سايكلوبروبان أو مجاميع هيدروكسي (7).

ولعدم وجود دراسات محلية مسبقة حول محتوى جرثومة *Serratia marcescens* من الأحماض الدهنية ونسبها المئوية لذلك أولت الدراسة اهتماماً لتحليل محتوى عزلات المنتجة وغير المنتجة للصبغة منها الأحماض الدهنية

بعد استخلاصها واسترتها بتقنية GLC الشعري في تحليلها للتعرف على أنواعها ونسبها .

المواد وطرائق العمل

أولاً : العزلات

تم الحصول على عزلتين من جرثومة *Serratia marcescens* احدهما منتجة للصبغة وأخرى غير منتجة للصبغة من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل والمعزولة من حالات مرضية وتم التأكد من نقاوتهما اعتماداً على الاختبارات الشكلية والكيمياحيوية الخاصة بالجرثومة (8) .

ثانياً : استخلاص الأحماض الدهنية

Extraction of fatty acids from *Serratia marcescens*

تم استخلاص الأحماض الدهنية حسب طريقة الباحث Fourche (9) والمحورة من قبل Al-Kaisy وجماعته (10) ، إذ تم تنمية الجراثيم على وسط أكار الماكونكي (3) وحضنت عند درجة حرارة (37)مْ لمدة 24 ساعة ، نقلت الخلايا النامية إلى أنبوب حاو على (5)سم3 من هيدروكسيد الصوديوم (7.5) عياري في الميثانول المخفف بالماء المقطر بنسبة (4:6 حجم/حجم) ، سخن المزدوج بعد ذلك عند درجة حرارة (105)م لمدة ساعة ونصف وترك المحلول ليبرد ، ثم أضيف إليه (6)سم3 من الماء المقطر ، وضبطت الدالة الحامضية عند (2.0) باستخدام محلول حامض الكبريتيك (H_2SO_4) وبتركيز (20%) . واستخلصت الأحماض الدهنية المحررة باستعمال (30-50) سم3 من ثنائي اثيل الايثر Diethyl ether وباستخدام قمع الفصل (separating funnel) (لضمان سحب الدهون الموجودة جميعها في المذيب وفصلها عن الحامض والماء) ، وأخذت طبقة الأثير الحاوية على الأحماض الدهنية وغسلت بالماء المقطر ، وضبطت دالتها الحامضية عند (7.0) ، وجففت باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية (Anhydrous Sodium Sulphate) ، وتم تبخيرها باستخدام جهاز المبخر المفرغ الدوار (Rotary Vaccume evaporator) وبدرجة حرارة (50)م ، وبهذا تم الحصول على الأحماض الدهنية .

تحليل الأحماض الدهنية بجهاز كروماتوكرافيا الغاز–السائل (GLC)

تضمنت طريقة تحليل الأحماض الدهنية بجهاز الـ(GLC) تحويل الأحماض الدهنية إلى أسترات المثيل (Methyl esters) ، إذ أضيف إلى نماذج الأحماض الدهنية المستخلصة (0.1)سم3 من كلوريد الاسيتل إلى (25)سم3 ميثانول بصورة تدريجية مع التحريك ، بعدها تم غلق العبوات بإحكام بعد تفريغها من الهواء ، ثم وضعت في حمام مائي مغلي لمدة (25) دقيقة .

تم حقن (1)مايكروليتر من كل نموذج في جهاز الـ(GLC) من نوع (Packard Modelula) والمجهز من شركة (Hewlett Packard) الأمريكية . المربوط بكاشف التأثير الحراري ([Flame Ionization Detector [FID) ، باستخدام عمود فصل زجاجي وبقياس (I.D. mm2xcm210) معبأة بمادة (Silarloc) وبتركيز (10%) والمحملة على مادة Chromosorb DMCS-DWA بقطر حبيبة (80-100)مايكروميتر . وفصلت الأحماض الدهنية بين درجة حرارة (120-200)م ، بحرارة ابتدائية (120)م لتصل إلى درجة حرارة قدرها (200)م كحرارة نهائية ، وذلك برفعها بمعدل عشر درجات/دقيقة ، أما حرارة موضع حقن النموذج والكاشف فكانت (270)مْ لكل منهما . استخدم غاز النتروجين كناقل بسرعة (30)سم3/دقيقة ، وغاز الهيدروجين والهواء للحصول على اللهب وبسرعة (30) و (300)سم3/دقيقة على التوالي .

تم الحصول على منحنيات للأحماض الدهنية التي تم تشخيصها وذلك بمقارنة زمن احتباسها (Retention time [Rt]) مع أوقات احتباس أسترات الأحماض الدهنية القياسية المشتقة بنفس الطريقة وعند الظروف نفسها المذكورة في أعلاه . وحددت أسترات الأحماض الدهنية بوساطة جهاز Silica بجهاز Schimadzu UV spectrometerوعلى طول موجي (240) نانوميتر وتم حساب نسبها المئوية.

النتائج والمناقشة

حددت الأحماض الدهنية لعزلتين من عزلات جرثومة *S. marcescens* احدهما منتجة للصبغة وأخرى غير منتجة للصبغة باستخدام جهاز الـ(GLC) حيث تم الحصول على الأحماض الدهنية بشكل ذروات (Peaks) رسمت على جهاز تسجيل (recorder) أبدت نتائج تحليل محتوى العزلتين من الأحماض الدهنية الحصول على عدد من الأحماض المشبعة وغير المشبعة بنسب متفاوتة حيث تم الحصول على سبعة أحماض دهنية موجودة في كلا النوعين ، اعتمد في قراءة النتائج على الشكل (1) الذي يمثل نتائج تحليل الأحماض القياسية وزمن احتباسها مقدراً بالدقائق ، ويوضح الشكل (2) نتائج تحليل مزيج الأحماض الدهنية المستخلصة من الجرثومة لكلا النوعين قيد الدراسة وتمثل كل ذروة في الشكل قراءة لحامض دهني معين تم تحديد نسبته المئوية اعتماداً على زمن الاحتباس للأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة ، التي تم فصلها ثم تحديدها اعتماداً على الشكلين (1)،(2) .

يتبين من الجدول (1) سيادة الأحماض الدهنية المشبعة في كلا النوعين حيث ان الحامض الدهني (C12:0) Lauric acid شكل أعلى نسبة من بين الأحماض الدهنية الخلوية لهذه الجرثومة في كلا النوعين المنتجة وغير المنتجة للصبغة حيث بلغت (22.81%) ، (31.02%) على التوالي ، فيما شكل الحامض الدهني (C20:0) Arachidic acid في النوع المنتج للصبغة اقل نسبة بلغت (9.83%) ، وفي النوع غير المنتج للصبغة بلغت (1.45%) وتقاربت نسب فصل الحامض الدهني (C16:0) palmitic acid في جراثيم *Serratia marcescens* في كلا النوعين المنتجة للصبغة وغير المنتجة للصبغة إذ بلغت (19.90% ، 17.40%) على التوالي ، في حين بلغت نسبة الحامض الدهني (C16:1) Palmitoleic acid في هذه الجراثيم لكلا النوعين المنتجة وغير المنتجة للصبغة (12.29% ، 15.35%) وبلغت نسبة الحامض الدهني Myristic acid (C14:0) في النوعين المنتج وغير المنتج للصبغة (10.39% ، 15.4%) ، في حين بلغت نسبة الحامض الدهني (C18:1) Oleic acid في جراثيم *Serratia marcescens* المنتجة للصبغة (13.11%) وفي النوع غير المنتج للصبغة (17.7%) ، فيما شكل الحامض الدهني (C18:2) Lanoleic acid في النمط غير المنتج للصبغة (11.62%) وفي النوع غير المنتج للصبغة (1.54%) .

جدول (1) : الأنواع والنسب المئوية للأحماض الدهنية الحرة (free Fatty acids) لجراثيم *Serratia marcescens* المنتجة وغير المنتجة للصبغة وباستخدام طريقة كروماتوكرافيا الغاز–السائل (GLC)

جدول (1) : الأنواع والنسب المئوية للأحماض الدهنية الحرة (free fatty acids)
لجراثيم *Serratia marcescens* المنتجة وغير المنتجة للصبغة وباستخدام طريقة كروماتوكرافيا الغاز–السائل (GLC)

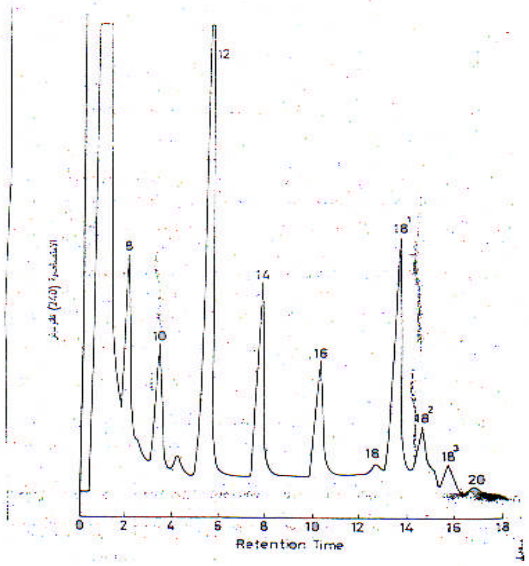
جراثيم *Serratia*	الأحماض الدهنية						
	Arachidic acid (C20:0)	**Oleic acid (C18:1)**	**Palmitoleic acid (C16:1)**	**Myristic acid (C14:0)**	**Palmitic acid (C16:0)**	**Lanoleic acid (C18:2)**	**Lauric acid (C12:0)**
***S. marcescens* المنتجة للصبغة**	**9.83**	**13.11**	**12.29**	**10.39**	**19.90**	**11.62**	**22.81**
***S. marcescens* غير المنتجة للصبغة**	**1.45**	**17.7**	**15.35**	**15.46**	**17.40**	**1.54**	**31.02**

C20:06, C16:0, C14:0, C12:0 أحماض دهنية مشبعة .

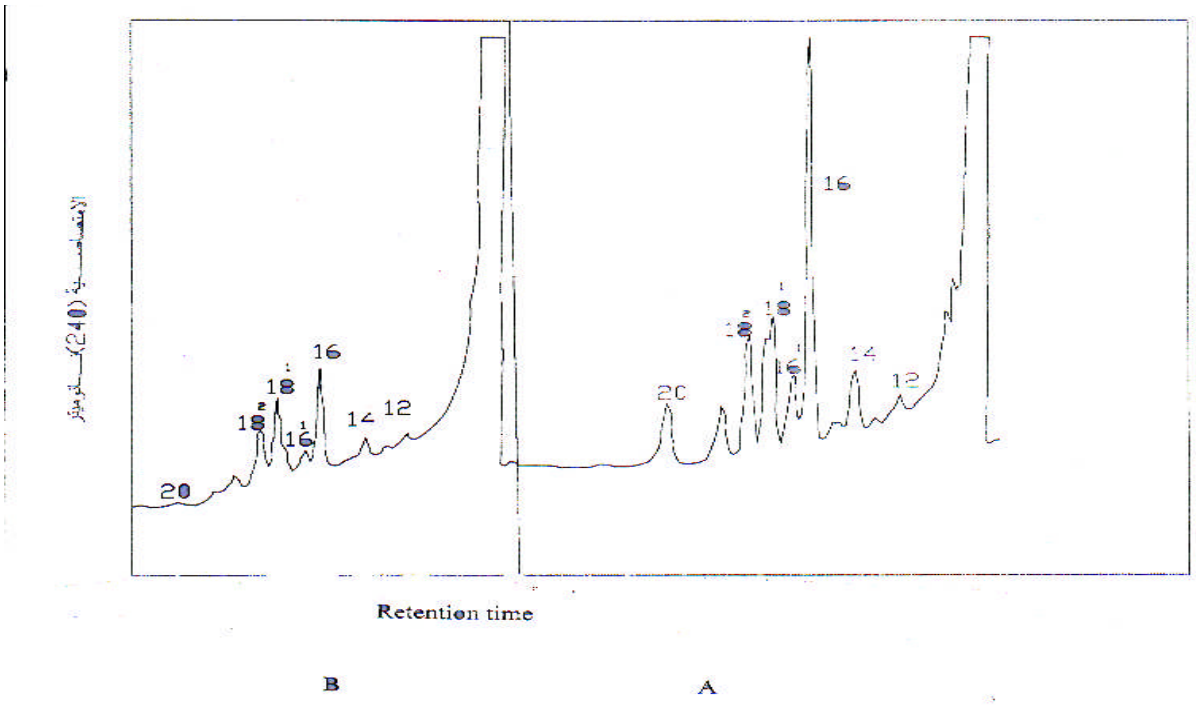
C18:1, C16:1 أحماض دهنية أحادية غير مشبعة .

C18:2 أحماض دهنية متعددة غير مشبعة .

ويلاحظ من الجدول ذاته عدم وجود فروقات مميزة في المحتوى الدهني لجراثيم *Serratia marcescens* المنتجة وغير المنتجة للصبغة سوى في النسبة المئوية للحامض الدهني المشبع Arachidic acid والحامض الدهني غير المشبع Lanoleic acid وكانت عالية عند الجراثيم *Serratia marcescens* المنتجة للصبغة وهذا يتفق مع ما توصل إليه الباحثان (11) .



الشكل (1) : زمن الاحتباس لمزيج الأحماض الدهنية القياسية وباستخدام جهاز كروماتوكرافيا الغاز – السائل (GLC)



الشكل (2) انواع الاحماض الدهنية التي فصلت باستخدام جهاز كروماتوكرافيا الغاز –سائل(GLC) لجرثومة S.marcescens

A- المنتجة للصبغة

B- غير المنتجة للصبغة

في حين أظهرت النتائج تبايناً في أنواع الأحماض الدهنية مقارنة بمزيج الأحماض الدهنية القياسية ، وبلغت النسب المئوية للأحماض الدهنية غير المشبعة (37.02%) ، (34.59%) في جراثيم *Serratia marcescens* المنتجة وغير المنتجة للصبغة على التوالي ، وهذا يتفق مع ما توصل إليه الباحثان (12) إلى ان جراثيم *Serratia marcescens* تحوي على كميات كبيرة من الأحماض الدهنية المشبعة أكثر من الأحماض الدهنية غير المشبعة .

وأظهرت دراسة الباحثين (13) على تسعة عشر عزلة من جراثيم *Serratia marcescens* لتحديد محتواها من الأحماض الدهنية باستخدام تقنية GLC الشعري وجود كلا من الحامض الدهني Myristic acid و Palmitic acid و Palmitoleic acid و oleic acid و Lanoleic acid التي شكلت هذه الأحماض الدهنية المكون الأكبر حيث بلغت (80-50%) في الأحماض الدهنية الكلية للعزلات .

أشار الباحث (6) إلى وجود الأحماض الدهنية Palmitic acid و Palmitoleic acid بكميات كبيرة في أفراد العائلة المعوية ، وان جراثيم *Serratia marcescens* تحتوي على كميات كبيرة من الأحماض الدهنية المتفرعة السايكلوبروبان والأحماض الدهنية الحاوية على مجاميع هيدروكسي كبقية الجراثيم السالبة لصبغة كرام (14) . وأشار الباحثون (16,15) إلى ان تركيب الأحماض الدهنية الخلوية في الجراثيم يتأثر بعوامل عديدة منها نوع وسط النمو وعمر المزرعة ودرجة حرارة التحضين .

المصادر

1. Leopold Kurz, C.; Chauvet, S.; Andres, E.; Aurouze, M. and Vallet, I. (2003). Virulence factors of the human opportunistic pathogen Serratia marcescens identified by invivo screening. J. EMBO. 22(7):1451-1460.
2. Schmitz, G. and Braun, V. (1985). Cell bound and secreted proteases of Serratia marcescens . J. Bacteriol. 161(3) : 1002-1009.
3. Khanaafari, A.; Assadi, M. M. and Fakhr, F. A. (2006). Review of prodigiosin, pigmentation in Serratia marcescens. J. Biolo. Sci. 6(1) : 1-13.
4. Meizhang, Y.; Marrakchi, H.; White, S. W. and Rock, C. O. (2003). The application of computational methods to explore the divers and structure of bacterial fatty acid synthase. J. lipid Research. Vol.44: 1-10.
5. Abel, K. D.; Schmertzing, H. S.; Peterson, J. I. (1963). Classification of microorganisms by analysis of chemical composition feasibility utilizing gas chromatography. J. Bacteriol. 85: 1039-1044.
6. Valderrama, E. R.; Bocanegra, M. D.; Arreaga, M. E.; Garcia, P. R.; Diaz, A. D.; Patino, R. A. and Perez, M. E. (2002). Determination of profile of fatty acids of 4 species of shigella spp. by chromatography of gases. Rev. Latinoam Microbiol. 44(2): 69-74.
7. Dirusso, C. C. and Black, P. N. (2004). Bacterial long chain fatty acid transport: Gateway to a fatty acid-resposive signaling system. J. Biol. Chem. 279(48) : 49563-49566.
8. Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6thed. McGraw-Hill companies, Inc. New York.
9. Fourche, J. (1989). Gaschromatographic Fatty acid determination to differentiate. No Gardia asteroids, Mycobacterium fortuitum and Mycrobacterium chelone: J. Chrom, 484:142-146.
10. Al-Kaisy, M. T.; Hadwan, H. A.; Saleh, H. M. and Hussen, A. K. (1991). Determination of citric and oxalic acids in fermented solutions of Aspergillus niger by gas-liquid chromato0graphy. Iraqi. J. Microbiol. vol. 3:170-177.
11. Winshel, E. B. and Harold, C. N. (1974). Relation of cell wall lipid content of Serratia marcescens to Resistance to Antimicrobial Agents. J. Antimicrobial Agents. Chem. 6(1): 73-75.
12. Pizzimenti, F. C.; Nostroa, V. V.; Trozzia, A. (1999). Fatty acid profiles

chromatography mass spectrometry. Anal. Chem. 68(17). 2805-2810.

15. Button, G. L.; Milier, M. A. and Tsana, J. C. (1975). Antibiogram and lipid analysis of a pigmented strain of Serratia marcescens and its non pigmented variants. Antimicro. Agents and chem..7(2) : 219-222.
16. Willey, J. M.; Sherwood, L. M. and Woolverton, G. J. (2008). Microbiology. 7thed. McGraw-Hill companies. Inc. New York.

inpigmented and nonpigmented strains of Serratia marcescens J. New. Micro. Vol.22(2): 91:98.

13. Bergan, T.; Grimont, A. D. and Grimont, F. (1983). Fatty acids of Serratia Determined by Gas chromatography. J. Current Micro. Vol.8:7-18.
14. Gharaibeh, A. A. and Voorhees, K. J. (1996). Characterization of lipid fatty acids in whole-cell Microorganisums using in situ super critical fluid derivtization Extraction and gas

A COMPARISON STUDY ON THE FATTY ACIDS CONTENTS OF PIGMENTED AND NON PIGMENTED STRAINS OF SERRATIA MARCESCENS USING LIQUID GAS CHROMATOGRAPHY.

ADEBA Y.SHAREEF AMERA A. AHMED MAHDI D.AL-QAISY
E.mail: scianb@yahoo.com

ABSTRACT:The study recorded seven types of fatty acids using Liquid-Gas chromatograph technique including Lauric acid (C12:0), Lanoleic acid (C18:2), Palmitic acid (C16:0), Myristic acid (C14:0), Palmitoleic acid (C16:1), Oleic acid (C18:1), Arachidic acid (C20:0) in both strains and fatty acid.Lauric acid (C12:0) formed the highest ratio in both strains, the study also showed a difference in the percentage of these fatty acids between the two tested strains.