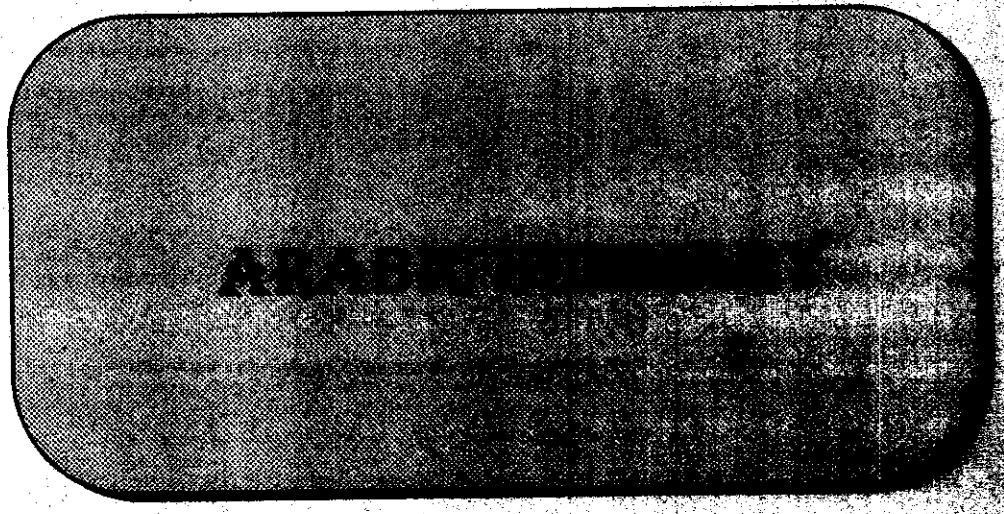

الملخص العربى

١- تتناول هذه الرسالة دراسة البكتيريا المحبة للحرارة والقلوية معا لعينات تربة تمثل الأراضى المختلفة فى جمهورية مصر العربية.

٢- جمعت خمسة وثلاثون عينة تربة من خمس مناطق فى جمهورية مصر العربية : منطقة وادى النطرون، ملاحات بورسعيد، ملاحات العامرية، بحيرة مريوط، ومحافظة القليوبية، جمعت بقدر الإمكان من مناطق صحراوية ومعروفة القلوية العالية.

٣- أبدت دراسة المحتوى الكلى من البكتيريا المحبة للحرارة والقلوية معاً أن عينات التربة التى جمعت من منطقة وادى النطرون، منطقة ملاحات بورسعيد وملاحات العامرية تحتوى على كمية عالية من هذه الميكروبات، بينما سجلت عينات التربة التى جمعت من بحيرة مريوط ومحافظة القليوبية محتوى متوسط من البكتيريا المحبة للحرارة والقلوية.

٤- تم إختيار (١٧٠) عزلة بكتيرية محبة للحرارة والقلوية معاً من بين الفلورا البكتيرية الموجودة فى الـ (٣٥) عينة من عينات التربة.

٥- تم إنماء هذه البكتيريا المحبة للحرارة والقلوية على منبت هو بيئة دوكس المزودة بمستخلص الخميرة وجيلاتين و ١ - ٢٪ فوسفات صوديوم وذلك بهدف عزل السلالات المحللة للبروتين ومحبة للحرارة والقلوية وقد تم ذلك عند رقم هيدروجينى ١٢ وبالتحضين عند درجة حرارة ٦٥° م.

٦- تم دراسة مدى إنتشار العزلات البكتيرية (١٧٠) بالنسبة لنوع التربة الأم التى عزلت منها وقد سجل أعلى رقم فى وادى النطرون (٣٤,٧٪)، يليه بحيرة مريوط (١٩,٤٪)، يليها ملاحات العامرية (١٥,٩٪)، يليها ملاحات بورسعيد (١٥,٣٪) وأخيراً محافظة القليوبية (١٤,٧٪)، على التوالى.

٧- تم عمل مسح شامل لتقييم قدرة الـ (١٧٠) عزلة بكتيرية على إنتاج أنزيم البروتياز وقد أظهر هذا المسح على وجود ستة عشر عزلة بكتيرية من بين الـ (١٧٠) عزلة لها قدرة على إنتاج أنزيم البروتياز وأقوى عزلة له القدرة على إنتاج أعلى محصول من الأنزيم عند درجة حرارة ٦٥ ° م ورقم هيدروجى ١٢ كانت عزلة رقم و.ن ١٦١٦ب.

٨- إعتمدت عملية تعريف الـ (١٦) عزلة بكتيرية المحبة للحرارة والقلوية والمحللة للبروتين على مفاتيح التعريف العالمية الموصى بإستخدامها عند تعريف البكتيرا حيث تتميز العزلات بالصفات التالية : خلاياها عصوية توجد أحادى، وفى ازواج وفى سلاسل، منتجة للجراثيم، موجبة الجرام، هوائية إجبارية، لاتكون أستيل ميثيل كربينول ماعدا العزلات رقم ١٢٠١، ٢٣٠٥، ٦١١ فإنها تكون أستيل ميثيل كربينول. العزلات رقم ١٦١٦ب،

١٥١٥ب، ١٢٠١، ٢٣٠٥، ٦١١، ٣٤٠٣ب تكون حمض من د - جلوكوز، د - مانيتول وليس من د - زيلوز أو ل - أرابينوز، أما باقى العزلات فلا تنتج حمض من د- جلوكوز د- زيلوز، د - مانيتول أو ل - أربينوز. تحلل العزلات الجيلاتين، الكازين، والنشا ماعدا العزلات رقم ١٥١٥أ، ١٢٠١، ٢٧١٦أ، ٦١١ لا تحلل الكازين وعزلات رقم ١٦١٦ ب، ٢٧١٥أ، ٢١٠١ لا تحلل النشا. تحلل العزلات التيروزين ما عدا العزلات رقم ٣٤٠٣ك، ١٦١٦ب، ١٥١٥أ، ٣٠٥ب، ٢٣٠٥، ٢٧١٦أ، ٦١١ فأنها لا تحلل التيروزين. تنتج العزلات أندول ما عدا رقم ١٦١٦ب، ١٥١٥أ، ٢٣٠٥، ٢٧١٦أ، ٦١١ فإنها لا تنتج الأندول. لا تكون العزلات غاز من د - جلوكوز أو من النترات ما عدا العزلات رقم ٣٤٠٣ك، ٢٣٠٥، ٢٧١٦أ، ٣٤٠٣ب فإنها تنتج غاز نتيجة إختزال النترات.

هذه العزلات عاشقة للحرارة العالية حيث يتراوح درجة حرارة نموها ما بين ٤٥ إلى ٨٠° م ولا تعطى أى نمو عند درجة حرارة أقل من ٤٥° م. تقع درجة الحرارة المثلى للنمو ما بين ٥٥و ٦٥° أيضاً هذه العزلات محبة للقلوية حيث تنمو عند رقم هيدروجينى تتراوح قيمة من (٧,٥ إلى ١٣,٣) ولكن عند رقم هيدروجينى أقل من ٧,٥ لايوجد أى نمو. أما العزلات رقم ٣٥٠٣ ب، ٣٠٥ب فإنها تنمو عند رقم هيدروجينى من (٨) إلى (١٣,٣) ولا تعطى أى نمو عند رقم هيدروجينى أقل من (٨).

أعلى تركيز من كلوريد الصوديوم تنمو فى وجودة هذه العزلات هو تركيز ٧٪ عند ٦٥° ورقم هيدروجينى (١٢).

٩- وطبقاً لمفتاح بيرجى لتصنيف البكتيريا عام ١٩٨٦ م والمفاتيح الأخرى المتعلقة بالموضوع أمكن تصنيف الـ (١٦) عزلة بكتيرية إلى باسيللس أستيروسرموفيلس.

١٠- أجريت دراسة خاصة على إنتاجية انزيم البروتياز الصامد للحرارة والمحب للقلوية بإستخدام البكتيرة المحللة للبروتين باسيللس أستيروسر موفيلس و.ن ١٦١٦ب المعروفة بحبها للحرارة والقلوية معاً والمعزولة من عينة تربة مأخوذة من ملاحات وادى النطرون. وقد تم إختيار هذه السلالة بالذات على أساس أنها أقوى السلالات المعزولة والمحللة للبروتين (وعددها ١٦سلالة) من حيث مهاجمة البروتين وإنتاج أنزيم البروتياز.

١١- تم دراسة العوامل المؤثرة على إنتاجية أنزيم البروتياز بواسطة السلالة البكتيرية باسيللس أستيروسرموفيلس و. ن ١٦١٦ب وفيما يلى موجزاً دقيقاً للنتائج الهامة التى سجلت بهذا الصدد.

أ) سجلت أفضل حقنة بحجم يعادل نصف مل يحتوى على (٢٢٩٠٣× ١٠ ^{٦}) خلية بكتيرية.

ب) أظهرت السلالة البكتيرية أن أقصى قدرة لأفراز أنزيم البروتياز تتم فى غضون فترة تحضين تعادل ٣٠يوم عند درجة حرارة ٥٥° م.

جـ) ثبت أن الرقم الهيدروجينى الأمثل لإنتاج البروتياز هو (١٠) بإستخدام ١٪ فوسفات الصوديوم.

هـ) أفضل المحاليل الجامحة هو بوراكس – ص أيد عند رقم هيدروجينى يعادل (١٠,٢) ثم يليه محلول كربونات – بيكربونات عند رقم هيدروجينى (١٠,٧) يليه محلول جلايسين – ص أ يد عند رقم هيدروجينى (١٠,٤) يليه ترس يد كل عند رقم هيدروجينى (٩) يليه بورك – بوركس عند رقم هيدروجينى (٩,٢) على التوالى.

و) سجل تركيز (٣٪) من كلوريد الصوديوم أمثل تركيز لأنتاج أنزيم البروتياز.

ز) تم دراسة تأثير إدخال عدد (١٥) حامض أمينى فى منبت الإنتاج لكى تمثل المصدر النيتروجينى العضوى وقد قورنت نتائجها بالقيمة المأخوذة عن نترات الصوديوم كمصدر غير عضوى للنيتروجين وقد تمخضت هذه الدراسة عما يلى :

١- أحدث الثريونين أعلى تأثير لأستحثات البروتياز مقارنة بتأثير نترات الصوديوم المصدر الأصلى للنيتروجين فى منبت الإنتاج ثم يليه فى التأثير دل – الأنين، ل –سستين، ب– الأنين، حامض أسبارتيك.

٢- لم يسجل أى تأثير بالمرة فى حالة إدخال كل من :

ل – تيروسين، جليسين، دل – ليوسين، ل– هيستادين مقارنة بتأثير نترات صوديوم الذى له نفس التأثير.

٣- أحدث ل – سستين،دل – فينيل الانين، ل – أسبراجين، دل – سيرين نقصاً فى إنتاج أنزيم البروتياز يعادل ٧٤٪.

ع) أثبتت النتائج أيضاً أن إدخال مصادر نيتروجينية مختلفة (موليبدات الأمونيوم، كلوريد الأمونيوم، نترات الأمونيوم، كبريتات أمونيوم الحديدوز نترات بوتاسيوم، فوسفات ثنائى الأمونيوم، كبريتات الأمونيوم،أكسالات الأمونيوم، يوريا، نترات كالسيوم) ادى إلى زيادة إنتاج أنزيم البرويتاز ما عدا أكسالات الأمونيوم تسبب فى نقص محصول البروتياز ولكن أقصى إنتاج للأنزيم تحقق مع نترات الكالسيوم.

ط) أوضحت النتائج السابقة أن إضافة الماء فقط مع الجيلاتين ١٪ فوسفات صوديوم إلى وسط الإنتاج يكون مناسب جداً لإنتاج البروتياز.

م) كانت أفضل مادة بروتينية ساعدت على أستحثاث البروتياز هى البيتون يتبعها تريبتون، الجيلاتين، برويتاز بيبتون، الكازين.

ن) سجلت أفضل الفيتامينات من حيث قدرتها على إستحثاث بناء البرويتاز على النحو التالى :

حمض بانوثينيك، ثيامين، حمض أسكوربيك، حمض الفوليك، حمض النيكوتينيك وأخيراً الريبوفلافين على التوالى.

ل) أوضحت النتائج أن إدخال تركيزات مختلفة من بعض العناصر الثقيلة إلى وسط الإنتاج أدى إلى زيادة محصول الأنزيم فى وجود كبريتات الزنك عند تركيز (٥٠جزء فى المليون)، بينما وجود كبريتات النحاس، كبريتات الكوبلت، خلات الرصاص أدى إلى تثبيط إنتاج الأنزيم مع كل التركيزات.

١٢- تم إنتاج الأنزيم تحت كل الظروف المثالية المذكورة سابقاً بعدها أجريت عملية التنقية للأنزيم ثم درست بعض العوامل المؤثرة على نشاط الأنزيم المنقى.

١٣- إشتملت عملية التنقية على الخطوات الآتية : تحضير الرشيح الخالى من الخلايا، الترسيب بكبريتات الأمونيوم عند تركيز ٦٠٪، الديلسة ضد الماء المقطر يليها السكروز النقى ثم المرور خلال أعمدة سيفادكس ج ٢٠٠، ج ١٠٠ وقد ترتب على ذلك زيادة نقاوة الأنزيم ٤٨ مرة يقابلها زيادة فى درجة النشاط النوعى بما يعادل ١٢٦٧,٦ وحدة/مجم بروتين/مل.

١٤- تم دراسة العوامل المؤثرة على أنزيم البروتياز المنقى وفيما يلى نتائج هذه الدراسة.

أ) كانت درجة الحرارة المثلى فى خليط التفاعل الأنزيمى تعادل ٦٠° م.

ب) أمثل رقم هيدروجينى لعمل الأنزيم المنقى يقع عند (١١) بإستعمال محلول بوركس أيد المنظم.

جـ) سجل الأنزيم المنقى أعلى نشاط بعد فترة تحضين تعادل ٦٢ ساعة.

د) التركيز الأمثل للمادة البروتينية (جيلاتين) يعادل ٠,٥٪.

هـ) أحدث كلا من كلوريد الكالسيوم، ادتا أفضل إستحثاث فى نشاط الأنزيم عند تركيز واحد مل مول يلى ذلك كبريات الماغنسيوم فيما بين ١-٥ مل مول وأخيراً صوديوم دى دوسيل بنزين سلفونات عند تركيز ١ مل مول ولكن أحدث كلوريد الزئبق تأثير مثبط تماماً أفقدت الأنزيم نشاطه عند كل المعاملات بالتركيزات المستعملة والتىتقع ما بين ١ -١٠ مل مول

و) احتفظ الأنزيم المنقى بنشاطة بدرجة كاملة (١٠٠٪) عند درجة حرارة ٦٠° م فى خلال فترة زمينة قدرها (١٨ساعة) ولكن عند ٧٠° وبعد فترة زمنية (١٨ساعة) أستبقى الأنزيم حوالى ٨٥٪ من نشاطه الاصلى ولكن عند ٨٠°م أستبقى الأنزيم حوالى ٥٠٪ من نشاطة بعد فترة زمنية قدرها عشرة دقائق.

ز) لقد أوضحت نتائج تحليل محتوى الأحماض الأمنية للأنزيم المفرزة بواسطة باسيللس أستيروسرموفيلس أنه يحتوى على الأحماض الأمينية التالية : أيسوليوسين، ليوسين، تيروسين، فينيل الأنين، هستادين، ليسين، أرجنين، جليسين.