مجله دنیای میکروب‌ها
سال پنجم، شماره اول و دوم (پیاپی ۱۲) تابستان ۱۳۹۱
صفحات ۳۸-۳۰

Original Article

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم سیالیداز از فلور میکروبی دهان

فرزانه حسینی*[۱]، رویا رضوی‌پور[۲]، المیرا ابراهیمی[۲]

[۱]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، [۲]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم سیالیداز با تجزیه گلیکوپروتئین و گانگلیوزیدهای سطح سلول موجب تغییرات فیزیولوژی سلول و در نتیجه افزایش بیماری‌زایی می‌گردد. امروزه سیالیدازها در میکروارگانیسم‌های مختلفی مانند باکتری‌ها، *پروتوزوآها* و غیره جداسازی شده‌اند. بنابراین یافتن منابع ارزان و در دسترس جهت تولید آنزیم‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری‌های مولد سیالیداز از فلور طبیعی دهان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی – توصیفی بر روی ۹٤ نمونه سواب تهیه شده از دهان افراد مراجعه کننده به واحد دندانپزشکی شهریار انجام شد. برای جداسازی و تعیین هویت باکتری‌ها از محیط کشت‌ها وآزمون‌های اختصاصی استفاده گردید. با استفاده از آزمون حساس فلورومتریک ۲'-(٤-متیل‌آمبلیفریل)- α-DN-استیل نورامینیک اسید به عنوان سوبسترا، باکتری‌های مولد سیالیداز شناسایی شدند. همچنین میزان پایداری آنزیم در pH و دماهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر باکتری‌های جداسازی شده به جنس‌های *استرپتوکوکوس*، *باکتریوئیدس*، *فوزوباکتریوم*، *کاپنوسیتوفاگا* و *اکتینوباسیلوس* تعلق داشتند. *استرپتوکوک‌های* جدا شده با ۹۸٪ تشابه متعلق به گونه‌های *استرپتوکوکوس نمونیه*، *استرپتوکوکوس میوتانس*، *استرپتوکوکوس سانگوئیس*، *استرپتوکوکوس سالیواریوس* و *استرپتوکوکوس ارالیس* بودند. بیشترین فعالیت آنزیم سیالیداز در *استرپتوکوک‌ها* و *باکتریوئیدس‌ها* در pH بهینه ٦ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. همچنین تولید آنزیم به موازات رشد باکتری انجام پذیرفت.

نتیجه گیری: میکروفلور طبیعی دهان افراد سالم حاوی تعداد زیادی از باکتری مولد آنزیم سیالیداز می‌باشد که می‌تواند به عنوان منبعی ارزان و در دسترس در تولید آنزیم در مصارف صنعتی و پزشکی به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: آنزیم سیالیداز، گانگلیوزید، ۲'-(٤-متیل‌آمبلیفریل)-α-DN-استیل نورامینیک اسید

دریافت مقاله: اسفند ۱۳۹۰ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ۱۳۹۱

مقدمه

آنزیم سیالیداز (Sialidase, N- acylneuraminosyl glycohydrolase, EC. 3.2.1.18) یک اگزوگلیکوزیداز است که پیوند آلفا-گلیکوزیدی را در گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها و الیگوساکاریدها هیدرولیز می‌کند. انواع مختلفی از سیالیدازها نقش مهمی در چرخه سیالوگلیکو کانژوگیت در جانوران ایفا می‌کنند. به نحوی که در رشد سلول‌ها تاثیر می‌گذارند (۱). گانگلیوزیدها، گلیکواسفنگولیپیدهای حاوی اسید سیالیک

*)آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۷۲۳٤۷۲٤٤۱ ، پست الکترونیک: hosseinimicrobiology@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

هستند که اغلب به صورت دایم در بافت‌های عصبی و مغزی مشاهده می‌شوند (۲). گانگلیوزیدها موجب تنظیم عملکرد پروتئین‌های غشایی مختلف مانند آنزیم‌ها (۳)، کانال‌های یونی (٤)، گیرنده‌ها (۵) و مولکول‌های اتصال سلولی (٦) می‌گردند. یکی از مهم‌ترین نوع گانگلیوزیدها GM1 می‌باشد که اخیراً به منظور درمان آسیب‌های عصبی ناشی از بیماری‌هایی مانند آلزایمر (۷)، پارکینسون (۸) و آسیب نخاعی (۹) مورد استفاده قرار گرفته است. برای تهیه GM1 می‌توان از آنزیم سیالیداز یا تیمار اسیدی استفاده نمود. اما به کارگیری این روش‌ها به منظور تولید انبوه GM1 ناکافی می‌باشد (۱). سیالیدازها اغلب در میکروارگانیسم‌های موجود در حیوانات میزبان دیده می‌شود و می‌تواند در استقرار، بیماری‌زایی و تغذیه نقش داشته باشند. این آنزیم‌ها پس از حذف اسید سیالیک، گیرنده‌ها را در معرض اتصال باکتریایی قرار می‌دهد و یا به عنوان یک فاکتور منتشره در آلودگی میکروبی دخالت می‌نمایند. برای نمونه آنزیم سیالیداز تولید شده توسط *استرپتوکوکوس نمونیه* می‌تواند با کاهش ویسکوزیته مخاط در انتشار باکتری در بدن دخالت داشته باشد (۱۰). در حال حاضر بیش از ۷۰ نوع آنزیم سیالیداز متفاوت تولید شده است. از میان میکروارگانیسم‌ها، تولید سیالیداز در باکتری‌هایی مانند *ویبریو کلرا*، *کلاستریدیوم پرفرنجنس*، *کورینه‌باکتریوم دیفتریه*، *اریسی‌پلیوتریکس روزوپاتیه* و *استرپتوکوک‌های* گروه A و B مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱ و ۱۲). فلور میکروبی دهان مشخص کننده جمعیتی از میکروارگانیسم‌ها است که در مخاط افراد سالم جایگزین شده‌اند. در سیستم تنفسی فوقانی به ویژه در گلو *استرپتوکوک‌های* غیرهمولیتیک، *استرپتوکوک‌های* آلفا-همولیتیک و *نایسریاها* به عنوان ارگانیسم‌های غالب شناخته شده‌اند. آنزیم سیالیداز از *استرپتوکوک‌های* گروه A و B، *استرپتوکوکوس نمونیه* و نیز برخی از *استرپتوکوک‌های* ویریدانس جدا شده است (۱۳). همچنین اطلاعاتی در مورد تولید سیالیداز در *پروتوزوآها*، *اکتینومیست‌ها* و سویه‌های غیربیماری‌زای *آرتروباکتر* وجود دارد (۱٤). در سال‌های ۱۹۵۹ تا ۱۹٦۱ به منظور سنجش سیالیداز و نیز تعیین اسید سیالیک آزاد روش رنگ سنجی با استفاده از اسید باربیتوریک توسعه پیدا کرد. در این روش برای تعیین خواص سیالیداز از الیگوساکاریدهایی چون N- استیل نور آمینوزیل و لاکتوز استفاده می‌گردد. ابراشو (Abrashev) و دولگروا (Dulguerova) در سال ۲۰۰۱ یک سوبسترای سیالیداز جدید از جنس گلوکوماکرو پپتید معرفی نمودند. این ترکیب نسبت به سایر سوبستراهای مورد استفاده، قدرت ثبات بیشتری داشت و به طور موفقیت آمیزی در تعیین فعالیت سیالیداز *آرتروباکتر نیکوتیان* به کار گرفته شد (۱۰). هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های مولد سیالیداز از فلور طبیعی دهان و نیز شناسایی آنزیم سیالیداز با استفاده از سوبسترای متیل‌آمبلیفریل-α-DN- استیل نورامینیک اسید (MUN) بود.

مواد و روش ها

الف) کشت و جداسازی: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۹٤ نمونه سواب دهان افراد مراجعه کننده به واحد دندانپزشکی شهریار از دی ماه تا بهمن ماه ۱۳۹۰ انجام شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۲٤ ساعت در محیط BHI broth (شرکت دیفکو) در دمای ۳۷°C در شرایط هوازی و بی‌هوازی گرمخانه گذاری شدند.

برای جداسازی گروه *استرپتوکوکوس*، سواب‌های پلاک‌های دندانی نرمال به محیط *استرپتوکوکوس* سلکتیو آگار (شرکت دیفکو) منتقل شدند. به منظور جداسازی *باکتریوئیدس‌ها* و *فوزوباکتریوم‌ها*، نمونه‌ها به مدت ۲ روز در جار بی‌هوازی در محیط فستیدیوس آنئروبیک آگار (Fastidious Anaerobe Agar) در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند. آزمون تخمیر قندها در مورد سویه‌های جدا شده استرپتوکوکی با استفاده از محلول‌های ۱٪ قندهای آرابینوز، گلیسرول، اینولین، لاکتوز، مانیتول، رافینوز، سوربیتول، سوکروز و ترهالوز در محیط نوترینت براث با معرف نوترال رد انجام پذیرفت (۱۵).

به منظور شناسایی *اکتینوباسیلوس‌ها* از آزمون‌های بیوشیمیایی رشد هوازی و بی‌هوازی، محیط مک کانکی آگار، تست اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، احیای نیترات، بتا گالاکتوزیداز (ارتو-

Archive of SID

www.SID.ir

نیتروفنیل–بتا–دی–گالاکتوپیرانوزیداز= ONPG)، فسفاتاز، تولید اسید در محیط تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، تولید اسید از گلوکز، لاکتوز، مانوز، رافینوز، سوکروز، ترهالوز و زایلوز، حرکت، تولید گاز از گلوکز در محیط MRS براث، هیدرولیز اسکولین، تولید اندول، تولید گاز از نیترات، تست ارنیتین دکربوکسیلاز، تولید H_2S در TSI، تولید اسید از سلوبیوز، آرابینوز، اینوزیتول، سالیسین و سوربیتول استفاده شد (۱۶).

برای شناسایی *باکتریوئیدس‌ها* و *فوزوباکتریوم‌ها*، کلنی‌های رشد یافته در کشت ۴۸ ساعته بلاد آگار به محیط‌های باکتریوئیدس–بایل– اسکولین آگار (BBE) و بلاد آگار (حاوی ۵٪ خون گوسفند) منتقل شدند. محیط BBE در جار حاوی گاز پک به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. به منظور جداسازی *باکتریوئیدس* از *فوزوباکتریوم*، پلیت‌های بلاد آگار پس از تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند با دیسک‌های اریترومایسین (۶۰ µg)، کانامایسین (۱ mg)، کلیستین (۱۰ µg) و ریفامپین (۱۵ µg) دیسک گذاری شدند (۱۷).

به منظور جداسازی *کاپنوسیتوفاگا*، از محیط بلاد آگار حاوی باسیتراسین، پلی‌میکسین B، وانکومایسین و تریمتوپریم در جار هوازی ۳۷°C به همراه ۵٪ CO_2 استفاده گردید. همچنین برای تعیین هویت آن‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز، اندول، هیدرولیز اسکولین، تجزیه نشاسته، هیدرولیز ژلاتین (۷ تا ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه)، اوره و تولید H_2S استفاده شد. همچنین برای جداسازی گروه‌های *استرپتوکوکوس ویریدانس* از *استرپتوکوکوس نمونیه* از آزمون‌های حلالیت در صفرا، تخمیر اینولین، حساسیت به اپتوچین و تست تورم کپسولی (Quellung) استفاده گردید (۱۸). از سویه‌های باکتریوئیدس *اساکارولیتیکوس* (*Bacteroides asaccharolyticus* ATCC25260)، *اکتینوباسیلوس اکتینومیستم‌کومیتانس* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC33384)، *کاپنوسیتوفاگا جینجیوالیس* (*Capnocytophaga gingivalis* ATCC33624) و *استرپتوکوکوس ارالیس* (*Streptococcus oralis* AR3) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

ب) سنجش فعالیت آنزیم: برای این منظور سوسپانسیونی از سلول‌های باکتری جدا شده از میکروفلور دهان و نیز سویه‌های استاندارد در آب مقطر (معادل جذب نوری ۲۰۰) تهیه و تا زمان انجام آزمایش بر روی یخ نگه داری شدند. برای ارزیابی اسید سیالیک آزاد شده ابتدا محلولی از '۲–(۴–متیل‌آمبلیفریل)–α–DN–استیل نورامینیک اسید (MUN) شرکت سیگما در آب مقطر با غلظت ۱۱۰ میکرومول در میلی لیتر تهیه و به صورت یخ زده در حجم ۱۸۰ µl نگهداری گردید. سپس محلول یاد شده دوباره به حالت مایع درآورده شد و با ۲۰ میکرولیتر بافر TES یک مولار مخلوط گردید. کاغذهای صافی لکه گذاری شده، در محلول به دست آمده غوطه ور و در پتری دیش پلاستیکی نگهداری شدند.

ارگانیسم‌های کاپنوفیلیک پس از گذشت ۴۸ تا ۹۶ ساعت از کشت و بی‌هوازی‌ها پس از ۷۲ تا ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور یک یا دو کلنی باکتری جداسازی و پس از قرارگیری بر روی کاغذ صافی در دمای ۳۷°C گرم‌خانه گذاری شدند. کاغذهای علامت گذاری شده پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در زیر لامپ با طول موج ۳۶۵ نانومتر، مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم سیالیداز به صورت یک لکه آبی فلوئورسنت مشاهده گردید.

ج) تعیین فعالیت آنزیم: یک واحد فعالیت آنزیم (U) معادل مقدار آنزیمی درنظر گرفته شد که بتواند ۱ گرم N– استیل نورامینیک اسید را در مدت زمان ۱ دقیقه در شرایط استاندارد از گلیکوماکروپپتید (سوبسترا) آزاد نماید (۱۴). سویه‌های برتر

جدول ۱: باکتری‌های شناسایی شده از دهان افراد مورد پژوهش.

باکتری جدا شده	تعداد سویه
استرپتوکوکوس میوتانس	۴۶ (٪۵۱/۱۱)
استرپتوکوکوس‌های غیر میوتانس	۱۴ (٪۱۵/۵۶)
باکتروئیدس	۱۲ (٪۱۳/۳۳)
فوزوباکتریوم	۵ (٪۵/۵۶)
اکتینوباسیلوس	۳ (٪۳/۳۳)
کاپنوسیتوفاگا	۱۰ (٪۱۱/۱۱)
جمع	۹۰ (٪۱۰۰)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: آزمون‌های بیوشیمیایی تعیین هویت *استرپتوکوک‌ها* (۲۰).

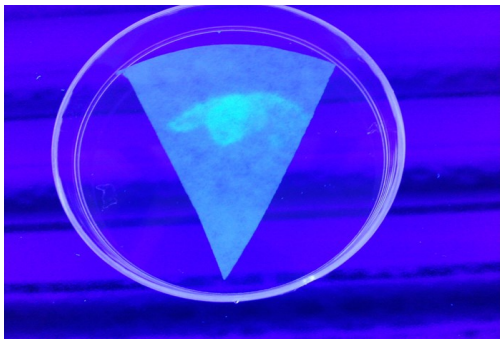
گونه	Tre	Sbl	Man	Esc	Inl	Arg	VP	Raf	Opt
استرپتوکوکوس ارالیس	+	−	+	V	−	+	+	−	−
استرپتوکوکوس میوتانس	+	+	+	+	+	−	+	+	−
استرپتوکوکوس سالیواریس	V	−	−	+	−	−	+	−	−
استرپتوکوکوس سانگوئیس	+	−	−	+	V	+	−	−	−

Opt: اپتوچین، Raf: رافینوز، VP: وگس-پروسکر، Arg: آرژنین، Inl: اینولین، Esc: اسکولین، Man: مانوز، Sbl: سوربیتول، Tre: ترهالوز

مولد آنزیم انتخاب گردید و در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع BHI در شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه گذاری شدند. پس از ۲٤ ساعت، سلول‌ها از محیط کشت مایع توسط سانتریفوژ (۸۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه) جداسازی و فعالیت ویژه آنزیم (تعداد مول‌های آزاد شده ٤-متیل آمبلیفرون) بر حسب نانومول MUN هیدرولیز شده در میلی گرم پروتئین در دقیقه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. همچنین میزان پروتئین باکتریایی در محیط کشت مایع نیز با استفاده از روش لوری تعیین گردید (۱۹). همچنین پایداری فعالیت آنزیم تولید شده در محیط‌های کشت مایع در دماهای ۲۰ تا ٦۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۳ تا ۸ در بافر سیترات فسفات ۲۰۰ mM ارزیابی گردید.

نتایج

با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی مشخص گردید که ٦۳٪ (٦۰ مورد) از سویه‌های جداسازی شده از دهان متعلق به گروه



شکل ۱: آزمون غربالگری آنزیم سیالیداز با سوبسترای MUN بر روی کاغذ صافی.

استرپتوکوک‌ها و ۳٦٪ (۳٤ مورد) باقیمانده به گروه غیراسترپتوکوکی تعلق داشتند. همچنین ٤٦ سویه (۷٦٪) از ٦۰ سویه جداسازی شده به عنوان *استرپتوکوکوس میوتانس* شناسایی شدند (جدول ۱). سپس گونه‌های *استرپتوکوکوس‌های* شناسایی شده بر اساس جداول کتاب برگی (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*) تعیین هویت شدند (جدول ۲).

پس از جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی، آزمون غربال‌گری آنزیم سیالیداز به کمک سوبسترای MUN بر روی گونه‌های *استرپتوکوکوس* و سایر گروه‌های بیماری‌زای باکتریایی انجام شد (شکل ۱).

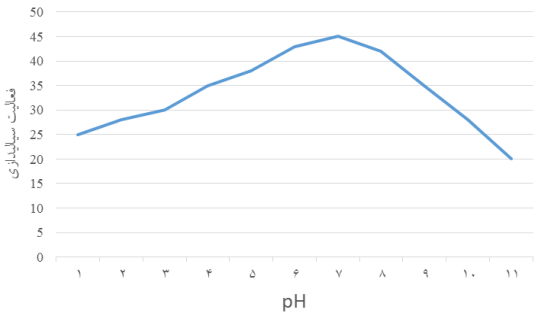
ارزیابی میزان پایداری فعالیت آنزیم سیالیداز در pH و دماهای مختلف مشخص نمود که بالاترین فعالیت در دمای ۳۵°C و pH ٦/٤ می‌باشد. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که pH بافر انکوباسیون تأثیر کمی بر فعالیت آنزیم سیالیداز دارد و حداکثر دامنه pH بین ۷/۵ تا ٤/٦ می‌باشد (شکل ۲). اما فعالیت مشخص آنزیم تنها در محدوده دمایی ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

نتایج حاصل از سنجش غربالگری در مورد سویه‌های جدا شده و کنترل نشان داد که هر دو سویه به طور مشابه دارای فعالیت سیالیداز می‌باشند. در سایر *استرپتوکوک‌ها* حتی با گرم‌خانه گذاری طولانی مدت تا ۷۲ ساعت نیز هیچ گونه فعالیت سیالیدازی را نشان ندادند.

در این مطالعه با افزایش زمان انکوباسیون تا ۲۰ دقیقه بر میزان فعالیت آنزیم تولیدی توسط سویه *استرپتوکوکوس*

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: تغییرات میزان فعالیت آنزیم سیالیداز بر اساس pH محیط.

ارالیس افزوده شد، اما پس از گذشت ٤٠ دقیقه میزان رهایی MUN کاهش یافت. مطالعه منحنی رشد باکتری‌های مولد نشان داد که میزان رشد موازی با میزان فعالیت آنزیم می‌باشد. همچنین فعالیت آنزیم سیالیداز در محیط بی‌هوازی ۵ برابر بیشتر از شرایط هوازی بود. نتایج حاصل از ارزیابی آنزیم نشان دادند که علاوه بر *استرپتوکوک‌ها*، *باکتریوئیدس جینجیوالیس* و گونه‌های *اکتینوباسیلوس*، *فوزوباکتریوم* و *کاپنوسیتوفاگا* نیز دارای فعالیت سیالیدازی می‌باشند (جدول ۳). به طور خلاصه، فعالیت سیالیداز در ۸۲٪ از گونه‌های *باکتریوئیدس* مشاهده گردید اما در *فوزوباکتریوم‌ها* مشاهده نگردید.

بحث

تهیه آنزیم از منابع ارزان و در دسترس همواره مورد توجه محققان بوده است. گانگلیوزیدها با عملکردهای متفاوت در غشاهای پروتئینی، کانال‌های یونی، گیرنده‌ها و مولکول‌های اتصالی سلولی یافت می‌شوند. به منظور تهیه GM1 از پلی‌سیالوگانگلیوزیدها، می‌توان از سیالیدازهای سنتزی استفاده نمود. امروزه از این آنزیم‌های تجاری در تهیه سوبستراها، گلیکوپروتئین‌ها و نیز در جراحی‌های چشم و مغز و اعصاب بهره می‌گیرند (۲۱). همچنین از این آنزیم در صنعت داروسازی به منظور تهیه آنتی‌ویروس آنفلوانزا براساس حذف رسپتور ویروس در سلول‌های پذیرنده استفاده می‌گردد (۲۲).

مطالعات نشان داده است که آنزیم سیالیداز به وسیله میکروارگانیسم‌هایی تولید می‌گردد که ارتباط نزدیکی با میزبان حیوانی دارند و می‌توانند به عنوان عامل مهمی در تهاجم و استقرار به شمار آیند (۱۰، ۱۱، ١٤ و ۲۳). *استرپتوکوک‌های* ویریدانس را اغلب از آبسه‌های مغزی، شکمی و توراکس جدا نموده‌اند (٢٤). *باکتریوئیدس فراجیلیس* (*B. fragilis*) به شکل باسیل گرم منفی بی‌هوازی، اغلب در آبسه‌های داخلی شکم و سایر عفونت‌های مهم بالینی وجود دارد. در حالی که اشکال دیگر گروه *باکتریوئیدس فراجیلیس* کم‌تر در عفونت‌های بالینی دیده می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده است که تغییرات القا شده توسط آنزیم سیالیداز در چندین گلیکوپروتئین در شرایط درون تن و برون تن در چرک یافت شده است. نتایج به دست آمده از

جدول ۳: نتایج فعالیت آنزیم سیالیداز در سویه‌های استرپتوکوکی و غیراسترپتوکوکی جدا شده از دهان.

گونه	تعداد جدایه ها	درصد سویه‌های مثبت	غلظت پروتئین (mg/ml)	فعالیت ویژه*
استرپتوکوکوس میوتانس	٤٦	٪۰	٤/۲۳	–
استرپتوکوکوس ارالیس	٤	٪۱۰۰	۳/۵۹	۲/۱
استرپتوکوکوس بویس	۱	٪۰	۲/۳۳	–
استرپتوکوکوس سانگوئیس	۲	٪۰	۲/۳٤	–
استرپتوکوکوس سالیواریوس	۲	٪۰	۳/۱۲	–
استرپتوکوکوس نمونیه	۵	٪۱۰۰	۳/۰۳	۱۳/٤
باکتریوئیدس	٦	٪۱۰۰	٤/۵٦	١٤/٤
فوزوباکتریوم	۵	٪۰	۵/۲۲	–
اکتینوباسیلوس	۳	٪۸۰	۷/۲۹	۰/٤۵
کاپنوسیتوفاگا	۱۰	٪۱۰۰	۲/٦۵	۰/۰۸۷

*تعداد مول‌های آزاد شده ٤-متیل آمبلیفرون بر حسب نانومول MUN هیدرولیز شده در میلی گرم پروتئین در دقیقه.

Archive of SID

www.SID.ir

سایر مطالعات نشان می‌دهد که میزان فعالیت سیالیداز در *باکتریوئیدس‌های* جدا شده از نمونه‌های پاتولوژیک، به طور چشمگیری بیشتر از نمونه‌های غیرپاتولوژیک بوده است (۲۵). همچنین مشخص شده است که این آنزیم می‌تواند فاکتورهای حفاظتی میزبان و یا سایر ترکیبات را به اجزای تغذیه‌ای تبدیل کند و نیز پروتئین‌های خاصی را در میزبان تغییر دهد (۱۰).

بهترین نتایج تولید آنزیم در این بررسی در محیط BHI به‌دست آمد. این محیط حاوی گلیکوپروتئین‌ها و سایر کربوهیدرات‌هایی است که باعث القای تولید آنزیم می‌شوند (۲۷و ۲۶). مشاهدات به دست آمده نشان دادند که تولید آنزیم در *استرپتوکوک‌ها* و *باکتریوئیدس‌ها* هم زمان با رشد لگاریتمی است، اما در مورد سایر باکتری‌ها مانند *ویبریو کلرا* حداکثر میزان تولید در فاز سکون رشد می‌باشد (۲۸و۲۷).

در مطالعه حاضر به منظور سنجش فعالیت آنزیم سیالیداز از بافر TES با pH ٦ استفاده گردید که نتایج سریع و روشنی را به همراه داشت و با نتایج به دست آمده در سایر بررسی‌ها مشابه بود (۱۰، ۱۳ و ٢٤). آنزیم سیالیداز تولید شده توسط *سودوموناس آئروجینوزا* (*P. aeruginosa*) بیشترین فعالیت خود را در pH حدود ٦/٤ نشان می‌دهد و حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد از انواع این آنزیم در pH برابر ۷ در فسفات بافر فعال می‌باشند (۲۹). طبق گزارشی سیالیداز تولید شده توسط *کلاستریدیوم چاوویی* (*Clostridium chauvoei*) در دمای ٤٥°C تا ٥٥°C فعال بوده است (۳۰). پایداری سیالیداز *سودوموناس آئروجینوزا* تا حدود ٥/٦ گزارش شده است (۲۹). در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم تولید شده توسط *استرپتوکوک‌ها* محدود به دمای ۳۵ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد بود و در دمای ٦٠ حداقل میزان فعالیت مشاهده گردید.

در تحقیق جاری جنس‌های *استرپتوکوکوس*، *باکتریوئیدس*، *اکتینوباسیلوس* و *کاپنوسیتوفاگا* از دهان افراد مبتلا به عفونت‌های لثه و دندان جداسازی و شناسایی شدند که قابلیت تولید آنزیم با سوبسترای فلوئورسنت MUN را داشتند. تحقیقات نشان دادند که MUN سوبسترای حساس و مناسبی به منظور شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم سیالیداز می‌باشد (۱۳، ۱۷ و ٢٤). مطالعه حاضر روش ساده‌ای برای نشان دادن فعالیت سیالیداز ارائه می‌دهد که می‌تواند در غربال‌گری تعداد زیاد نمونه‌ها به کار گرفته شود. اما استفاده از سوبسترای MUN در مورد گونه‌های *فوزوباکتریوم* به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

پوتیر (Putier) و همکارانش در سال ۱۹۷۹، اندازه گیری سیالیداز باکتریایی را از طریق سنجش حساسیت و سرعت MUN را معرفی نمودند (۳۱). با استفاده از سوبسترای یاد شده بدون نیاز به روش‌های پر زحمت شیمیایی و رادیوشیمیایی که قبلاً به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گرفت، جدا کردن تولیدات سیالیداز به سرعت امکان‌پذیر گردید. سنجش فلوئورسنت حساس‌ترین و تخصصی‌ترین روش کشف فعالیت سیالیداز می‌باشد که تاکنون در دسترس قرار گرفته است (۲۹). کاربرد روش‌های آنالیزی مانند کروماتوگرافی گازی از محصولات متابولیک، نیز ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های مولد را تایید می‌کند (۳۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که قدرت تولید آنزیم در برخی از میکروارگانیسم‌ها مانند *استرپتوکوک‌ها* و *باکتریوئیدس‌ها*، پس از کشت دوم و متوالی از دست می‌رود و یا به شدت کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد این آنزیم در ادامه حیات آن‌ها نقش دارد. این مساله در سایر مطالعات مشاهده و گزارش نشده است. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد که حتی ارگانیسم‌هایی که به مدت طولانی برای بیشتر از ۳ ماه کشت داده شده‌اند، همچنان در تست نقطه‌ای سیالیداز واکنش‌های مثبت را نشان می‌دهند (۳۳). بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیم در این بررسی در *باکتریوئیدس‌ها* مشاهده گردید که در مقایسه با فعالیت آنزیمی در *استرپتوکوک‌ها* قابل توجه می‌باشد. بایرز (Byers) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ میزان فعالیت ویژه آنزیم تخلیص نشده *استرپتوکوکوس ارالیس* را ۰/۰۸ nmol/min/mg گزارش نمودند که حدود نصف میزان فعالیت آنزیم حاصل در بررسی جاری است (۱۳). استراس (Straus) و همکارش میزان فعالیت آنزیم جدا شده از *استرپتوکوکوس سانگوییس* را ۱۷٤/٤ mumol/mg اعلام نمودند (۳٤). در دیگر مطالعات مشابه مقادیر متفاوتی در مورد فعالیت آنزیم‌ها گزارش شده است (۳۵و۳٦).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که میکروفلور دهان فعالیت قابل توجه آنزیم سیالیداز را دارد. زنجیرهای قندی می‌توانند با فعالیت هضم خارج سلولی آنزیم‌های گلیکوزیدازی تولیدی شکسته شوند و منبع کربوهیدراتی قابل تخمیر وسیعی را ایجاد و در دسترس سایر باکتری‌ها قرار دهند. آنزیم سیالیداز جدا شده در این بررسی توانایی فعالیت در محدوده وسیعی از pH را داشت و بدون سوبسترای اختصاصی در شرایط هوازی و بی‌هوازی تولید می‌شد. با توجه به تولید و پایداری قابل توجه آنزیم سیالیداز، به نظر می‌رسد که کاربرد آن می‌تواند در راهبردهای درمانی بدون آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی و پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Abrashev I, Dulguerova G, Dolashka-Angelova P, Voelter W. Purification and Characterization of a Novel Sialidase from a Strain of *Arthrobacter nicotianae*. J Biochem. 2005; 137(3): 365-371.
2. Ledeen RW. Biosynthesis, metabolism, and biological effects of gangliosides, *In* R. U. Margolis and R. K. Margolis. Neurobiology of glycoconjugates. Plenum Press: New York; 1989; 43-83.
3. Partington CR, Daly JW. Effect of gangliosides on adenylate cyclase activity in rat cerebral cortical membranes. Mol Pharmacol. 1979; 15(3): 484-491.
4. Frieder B, Rapport MM. The effect of antibodies to gangliosides on Ca^{2+} channel-linked release of g-aminobutyric acid in rat brain slices. J Neurochem. 1987; 48(4): 1048-1052.
5. Nojiri H, Stroud M, Hakomori S. A specific type of ganglioside as a modulator of insulin-dependent cell growth and insulin receptor tyrosine kinase activity. J Biol Chem. 1991; 266(7): 4531-4537.
6. Zheng M, Fang H, Tsuruoka T, Tuji T, Sasaki T, Hakomori S. Regulatory role of GM3 ganglioside in a5b1 integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells. J Biol Chem. 1993; 268: 2217-2222.
7. Svennerholm L. Gangliosides. A new therapeutic agent against stroke and Alzheimer's disease. Life Sci. 1994; 55(25-26): 2125-2134.
8. Schneider JS, Roeltgen DP, Rothblat DS, Chapas-Crilly J, Seraydarian L, Rao J. GM1 ganglioside treatment of Parkinson's disease: an open pilot study of safety and efficacy. Neurology. 1996; 45(6): 1149-1154.
9. Argentino C, Sacchetti LM, Toni D, Savoini G, D'Arcangelo E, Erminio F, Federico F. GM1 ganglioside therapy in acute ischemic stroke. Stroke. 1989; 20(9): 1143-149.
10. Abrashev I, Dulguerova G. Neuraminidases (Sialidases) from bacterial origin. Exp Pathol Parasitol. 2001; 4: 35-40.
11. Burnet F, Stone J. The receptor destroying enzyme of *Vibro viridia*. Aust J Exp Biol Med Sci. 1974; 25: 219-247.
12. Abrashev I, Kourteva J, Nikolkov P, Velcheva P. Comparative studies on the action of neuraminidase from *Erysipelothrix rhusiopathiae* on various substrates. Compt Rend Acad Bulg Sci. 1981; 34: 575-577.
13. Byers H L, Tarelli E, Homer KA, Beighton D. Isolation and characterisation of sialidase from a strain of *Streptococcus oralis*. J Med Microbiol. 2000; 49(3): 235-244.
14. Saito M, Sugano K, Nagai Y. Action of *Arthrobacter ureafaciens* sialidase on sialoglycolipid substrates. J Biologic Chemist. 1979; 254(16): 7645-7664.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Beighton D, Hardie JM, Whiley RA. A scheme for the identification of viridians *streptococci*. J Med Microbiol. 1991; 35(6): 367-372.
16. Lo TM, Ward CK, Inzana TJ. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 5* by multiplex polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1998; 36(6): 1704-1710.
17. Newman MG, Sutter VL, Pickett MJ, Blachman U, Greenwood JR, Grinenko V. Detection, identification, and comparison of *Capnocytophaga*, *Bacteroides ochraceus*, and DF-1. J Clin Microbiol. 1979; 10(4): 557-562.
18. Patterson MJ,. "*Streptococcus*". Baron's Medical Microbiology (Baron S *et al.*, eds.) 4th ed. Univ of Texas Medical Branch; 2005.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Boil Chem. 1951; 193: 265-275.
20. Centers for Disease Control and preventation, Identification of other *Streptococcus* Species: *Streptococcus* General Methods. Content source: National Center for Immunization and Respiratory Diseases, 2006.
21. Arab MR, Talai Khouzani T, Fazel A. Study of cell surface and extracellular matrix sugars changes during lens development. Razi J Med Sci. 2001; 8(26): 450-455. [In Persian]
22. Suzuki T, Takahashi T, Nishinaka D, Murakami M, Fujii S, Hidari KI, Miyamoto D, Li YT, Suzuki Y. Inhibition of infuenza A virus sialidase activity by sulfatide. FEBS Lett. 2003; 553(3) : 355-359.
23. Corfield T. Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. Glycobiology 1992; 2(6): 509-521.
24. Beighton D, Hardie JM, Whiley RA. Sialidase activity of the "*Streptococcus milleri* group" and other viridans group *Streptococci*. J Clin Microbiol. 1990; 28(6): 1431-1433.
25. Briselden AM, Moncla BJ, Stevenes CE, Hillier SL. Sialidases (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora. J Clin Microbial. 1992; 30(3): 663-666 .
26. Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SM. Diversity of microbial sialic acid metabolism. Microbiol Mol Biol Rev. 2004; 68(1): 132-153.
27. Fraser AG, Brown R. Neuraminidase production by *Bacteroidaceae*. J Med Microbiol 1981; 14(1): 63-76.
28. Takafumi M, Barksdale L. Neuraminidase of *Corynebacterium diphtheriae*. J Bacteriol. 1967; 94(5): 1565–1581.
29. Ghazaei C, Ahmadi M, Hosseini Jazani N. Optimization and comparative characterization of neuraminidase activities from *Pseudomonas aeruginosa* with *Klebsiella pneumoniae*, Hep-2 cell, sheep kidney and rat liver lysosome. Iran J Microbiol. 2010; 2 (1): 33-40.
30. Useh NM, Ajanusi JO, Esievo KAN, Nok AJ. Characterization of a sialidase (neuraminidase) isolated from *Clostridium chauvoei* (Jakari strain). Cell Biochem Funct. 2006; 24(4): 347-352.
31. Potier M, Mameli L, Belisle M, Dailaire L, Melancon SB. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-α-D-*N*-acetylneuraminate) substrate. Anal Biochem. 1979; 94(2): 287-296.
32. Taylor G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. Cur Opin Struct Biol. 1996; 6(6): 830-837.
33. Hyano S, Tanaka A. Sialidase-like enzymes produced by group A, B, C, G, and L *streptococci* and by *Streptococcus sanguis*. J Bacteriol. 1969; 97(3): 1328-1333.
34. Straus DC, Portnoy-Duran C. Neuraminidase production by a *Streptococcus sanguis* strain associated with subacute bacterial endocarditis. Infect Immun. 1983; 41(2): 507-15.
35. Cuatrecasas P, Illiano G. Purification of neuraminidases from *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* and influenza virus by affinity chromatography. Biochem Biophys Res Commun 1971; 44(1): 178-184.
36. Fukano Y, Ito M. Preparation of GM1 ganglioside with sialidase-producing marine bacteria as a microbial biocatalyst. Appl Environ Microbiol. 1997; 63(5): 1861-1865.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 5, No. 1&2, June 2012

Original Article

Isolation and identification of producing sialidase enzyme bacteria isolated from normal microflora of mouth

Farzaneh Hosseini[1], Rouya Razavipour[2], Elmira Ebrahimi[2]

[1]Assistant Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]M.Sc., Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives: Production of Sialidase by oral microbial flora leads to degradation of glycoproteins and gangliosides on the surfaces of the cells, leading to cell physiologic changes and increase oral diseases. This enzyme can be isolated from various microorganisms including bacteria, protozoa and etc. This study was aimed to isolate sialidase producing bacteria from normal flora of mouth.

Material and Methods: This cross-sectional descriptive study conducted on 94 mouth swab samples of individuals who visited by dentists in the Shahryar dental clinic. Isolation and identification of bacteria was performed by specific assays and culture media. Sialidase producing bacteria were identified by sensitive fluorometric assay and using 2′-(4-methylumbelliferyl) α-D-N acetylneuraminic acid as substrate. Activity and stability of enzyme was studied in different condition of pH and temperature.

Results: In this study, isolated bacteria belonged to *Streptococcus*, *Bacterioedes*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga* and *Actinobacilus*. Isolated *Streptococcus* strains were showed 98% homology with *S. pneumonia, S. mutans, S. sanguis, S. salivarius* and *S. oralis* species. The higher enzyme activity was observed in *Streptococcus* and *Bacterioedes* in optimum pH 6 and 35ºC. Also, enzyme production was accomplished parallel with growth of bacteria.

Conclusion: Mouth normal flora of healthy individuals contain several sialidase producing bacteria which could use as cheap and available source of this enzyme for medical and industrial application.

Keywords: Sialidase Enzyme, Gangliosides, MUN

Correspondance to: Farzaneh Hosseini
Tel: +989123472441
E-mail: hosseinimicrobiology@gmail.com
Journal of Microbial World 2012, 5(1&2): 30-38.

Archive of SID

www.SID.ir