



جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم سیالیداز از فلور میکروبی دهان

فرزانه حسینی^{۱*}، رویا رضوی پور^۲، المیرا ابراهیمی^۲

^۱استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، آکارشناس 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 ۹۴ نمونه سواب تهیه شده از دهان افراد مراجعه کننده به واحد دندانپزشکی شهریار انجام شد. برای جداسازی و تعیین هویت باکتری‌ها از محیط کشت‌ها و آزمون‌های اختصاصی استفاده گردید. با استفاده از آزمون حساس فلورومتريک ۲'-(۴-متیل‌آمبلیفریل)-DN- α -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 ۶ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. همچنین تولید آنزیم به موازات رشد باکتری انجام پذیرفت.

نتیجه‌گیری: 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'-(۴-متیل‌آمبلیفریل)-DN- α -استیل نورامینیک اسید

پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ۱۳۹۱

دریافت مقاله: اسفند ۱۳۹۰

مقدمه

گلیکوزیدی را در گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها و الگوساکاریدها هیدرولیز می‌کند. انواع مختلفی از سیالیدازها نقش مهمی در چرخه سیالوگلیکو کائزوگیت در جانوران ایفا می‌کنند. به نحوی که در رشد سلول‌ها تاثیر می‌گذارند (۱). گانگلیوزیدها، گلیکواسفنگولیپیدهای حاوی اسید سیالیک

آنزیم سیالیداز (Sialidase, N- acylneuraminosyl glycohydrolase, EC. 3.2.1.18) یک آگروگلیکوزیداز است که پیوند آلفا-

*آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۷۲۳۴۷۲۴۴۱، پست الکترونیک: hosseinimicrobiology@gmail.com

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 (Abrashov) و دولگرووا (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 روش‌ها

الف) کشت و جداسازی: این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی بر روی ۹۴ 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 ۲۴ ساعت در محیط BHI broth (شرکت دیفکو) در دمای 37°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 آنروویک آگار (Fastidious Anaerobe Agar) در دمای 37°C گرم‌خانه گذاری شدند. آزمون تخمیر قندها در مورد سوبه‌های جدا شده استرپتوکوکی با استفاده از محلول‌های ۱٪ قندهای آرابینوز، گلیسرول، اینولین، لاکتوز، مانیتول، رافینوز، سوربیتول، سوکروز و تره‌هالوز در محیط نوترینت برات 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 نترات، بتا گالاکتوزیداز (ارتو-

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 (۴)، گیرنده‌ها (۵) و مولکول‌های اتصال سلولی (۶) 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 میکروارگانسیم‌های 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 میکروارگانسیم‌ها، 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 میکروارگانسیم‌ها 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 ارگانسیم‌های 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 سوبه‌های غیربیماری‌زای آرتروباکتر وجود دارد (۱۴). در سال‌های ۱۹۵۹ تا ۱۹۶۱ به منظور سنجش سیالیداز و نیز تعیین اسید سیالیک

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)-DN- α -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 μ l 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.

ارگانسیم‌های 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 فلوروسنت مشاهده گردید.

ج) تعیین فعالیت آنزیم: یک واحد فعالیت آنزیم (U) معادل مقدار آنزیمی در نظر 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.

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

نیتروفیل-بتا-دی-گالاکتوپیرانوزیداز (ONPG)، فسفاتاز، تولید اسید در محیط تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، تولید اسید از گلوکز، لاکتوز، مانوز، رافینوز، سوکروز، تره‌هالوز و زایلوز، حرکت، تولید گاز از گلوکز در محیط MRS براث، هیدرولیز اسکولین، تولید اندول، تولید گاز از نترات، تست ارنیتین دکربوکسیلاز، تولید H₂S 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 ۰.۵٪ 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 اریترومايسين (۶۰ μ g)، کانامایسین (۱ mg)، کلیستین (۱۰ μ g) و ریفامپین (۱۵ μ g) دیسک گذاری شدند (۱۷).

به منظور جداسازی کاپنوسیتوفاگا، از محیط بلاد آگار حاوی باستیراسین، پلی میکسین B، وانکومايسين و تریمتوپریم در جار هوای ۳۷°C به همراه ۰.۵٪ CO₂ 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 H₂S استفاده شد. همچنین برای جداسازی گروه‌های استرپتوکوکوس ویریدانس از استرپتوکوکوس نمونه 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 اکتینومیسستم‌کومیتانس (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC33384)، کاپنوسیتوفاگا جینجیوالیس (*Capnocytophaga gingivalis* ATCC33624) و استرپتوکوکوس ارایس (*Streptococcus oralis* AR3) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

ب) سنجش فعالیت آنزیم: برای این منظور سوسپانسیونی از

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

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

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

استرپتوکوک‌ها و ۳۶٪ (۳۴ مورد) باقیمانده به گروه غیراسترپتوکوکی تعلق داشتند. همچنین ۶۶ سویه (۷۶٪) از ۶۰ سویه جداسازی شده به عنوان استرپتوکوکوس میوتانس شناسایی شدند (جدول ۱). سپس گونه‌های استرپتوکوکوس‌های شناسایی شده بر اساس جداول کتاب برگگی (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*) تعیین هویت شدند (جدول ۲).

پس از جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی، آزمون غربالگری آنزیم سیالیداز به کمک سوسترای 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 ۶/۴ 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 ۴/۶ می‌باشد (شکل ۲). اما فعالیت مشخص آنزیم تنها در محدوده دمایی ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

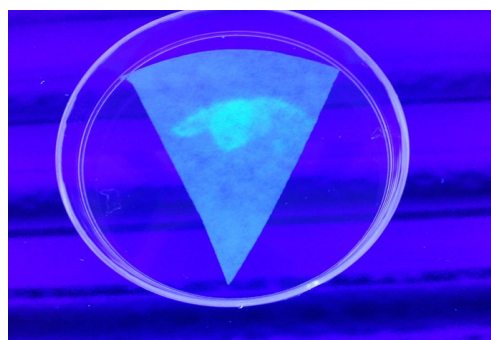
نتایج حاصل از سنجش غربالگری در مورد سویه‌های جدا شده و کنترل نشان داد که هر دو سویه به طور مشابه دارای فعالیت سیالیداز می‌باشند. در سایر استرپتوکوک‌ها حتی با گرم‌خانه‌گذاری طولانی مدت تا ۷۲ ساعت نیز هیچ گونه فعالیت سیالیدازی را نشان ندادند.

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

مولد آنزیم انتخاب گردید و در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع BHI در شرایط بی‌هوای گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها از محیط کشت مایع توسط سانتریفیوژ (۸۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه) جداسازی و فعالیت ویژه آنزیم (تعداد مول‌های آزاد شده ۴-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 ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۳ تا ۸ در بافر سترات فسفات ۲۰۰ mM ارزیابی گردید.

نتایج

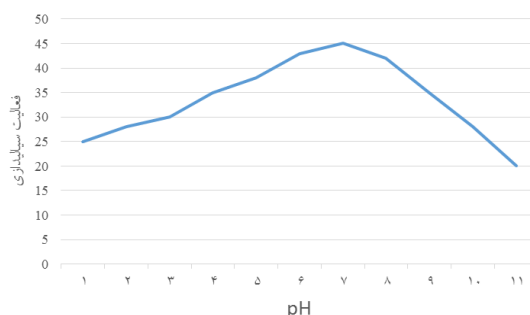
با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی مشخص گردید که ۶۳٪ (۶۰ مورد) از سویه‌های جداسازی شده از دهان متعلق به گروه



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

محققان بوده است. گانگلیوزیدها با عملکردهای متفاوت در غشاهای پروتئینی، کانال‌های یونی، گیرنده‌ها و مولکول‌های اتصال سلولی یافت می‌شوند. به منظور تهیه GM1 از پلی‌سیالوگانگلیوزیدها، می‌توان از سیالیدازهای سنتزی استفاده نمود. امروزه از این آنزیم‌های تجاری در تهیه سوسترها، 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 میکروارگانسیم‌هایی تولید می‌گردد که ارتباط نزدیکی با میزبان حیوانی دارند و می‌توانند به عنوان عامل مهمی در تهاجم و استقرار به شمار آیند (۱۰، ۱۱، ۱۴ و ۲۳). *استرپتوکوک‌های* ویریدانس را اغلب از آبسه‌های مغزی، شکمی و توراکس جدا نموده‌اند (۲۴). *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



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

ارالیس افزوده شد، اما پس از گذشت ۴۰ 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 *کاپنوسیتوفاکا* 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

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

گونه	تعداد جدایه‌ها	درصد سویه‌های مثبت	غلظت پروتئین (mg/ml)	فعالیت ویژه*
<i>استرپتوکوکوس میوتانس</i>	۴۶	٪۰	۴/۲۳	-
<i>استرپتوکوکوس ارالیس</i>	۴	٪۱۰۰	۳/۵۹	۲/۱
<i>استرپتوکوکوس یویس</i>	۱	٪۰	۲/۳۳	-
<i>استرپتوکوکوس سانگوئیس</i>	۲	٪۰	۲/۳۴	-
<i>استرپتوکوکوس سالیواریوس</i>	۲	٪۰	۳/۱۲	-
<i>استرپتوکوکوس نمونیه</i>	۵	٪۱۰۰	۳/۰۳	۱۳/۴
<i>باکتریوئیدس</i>	۶	٪۱۰۰	۴/۵۶	۱۴/۴
<i>فوزوباکتریوم</i>	۵	٪۰	۵/۲۲	-
<i>اکتینوباسیلوس</i>	۳	٪۸۰	۷/۲۹	۰/۴۵
<i>کاپنوسیتوفاکا</i>	۱۰	٪۱۰۰	۲/۶۵	۰/۰۸۷

*تعداد مول‌های آزاد شده ۴-متیل آمبلیفرون بر حسب نانومول MUN هیدرولیز شده در میلی گرم پروتئین در دقیقه.

۱۷ و ۲۴). 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، اندازه‌گیری 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 میکروارگانسیم‌های مولد را تایید می‌کند (۳۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که قدرت تولید آنزیم در برخی از میکروارگانسیم‌ها 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 ارگانسیم‌هایی 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 اریلیس* 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 سانگوییسی* را ۱۷۴/۴ mumol/mg اعلام نمودند (۳۴). در دیگر مطالعات مشابه مقادیر متفاوتی در مورد فعالیت آنزیم‌ها گزارش شده است (۳۵ و ۳۶).

سایر مطالعات نشان می‌دهد که میزان فعالیت سیالیداز در *باکتریوئیدس‌ها* 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 به دست آمد. این محیط حاوی گلیکوپروتئین‌ها و سایر کربوهیدرات‌هایی است که باعث القای تولید آنزیم می‌شوند (۲۷ و 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 (۲۸ و ۲۷).

در مطالعه حاضر به منظور سنجش فعالیت آنزیم سیالیداز از بافر TES با pH ۶ 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 ۲۴). آنزیم سیالیداز تولید شده توسط *سودوموناس آئروجینوزا (P. aeruginosa)* بیشترین فعالیت خود را در pH حدود ۶/۴ 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 چاویویی (Clostridium chauvoei)* در دمای ۴°C تا ۵۵°C فعال بوده است (۳۰). پایداری سیالیداز *سودوموناس آئروجینوزا* تا حدود ۵/۶ 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 ۶۰ حداقل میزان فعالیت مشاهده گردید.

در تحقیق جاری جنس‌های *استرپتوکوکوس*، *باکتریوئیدس*، *اکتینوباسیلوس* و *کاپنوسیتوفانگا* 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)،

نتیجه گیری

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 میکروبی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که میکروفلور دهان فعالیت قابل توجه آنزیم سیالیداز را دارد. زنجیره‌های 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

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 Ca²⁺ 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 $\alpha 5 \beta 1$ 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, Nikolov 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.

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 prevention, 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 influenza 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 Microbiol. 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.



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

Farzaneh Hosseini¹, Rouya Razavipour², Elmira Ebrahimi²

¹Assistant Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
²M.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 35°C. 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](mailto:hosseini microbiology@gmail.com)

Journal of Microbial World 2012, 5(1&2): 30-38.