النمط البلازميدي لعدد من البكتريا المستهلكة للملوثات اللاعضوية المعزولة من الترب والرواسب المائية المحلية

د. علي شهاب احمد
الجامعة التكنولوجية ، قسم العلوم التطبيقية

الخلاصة

تم استخلاص ودراسة النمط البلازميدي لعدد من انواع البكتريا المعزولة من التربة والرواسب المائية ذات القابلية على استهلاك وإزالة الامونيا والنتريت في ظروف هوائية والنترات والكبريتات في ظروف لاهوائية. تم تعديل طريقة التحلل القاعدي لاستخلاص الدنا البلازميدي من البكتريا ذاتية التغذية المؤكسدة للامونيا والنتريت وبكتريا اختزال الكبريتات (ASA-4) *Desulfovibrio desulfuricans* ,(ASA-2) *Nitrobacter winogradskyi* , (ASA-1) *Nitrosomonas europaea* sub spp.A .
أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز عدم وجود أي دنا بلازميدي في هذه الأنواع مع ظهور مسحة غير مميزة على طول حقل الترحيل للدنا المستخلص من بكتريا النترة (ASA-3) *Pseudomonas stutzeri* و العزلة البكتيرية AN3 متعددة الابعض . استخدمت طريقة الترسيب الملحي (Salting – Out) في استخلاص الدنا الكلي من بكتريا الدنترة ASA-3 ومتعددة الايض AN3 بالمقارنة مع الدلائل الوراثية . اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز (1.5%) وجود ثلاثة حزم بلازميدية بمستوى الأشكال الفيزياوية لدنا البلازميد *pBR* 322 مع اختلاف شدة التألق . ظهرت حزمة واحدة بعد حفرة التحميل مباشرة لدنا العزلة AN3 المرحل ويرجح إن تكون بلازميد كبير .

المقدمة

أشارة جميع الدراسات الوراثية إلى عدم احتواء بكتريا النترجة ذاتية التغذية على أي دنا خارجي **Extrachromosomal DNA** وان الجينات المسؤولة عن الأكسدة محمولة على الدنا الكروموسومي [1,2] . لوحظ وجود بعض صفات الدنا البلازميدي في بكتريا ***Ps.stutzeri*** ولكنها غير مسؤولة عن صفات أختزال النترات (الدنترة) نفسها . تحمل جينات الدنترة التحطيمية والبنائية على الدنا الكروموسومي حيث تتجمع هذه الجينات على شكل تجمع عالي **(Supper Cluster)** وهي 33 جين عدا الجينات المشفرة للمعقد الانزيمي **(NO_3 Reductase)** [3] . اكتشف أن الجين المشفر لانزيم اختزال اوكسيد النتروز يكون معزول عن بقية التجمع الجيني في بكتريا ***Paracoccus.danitrificans*** و ***Ps.aeruginosa*** في حين يكون ضمن التجمع الجيني في بكتريا ***Ps.stutzeri*** [4] . اكتشفت وظيفة مشابه لانزيم اختزال اوكسيد النتروز في بكتريا ***Alcaligenes.eutrophus*** ولكن التعبير عن خلال جين محمول على الدنا الكروموسومي [4] . لم تشير المراجع الأدبية الى وجود دنا بلازميدي مسؤول عن صفات اختزال الكبريتات حيث تستقر جميع الجينات على الدنا الكروموسومي . تبين خلو بكتريا ***Desulfovibrio desulfuricans*** من أي دنا بلازميدي في حين اكتشف وجود اثنين من الدنا الكروموسومي غير معرفة الوظيفة **(Cryptic plasmid)** في بكتريا ***Desulfovibrio gigas*** [5,6] . تضمنت الدراسة التعرف على النمط البلازميدي لعزلات من بكتريا محلية معزولة ومشخصة في دراسات سابقة ذاتية وعضوية التغذية لها المقدرة على استهلاك وإزالة تراكيز عالية من الامونيا والنترات والكبريتات ومتعددة الأيض .

المواد وطرائق العمل

عزلات البكتريا

استخدمت عزلات بكتريا محلية مشخصة على انها **(ASA-1)** ***Ns. europaea*** المؤكسدة للامونيا و **(ASA-2)** ***Nb. winogradskyi*** المؤكسدة للنتريت و **(ASA-3)** ***Ps. stutzeri*** المختزلة للنترات و **(ASA-4)** ***Dsv. desulfuricans*** **supp.A** المختزلة للكبريتات وبكتريا **AN3** متعددة الايض [8] . استخدمت بكتريا ***E.coli*** **MM299** المجردة وبكتريا ***E. coli*** **HB101** الحاوية على البلازميد ***pBR322*** فقط . تم الحصول على جميع العزلات البكتيرية من قسم التقنيات الاحيائية التابع لكلية العلوم /جامعة بغداد .

الاوساط الزرعية والتنمية

استخدمت الاوساط الزرعية لتنمية عزلات البكتريا حسب مجاميعها وهي وسط **NC-A** و **O2C-A** لبكتريا النترجة ASA-1 و **ASA-2** , والوسط **O3a-A** لبكتريا الدنترة **ASA-3** و **AN3** , ووسط **C-medium** المحور لتنمية بكتريا اختزال الكبريتات **ASA-4** [8] . استخدمت ظروف تنمية هوائية لتنمية بكتريا النترجة والدنترة ومتعددة الايض (30 ºم ، حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة / دقيقة) وظروف لاهوائية لتنمية بكتريا اختزال الكبريتات (30 ºم ، حاوية لاهوائية Anaerobic Jar مع سبث تجهيز غازات Anaerobic Generating Kit) [6] .

استخلاص الدنا

استخدمت طريقة التحلل القاعدية المصغرة Mini prepe. (Alkaline lysis method) [6] وطريقة الترسيب الملحي [7] لاستخلاص الدنا البلازميدي من عزلات البكتريا المنشطة وبحجوم 1.5 و30 مللتر على التوالي.

المحاليل

تم تحضير جميع المحاليل الخاصة باستخلاص الدنا البلازميدي بطريقة التحلل القاعدي [6]. تضمن المحلول تحضير محلول الـ **SDS** بتركيز 10% ومحلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.2 عياري لاستخلاص الدنا البلازميدي والكلي من البكتريا.

الترحيل الكهربائي

تم تحضير هلام الاكاروز بنسبة 0.7 % و 1.5 % في دارىء **TBE** (**Tris- Borate EDTA**). أنجز الترحيل في خلية الترحيل الكهربائي نوع **Bio-Rad** بجهد كهربائي 5 فولت / سم.

النتائج والمناقشة

لم تكن طريقة التحلل القاعدي المصغرة موفقة بخطواتها التقليدية في استخلاص الدنا البلازميدي من البكتريا ذاتية التغذية وبكتريا اختزال الكبريتات، في حين كان الاستخلاص ملائما مع بكتريا **AN3** متعددة الأيض وبكتريا المتنثرة الموجبة لصبغة كرام (**G + ve**) مع ظهور مسحة واضحة على طول حقل الترحيل والاسباب قد تكون ناشئة عن المحتوى البروتيني العالي لهذه البكتريا او الى فعالية انزيمات الهضم النووي الخارجي (**Exonucleases**) بالرغم من كون الطريقة مصممة للبكتريا سالبة الاستجابة لصبغة كرام (G- ve). كان الاستخلاص واضحا للسلالات الوراثية ***E.coli* HB101** و ***E.coli* MM294**. يوضح الشكل رقم (1) نتائج الترحيل الكهربائي لمستخلصات دنا البكتريا باستخدام الطريقة القاعدية المصغرة المعدلة جزئيا. تمكنا من دنا بكتريا **ASA-1** و **ASA-2** ذاتية التغذية و**ASA-4** المختزلة للكبريتات ويلاحظ ذلك في المسارات 7,6,5، لم يظهر أي دنا بلازميدي في هذه البكتريا بعد مرور ساعة ونصف من الترحيل بالمقارنة مع الحقول 4،3 التي تمثل السلالات الخالية والحاوية على الدنا البلازميدي ***pBR322*** على التوالي. لم تكن الطريقة مناسبة لبقية الانواع من البكتريا حيث لوحظ وجود المسحة على حقل الترحيل. استخدمت طريقة الترسيب الملحي [7] مع استبدال انزيم **Proteinase K** بانزيم **Pronase** حيث ان لهما نفس التخصص في هضم البروتين. كانت نتائج الترحيل جيدة في استخلاص الدنا الكلي (الكروموسومي والبلازميدي) للبكتريا سالبة الاستجابة لصبغة كرام مما يعني كونها طريقة عامة لاستخلاص الدنا الكلي. يوضح الشكل رقم (2) نتائج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز بتركيز 1.5% وهو التركيز الانسب للحصول على حزم حادة (Sharp) للنماذج المحملة للترحيل بعد مرور ساعة واحدة حيث ظهرت حزم الاشكال الفيزيائية لدنا ***pBR322*** (المسار -4) لمستخلص دنا بكتريا ***E.coli* HB101** وعدم وجود أي دنا بلازميدي في مستخلص دنا البكتريا الخالية ***E.coli* MM294**. بينما ظهرت حزمتان في المسارين 1 و 2 للبكتريا **AN3** و ***Ps.stuzeri*** (**ASA-3**) على التوالي. نجد من الشكل رقم (2) ان حزم الدنا البلازميدي لهذه البكتريا كانت بمستوى الاشكال الفيزيائية لدنا ***pBR322***. يلاحظ وجود حزمة دنا بلازميدية متشدد (ميكابلازميد) في بكتريا **AN3** بعد حفرة الترحيل. ان هذه الحزم ليست لها علاقة بملوثات المتنثرة وقد ترتبط بعمليات ايض ثانوية. ان وجود هذه الحزم في بكتريا **ASA-3** قد اشير اليها سابقا [2] وهي ليست لها علاقة بعمليات المتنثرة التنفسية كونها عمليات كروموسومية. قد تعزى الفعاليات الايضية المتعددة للعزلة **AN3** الى وجود البلازميدات عالية النسخ وبلازميد واطئ النسخ وهذا واضح في قابليتها على ازالة العديد من الملوثات وظروف نمو مختلفة فضلا عن النمط البلازميدي لها.

References

1 -Rotthauwe , J . , de- Boer , W . and Liesack , W . (1995) . Comparative analysis of gene sequence encoding Ammonia monoxygenase of *Nitrosospira* spp. AHBI AND *Ni trosolobus multiformis* C-17 . FEMS. Microbial Lett. 133 (1-2) : 131 .

2 - Sinigalliano , C., Kuhn , D. and Sons , R . (1995) . Amplification of ammonium - oxidizing bacteria and feom an indigenous bacteria population from sweater . Appl. Environ.Microbial . 61 (11) : 4140 .

3 – Braun, C . and Zumft , W. G . (1992) . The structural genes of the nitric oxide reductase complex from Pseudomonas stutzeri are part of a 30 kilocluster for denitrification , 174 : 2394 .

4 – Zumft , W . (1997) . Cell biology and molecular basis of denirtification . Microbiol . Mol . Bio . Rev . 61 (4) : 533 .

5 – Postgate , T . RP . (1984) . The Sulphate Reducing Bacteria. Second Edn . London . New York .

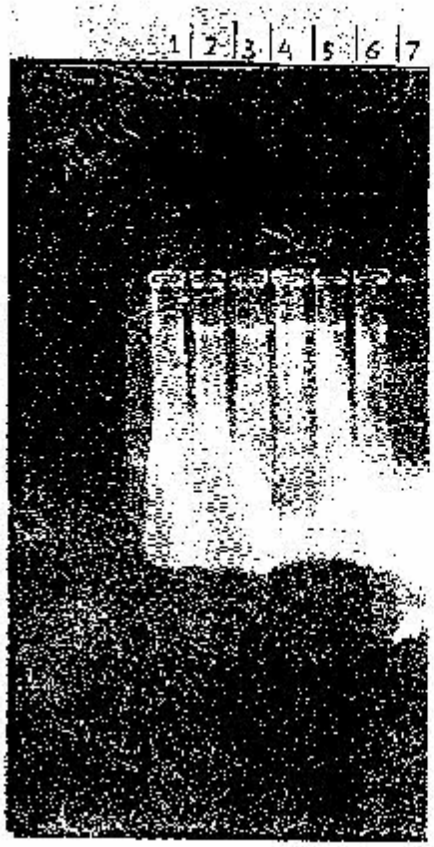
6 – Maniatis , T ., Fritsch , E . F . and Sambrook , J . (1982) . Molecular cloning . Alaboratory manual . Cold spring harbor laboratory . New York .

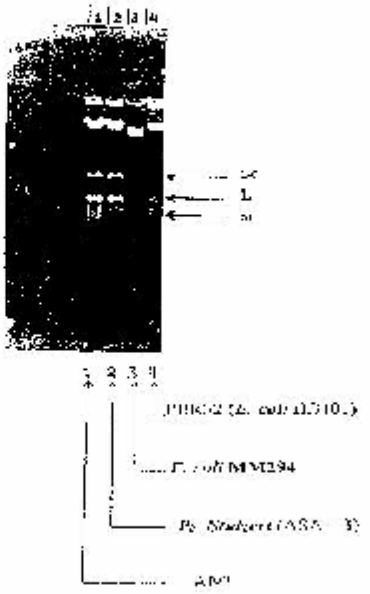
7 – Kieser , T . (1995) . Salting – out proceduere for the isolation of genomic and plasmid DNA . Popiech , T . and Neumann. T . (Edts)) . Norwich , UK .

8 – احمد ، علي شهاب . (2000) . المعالجة البيولوجية لبعض الملوثات الكيميائية اللاعضوية في المياه الصناعية المطروحة . اطروحة دكتوراه . قسم التقنيات الاحيائية – كلية العلوم – جامعة بغداد .

Summery

Plasmid profile for five different isolates of bacteria that have ability to remove organic and inorganic pollutants from industrialwastewater was studied .Results of modified mini- preparation alkaline lysis method showed the absence of any plasmid bands in NITROMONAS EUROPAEA(ASA-1) , NITROMONAS WINOGRADISKYI (ASA-2) and DESULFOVIBRIO DESULFURICANS spp.A after electrophoresised on agarose gel . While the result of modified salting – out procedure showed that there were two plasmids bands included in the denitrifying bacterium (ASA-3) in addition to large plasmid in multi- metabolites bacterium (AN3)





الشكل – 2 : الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لمستخلصات دنا ...
(Schlong ... 1987) بالطريقة الترسيب الملحي

1 : دنا بكتريا AN3

2 : دنا بكتريا *Ps.stutzeri* (ASA – 3)

3 : دنا بكتريا *E. coli* MM294

4 : دنا بكتريا *E. coli* HB101

5 : دنا بكتريا *Nitrosomonas europaea* (ASA – 1)

6 : دنا بكتريا *Nitrobacter Winogradskyi* (ASA – 2)

7 : دنا بكتريا *Desulfovibrio desulfuricans* (ASA – 4)

الشكل – 1 : الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لمستخلصات دنا عزلات البكتريا المنتخبة بالطريقة القاعدية المستمرة المحورة