مجلة جامعة النهرين العلوم المجلد ١٤ العدد(3) أيلول، ٢٠١١ ص ٦٤-٧٣

دراسة وراثية للطوافر البكتيرية المحللة للمركبات الفينولية

*ميساء جاسب الياس،**دانية منعم حامد و **صبحي جواد حمزة
* قسم التقانة الاحيائية، كلية العلوم، جامعة النهرين.
** قسم التقانة الاحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد.

الخلاصة

في هذه الدراسة تم عزل ٣٠ عزله بكتيريه من ٥٥ عينة تربة و١٠ عينات مياه ملوثة بالمخلفات النفطية وتم التحري عن قابليتها لتحلل الفينول و الانلين وتم اختيار ٥ عزلات اعتمادا على قابليتها على التفكيك لهذه المركبات وشخصت العزلات على انها *Pseudomonas aeruginosa* ورمز لها A5، A13 و *Escherichia coli* ورمز لها A2، A11 و *Enterobacter cloacae* ورمز لها A8. ولغرض زيادة نسبة تحلل هذه البكتريا للفينول والانلين تم الحصول على عدد من الخلايا الطافرة باستعمال المطفر الكيمياوي النايتروزوكوانيدين بتركيز ٥٠٠ مايكروغرام/ ملليتر بمدد زمنية مختلفة (٠.٥، ١.٠، ٢.٠) ساعة وبينت النتائج ان المدة ساعة واحدة كافيه لاستحثاث الطفرات في البكتريا قيد الدراسه وزادت نسبة التحلل وبلغت (٩٠، ٩٠، ٩٧)% للفينول للعزلات (A8 و A13 و A11) على التوالي عند التركيز ٢٠٠٠ مايكروغرام/ ملليتر للفينول، وبلغت (٩٠، ٩٧ ، ١٠٠)% للانلين عند التركيز ٢٥٠٠ مايكروغرام/ ملليتر.

اكدت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز امتلاك العزلات (A13،A8) ثلاث حزم بلازميدية وامتلاك العزلات (A15، A11) حزمتين بلازميدية.

كما تناولت الدراسة إجراء تحييد لبلازميدات العزلات (A8 و A13 و A11) لتحديد العوامل الوراثية المسؤوله عن تحلل الفينول والانلين باستخدام الصبغات الاكردين البرتقالي وبروميد الاثيديوم و مادة (SDS) وبينت النتائج الحصول على خلايا محيدة للعزلتين (A11c، A13c) بأستخدام ٢٢٠٠ مايكروغرام/ ملليتر من مادة SDS و ٢٠٠ مايكروغرام/ ملليتر من صبغة الاكردين البرتقالي وفشلت جميع المحاولات في الحصول على خلايا محيدة للعزله (A8c) فاقدة لقدرتها على تحلل المركبات الفينولية، اجريت محاولات لتحويل سلاله البكتريا *E. coli* MM294 بالدنا البلازميدي المستخلص من العزلات (A11، A8،A13). اذ اظهرت نتائج التحول قدرة نمو البكتريا *E. coli* MM294 على الأوساط الحاوية على الفينول والانلين كل على حده مما يؤكد الموقع البلازميدي لتلك الجينات.

المقدمة

أوضحت التقارير القومية على مستوى العالم العربي انه تكاد لا تخلو عينة ماء أو تربه واحدة من التلوث بالمواد الكيميائيه مثل المبيدات، وان تلوث المياه وعدم توافر مياه للشرب في الوطن العربي قد يسبب رفع معدل الإصابة بالأمراض مثل الفشل الكلوي والسرطان والفشل الكبدي [1]. ويعد تلوث المياه والتربه بالفينول والانلين أحد المشاكل البيئية المهمة، حيث يعد الفينول والانلين أحد أهم المركبات الفينولية المستخدمة في الصناعة في معظم بلدان العالم وخاصةً البلدان الصناعية المتقدمة ونتيجة لعمليات التصنيع فان كميات هائله من المركبات الفينولية ومشتقاتها ومخلفات العمليات الصناعية تأخذ طريقها إلى المحيط الحيوي وتعد سامة لمعظم الكائنات الحية فضلاً عن إن بعضها مواد مسرطنة (Carcinogenic) ولها قابلية الانتقال في السلسلة الغذائية. ولغرض التخلص من هذه المشكلة اشار عدد من الباحثين الى قابلية عدد من الاحياء المجهرية على تفكيك المواد الهيدروكاربونية اذ تعد من افضل الوسائل المحللة للهيدروكاربونات [٢].

تنتشر هذه الاحياء ومنها البكتريا المحللة للمركبات الفينولية في بيئات مختلفة إذ تم عزلها من بيئات الزراعية و المائية [٤،٣] من عزل البكتريا Acinetobacter calcoaceticus المحللة للانلين من ماء النهر. عزلت عدد من الأحياء المجهرية من الترب والمياه الملوثة بالمخلفات الفينولية ومن الترسبات في السواحل وقيعان البرك الملوثة

بالمخلفات النفطية والتي أثبتت كفاءة عاليه في تحلل أنواع مختلفة من الهيدروكاربونات، وتعود هذه الاحياء المجهرية الى اجناس مختلفة من بكتريا *Nocardia sp.،Pseudomonas sp.* او الفطريات ومنها بعض الخمائر مثل *Candida sp* [٥،٦،٧].

تعد بكتريا *Pseudomonas* من اهم المضائف لتواجد بلازميدات التحلل الحيوي وخاصة النوع *P. aeruginosa* ، *P. putida* غالبا ما تكون بلازميدات التحلل الحيوي الموجودة في هذه الأنواع من البكتريا الرمية متوافقة مع بعضها البعض، أي انها لا تعاني من الفقدان اذا ما تواجدت معا [8]. أن بلازميدات التحلل الحيوي غالبا ما تكون منتقله (Transmissible) أو اقترانية (Conjugative) ذات اوزان جزيئية كبيرة بما يكفي لتحمل الجينات المسؤولة عن التحلل إذ تتراوح احجامها الجزيئية بشكل عام (٧- ٣٠٠) كيلو زوج قاعدي [٩،١٠].

تشابه بلازميدات التحلل الحيوي الى حد كبير بلازميدات المقاومة لمضادات الحيوية في بكتريا *Pseudomonas* وهذا ما اثبتته تجارب التهجين (Hybridization) والتقطيع بالانزيمات القاطعة. وبشكل عام فأن بلازميدات التحلل الحيوي في بكتريا *Pseudomonas* و *E. coli* تشفر على الاقل إلى 10 انزيمات مسؤولة عن التحلل الجزئي للمصدر الغذائي [١١،١٢]. ان الغرض من هذه الدراسة هو زيادة نسبة تحلل البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و *Enterobacter cloacae* للفينول والانلين باستعمال المطفر الكيمياوي النايتروزوكوانيدين للحصول على عدد من الخلايا الطافرة ذات قابلية عالية على تحلل هذه المركبات.

طرائق العمل

جمع العينات

جمعت العينات وعددها ٥٥ عينة تربة و١٠ عينات مياه من اعماق تراوحت من ١٠-١٥ سم خلال المدة من ١-٢٠ آب ٢٠٠٨ من المناطق مختلفة من ترب مزيجية معرضة للتلوث بشكل مستمر بالمشتقات النفطية من محطات تعبئة الوقود ومن مناطق ملوثة كمولدات الكهرباء ومناطق تصليح السيارات ومن المياه الراكدة قرب محطات توليد الكهرباء ووضعت العينات في قنانٍ زجاجيه واضيف اليها ٠.٥ مليليتر من البنزين لتشجيع الاحياء المجهريه المحللة للمركبات الفينوليه على النمو الى ان تم نقلها الى المختبر في اليوم التالي [16].

الاختبارات الكيموحيوية

استخدمت عدة اختبارات كيموحيوية للكشف عن انواع الاجناس المعزولة اعتمادا على [١٣،١٤،١٥]. اذ استعمل كل من اختبار الاوكسيديز Oxidase test، الكتاليز Catalase test، الحركة Motility test، اليوريز Urease test، تكون الاندول Indole production test، احمر المثيل Methyl red test، الفوكس بروسكور Vogus proskauer test، استهلاك السترات Citrate utilization test، تخمر السكريات الثلاثية، (TSI) التنمية على وسط الستريمايد الصلب (Citramid – agar)، التنمية على وسط A king، التنمية على وسط B king، التنمية على وسط اكار الدم Blood–agar واستخدام نظام API 20E.

دراسة الفقدان الكمي للمركبات الفينوليه

تم دراسة الفقدان الكمي للمركبات الفينولية في وسط الاملاح المحضر وفقا [16] و الملقحه بالبكتريا وبرقم هيدروجيني ٧ وبدرجة حرارة ٣٠°م وبعد مرور ٣ ايام من الحضانه وذلك بأجراء الطرد المركزي للوسط على سرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة نصف ساعه واهمال الراسب واخذ الراشح للوسط وقياس الامتصاصية للفينول والانلين بأستخدام جهاز المطياف الضوئي للاشعة فوق البنفسجية على طول موجي ٣٠٠ و ٣٥٠ نانوميترعلى التوالي وهي الاطوال الموجيه التي تعطي اعلى امتصاصيه للمركبين المذكورين وبمقارنتها بالمحاليل القياسيه [17].

التطفير باستعمال المطفر الكيماوي النايتروزوكوانيدين

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [18] بأضافة ٣ مليليترات من دارئ الفوسفات المعقم و ٢ مليليترات من المطفر النايتروزوكوانيدين (N-methyl –N-nitro-N-nitrosoguanidine) ذي التركيز ٤٠٠ مايكروغرام/ مليليتر الى راسب الخلايا المنماة لمدة ١٨ ساعة في درجة حرارة ٣٧° م. كررت المعاملة بالمطفر NTG بالطريقة نفسها بأستعمال تركيز المطفر نفسة ٤٠٠ مايكروغرام/ مليليتر

ولفترات حضن مختلفة تراوحت بين (١-٢) ساعة. اختيرت المعامله التي اعطت نسبة قتل ٩٠% وتم حساب عدد الخلايا المتبقية ومنها حسبت نسبة القتل وبتطبيق القانون الاتي:

النسبة المئوية للقتل = (عدد الخلايا الاصلية – عدد الخلايا المتبقية)/ عدد الخلايا الاصليه × ١٠٠. اختبرت قابلية العزلات المطفره على تحلل الفينول والانلين وقورنت مع نماذج السيطرة.

اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية

اتبعت الطريقة التي وصفها [19] لاختبار حساسية العزلات باستعمال الأقراص الجاهزة

amoxicillin(25), ampicillin(10), carbenicillin(100), cefotaxime(30), cephalothin(30), ciprofloaxin(5), erythromycin(15), gentamycin(10), kanamycin(30),piperacillin(100), rifampin(5), tetracycline(30) and trimethoprim\ sulfamethoxale(25)

مايكروغرام/ قرص. سجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط بـ (المليمترات) حول كل قرص وبالرجوع إلى جداول قياسية خاصة بكل نوع من المضادات الحيوية[20]، يحدد كون العزله حساسة أو مقاومة.

استخلاص الـ DNA البلازميدي للبكتريا بطريقة الترسيب بالملح

استعملت طريقة الترسيب بالملح (salting out) لعزل الـ DNA البلازميدي [21] نميت مستعمرة بكتيرية مفردة من العزله المراد عزل الـDNA البلازميدي منها في وسط مرق نقيع القلب والدماغ وحضنت في درجة حرارة ٣٧°م في حاضنة هزازة مدة ٢٤ ساعة. تم اضافة ٣ مليليتر من محلول دارئ SET ونبذت ثم أعيد تعليق الخلايا بـ ٥ مليليتر من دارئ SET واضيف ١ مليليتر من محلول ١٠% SDS حضنت الأنابيب مدة ساعتين في حمام مائي بدرجة حرارة ٥٥°م. ونبذت بعد ذلك تم اضافة ٢ مليليتر من محلول 5M كلوريد الصوديوم، اضيف ٥ مليليتر من الكلوروفورم، بعد ذلك سحب الرائق (الطبقة المائية) ونقل إلى ابندورف معقم وتم اضافة ما يعادل ٠.٦ من حجم الرائق من كحول الايزوبروبانول، تم التخلص من الرائق واضيف ٥ مليليتر من محلول ٧٠% كحول الإيثانول خلط قليلاً ثم نبذ مركزياً بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/ دقيقة مدة ١٠ دقائق، ثم أزيل الرائق وترك الإنبوب ليجف مدة ١٠ دقائق. أذيب الـ DNA المترسب بـ ١ مليليتر من دارئ TE ومن ثم حفظ في درجة حرارة ٤°م لحين الاستعمال.

تحييد البلازميدات [22]

استخدمت صبغتا الاكردين البرتقالي وبروميد الاثيديوم ومادة SDS لتحييد بلازميدات العزلات البكتيريه وكما يلي: لكل عامل محيد تم تحضير سلسله من التراكيز من وسط نقيع الدماغ والقلب السائل، بحجم نهائي مقداره ٥ مليليتر وبالتراكيز الاتيه: لصبغة الاكردين البرتقالي (٥٠، ١٠٠،١٥٠،٢٠٠،٢٥٠،٣٠٠) مايكروغرام/ مليليتر، اما لصبغة بروميد الاثيديوم فكانت التركيز: (١٠٠،١٥٠،٢٠٠،٢٥٠) تم تلقيح كل من هذه الانابيب بـ ١٠٠ مايكروليتر من المزروع البكتيري المنمى في درجة حرارة ٣٧°م لمدة ١٨ ساعة، حضنت بعد ذلك كافة الانابيب في درجة حرارة ٣٧°م مدة ١٨ ساعة بسرعة ١٥٠ دورة/ دقيقة. قورنت كثافة النمو في الانابيب الحاويه على تراكيز مختلفه من العوامل المحيدة مع النمو في انبوبتا السيطره وتم اختيار الانابيب التي احتوت على اعلى تركيز من العامل المحيد والذي اظهر نموا للبكتريا يمكن ملاحظته بالعين المجردة، اجريت تخافيف عشريه للمزروع البكتيري للانابيب المختاره ومن ثم نقل ٠.١ مليليتر من كل تخفيف الى أطباق المولر هنتون التي تحتوي على اقراص المضادات الحيوية (Antibiotic discs) المستخدمة في التجارب، وذلك لملاحظة فقدان صفة المقاومة لاي من المضادات الحيوية وكذلك اختبرت قابليتها على استهلاك الفينول والانلين على وسط الاملاح المعدنيه. استخلاص الدنا للمستعمرات التي اظهرت تغيرا في حساسيتها للمضادات الحيوية ورحل على هلام الاكاروز وقورنت انتائج مع العزلات الاصلية.

التحول

حولت سلاله البكتريا *Escherichia coli* MM294 (مركز التقنيات الاحيائية/ جامعة النهرين) بالدنا البلازميدي المستخلص من العزلات (A8،A13،A11) وذلك بأتباع طريقة [21] [23] وتم حساب تكرار التحول حسب المعادله

التالية: تكرار التحول = عدد الخلايا المتحوله/ العدد الكلي للخلايا المؤهله.

النتائج والمناقشة

دراسة الفقدان الكمي للمركبات الفينولية

اظهرت النتائج قابلية ١٤عزله بكتيرية على تحلل الفينول والانلين مع ملاحظة وجود اختلافات في قابلية العزلات على تحلل هذين المركبين وذلك بأعتماد ملاحظة النمو على اوساط حاوية على المادة الاساس (الفينول والانلين) واعتبار تقدير الامتصاصية على طولي موجي ٣٠٠ و ٣٥٠ نانوميتر كدليل على تحلل المركبات الفينولية بأعتبار كونهما يعطيان اعلى قيمه للامتصاصية وحسب ما تم تحديدة من خلال المحاليل القياسية والمصادر المختلفة [١٧،٢٤،٢٥] اتصفت الطريقة المتبعة في غربله هذه العزلات بالسرعة الممكنة والكفاءة في تحديد العزلات الكفوءة في تحلل المركبات الفينولية و الاستدلال عليها عن طريق متابعة تحلل الفينول والانلين في وسط الاملاح وان تحلل المركبات الفينولية تعتمد على متابعة تحررالكاتيكول (Catechol) والكشف عنه باستخدام طرق الامتصاصية على جهاز المطياف الضوئي للاشعة فوق البنفسجية، وتعتمد قراءة الامتصاصية على كمية الفينول والانلين المتبقيان في الوسط [26].

ان نجاح عملية العزل يعتمد بالاساس على اختيار نماذج معرضة ولفترة طويله بمركبات قريبة من الناحية التركيب بالمركبات الاصلية وذلك يعني من الناحية العلمية انها تمتلك الجينات الخاصة بتخليق الانزيمات الضرورية لتفكيك تلك المركبات استنادا الى نتائج التحلل اختيرت العزلات A2،A5،A8،A11،A13 التي تميزت بنسبة تحلل و نمو اعلى من البقية، وجد عند تشخيص هذه عزلات انها تعود لجنس العائله المعوية اعتمادا على الصفات المزرعية والمظهرية والكيموحيوية. اكدت بعض الاختبارات الكيموحيوية، فضلا عن الصفات المظهرية المذكورة سابقا عائدية هذه العزلات الى اجناس *Escherichia*،*Enterobacter*،*Pseudomonas* وتفاوتت هذه العزلات في استجابتها لبقية الاختبارات (اختبار الاوكسيديز و اختبار الحركة و اختبار الاندول واختبار اليورييز واختبار احمر المثيل واختبار الفوكس بروسكاوير و اختبار استهلاك السترات) شخصت عزلات *Enterobacter* باجراء الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بها حسب ما جاء في [٢٧،٢٨].

اختبار حساسية العزلات لمضادات الحيوية

تم اختبار حساسية العزلات لتراكيز ١٣ مضادات حيوية و الموضحة في الجدول (١) بأستعمال طريقة الاقراص.

جدول (١)

اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية المختلفة.

المضاد الحياتي	رمز العزله		
	A8	A11	A13
Ampicillin	R	R	R
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	R	R	R
Cephalothin	R	R	R
Cefotaxime	R	R	R
Ciprofloxacin	S	S	S
Amoxicillin	R	R	R
Erythromycin	R	R	R
Gentamicin	S	S	S
Carbenicillin	R	R	R
Rifampin	S	S	S
Tetracycline	R	R	R
Piperacillin	S	S	S
Kanamycin	R	S	R

(R) مقاومة العزله لمضاد الحيوية،(S) حساسية العزله لمضاد الحيوية.

بينت النتائج اختلافا في نمط المقاومة المضادات الحيوية المستعمله فقد كانت كافة العزلات حساسة لمضاد Rifampin ذلك لقله تعرض البكتريا لهذا المضاد بسبب تجنب استعماله طبياً لطبيعتة المطفرة [29] وكذلك حساسة للمضادات Piperacillin، Gentamicin، Ciprofloxacin. في حين اظهرت العزلات مقاومة متباينة و عاليه نسبيا لكل من المضادات Ampicillin، Tetracycline، Carbenicillin، Amoxicillin، Trimethoprim /Sulfamethoxazol،Erythromycin

Cephalothin، Cefotaxime و قد يعزى ذلك الى ان استعمال مضادات الحيوية واسعة الطيف Broad (spectrum) في العلاج زاد من ظهور المقاومة وانتشارها، لا سيما اذا كان جين المقاومة بلازميدي الموقع ، كما هو الحال مع جين مقاومة مضاد التتراسايكيلين الذي غالبا ما يكون بلازميدي الموقع في اجناس الاسرة المعوية، وهذا يزيد من فرصة انتشارة بين البكتريا [30]. اما بالنسبة لمقاومة الامبيسيلينات فقد كانت كافة العزلات مقاومة لهذه المضادات (Ampicillin ، Carbenicillin، Amoxicillin) وقد يعود سبب ذلك الى ان الجينات المشفرة لانتاج انزيم الـ (β–lactamase) (المسؤول عن تحطيم حلقة المضاد) قد تكون محموله على البلازميدات او على العناصر الوراثية القافزة (Transposons) بالاضافة الى كونها محموله على الكروموسوم، و هذا يؤدي بالطبع الى زيادة انتشار مقاومة هذه المضادات بين الاجناس البكتيرية المختلفة [31] ومن الجدير بالذكر ان النوع الواحد من البكتريا يمكن ان ينتج انواعاً متعددة من الانزيم [32].

تحسين قدرة العزلات البكتيرية على تحلل المركبات الفينوليه باستخدام المطفرات الكيمياوية

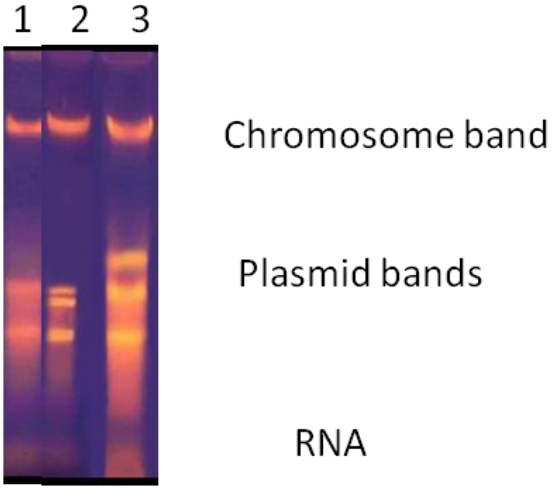
لتحديد الجرعة اللازمة من المطفر الكيماوي (NTG) N- methy –N-nitro-N- nitrosoguanidine للحصول على طفرات من العزلات قيد الدراسة، استخدم المطفر بتركيز ٥٠٠ مايكروغرام/ مل بمدد زمنية مختلفة (٠.٥ ،١.٠، ٢.٠) ساعة على اعتبار ان الجرعة حاصل تأثير التركيز ومدة التعرض المحسوبة على اساس نسبة قتل للخلايا مقدرة ٩٠ % وهي النسبة اللازمة لتحفير المادة الوراثية بأتجاه زيادة نسبة الطفرات المتولدة.

وعلى هذا الاساس وجد بأن استخدام المطفر لمدة ساعة واحدة حقق نسبة القتل المذكورة وبعد اختبار الصفات المطلوبة المتمثله بالنمو وتحلل المركبات وكذلك المقاومه للمضادات الحياتيه ظهر بأن (١٠) طوافر للعزله A11 والتي تعود *Escherichia coli* و(١٢) طافرة للعزله A8 والتي تعود لبكتريا *Enterobacter cloacae* و(٨) طوافر للعزله A13 والتي تعود لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* حيث اعطت نتائج موجبة من خلال تغير صفاتها المظهرية حيث اصبحت حساسة لعدد من المضادات الحيوية مثل المضادات Ampicillin،Cephalothin، Carbenicillin، Erythromycin قياسا بالنوع البري Wild type التي كانت مقاومة لهذه المضادات وكذلك لوحظ بعض التغيرات على الصفات المزرعية للعزله A13 حيث قلت انتاجها للصبغات وبعد اختبار صفة تحلل المركبات الفينولية (الفينول والانلين) وجد بأن (٦) طوافر للعزله A8 و(٤) طوافرللعزله A13 و(٥) طوافر للعزله A11 تفوقت في قدرتها في تفكيك هذه المركبات مقارنة بالعزلات البرية. حيث تميزت العزلات الطافرة بزيادة تحللها للفينول والانلين قياسا بالنوع البري وزادت نسبة التحلل الفينول وبلغت (٩٧،٩٠،٩٠) % للفينول عند التركيز ٢٠٠٠ مايكروغرام/مل للفينول للعزلات (a8 وa13 وa11) وكذلك تحلل الانلين وبلغت (١٠٠،٩٧،٩٠)% عند التركيز ٢٥٠٠ مايكروغرام/ مل للعزلات المطفرة (a8 وa13 وa11) على االتوالي. على اعتبار زيادة الجرعة المستخدمة في قتل الخلايا وتحفيزالخلايا المتبقية لحدوث الطفرات، فقد امكن من خلال استخدام هذا المطفر الحصول على طفرات من العزلات (A11،A13،A8) وذلك من خلال زيادة قدرة الطوافر على تفكيك المركبات الفينولية مقارنة بالعزلات البرية.

ان هذه النتيجة تتفق مع العديد من البحوث العلمية في هذا المجال [22] حيث تم الحصول على طافرات من بكتريا *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas sp* قادرة على تفكيك phenol،cresols، p-Chlorotoluene كذلك تم من الحصول على طافرات من بكتريا *Escherichia coli* قادرة على تحليل thiophenes،furans [23] بينما فشلت عزلات *Enterobacter cloacae* الطافرة في تحلل المركبات الفينوليه [33]. وجدير بالذكر ان تأثير المطفر الكيميائي النايتروزوكواندين يكون عن طريق حدوث طفرة استبدال (متكافى) Transition mutation ويتضمن استبدال قاعدة بيورين على احد شريطي الـ DNA بقاعدة بيورين اخرى أو استبدال قاعدة بيرميدينية على احد شريطي الـ DNA بقاعدة بايرميدينية اخرى و يؤدي ايضاً إلى حدوث طفرة الحذف [٣٥،٣٤].

عزل الدنا البلازميدي

تم التحري عن المحتوى الوراثي للعزلات A8،A13،A11 شكل (١) وذلك لأجل التعرف عن النسق البلازميدي اذ تم اعتماد طريقة الترسيب بالملح (Salting out procedure) [36]. اكدت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز وبعد مرور ساعة ونصف من بدء الترحيل امتلاك العزلتين A13، A8 ثلاث حزم بلازميدية وامتلاك العزله A11 حزمتين بلازميدية.



الشكل (١) الترحيل الكهربائي لنماذج الدنا المستخلص من العزلات البرية و الطافره على هلام الاكاروز ٠.٨ % ولمدة ١.٥ ساعة وبفرق جهد ٧ فولت/سم.

المسار رقم ١ يمثل العزله A11 البريه، المسار رقم ٢ يمثل العزله A8 البريه، المسار رقم ٣ يمثل العزله A13 البريه.

اشارت دراسات عديدة الى احتواء انواع مختلفة من البكتريا على بلازميدات ذات اوزان جزيئية متباينة مشفرة لتفكيك المركبات الفينولية حيث اشارت دراسة الى احتواء بكتريا *Pseudomonas sp* المعزوله من بيئات ملوثة بالمركبات الفينولية على بلازميدين مختلفين بالوزن الجزيئي [37] وفي دراسة اخرى على بكتريا *Pseudomonas fluorescens* المعزوله من ترب ملوثة بالبترول وجد انها تحتوي على بلازميد ذات وزن جزيئي (١.٨ kb)[38]. هذا بالاضافة الى احتواء عزلات *E. coli* المحللة للمركبات الاروماتية على بلازميدين قريبين بالوزن الجزيئي [39].

تحييد البلازميدات

اجريت محاولات عدة لدراسة دور البلازميدات في عملية تحلل المركبات الفينولية وذلك من خلال تحييد بلازميدات هذه العزلات بمعاملتها بتراكيز مختلفة من صبغة الاكردين البرتقالي و صبغة بروميد الاثيديوم و مادة كبريتات دودسيل الصوديوم (SDS) لمعرفة اعلى تركيز من كل مادة يسمح بنمو البكتريا، اوضحت النتائج ان اعلى تركيز من صبغة الاكردين البرتقالي و مادة SDS الذي ظهر فيه نمو امكن ملاحظته بالعين المجردة هو ٢٠٠ مايكروغرام/ مليليتر و ٢٢٠٠ مايكروغرام/ مليليتر لكل من هذه المواد على التوالي .كما اخذت نماذج من هذه المعاملات ونشرت على وسط المولر هنتون المضاف له اقراص المضادات الحيوية وهي (Kanamycin،Amoxicillin ، Cefotaxime ، Tetracycline) ووسط الاملاح المعدنية المضاف له الفينول والانلين حسب التركيز المذكور في التجارب السابقه، اشارت النتائج جدول (1) و الشكل (2) الحصول على خلايا محيدة للعزلتين (A11c، A13c) بأستخدام مادة SDS وصبغة الاكردين البرتقالي حيث تميزت العزلات المحيدة بفقدان نموها على الفينول والانلين بأضافة الى تغير حساسيتها تجاه المضادات الحياتية.

جدول (1)

الحساسية الدوائية لبكتريا *Pseudomonas* لمحيدة الدنا البلاميدي وقابليتها على تحلل الفينول والانلين.

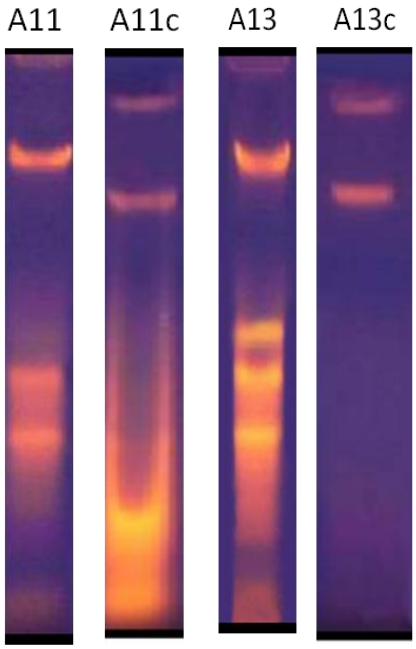
رمز العزله المحيدة	الحساسية لمضادات الحياتية				تحلل المركبات الفينولية	
	AX	TE	CTX	K	فينول	الانلين
A11c	S	S	S	S	−	−
A13c	S	S	R	S	−	−
A8c	R	R	R	R	+	+

(S) حساسية العزله لمضاد الحيوية، مقاومة العزلة للمضاد (R)+ القابلية على تحلل الفينول والانلين،−عدم القابلية على تحلل الفينول والانلين.

K: kanamycin,CTX: cefotaxime, TE: tetracycline, AX: amoxicillin

ولم يتم الحصول على خلايا محيده بأستخدام صبغة بروميد الاثيديوم وقد اشارت الدراسة التي قام [40] الى نجاح تحييد عزلات *Pseudomonas sp.* بأستخدام مادة SDS في حين اثبتت الدراسة التي قام بها كل من [37،42] نجاح تحييد العزلات بأستخدام صبغة الاكردين البرتقالي وصبغة بروميد الاثيديوم وفشلت جميع المحاولات باستخدام مادة

SDS للحصول على خلايا محيدة للعزله A8 فاقدة لقدرتها على تحلل المركبات الفينولية على الرغم من اعادة التجربة لمرات عديدة، لذلك لم يتم تأكيد المنشأ البلازميدي للجينات المشفرة لتحلل.



الشكل (٢) النسق البلازميدي لنماذج الدنا المستخلص من العزلات البريه والمحيدة بأستخدام ٢٠٠ مايكروغرام/ ملليتر من صبغة الاكردين البرتقالي و ٢٢٠٠ مايكروغرام/ ملليتر مادة SDS على هلام الاكاروز ٠.٨ % ولمدة ١.٥ ساعة وبفرق جهد ٧ فولت. المسار A11 يمثل العزله البرية و A11c المحيدة. المسار A13 يمثل العزله البرية المسار A13c يمثل العزله المحيدة.

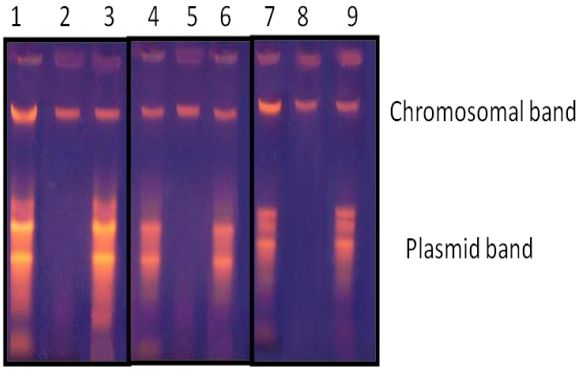
المركبات الفينولية حيث ان البكتريا مقاومة تجاه هذه المواد وقادرة على النمو بتراكيز عاليه منها وقد يستوجب استعمال عوامل محيدة اخرى مثل Mitomycin C وهذه النتيجة تتفق مع الدراسة التي قام بها [43] بأستخدام صبغة بروميد الاثيديوم و الحرارة.

التحول Transformation

لغرض الاستدلال الكامل على عائدية صفة تحلل المركبات الفينولية (الفينول و الانلين) الى البلازميدات قيد الدراسة في التجارب السابقة. اجريت محاولات لتحويل سلاله البكتريا *E. coli* MM294 بالدنا البلازميدي المستخلص من العزلات (A8،A13،A11). استخدمت السلالة لكونها تتميز بعدم احتوائها على نظام تقييد (r-) وعدم احتؤاها على نظام تبادل وراثي (Recombination) (rec-) وبالتالي فأن البلازميد في حالة انتقاله الى هذه السلالة فانه لايتعرض للتقطيع بفعل انزيمات التقييد ولا يحصل له تبادل وراثي مع كروموسوم هذه السلالة، وبعد اجراء تجارب التحول نشرت الخلايا المتحوله على اوساط حاوية على الفينول واوساط حاوية على الانلين بتركيز (٢٥٠٠،٢٠٠٠) مايكروغرام/مل على التوالي. وذلك في محاوله للانتقاء المباشر للمستعمرات الحاوية على خلايا متحوله قادرة على تفكيك الفينول والانلين. كما نشرت الخلايا المتحوله على وسط المولر هنتون المضاف له اقراص المضادات الحيوية وهي (Tetracycline ، Kanamycin،Amoxicillin) للاستدلال على الخلايا المقاومة للمضات الحيوية كدليل اخر على تحولها.

حيث اظهرت النتائج نمو الخلايا على الاوساط الحاوية على الفينول والانلين كل على حدة وبتردد ($1.5X10^2$، $1.2X10^2$، $1.2X10^2$) للعزلات a11 ، a13، a8 على التوالي. كما اظهرت النتائج مقاومة الخلايا للمضادات الحيوية (Tetracycline Kanamycin ، Amoxicillin) وبتردد ($2.1X10^2$، $1.2X10^2$) للـ (Amoxicillin) للعزلات (a11 ، a8). و($1.5X10^2$) للـ (Kanamycin، Tetracycline) للعزلات (A8،A13،A11) كما في الشكل رقم (٣). وهذه النتيجه تتفق مع البحوث السابقة [38،41] حول امكانية تحول السلالة *E. coli* MM294 بالدنا البلازميدي للعزله *Pseudomonas sp.* المحللة للـpentachlorophenol كذلك ذكر[42] عن امكانية تحول السلالة *E. coli MV1184* بالدنا البلازميدي للعزله *Enterobacter cloacae* بينما فشل كل من [43،44] في تحول السلالة *E. coli* بالدنا البلازميدي للعزله *Enterobacter cloacae*.

and Identification of a new Species *Acintobacter venetianus* Institue pasteur/ Elsevier. Res. Microbiol.148، pp:237-249.
[3] Jones, S.H and Alexander, M.(1986). Kinetics of Mineralization of Phenols in Lake Water. Appl. Enviromen. Microbiol. 51: 891-897.
[4] Rubin, H. and Schmidt, S.(1985). Growth of Phenol-Mineralizing Microorganisms in Fresh Water. Appl. Enviromen. Microbiol. 49: 11-14.
[5] Zhangt, X. and Wiegel, J. (1994). Reversible Conversion of 4-Hydroxybenzoate and Phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum* Appl. Enviromen. Microbiol. 60: 4182-4185.
[6] Pareileux, A. 1979. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant، effects on respiratiry activity and growth. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8:91-101.
[7] Rehm, H.J. and Reiff, I. 1981 Mechanisms and Occurrence of microbial oxidationoflong-chain alkanes.19:175-215.
[8] Chakrabarty, A.M. 1982. Genetic mechanisms in the dissimulation of chlorinated compounds. In: Biodegradation and detoxification of environmental pollutants. (E.d Chakrabarty, A.M.) pp: 127-140. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
[9] Farrell, R. and Chakrabarty, A.M. 1979. Molecular nature and mode of evolution. In: Plasmids of medical، environmental and commercial importance (Eds. Timmis، K.N. and Puler، A.). 1: 97-109. Elsevier North-Holland Biomedical press، Amsterdam, New York.
[10] Hardy, K. (1987). Bacteria plasmids. Second edition. American Society for Microbiology, USA.
[11] Timmis, K. N.; Lehrbach, P.R.; Harayama, S.; Don، R.H.; Mermod, N.; Bas, S.; Leppik, R.; Weightman, A.J.; Reineke, W. and Knackmuss, H.J.1985. Analysis and manipulation of plasmid-encoded pathways for the catabolism of aromatic compounds by soil bacteria. In: Plasmid in Bacteria. (Eds. Helsinki, D.R.; Cohen, S.N.; Clewell, D.B.; Jackson, D.A.; Hollaender, A. and Wilson, C.M.) pp:719-739. Plenum, New York.



الشكل (٣) محتوى السلالة *E. coli* MM294 المحوله بالدنا البلازميدي للعزلات (A11 ، A13، A8) والمرحله كهربائيا على هلام الاكاروز ٠.٨ % ولمدة ١.٥ ساعة وبفرق جهد ٧ فولت/سم ١٠ و 4 و ٧ المحتوى البلازميدي للعزلات (A11،A13،A8) على التوالي.
٢ و ٥ و ٨ الدنا الكروموسومي للسلاله *E. coli*
***E. coli* MM294 .٣ و ٦ و ٩ الدنا البلازميدي للسلاله MM294 المتحوله.**

على وفق نتائج هذه الدراسة يمكن الاستنتاج ان استخدام المطفرات الكيميائية زاد من قدره البكتريا قيد الدراسة على استهلاك الفينول والانلين وبنسب تحلل اعلى مما كانت في العزلات البرية ونجاح تحييد بلازميدات العزلات *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* وفشل الحصول على عزله محيدة لل *Enterobacter cloacae* باستخدام الصبغات الاكردين البرتقالي و بروميد الاثيديوم ومادة (SDS). هذا بالاضافة الى ان هناك امكانية لتحويل سلاله البكتريا *E. coli* MM294 بالدنا البلازميدي المستخلص من العزلات *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و *Enterobacter cloacae* اي ان الجينات المسؤوله عن تحلل الفينول والانلين للعزلات المستعمله في الدراسة بلازميدية المنشأ.

References

[1] Abd-El-Haleem D, Moawad H, Zaki E, Zaki S. 2002. Molecular characterization of phenol degrading bacteria isolated from different Egyptian ecosystems. Microbiol. Ecol. 43: 217-224. 2002.
[2] Cello, F.o.; Pepi،M.; Baldi، F. and Fani, R. 1997. Molecular Characterization of an n-alkane Degrading Bacterial Community

[12] Slater, J.H. and Bull, A.T. 1982. Environmental Microbiology biodegradeation. Phil, Trans R. Soc. Lond. B297:575-597.

[13] Atlas, R.M; Parks, L.C. and Brown, A.E. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. Mosby. London.

[14] MacFaddin, F. J. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Printed in united state of America.

[15] Collins, C. H. and Lyne, P. M. (1987). Microbiological Methods. 5th ed. Churchill Livingstone. London.

[16] Herman, D.C.; Zhang, Y. and Miller, R.M. (1997) Rhamnolipid (Biosurfactant) Effect On Cell Agreement and Biodegradation Of Residual hexadecane Under Saturated Flow Conditions. Appl. Envi- Ron. Microbiol., 63:3622-3627.

[17] Grit, N.; Riho, T.; Liis, M.; Maia, K.; Frieder, S. and Hermann, J. H. (2004). Simultaneous Degradation of Atrazine and Phenol by *Pseudomonas sp*. Strain ADP: Effects of Toxicity and Adaptation. Appl. Enviromen. Microbiol. 70(4):1907-1912.

[18] Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Costilow, R.N.; Nester, E.W.; Wood, W.A.; Krieg, N. R. and Phillips, G. B. 1981.Manual of Methods for general Bacteriology. Section II, P.P.221-242.

[19] Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C. and Turck, M. (1966). Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 36 (3): 493 – 496.

[20] National Committee for Clinical Laboratory Standards. $NCCL_S$ 2002. performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth inform-ational supplement. Vol. 22(1). National Committee for Clinical Laboratory standards, Wayne.

[21] Pospiech, A. and Neuman, L. 1995. Salting out procedure for the isolation of genomic DNA. cited by kieser, T.(1995). Norwitch, UK.

[22] Trevors, J. T. (1986).plasmid curing in bacteria.FEMS Microbil.Lett.32:149-157.

[23] Maniatis, T.; Fritsch, I.N. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring. New York.

[24] Pfaender, F. K. and Bartholomew, G.W. (1982). Measurement of aquatic biodegradation rates by determining heterotrophic uptake of radiolabeled pollutants. Appl. Enviromen. Microbiol. 44:159-164.

[25] Deng, Y. L.; Jurgen، E.; Beate، W.; Joachim, K. and Franz, L.(1991). Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Azotobacter sp*. Strain Gp1.Appl. Enviromen. Microbiol. 57(7):1920-1928.

[26] Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology (2004). Published by Wiley-Interscience.

[27] Sneath, P. H. A.; Mair، N. S.; Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986). Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Vol.2 Williams and Wilkins. Baltimore.

[28] Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. Maryland USA.

[29] Trevors, J. (1986). Plasmid curing in bacteria. Fems. Microbiol. Rev. 32 149-157.

[30] Woodford, N. and Johnson, A.P. (1998). Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications (ed.). Central Public Health Laboratory, London، U.K., pp. 64-642.

[31] Elhag, K; Reed, M. and Hassan, M. (1991). The Prevalence of antibiotic resistance among gram negative *bacilli* from intensive care units in Oman. Sau. Med. J. 20 (5): 373-377.

[32] Gupta, K.; Scholes, D. and Stamm, W. E. (1999). Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. JAMA. 281: 736 – 738.

[33] Haigler, B., E. and Spain، J., C. 1989. Degradation of p-Chlorotoluene by a Mutant *of Pseudomonas sp*. Strain *JS6*. Appl Environ Microbiol. 55: (2) 372-379.

[34] Kazutaka, A.; Kenya, S.; Akio, K.; Junichi, K. and Hisao, O.1997. d Characterization of *Enterobacter cloacae*

Phenol by the Resistant *Enterobacter cloacae* Strain EM. Appl. Enviromen. Microbiol, 67 (6): 2404–2409.

[44] Kazutaka, A.; Kenya, S.; Akio، K.; Junichi, K. and Hisao, O. (١٩٩٧). Isolation and Characterization of *Enterobacter cloacae* Mutants Which Are Defective in Chemotaxis toward Inorganic Phosphate. J.Bacteriol 179 (19): 6192–6195.

Abstract

In this study، 30 bacterial isolates were obtained from 55 soil`s sample and 10 bacterial isolates were obtained from water sample that contaminated with oil derivatives. These isolates were submitted to phenol and analine degradation. Five isolates were selected depending on their ability to degraded these compounds and identified as *Pseudomonas aeruginosa* A5، A13 and *Escherichia coli* A2، A11 and *Enterobacter cloacae* A8. In order to increase the degradation percentage a number of mutant cells were obtained using 500 mg/ml of N-methy –N-nitro-N- nitrosoguanidine (NTG) at different periods (0.5،1.0 and 2.0) hours. The percentage of degradation were increased to, 90,90,97% for phenol by (a11، a13 and a8) and to 90,97,100% for analine at 2500 mg/ml.

The result of gel electrophoresis indicated that A13, A8 and A8 contain three plasmid bands whereas A11, a13 and a11 contain only two.

In order to determine the genetic factors which responsible for degradation of phenol and analine، curing of plasmid were applied to A8, A13 and A11 using acridine orange، ethidium bromide and Sodium dodecyl sulfate (SDS) as curing agent. Result indicated that using 2200 mg/ml of SDS and 200 mg/ml of acridine orange two curing cells for A13c، A11c mutant isolates were obtained while A8M12 failed to obtained curing cells due to the losing of their ability for degradation phenolic compounds. Further more، Plasmid DNA of (A11,A13,A8) bacterial isolates were transformed to bacterial strain *E. coli* MM294 bacterial strain. the ability of *E. coli* MM294 to grow on phenol and analine culture media may indicate that the genes responsible for degradation of these compounds were located on plasmid DNA.

Mutants Which Are Defective in Chemotaxis toward Inorganic Phosphate. J.Bacteriol 179 (19): 6192–6195.

[35] Carlton, B.C., and Brown, B.J. (1981). Gene mutation In: "Manual of methods for general bacteriology, p.p 222–242. Gerhardt, p.; Murray, R.G.E.; Costihow, RN.; Nester, E.W.; wood, W.A. Krieng, N.P. and Philips, G.B. (eds.) American society for Microbiology, Washington.

[36] Eduardo, D.; Abel, F.; Mari´a, A.; Prieto and Jose´ l, G.(2001). Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli* Microbiol and Molecular. Biol. 65 (4): 523–569.

[37] Synder, D. and Champness, W. 1997. Molecular genetics of Bacteria. Mutation in Bacteria. p.p. 75 – 103.

[38] Thkura, I.S.; Verma, P.K.; Upadhaya, K.C.2001. Involvement of plasmid in degradation of pentachlorophenol by *Pseudomonas sp*. from a chemostat. Biochem Biophys Res Commun. 286 (1): 109-13.

[39] Vasudevan, N.; Bharathi, S. and Arulazhaqan, P. 2007. Role of plasmid in the degradation of petroleum hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens NS1*. J. Environ Sci Health Environ Eng 42 (8): 1141-6 1761.

[40] Eduardo, D.; Abel, F.; Mari´a, A.; Prieto and Jose´ l, G.(2001). Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli* Microbiol and Molecular. Biol. 65 (4): 523–569.

[41] Saha, R. P.; Singh، J. P.; Verma and Jayaraman, J. 2000. Plasmid-borne determinants of colony morphology, pigmentation, antibiotic resistance and antibiosis in *Pseudomonas* species antagonistic to bacterial blight of cotton. Current Science. 79(9): 1384- 1385.

[42] Deshpande, N.M; Dhakephalkar, P.K. and Kanekar, P.P. 2001. Plasmid-mediated dimethoate degradation in *Pseudomonas aeruginosa MCMB-427* Applied Microbiology. (33):275-279.

[43] Nelly, V.; Franc¸ O.; Loredana, V.; Maryse, D.; Jean-guy, B.; Re´jean, B. and Richard, V. 2001. Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into