استخلاص وتشخيص الأحماض الدهنية لبكتريا *Sinorhizobiummeliloti*

علياء حازم عبد الرزاق القصيمي

قسم علوم الحياة / كلية التربية للبنات

جامعة الموصل

الاستلام	**القبول**
2012 / 03 / 25	**2012 / 06 / 06**

ABSTRACT

The current study sought to investigate one of the determining factors of symbiosis between rhizobium bacteria and legumes (i.e. multi sugary acids of *Sinorhizobium meliloti*), where fatty acids on the lipid A chain were extracted and esterified for analysis using Gas-Liquid Chromatography (GLC) and determination. Moreover, a number of standard fatty acids were analyzed for comparison with fatty acids extracted from *S. meliloti*.

Results show predominance of unsaturated Palmitoleic acid (C16:1) with percentage of 29.299. Furthermore, a number of saturated and unsaturated fatty acids, which levels exceeding model fatty acids analyzed within the scope of the study, were determined.

الخلاصة:

أهتمت الدراسة الحالية بدراسة إحدى العوامل المحددة للعلاقة التعايشية بين بكتريا الرايزوبيوم والنباتات البقولية، (وهو عديد السكريات الدهنية العائد لبكتريا *Sinorhizobiummeliloti*) حيث تم استخلاص الاحماض الدهنية الموجودة على سلسلة الحامض الدهنيLipid A لعديد السكريات الدهنية واسترتها لغرض تحليلها باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز-السائل GLC ومن ثم تشخيصها، فضلا عن تحليل عدد من الاحماض الدهنية القياسية لغرض مقارنتها مع الأحماض الدهنية المستخلصة من بكتريا *S.meliloti*.

بينت النتائج سيادة الحامض الدهني غير المشبع البالمتوليك Palmitoleic acid (C16:1) بنسبة مئوية 29.299%. بالإضافة إلى تشخيص عدد آخر من الأحماض الدهنية

المشبعة وغير المشبعة والتي تجاوزت نسبها المئوية بشكل عام الأحماض الدهنية القياسية التي تم تحليلها ضمن الدراسة.

المقدمة

تعود بكتريا *Sinorhizobiummeliloti* إلى عائلة *Rhizobiaceae* من جنس *Rhizobium* والتي لها القابلية على الاقتران بعلاقة تعايشية متخصصة مع نباتات العائلة البقولية وهي الجت *Medicago*والبرسيم الحلو *Melilotus* والحلبة *Trigonella*، لينتج عن هذه العلاقة تراكيب تسمى بالعقد الجذرية يتم داخلها تثبيت النتروجين الجوي إلى الأمونيا[1]، وتمتاز بكون خلاياها عصوية الشكل ذات أبعاد (0.9 × 3.0 µm) سالبة لصبغة كرام، غير مكونة للسبورات متحركة بأسواط محيطية أو قطبية أو تحت قطبية درجة الحرارة المثلى للنمو تتراوح بين 25−30°م، وتنمو بهيئة مستعمرات بيضاء لزجة على الأوساط الصلبة الحاوية على مستخلص الخميرة والأملاح المعدنية وعلى سكر المانيتول أو الكلوكوز منتجة طبقة كاربوهيدراتية لزجة خارج خلوية[2]، وطبقة عديد السكريات الدهنية Lipopolysaccharides والتي تتركب أساساً من جزئي الحامض الدهني Lipid A المرتبط باللب وكذلك السكريات المتعدد Polysccharides والحامل لمجموعة O-antigen[3].

وتتواجد الأحماض الدهنية الخلوية في البكتريا السالبة لصبغة كرام بأشكال عدة منها الأحماض المشبعة المستقيمة السلسلة أو غير المشبعة الأحادية أوالمتعددة وكذلك الأحماض المتفرعة المثلية إلا أن اكثرها شيوعاً هي الأحماض التي تحتوي على حلقات سايكلو بروبان أو مجاميع هيدروكسي Hydroxy[4]، وقد بينت بعض الدراسات أن الأحماض الدهنية المستخلصة من بكتريا *S.meliloti* كانت على نوعين مشبعة وغير مشبعة وإن هناك عوامل عديدة ومختلفة تؤثر بشكل مباشر في أطوال السلاسل الدهنية Fattyacylchains ومكوناتها من الأحماض الدهنية واعداد الحزم الموجودة فيها[5].

في حين بينت أغلب الدراسات أنواع الدهون الداخلة في الغشاء الخلوي لبكتريا *S.meliloti* وتبين انها من الدهون الفوسفاتية المؤثرة في العلاقة التعايشية الجزيئية بين البكتريا المذكورة آنفاً والنبات البقولي المتخصصة بإصابته[6]، وقد اتضح أن من أهم الدهون المفسفرة التي تدخل في تركيب الغشاء الخلوي هي الفوسفاتيديلكليسرولPhosphatidyl glycerol، والفوسفاتيديل ايثانول أمين Phosphatidylethanolamine وفوسفاتيديل كولين Phosphatidylccholine[7] حيث يدخل في تركيبها الكليسرول وحامض الفوسفوريك وأحماض دهنية مشبعة أو غير مشبعة[8].

تعد تقنية كروماتوكرافيا الغاز السائل Gas-Liguid Chromatography (GLC) من اهم التقنيات المستخدمة في الكيمياء التحليلية والحياتية وذلك لكونها من الطرق الحساسة

والسريعة والبسيطة والتي تمتاز بدقة المعلومات النوعية والكمية فضلاً عن احتياجها لكميات صغيرة جداً من العينة المراد قياسها، لذلك تستخدم في فصل الغازات أو المواد التي يمكن تحويلها إلى الحالة الغازية بسهولة[9]مثل الأحماض الدهنية التي لا يمكن تحليلها بصورة مباشرة إلا بعد تحويلها بهذه التقنية إلى مشتقات أكثر تغايراً ولاسيما على هيئة استراتمثيلية[10].

ونظراً لعدم وجود دراسة محلية حول التركيب الجزئي لسلسلة الحامض الدهني الخلوي Lipid A لبكتريا *S.meliloti* وما تحتويه من الأحماض الدهنية ونسبها المئوية لذلك اعتمدنا هذه الدراسة البحثية لتحليل وتشخيص الأحماض الدهنية باستخدام تقنية GLC الشعري للتعرف على أنواعها ونسبها المئوية.

المواد وطرق العمل

أولاً: عزل بكتريا *S.meliloti* واختبار تخصصها العائلي

عزلت بكتريا *S.meliloti* من نباتات الجت *Medicago sativa* النامية من أحد حقول مدينة الموصل. وتم التأكد من تشخيصها باختيار تخصصها العائلي باتجاه نبات الجت[11، 12].

ثانياً: استخلاص الأحماض الدهنية

استخلصت الأحماض الدهنية الخلوية من بكتريا *S.meliloti* النامية في وسط Mannitol salt yeast extract medium (YEM) السائل في الحاضنة الهزازة من نوع (New brunswich scientific Co. Inc Edison N.J., U.S.A) عند درجة حرارة 28±2°م بإضافة 5 سم^3 من هيدروكسيد الصوديوم NaOH (7.5 مولر)، المذاب في الميثانول بعد تخفيفه بالماء المقطر بنسبة 6 :4 حجم : حجم إلى 0.2 غم من خلايا البكتريا سخن المزيج بدرجة 100°م لمدة 90 دقيقة باستخدام جهاز الـ Water bath نوع (M96K) ثم ترك ليبرد وأضيف إليه 6 سم^{3}من ماء المقطر، ضبطت الدالة الحامضية للمزيج على 2 باستخدام حامض H_2SO_4 تركيزه 20% ثم أضيف إليه 30- 50 سم^3 من Diethyl ether ووضع في قمع الفصل،وبعد ان فصلت الطبقة العليا الحاوية على الأحماض الدهنية حفظت في قناني معقمة لاسترتها[13، 14].

ثالثاً: أسترة الأحماض الدهنية

بعد اكتمال الاستخلاص تم استرة الأحماض الدهنية بإضافة 5 سم^3 من BF_3 (BaromTriflorid) تركيزه 14% وسخن المزيج بدرجة 85°م مدة 15 دقيقة ثم أضيف 1 سم^3 من مزيج البنتان داي اثيل أيثر 1:1 حجم: حجم، ثم نقلت المستخلصات الحاوية على استر مثيل الأحماض الدهنية إلى أنابيب اختبار نظيفة وتم تركيزها تحت ظروف مشبعة ببخار غاز

النتروجين ثم سحبت منها الرطوبة باستخدام 200 ملغم من كبريتات الصوديم اللامائية التي أضيفت إلى مستخلصات أستر مثيل الأحماض الدهنية ثم نقلت النماذج إلى أنابيب اختبار نظيفة وحفظت بدرجة 25°م[15].

رابعاً: تحليل الاحماض الدهنية باستخدام جهاز GLC

تم تحليل الأحماض الدهنية في دمشق بسوريا (مختبرات وزارة الصناعة) وذلك باستخدام جهاز GLC الياباني المنشأ (SHIMA DZUC 2010) ذو المواصفات الآتية:

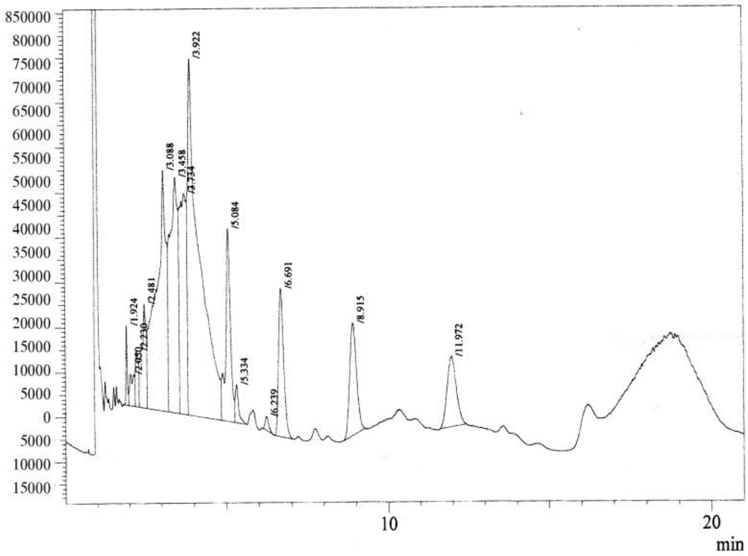
اسم العمود	TR-WAX
درجة الحرارة	200°C
طول العمود	30 m
قطر العامود	0.32 mm
الغاز الحامل	N_2
زمن الاحتباس	30 min

رفعت درجة حرارة العمود بمعدل 5°م/ دقيقة من 175°م إلى 200°م وللحصول على اللهب نظمت درجة حرارة الكاشف على 250°م. حقنت عينات الأحماض الدهنية بواقع 1 مايكرو ليتر/نموذج وتم التعرف على أنواع الأحماض الدهنية ونسبها المئوية بمقارنة زمن احتباسها Retention time مع أوقات ظهور الأحماض الدهنية القياسية.

النتائج والمناقشة

استجابت بادرات نبات الجت *M. sativa* عند تلقيحها ببكتريا *S.meliloti* بدلالة تشوه الشعيرات الجذرية للبادرات أولاً ثم ظهور العقد الجذرية على الجذر الرئيسي والجذور الجانبية لهذا النبات بعد (3و7) أيام من التحضين على التوالي.

وأبدت نتائج تحليل محتوى العزلة المحلية لبكتريا *S.meliloti* من الأحماض الدهنية الحصول على عدد من الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة بنسب متفاوتة باعتماد تقنية GLC الشعري بمقارنة زمن الاحتباس للأحماض المستخلصة من البكتريا مع زمن احتباس الأحماض القياسية مع الإشارة إلى الحصول على قراءات لزمن احتباس أحماض دهنية أخرى الا اننا لم نتمكن من تحدد هويتها لعدم توفر الأحماض القياسية الخاصة بها لغرض مقارنتها، ولسهولة قراءة النتائج الواردة في كل من الشكل (1) الذي يمثل نتائج تحليل الأحماض القياسية وزمن احتباسها مقدراً بالدقائق والشكل (2) الذي يمثل نتائج مزيج الأحماض الدهنية المستخلصة من البكتريا، فقد تم تنظيمها في الجدول (1) و(2) على التوالي.



الشكل (1): الأحماض الدهنية القياسية

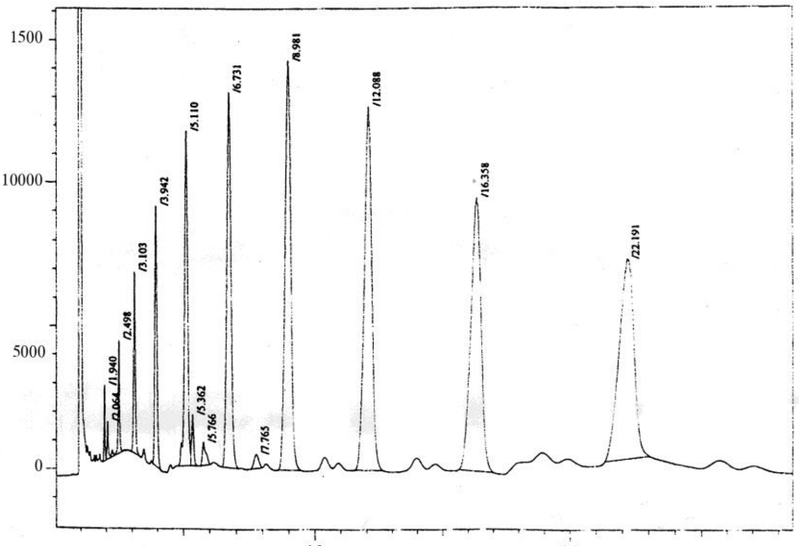
الجدول (1): الأحماض الدهنية لمزيج من (12) حامض دهني- نماذج قياسية-

الأحماض الدهنية القياسية	المختصر	زمن الاحتباس (الدقيقة) Retention time	النسبة المئوية (%)
الكابريك	C10:0	1.940	0.498
الليوريك	C12:0	2.064	0.314
الميريستك	C14:0	2.498	1.151
البالمتيك	C16:0	3.103	2.156
البالمتوليك	C16:1	3.942	3.863
السيترك	C18:0	5.110	7.062
الأوليك	C18:1	5.362	0.701
اللينوليك	C18:2	5.766	0.546
اللينولينك	C18:3	6.731	10.212
الاراكيدونك	C20:4	8.981	15.405
الايكوزا بيتا انيويك	C20:5	12.088	18.547
الدوكوساهيكانيويك	C22:6	16.358	19.397

وتبين النتائج الواردة في الجدول (2) أن عدد الأحماض الدهنية المشبعة تساوي عدد الأحماض الدهنية غير المشبعة وعلى التوالي 5:5 وإن الأحماض الدهنية المشبعة ارتفعت أو بقيت ضمن نفس المدى بالنسبة للأحماض الدهنية القياسية الموضحة في الجدول (1) وقد ارتفعت نسبة حامض البالمتيك (Palmitic) C16:0 والميرستيك (Myristic) C14: 0 لثمان

وثلاث أضعاف على التوالي. أما الأحماض الدهنية غير المشبعة فقد لوحظ ارتفاع نسبة حامض البالمتوليك (Palmitoleic) C16:1 بشكل كبير جداً.

في حين انخفضت بقية الأحماض الدهنية غير المشبعة ما عدا حامض الأوليك (Oleic) C18:1 ليبقى ضمن نفس المدى وكما هو موضح في الجدول (2) وبشكل الحامض الدهني C16:1 أعلى نسبة من بين الأحماض الدهنية الخلوية لبكتريا *S.melilote* حيث بلغت 92.299% يليها الحامض الدهني C16:0 حيث بلغت نسبته المئوية 17.317% في حين أن هذين الحامضين يشكلان كمية قليلة لا تتجاوز 2% من مجموع الاحماض الدهنية الكلية[16]، وقد يعزى هذا الاختلاف غالباً إلى تأثير كل من وسط النمو وعمر المزرعة ودرجة حرارة التحضين في تركيب الأحماض الدهنية[4] إضافة إلى مدى توفر كميات من المواد الأساس للمكون النهائي لهذه الأحماض مثل الأحماض الأمينية متفرعة السلسلة التي تؤثر على نسب وكمية الأحماض الدهنية متفرعة السلسلة[17] فضلاً عن أن هذين الحامضين الدهنيين C16:0 وC16:1 يدخلان في تركيب الأحماض الدهنية غير المفسفرة[18]، وهذا يفسر التأثير السلبي لسلسلة الحامض الدهني Lipid A المعزول من مركب LPS على انقسام الخلايا المفردة وتثبيطه عملية الأكسدة الخلوية في مزارع المعلقات الخلوية للنباتات البقولية[19].



الشكل (2): الاحماض الدهنية المشخصة من سلسلة الحامض الدهني Lipid A المعزولة من بكتريا *S.meliloti*

الجدول (2): الأحماض الدهنية المشخصة من سلسلة الحامض الدهني Lipid A المعزولة لبكتريا *S.meliloti*

الأحماض الدهنية المشخصة	المختصر	زمن الاحتباس (الدقيقة)	النسبة المئوية (%)

		Retention time	
الكابريك	C10:0	1.929	0.739
الليوريك	C12:0	2.050	1.035
الميريستك	C14:0	2.481	3.369
البالمتيك	C16:0	3.088	17.317
البالمتوليك	C16:1	3.724	29.299
السيترك	C18:0	5.084	6.682
الأوليك	C18:1	5.334	0.882
اللينولينك	C18:3	6.691	5.256
الاراكيدونك	C20:4	8.915	5.428
الايكوزا بيتا انيويك	C20:5	11.972	4.656

واذا ماقارنا نتائجنا الحالية بنتائج دراسات أخرى تناولت بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام *Pseudomonas aeruginosa*،*Plesiomonas Shigelloids*.[20]. فنلاحظ تفوق البكتريا قيد الدراسة لمحتواها من الأحماض الدهنية، اما بكتريا*Proteus mirabilis*فقد احتوت على حامضين دهنين فقط هما الليوريك C12:O (Lauric) وحامض الميرستك (Myristic) C 12 :0 بنسب 13.130٪ و 17.349 على التوالي. في حين اذا ما قورنت مع بكتريا *Legionella Pneumophila* فاننا نلاحظ سيادة الحامض الدهني المشبع (Palmitic) C16:O حيث بلغت 14.7٪ فيما كان الحامض الدهني الليوريك C12:O (Lauric) متواجداً بأقل نسبة بلغت 1.57٪[21].

كما أكدت العديد من الدراسات اعتماد تحليل الأحماض الدهنية كطريقة بديلة للطرق المظهرية والجينية المعتمدة في تشخيص وتصنيف العديد من أنواع البكتريا وخصوصاً تلك الأنواع صعبة التشخيص [22، 23].

وتعتبر هذه أول دراسة بحثية بينت توزيع الأحماض الدهنية كماً ونوعاً في سلسلة الحامض الدهني Lipid A الواقعة في عديد السكريات الدهنية LPS لبكتريا *S.meliloti* بنوعيها المشبعة وغير المشبعة.

المصادر

1) Jones, K.M; Kobayashi, H.; Davies, B.W.; Taga, M.E. and Walker, G.C.2007. How rhizobialsymbionts invade plants: the *sinorhizobium-medicago* model. Nat. Rev. Microbiol. (5): 619-633.

2) Lodwig, E. and Poole, P. 2003. Metabolism of Rhizobium bacteriods. Crit. Rev. Plant Sci. (22): 37-78.

3) Garg, N. and Geetanjali, A. 2007. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. AreviewAgron. Sustain. Dev. 27: 59-68.

4) Willey, J.W.; Sherwood, L.M. and Woolverton, C.J. 2008. Prescott, Harley and Klein's microbiology. 7th ed. McGraw-Hill companies. Inc. New York.

5) Koivusalo, M.; Haimi, P.; Heikinheimo, R.K. and Somerharju, P.2001. Quantitative determination or phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and Lipid concentration on instrument response. J. Lipid Res.42: 663-672.

6) Mahalakshmi, V.; Margreet, A.W. and Geert-Jan, B.2007. Agonistic and tagonsistic of a properties of a Rhizobium sin-1 Lipid A modified by an ether-linked lipid. Org. Biomol. Chem. 5: 2087-2097.

7) Lopez-Lara, I.M.; Gao, J.L.; Soto, M.J.; Solares- Perez, A.; Weissenmayer, B.; Shohlenkamp, C.; Verroies, G.P.; Thomas-Oates, J. and Geiger, O. 2005. Phosphorus- free membrane lipids of *sinorhizobiummeliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting condition of growth. Mol. Plant microbe. Interact. 18: 73-82.

8) أحمد، طارق يونس الهلاليولؤي عبد علي، 2010، الكيمياء الحياتية، دار ابن الأثير للطباعة والنشر، جامعة الموصل: 166-167.

9) الغبشة، ثابت سعيد وسمير عبد الرحيم. 1986. مدخل إلى تقنيات الفصل في الكيمياء. مطبعة جامعة الموصل.

10) Gunstone, F.D., Harwood, J.L. and Padely, F.B. 1994. The Lipid Hand Book 2nd ed., Chapman and Hall, London, UK, 195:243-244.

11) Burdass, D. (2002). Microbes in Enviroment. In: Society for General Microbiology. (Eds., Janet, H.) SGM, Marliborough House, Basing stote Road, Spencer, wood, Reading RG71.

12) Prasad, C.K.; Vineetha, K.H.; Hassani, R., and Randhawa, G.S., (2000). Isolation and Symbiotic characterization of aromatic amino acid auxorophs of sinorhizobium meliloti. India, J. Exp. Bio., 38: 1041-1049.

13) Fourche, J. 1989. Gas chromatographic fatty acid determination to differentiate nocardia asteroids, mycobacterium fortuitum andmycrobacteriumcheloneJ. Chrom. 487: 142- 146.

14) Al-kaisy, M.T.; Hadwan, H.A.; Saleh, H.M. and Hussen, A.k. 1991. Determination of citric and oxalic acid in fermented solutions of *Aspergillusniger* by Gas-Liquid chromatography. Iraqi J. Microbiol. 3: 170-177.

15) Morrison, W.R. and Smith, L.M. 1964. Esterification of fatty acids. J. lipid. Rev. 5: 151-159.

16) Basconicllo, L.S.; Zaheer, R.; Finan, T.M. and Mc carry, B.E. 2009. Ashotgun Lipidomics approach in *Sinorhizobium meliloti* as atool in functional genomics. J. Lipid. Rev. 50:1120- 1132.

17) Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weiss feld, A.S. 2002. Bailey and Scott's Medical Microbiology. 11th ed. Mosby. Inc. China: 482-486.

18) Geman. J.B.; Gillies, L.A.; Smilowitz, J.T.; Zivkovic, A.M. and A.M. and Watkins, S.M. 2007. Lipidomics and Lipid profiling in metabolomics. Curr. Opin. Lipidol. 18: 66-71.

19) Scheidle, H.; Grab, A. and Nichaus, K. (2005). The lipid A substructure of *Sinorhizobium meliloti* lipopoly saccharides is sufficient ot suppress the oxidative burst in host plants. New phytologist, 165:559.

20) الراوي، أميرة محمود محمد والطائي. غادة عبد الرزاق محمد، برهان. شفق طارق.2007. قياس نسب الأحماض الدهنية لبعض الجراثيم السالبة لصبغة كرام. –المؤتمر العلمي الأول لعلوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل.

21) الراوي، أميرة محمود محمد. 2009. دراسة محتوى جرثومة *Legionella Pneumophila* المعزولة محلياً من الاحماض الدهنية. المؤتمر العلمي الاول لعلوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل.

22) Kellogg, J.A.; Bankert, D.A.; Brenneman, T.M.; Grove, M.A.; Wetzel, S.L. and Young, K.S. 1996. Identification of Clinical isolated of non-Eentrobacteriaceae gram – negative rods by computer-assisted gas-Liuid Chroma to graphy.J.Clin. Microbiol. 34:1003-100.

23) Vauterm, L.; Young, P.and Swings, J. 1996 Utilization of fatty acid methyle esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species Int.J. syst. Bacteriol. 46:298-304.