دور البلازميدات في أستهلاك الاگار من قبل بكتريا *Pseudomonas sp.* HK_1

عبد الكريم عبد الرزاق القزاز*

تاريخ قبول النشر 2007/2/5

الخلاصـة:

جمعت(40) عينة (ماء وتربة) من مناطق مختلفة من العــراق و سوريــا . أ ظــهرت (6)عزلات قابليتها على النمو على وسط الأگار واستهــلاكه كمصــدر وحيد للكاربون والطــاقة .أكدت الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية عائديتها للجنس *Pseudomonas* (HK_6-HK_1) .درس النسق البلازميدي للعزلات لمعرفة دور البلازميدات في اظهار صفة استهــلاك الاگار وا ظهرت نتائج الترحيل الكهربائي أحتواء العزلات على (3 – 2) حزم بلازميدية أختيرت العزلــة HK_1 وذلك لكفاءتها وقابليتها للنمو بكثافة على وســط الأگار الانتقائي لأ جراء تجارب النقل و ا لتحييد . أظــهرت نتائج تجــارب التحــول ان بلازميد العزلة HK_1 له ا لقدرة علــى التعبير ا لمظــــهري في بكتريا *E. coli* MM294. ،أي انها ذات مدى مضيفي واسع ، وان الجينات الوراثية المسؤولة عن اظهار صفة أستهلاك الأگار كانت بلازميدية الموقع وهذا ما اكدته تجارب التحييد .

المقدمة:

أستخدمت البكتريا المعزولة من بيئات مختلفة (ماء ، تربه) لفترة طويلة كمصادر لمنتجات طبيعية أستعملت في الطب والزراعة و الصناعة. شخصت البكتريا المستهلكة للأگار كمصدر وحيد للكاربون لأول مرة سنة 1902من قبــــل العــــالمGran (1) عزلت بعد ذلك العديد من السلالات البكتيرية المستهلكة للأگار من البيئات البحرية و المائية و كذلك من البيئات الاخرى . غالبا ما تنتشر الاحياء المستهلكه للاگار في البيئات البحريه ، ولكنها وجدت ايضا في البحيرات العذبه ، مياه التصريف الصحي و التربـــه(2) .تعود هذه البكتريا الى الاجناس منها : Pseudomonas (3) ،(4) ، *Cytophaga* (5)، *Streptomyces*(6)، *Vibrio* (7) ، *Alteromonas*(8) ، *Alerococcus* (9) ، *Microscilla* (10) .

تلعب هذه البكتيريا دور مهم في تحليل العديد من المواد العضوية على حواف الأنهار، البحار و المحيطات و هو الموقع الذي يكون فيه الأگار المكون الرئيسي المهم للسكريات المتعددة المنتجة من قبــل ا لطحالب الحمراء *Rhodophyata* (11) .

يتركب الاگار من مجموعتين من السكريات المتعدده المعقده هما الأگاروز (Agarose) وألــ (agropectin). يعتبر الاگاروز الجــزء المتحــلل بفعل انــزيم الاگـا ريز المنتج من قبل الاحياء المستهلكه للاگا ر (12) .

أشارت الدراسات ألى أن أنزيم الأگاريز هو من الأنزيمات المهمة المعزولة من البكتيريا المستهلكة للأگار والموجودة في البيئة البحريه (Marine) . بالإضــافة ألــى دوره فــي هضــم الأگاروز هنالك انواع اخرى من الانزيم تعمل على مواد أخرى غير الأگار مثل النشاء ، البكتين و المشتقات الأخرى للسكريات المتعددة (12) .

تصنف الانزيمات المحلله للاگاروز الى مجموعتين الفا-اگاريز وبيتا- اگاريز ،وقد تمت تنقية الانزيم من انواع مختلفة من الاحياء المجهرية . يمثل أنزيم الأگاريز نظام لتوضيح القواعد أو المستويات االجزيئية لتحلل أو استهلاك أغلب السكريات المتعددة المفسفرة (13)،(14) .

لوحظ أن العوامل الوراثية المشفرة لصفة الاستهلاك الحيوي لهذا النوع من السكريات المتعددة في بعض الانواع البكتيرية هي جينات بلازميدية الموقع ، لذا كان هدف البحث هو تحديد قابلية العزلات قيد الدراسة في أستهلاك الأگار كمصدر وحيد للكربون والطاقة و دراسة دور البلازميدات في اظهار هذه الصفة ليتسنى لنا مستقبلا أستخدام هذه البلازميدات لتطوير عزلات تستهلك مدى واسع من هذه السكريات المتعددة .

*قسم التقنيات الاحيائية،كلية العلوم،جامعة بغداد

المواد و طرائق العمل

1. العزلات البكتيرية : جمعت أربعين عينة (ماء و تربة) من مناطق مختلفة في العراق

وسوريا 23 عينة تربة و 17 عينة مياه كما موضح أدناه:-

آ. العراق

1.	بغداد - نهر دجلة	2 عينة تربة + 2 عينة مياه
2.	بغداد - نهر الفرات	2عينة تربة + 1عينة مياه
3.	العمارة - المشرح	5 عينة تربة + 5 عينة مياه
4.	واسط- الكوت	2 عينة تربة +1 عينة مياه
5.	بصرة - شط العرب	5 عينة تربة +1 عينة مياه
6.	السليمانية - سد دوكان	5 عينة تربة + 5 عينة مياه
ب.	سورية - طرطوس	2 عينة تربة + 2 عينة مياه

أظهرت 6عزلا ت القابلية على النمو على وسط الاملاح المعدنية الصلب(وسط الاگار) كمصدر وحيد للكاربون وأعطيت الرموز(HK_1 – HK_6). أنتخبت العزلة HK_1 والعائدة للجنس الـ *Pseudomonas* و أظهرت القابلية على استهلاك الأگار لنموها الكثيف كأ كفأ عزلة .

2. **استهلاك العزلات للأگار :** أستخدم وسط الأملاح المعدنية المعقم المضاف له (وسط الاگار) كمصدر وحيد للكاربون والطاقه والموصوف في (15) .

3. **أستخلاص الدنا البلازميدي** : عزل الدنا البلازميدي من العزلات (HK1 – HK6) و ذلك بأتباع طريقة الترسيب بالاملاح المحوره من قبل (16) .

4. **الترحيل الكهربائي الهلامي** : حدد محتوى البكتريا من البلازميد بعد ترحيل الدنا البلازميدي المستخلص على هلام الأگاروز % 0.8 حسب الطريقة الموصوفة من قبل (17) .

5. **تحييد بلازميدات العزلات** : أستخدمت مادتي أل Sodium Dodecyl Sulphate(SDS)، Bromide(EB) Ethidium لتحييد البلازميدات ، و للتحري عن المستعمرات المحيدة ، كررت 300 مستعمرة لكل معاملة من هذه المعاملات على وسط الأملاح المعدنية الصلب (وسط الأگار) المضاف اليه الأگار كمصدر وحيد للكاربون و الطاقة و كررت نفس المستعمرات على الوسط المذكوراعلاه ، حضنت جميع الأطباق بدرجة حرارة 37 م و لمدة 24 ساعة .

حددت المستعمرات التي فشلت في النمو على الأوساط الاننقائية(وسط الاگار) و أكدت قابليتها على استهلاك الأگار كمصدر وحيد للطاقة و الكاربون . أستخلص الدنا البلازميدي من المستعمرات التي أظهرت تغييرا في قابليتهاعلى استهلاك الأگار و تم ترحيله على هلام الأگاروز و قورنت الحزم الناتجة مع الحزم البلازميدية للعزلات الأصلية .

6. **التحول** : أجريت تجربة التحول و ذلك بأستعمال الـ DNA الكلي المعزول من السلالات تحت الدراسة . و تم نقله الى بكتريا ألـ MM 294 *E.coli* بالاستفادة من الطريقة الموصوفة من قبل (18) وبعد أجراء عملية التحويل نشرت عينات بعد أجراء تخافيف مناسبة على وسط الأملاح المعدنية الصلب (وسط الأگار) حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة .

النتائج والمناقشة

*** تشخيص العزلات** : تم أختيار 6 عزلات وذلك لقابليتها العالية على أستهلاك الاگاركما موضح بالجدول رقم (1)

جدول (1) العزلات التي تملك القابلية على تحليل الاگارومناطق عزلها ونوع النماذج

العزلة	المنطقة	نوع العينة
HA1	سوريا – طرطوس	عينة مياه (ساحل)
HA2	سوريا – طرطوس	عينة مياه (ساحل)
HA3	بغداد – نهر دجلة	عينة تربة
HA4	العمارة – المشرح	عينة تربة
HA5	الفلوجة – نهر الفرات	عينة مياه
HA6	واسط-الكوت	عينة تربة

وبعد دراسة الصفات المظهرية من شكل المستعمرات وشكل الخلايا البكتيرية والاختبارات الكيموحيوية أثبتت الفحوصات عائدية العزلات الست للجنس *Pseudomonas* وكما مبين بالجدول رقم (2)

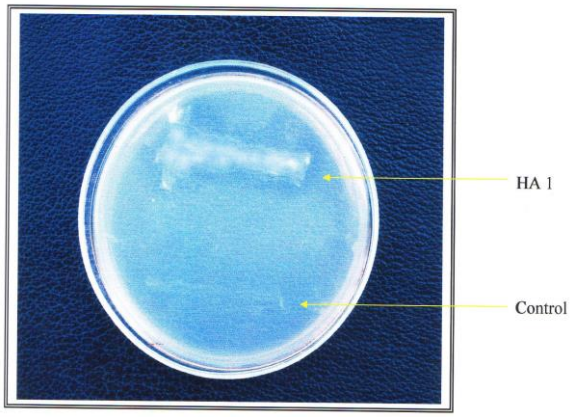
جدول (2) الاختبارات المظهرية والكيموحيوية للعزلات البكتيرية المحللة للاگار من الـ Pseudomonas

الاختبارات	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	HK6
لون المستعمرة	أصفر	أصفر	أصفر	أصفر	أصفر	أصفر
شكل المستعمرة	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية
صبغة گرام	-	-	-	-	-	-
أنتاج الكاتاليز	+	+	+	+	+	+
أنتاج البيروكسديز	+	+	+	+	+	+
النمو على King A	+	+	+	+	+	+
النمو على King B	+	+	+	+	+	+
النمو على الستراميد	+	+	+	+	+	+
النمو على المكونگي	+	+	+	+	+	+
أسالة النشأ	+	+	+	+	+	+
أسالة الگازين	+	+	+	+	+	+
DNase	+	+	+	+	+	+
أسالة الجلاتين	+	+	+	+	+	+
أستهلاك الستارت	+	+	+	+	+	+

الحركة	+	+	+	+	+	+
الفوكس بروسكاور	-	-	+	+	+	+
المثيل - الاحمر	+	+	-	-	-	-
أنتاج البابوسيانين	-	-	+	-	+	+
الفحص تحت أشعة UV	+	+	-	+	-	-
TSI السطح	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي
TSI القعر	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي
TSI أنتاج H_2S	-	-	-	-	-	-
TSI أنتاج الغاز	-	-	-	-	-	-

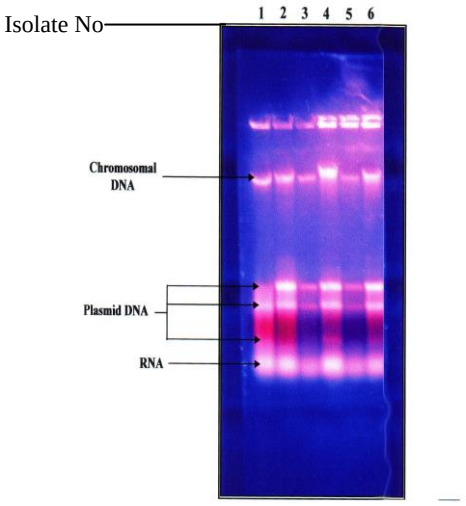
االرموز:(+)نتيجة موجبة،(-)نتيجة سالبة ،اختبار الTSI: Triple sugar iron

* **تنقية العزلات** : تم تنقية العزلات (HK6 – HK1) وذلك بتنميتها مرات عديدة على وسط الاگار ، ومن ثم تم أختيار العزلة HK1 وذلك لكفائتها العالية في أستهلاك الاگار ونموها الكثيف على الوسط الانتقائي كما موضح في الشكل (1) .



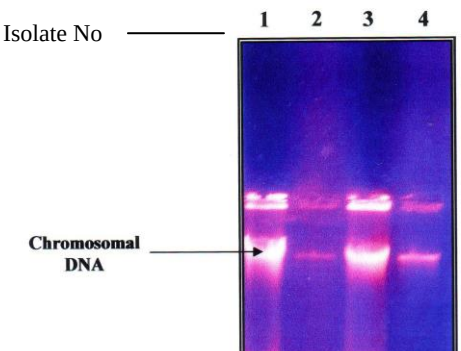
مقارنةً بالسلالة القياسية (control) *E coli* MM 294 التي تكون غير قادرة على النمو .

* **عزل الدنا البلازميدي** : درس النسق البلازميدي للعزلات الستة(HK6-HK1)واظهرت نتائج الترحيل الكهربائي احتواء هذه العزلات على حزمتين او ثلاث بعد اكثر من ساعتين من بدء الترحيل الكهربائي كما موضح في الشكل (2) ، حيث ان العزلات البكتيريه المستهلكه للاگار المعزولة من بيئات مختلفة غالبا تحتوي على بلازميدات ذات اوزان جزيئية مختلفة(19) ،(20) وقد اشار العالم (Kang)الى احتواء بكتريا Pseudomonas المعزولة من بيئات مائية على بلازميدات ذات اوزان جزيئية صغيرة وهي معظمها بلازميدات تحلل أو تلعب دورا كبيرا في التنظيم الجزيئي لعملية التحلل الحيوي(13) بالرغم من ذلك فأن العزلات البكتيرية المختارة قد تحتوي على بلازميدات أخرى لم تظهر وقد يعزى ذلك لكبر حجمها .



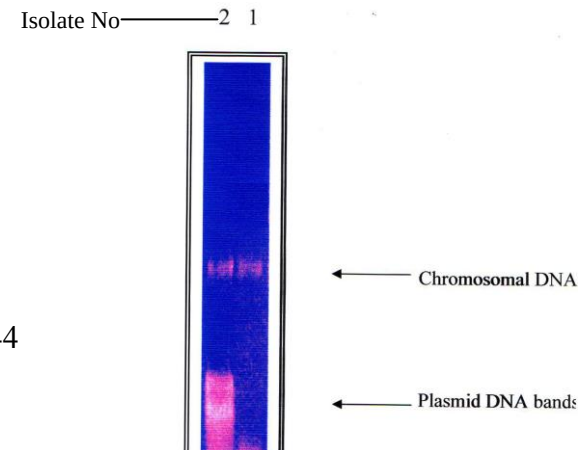
شكل (2) الترحيل الكهربائي في هلام الاگاروز (0.8%) بفرق جهد 65 فولت والذي يظهر مواقع الحزم البلازميدية والكروموسوم للعزلات (HK6-HK1) *Pseudomonas* .

* **تحييد البلازميدات** :الغرض الاساسي من أجراء تجارب التحييد هو لتحديد بعض الصفات التي تكون محمولة على البلازميد ومن المحتمل فقدانها أثناء معاملة الخلايا بالمواد المحيدة (21). أوضحت نتائج التحييد التي أجريت على العزلة (HK1) تحديد أعلى تركيز من مادة ألـ SDSو ألـ EB الذي يسمح بنمو البكتريا هو 2 %، 0.2% على التوالي ، و لوحظ أن نسبة(9 %) من المستعمرات الناتجة بعد المعاملة بمادة ألـ SDS قد فشلت في النمو على وسط الأملاح المعدنية الحاوي على الأگار كمصدر وحيد للكاربون و الطاقة . و لم يلاحظ فقدان أي من المستعمرات قابليتها على استهلاك الاگار بعد المعاملة بمادة ألـ EB ، تبين في ما سبق أن للـ SDS فعالية ملحوظة في فقدان العزلة قابليتها على استهلاك الأگار، مما يشير الى فقدان البلازميد لتلك الصفة لكون مادة ألـ SDS مادة محيدة (22) و للتأكد من ذلك أستخلص الـ DNA البلازميدي لعدد من المستعمرات و تم مقارنته بالمحتوى البلازميدي للعزلة الأصلية و أوضحت النتائج فقدان البلازميد مما يشير ألى أن هذا البلازميد له دور أساسي أو تنظيمي في استهلاك الأگار كما في الشكل (3) .



شكل (3) الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (0.8%) بفرق جهد 65 فولت لمدة(2) ساعةونصف والذي يظهرمواقع الحزم البلازميدية والكروموسوم لعزلةHK1 المعاملة (2,4) وغير المعاملة (1,3) بالـ SDS .

***التحول**: بعد أجراء عملية التحول تم أنتقاء الخلايا المتحولة على الوسط ألانتقائي الذي يعتمد على صفة المقاومة للمضاد الحيوي الريفاميسين و صفة استهلاك الأگار حيث يسمح بنمو الخلايا المتحولة و تم الحصول على متحولات نامية على هذا الوسط الأنتقائي و هذا يوضح أن بكتريا ألـ *Ecoli* MM294.أستلمت نسخة من البلازميد و الذي أكسب البكتريا صفة أستهلاك الأگار كمصدر وحيد للكربون كما موضح في الشكل رقم(4) ، حيث بينت النتائج أحتواء الخلية المستلمة على حزمتين بلازميدية ظهرت بنفس مستوى البلازميد مما يشير ألى أن هذه البلازميدات قد أنتقلت الى هذه العزلة و أكسبتها صفة أستهلاك الأگار و هي صفة تنطبق على معظم بلازميدات التحلل الحيوي خاصة في جنس *Pseudomonas* (23)،(24) . و هي ذات مدى مضيفي واسع و لها صفة الأنتقال بين أجناس البكتريا السالبة لصبغة گرام و خاصة تلك التي تعيش في بيئات مائية (2) ،(25) ،(26) .



شكل (4) الترحيل الكهربائي لسلالة الـ *E.coli* MM 294 قبل (1) وبعد (2) النقل بالتحول لبلازميد العزلةHK1 على هلام الاكاروز(0.8%) في دارئ TBE بفرق جهد 65 فولت ولمدة(2) ساعة ونصف.

References:

1. Yaphe , W. (1957) .The use of agarase from *Pseudomonas* in the identification of agar in marine alge (Rhodophyceae).can.J.Microbiol. 3:987-993 .

2. Zhong,Z.,ToukdarianA.,Helinski,D.,Knauf,V.,Sykes,S.,Wilkinson,J.E.,nOBryne,C.,Shea,T.,Deloughery,C.,and Caspi, R. (2001). Sequence analysis of a 101- kilo base plasmid required for agar Degradation by a *Microscilla* isolate. Appl.Environ.Microbial.67:5771-5779 .

3. Kim,B.J.,Kim,H.J.,Ha,S.D.,H.wang,S. H., Byun. D. S., Lee, T. H. and kong,J.Y.(1999).Purification and characterization of beta-agarase . From marine bacterium *Bacillus cereus* ASK 202. Biotechnol. Lett, 21:1011-1015 .

4. Ha, J.,Kim, G. T., Kim, S. K., oh, T. K., Yu, J. H. and Kong, I.S(1997).Beta-agarase from *pseudomonas sp*. W 7.purification of the recombinant enzyme from *E.coli* and the effects of salt on its activity. Biotechnol. Appl. Biochem.26:1-6.

5. Vander Meulen,H. J. and Harder, W.(1975). Purification and characterization of the agarase of

Pseudomonas sp. SK38 , Biotechnol, Lett. 25:1165-1170 .

14. Agbo J. A. C and Moss M. O.(1997). The isolation and characterization of agarolytic bacteria from a Lowland River, J. Gen. Microboil . 115:355-368 .

15. Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raa-sch , C., Jaeger, K. E. and streit ,W.R (2003).Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. Appl. Environ Microbiol. 69:6235-6242.

16. Pospiech, J. and Neuman,T.(1995).Preparation and analysis of genomic DNA and plasmid (DNA (ed.Kieser,T) Norwich, U.K.

17. Sambrook, J.Fritsch,E.F.and Maniatis,T . (1998) . Molecular Cloning:a Laboratory Manual Cold spring Harbor , NY:Cold Spring Harbor Laboratory.

18. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sumbrook, J.(1982) . Molecular cloning a Laboratory Manual. Cold spring harbor Laboratory,Newyork.

19. Julie A., Murielle J., William H., Tristan B., Bernard KI., Bernarad H.and Mirjam C.(2003). The three-dimensional structure of two beta-agarase J. Bio. Chem. 278:47171-47180.

20. Julie A., William H., Bernard H.and Mirjam C.(2004).Parallel substrate binding sites in a beta - agarase suggest a novel mode of action on double helical agarose, structure, 12:623-632 .

21. Trevors,J. T. (1986) . Plasmid curing in bacteria. FEMS. Micobiol. Rev. 32:149- 157.

22. Novick , R. P. (1969) .Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bacteriol. Rev. 33:210-235.

23. Schroeder,D.C.,Jaffer,M. A. and Coyne,V.E.(2003).Investigation of the role of a β (1-4) agarase produced by *Pseudoalteromonas Gracilis* B9 in eliciting disease symptoms in the red *Cytophaga flevensis* . Antonie Vanleeuw-enhoek 41:431-447.

6. Bibb, M. J. , Jones, G. H., Joseph, R., Butter,M. J., Ward J. M. (1987) . The agarase gene(dagA)of *Streptomyces coelicolor*A3(2):affinity purification and characterization of the cloned gene product. J. Gen. Microbiol.133:2089-2096.

7. Aoki, T., Araki,T. and Kitamikado, M.(1990) Purification and characterize- ation of novel beta-Agarase from *Vibrio sp.* Ap.2. Eur.Biochem. 187:461-465.

8. Leon O., Quintana, L., Peruzzo,G.and Slebe, J. C. (1992). Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas sp.* Strain C-1.Appl. Environ. Microbiol. 58(12): 2060 – 4063.

9. Shieh ,W . Y. , and Jean , W. D. (1998) . *Alterococcus agarolyticus,* gene , nov . , sp. nov . , a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation .Can. J. Microbiol . 44:637-645 .

10. Naganuma, T.,Coury,D. A., Polne Fuller, Gibor, A. and Horikoshi K.(1993). Characterization of agarolytic *Microscilla* isolate and their extracellular agarase. Syst. Appl. Microbiol . 16:183-190.

11. Jam. M. , Flament,D. , Allouch, J , Potin, Thion, L., Kloareg, B., Czjzek, M. , Helbert , W.,Michel, G., and Barbeyron, T. (2005). The endo- β - agarase Aga A and Aga β from the marine bacterium *Zobelliagalacta niborans* . Biochem. J. 385:703-713.

12. Hamer, G. K.,Bhattacharjee, S. S. and Yaph W.(1977).Analysis of the enzymes hydrolysis products of agarose by13C-n.m.r.Spectroscopy. Carbohydr. Res. 54 : C7 - C10.

13. Kang,N.Y., Choi, Y. L., Cho, Y. S., Kim,B.K.,Jeon,B.S.,Cha, J.Y.,Kim. C. H .and Lee, .C.(2003). Cloning, expression and characterization of a

of Quinoline and Methyl quinolines. Appl. Environ. Microbiol. 56:345-351.

26. Carney, B. F. and Leary, J. V.(1989).Novel alteration in plasmid DNA associated with aromatic hydrocarbons utilizations by *Pseudomonas putida* R5-3 . Appl. Environ . Microbiol . 55:1523-15

alga *Gracilaria grcilis.* Microbiol 149:-2919-2929.

24. Morrice,L.M. ,Mclean,M.W. , Long, W.F.and Williamson,F.B. (1983).Beta- agarase I and ∏ from *Pseudomonas atlantica* Eur. J. Biochem. 137:149 – 154 .

25. Aislabie,J., Bej,A. K., Hurst, H.,Rotheurger, S. and Atlas,R. M.(1990).Microbiological degarative

Plasmid role in agar utilization by *Pseudomonas sp.* HK_1

Abdul Kareem A . Al-kazaz*

*Biotechnology Dept., science college ,Baghdad University

Abstract:

Forty different samples (water and soil) were collected from different places in Iraq and Syria. Only (6) isolates showed the ability to grow and utilize agar as a sole source of carbon and energy. Morphological, cultural characterization and biochemical tests confirmed that These isolates belonging to genus *Pseudomonas* (HK_1-HK_6) .Plasmid profiles results showed that these isolates were harbored (2 -3) small Plasmids . HK_1 isolate was selected because of its efficiency and ability to grow in high density on agar media for transformation and curing experiments, these were checked by transformation experiments after their expression in *E. coli* MM294. The genes responsible for agar utilization were located on these plasmids . These results were confirmed by data obtained from curing experiments.