عزل وتشخيص البكتريا المقاومة للفينول من تربة الحدائق

نغم عادل غني

جامعة بابل – كلية العلوم

الخلاصة

تم في هذه الدراسة عزل وتشخيص 30 عزلة بكتيرية تعود ل .*Staphylococcus auruse* و *Bacillus subtilis* و *Protus sp* من عينات تربة الحدائق (عند الجذور) في مدينة الحلة وقد وجد ان 7 عزلات اظهرت مقاومة للفينول بتركيز 10 ملي مولر وحدد جين مقاومة الفينول بكونه محمول على البلازميد من خلال تحييد بلازميدات العزلات المقاومة للفينول باستخدام الاكردين البرتقالي ثم نقل البلازميد المستخلص من العزلات المقاومة (غير المحيدة) الى الخلايا المحيدة (الخلايا المستلمة) بعملية التحول وقد لوحظ قابلية الخلايا المتحولة على اظهار مقاومة للفينول عند 10 ملي مولر.

Abstract

Thirty bacterial isolates capable of phenol resistance were isolated from garden soil in Hilla city. By standard bacteriological methods, these bacteria were belong to genera *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis and Proteus sp.*. Seven of these strains were found resistance to 10 mM of phenol. Using of acridin orang determined that phenol resistant genes are located on plasmid. Plasmid DNA isolated from the uncured strains was transferred into the cured competent recipient cells. Stable transfer of phenol resistance plasmid gene(s) was observed.

المقدمة

يعد الفينول ومشتقاته سام جدا ومصدر قلق من تلوث بيئي ذلك ان الفينول يستخدم في المعقمات و المطهرات ويكون سلوكه كمبيد واحيانا كمثبط (Munaazz *et al.*,2004). ان استخدام الفينول للسيطرة على فعالية البكتريا يكون من خلال التاثير على قابلية الغشاء البكتيري وتحديد القابلية النفاذية فيه او تخثر السايتوبلازم ولهذا يعتبر كسموم بروتوبلازمية عامة (Cloete, 2003). تحصل المقاومة للفينول اما بشكل طبيعي في الكائن الحي او مكتسب بالطفرات او امتلاك البلازميد الحامل لصفة المقاومة (Chapman, 2003). ان استعمال العوامل المحيدة يفيد في تمييز البلازميدات في الحالات التي يمكن فيها ازالة الصفة المظهرية (Udo *et al.* ,2002).

الهدف من الدراسة:- التحري عن موقع جينات مقاومة الفينول في البكتريا المعزولة.

المواد وطرائق العمل

1- طرق التشخيص:

تم جمع عينات تربة الحدائق من عند الجذور وشخصت منها 30 عزلة تعود الى *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis and Proteus sp.* بالاعتماد على (Holt *et al.*,1994) والطرق المستخدمة من قبل (Mac Faddin,2000).

2- انتقاء عزلات البكتريا المقاومة للفينول:

التقطت المستعمرات المعزولة على اطباق الوسط الزرعي المغذي الصلب واختبرت مقاومتها للفينول باستخدام طريقة Replica plate (Lederberg *et al.*,1952) حيث نقلت الى اطباق الوسط الزرعي الصلب الحاوي على تراكيز مختلفة من الفينول (100,50,20,15,10) ملي مولر.

3 – عزل الدنا البلازميدي:

تم عزل بلازميد البكتريا باعتماد طريقة التحلل القاعدي كما وصفها Sambrook *et al.*(1989) .

4 – تحييد الدنا البلازميدي:

اتبعت طريقة (Hardy,1987) باستعمال الاكردين البرتقالي لتحييد بلازميد الخلايا البكتيرية .

5- تحول الدنا البلازميدي:

تم اتباع طريقة (Davis *et al.*,1986) لاجراء التحول البكتيري واستعملت الخلايا المحيدة كمستقبل للبلازميد.

النتائج والمناقشة

تم جمع عينات من تربة الحدائق من عند منطقة الجذور لعزل البكتريا المقاومة للفينول ذلك ان هذه المنطقة تكون غنية بمركبات الفينول التي يفرزها النبات. وجد ان 20 عزلة من اصل 30 عزلة بكتيرية هي بكتريا موجبة كرام و 10 عزلات هي بكتريا سالبة كرام وتم اختبار قابلية هذه العزلات على مقاومة الفينول بعدة تراكيز (100,50,20,15,10) ملي مولر وقد بينت النتائج ان 7 عزلات اظهرت مقاومة للفينول بتركيز 10 ملي مولر وعزلتين فقط مقاومة للتركيز 15ملي مولر (جدول 1). تعود العزلات المقاومة الى بكتريا *Staphylococcus , Proteus , Bacillus sp* على التوالي بالاعتماد على صفاتها المظهرية والاختبارات الكيمياوية باتباع طرق كل من (Mac Faddin,2000) و (Holt *et al.*,1994).

جدول (1): نمو العزلات البكتيرية في تراكيز مختلفة من الفينول

رقم العزلة	اسم البكتيريا	النمو في الوسط الصلب الحاوي على الفينول (ملي مولر)				
		10	15	20	50	100
5	*Staphylococcus aureus*	+	+	–	–	–
7	*Protus sp.*	+	–	–	–	–
9	*Bacillus subtilis*	+	+	–	–	–
16	*Bacillus subtilis*	+	–	–	–	–
18	*Staphylococcus aureus*	+	–	–	–	–
25	*Bacillus subtilis*	+	–	–	–	–
27	*Staphylococcus aureus*	+	–	–	–	–

ان استعمال الصبغات المتفلورة مثل الاثيديوم بوميد والاكردين البرتقالي يؤدي بالخلايا الى فقدان بلازميداتها (Meksem *et al.* , 2000) وهي طريقة موثوقة للتاكد فيما اذا كانت الصفة المظهرية قيد الدراسة محمولة على البلازميد او على الكروموسوم ، وقد ظهر بعد عملية التحييد ان جميع العزلات المقاومة للفينول فقدت قابلية المقاومة وهذا يشير الى ان جينات مقاومة الفينول محمولة على البلازميد في عزلات هذه الدراسة (جدول 2).

جدول (2): نمو العزلات البكتيرية في تراكيز مختلفة من الفينول بعد إجراء عملية التحييد

رقم العزلة	اسم البكتيريا	النمو في الوسط الصلب الحاوي على الفينول (ملي مولر)				
		10	15	20	50	100
5	*Staphylococcus aureus*	–	–	–	–	–
7	*Protus sp.*	–	–	–	–	–
9	*Bacillus subtilis*	–	–	–	–	–
16	*Bacillus subtilis*	–	–	–	–	–
18	*Staphylococcus aureus*	–	–	–	–	–
25	*Bacillus subtilis*	–	–	–	–	–
27	*Staphylococcus aureus*	–	–	–	–	–

يمكن نقل جينات المقاومة المحمولة على البلازميد من نو ع بكتيري الى اخر في الزجاج بطرق مختلفة مثل الاقتران والتحول (Davis,1994)، اذ تم نقل البلازميد المستخلص من العزلات المقاومة للفينول الى نفس العزلات لكن بعد تحييد الاخيرة وبذلك تكون الخلايا المحيدة هي الخلايا المستلمة هنا وطبقا للنتائج فقد لوحظ ان البلازميد استطاع التعبير عن صفةمقاومة الفينول في الخلايا المستلمة واظهر مقاومة عند 10 ملي مولر من الفينول (جدول 3).

جدول (3): تردد التحول

رقم العزلة	تردد التحول
5	10-7× 90
7	10-7 × 95
9	10-7 × 97
16	10-7 × 99
18	10-7 × 100
25	10-7 × 120
27	10-7 × 115

References

Chapman,J. C. 2003. Disinfectant resistance mechanisms cross-resistance and co-resistances.J. Pharm. Sc. Thechnol., 51(1):36-47.

Cloete,T. E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. Int. Biodeter. ,51(4): 277-282.

Davis, L.G., M. D. Dibner and J.F. Battery. 1986. Basic method in molecular biology. Elsevier Science Publishing Co. Inc. New York. pp. 45-72.

Hardy, K.G. 1987. Plasmids-A Practical Approach. IRL press Oxford England. pp. 1-252.

Holet, J. C. ; Krieg, N.R. ; Sneath, P.H.A. : Stahley, J. T. & Willa, S. T.(1994). Berge's manual of determinative bacteriology,9th ed. VSA.

Lederberg, J., L. Cavali and E.M. Lederberg. 1952. Sex compatibility in *E. coli*. Genetics, 37: 720-730.

Mac Faddin,J.F.(2000).Biochemicaltests for identification of medical microbiology. Lippincott Williams and Wilkins Publisher.

Meksem, K. ; T. Doubler and A. Rao. 2000. Effect SDS on clustering genes in Soybean. Theor. Appl. Genet. 99: 1131-1142.

Munnazz, A. ; N. Nebool ; A. R. Sheikh and A. K. Shakeel. 2004. Phenol resistant bacteria from soil. Pak. J. Bot. ,36(2): 415-424.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York. pp. 1.38-1.39.

Tomoeda, M., M. Inuzuka, N. Kubo and S. Nakamura. 1986. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *E. coli* by sodium dodecyl sulphate. J. Bacteriol., 95 (3): 1078-1089.

Udo, E. ; N. Sweih and B. Noronha. 2002.Achromosomal location of the mup A gene in S. aureus expressing high level resistance. J. Anti. Chemoth. 51(5): 1283-1286.