دراسة قابلية عزلة البكتريا المحلية *Pseudomonas* KK_5 في أستهلاك الميثانول كمصدر للطاقة والكاربون ودور البلازميد فيها

عبد الكريم عبد الرزاق القزاز، رنا كاظم محمدالشمري، هديل قادر رستم*

قسم التقنيات الاحيائية- كلية العلوم- جامعة بغداد. العراق، بغداد.

** قسم التقانات الاحيائية- كلية العلوم- جامعة النهرين. العراق, بغداد.*

الملخص

جمعت (50) عينة (ماء وتربة) من مناطق مختلفة من العراق . أظهرت (5)عزلات قابليتها على النمو على وسط الأملاح المعدنية المضاف له الميثانول كمصدروحيد للكاربون والطاقه وبكثافة نمو مختلفة. أكدت الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية عائديتها للجنس *Pseudomonas* (KK1-KK5) ، تمت دراسة المحتوى الوراثي للعزلات ، لمعرفة دور البلازميدات في اظهارصفة أ ستهلاك الميثانول ، وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي احتواء العزلات على حزمة بلازميدية واحده.اختيرت العزلة (KK5) وذلك لكفاءتها وقابليتها للنمو بكثافة على وسط الميثانول الانتقائي وبتركيز (% 0.8) لأجراء تجارب الأقتران والتحييد. أ ظهرت نتائج الأقتران ا ن بلازميد العزلة (KK5) له القدرة على التعبير المظهري في بكتريا (MM294 *E.coli*) أي ا نها ذات مدى مضيفي واسع ، وان الجينات الوراثية المسؤولة عن اظهار صفة ا ستهلاك الميثانول كانت بلازميدية الموقع ، وهذا ما اكدته نتائج تجارب التحييد .

A Study of the Ability of *Pseudomonas* KK_5 in Utilization of Methanol as a Sole Source of Carbon and Energy and the Role of its Plasmid.

Abstract

Fifty different samples (water and soil) were collected from different places in Iraq. Only (5) isolates showed the ability to grow and utilize methanol as a sole source of carbon and energy. Morphological, cultural characterization and biochemical tests confirmed that these isolates belonging to genus *Pseudomonas* (KK_1-KK_5) .Plasmid profiles results showed that these isolates were harbored only one large plasmid . KK_5 isolate was selected because of its efficiency and ability to grow in high density on methanol selective medium (0.8%) for conjugation and curing experiments, these were checked by conjugation experiments after their expression in *E. coli* MM294. The genes responsible for methanol utilization were located on large conjugative plasmid. These results were confirmed by data obtained from curing experiments.

المقدمة

استخدمت البكتريا المعزولة من بيئات مختلفة لفترة طويلة كمصادر لمنتجات طبيعية ، استعملت في مجالات الطب ، الصناعة والزراعه ، شخصت البكتريا المستهلكه للميثانول كمصدر وحيد للكاربون والطاقه ، منذ عام 1906 ، ويعتبرالباحث Sohngen أ ول من عزل بكتريا محللة للميثان ,

لاحظ بعد ذلك العالم Bassalikفي عام (1914) نمو بكتريا *Bacillus*علـى الميثـانول (1) . تنتـشر المجـاميع البكتيريـة المـستهلكة للميثـانول (Methylotrophic bacteria) بصورة واسعة ، وتضم أجناس وأ نواع عديدة منهـا *Methylobacterium extorquens* (2) *Methylococcus capsulatus* (3), *Bacillus methanolicus* (4) , *Acidomonas* (5),*Beijerinckia* (7) *Pseudomonas* . (6) تنتج أ غلب الأحياء المستهلكة للميثانول انزيم mdh (Methanol dehydrogenase) والذي يتواجد في الفسحة البريبلازميديةPeriplasmic Space) للبكتريا المستهلكة وخاصة في البكتريا السالبة لصبغة غرام ، يقوم الانزيم بأكسدة الميثانول الى الفورمالديهايد وهو مركب سام ، لـذا كيفـت الاحيـاء المـستهلكة للميثـانول مـساراتها الايـضية لأكسدته لثاني أوكسيد الكاربون . يتركب الانزيم من سلسلتين (α2β2) أحدهما ذو وزن جزيئي كبير(60 - 67 KD) والاخرى صغير (8.5 KD) (8). ينتشر الميثانول في مختلف البيئات مسببا تلوثا لها ، ولأزالة هذا التلوث بالطرق الفيزيائية- الكيميائيـة يتطلـب ذلـك وجـود مختبـرا ت عاليـة التكـاليف، لـذ استخدم الأستهلاك الحيوي الذي يكون رخيصا وملائم للبيئة (9) . لوحظ ان العوامل الوراثية المشفرة لصفة الاستهلاك الحيوي للميثانول في بعض الانواع البكتيرية عبارة عن جينات بلازميدية الموقـع (10,11) . ، لـذا وطبقـا لمـا ذكـر سـابقا ، وبـسبب الدراسـات المحـدودة محليـا علـى البكتريـا المـستهلكة للميثـانول ولتحديد العوامل الوراثية المشفرة لهذه الصفة , تم اجراء هذه الدراسـة لتنقيـة وتـشخيص العـزلات المـستهلكه ومعرفـة دور البلازميدات في اظهار هذه الخاصية ليتسنى لنا مستقبلا تطوير عـزلات تـستهلك مـدى واسـع مـن المركبـات الكحوليـة وكـذلك القضاء على التلوث الناتج عنها.

المواد وطرق العمل:

1.العزلات البكتيرية : جمعت (50) عينة (ماء و تربة) من مناطق مختلفة في العراق (33 عينة تربة و 17 عينة مياه) كما موضح أدناه:-

ت	الموقع	العينات
.1	بغداد – نهر دجلة	5 عينة تربة + 1 عينة مياه
.2	بغداد – نهر الفرات	5 عينة تربة + 1 عينة مياه
.3	بغداد – مصفى الدورة	5 عينة تربة
.4	صلاح الدين – بيجي	5 عينة تربة
.5	ديالى – معمل كحول الخالص	5 عينة تربة
.6	بصرة – شط العرب	5 عينة تربة + 1 عينة مياه
.7	السليمانية – سد دوكان	5 عينة تربة + 1 عينة مياه
.8	ديالى – شهربان	5 عينة تربة
.9	بغداد – الجادرية	5 عينة تربة + 1 عينة مياه

تم اختيار خمس عزلات وأعطيت الرموز(KK1 – KK5). وتم بعد ذلك تشخيصها مظهريا ، زرعيا و كيموحيويا.

2.استهلاك العزلات للميثانول : أستخدم وسط الأملاح المعدنية المعقم المضاف له الميثانول (وسط الميثانول الانتقائي) كمصدر وحيد للكاربون والطاقه والموصوف في (12) . حيث تم تنمية العزلات الخمس على تراكيز متسلسلة تصاعدية من الميثانول وكمـا يلـي : (0.1% ، 0.2% ، 0.4% ، 0.8% ، 1.2% V/V) وذلك لأختيار العزلة الأكفأ التي تستطيع النمو على أعلى تركيزمن الميثانول وذلك بعد حضنها لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37.م .

3. أستخلاص الدنا البلازميدي : عزل الدنا البلازميدي من العزلات (KK1-KK5) و ذلك بأتباع طريقة التحلل القاعدي Alkaline Lysis والمحورة من قبل(13) والتي تفصل الدنا الكروموسومي عن البلازميدي بأستخدام قاعدة قوية ، وتفضل هذه الطريقه بكثرة وذلك لدقتها ، حيث تحافظ على الدنا البلازميدي بشكله التساهمي المغلق على عكس الدنا الكروموسمي الذي يتحطم كليا .

4. الترحيل الكهربائي الهلامي : حدد محتوى البكتريا من البلازميد بعد ترحيل الدنا البلازميدي المستخلص على هلام

الأگاروز (% 0.8) حسب الطريقة الموصوفة من قبل (14) .

5. تحييد بلازميدات العزلات: أستخدمت العوامل المحيدة Ethidium Bromide (EB) وال SDS Sodium Dodecyl (Sulphate) ، لتحييد البلازميدات والموصوفة في(15) ، حيث تم تحديد تراكيز متزايدة من من العاملين وكما يلي (1%، 2% ، 3% ، 4% ، 5%) للعامل المحيد (SDS)، والتراكيز (0.1%، 0.2% ، 0.3% ، 0.4% ، 0.5%) للعامل المحيد EB بعد اجراء العديد من ا لتجارب لاختيار مدى التراكيز الامثل . و للتحري عن المستعمرات المحيدة ، كررت 300 مستعمرة لكل معاملة من هذه المعاملات على وسط الأملاح المعدنية الصلب (وسط الميثانول) المضاف اليه الميثانول 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 أظهرت نموا واضحا على الأوساط الاننقائية(وسط الميثانول) و أكدت قابليتها على استهلاك الميثانول كمصدر وحيد للطاقة و الكاربون . أستخلص الدنا البلازميدي من المستعمرات التي أظهرت تغييرا في قابليتهاعلى استهلاك الميثانول و تم ترحيله على هلام الأگاروز و قورنت الحزم الناتجة مع الحزم البلازميدية للعزلات الأصلية.

6 . الاقتران : أجريت تجربة الاقتران بين العزلة KK_5 ذات القدرة العالية على أستهلاك الميثانول كسلالة واهبة ، وأظهر أختبار الحساسية للمضادات مقاومتها للمضادات (التتراسايكلين وألامبيسيلين) وحساسيتها للمضادات (ريفامبسين والنيومايسين) . تم بعد ذلك أختيارالسلالة *E.coli* MM294 التي ليس لها القدرة على النمو على وسط الميثانول الأنتقائي وأعتبرت كسلالة مستلمة والتي تتصف بمقاومتها للمضاد (ريفامبسين) وبالاستفادة من الطريقة الموصوفة من قبل(16)وبعد اجراء تخافيف مناسبة على وسط الأملاح المعدنية الصلب المضاف له الميثانول بتركيز (0.8%) كمصدر وحيد للكاربون والطاقة ومضاف له المضاد الحيوي الريفامبسين . حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37° م لمدة 48 ساعة .

النتائج والمناقشة:

- **تشخيص العزلات :** تم أختيار 5 عزلات وذلك لقابليتها العالية على أستهلاك الميثانول كما موضح بالجدول رقم (1).

جدول (1) العزلات التي لها القابلية على أستهلاك الميثانول ومناطق عزلها ونوع النماذج

العزلة	المنطقة	نوع العينة
KK1	ديالى -شهربان	عينة تربة (ساحل)
KK2	ديالى– معمل كحول الخالص	عينة تربة
KK3	بغداد – نهر دجلة	عينة مياه
KK4	صلاح الدين – بيجي	عينة تربة
KK5	بغداد-الدورة	عينة تربة

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

جدول (2) الاختبارات المظهرية والكيموحيوية للعزلات البكتيرية الخمس المستهلكة للميثانول العائدة لجنس *Pseudomonas*

الاختبارات		KK1	KK2	KK3	KK4	KK5
لون المستعمرة		أصفر	أصفر	أصفر	أصفر	أصفر
شكل المستعمرة		عصوية	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية
صبغة گرام		-	-	-	-	-
أنتاج الكاتاليز		+	+	+	+	+
أنتاج البيروكسديز		+	+	+	+	+
النمو على وسطKing A		+	+	+	+	+
النمو على وسطKing B		+	+	+	+	+
أسالة النشأ		+	+	+	+	+
أسالة الگازين		+	+	+	+	+
DNase		+	+	+	+	+
أسالة الجلاتين		+	+	+	+	+
أستهلاك الستريات		+	+	+	+	+
الحركة		+	+	+	+	+
الفوكس بروسكور		-	-	+	+	+
المثيل - الاحمر		+	+	-	-	-
أنتاج البايوسيانين		-	-	+	-	+
الفحص تحت أشعةUV		+	+	-	+	-
TSI	السطح	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي
	القعر	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي	قاعدي
	أنتاج الغاز	-	-	-	-	-

أختبار الTSI: Triple sugar iron($KK_5 - KK_1$) العزلات المحلية المستهلكة للميثانول الرموز:(+)نتيجة موجبة،(-)نتيجة سالبة.

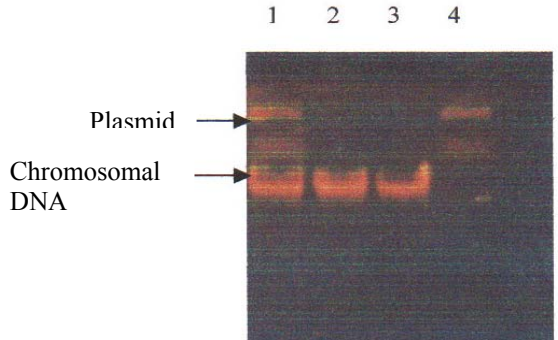
تنقية العزلات : تم تنقية العزلات($KK_1 - KK_5$) وذلك بتنميتها مرات عديدة على وسط الميثانول وتم أختيار العزلة KK_5 وذلك لكفائتها العالية في أستهلاك الميثانول ونموها الكثيف على وسط الميثانول الانتقائي بأعلى تركيز (0.8%) وذلك بعد ان أختبر نموها على تراكيز متصاعدة من الميثانول حيث تمت الاضافة بنسبة مئوية الى حجم الوسط .

عزل الدنا البلازميدي : درس النسق البلازميدي للعزلات الخمس (KK1-KK5) واظهرت نتائج الترحيل الكهربائي احتواء هذه العزلات على حزمة بلازميدية ذات وزن جزيئي عالي بعد اكثر من ساعتين من بدء الترحيل الكهربائي وتم أختيار العزلة KK5 كأكفا عزلة ، حيث ان العزلات البكتيريه المستهلكه للميثانول المعزولة من بيئات مختلفة غالبا تحتوي على بلازميدات ذات اوزان جزيئية عالية(17،18) وقد اشار العالم Kanaly الى احتواء بكتريا *Pseudomonas* المعزولة من بيئات مختلفة.
على بلازميدات ذات ا وزان جزيئية كبيرة وهي معظمها بلازميدات تحلل أو تلعب دورا كبيرا في التنظيم الجزيئي لعملية ألأستهلاك الحيوي (19) .

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 (15). أوضحت نتائج التحييد التي أجريت على العزلة(**KK_5**) تحديد أعلى تركيز من مادة ألـ SDSو ألـ EB الذي يسمح بنمو البكتريا هو 2 %, 0.2% على التوالي ، و لوحظ أن نسبة(121 %) من المستعمرات الناتجة بعد المعاملة بمادة ألـ SDS قد فشلت في النمو على وسط الأملاح المعدنية الحاوي على الميثانول كمصدر وحيد للكاربون و الطاقة . و لم يلاحظ فقدان أي من المستعمرات قابليتها على استهلاك الميثانول بعد المعاملة بمادة ألـ EB ، تبين في مما سبق أن للـ SDS فعالية ملحوظة في فقدان العزلة قابليتها على استهلاك الميثانول ، مما يشير الى فقدان البلازميد الحامل لتلك الصفة وذلك لكون مادة ألـ SDS مادة محيدة فعالة (21) و للتأكد من ذلك أستخلص الـ DNA البلازميدي لعدد من المستعمرات و تم مقارنته بالمحتوى البلازميدي للعزلة الأصلية و أوضحت النتائج فقدان البلازميد مما يؤكد ألى أن هذا البلازميد له دور أساسي أو تنظيمي في استهلاك الميثانول كما في الشكل رقم (1) .

ألاقتران :

بعد اجراء تجارب الأقتران بين السلالة الواهبة KK_5الحساسة للريفامبسين مستهلكة للميثانول والسلالة *E.coli* MM294 المقاومة للريفامبسين وغير مستهلكة للميثانول ، تم أنتقاء الخلايا المقترنة على وسط الميثانول ألانتقائي مضافا له المضاد الحيوي الريفامبسين ، حيث يسمح بنمو الخلايا المقترنة ولا يسمح بنمو الخلايا الواهبة والمستلمة . تم الحصول على مقترنات نامية على الوسط المذكور تمتاز بكونها مقاومة للريفامبسين ومستهلكة للميثانول كمصدروحيد للكاربون والطاقة، مما يؤكد كون السلالة *E.coli* MM294 قد أستلمت نسخة من البلازميد والذي أكسب البكتريا صفة أستهلاك الميثانول كمصدروحيد للكاربون والطاقة وكما موضح بالشكل رقم (1).
عند أستخلاص الدنا البلازميدي من المستعمرات المقترنة ومقارنته بالمحتوى البلازميدي للعزلة الواهبة والمستلمة ، تبين أحتوائها على حزمة بلازميدية واحدة ظهرت بمستوى واحد مما يدل على ان هذا البلازميد أقتراني ويشفر لصفة استهلاك الميثانول ، وهي صفة تنطبق على معظم بلازميدات الأستهلاك الحيوي في كونها بلازميدات أقترانية وذات أوزان جزيئية عالية وخاصة في جنس ال *Pseudomonas* (13 ,20) وهي ذات مدى وظيفي واسع ولها صفة الانتقال بين أجناس البكتريا السالبة لصبغة غرام وخاصة تلك التي تعيش في بيئات ملوثة بالكحولات الأليفاتية والمركبات الهايدروكاربونية الأخرى(14,18) .



7. Bellion, E. ; Kent, M.E, Aud, J. C. ; Alikhan, M.Y. and Bolbot, J. A. (**1984**). Uptake of methylamine and methanol by *Pseudomonas* sp. Strain AM1. J. Bacteriol.154(3):1168-1173.
8. Frank, J.; Janvier, M. ; Heiber-Longer, I. ; Duine, J.A. ; Gasses, G. and Balny, C. (**1993**). Structural aspects of methanol and oxidation in gram negative bacteria. P.209-220.In Murrell, J. C. and Kelley, D. P.(ed.), Microbialgrowth of compounds. Intercept Press, Ltd .,Andover, United Kingdom.
9. Atlas, R.M. and Bartha, R. (**1998**). Microbial Ecology : Fundamentals and Applications . P:511-598. Benjamin / Cummings Publishing Company: Inc., an Imprint of Addison Wesley Longman, Inc.
10. Gautier, F. and Bonewald, R. (**1980**). The use of plasmid R1162 and derivatives for gene cloning in the methanol-utilizing *Pseudomonas* AM1. Mol. Gen. Genet.178(2):375-380.
11. Sowers, K. R. and Gunsalus, R.P. (**2001**). Plasmid DNA from the acetotrophic methanogene *Methanosarcina acetivorans*. J. Bacteriol.170(10):4979-4982.
12. Marshall, S. J. and White, G. F. (**2001**) . Complete denitration of nitroglycerine by bacteria isolated from a wash water soakamay . Appl. Environ. Microbiol. 110:2622-2626.
13. Pospiech, T.and Neumann,T. (**1995**). Plasmid isolation by alkaline and potassium acetate precipitation. In :Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA. (Ed. Kieser. T.)Norwich. U.K.
14. Stater, J.T.;Weightman , A. and Thomas, D.J.(**1988**). Plasmids in: Micro- organisms in action .(eds. Lynch, J. M. and Hobbies, J.) PP:44-51. Blackwell Scientific, Oxford.
15. Trevors, J.T. (**1986**). Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol. Lott. 32:259.
16. Weiserver, M.;Hubacek, J.;Brenner,V.; piruzian ,E.S.; Kobec, N.S. and Velikodvorskaya, G.A. (**1987**). Mini-mu Transposition of Bacterial Genes in the transmisissible plasmid. Folia Microbiol. 42 :368-375.
17. Davison, J.(**1999**).Genetic exchange between bacteria in the environment plasmid. 42:73-91
18. Trevors, J . T. and Van Elasas, J. D. (**1997**) . Quantification of gene transfer in soil and the rhizosphere. In :Manual of Environmental Micrbiology. (eds. Hurst, G. J.; Kundsen, C. R.; Mclnerney, M. L. ; Stelzenbachm, L. D. and Walter, M. V.) PP. 500-508. American Society for Microbiology, D.C.).

References المصادر

1. Anthony , C. (**1986**).*Bacterial oxidation of methane and methanol* . Adv. Microb. Physio. 27: 113 – 210.
2. Chistoserdova, L. (**1996**). Metabolism of formaldehyde in *Methylobacterium extoriquens* AM1: Molecular genetic analysis and mutant characterization . In Microbial growth on C1 compound, p. 16-42. Edited by Lidstrom, M.E. and Tabita, F.R., Dordrcht: Klwer Academic.
3. Chistoserdova, L. ; Chen S.W. ; Lapidus, A. and Lidstrom, M. (**2003**). Methylotrophy in *Methylobacterium extoriquens* AM1 from a genomic point of view. J. Bacteriol., 185:2980-2978.
4. Brautaset, T.; Jacobsen, Q.M.; Flickinger,M.C.; Svein Valla and Ellingsen, T.E. (**2004**).Plasmid-dependent Methylotrophy in Thermotolerant *Bacillus methanolicus*. J.Bacteriol.186(5):1229-1238.
5. Bulygina, E.S.;Gulikova, O.M.;Dikanskaya, E. M. ; Netrusov, A. I. ;Tourova, T. P. and Chumakov, K. M. (**1992**). Taxonomic studies of the genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. J. Gen. Microbiol.138:2283-2286.
6. Dedysh, S. N. ; Smirnova, K. V. ; Khmelenina, V. N. ; Suzina, N. E. ; Liesack, W. and Trotsenko, Y. A. (**2005**). Methylotrophy Autotrophy in *Beijerinckia mobilis* . J. Bacteriol.187(11):3884-3888.