دراسة قابلية عزلة البكتريا *Acinetobacter RB8* في استهلاك بعض المركبات الهيدروكاربونية العطرية ودور البلازميد فيها

رائد بحر نصر

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

الاستلام: 2004/4/19 القبول: 2004/11/2

الملخص

درست قابلية استهلاك عزلتين من بكتريا *Acinetobacter* وهي RB8 و RB23 لعدد من المركبات العطرية (الاروماتية) كمصدر وحيد للكاربون والطاقة وتبين ان العزلة *Acinetobacter* RB8 تستهلك انواع مختلفة من المركبات الاروماتية الاحادية الحلقة مثل البنزويت ، حامض السالسليك والثنائية الحلقة كالنفثالين. كما تميزت بعدم قابليتها على استهلاك الفينول والانثراسين (مركب اروماتي ثلاثي الحلقة).

درس النمط البلازمي للعزلتين وتبين ان العزلة *Acinetobacter* RB8 حاوية على بلازميد واحد ذو وزن جزيئي عالي بينما لم تحتوي العزلة *Acinetobacter* RB23 على اي بلازميد.

درس دور البلازميد pRj303 في استهلاك المركبات الهيدروكاربونية من خلال تجارب التحييد والاقتران، اظهرت نتائج التحييد التي اجريت على العزلة *Acinetobacter* RB8 الحصول على بعض المستعمرات فاقدة لصفة استهلاك النفثالين كمصدر وحيد للكاربون والطاقة. وعند استخلاص الدنا البلازميدي لعدد من تلك المستعمرات تبين انها فاقدة للبلازميد pRj303.

اظهرت تجارب الاقتران التي اجريت على العزلة RB8 المستخدمة كخلية واهبة والعزلة RB23 التي اعتبرت كخلايا مستملة الحصول على مستعمرات مقترنة على الوسط الانتقائي الحاوي علة الريفامبسين والنفثالين المستخدم كمصدر وحيد للكاربون والطاقة مما يشير ان البلازميد pRj303 مسؤول عن استهلاك النفثالين وهو بلازميد ذاتي الانتقال.

Abstract

The utilization ability of two isolates belonging to genus Acientobacter (RB8 and RB23) to a number of aromatic hydrocarbons as sole carbon and energy source were studied.

The results indicated that isolates (RB8) utilized monocyclic compounds such as benzoate, salicylic acid with the exception of the polycyclic compounds (naphthalens excepts anthracin). A plasmid profile study of two isolates showed only one large plasmid in *Acientobacter sp.RB8.*

Curing and conjugation were used to study the role of *Acientobacter sp.RB8* plasmid (pRj*303).* Curing experiments results showed that some colonies have lost their ability to utilize naphthalens as a sole carbon source. Plasmid DNA extraction from these colonies indicated the loss of plasmid pRj303.

Conjugation experiments between *Acientobacter sp.RB8* and *Acientobacter sp.RB*23 resulted in transconjugants able to utilize naphthalens compounds in .addition to resistance to rifampicin and neomycin. This result indicated the plasmid (pRj303) was responsibl for utilization of naphalen it is a conjugative plasmid.

المقدمة

تعد دراسة التحلل الحيوي للمركبات العطرية (الاروماتية) ذات أهمية واسعة وذلك لكون هذه المركبات لا تتحلل ذاتياً في البيئات التي تتواجد فيها وقد تبقى لعشرات السنوات دون حصول أي تأثر في تركيبها فضلاً عن ما تسببه من أخطار على الصحة العامة في البيئة التي تتواجد فيها وذلك لكونها مركبات سامة حيث إنها تسبب أمراض خطرة مثل السرطان وبعض الأمراض الوراثية[1] كما إن استهلاك المركبات الاروماتية من قبل الأحياء المجهرية كمصدر وحيد للكربون والطاقة يعد صعباً إذا ما قورنت بقابلية هذه الأحياء على استهلاك المركبات الأبسط في التركيب مثل المركبات الاليفاتية[2] ويعود السبب إلى سمية هذه المركبات للكائنات المجهرية فضلاً عن إنها تحتاج إلى مسارات ايضية اكثر تعقيدا كما ذكر آنفا.

تتخذ معظم الاحياء المجهرية المستهلكة للمركبات الاروماتية مساراً رئيسياً للتحلل الحيوي Biodegradation لهذه المركبات والذي يشتمل على اكسدة المركب الاروماتي وتحويله الى مركب كحولي ثنائي الهيدروكسيل (Catechol) ومن ثم يدخل بسلسلة من عمليات الاكسدة والاختزال ليتحول في النهاية الى حامض البايروفيك والذي يدخل بدوره في دورة كريبس (Cryp's Cycle) [3].

اشارت الكثير من الدراسات الى امكانية عزل انواع من البكتريا مستهلكة لانواع مختلفة من هذه المركبات كمصدر وحيد للكاربون والطاقة مثل *Flavobacterium* و *Pseudomonaas* و *Acinetobacter* والتي امتازت بقابليتها على استهلاك انواع اكثر تعقيدا من المركبات الاروماتية الثنائية والثلاثية الحلقة والمتعددة الحلقات (Polycyclic aromatic hydrocarbon) [4]. او بشكل عام يعد استهلاك هذه النوع من المركبات محدودة بانواع معينة من البكتريا [5].

لوحظ ان الجينات المسؤولة عن صفة التحلل الحيوي لهذا النوع من المركبات جينات بلازميدية محمولة على بلازميدات مثل بلازميد التولوين (Tol Plasmid) والسالسيك (Sal Plasmid) والنفثالين (NaH Plasmid) [6]. وقد استخدمت هذه البلازميدات في مشاريع عدة من اجل تطوير قابليات بكتريا معينة لاستهلاك انواع مختلفة من المركبات الهيدروكاربونية الاروماتية وذلك من خلال جمع انواع مختلفة من هذه البلازميدات في كائن بكتيري واحد ليمكن بالنهاية استهلاك مدى واسع من المركبات الاروماتية [7].

لذا هدفت الدراسة الى تحديد قابلية العزلتين في استهلاك المركبات الاروماتية المختلفة ودراسة دور البلازميد في استهلاك هذه المركبات ليتسنى مستقبلا استخدام هذه البلازميدات لتطوير عزلات تستهلك مدى واسع من الهيدروكاربونات.

المواد وطرائق العمل

1-السلالات البكتيرية

استخدمت عزلتي البكتريا *Acinetobacter* RB8 وRB23 اللتان عزلتا في دراسة سابقة[8] واللتان تستهلكان النفط الخام كمصدر وحيد للكاربون والطاقة وتمتاز العزلة RB8 كونها حساسة للمضادات الحيوية (الريفامبسين، والنيومايسين والكاربنسلين) فضلاً عن مقاومتها للمضادات (الترايميثوبريم والتتراسايكلين). وبالنسبة للعزلة *Acinetobacter* RB23 فهي حساسة للمضادات المذكورة انفاً فيما عدا مقاومتها للريفامبسين والنيومايسين.

2-استهلاك البكتريا للعدد من المركبات الهيدروكاربونية العطرية (الاروماتية)

استخدم وسط الاملاح المعدنية المعقم الموصوف في [9] بعد ان وزع بمقدار 25 مللتر في دورق (سعة 250 مللتر) واضيفت المركبات الهيدروكاربونية وهي البنزويت وحامض السالسيك والفينول والنفثالين والانتراسين كل على حدة وبتركيز نهائي 0.2 % ثم لقحت الدوارق بالبكتريا وترك بعض منها دون تلقيح كنموذج سيطرة كذلك لقح وسط الاملاح المعدنية غير الحاوي على مصدر هيدروكاربوني كنموذج سيطرة ايضاً ثم حضنت العبوات في حاضنة هزازة بسرعة 120 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 37 م مدة 72 ساعة.

3-استخلاص الدنا البلازميدي

عزل الدنا البلازميدي من العزلتين *Acinetobacter* وذلك باتباع طريقة التحلل القاعدي (Alkaline lyses) المحورة من قبل[10].

4-الترحيل الكهربائي الهلامي

حدد محتوى البكتريا من البلازميد بعد ترحيل الدنا البلازميدي لمستخلص في هلام الاكاروز (0.8 %) حسب الطريقة الموصوفة في [11].

5-تحييد بلازميد العزلة *Acinetobacter* RB8

استخدمت مادة SDS وصبغة بروميد الاثديوم لتحييد البلازميد pRj303 وللتحري عن المستعمرات المحيدة كررت 300 مستعمرة لكل معاملة من هذه المعاملات على وسط الاملاح المعدنية الصلب المضاف له المركبات الاروماتية كمصدر وحيد للكاربون والطاقة وكررت نفس المستعمرات على وسط لوريا الصلب. حضنت جميع الاطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة.

حددت المستعمرات التي فشلت في النمو على الاوساط الانتخابية واكدت قابليتها على استهلاك النفط الخام والهيدروكاربونات الاروماتية كمصدر وحيد للكاربون والطاقة.

استخلصت الدنا البلازميدي من المستعمرات التي اظهرت تغييراً في قابليتها على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية ورحل على هلام الاكاروز وقورنت الحزم الناتجة مع الحزم البلازميدية للعزلة الاصلية.

6- الاقتران

اجريت تجربة الاقتران بين السلالة الواهبة RB8 *Acinetobacter* (Neo^s, rif^s) والتي تتصف بقابليتها على استهلاك البنزويت وحامض السالسيك والنفثالين وعدم قابليتها على استهلاك الانثراسين والفينول والسلالة المستقبلة التي تتصف بمقاومتها للمضاد الحيوي الريفامبسين والنيومايسين وبالاستفادة من الطريقة الموصوفة من قبل Weserver [12] والمحورة من قبل [13] وبعد اجراء عملية الاقتران نشرت عينات (0.1 ملليتر) بعد اجراء تخافيف مناسبة على وسط الاملاح المعدنية الصلب المضاف له النفثالين بتركيز 0.2 % كمصدر وحيد للطاقة ومضاف له المضاد الحيوي الريفامبسين. حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة.

النتائج والمناقشة

استهلاك عزلتي البكتريا *Acinetobacter*RB8 وRB23 لعدد من المركبات الهيدروكاربونية

نميت العزلتين على عدد من المركبات الهيدروكاربونية الاروماتيى والتي شملت المركبات الاروماتية احادية الحلقة (البسيطة) والمركبات الحلقية المتعددة مثل (النفثالين والانثراسين) واوضحت النتائج قابلية عزلة البكتريا RB8 *Acinetobacter* على استهلاك البنوين وحامض السالسيك والنفثالين وعدم قابليتها على استهلاك الفينول والانثراسين مقارنة بالعزلة RB23 والتي تميزت بقابليتها على استهلاك البنزويت وحامض السالسيك فقط (جدول 1).

تميزت العزلتان بقابليتها على استهلاك حامض البنزويت وحامض السالسيك وذلك لكون هذين المركبين من المركبات الاروماتية التي تتمكن معظم البكتريا المستهلكة للمركبات الاروماتية من استهلاكها [20]، اما بالنسبة لعدم قابلية العزلات على استهلاك الفينول فيعود الى كون هذا المركب سام لهذا النوع من البكتريا [2] الا ان العديد من الدراسات اشارت الى وجود انواع مختلفة من البكتريا مثل *Pseudomonas* لها القابلية على استهلاك الفينول [14]. وقد يعزى الاستهلاك النفثالين من قبل السلالة RB8 فقط الى ان صفة التحلل الحيوي هي صفة مرتبطة بالسلالة وليس خاصة بنوع معين اذ بالامكان العثور على سلالات بكتيرية تابعة لنفس النوع الا انها مختلفة وراثياً في قابليتها في استهلاك انواع مختلفة من الهيدروكاربونات [15].

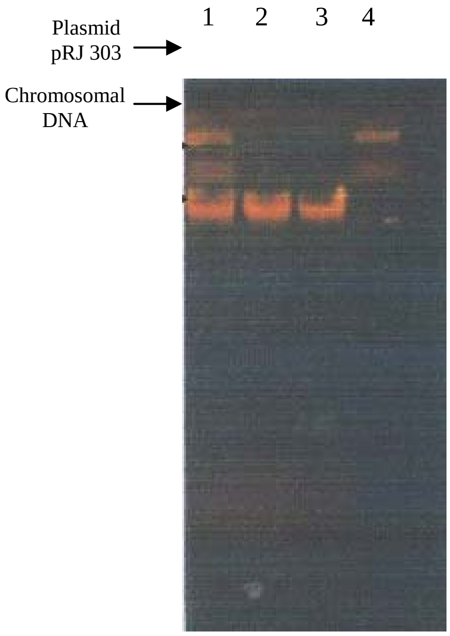
اما بالنسبة لعدم قابلية العزلتين على استهلاك الانثراسين فيعود الى كون هذا المركب من المركبات متعددة الحلقة (المعقدة التركيب) وهي مركبات صعبة التحلل تحتاج الى مسارات انزيمية اكثر تعقيداً لاستهلاك هذا النوع من المركبات وهنا تجدر الاشارة الى ان هناك العديد من الاحياء المجهرية القادرة على استهلاك هذه المركبات وذلك لامتلاكها جينات غير كروموسومية (extrachromosomal) [5]،[15].

جدول (1): استهلاك عزلات *Acinetobacter* للمركبات الهيدروكاربونية الاروماتية

العزلات	بنزويت	حامض السالسيك	فينول	نفثالين	انثراسين
Acinetobacter RB8	+	+	−	+	−
Acinetobacter RB23	+	+	−	−	−

ل الدنا البلازميدي 60

عزل الدنا البلازميدي من كلتا العزلتين ولوحظ احتواء عزلة البكتريا RB8 على بلازميد ذو وزن جزيئي كبير ظهر بشكل حزمة واضحة بعد اكثر من ساعتين من بدء عملية الترحيل الكهربائي اطلق عليه pRj303 بينما لم تحتو العزلة RB23 على حزمة بلازميدية (شكل 1) حيث ان العزلات البكترية المستهلكة للنفط والمركبات الهيدروكاربونية المعزولة من بيئات ملوثة بالنفط الخام تحتوي غالباً على بلازميدات ذات اوزان جزيئية كبيرة نسبياً [16] وقد اشار[17] الى احتواء بكتريا *Acinetobacter* المعزولة من بيئات ملوثة على بلازميدات ذات اوزان جزيئية كبيرة وهي معظمها بلازميدات تحللية او تلعب دوراً كبيراً في التنظيم الجزيئي لعملية التحلل الحيوي.



شكل(1): المحتوي البلازميدي لعزلات بكتريا *Acinetobacter*
1-الحتوى البلازميدي لعزلة RB8 *Acinetobacter*
2-الحتوى البلازميدي لعزلةRB23 *Acinetobacter*
3-الحتوى البلازميدي لعزلة RB8 *Acinetobacter* المحيدة
4-الحتوى البلازميدي لعزلة RB23 *Acinetobacter* المقترنة

تحييد البلازميدات

اوضحت نتائج التحييد التي اجريت على العزلة RB8 تحديد اعلى تركيز من مادة SDS وصبغة برميد الاثيديوم الذي يسمح بنمو البكتريا هو 300 ملغم/ملم، 200 مايكروغرام/مل على التوالي. ولوحظ ان نسبة (30%) من المستعمرات الناتجة بعد المعاملة بمادة بروميد الاثيديوم قد فشلت في النمو على وسط الاملاح المعدنية الحاوي على النفثالين كمصدر وحيد للكاربون والطاقة ولم تتغير قابليتها على استهلاك المركبات الاروماتية الاخرى ولم يلاحظ أي من المستعمرات فقدت قابليتها على استهلاك أي من المركبات الهيدروكاربونية بعد المعاملة بمادة الـ SDS.

يثبت مما سبق ان لصبغة بروميد الاثيديوم فعالية ملحوظة في فقدان العزلة RB8 قابليتها على استهلاك احد المركبات الاروماتية (النفثالين).

مما يشير الى فقدان البلازميد pRj303 لكون تلك المادة (بروميد الاثيديوم) مادة محيدة او لربما احداثه طفرة في فقدان قابليته على الاستهلاك لكونه مادة مطفرة ومحيدة [18] وللتاكد من ذلك استخلص الدنا البلازميدي لعدد من هذه المستعمرات وتم مقارنته بالمحتوى البلازميدي للعزلة الاصيلة واوضحت النتائج فقدان البلازميد pRj303 مما يشير الى ان هذا البلازميد له دور اساسي او تنظيمي في استهلاك النفثالين.

الاقتران

بعد اجراء الاقتران بين السلالة الواهبة RB8 الحساسة rif و neo مستهلكة للنفثالين والسلالة RB23 المقاومة rif و neo وغير مستهلكة للنفثالين تم انتقاء الخلايا المقرنة على الوسط الانتقائي المطور في دراسة سابقة [13] الذي يعتمد على صفة المقاومة لمضاد الحيوية الريفامبسين وصفة الاستهلاك للمركبات الهيدروكارونية حيث يسمح بنمو الخلايا المقترنة ولا يسمح بنمو الخلايا الواهبة والمستلمة تم الحصول على مقترنات نامية على الوسط المحور تمتاز بكونها مقاومة للريفامبسين ومستهلكة للنفثالين كمصدر وحيد للكاربون والطاقة. كما اظهرت مقاومة للنتومايسن مما يؤكد السلالة RB23 قد استلمت نسخة من البلازميد pRj303 والذي اكسب صفة استهلاك النفثالين كمصدر وحيد للكاربون والطاقة.

عند استخلاص الدنا البلازميدي من المستعمرات المقترنة ومقارنته بالمحتوى البلازميدي لعزلة الواهبة RB8 والمستلمة تبين احتوائها على حزمة بلازميدية واحدة ظهرت بنفس مستوى البلازميد pRj303 مما يشير الى ان هذا البلازميد اقتراني ويحمل صفة التحلل الحيوي للنفثالين وهي صفة تنطبق على معظم بلازميدات التحلل الحيوي في كونها بلازميدات اقترانية وذات اوزان جزيئية عالية وخاصة في جنس *Acinetobacter* و *Pseudomonas* [16] ,[17] وهي ذات مدى عائلي واسع ولها صفة الانتقال بين اجناس البكتريا السالبة لصبغة كرام وخاصة تلك التي تعيش في بيئات ملوثة بالهيدروكاربونات [19] ,[20].

References

1. Shuttleworth, K.L. and C.E. Cerniglia **1995**. *Environmental aspects of PAH biodegradation*. Appl. Biochem. Biotechnol. 54: 291-402.
2. Brittion, L.N. (**1984**). *Microbial degradation of Aliphatic Hydrocarbons. In: Microbial degradation of Organic compounds*. (Ed. Gibson. D.T.) pp: 89-130 Marcel Dekker. Inc. New York.
3. Buhler, M. And Schindler J., (**1984**). *Aliphatic Hydrocarbons. In: Biotechnology*. (Eds. Rehm. H.J. and Reed. G.) V. 6a. pp: 329-386.
4. Kanaly R.A. and Harayama. S., (**2000**). *Minireview: Biodegradation of High – Molecular - Weight polycyclic aromatic Hydrocarbons by bacteria*. J. Bacteriol. 182(8) : 2059-2067.
5. Harvey, R. G. **1997**. *Polycyclic aromatic hydrocarbons*. Wiley-VCH. New York. N.Y.
6. Hardy, K. (**1987**). *Bacterial Plasmids*. Second edition. American Society for Microbiology. USA.
7. Friello, DA. Mylorie, J. R. And Chakrabarty, AM. **2000**. *Use of genetically engineered multi-plasmid Microorganisms for rapid degradation of fuel hydrocarbons*. International of Biodeter. And Biodegrad. 48 (1-4): 233-242.
8. Nasir, R.B.; Ali, N.A. and Al-Gelawi, M.H. (**2002**). *Isolation and Identification of crude oil and hydrocarbons utilizing bacteria*. J. IRAQ Science. 1(43): 32-47.
9. Uchiyama, H.; Oguvi, K.; Nishibayshi, M.; Kokufuta, E. And Yagi, O. (**1995**). *Trichloroethylene degradation by cell of methan utilizing bacterium. Methylocystis* spp. Immobilized in calcium alginate. J. Derment. Bioeng. 79: 608-613.
10. 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.) Noewich. U.K.
11. Maniatis, T. Fritsch. E.F. and Sambrook, J. (**1982**). *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
12. Weiservar, M.; Hubacek, J.; Brenner, V.; Piruzian, E.S.; Kobec, N.S. and Velikodvorskaya, G.A. (**1987**). *Mini-Mu Transposition of Bacterial Genes in the transmissible plasmid*. Folia Microbiol. 42: 368-375.
13. Nasir, R.B.; AI-Gelawi, M.H.; Ali, N.A. (**2002**). *The role of Pseudomonas aeruginosa RB19 plasmid in Utilization of Hydrocarbon compounds*. 2(31): 1011.
14. Austen, R.A. and. Dunn. N.W. (**1980**). *Regulation of the plasmid-specified Naphthalene catabolic path way of Pseudomonas putida*. J. Gun. Microbiol. 117: 521-528.
15. Harayama, S. (**1997**). *Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design*. Carr. Opine. Biotechnol. 8 : 248-273.
16. Weightman, A.J. and Slater, J.H. (**1988**). *Concepts and Application in Microbial Ecology. In: Microorganisms in Action*. (Eds. Lynch. J.M. and Hobbie. J.E.) pp: 322-347.
17. Stater, J.H.; Weightman, A. and Thomas, D.J. (**1988**). *Plasmids in: Microorganisms in action*. (Eds. Lynch. J.M. and E. Hobbies. J.) pp: 44-51. Blackwell Scientific, Oxford.
18. Trevors, J. T. (**1986**). *Plasmid curing in bacteria*. FEMS Microbiol. Lott. 32:259-271.
19. Davison, J. (**1999**). *Genetic exchange between bacteria in the environment plasmid*. 42: 73-91.
20. Trevors, J. T. and Van Elasas, J.D. (**1997**). Quantification of gene transfer in soil and the rhizosphere. In: Manual of Environmental Microbiology. (Eds. Hurst, GJ. Knudsen, C.R.; Mclnerney, M.L.; Stelzenbachm, L.D. and Walter, M.V.) pp: 500-508. American Society for Microbiology. Washington, D.C.).