تعيين مواقع المورثات المحللة للسليلوز في بعض الأنواع العائدة لجنس *Pseudomonas* ودراسة إمكانية زيادة قدرة التحلل بإستعمال تقنية تضخيم محتوى الـ DNA البلازميدي

ريان مازن فيصل فادية موفق الحيالي

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل

الخلاصة

تم عزل 26 عزلة محللة للسليلوز من ترب مختلفة في محافظة نينوى فحصت هذه العزلات تجاه مقاومتها للمُضادات الحيوية التتراسايكلين وحامض النالدكسيك والسيفالكسين والأمبسلين والكلورامفينيكول وإعتماداً على مقاومتها للمُضادات الحيوية أنتخبت ثمأن عزلات لغرض تشخيصها ولوحظ أن جميعها تعود للنوع *Pseudomonas putida* . أُجري تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي لهذه العزلات بإستعمال درجة حرارة 45°م كعامل محيد وذلك لغرض الكشف عن مواقع المورثات المحللة للسليلوز إذ تم الحصول على نسب تحييد تراوحت بين (4-31%) لبعض العزلات مما يعتبر مؤشراً على حمل هذه المورثات على جزيئات بلازميدية بينما لم يعطي البعض الاخر نسبة تحييد مما يدل على حملها على الكروموسوم. درست قابلية التضخيم البلازميدي للعزلات التي تحمل مورثات السليلوز بلازميديا بإُستعمال تركيز 150 مايكروغرام/مليلتر من مضاد الكلورامفينيكول ولوحظ أن العزلة ذات الرمز19 كأن لها القدرة على تضخيم محتواها البلازميدي وتم التأكد من أن البلازميدات التي تحمل مورثات تحلل السليلوز هي التي حصل لها التضخيم وليس غيرها من خلال إجراء مقارنة بين العزلة الاصلية والعزلة المضخمة محتواها البلازميدي من حيث كمية الـCO_2 المتحرر مقارنة بالزمن.

DETERMINING THE CELLULASE GENE LOCATION OF SOME *PSEUDOMONAS* SPECIES ISOLATED FROM SOIL AND STUDYING THE POSSIBILITY TO INCREASE CELLULASE DEGRADATION BY PLASMID DNA AMPLIFICATION TECHNIQUE

Rayan M. Faisal **Fadeya M. Al-Haiali**

Dept. of Biology, College of Science, University of Mosul

ABSTRACT

Twenty six cellulose-degrading bacterial isolates were isolated from different soil samples from Nineveh governorate, these isolates were checked for antibiotic resistance towards Tetracycline, Nalidixic acid, Cefalexin, Ampicillin and Chloramphenicol, according to their resistance pattern eight of them were chosen for diagnosis. The study found that all these isolates belonged to *Pseudomonas putida*. Curing by elevated temperature was carried out to identify the cellulose degradation gene location, curing percentage of some isolates were between (4-31%) which may give a fact that these isolates may carry cellulose genes on their plasmids. On the other hand some isolates failed to be cured probably because their cellulose genes were chromosomal. Plasmid amplification by 150µg/ml chloramphenicol was studied for all isolates that carried plasmid for cellulose degradation, we found that the isolate (19) had the ability to amplify its plasmid content. Certification that cellulase plasmids were amplified was done by comparing the CO_2 evolution for the original and the amplified isolate per week.

Key words: **Cellulase gene, Location, *Pseudomonas***

المقدمة

تعتمد الحياة على سطح الكرة الأرضية على عملية البناء الضوئي والتي تخلف سنوياً ملايين الأطنان (10^{11} طن) من المخلفات النباتية المعقدة والتي يشكل السليلوز أغلبها(1) والسليلوز بوليمر من الكلوكوز مرتبطة بأواصر (β1-4) متواجد بهيئة بلورية وغير بلورية في جدر النباتات مرافقاً مع غيره من السكريات مثل اللكنين (Lignin) واليهيمسليلوز Hemicellulose(2)هناك مدى واسع من البكتريا والفطريات التي لها القدرة على تحليل السليلوز طبيعيا من خلال أنتاجها لمجموعة من الأنزيمات التي يطلق عليها مجتمعة بالـCellulase كما وجد في بعض الأحياء المجهرية أن تواجد وأنتاج هذه الأنزيمات يتم من خلال معقد متعدد البروتين Multiproteincomplex يسمى بـ Cellulosome هذا المعقد يقع على السطح الخارجي للخلية البكتيرية(3) وهو المسؤول عن إنتاج الأنزيمات الثلاثة المسؤولة عن تحليل السليلوز وهم endo- β1-4glucanase وexo-β1-4glucanase و-β glucosidase(2). تزايدت أهمية الأحياء المجهرية المحللة للسليلوز في الآونة الأخيرة أذ لم تقتصر فقط أهميتها في تحليل المخلفات السليلوزية في التربة وأنما ساهمت في العديد من الصناعات مثل أنتاج الميثأن والايثأنول وبروتين الخلية الواحدة (4,5) وفي عملية التخلص من المخلفات السليلوزية في معامل صناعة الورق. يقع جنس *Pseudomonas* ضمن مجموعة تصنيفية كبيرة يضم العديد من الأنواع التي تتباين في فعالياتها الحيوية فهي كثيرة التقلب أيضياً وفسيولوجياً ووراثياً وتدخل في العديد من العمليات المهمة مثل تدوير المعادن و تحليل وتدوير المركبات العضوية و فساد الأغذية وحماية النباتات من بعض الإصابات البكتيرية والطفيلية. أنواعها متباينة التغذية بعضها يستطيع تحليل أكثر من 100 مصدر مختلف للكاربون بعضها محمول على جزيئات بلازميدية لها القدرة على الأنتقال بالاقترأن أو قد تكون واقعة على عناصر وراثية قافزة Transposon elements(6). يهدف هذا البحث إلى عزل الأحياء المجهرية المحللة للسليلوز من التربة ودراسة أمكأنية زيادة قدرتها في تحليل السليلوز للمورثات بلازميدية الأصل بأُستعمال تقنية التضخيم البلازميدي باستعمال مضاد الـ Cm.

المواد وطرائق العمل

عزل الأحياء المجهرية المحللة للسليلوز

أُخذ 20 عينة تربة من مواقع مختلفة من محافظة نينوى أخذت عينات الترب على عمق 10سم من سطح التربة حضر منها تخافيف عشرية ونشرت على وسط غذائي أدنى Minimal Media يحوي على مادة السليلوز بتركيز 2غم/لتر كمصدر عضوي وحيد وحضنت الأطباق بدرجة 37°م ولمدة 7 أيام وحسب طريقة (7).

مقاومة المُضادات الحيوية

لغرض تحديد صفة المقاومة والحساسية للعزلات قيد الدراسة فقد لقحت أوساط المُضادات الحيوية بالعزلات قيد الدراسة للمُضادات التتراسايكلين(Tc) وحامض النالدكسيك (NA) وسيفالكسين (Cf) والامبسلين(Ap) والكلورامفينيكول (Cm) وذلك بأُستعمال المحاليل الخزينة لكل مضاد والمحضر حسب طريقة (8). زرعت السلالات بطريقة التخطيط على أوساط المُضادات وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37°م.

تشخيص العزلات المنتخبة

أنتخبت 8 عزلات من العزلات قيد الدراسة وذلك إعتماداً على مقاومتها للمُضادات الحيوية أذ أنتخبت أكثرها مقاومةً. شخصت العزلات حسب مظهرها الخارجي وشكل المستعمرات على وسط أكار الماكونكي وإصطباغها لصبغة كرام و فحص الحركة كما أجريت عليها اختبارات بايوكيمائية وهي فحص الاوكسيديز، فحص الكتاليز، فحص تخمر الكلوكوز فحص تخمر اللاكتوز، فحص تحلل الارجنين، فحص تحلل اللايسين، وإختزال النترات إلى نتريت، وإختبار ONPG، وفحص تحلل الايسكولين وأنتاج أنزيم DNase وأنتاج الـ H_2S وكما جاء في (9).

تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي للعزلات المنتخبة

أُستعملت طريقة (10) في تحييد محتوى الـDNA البلازميدي للسلالات قيد الدراسة المنتخبة إذ أُستعملت درجة حرارة 45°م كعامل محيد بإعتبارهُ وسيلة للكشف عن مواقع المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز ومقاومة المُضادات الحيوية.

دراسة قابلية الـDNA البلازميدي على تضخيم عدد نسخه

أُتبعت طريقة (11) لدراسة قدرة الـDNA البلازميدي للعزلات قيد الدراسة على تضخيم عدد نسخه أذ حضر نموذجين بمقدار 50 مليلتر وسط مرق مغذي حاوي على تركيز 10 مايكروغرام/مليلتر من مضاد الـ Cm، ثم لقح كل نموذج بإضافة0.1 مليلتر من مزرعة جرثومية نشطة. حضنت النماذج في حاضنة هزازة (80 دورة/دقيقة) عند درجة 37°م لمدة 4-5 ساعات لحين وصول الكثافة الضوئية إلى 0.4 عند طول موجي 600 نأنومتر. عزل الـDNA البلازميدي من أحد النماذج وبإعتماد طريقة (12) أما النموذج الثأني فقد تم تحفيز زيادة عدد نسخ ال DNAالبلازميدي فيه بإضافة المضاد الحيوي الـ Cm بتركيز 150 مايكروغرام/مليلتر مع إستمرار تحضينه إلى اليوم التالي، ثم عزل منه الـDNA البلازميدي بنفس الطريقة آنفة الذكر بعدها تم تقدير تركيز الـDNA البلازميدي المعزول من النموذجين بحسب طريقة (13) لغرض المقارنة بينهما.

الكشف عن تضخيم مورثات تحليل السليلوز المحمولة بلازميديا

لغرض التأكد من أن المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز حصل لها تضخيم أم لا أُستعملت طريقة (14) أذ لقح 100غم من تربة معقمة في دورق مخروطي حجم 250 مليلتر بالعزلة الأصلية والاخرى بالعزلة المضخم محتواها البلازميدي أضيف لكل منها 2 غم من السليلوز ثم رطبت التربة ببضع قطرات من الماء المقطر المعقم وثبت فيال زجاجي يحوي 15 مليلتر هيدروكسيد الصوديوم (1عياري) في التربة ثم غطي الفلاسك بغطاء محكم وحضن بدرجة37°م لمدة أسبوع بعدها أخذ محلول هيدروكسيد الصوديوم وأضيف له 2 مليلتر من كلوريد الباريوم (1عياري) مع عدة قطرات من الفينولفثالين وثم سحح ضد حامض الهيدروكلوريك (1عياري) حتى إختفاء اللون الوردي للدليل (كررت هذه الخطوات لمدة أربعة أسابيع) علماً بأن الملي مكافئات من هيدروكسيد الصوديوم المستعملة تمثل ملي مكافئات ثأني أوكسيد الكاربون المتحرر من إستهلاك السليلوز وتم حساب عدد ملي غرامات ثأني أوكسيد الكاربون المتحرر حسب المعادلة التالية:

ملغم CO_2 = ملي مكافئCO_2 × الوزن المكافئ لـCO_2(22)

ثم طبقت العلاقة بين عدد ملي غراماتCO_2 المتحررة مع الزمن لملاحظة الفرق بين العزلة الأصلية والعزلة المضخم محتواها البلازميدي.

النتائج والمناقشة

عزل الأحياء المجهرية المحللة للسليلوز

تم عزل 26 عزلة نقية من عينات التربة والتي تمكنت من النمو على وسط غذائي أدنىMinimal media يحوي السليلوز كمصدر عضوي وحيد مما يدل على إمتلاك هذه الجراثيم المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز وهذا يتفق مع الباحث (7) أذ اعتبر نمو العزلات على وسط Omeliansky agar المدعم بالسليلوز كمصدر عضوي وحيد هو المؤشر الأول على قدرة هذه الجراثيم على تحليل السليلوز ليتم بعدها قياس النشاط الأنزيمي.

مقاومة المُضادات الحيوية

أُختبرت 26 عزلة محللة للسليلوز تجاه المُضادات الحيوية التتراسايكلين وحامض النالدكسيك والسيفالكسين والامبسلين والكلورامفينكول وبالتراكيز النهائية المبنية في الجدول(1). ويلاحظ من الجدول(1) أن نسب المقاومة لعزلات التربة كأنت 19.2% لمضاد التتراسايكلين و57.7% لمضاد حامض النالدكسيك و76.9% تجاه مضاد السيفالكسين و42.3% تجاه مضاد الأمبسلين و46.2% تجاه مضاد الكلورامفينكول.

جدول(1):حساسية ومقاومة العزلات المحللة للسليلوز تجاه المُضادات الحيوية

رقم العزلة	وسط الاكار المغذي الحاوي على التراكيز النهائية للمُضادات الحيوية بـ مايكروغرام/مليلتر				
	Tc (15)	NA (30)	Cf (30)	Ap (50)	Cm(10)
1	S	S	R	R	S
2	S	S	S	S	R
3	S	S	S	S	S
4	S	S	R	R	R
5	S	S	S	S	R
6	S	R	R	S	R
7	R	S	S	S	S
8	S	R	R	S	S
9	S	R	R	R	R
10	S	R	R	S	S
11	S	R	R	S	S
12	R	S	R	R	S
13	R	S	S	S	R
14	S	R	R	S	S
15	S	R	R	R	R
16	R	S	R	R	S
17	S	R	R	R	S
18	S	R	R	S	S
19	S	S	R	R	R
20	R	S	S	S	R
21	S	R	R	R	R
22	S	R	R	R	R
23	S	R	R	S	R
24	S	R	R	R	S
25	S	R	R	S	S
26	S	R	R	R	S

قد يعود السبب إلى مقاومة عزلات التربة الى المُضادات الحيوية إلى تلوث التربة بالفضلات أو بمياه المجاري التي تحوي أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية الممرضة ففي دراسة أجراها (15) لاحظ بأن 62% من ترب الحدائق في المنازل التي تمتلك حيوانات كالقطط والكلاب كانت حاوية على بكتريا الـ ***Salmonella*** المرضية والتي أتت من براز هذه الحيوأنات. أو ربما يعود السبب في مقاومة عزلات التربة للمُضادات الحيوية إلى أن العزلات التي ظهرت لدينا قد تعود لجنس ***Pseudomonas*** المعروف مقاومته للمُضادات الحيوية أو جنس ***Bacillus*** أو ***Streptomyces*** المعروف بأنتاجه لبعض المُضادات الحيوية وبالتالي مقاومتهم إذ لاحظ(7) أن من بين عزلاته التسعة المعزولة من التربة كأن بعضهم يعود للنوع ***B.circulans*** بينما كأن البقية ***P.fluorescence***، إذ تمكنت بعض عزلاته من مقاومة الامبسلين بتركيز(ppm1600) والكلورامفينكول (ppm300) والكاناماسين(ppm1600) والريفامايسين (150ppm) والجنتامايسين (ppm400) والستريتومايسين (ppm300).

إستناداً إلى مقاومة المُضادات الحيوية تم إختيار العزلات (4 و6 و9 و15 و19 و21 و22 و23) والتي تحمل صفة المقاومة لثلاث وأربع مُضادات حيوية وذلك لايضاح نتائج التحييد البلازميدي لمقاومة المُضادات الحيوية ودراسة مواقع المورثات المقاومة للمُضادات الحيوية جنبا إلى جنب مع مورثات تحليل السليلوز. مع مراعاة أن جميع العزلات التي تم أنتخابها يجب أن تكون مقاومة لمضاد الكلورامفينكول لغرض أُستعمالهم في تجربة تضخيم محتوى الـDNA البلازميدي لاحقاً.

تشخيص العزلات المنتخبة

ظهرت العزلات الثمأنية قيد الدراسة بشكل مستعمرات شاحبة اللون قطرها 3 ملم وبعد فحصها مجهرياً ظهرت بأنها عصيات سالبة لصبغة كرام غير مكونة للأبواغ موجبة لإختيار الحركة وموجبة لفحص الاوكسينر ومنتجة لخميرة الكتاليز ومخمرة للكلوكوز وغير قادرة على إستهلاك اللاكتوز وموجبة لفحص تحلل الارجنين وسالبة لفحص تحلل اللايسين وموجبة لفحص إختزال النترات وسالبة لفحص ONPG وسالبة لاختبار DNase وسالبة لفحص تحلل الاسكولين وغير قادرة على أنتاج الـH_2S واستنادا إلى ما ذكر في(9) تعود هذه العزلات إلى النوع *P.putida*. قد يعود سبب عائدية جميع العزلات قيد الدراسة إلى النوع *P.putida* إلى الطريقة التي من خلالها تم أنتخاب العزلات قيد الدراسة أذ أعتمد أولاً على قدرة البكتريا على تحليل السليلوز وأن جنس *Psedomonas* هو أحد أهم الأجناس المحللة للسليلوز في التربة أذ وجد (16) أن أكثر ثلاث أجناس لها القابلية على تحليل السليلوز في التربة الزراعية هي *Serratia spp* و *Pseudomonas spp.* و *Serratia marcescens* والذي أظهروا قيم تحلل 3.83 و4.21 و 4.52 ملي مول كلوكوز لكل مل بالساعة على التوالي. بعدها تم إعتماد فرط المقاومة كأساس لإختيار العزلات والتي أيضاً ساهمت في إظهار عزلات *Pseudomonas* المعروفة بمقاومتها للعديد من المُضادات الحيوية من خلال إمتلاكها آليات مختلفة لمقاومة المُضادات ففي دراسة أجراها(6) عزل بكتريا*P.putida* من التربة ووجد أنها مقاومة للمُضادات الأمبسلين والكلورامفينكول والنتتراسايكلين والكانامايسين والستربتومايسين والكاربنسلين.

تحييد محتوى الـDNA البلازميدي لعزلات *P.putida*

لغرض الكشف عن مواقع المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز وعن مقاومة المُضادات الحيوية في عزلات جرثومية *P.putida* أُستعمل درجة الحرارة 45°م بإعتبارها عامل تحييد فيزياوي وبإعتبارها أحد المحيدات شائعة الاستعمال والتي لها دور واضح في تحييد محتوى الـDNA البلازميدي في أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية إذ تم إستعمالها من قبل(6) في تعيين مواقع المورثات المنتجة لأنزيمات تحلل الليمونين limonin Degradation enzyme في بكتريا *P.putida* كما حصل (17) على نسب تحييد تراوحت بين (4-60%) لتحييد محتوى الـDNA البلازميدي لبكتريا *Streptomyces* وكانت فعالية التحييد بالحرارة أكفأ من أُستعمال الاكردين البرتقالي بالتركيزين 50 و100 مايكروغرام/مليلتر وكذلك أكفأ من المحيد

Sodium Dodecyl Sulphate بالتركيزين 50 و100 مايكروغرام/مليلتر وعلى هذا الأساس تم أعتماده في هذا البحث ويوضح الجدول(2) نتائج التحييد بأُستعمال درجة الحرارة45°م.

جدول(2):النسب المئوية لتحييد محتوى الـDNA البلازميدي لبكتريا *P.putida* بأُستعمال درجة الحرارة 45 °م

رقم العزلة	النسب المئوية لتحييد محتوى الـDNAالبلازميدي تجاه المُضادات الحيوية المستخدمة بالـ مايكروغرام/مليلتر والسليلوز.				
	Cellulose	NA(30)	Cf(30)	AP(50)	Cm(10)
4	22	S	4	0	12
6	0	14	42	S	0
9	0	27	30	17	2
15	0	18	10	21	10
19	18	S	2	6	22
21	0	55	0	28	18
22	31	96	0	0	14
23	4	0	2	S	4

يلاحظ من الجدول (2) أن العزلات (6و9 و15 و21) لم يحصل لهم تحييد لمورثات تحليل السليلوز بينما حصل لهم تحييد لمقاومة المُضادات الحيوية قيد الدراسة وبنسب تراوحت بين (0-42%) للعزلة6 و(2-30%) للعزلة 9 و(10-21%) للعزلة 15و(18-55%) للعزلة 21 لذا يمكن القول أن المقاومة لهذه المُضادات قد تكون بلازميدية بينما تشير النتائج في العزلات آنفة الذكر أنها تملك مورثات لتحليل السليلوز واقعة على الـDNA الكروموسومي لهذه العزلات إذ ذكر(18) بأن المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز في البكتريا والفطريات تكون محمولة على الكروموسوم وفي البكتريا تكون المورثات أما موزعة على الكروموسوم أو بشكل مجموعة مرتبطة من تسعة مورثات حجمها 22kb تمتلك في النهاية $^{-}3$ مورث قافز. كما يلاحظ من الجدول(2) أن العزلات (4 و19 و22 و23) حصل لهم تحييد لمحتوى الـDNA البلازميدي تراوحت بين (4-31%) لمورثات تحليل السليلوز وهذا يدل على أن المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز تقع على جزيئات بلازميدية حساسة للحرارة إذ ذكر (19) إمتلاك بكتريا *P.putida* العديد من المسارات الايضية المشفرة من البلازميدات والتي تخلق مركبات ثأنوية أصغر تصب في المسارات الايضية الرئيسية لحياة وتكاثر هذه البكتريا وخير مثال لهذه البلازميدات هي البلازميدات المسؤولة عن تحليل التولوين Tolueneوالنفثالين Naphthalene والكامبور Camphor. كما يمكن أن تحمل مورثات تحليل السليلوز على جزيئات قافزة أدت الى نقل المورثات المسؤلة عن تحليل السليلوز من الكروموسوم الى جزيئة بلازميدية إستناداً الى ما ذكره (18) أذ أشار الى أن مورثات تحليل السليلوز في الفطريات قد يكون منشأها المورثات القافزة والمحللة للسليلوز في البكتريا.

دراسة قابلية الـDNA البلازميدي على تضخيم عدد نسخه

إستناداً إلى نتائج التحييد المبنية في الجدول(2) تم إختبار العزلات (4 و19 و22 و 23) التي إتضح أنها تحمل المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز على جزيئات بلازميدية وذلك لغرض دراسة قابلية الـDNA البلازميدي لهذه العزلات على تضخيم عدد نسخه ويوضح الجدول(3) النتائج التي حصلنا عليها.

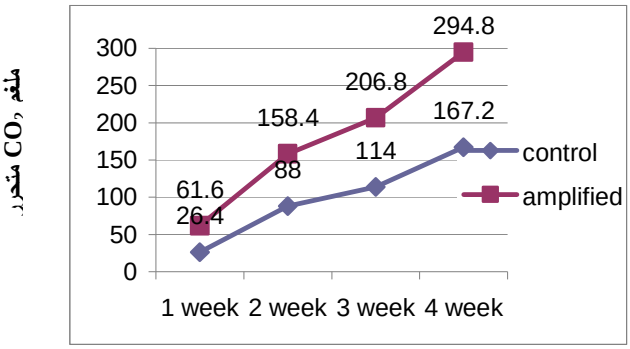
جدول(3):دور مضاد الكلورامفينكول بتركيز (150مايكروغرام/مليلتر) في إحداث تضخيم محتوى الـDNA البلازميدي لعزلات بكتريا *P.putida*

رقم العزلة	قبل إضافة مضاد الكلورامفينكول		بعد إضافة مضاد الكلورامفينكول	
	الكثافة الضوئية للمزرعة البكتيرية	تركيز الـDNAالبلازميدي بالمايكروغرام/مليلتر	الكتافة الضوئية للمزرعة الجرثومية	تركيز الـDNA البلازميدي بالـ مايكروغرام/مليلتر
4	0.425	29.0	0.440	29.9
19	0.390	30.2	0.405	61.0
22	0.410	24.3	0.515	27.2
23	0.385	22.6	0.422	23.7

يلاحظ من الجدول(3) أن من بين العزلات الأربعة قيد الدراسة كأنت فقط لبلازميدات العزلة (19) القدرة على تضخيم عدد نسخها عن طريق التحفيز بمضاد الكلورامفينكول بتركيز (150 مايكروغرام/مليلتر) أذ وصل تركيز الـDNA البلازميدي في هذه العزلة إلى أكثر من ضعف ما كأن عليه قبل إضافة مضاد الكلورامفينكول، مع مراعاة أنه لم يحدث زيادة في قراءة الكثافة الضوئية لجميع المزارع الجرثومية بعد إضافة الكلورامفينكول وهذا يدل على أن سبب حدوث زيادة في تركيز الـDNA البلازميدي يعود إلى قدرة هذه البكتريا على تضخيم محتواها البلازميدي وليس إلى زيادة عدد الخلايا البكتيرية وبالتالي زيادة تركيز البلازميدات وقد أشار (20) أن السبب وراء زيادة تركيز الـDNA البلازميدي عند إستعمال التراكيز من الكلورامفينكول مع بكتريا *Proteus mirabilis* هو زيادة أنزيمChloramphenicol acetyl transferees نتيجة إكثار المحددات r في بلازميدات المقاومة R plasmids. كما ذكر(21) بأن بعض البلازميدات لا تحتاج بتضاعفها الى البروتينات المنتجة من البلازميد نفسه بل تستخدم في تضاعفها الأنزيمات طويلة العمر من خلية المضيف وبالتالي تتضاعف بصورة مرتاحة Relaxed fashion عند وجود مثبطات بناء البروتينات مثل تجويع الاحماض الامينية Amino acid starvation ووجود الكلورامفينكول ولأن تضاعف الكروموسوم على عكس تضاعف البلازميد يحتاج في كل خطوة الى بروتينات وأنزيمات للبدء في كل مرحلة تضاعف لذا سيتوقف تضاعف الكروموسوم ويستمر تضاعف البلازميدات.

الكشف عن تضخيم مورثات تحليل السليلوز المحمولة بلازميديا

بعدما لوحظ من نتائج الجدول(2) إن العزلة 19تحمل المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز بلازميديا وكما لوحظ من نتائج الجدول(3) بأن هذه العزلة لها القدرة على تضخيم محتواها البلازميدي لذا أُستعمل تجربة تم من خلالها تقدير عدد مليغرامات ثأني أوكسيد الكاربون المتحرر من عينتي تربة تحتوي على السليلوز أحداهما ملقحة بالعزلة (19) الأصلية والأخرى بالعزلة (19) المضخمة محتواها البلازميدي وذلك لإثبات بأن الزيادة في تركيز الـDNA البلازميدي كأن له تأثير إيجابي في تحسين قدرة العزلة (19) المضخمة محتواها البلازميدي في تحليل السليلوز. وكما موضح في الشكل(1). يلاحظ من الشكل(1) أن كفاءة العزلة 19 المضخمة محتواها البلازميدي تحسنت بشكل ملحوظ بمقارنتها بالعزلة 19 الاصلية وهذا يدل على أن مضاد الكلورامفينيكول كأن له دور في تضخيم محتوى الـ DNA البلازميدي لبكتريا ***P.putida*** ومن ضمنها المورثات المسؤولة عن تحليل السليلوز والتي ربما تكون واقعة على نفس الجزيئة البلازميدية المسؤولة عن مقاومة الكلورامفينيكول. أن إستعمال العزلات المحللة للسليلوز وبالاخص الاكفأ تحليلاً له دور مهم في زراعة المحاصيل وتحسين خصوبة الترب أذ وجد(22) أنه عند تلقيح مجموعة سنادين من نبات الحنطة ببكتريا الـ Azotobacter مع بكتريا محللة للسليلوز إزداد الحاصل النباتي ومحتوى النتروجين فيها بشكل معنوي مقارنة بعينة السيطرة.



شكل(1):كفاءة تحليل السليلوز للعزلة 19 الاصلية والمضخمة محتواها البلازميدي كلا خلال أربع أسابيع من التحضين.

المصادر

1- DeBoy, R. T.; Mongodin, E. F.; Fouts, D. E.; Tailford, L. E. Khouri, H.; Emerson, J. B.; Mohamoud, Y.; Watkins, K.; Henrissat, B.; Gilbert, H. J. and Nelson, K.E.(2008). Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibriojaponicas, J. Bacteriol.*,190:5455-5463.

2- Moat, A.G.; Foster, J.W. and Spector, M. P.(2002). *Microbial physiology,* Wiley-liss, Inc.
3- Beguin, P.(1990).Molecular biology of cellulose degradation. Annu. Rev. *Microbiol*.,44:219-248.
4- Dees, C.; Ringliberg, D.; Scott, T.C. and Phelps, T.(2002). Taxonomic characterization of the cellulose degrading bacterium NCIB 10462, Applied *Biochem. and Biotech.,*12:2-12.
5- Wood, B. E. and Ingram, L. O. (1992). Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiellaoxytoca* containing chromosomally integrated zymomonasmobilis genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulose genes from Clostridium thermocellum,58:2103-2110.
6- Jain, M. Sh. (2003). Molecular and physiological studies on *Pseudomonas putida*, M. Sc. thesis, Thaper Institute of engineering and technology.
7- Mazumdar, T.; Goswami, C. and Talukdar, N. C. (2007). Charecterization and screening of beneficial bacteria obtained on Kings B agar from rhizosphere, Indian *J. of Biotechnology*,6:490-494.
8- Timmis, N. K. and Puhlar, A.(1984)." Advances in molecular genetics", Springer-verlary, New York,187-188.
9- Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. and Woods, G. (2006). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Sixth ed., Lippincott Williams and wilkins, USA. P:303-321.
10- Baldwin, J. N.; Strickland, R. H. and Cox, M. F. (1969). Some properties of the Beta-lactamase genes in *Staphylococcus epidermidis, J. Appl. Microbiol.*,18,628-630.
11- Norgard, M.V.; Emigholz, K. and Monahan, J. J.(1979)Increased amplification of pBR322 plasmid deoxyribonucleic acid in *E. coli* K12 strain RP1 and X1776 grown in presence of high concentrations of nucleoside. *J.Bacteriol*.,138:270-272.
12- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). *Nucleic Acid Research,*7:1513-1524.
13- Ahmed, K. D. (1989). The positive control of ilv C expression in *E. coli* K12. Ph.D. thesis, Univ. Durham, England.
14- Weaver, R. W.; Angle, J. S.; Bottomley, P. S.; Bezdicek, D.; Smith, S; Tabatabai, A. and Wollum, A. (1994) Methods of soil analysis, part 2,soil science society of America, Inc.
15- Nocon, F.A. (1993). The source of Salmonella contamination of soil on Guam, *J. Environmental health,*12:676-682.
16- Machiavelli; Tejoprakash, N. and Khanna, S. (2009). Fingerprinting of cellulose degrading bacteria from agricultural soils, *J. of pure and applied Microbiology,* 3:143-150.
17- Faisal, R. M.(2010). Application of Low pH as a Curing Agent of Plasmid DNA in *Streptomyces* as Compared With Other Agents, Al-Rafidain *Journal of science,*21:40-53.

18- Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Van zyl, W. H. and Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: *Fundamentals and biotechnology*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:506-577.

19- Wheatcroft. R. and Williams P.A. (1981). Rapid methods for the study of both stable and unstable plasmids in *Pseudomonas*, *Journal of General Microbiology*, 124 : 433 - 437.

20- Franklin, T.J. and Rownd, R. (1972). R-factor mediated resistance to tetracycline in *Proteus mirabilis. J. Bacteriol.*,115:235-242.

21- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed., Cold spring harbor, NY: Cold spring harbor laboratory Press.

22- Sundara, A. V. B. (2003). Soil organic matter and microorganisms. Ind., *J. Soc. Soil Sci.*, 148:221-226.