------مجلة علوم الرافدين، المجلد 21، العدد 1، ص40-53،2010------

الأس الهيدروجيني المنخفض محيدا لمحتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* مقارنه بمحيدات أخرى

ريان مازن فيصل

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 4/ 11 / 2008 ؛ تاريخ القبول 7 /12 / 2009)

الملخص

أخذت 14 سلالة من جرثومة *Streptomyces* من دراسة سابقة وجرى التأكد من التـشخيص ثانيـةً بإعـادة زرعها على مزرعة الشريحة لملاحظة شكل الغزل الهوائي والأرضي لها، أختبر مقاومتها تجاه المـضادات الحيوية حامض النالدكسيك والامبسلين والكلورامفينيكول والسيفالكسين والريفامايسين والجنتامايسين واسـتناداً لاختلاف المقاومة تم اختيار 4 سلالات الأكثر مقاومة للمضادات قيد الدراسة. أجري التحييد التلقـائي لهـذه السلالات كنموذج سيطرة وكانت نسبة التحييد (4% – 0) ثم أجري التحييـد باسـتخدام الأس الهيـدروجيني ألحامضي(pH) إذ حصلنا على نسب تحييد (100% – 22) تجاه المضادات الحيوية قيد الدراسة ثـم اسـتخدم محيدات فيزياوية وكيمياوية لإجراء مقارنة مع التحييد بالأس الهيدروجيني ألحامضي إذ اسـتخدمت درجـة الحرارة والاكردين البرتقالي بتركيز 50 µg/ ml , 100 µg/ ml ومادة الـ SDS بتركيز 50 , 100 µg/ ml إذ حصلنا على نسب تحييـد (60% – 4) و (20% – 0) و (12% – 0) و (6% – 0) و (20% – 4) على التوالي مما يثبت بأن استخدام الأس الهيدروجيني الحامضي له تأثير تحييدي أقوى في تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* من بقية المحيدات شائعة الاستخدام بالإضافة إلى سهولة التعامل معه مقارنة بالمحيدات الكيمياوية التي بعضها يكون مطفراً للـ DNA الكروموسومي للبكتريا وفيه مخـاطر أيضا على الباحث نفسه.

Application of Low pH as a Curing Agent of Plasmid DNA in *Streptomyces* as Compared with other Agents

Rayan M. Faisal
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

Fourteen strain of *Streptomyces* were obtained from a previous study and their identity was ascertained by using slide culture method that showed their aerial and earthy hyphae. Antibiotic susceptibility of the strains towards Nalidixic acid, Ampicillin, Chloramphenicol, Cefalexin, Rifamycin and Gentamycin were tested and the four most resistant were selected for subsequent analysis. Spontaneous curing was obtained as a control sample and we noticed (0-4%) curing percentage, after treatment of the isolates with acidic pH we noticed (22-100%) curing percentages towards the antibiotics understudy .Then we used various chemical and physical curing agents to compare them with acidic pH treatment. We found that elevated temperature, acridine orange (50µg/ml), (100µg/ml), SDS (50µg/ml) and (100µg/ml) had the ability to cure the isolates at various percentages (4-60%), (0-20%), (0-12%), (0-6%), (4-20%) respectively. This indicated that using the acidic pH has an effective curing ability to cure the plasmid DNA of *Streptomyces* much better than other well known curing agents .Low pH is also much easier and safer to handle as compared with chemical compounds that can be mutagenic to chromosomal DNA and harmful to the researcher himself .

المقدمة

تعد جرثومة *Streptomyces* من أحياء التربة المجهرية المهمة والتي تعود للجنس Actinomycetes والتـي تنمو أفراده بشكل خيوط متشبعة تتمايز لتنتج السبورات تأتي أهميتها من قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية حيث 60% من المضادات المنتجة من قبل الأحياء المجهرية تعود لهذا النوع (Crameri *et al.*, 1986).

أجريت العديد من الاختبارات والبحوث في المختبرات لاكتشاف المركبات التي لها القدرة على إحداث تحييـد للبلازميدات البكتيرية، وأن أكثر هذه المركبات شيوعاً هي تلك المركبات التي لها القدرة على الاندساس داخل الـ DNA (DNA intercalating agents) مـن هـذه المركبـات Nitroacridines و Aminoacridines وأملاح الـ Ethidium والـ Propidium (Hahn, 1976)، هذه المركبات تحوي حلقات كارهة للماء معقدة تستطيع أن تنحشر بين القواعد النتروجينية في الـ DNA ثنائي الخيط وتتمكن من الدخول إلى الخلية البكترية والتداخل مع عدة فعاليات حيوية منها التضاعف والاستنساخ والترجمة وإعادة التـشكيل Recombination و RNA splicing وتواجد البلازميدات وإحداث طفرات الإزاحة Frame shift mutations، كما تتمكن هـذه

المركبات في جرثومة *Streptomyces* من إحداث طفرات الحذف وتحفيز قطع الـ DNA على التضخيم Amplification وخصوصاً في الأطراف النهائية للكروموسوم الخيطي لهذه البكتريا (Lee *et al.*, 1996). وجد أن بعض المضادات الحيوية لها القدرة أيضا على إحداث التحييد عند استخدامها بتركيز أقل من التركيز المثبط الأدنى للبكتريا مثل مضاد Novobiocin و Clorobiocin و Coumermycin A1 والتي تؤثر على الوحدة B من انزيم DNA gyrase ومضاد Oxolinic acid و Nalidixic acid اللذان يؤثران على الوحدة A من أنزيم DNA gyrase إذ يستخدم المضاد Nalidixic acid في تحييد بلازميدات المقاومة R plasmid وليس له تأثير على غيره (Hooper *et al.*, 1984).

إن عملية تحييد البلازميدات عن مختلف وظائفها باستخدام انواع متباينة من المحيدات لها دوركبير في تشخيص العلائم الوراثية في البلازميدات بالاضافة الى وصف ودراسة مورثات التضاعف في البلازميدات (Hooper *et al.*, 1984) كما يحاول الباحثين الاستفادة من تجارب التحييد في البحوث الدوائية اذ لاحظ Hahn (1976) ان بكتريا *S. typhimurium* المقاومة لمضاد الأمبسلين إلى حد 2500 µg/ml تمكن من القضاء عليها بعد مرور 6 ساعات من التحضين باستعمال مضاد الأمبسلين بتركيز 60 µg/ml مترافقاً مع المحيد بروميد الأيثيديوم.

المواد وطرائق العمل

جمع العزلات الجرثومية وتشخيصها

أخذت 14 سلالة من جرثومة *Streptomyces* المعزولة من التربة المشخصة سابقاً من قبل السماك (2006) إذ جرى تأكيد تشخيصها ثانيةً باعادة زرعها على مزرعة الشريحة وملاحظة شكل الغزل الهوائي والأرضي لها.

مقاومة المضادات الحيوية

لغرض تحديد سلالات جرثومة *Streptomyces* التي لها القابلية على مقاومة المضادات الحيوية قيد الدراسة فقد لقحت أوساط المضادات الحيوية بالسلالات قيد الدراسة وبالتراكيز µg/ml من المضادات التالية:حامض النالدكسيك/NA(30) والأمبسلين/Ap (50) والكلورامفينيكول/Cm(20) والسيفالكسين/Cf(30) والريفامايسين/Rif(10) والجينتامايسين /GM(20)، حضرت هذه الأوساط بعد تهيئة المحاليل الخزنية لكل مضاد وحسب طريقة Timmis و Puhlar (1984) . زرعت السلالات بطريقة التخطيط على اوساط المضادات وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37م.

تحييد المحتوى البلازميدي لجرثومة *Streptomyces*

استخدمت أربعة أنواع من المحيدات في تحييد سلالات جرثومة *Streptomyces* مقارنة بالتحييد التلقائي الذي درس ليكون نموذج سيطرة Control لمقارنته مع بقية المحيدات الأربعة.

التحييد التلقائي وتحضير الطبق الرئيسي

استخدمت طريقة Meyer (1974) في تحييد سلالات جرثومة *Streptomyces* اذ لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بسبورات الجرثومة حضن بدرجة 37م لمدة 24 ساعة، نقلت 0.1 مل من هذه المزرعة الى أنبوبة تحوي 5 مل من المرق المغذي حضن ايضاً لمدة 24 ساعة بدرجة 37م ثم حضرت تخافيف من المزرعة النهائية ونشرت على وسط الأكار المغذي حضنت بدرجة 37م لمدة 24 ساعة ثم نقلت 100 مستعمرة الى وسط الأكار المغذي لتحضير الطبق الرئيسي Master plate نقلت هذه المستعمرات من الطبق الرئيسي الى أطباق المضادات الحيوية قيد الدراسة لتحديد نسبة التحييد في كل مضاد.

تحييد الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام الأس الهيدروجيني الحامضي

استخدم طريقة Sinha (1989) في تحييد سلالات جرثومة *Streptomyces* حيث أستخدم الأس الهيدروجيني pH6 و pH5 كعامل محيد علما أن الـ pH الطبيعية لنمو هذه الجرثومة هي7 pH.إذ لقح 5 مل من المرق المغذي بمستعمرة مفردة من الجرثومة وحضن بدرجة 37م لمدة 24 ساعة ثم أخذ 0.1مل من المزرعة الجرثومية ولقح في 5 مل من المرق المغذي عند 5 pH وثم 6 pH نميت عند نفس ظروف التحضين السابقة ثم حضر تخافيف عشرية وفرش 0.1 مل من التخفيف المناسب على وسط الاكار المغذي الذي منه حضر الطبق الرئيسي Master plate والذي بدوره نقل الى اوساط المضادات الحيوية قيد الدراسة.

تحييد الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام الحرارة

استخدم طريقة Baldwin وآخرون (1969) في تحييد سلالات جرثومة *Streptomyces* إذا استخدمت درجة حرارة 42م كعامل محيد, علما ان الدرجة الحرارية المثلى لنمو هذه الجرثومة تتراوح بين 28 – 37م.

تحييد الـ **DNA** البلازميدي لجرثومة ***Streptomyces*** باستخدام الاكردين البرتقالي

استخدم طريقة Lovell و Barrow (1988) في تحييد سلالات جرثومة Streptomyces باستخدام الاكردين البرتقالي حيث أستخدم تركيزين من هذا المحيد هما 50 µg/ml و 100 µg/ml.

تحييد الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام مادة الـ SDS

استخدم طريقة Tomoeda وآخرون (1974) في تحييد سلالات جرثومة *Streptomyces* باستخدام مادة Sodium dodecyl Sulfate (SDS) إذ استخدمت هذه المادة بتركيزين 50 µg/ml و 100 µg/ml.

النتائج والمناقشة

مقاومة المضادات الحيوية

بعد اختبار 14 سلالة من جرثومة *Streptomyces* تجاه المضادات الحيوية قيد الدراسة أنتخب اربعة سلالات التي تقاوم اكبر عدد من المضادات الحيوية وكما موضح في الجدول (1).

الجدول 1: مقاومة جرثومة *Streptomyces* تجاه المضادات الحيوية قيد الدراسة

رقم العزلة	أوساط الأكار المغذي الحاوي على التراكيز النهائية للمضادات الحيوية قيد الدراسة بالـ(µg/ml)					
	Nal (30)	Ap (50)	Cm (20)	Cf (30)	Rif (10)	Gm (20)
1	R	R	R	R	S	R
2	R	R	S	R	R	R
3	R	S	R	R	S	S
4	R	R	R	R	R	S

تشير R الى صفة المقاومة للمضاد الحيوي

تشير S الى صفة الحساسية للمضاد الحيوي

يلاحظ من الجدول (1) أن جميع المضادات الحيوية قيد الدراسة جرى مقاومتها من قبل سلالات جرثومة *Streptomyces* ، وهذا قد يعود إلى كون هذه الجرثومة هي أصلاً منتجة للمضادات وبنفس الوقت تحمي نفسها من تأثير المضادات التي تنتجها بآليات مقاومة المضادات المختلفة، إذ أوضح الباحثان Freeman و Hopwood(1978) قدرة بكتريا *Streptomyces rimosus* على إنتاج مضاد الـ Oxyteracycline وتقاومه هذه الجرثومة في الوقت نفسه واستناداً لذلك فقد ذكر العديد من العلماء بأن مورثات مقاومة المضادات الحيوية في مختلف أنواع البكتريا المرضية أصلها مورثات من جرثومة *Streptomyces* التي تنتج ذلك المضاد ومما قد يؤيد هذا الاستنتاج هو تماثل الأنزيمات التي تحطم المضادات الحيوية في البكتريا الحقيقية وفي جرثومة *Streptomyces*.

لقد رافق إنتاج المضادات الحيوية ظهور سلالات تقاوم هذه المضادات وباليات مختلفة منهـا آليـات ضـخ المضاد إلى خارج الخلية البكترية قبل وصوله إلى منطقة الهدف، وإنتاج بروتينـات حمايـة الرايبوسـومات Ribosomal Protection Protein (RPP) والذي يعمل على إحاطة الرايبوسومات وتغير شـكلها بحيـث لا تتعرف عليها المضادات، وانتاج أنزيمات تعمل على معادلة المضادات الحيوية إما بإضافة مجموعـة acetyl ($COCH_3$) او مجموعة فوسفات (PO_3^{-2}) الى المواقع الفعالة للمضاد (Wright, 1999) وتبـين أن أنظمـة المقاومة سابقة الذكر موجودة جميعاً في جرثومة *Streptomyces* والتي تستخدمها لمقاومة المضادات الحيوية التي تنتجها(Chopra and Roberts, 2001).

تحييد الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* تلقائياً

يوضح الجدول (2) النتائج التي حصلنا عليها من التحييد التلقائي لسلالات جرثومـة *Streptomyces* والـذي يعتبر كنموذج سيطرة لمقارنته مع بقية المحيدات المستخدمة.

الجدول2 : نتائج التحييد التلقائي لسلالات جرثومة *Streptomyces*

رقم العزلة	النسبة المئوية لتحييد الـ DNA البلازميدي بواسطة المضادات الحيوية المستخدمة بالـ (µg/ml)					
	Nal (30)	Ap (50)	Cm (20)	Cf (30)	Rif (10)	Gm (10)
1	2	0	4	2	S	0
2	0	2	S	2	4	4
3	2	S	2	0	S	S
4	0	2	0	2	4	S

0 :جميع المستعمرات قاومت ذلك المضاد اي ان نسبة التحييد 0%

S :العزلة حساسة اصلا لذلك المضاد

يلاحظ من الجدول (2) أن نسب التحييد التلقائي في العزلات الأربعة قيد الدراسة قـد تراوحت بيـن (0 – 4%) إذ هذه النسب هي نسب متوقعة في جرثومة *Streptomyces* التي تمتاز بعـدم ثباتهـا الـوراثي وتأثرها بالظروف البيئية المحيطة اذ لاحظت السماك (2006) تغير الوان سبورات هذه الجرثومة مـع تغيـر الوسط الغذائي المستخدم واختلاف درجات حرارة التحضين. كما لاحظ الباحثان Darmalingam و Cullum (1996) أن العديد من أنواع الـ *Streptomyces* هي غير ثابتة وراثياً للعديد من الصفات أي يمكن أن يحدث

بها طفرات تلقائية بنسب تتجاوز 0.1% مثـل صـفة إنتـاج مـضاد الستربتومايـسين ومقاومـة مـضاد الكلورامفينيكول والتتراسايكلين والستربتومايسين وإنتاج الصبغات وغيرها وتزداد هذه النسب عند تعـريض البكتريا لمؤثرات خارجية مثل الأشعة فوق البنفسجية والعوامل المندسة فـي الـ (intercalating agents DNA DNA) أو حتى حفظ السبورات بدرجة 20-°م تؤدي إلى عدم الانتظام الوراثي. وذكر الباحثان نفسهم ان هذه العلائم غير الثابتة هي بلازميدية الموقع وأن التحييد التلقائي للبلازميد هو السبب في عـدم الانتظـام الوراثي.

تحييد الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام الأس الهيدروجيني ألحامضي

استخدم الأس الهيدروجيني pH في تحييد محتوى الـ DNA البلازميـدي فـي جرثومـة *Streptomyces* باعتباره أحد العوامل البيئية التي تؤثر على ايض الخلية البكتيرية ونموها,إذ يوضح الجدول (3) النتائج التـي حصلنا عليها بعد استخدام الأس الهيدروجيني كعامل محيد.

الجدول3:النسب المئوية لتحييد سلالات جرثومة *Streptomyces* باستخدام الأس الهيدروجيني الحامضي.

رقـــم العزلة	**النسبة المئوية لتحييد محتوى الـ DNA البلازميدي تجاه المضادات الحيوية المستخدمة بالـ µg/ml**											
	Nal (30)		Ap (50)		Cm (20)		Cf (30)		Rif (10)		Gm (10)	
	pH 5	pH 6	pH 5	pH 6	pH 5	pH 6	pH 5	pH 6	pH 5	pH 6	pH 5	pH 6
1	100	100	82	64	34	22	100	90	S	S	46	40
2	72	70	63	68	S	S	58	68	90	76	52	34
3	48	42	S	S	52	40	73	62	S	S	S	S
4	63	58	62	55	40	32	66	63	40	31	S	S

100 : جميع المستعمرات فقدت المقاومة للمضاد الحيوي أي ان نسبة التحييد 100%

S : العزلة حساسة أصلا لذلك المضاد

لاحظ Kontro وآخرون (2005) بعد تنمية 10 سلالات من جرثومـة *Streptomyces* فـي أوسـاط متدرجة من الـ pH تراوحت بين (11.5- 4 pH) أن أفضل نمو لجرثومة *Streptomyces* كـان عنـد الأس الهيدروجيني 7 وما فوق ذلك بقليل في هذه الدراسة. كما لاحظت سليمان (2008) ان افضل انتاج للمضادات الحيوية في هذه الجرثومة كان عند pH7.5 بينما انعدمت الانتاجية عند 5 pH و 5.5 pH.

يلاحظ من الجدول (3) أن للأس الهيدروجيني دوراً فعالاً وواضحاً في تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* إذ تراوحت نسب التحييد بين (100% – 22) لجميع المضادات الحيوية المستخدمة وهذا يفوق ما حصل عليه الخياط (2008) في كل من جرثومة *E. coli* (82% – 2) وجرثومة *Klebsiella pneumonia* (53% – 4) وجرثومة *Proteus mirabilis* (24% – 12) وجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* (96% – 11) وهذا قد يرجع إلى حساسية بكتريا *Streptomyces* للتغير في الظروف البيئية اكثر من العزلات آنفة الذكر. يعتبر وجود البروتينات مهم جداً في الأغشية الخلوية لاعتبارها جزيئات ناقلة تسيطر على دخول وخروج المغذيات من والى الخلية فان أي عامل يؤثر عليها يسلط جهداً على الخلية الحية، في الظروف الحامضية تكون أيونات H^+ هي السائدة مما تحول احد نهايات سلسلة الحامض الاميني المكونة للبروتين من NH_2 - إلى NH_3- لذا يصبح المركب موجب الشحنة هذا التغير في الشحنات يؤثر على المواقع الفعالة للأنزيمات وبالتالي عمل البروتينات إذ يمكن القول بأنه مهما تغير من شحنة البروتين بعيداً عن وضعه المتعادل فهو له تأثير سلبي على فعاليته (Hewiston, 2009). قد يعود السبب في هذه النسب العالية من التحييد إلى انشغال الخلية البكتيرية بهذا الجهد المسلط عليها فتحاول البقاء حية واستهلاك الطاقة في العمليات الأيضية المهمة فقط في الخلية البكتيرية مما يتسبب في إيقاف تضاعف البلازميدات التي غالباً ما تحوي المورثات غير الضرورية لحياة وتكاثر الخلية البكتيرية هذا الإيقاف سوف ينتج عنه بعد عدة دورات من التضاعف خلايا بكتيرية فاقدة لمحتواها البلازميدي، أو قد يؤدي التغير في الأس الهيدروجيني إلى أكسدة الحوامض الدهنية في الأغشية الخلوية وتغير في نفاذيتها مما قد يؤدي الى ضخ البلازميدات غير الضرورية لحياة الخلية الى الخارج (الخفاجي، 2008) إذ لاحظ Rowbury (1997) ان التغير في الـ pH حاله حال بقية الاجهاد الفيزيائي قد يسبب تشغيل switch on لبعض المورثات في الخلية البكتيرية ومنها لمورث الـ Porin (Omp C gene) الذي يتحفز بانخفاض الأس الهيدروجيني، فقد تكون هذه البورينات هي الفتحات التي من خلالها تطرح البلازميدات الى خارج الخلية البكتيرية.

يلاحظ من الجدول (3) أن الأس الهيدروجيني الأكثر تأثيراً كان الأس الهيدروجيني 5 باعتباره يسلط جهداً اكبر على الخلية البكتيرية مقارنة بالأس الهيدروجيني 6 الأقرب منه الى الأس الهيدروجيني المتعادل، كما يلاحظ من الجدول نفسه أن العزلتين 1 و 2 كانت اكثر تأثراً من العزلتين 3 و 4 قد يعود الى امتلاك الأخيرتين أنظمة حيوية لمقاومة التغير في الأس الهيدروجيني، فقد لاحظ Hall وآخرون (1995) و Brown و Booth (1991) ان بعض الاحياء المجهرية تحاول التكيف للبيئات الحامضية من خلال معادلة الـ pH الخارجي فمثلاً تفرز جرثومة *E. coli* أنزيم Lysine decarboxylase المشفر من المورث cad A والذي يحول الـ Lysine إلى مركب قاعدي هو Cadaverine والذي عند طرحه الى خارج الخلية البكتيرية يعمل على معادلة الـ pH الخارجي.

تحييد الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام الحرارة

استخدم درجة حرارة 42°م في تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* ، إذ تعتبر أحد العوامل الفيزياوية المعروفة التي تسبب التحييد للبلازميدات لذا تم اختيارها لإجراء مقارنة بينها وبين التحييد باستخدام الأس الهيدروجيني الحامضي ويوضح الجدول (4) النتائج التي حصلت عليها.

الجدول 4: النسب المئوية لتحييد محتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام الحرارة

رقم العزلة	**النسبة المئوية لتحييد الـ DNA البلازميدي تجاه المضادات الحيوية المستخدمة بالـ** µg/ml					
	Nal (30)	Ap (50)	Cm (20)	Cf (30)	Rif (10)	Gm (10)
1	53	40	12	44	S	51
2	42	60	S	32	4	28
3	18	S	22	17	S	S
4	24	11	21	15	6	S

يلاحظ من الجدول (4) إن استخدام درجة الحرارة 42°م له تأثير جيد في إحداث تحييد لمحتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces*، إذ تراوحت نسب التحييد بين (60% – 4) لجميع المضادات الحيوية المستخدمة وهذا كان أقل مما لاحظناه في التحييد باستخدام الأس الهيدروجيني الحامضي.

إن حصولنا على نسب تحييد جيدة باستخدام الحرارة يدل على امتلاك جرثومة *Streptomyces* بلازميدات حساسة للحرارة تحمل المقاومة للمضادات الحيوية، إذ لاحظ Muth وآخرون (1989) إن تضاعف البلازميد PSG5 في جرثومة *Streptomyces ghanaensis* كان حساساً للحرارة إذ كان تضاعفه مستقراً عند درجة 37°م بينما يتوقف عن التضاعف عند ارتفاع درجة الحرارة عن هذه الدرجة مما يتسبب في فقدانه وذكر الباحث نفسه أن هذا النوع من البلازميدات مهم جداً عند امتلاكه مورثات الحشر داخل الكروموسوم لقابليته على إحداث الطفرات ولسهولة إزالته من الخلية البكتيرية عند الحاجة لذلك وذلك برفع درجة حرارة النمو.

تحييد الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام الاكردين البرتقالي

استخدم المحيد الاكردين البرتقالي بتركيزين (50 µg/ml و 100 µg/ml) لايجاد التركيز الاكثر تـأثيراً ومقارنته مع التحييد باستخدام الأس الهيدروجيني الحامضي، إذ يعتبر هذا المحيـد مـن المحيـدات شـائعة الاستعمال في ازالة بلازميدات الخصوبة والبلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية مـن مختلـف الأجنـاس البكتيرية وذلك من خلال تداخله ضمن سلسلة الـ DNA ثنائية الخيط واحداث طفرات خاصـة فـي مواقـع تضاعف البلازميدات مما يـسبب فقـدانها تـدريجياً مـن الخليـة البكتيريـة (Gabriella *et al.*, 2006 و Freifelder, 1983). يوضح الجدول (5) النتائج التي حصلت عليها.

الجدول 5: النسب المئوية لتحييد محتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام الاكردين البرتقالي بتركيز 50 µg/ml و 100 µg/ml

رقم العزلة	**النسبة المئوية لتحييد محتوى الـ DNA البلازميدي تجاه المضادات الحيوية المستخدمة بالـ µg/ml**											
	Nal (30)		Ap (50)		Cm (20)		Cf (30)		Rif (10)		Gm (10)	
	A 50	A100	A 50	A100	A 50	A100	A 50	A100	A 50	A100	A 50	A100
1	20	8	12	6	9	4	0	0	S	S	2	0
2	14	6	0	2	S	S	18	12	2	0	4	0
3	12	2	S	S	0	0	6	2	S	S	S	S
4	0	0	12	4	7	4	10	6	13	8	S	S

حيث تشير

A50 الى استخدام الاكردين البرتقالي بتركيز 50 µg/ml

A100 الى استخدام الاكردين البرتقالي بتركيز 100 µg/ml

يلاحظ من الجدول (5) إن للاكردين البرتقالي تأثيراً واطئاً مقارنة مـع اسـتخدام الأس الهيـدروجيني الحامضي اذ تراوحت نسب التحييد للمضادات الحيوية المستخدمة بين (0 – 12%) عند استخدام التركيز 100 µg/ml وهذه النسبة هي مقاربة لنسب التحييد التلقائي لذا يمكن القول بأنه لم يحدث تحييداً في هذا التركيز من الاكردين البرتقالي، بينما كانت نسب التحييد تتراوح بين (0 – 20%) عند استخدام المحيد الاكردين البرتقالي بتركيز 50 µg/ml، لذا يعتبر هذا التركيز أفضل من التركيز السابق في إحداث التحييـد وهـذا يتفـق مـع Grindley وآخرين (1970) إذ ذكر أن زيادة التركيز لا يكون له تأثير على فقـدان البلازميـدات المقاومـة للمضادات الحيوية. بينما لا تتفق نتائجنا مع ما توصل اليه الدليمي (2005) اذ حصل على نسب تحييد أعلـى عند استخدام الاكردين البرتقالي بتركيز 100 µg/ml من التركيزين (50 µg/ml و 25) في جرثومة *E. coli*

، قد يعود السبب في ذلك الى حساسة بكتريا *Streptomyces* للظروف البيئية والكيمياويات علماً أن الاكردين البرتقالي قد يسلك سلوك المطفر عند زيادة تركيزه مما يؤثر على الكروموسوم ويؤدي الى زيادة شدة القتـل ليخفي من نسب التحييد.

حصل Redshaw وآخرون (1979) على نسب تحييد مقاربة اذ تراوحت بين (2–20%) عند اسـتخدام الاكردينات في تحييد المحتوى البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* اذ رافق تحييد مقاومة المضادات الحيوية فقدان لانتاج المايسيلوم الهوائي وانتاج الحامض الاميني الارجنين وقد أعزى ذلك الى وقوع هـذه الـصفات على جزيئات بلازميدية. بينما تمكن Ikeda وآخرون (1982) من الحصول على عزلات فاقدة لانتاج المضاد الحيوي Spiramycin بعد معاملة جرثومة *Streptomyces ambofaciens* بصبغات الاكردينات.

يلاحظ من الجدول (5) أيضا أن هناك بعض السلالات لم ينجح بها التحييد لبعض المحيدات أو ظهـر نسب تحييد مقاربة للتحييد التلقائي قد يعود السبب في ذلك إلى امتلاك هذه السلالات آليـات لمقاومـة تـأثير الاكردين البرتقالي وذلك لشيوع استعماله، إذ تمكن Lee وآخرون (1996) من الحصول على طفرات تلقائيـة في جرثومة *Streptomyces lividans* Tk64 مقاومة لتراكيز 15 µg/ml و 5 من المحيد بروميد الاثيـديوم وبعد تحليل الـ DNA لوحظ ان مواقع هذه الطفرات كروموسومية وأن آلية المقاومة كانت عن طريق ضخ بروميد الاثيديوم إلى خارج الخلية البكتيرية وقد رافق هذه المقاومة مقاومة العديد من المواد المندسة في الـ DNA interealating agents DNA مثل الاكريفلافين والاكردين البرتقالي والبروفلافين.

تحييد الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام مادة الـ SDS

استخدم مادة الـ SDS بتركيزين 100 µg/ml و 50 لإيجاد التركيز الأكثر تـأثيراً ومقارنتـه مـع التحييـد باستخدام الأس الهيدروجيني ألحامضي وباعتباره مادة كيماوية أخرى تسبب التحييد في العديد مـن أجنـاس المجهرية حيث لاحظ حسن (2000) عند استخدام المحيد SDS بتركيز 50 µg/ml في تحييد محتـوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Klebsiella* أنه حصل على نسب تحييد تراوحت بين (45% – 20). ويوضـح الجدول (6) النتائج التي حصلنا عليها في الدراسة الحالية .

الجدول 6: النسب المئوية لتحييد محتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* باستخدام مادة الـ SDS بتركيز 50 و 100 µg/ml

رقم العزلة	**النسبة المئوية لتحييد محتوى الـ DNA البلازميدي تجاه المضادات الحيوية المستخدمة بالـ µg/ml**					
	Nal (30)	Ap (50)	Cm (20)	Cf (30)	Rif (10)	Gm (10)

SDS 100	SDS 50	SDS 100	SDS 50	SDS 100	SDS 50	SDS 100	SDS 50	SDS 100	SDS 50	SDS 100	SDS 50	
10	0	S	S	20	0	18	4	12	0	8	2	1
13	6	16	4	8	2	S	S	4	2	16	0	2
S	S	S	S	10	4	12	2	S	S	14	4	3
S	S	14	4	8	6	15	0	7	0	8	2	4

يلاحظ من الجدول (6) أن المحيد SDS عند استخدامه بتركيز µg/ml 50 كان تاثيره معـدوماً فـي تحييد بعض بلازميدات مقاومة المضادات الحيوية وقريباً الى نسب التحييد التلقائي في مضادات اخرى وهـذا يدل على عدم قدرة هذا المحيد من إحداث تحييد في محتوى الـ DNA البلازميدي لجرثومة *Streptomyces* بينما ارتفعت نسبة التحييد في جميع العزلات قيد الدراسة عند استخدام المحيد نفسه بتركيـز µg/ml 100 إذ تراوحت نسب التحييد بين (20% – 4) وهذه النسبة هي أقل مما حصل عليه Ogazawa و Nozaki (1977) إذ حصل لديهم فقدان لمقاومة مضادات الـ β-lactam عند استخدام المحيدات بروميد الاثيديوم والاكريفلافين والـ SDS كان أفضل نسب التحييد في الـ SDS بنسبة 63.8% وهذا ما دفعهم للاستنتاج بأن هذه المورثات كانت مواقعها على البلازميدات.

تسبب الـ SDS تحطم الأغشية الخلوية مما تسبب التحييد عند إحداث التحطم في أماكن ارتباط البلازميـدات بالغشاء البلازمي وبما أن ليس جميع البلازميدات مرتبطة بالأغشية فقد يدل فقدان المقاومة للمـضادات إلـى التعرف على أن تلك البلازميدات مرتبطة بالغشاء ولهذا يمكن الاستفادة من التحييد بالـ SDS باعتباره عامل مهم عند دراسة علاقة البلازميدات مع الأغشية الخلوية (Sonstein and Baldwin, 1972) ولهذا قد يعـزى السبب وراء نسب التحييد التي ظهرت لدينا باستخدام هذا المحيد إلى قلة البلازميدات المرتبطة بالغـشاء فـي هذه الجرثومة مقارنة بغيرها.

يمكن الاستنتاج من نتائج التحييد سابقة الذكر بأن أفضل المحيدات التي يمكن استخدامها في تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي في جرثومة *Streptomyces* هو استخدام الأس الهيدروجيني ألحامضي عند pH5 حيـث أعطتنا أعلى النتائج بالإضافة إلى سهولتها وعدم الحاجة لاستخدام المواد الكيماوية التي أغلبها يكون مطفـراً للـ DNA الكروموسومي وفيه مخاطر أيضا على الباحث نفسه.

المصادر العربية

حسن، اياد حازم, (2000). دراسة وراثية جزيئية لجرثومة *Klebsiella pneumonia* المعزولة من حـالات مرضية مختلفة في الأنسان. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

الخفاجي، زهرة محمود ناصر(2008). التقنيات الحيوية المايكروبية (توجهات جزيئية). وزارة التعليم العـالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، العراق.

الخياط، محمد زغلول سعيد, (2008). تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي فـي الجـراثيم المعزولـة مـن المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية في مدينة الموصل. رسالة ماجـستير، كليـة التربيـة، جامعة الموصل.

الدليمي، الآء سعيد شيت, (2005). تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي في جرثومة *E. coli* المعزولة مـن حالات إسهال الأطفال باستخدام الاكردينات والريفامبين وتأثير السكريات على نمو الجرثومة. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

سليمان , سهى سليمان ايليا, (2008). عزل وتشخيص النوع *Streptomyces lavendulae* من التربة ودراسة الظروف المثلى لإنتاج المضادات الحيوية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

السماك، إسراء غانم, (2006). دراسة تصنيفية لمجموعة البكتريا الخيطية، إطروحة دكتوراه، كلية العلـوم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Baldwin, J.N.; Strickland, R.H. ; Cox, M.F. (1969). Some properties of the Beta-lactamase genes in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Appl. Microbiol.,* **18,** 628-630.

Brown, M.H. ; Booth, I.R.(1991). "Acidulants and Low pH. In: Rusell, N.J.; Gould, G.W. editors, Food preservatives", Glascow, U.K., pp.103-104.

Chopra, I. ; Roberts , M.(2001). Tetracycline antibiotics : mode of action , applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. and Mol. Bio. Rev.* ,**65** (2), 232-260.

Crameri, R; Davies, J.E. ; Hutter, R.(1986). Curing and generation of mutation induced with ethidium bromide in Streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.,* **132**,819-824.

Darmalingam, K.; Cullum, J. (1996). Genetic instability in *Streptomyces. J. Biosci.,* **12**(3)566-570.

Freeman, R. F.; Hopwood, D. A. (1978). Unstable naturally occurring resistance to antibiotics in *Streptomyces* . *J. Gen. Microbiol.* , **106,** 377-381.

Freifelder, D. (1983). "Molecular Biology, A Comprehensive Introduction to Prokaryotes and Eukaryotes". Science books international, Inc. New York, pp. 251-254.

Gabriella, S.; Annamaria, Mi.; Zsuzsanna, S.; Leonard, A.; Derek, S. ; Joseph, M. (2006). The mechanism of plasmid curing in bacteria. *Current drug targets*, **7**, 823-841.

Grindley, J.N. ; Grindley, N.D.F. ; Anderson, E.S. (1970). Acridine treatment of F+ and Hfr strains of *Escherichia coli* K-12 carrying a neomycin – kanamycin resistance determinant. *Genet. Res.,* **15** , 327-334.

Hahn, F.E. (1976). Elimination of plasmids from bacteria. *Antibiotics and Chemotherapy*, **20**, 196- 201.

Hall, H.K.; Karem, K.L.; Foster, J.W. (1995). Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Adv. Microbial. Phys.,* **37,** 229-264.

Hewiston, J. (2009). Effect of pH of the solution on cell membrane. *Letters in Appl. Microbiol.*, **53**(2),122-128.

Hooper, D.C.; Wolfson, J.S.; Mc Hugh, G.L.; Swartz, M.D.; Tung, C.; Awartz, M.N.(1984). Elimination of plasmid pMG11D from *Escherichia coli* by novobiocin and other inhibitors of DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **25**(5), 586-590.

Ikeda, H.; Tanaka, H. ; Omura, S. (1982). Genetic and biochemical features of spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *J. antib.,* **35**(4),63-71.

Kontro, M.; Lingell, V.; Hirvonen, M.R. ; Nevalainen, A. (2005). pH effect on 10 *Streptomyces spp*. growth and sporulation depend on nutrients. *Letters in Appl. Microbiol.*, **41**(1), 32-38.

Lee, L.; Huang, Y. ; Chen, C.W. (1996). Two classes of ethidium bromide resistant mutants of *Streptomyces lividans* 66. *Microbiology,* **142**,1041-1047.

Lovell, M.A. ; Barrow, P.A. (1988). The association between a large molecule mass plasmid and virulance in a strain of *Salmonella pullorum*. *J. Gene. Microbial.,* **134,** 2307-2316.

Meyer, R.(1974). Alternate forms of the resistant factor R1 in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol*., **118,** 1010-1019.

Muth, G.; Nubbaumer, B.; Wohllenben, W. ; Puhler, A. (1989). A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in *Streptomyces. Mol. Gen. Genetic.,* **219,** 341-398.

Ogazawa, H. ; Nozaki, S.(1977). Effect of acriflavine on the production of β - lactamase in *Streptomyces*. *J. antib.,* **30**(4), 337-338.

Redshaw, P.A.; McCann, P.A. Pentella, M.A. ; Pogell, B.M.(1979). Simultaneous loss of multiple differentiated functions in aerial mycelium. Negative isolates of Streptomycetes. *J. Bacteriol.,* **137**(2), 112-118.

Rowburry, R.J.(1997). Regulatory components, including integration host factor, CysB and H-NS, that influence pH responses in *Escherichia coli*- a review. *Letters in Appl. Microbiol.*, **4**,319-328.

Sinha, R.P. (1989). A new simple method of curing plasmid in lactic streptococci (*Streptococcus lactis, Strepcoccus cremoris*). *FEMS Microbial. Letters*. **57**(3), 349-352.

Sonstein, S.A. ; Baldwin, J.N. (1972). Loss of the pencillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Bacteriol.,* **109**(1), 262-265.

Timmis, N.K. ; Puhlar, A.(1984)." Advances in Molecular Genetics", Springer-verlary, New York, pp. 187-188.

Tomoeda, M.; Inuzuka, M.; A nto, S. ; Konishi, M.(1974). Curing action of Sodium Dodecyl Sulfate on a *Proteus mirabilis* $R^{\dagger}$ strain. *J. Bacteriol.,* **120**, 1158-1163.

Wright, G.D.(1999). Aminoglycoside – modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiol.* **2,** 499-503.