--مجلة علوم الرافدين، المجلد 27، العدد 4 /عدد خاص بالمؤتمر العلمي الثالث لعلوم الحياة، ص 42-52، 2018---

التحري عن مواقع جينات انتاج صبغة البيتا-كاروتين في الخميرة *Rhodotorula mucilaginosa* BA61

***بادية عبدالرزاق ملاعبيدة** **رعد حساني سلطان** **رافعة قادر جرجيس**

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الموصل

*** E-mail:** Badia_Jamal@yahoo.com

(أُستلم 9/ 5 /2018 ؛ قُبل 1/ 11 /2018)

الملخص

تم اتباع طريقتين في تعيين مواقع المورثات المشفرة لصبغة البيتا-كاروتين الاولى بتحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي، إذ اجريت عملية تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي باستخدام بروميد الاثيديوم بتركيز 150 مايكروغرام/مل لكل من الخميرة *Rhodotorula mucilaginosa* BA61 والخميرة *Sacharomyces cervisiae* BA179 وبكتريا *Escherichia coli* BA252. وبينت النتائج نجاح تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي للخميرة *R. mucilaginosa* BA61. أن المستعمرات المحيدة تحمل صفة انتاج صبغة البيتا-كاروتين وان الجينات المسؤولة عن هذه الصفة تقع على الكروموسوم لعدم حدوث تحييد، كما اظهرت المستعمرات المحيدة حساسية تجاه المضادات الحيوية المدروسة وبنسب مئوية 16-80% عدا Ampicillin، Erythromycin، Lamisil و Vancomycin. كذلك اظهرت نتائج تحييد الخميرة *S. cervisiae* BA179 فقدان المقاومة للمضادات الحيوية وبمدى 15-92%. كما اظهرت نتائج تحييد العزلة *E . coli* BA252 فقدان مقاومتها للمضادات وبنسبة 15- 23% ماعدا Trimethoprim، Erythromycin و Lamisil وهذا ما اكده الترحيل الكهربائي الهلامي.

اما الطريقة الثانية لتعيين مواقع المورثات فكانت من خلال اجراء عملية الاقتران، إذ اجريت محاولتان للاقتران، الاولى من اجل تعيين قابلية محتوى الحمض النووي البلازميدي على الحركة والانتقال في عزلات الخمائر، إذ نجحت عملية الاقتران ما بين عزلة الخميرة الواهبة *R. mucilaginosa* BA61 وخميرة *S. cervisiae* BA179 المحيدة كمستقبل وبتردد اقتران 0.65×10^{-8} وأثبتت الدراسة أن الحمض النووي البلازميدي المنتقل من الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 يحمل جينات المقاومة للمضاد الحيوي Gentamicin ولكنه لا يحمل الجينات المسؤولة عن انتاج صبغة البيتا- كاروتين، فضلا عن ذلك اجريت محاولة للاقتران عبر الممالك بين الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 كواهب وبكتريا *E. coli* 252 كمستقبل واظهرت النتائج بأن الحمض النووي البلازميدي الحامل لجينات المقاومة لـ Rifampin له القابلية على الحركة والانتقال من الخميرة الى البكتريا وبتردد اقتران 3.05×10^{-8}. كذلك اظهرت النتائج بأن البكتريا المحيدة تمتلك القابلية على استقبال وتوطين البلازميد من الخميرة عبر عملية الاقتران، غير أن المستعمرات الناتجة من الاقتران كانت لا تحمل صفة انتاج صبغة البيتا- كاروتين وهذا يؤكد بأن المورثات المشفرة لصفة انتاج الصبغة تقع على الحمض النووي الكروموسومي.

الكلمات الدالة: جينات البيتا-كاروتين، بلازميد، الاقتران، *Rhodotorula mucilaginosa* BA61.

Detection of Positions of Genes of β-Carotene Production by *R. mucilaginosa* BA61

Badia A. Malla-Obaida **Raad H. Sultan** **Rafea Q. Jirjees**

Deptartment of Biology / College of Science / University of Mosul

Deptartment of Biology/ College of Education for Pure Scie University of Mosul

ABSTRACT

Two procedures was followed to determine the position of β-carotene pigment coding genes. The first procedure is curing of plasmid nucleic acid content using ethidium bromide with 150 µg/ml concentration for each the yeasts *Rhodotorula. mucilaginosa* BA61, *Sacharomyces cervisiae* BA179 and *Escherichia coli* BA252. The results revealed that success of curing of plasmid DNA for the yeast *R. mucilaginosa* BA61. The cured colonies was bearing β-carotene pigment production characteristic and the genes responsible for this characteristic laid on the chromosome, as long as, the curing did not occur. The curred colonies showed sensitivity against the studied antibiotics with percentage ranged from 16-80% with exception with Ampicillin, Erythromycin, Lamisil and Vancomycin. Also results of curing of the yeast *S. cervisiae* strain BA179 losing of antibiotic resistance with the range 15-92%. Results of curring of *E. coli* BA252 strain showed losing of antibiotic resistance with percentage 15-23%, with exception with the Trimethoprim, Erythromycin and Lamisil.

The second procedure for determine the position of coding genes was done by conjugation, which two conjugation attempts was done. The first one for determine the ability of plasmid nucleic acid for mobilization and transferation in yeast strains. There was success conjugation between donor yeast strain *R. mucilaginosa* BA61 and the curred yeast *S. cervisiae* BA179 as recipient with conjugation frequency 0.65×10^{-8}, this study proved that the transferred plasmid nucleic acid from *R. mucilaginosa* BA61 bearing Gentamicin antibiotic genes, but not genes responsible for β-carotene pigment production, as well as, two attempts of conjugation was done through kingdoms between *R.mucilaginosa* BA61 as a donor and *E. coli* BA252 as recipient. Results revealed that plasmid nucleic acid bearing Rifampin resistance genes has the ability ofmobilization and transferation from the yeast to the bacteria with conjugation frequency 3.05×10^{-8}. Results also showed that the curred bacteria has the ability of receiving and stability of plasmid from the yeast by conjugation, whereas the resulting was not bear production of the β-carotene pigment characteristic and this confirm that the genes coding for pigment production characteristic bearing laid on chromosomal nucleic acid.

Keywords: β-carotene genes, plasmis, conjugation, *Rhodotorula mucilaginosa* BA61.

المقدمة

تنتج الخمائر الملونة صبغات الكاروتينويدات الملونة المضادة للأكسدة (Paul *et al*., 2014). والكاروتينات ذات اهمية كبيرة ولها تطبيقات واسعة في العديد من المجالات لما تمتاز به من وظائف وخصائص جعلتها مثيرة للاهتمام (Naziri *et al*., 2014)، إذ إنها تلعب دوراً في حماية الخلايا من الآثار الضارة للجذور الحرة (Kanzy *et al*., 2015) والحد من خطر الاصابة ببعض أنواع الامراض السرطانية، وامراض القلب والاوعية الدموية، والوقاية من مرض الزهايمر Alzhemeir's disease بسبب خصائصها كمضادة للأكسدة (Wang *et al*., 2008) فضلا عن ذلك تدخل الكاروتينات في الصناعات الغذائية إذ

تستخدم كملونات غذائية تسهم في جذب المستهلك للسلع والبضائع (Sharma, 2014) وتضاف كمكملات غذائية لأعلاف الحيوانات ومؤخرا دخلت في الصناعات الصيدلانية (Wang *et al*., 2014).

تتميز بعض أنواع الخمائر بامتلاكها عناصر وراثية خارج كروموسومية تسمى بالبلازميدات Plasmids (عبيدة ومحمود، 2012) وهي عبارة عن قطع حلقية مزدوجة من الـ DNA بإمكانها التضاعف بشكل مستقل عن كروموسوم الخلية المضيفة، وتعدّ غير ضرورية لحياة المضيف، إلا انها تمنح مضيفاتها سمات إضافية (Miljkovic- Selimovic *et al*., 2007) إذ وجد أنها تحمل جينات المقاومة للمضادات الحيوية (Ramesh *et al*., 2010) وجينات المقاومة للمعادن الثقيلة (Szczepanowski *et al*., 2005) ومن الممكن عزل البلازميدات بشكل جزئية حمض نووي حلقية الشكل (Franklin and Snow, 2005).

وتمتاز البلازميدات بقدرتها على الانتقال من خلية إلى أخرى بين الأنواع الجرثومية التي تكون من النوع نفسه أو بين الأنواع المختلفة (Yah *et al*., 2007) وفي الوقت نفسه بين الاجناس المختلفة، وتسمى هذه الآلية بالاقتران Conjucation (Salih and Qassar,1992). وتتضمن عملية الاقتران التماساً بين خليتين احداهما تدعى بالخلية المانحة Donor Cell والاخرى تدعى بالخلية المستلمة Recipient Cell (Simon and Jeremy, 2004) وفي هذه العملية تنتقل نسخة واحدة من البلازميد إلى الخلية المستقبلة (Wilkins and Rees,1989). إن انتقال المادة الوراثية الخارج كروموسومية بآلية الاقتران يمكن أن يساعد في انتقال العديد من الصفات من جنس إلى آخر ومنها صفات المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة (Chinedum *et al*., 2005). وقد اثبتت الدراسات أن صفة المقاومة تكون محمولة على بلازميدات المقاومة R-plasmids وبالإمكان نقلها كوحدة واحدة إلى خلايا أخرى عن طريق الاقتران (Hardy, 1989) ويهدف البحث الى الكشف عن موقع الجينات المنتجة لصبغة البيتا–كاروتين على الحمض النووي الكروموسومي أو الحمض النووي البلازميدي.

المواد وطرائق العمل

مصدر العزلات

استخدمت العزلات: *Rhodotorula mucilaginosa* BA61 و *Saccharomyces cerevisiae* BA179 فضلا عن بكتريا *Escherichia coli* BA252 المشخصة مسبقا باحتوائها على حمض نووي بلازميدي في دراسة سابقة اجريت في مختبرات قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الموصل (ملاعبيدة، 2017).

اختبار المقاومة للمضادات الحيوية

اجري اختبار المقاومة للمضادات الحيوية طبقا لـ Ernst و Chan (1985)، اما المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة فكانت كالآتي:Amoxicillin (Ax)، Ampicillin (Ap)، Candizol (Cd)، Chloramphenicol (Cm)، Clindamycin (Clin)، Erythromycin (Er)، Fluconazole (Fc)، Getamicin (Gm)، Ketoconazok (Kc)، Lamisil(Ls)، Newmycin (Nm)، Nystatin (Nys)، Penicillin (Pen)، Rifampin (Rif)، Streptomycin (Str)، Tetracycline (Tc)، Trimethoprim (Tm)، Vancomycin (Van) بالتركيز 100 مايكرو غرام/مل، اما Cephalexin monohydrate (Cf) و Clotrimazol (Ct) فقد استخدما بتركيزٍ قيمته 30 مايكرو غرام/مل.

اختبار المقاومة للمعادن الثقيلة

اجري هذا الاختبار بحسب ما جاء به Dar (2004)، اما المعادن الثقيلة المستخدمة في هذا الاختبار فكانت كالآتي: كبريتات الزنك، كبريتات النحاس، كبريتات البوتاسيوم، كلوريد الرصاص، كلوريد الزئبق، كلوريد الكادميوم، كلوريد النيكل و كلوريد الكوبلت وبالتركيز 100 مايكرو غرام/ مل.

تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي في خميرة الـ *S. cerevisiae* BA179 و *R. mucilaginosa* BA61

اتبعت طريقة Toh-e و Wickner (1980) في تحييد بلازميد عزلة خميرة *S. cerevisiae* BA179 و *R. mucilaginosa* BA61 استعمال بروميد الاثيديوم كمادة محييدة.

تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي في بكتريا الـ *E. coli* BA252

حيدت بكتريا الـ *E. coli* BA252 وفق طريقة Tomoeda *et al*., (1968).

الاقتران بين عزلات الخمائر

استخدمت عزلة الخميرة *S. cerevisiae* BA179 كعزلة مستلمة لدراسة صفة الانتقال الذاتي للبلازميدات من عزلة الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 بعملية الاقتران بين سلالتين من جنسين مختلفين، إذ كانت العزلتان مختلفتين في عمليتين وراثيتين (المقاومة والحساسية) للمضادات الحيوية.

الاقتران بين العزلة *R. mucilaginosa* BA61 والعزلة الـ *E. coli* BA252

اجري الاقتران على وفق طريقة Heinemann و Sprague (1989-1991).

النتائج والمناقشة

مقاومة العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية

يتبين من ملاحظة (الجدول 1) أن عزلتي الخميرة المختبرة اظهرت مقاومةً للمضادات الحيوية (Ax، Ap، Cd، Cf، Clin Fcz، Nm، Rif، Str و Tm)، في حين أنها أبدت حساسية تجاه المضاد الحيوي Ct و Kc وكانت النتائج متفاوتة مع بقية المضادات ووجِد في دراسة اخرى أجرها صوفي (2013) أن عزلات من خميرة *Saccharomyces* اظهرت تبايناً في مقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة. إذ ابدت معظم العزلات مقاومة لـ Erythromycin، Chloramphenicol، Rifampin، Getamicin، Streptomycin، Tetracycline، Penicillin، Ampicillin و Amoxicillin، بينما كانت حساسة فقط لـ Nystatin. وعلى وفق دراسة الطائي (2013) اظهرت نتائج اختبار حساسية عزلات خميرة *C. albican* المعزولة من المرضى المصابين بداء المبيضات الفموي أن جميع العزلات المدروسة (36) كانت مقاومة لكل من المضادات الحيوية Fluconazole، Itraconazole، Ketoconazole و Terbinafine باستثناء عزلة واحدة اظهرت حساسية Fluconazole وكذلك Itraconazole. بالنسبة للمضاد الحيوي Nystatin فقد اظهرت جميع العزلات حساسية لهذا المضاد باستثناء عزلة واحدة. اما بالنسبة لعزلة بكتريا *E. coli* BA252 فقد كانت حساسة فقط للمضادات الحيوية Cm، Gm، Nm و Rif ومقاومة لبقية المضادات الحيوية المستخدمة.

وتعود مقاومة المضادات الحيوية الى وجود موّرثات مسؤولة عن هذه المقاومة وتكون هذه المورثات محمولة على كروموسوم الخلية أو على البلازميد وتعمل على التعبير عن الأنزيمات المسؤولة عن تحطيم المضادات الحيوية وتحويلها الى شكل غير فعال (Remers and Delgado,1998) ولاحظ Kawane (2012) عند اختبار عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة من مياه الشرب لـ 13 مضاداً حيوياً أنها كانت اكثر مقاومة لـ Penicillin، Clindamycin، Cephoxithin، Metronidazole.

الجدول 1: اختبار مقاومة وحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية

العزلات	المضادات الحيوية وتراكيزها بالمايكروغرام/مل																			
	Ax	Ap	Cd	Cf	Cm	Clin	Ct	Er	Fcz	Gm	Kc	Ls	Nm	Nys	Pen	Rif	Str	Tc	Tm	Van
R.mucilaginosa BA61	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
S. cervisiae BA179	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S
E. coli BA252	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R

R: Resistance تشير الى صفة المقاومة. S : Sesitive تشير الى صفة الحساسية.

مقاومة العزلات قيد الدراسة للمعادن الثقيلة

أظهرت عزلتي الخميرة مقاومة للمعدن الثقيل $CuSO_4$ و $CdCl_2$ ومتفاوتة بالنسبة لبقية المعادن الثقيلة وكما في (الجدول 2).

الجدول 2: مقاومة عزلات الخمائر قيد الدراسة للمعادن الثقيلة

العزلات	المعادن الثقيلة بالتراكيز النهائية (مايكروغرام/مل)							
	$ZnSO_4$	$CuSO_4$	$K_2Cr_2O_7$	$PbCl_2$	$HgCl_2$	$CdCl_2$	$NiCl_2$	$CoCl_2$
R. mucilaginosa BA61	S	R	R	S	R	R	R	R
S. cervisiae BA179	R	R	S	R	S	R	S	S
E. coli BA252	S	S	R	R	S	R	S	S

R: Resistance تشير الى صفة المقاومة. S : Sesitive تشير الى صفة الحساسية.

إذ لوحظ أن هناك علاقة وثيقة بين المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بسبب احتمال أن المورثات المقاومة لكل منهما واقعة على نفس البلازميد R-plasmid (Kawane and Tambekar, 2004) وأوضح صوفي (2013) أن عزلات خميرة *Saccharomyces* المعزولة من العصائر وثمار الفاكهة والخضار واوراق النباتات والتربة والحشرات كانت مقاومة لـ $CdCl_2$، $PbCH_2COOH$، $CuSO_4$، $ZnSO_4$، $NiCl_2$ و $K_2Cr_2O_7$ وحساسة لـ $HgCl_2$. اما جرثومة *E. coli* فقد كانت مقاومة لـ $PbCl_2$،$K_2Cr_2O_7$ و $CdCl_2$ بينما كانت حساسة لـ $ZnSO_4$،$CuSO_4$، $HgCl_2$، $NiCl_2$و $CoCl_2$ (الجدول 4).

و وَجد Kawane (2012) أن جميع عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة من مياه الشرب كانت مقاومة لجميع المعادن الثقيلة $HgCl_2$، $CdSO_4$، $CuSO_4$، $PbNO_3$ المستخدمة وفي دراسة Lucious *et al.*, (2013) تم فحص حساسية عزلات *E. coli* تجاه المعادن الثقيلة التي ابدت مقاومة عالية لـ $K_2Cr_2O_7$، $CdCl_2$، $CuSO_4$، $PbCl_2$، $HgCl_2$ إذ تبين أنها اظهرت مقاومة شديدة لـ $CdCl_2$ و $K_2Cr_2O_7$ مقارنة ببقية المعادن الثقيلة.

تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي

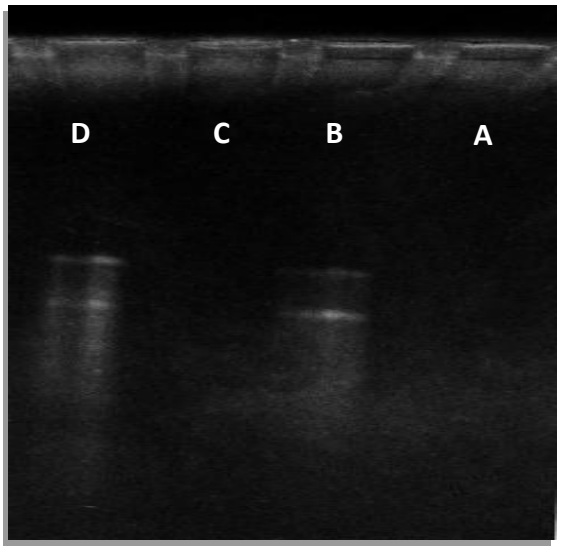
بعد ان تمت معاملة عزلة كل من خميرة *S. cerevisiae* BA179 و *R. mucilaginosa* BA61 والبكتريا *E. coli* BA 252 بعدة تراكيز من بروميد الاثيديوم (100، 150، 200، 250 و300 مايكروغرام/ مل) لتحديد التركيز القاتل لهذه

العزلات، تبين أن التركيز 300 مايكروغرام/ مل كان فعالا في عملية القتل ،وعلى هذا الاساس اعتمد التركيز 150 مايكروغرام/ مل باعتباره نصف التركيز القاتل في الجزء التالي من التجربة لغرض تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي لكل من خميرة BA179 *S. cerevisiae* و BA61 *R. mucilaginosa* والبكتريا BA252 *E. coli* على التوالي. وأظهر بروميد الاثيديوم كفاءة عالية في إزالة محتوى الحمض النووي البلازميدي مع مراعاة كون نسب المستعمرات النامية جيدة. وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Pahwa وآخرون (2012).

التحييد والترحيل في الهلام لمحتوى الحمض النووي البلازميدي لعزلة *S. cerevisiae* BA179 وعزلة *R. mucilaginosa* BA61

بيّنت نتائج تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي لعزلة خميرة *S. cerevisiae* BA179 أن النسب المئوية للمستعمرات المحيدة للمضادات الحيوية Ax، Ap، Cd، Cf، Clin، Fc، Nm، Nys، Rif، Str وTm كانت كالآتي: 100، 21، 100، 18، 20، 18، 15، 81، 17،100 و19% على التوالي، اما بالنسبة للمعادن الثقيلة$ZnSO_4$،$CuSO_4$ ، $PbCl_2$ و$CdCl_2$ فكانت النسب المئوية للمستعمرات المحيدة 40، 35، 0 و 100% على التوالي. فيما يخص عزلة خميرة *R. mucilaginosa* BA61 فإن النسب المئوية للمستعمرات المحيدة للمضادات الحيوية Ax، Ap، Cd، Cf ، Clin، Cm، Er، Fc، Gm، Ls، Nm، Pen، Rif، Str، Tc، Tm وVan كانت 100، 0، 20، 25، 100، 100، 0، 50، 33، 0، 18، 42، 76، 80، 64، 100 و0% على التوالي. اما المعادن الثقيلة $CuSO_4$، $K_2Cr_2O_7$،$HgCl_2$ ، $CdCl_2$، $NiCl_2$ و$CoCl_2$ فقد اعطت نسب تحييد 22، 100، 16، 100،30 و18% على التوالي. وهذا يؤكد وقوع المورثات المسؤولة عن اظهار صفة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة المحيدة على الحمض النووي البلازميدي، بينما المضادات الحيوية التي احتفظت الخميرة بصفة المقاومة لها واقعة على الحمض النووي الكروموسومي بدلالة عدم امكانية تحييد صفة المقاومة لهذه المضادات. وبوجه عام فإن بروميد الاثيديوم يعد مادة فعّالة في تحييد الحمض النووي البلازميدي، إذ إنه يعمل على ايقاف وتثبيط تضاعف البلازميد (Jamuna *et al*., 2010) وجاءت هذه النتائج مماثلة لما توصلت اليه دراسة صوفي (2013) عند تحييد بلازميد خميرة *S. cerevisiae*.

وتم استخلاص الحمض النووي البلازميدي للعزلات المحيدة، وأُجري لها الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز لملاحظة محتواها من الحمض النووي البلازميدي ومقارنتها بالعزلات غير المحيدة (الشكل1– A وC)، إذ وجد أن العزلات المحيدة لم تظهر اي حزم للحمض النووي البلازميدي مقارنة بالعزلات غير المحيدة وعندما زرعت عزلة الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 المحيدة البلازميد لوحظ عدم تغير لون مستعمراتها وبقيت ذات لون برتقالي وهذا يدل على أنها لم تفقد القابلية على انتاج صبغة البيتا– كاروتين المميزة لهذه الخميرة مما يشير الى أن عملية التحييد لا تؤثر في المورثات المسؤولة عن انتاج صبغة البيتا– كاروتين وأن هذه المورثات واقعة على الحمض النووي الكروموسومي وهذه النتائج توافقت مع ما ذكره الباحث Lodato *et al*., (2007) حول المورثات *idi*، *crtE*، *crtYB*، *crtI* التي تكون مسؤولة عن انتاج الصبغة وتنظيمها وأنها موزعة على شكل مجاميع من مورثات محمولة على الكروموسوم.

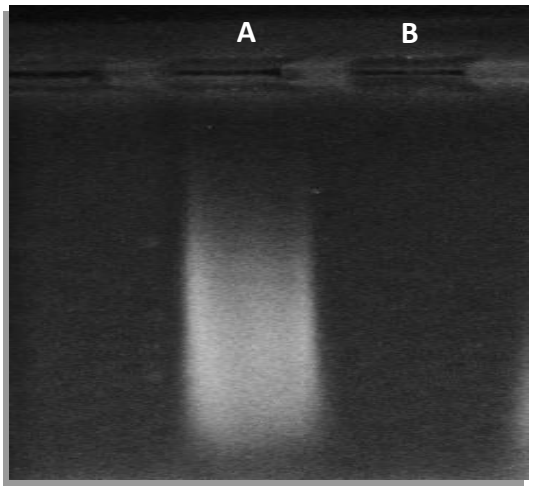


الشكل 1: تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي في عزلات الخمائر قيد الدراسة

(A) *S. cerevisiae* BA179 المحيدة، (B):*S. cerevisiae* BA179 غير المحيدة (C): *R. mucilaginosa* BA61 المحيدة، (D): *R. mucilaginosa* BA61 غير المحيدة

تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي في بكتريا *E. coli* BA252

تشير النتائج أن بكتريا *E. coli* BA252 سّجلت تحييداً للمضادات الحيوية Ax، Ap، Cd، Cf، Clin، Ct ، Fc، Er، Kc، Ls، Nys، Pen، Str، Tc، Tm، Van بالنسب المئوية الآتية: 100، 32، 18، 16، 100، 100، 100، 0، 20، 0، 19، 17، 100، 100، 0 و100%. بينما اظهرت تحييد للمعادن الثقيلة $K_2Cr_2O_7$، $CdCl_2$ و $PbCl_2$ بالنسب المئوية 100، 100 و15% على التوالي. وتم استخلاص الحمض النووي البلازميدي للعزلة المحيدة وأجري له الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز لملاحظة محتواها من الحمض النووي البلازميدي ومقارنته بالعزلة غير المحيدة، إذ وجد أن العزلة المحيدة لم تظهر اي حزم للحمض النووي البلازميدي مقارنة بالعزلة غير محيدة (الشكل 2–B). وتبين هذه النتيجة ان عملية التحييد تعمل على ازالة الحمض النووي البلازميدي الحامل للمورثات الخاصة بالمقاومة للمضادات الحيوية اما المورثات التي احتفظت بصفة المقاومة فواقعة على الحمض النووي الكروموسومي. طبقاً لما لشارت اليه دراسة كل من (Chigor *et al*., 2010؛ Daini *et al*., 2011).



الشكل 2: محتوى الحمض النووي البلازميدي من عزلة بكتريا *E. coli* BA252 قيد الدراسة
(A):*E. coli* BA252 غير المحيدة، (B): *E. coli* BA252 المحيدة

الاقتران Conjugation

اجريت عملية الاقتران لاختبار قابلية الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 على نقل مادتها الوراثية الواقعة على البلازميد الى كل من الخميرة *S. cerevisiae* BA179 وبكتريا *E. coli* BA252 اللتين تم تحييد بلازميداتيهما لتوضيح الدور الذي تؤديه البلازميدات المنتقلة في نقل صفة المقاومة للمضادات الحيوية، وللتأكد من أن المورثات المسؤولة عن انتاج صبغة البيتا–كاروتين واقعة ضمن تتابعات القواعد النتروجينية للحمض النووي الكروموسومي وليس البلازميدي.

الاقتران الجرثومي بين عزلتي خميرة *R. mucilaginosa* BA61 وخميرة *S. cerevisiae* BA179

لاجراء عملية الاقتران بين عزلتين يجب أن يكون هناك عليمتين وراثيتين مختلفتين على الاقل بين العزلتين *R. mucilaginosa* BA61 (كسلالة واهبة Donor) و*S. Cerevisiae* BA179 (كسلالة مستلمة Recipient). تم تحديد عليمتين لكل عزلة وهي امتلاك الخميرة الواهبة لصفة المقاومة للمضاد الحيوي Gm، وحساسة للمضاد الحيوي Nys، بخلاف الخميرة *S. cerevisiae* BA179 فكانت التي لم تُبدِ أيةّ مقاومة للمضاد الحيوي Nys وحساسة للمضاد الحيويGm ولوحظ أن عملية الاقتران ادت الى انتقال صفة المقاومة للمضاد الحيوي Gm من الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 الى الخميرة *S. cerevisiae* BA179 وبتردد اقتران (0.65×10^{-8}) بدلالة نمو المستعمرات الناتجة من الاقتران في الوسط الغذائي YPG الحاوي على المضاد الحيوي Nys و Gm وتم تنمية نماذج سيطرة في هذا الاختبار المتمثلة بالسلالة الواهبة والسلالة المستلمة، كل على حدة، في الوسط الحاوي على المضادات المستخدمة كدلالة وراثية في الاقتران فلم يلاحظ اي نمو لكلا السلالتين على هذا الوسط.

ويشير ذلك الى قابلية الحمض النووي البلازميدي في هذه العزلة على الحركة والانتقال الى عزلة اخرى من عزلات الخمائر ونجح الباحث Kelly *et al.*, (2012) في نقل مورثات المقاومة للزئبق الواقعة على الـ DNA البلازميدي من خميرة *S. cerevisiae* الى نوع آخر من نفس السلالة بعملية الاقتران وبتردد اقتران 1.3×10^{-2} وتمكن صوفي (2013) من إجراء ثلاث محاولات اقتران بين عزلة خميرة *S. cerevisiae* تم خلالها انتقال مورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية

Chloramphenicol، Ampicillin، Getamicin، Tetracycline، Penicillin ،فضلاً عن المعادن الثقيلة $CuSO_4$ و $NiCl_2$.

ولم يُلحظ انتقال صفة انتاج صبغة البيتا– كاروتين في أية مستعمرة مقترنة من المستعمرات الناتجة من الاقتران. إن هذه النتيجة التي تم الحصول عليها تؤشر بأن المورثات المسؤولة عن انتاج صبغة البيتا– كاروتين في الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 واقعة على الحمض النووي الكروموسومي ويتفق هذا مع ما اشارت اليه العديد من البحوث التي تناقلت توصيف المورثات المسؤولة عن التخليق الحيوي للبيتا–كاروتين في الخمائر، إن هذه المورثات تظهر على قطعة من كروموسوم الخميرة وهي بهيئة مجتمعة ،والجدير بالذكر أن هناك القليل من الدراسات حول العالم في هذا المجال التي اشارت لذلك مثل Niklitschek *et al.*, (2008) و Ukibe *et al.*, (2009) و Altincicek *et al.*, (2012).

الاقتران الجرثومي ما بين خميرة *R. mucilaginosa* BA61 وبكتريا *E. coli* BA252

كما ذُكِرَ آنفاً تم اختيار عزلتين تحملان عليمتان وراثيتان مختلفتان تمثلتا بامتلاك الخميرة الواهبة لصفة المقاومة للمضاد الحيوي Rif والحساسية للمضاد الحيوي Nys والعكس صحيح بالنسبة للبكتريا المستلمة واظهرت نتائج الدراسة انتقال صفة المقاومة للمضاد الحيوي Rif من الخميرة الواهبة الى البكتريا المستلمة وبتردد اقتران (3.05×10^{-8}) بدلالة نمو المستعمرات المقترنة عندما أُعيدت زراعتها في الوسط الغذائي الذي يضمّ المضاد الحيوي Nys والمضاد الحيوي Rif من نماذج السيطرة المستخدمة في هذه التجربة ولم يلحظ فيها نمو أية مستعمرة مقترنة بالاوساط الغذائية الحاوية للمضادات الحيوية المستخدمة ويشير هذا الى امكانية انتقال الحمض النووي البلازميدي في الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 الى بكتريا *E. coli* BA252 ونقل الباحث Haslett, (2006) الحمض النووي البلازميدي والحامل لمورثات المقاومة للمضادات الحيوية Tetracycline، Trimethoprim، Ampicillin من البكتريا *E. coli* JB139 الى الخميرة *S. cerevisiae* SY1229. اجرى صوفي (2013) محاولتين للاقتران بين الخميرة والبكتريا، الاولى بين الخميرة كواهب والسلالة *E. coli* DH5α كمستقبل ولاحظ انتقال الحمض النووي البلازميدي الحامل للمورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية Chloramphenicol، Tetracycline، Ampicillin، Getamicin، Penicillin وللمعادن الثقيلة $CdCl_2$، $ZnSO_4$، والمحاولة الثانية بين البكتريا المرضية *E. coli* كواهب وعزلة الخميرة المحيدة YET28 كمستقبل، إذ وجد أن لعزلة الخميرة المحيدة القابلية على استقبال وتوطين الحمض النووي البلازميدي من البكتريا بوساطة عملية الاقتران. ولم تنتقل صفة انتاج صبغة البيتا–كاروتين الى البكتريا، وهذا بدوره يثبت أن المورثات المسؤولة عن التخليق الحيوي لصبغة البيتا–كاروتين تعد جزءاً من الحمض النووي الكروموسومي كما أوضحت الدراسات المذكورة آنفا.

المصادر العربية

صوفي، بلقيس يحيى نجم (2013). دراسة تشخيصية ووراثية جزيئية للخميرة من جنس الـ *Saccharomyces* المعزولة من مصادر مختلفة في مدينة الموصل. اطروحة دكتوراه، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.

عبيدة، علي ابراهيم علي؛ محمود، أحمد عبد الفتاح (2012). اساسيات التقنية الحيوية. مكتبة المعارف الحديثة، الاسكندرية، مصر، 215 صفحة.

الطائي، رافع قاسم محمد (2013). دراسة تشخيصية لخميرة المبيضات .*Candida* spp المعزولة من المرضى المصابين بداء المبيضات الفموي في مدينة الموصل ودراسة تأثير حليب الام والمستخلص المائي للشاي الاحمر على انتاجها لبعض عوامل الضراوة. اطروحة دكتوراه، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.

ملا عبيدة، بادية عبدالرزاق جمال (2017). عزل وتشخيص ودراسة بعض أنواع الخميرة *Rhodotorula* من الناحية الوراثية والجزيئية وكفاءتها في انتاج β-carotene. اطروحة دكتوراه، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.

المصادر الأجنبية

Altincicek, B.; Kovacs, J.L.; Gerardo, N.M. (2012). Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biol. Lett*., **8**, 253-357.

Chigor, V.N.; Umoh, V.J.; Smith, S.I.; Igbinosa, E.O.; Okoh, A.I. (2010). Multidrug resistance and plasmid patterns of *Escherichia coli* O157 and *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal stools and surface waters from some selected sources in Zaria, Nigeria. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*., **7**,3831-3841.

Chinedum, Ch.S.; Abdullah, N.; Siang, T.W.; Wan, H.Y.J. (2005). *Microbiol*., **43**, 251-256.

Daini, O.A.; Adegboyega, H.O.; Odufuwa, T.; Ogbolu, D.O. (2011). Incidence of multidrug resistance R-plasmids among *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case study from Nigeria. *British Appl. Sci. and Technol*., **1**(4), 204-210.

Dar, N. (2004). Isolation and Characterization of Heavy Metals Resistant Yeast from Industrial Effluents and their Use in Environmental Cleanup. ph.D. Thesis. Punjab. Univ. Lahore. Pkistan.

Delgado, J.N.; Remers, W.A. (1998). "Text Book of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry". 10th ed., a Wolters Kluwer Company. New York.

Ernst, J.F.; Chan, R.K. (1985). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutant's supersensitive to aminoglycoside antibiotics. *J. Bacteriol*., pp.8-14.

Franklin, T. J.; Snow, G. A. (2005). "Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Actions". Springer Science-l-Business Media, Inc., pp. 142-145.

Hardy, K. (1989). "Bacterial Plasmids". 2nd ed., American Society of Microbiology.

Haslett, N.D. (2006). Evaluating transmission Barriers to *Escherichia coli* x *Saccharomyces cerevisiae* inter-kingdom conjugation. M.Sc. Thesis. (Hons) in the School of Biological Science, Canterbury University.

Heinemann, J.A.; Sprague, J.R. (1989). "Bacterial Conjugative Plasmids Mobilize DNA Transfer Between Bacteria and Yeast". Nature, 340p.

Heinemann, J.A.; Sprague, J.R. (1991). "Transmission of Plasmid DNA to Yeast by Conjugation with Bacteria". Methods in Enzymology. 2nd ed. pp. 187-195.

Jamuna, M.; Kolanchiammal, R.; Jeevaratnam, K. (2010). Plasmid- associated bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from some traditional fermented foods. *Global J. Biotech. Biochemi*., **5**(3), 175-181.

Jeremy, W.D.; Simon, F.P. (2004). "Molecular Genetics of Bacteria".4th ed. John Wiley and Sons Ltd., pp.137-174.

Kanzy, H.M.; Nasr, N.F.; El- Shazly, H.A.M.; Barakat, O.S. (2015). Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*., **4**(1), 456-469.

Kawane, R.S. (2012). Studies on antibiotics and heavy metal resistance profiling of *Escherichia coli* from drinking water and clinical specimens. *Bios. Dis.*, **3**(3),292-295.

Kawane, R.S.; Tambekar, D.H. (2004). "Studies on multidrug and Heavy Metal Resistance in Escherichia Coli". 45th Annual conference of Association of Microbiologist of India, NDRL (Karnal), November., pp. 23-25.

Kelly, A.C.; Shewmaker, F.P.; Kryndushkin, D.; Winkner, R.B. (2012). Sex, prions, and plasmids in yeast. *PNAS Early Edition*., **78**,177-207.

Lodato, P.; Alcaino, J.; Barahona, S.; Niklitschek, M.; Carmona, M.; Wozniak, A.; Baeza, M.; Jiménez, A.; Cifuentes, V. (2007). Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res*., **40**, 73-84.

Lucious, S.; Rrddy, E.S.; Anuradha, V.; Vijaya, P.P.; Ali, M.S.; Yogananth, N.; Rajan, R.; Parveen, P.K. (2013). Heavy metal tolerance and antibiotic sensitivity of bacterial strains isolated from tannery effeluent. *Asian J. Exp. Biol. Sc*i., **4**(4),597-606.

Miljkovic - Selimovic, B.; Babic, T.; Kocic, B.; Stojanovic, P.; Ristic, L.; Dinic, M. (2007). Bacterial plasmids. *Acta Medi. Medianae*., **46** (4), 61-65.

Naziri, D.; Hamidi, M.; Hassanzadeh, S.; Tarhriz, V.; Zanjani, B.M.; Nazemyieh, H.; Hejazi, M.A. ; Hejazi, M.S. (2014). Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ 126 ; an Extremely Halophilic Archeon from Urmia Lake. *Adva. Pharm. Bul*., **4** (1), 61-67.

Niklitschek, M.; Alcaíno, J.; Barahona, S.; Sepúlveda, D.; Lozano, C.; Carmona, M.; Marcoleta, A.; Martínez, C.; Lodato, P.; Baeza, M.; Cifuentes, V. (2008). Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res*., **41**, 93-108.

Pahwa, S.; Kaur, J.; Cameotra, S.S.; Nandanwar, H.; Kaur, P. (2012). Curing of multiple plasmids by Et Br in *Acinetobacter baumanir*. *J. Adv. Dev. Res*., **3**(1), 82-84.

Paul, D.; Magbanua, Z.; Arick ll, M.; French, T.; Bridges, S.M.; Burgess, S.C.; Lawrence, M.L. (2014). Genome of the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091. *Gen. Ann*., **2**(1), 46-14.

Qassar, I.; Salih, S.A. (1992). Effect of antibiotics used for transconjugant cell selections in the transfer frequency of RP4. *Iraqi J. Biological Sci*., **99**(12).

Ramesh, S.; Manivasagan, P. Ashokkumar, S.; Rajaram, G.; Mayavu, P. (2010). Plasmid profiling and multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from muthupettai mangrove environment, South Coast of India. *Curr. Res. Bacteriol*.,

Rees, C.E.; Wilkins, B.M. (1989). Transfer of tra proteins into the recipient cell during bacterial conjugation mediated by plasmid ColIb- P9. *J. Bacteriol*., **171**(6), 3152-3157.

Sharma, D. (2014). Understanding biocolour- a review. *Int. J. Sci. and Res*., **3**(1), 294-299.

Szczepanowski, R.; Braun, S.; Riedel, V.; Schneiker, S.; Krahn, I.; Puhler, A.; Schluter, A. (2005). The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence associated functions. *Microbiol.*, **151**,1095-1111.

Toh-e, A.; Wickner, B. (1980). Curing of the 2- μm DNA plasmids from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bcteriol*., **145**(3), 1421-1424.

Tomoeda, M.; Inuzka, M.; Kubo, N.; Nakamura, S. (1968). Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *J. Bacteriol*., **95**, 1078-1089.

Ukibe, K.; Hashida, K.; Yoshida, N.; Takagi, H. (2009). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* and oxidative stress tolerance. *Appl. Environ. Microbiol*., **75**(22), 7205-72011.

Wang, C.; Kim, J.H.; Kim, S.W. (2014). Synthetic biology and metabolic engineering for marine carotenoids: new opportunities and future prospects. *Mar. Drugs*., **12**,4810-4832.

Wang, W.; Shinto, L.; Connor, W.E.; Quinn, J.F. (2008). Nutritional biomarkers in alzheimer's disease: The association between carotenoids, n-3 fatty acids, and dementia severity. *J. Alzheimer's Dis. JAD*. **13**, 31–38.

Yah, S.C.; Eghafona, N.O.; Oranusi, S.; Abouo, A.M. (2007). Widespread plasmid resistance genes among Proteus species in diabetic wounds of patients in the Ahmadu Bello university teaching hospital (ABUTH) Zaria. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **73**(1),341-343.