عزل بكتيريا مكونة للأبواغ الداخلية تتبع جنس باسلس *Bacillus* من رمال صحراء منطقة زلاف جنوب ليبيا

عبدالهادي علي البصير، أمل حسن إبراهيم، دلال محمد المبروك، فاطمة إبراهيم علي وعائشة علي عمر
قسم علم النبات، شعبة الأحياء الدقيقة، كلية العلوم، جامعة سبها albaser474@hotmail.com

الملخص

تضمنت هذه الدراسة والأولى من نوعها عزل بكتيريا هوائية النمو مكوّنة للأبواغ من رمال منطقة زلاف الواقعة شمال غرب مدينة سبها جنوب ليبيا، تم تشخيص البكتيريا المعزولة بالطرق البيوكيميائية التقليدية المعروفة أو بإستخدام API 20E. أظهرت النتائج أن البكتيريا المعزولة تمتلك العديد من صفات الانواع البكتيرية التي تتبع جنس باسلس *Bacillus* ، حيث بيّن الفحص المجهري لهذه البكتيريا أنها بكتيريا عصوية الشكل منفردة أو في شكل أزواج ، متحركة ومكوّنة للأبواغ الداخلية ،الخلية المتكوّن فيها البوغ Sporangia غير منتفخة، موجبة لتفاعل صبغة جرام تنمو بغزارة عند درجة حرارة 30 °م و pH 7 ولم تنمو عند ملوحة 10% ، تحلل الكازين والجلاتين ولاتحلل النشأ ، موجبة لاختبارات الكاتاليز Catalase ، الاكسيديز Oxidase ، الإندول Indole ولاختبار فوكس بروسكر VP، تخمر الجلوكوز ، المانيتول ، سوربتول ، السكروز و amygladine. إعتمادا على النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة وبعد مقارنتها مع صفات أنواع بكتيريا الباسلس المدرجة في كتيب برجز Bergey's Manuel for Determinative Bacterioogy وجد انه من المحتمل أن تكون هذه العزلة نوع جديد يتبع جنس الباسلس لم يسبق نشره أو التعرف عليه، ولتأكيد هذه النتيجة نوصي بإجراء إختبارات تحديد النوع بإستخدام الطرق الوراثية مثل 16S rDNA وغيره للتعرف على جنس ونوع و السلالة لهذه البكتيريا نشير هنا بأن هذه الاختبارات غير متوفرة حاليا في جامعة سبها.

1. المقدمة

Ehrenberg (1835) كان أول من وصف بكتيريا هوائية مكونة للابواغ والتي عُرفت في ذلك الوقت بإسم *Vibrio subtilis* والتي أُعيد تسميتها من قبل Cohn (1872) إلي *Bacillus subtilis* والتي أُعتبرت فيما بعد على انها النوع النموذجي type species للجنس الجديد المسمى باسلس *Bacillus* والذي ضم في ذلك الوقت البكتيريا الخيطية. لاحظ العالمان Cohn (1876) و Koch (1877) أنَ نوعان من جنس الباسلس هما *B. subtilis* و *B. anthracis*, تكونان أشكالاً مميزة (الأبواغ) مقاومة للمعاملة الحرارية ولا تقتل بسهولة عند درجة الغليان. في عام 1880 قدّم Prazmowski ظاهرة تكوين الأبواغ الداخلية كعامل تفريقي مهم لجنس الكلوستريديوم *Clostridium* الذي إقترحه في ذلك الوقت والذي يختلف عن جنس الباسلس من حيث الاحتياج الي الاكسجين حيث أنّ الأول (الكلوستريديوم) لاهوائي النمو بينما غالبية أنواع جنس الباسلس هوائية النمو، ومُنذّ أنّ أُعتمدت خاصيّة مدى الحاجة للاكسجين من عدمه في تفريق البكتيريا عام 1920، ومُنذّ ذلك الحين عُرّفت أنواع جنس الباسلس على أنها موجبة لصبغة جرام ، عصوية الشكل هوائية النمو ، متحركة

أو غير متحركة ، مكوّنة للأبواغ الداخلية ، الخلية المكوّنة للبوغ قد تكون منتفخة أو غير منتفخة. إنّ العديد من أنواع جنس الباسلس له المقدرة الفسيولوجية للعيش في عدة بيئات طبيعية مختلفة (Ahn et al 2001) حيث عُزل العديد من أعضاء هذا الجنس من بيئات مختلفة مثل البيئات المائية والتي تشمل مياه المحيطات والمجاري (Demharter, Hensel (1989 ، البيئات الاستوائية ، الينابيع الحارّة Derekova et al (2008) ومن الترب الصحراوية Palmisano et al (2001). في هذه الدراسة تمّ عزل بكتيريا هوائية النمو مكوّنة للأبواغ الداخلية من رمال منطقة زلاف الواقعة شمال غرب مدينة سبها وجنوب منطقة وادي الشاطئ بالجنوب الليبي.

2. المواد والطرق

جُمعت عينة الرمل في أنبوبة بلاستيكية معقمة ونُقلت للمختبر حيث أُخذ منها وزنة (1 جرام) وأُضيفت إلى أنبوبة إختبار زجاجية تحتوي على 9 مليلتر محلول ملحي (0.85%) معقم ، رجت الانبوبة عدة مرات قبل معاملتها حرارياً (80 °م /10 دقائق) وذلك بتحضينها على Heat block وذلك لغرض قتل الخلايا الخضرية ، زُرعت العينة (150 ميكرولتر) على طبق بتري يحوي وسط غذائي صلب Nutrient agar من شركة (Oxoid) وحُضنت لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 30 °م. فُحصت البكتيريا النامية تحت المجهر الضوئي وذلك للتأكد من أنها بكتيريا عصوية كما أجرى عليها تفاعل صبغة جرام حسب الطريقة الموصوفة من قبل Doetsch (1981) واختبار الحركة بتعليق مستعمرة في قطرة ماء مقطر على شريحة مجهر زجاجية ومشاهدتها تحت المجهر الضوئي ، اما اختبار تحفيز إنتاج الابواغ (الجراثيم) فتمّ بإضافة كبريتات المنجنيز $MnSO_4$ (5 ملجم/لتر) Logan & Berkeley (1984). أُجريت الاختبارات الكيموحيوية Biochemical باستعمال API 20E (biomeriex, France) حسب تعليمات الشركة المصنعة ، أما إختبار تحلل الكازين فأُجري بتحضين بكتيريا الباسلس على آجار صرف (بدون مواد داعمة للنمو) مضافا إليها حليب منزوع (خالي) الدسم (50 مليلتر / لتر، شركة جودي، ليبيا) ، اما إختبار تحلل النشأ فأُجري حسب الطريقة المذكورة من قبل سيالة (1990)، إختبار إنزيم الكاتاليز Oxidase فتمّ الكشف عنه بإستخدام أقراص (Himedia, India) ، أما أنزيم Catalase فتمّ الكشف عنه بإضافة قطرات من محلول فوق اكسيد الهيدروجين (6%). اختبرت الدراسة تأثير أيون الهيدروجين (pH) على نمو البكتريا المعزولة حيث نميت البكتريا على مرق مغذي (NB, 5 , مليلتر) تمّ تعديل تركيز ايون الهيدروجين إلى التركيز المراد اختباره (4، 5، 6،7 ، 8، 9 و 10 pH) باستخدام إما HCl (5 M) أو NaOH (5 N) ، كما أُختبر نموها عند تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) (2 ، 4 ، 6 ، 8 و 10%) والتي أُضيفت إلى مرق مغذي NB (5 مليلتر) ، ونموها على درجات حرارة مختلفة (18 ، 30 ، 40 ، 50 ، 55 و 60 ° م).

3. النتائج والمناقشة

رغم الصحراء الشاسعة التي تنعم بها ليبيا وخاصة في المنطقة الجنوبية والمتمثلة في رمال منطقة زلاف التي تقع مابين مدينة سبها ووادي الشاطئ إلاّ أنّه لم يقع بين أيدينا دراسة عن الكائنات الدقيقة المتواجدة في هذه المنطقة خاصة من جنس الباسلس وكما هو معروف بأن هذا الجنس يتحمل الظروف البيئية الغير ملائمة لنمو كائنات دقيقة اخرى مثل الظروف البيئية الموجودة في منطقة زلاف وذلك لانّ الباسلس لها المقدرة على تكوين الابواغ وبمكن أن تتواجد في رملة زلاف ، وإعتمادا على هذه الفرضية نجحت

هذه الدراسة في عزل بكتيريا هوائية النمو نجزم قطعا بأنها تابعة لجنس الباسلس حيث بيّن الفحص المجهري بأنها متحركة وتكون في صورة أزواج أو منفردة ، موجبة لتفاعل صبغة جرام ، مكوّنة للابواغ الداخلية ومكان تكوّن البوغ الداخلي قرب احد النهايات ولا يسبب في انتفاخ الخلية وهذه الصفة موجودة في العديد من أنواع جنس الباسلس مثل أنواع *Bacillus cereus* و *B. subtilis* (Fritze 2004) ، تنمو عند درجة حرارة 18-40 وبدرجة أقل عند 50 ° م وهذا كان متوقعا نظرا لانها معزولة من بيئة تصل فيها درجة الحرارة الى أكثر من 40 ° م خلال فصل الصيف ، لا تنمو عند درجة حرارة من 55-60 ° م ، تستطيع النمو في بيئة تصل درجة الأس الهيدروجيني pH 5- 9 غير أنها لا تنمو عند pH 4 و 10 ولا على وسط غذائي ملوحته 10% ، نذكر هنا بأن النمو الحاصل بعد 24 ساعة من الحضن لا يمكن تقديره بإستخدام جهاز قياس شدة الضوء Spectrophotometer نظرا لتكون نمو كثيف على سطح الوسط الغذائي السائل NB ربما يرجع سببه لكون هذه البكتيريا هوائية النمو إجبارا ، ولسبب غير معروف فإنّ هذا النمو لا يمكن خلطه (مجانسته) في الوسط حتى بإستخدام جهاز الرجّ Vortex.

أظهرت نتائج شريط API 20E أن البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة تخمر سكريات الجلوكوز ، السوربيتول Sorbitol ، السكروز ، المانيتول و amygdalin لإمتلاكها أنزيم *β*-glucosidase ، لا تحلل إنسيتول Inositol ، رهمانوز Rhamnose ، مليبيوز Melibiose و لا الاربينوز Arabinose. البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة تحلل الكازين والجلاتين غير أنها لا تمتلك أنزيم الاميليز Amylase حيث لم تستطع تحليل النشأ غير أنها تمتلك أنزيم الكاتاليز Catalase وهاتين الصفتين وحسب مقالة Claus and Berkeley (1986) المنشورة في كتيب برجز Bergey's تضعانها ضمن مجموعة الباسلس التي تضم ما يزيد عن عشرة أنواع والتي من ضمنها *B. badius* و *B. sphaericus* و *B. laterosporus* كما أنها موجبة لاختبار الاكسيديز Oxidase. الأبواغ المتكونة داخل خلايا البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة غير كروية الشكل كما في *B. sphaericus* بل على شكل بيضاوي مشابها للموجود في *B. laterosporus* غير أنّ خلايا الأخيرة منتفخة Logan & Berkeley (1984) وهذه الصفة غير موجودة في البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة وبهذا فهي مشابهة *B. badius* غير انّ البكتيريا المعزولة في الدراسة موجبة لاختبار VP بينما الاخيرة (*B. badius*) سالبة لهذا الاختبار و إضافة لكون البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة تستطيع النمو على درجة حرارة مرتفعة (50 °م) فإنّ كل هذه الدلائل تجعلنا نعتقد بأنّ البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة قد تكون نوعا جديدا من جنس الباسلس. نظرا للعدد الكبير الذي يضمه جنس الباسلس والذي يفوق 200 نوع والتي علي الرغم أنّ العديد منها قد أُعيد تصنيفه تحت أجناس أخرى مثل *Virgribacillus* ، *Paenibacillus* ، *Viridibacillus* و *Brevibacillus* (http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html) إلاّ أنه وفي أحيانا كثيرة يصعب التفريق فيما بينها بالطرق التقليدية لوحدها مثل الطرق الكيموحيوية المستخدمة في هذه الدراسة غير أنّ التطور الذي حصل في علم التصنيف بالإعتماد على تقنية الوراثة بتحليل تسلسل القواعد النيتروجينية ونسب الجوانين إلى السيتوسين وغيرها أسهم كثيرا في التفريق بين الأجناس والأنواع البكتيرية (Stackebrandt and Swidersky 2002) و عليه فإننا نوصي بإجراء التحاليل الوراثية على هذه البكتيريا مثل إختبار 16S rRNA/DNA وذلك لمعرفة نوعها بالتحديد خاصة في وجود هذه الدراسة (الكيموحيوية) والتي ستضيف مجتمعة مع التحاليل الوراثية مزيدا من المعلومات حول هذه البكتيريا التي ربما تكون نوعا جديدا قد يضاف إلى أنواع

جنس الباسلس. الجدول التالي (1) يلخص أهم صفات البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة.

جدول (1) : يوضح أهم صفات بكتيريا الباسلس المعزولة من رمال منطقة زلاف

Motility	+
Spore formation	+
Oxidase	+
Catalase	+
Citrate utilization	-
Urease	-
Voges Proskauer (VP)	+
Indole	+
Hydrolysis of:	
Casein	+
Starch	-
Gelatin	+
Growth at:	
pH 4	-
pH 9	-
50 °C	+
55 °C	-
Acid from:	
Glucose	+
Rhamnose	–
Mannitol	+
Sucrose	+
Inositol	–
Melibiose	-
Amygdalin	+
Arabinose	-

المراجع

سيالة عبدالرؤوف 1990 مذكرات في البكتيرلوجيا العملية ، الطبعة الاولى 1990 ، LGA طرابلس ليبيا.

Ahn, T.S., Hong S.H., Kim O.S and Choi S.I. 2001. "The changes of *Bacillus* spp". in municipal waste water treatment plant with B3 process kor. J. Microbiology 37: 209-213.

Claus, D., and R. C. W. Berkeley. 1986**.** Genus *Bacillus* Cohn 1872, p. 1105-1139. *In* P. H. A.

Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Cohn, F. 1872. "Untersuchungen uber Bacterien". Beitrage zur Biologie der Pflanzen, 1,Heft 11, 127-224.

Cohn, F. 1876." Unterschungen uber Bacterien. IV". Beitrage zur biologie der bacillen.Beitrage zur Biologe der pflanzen, 2, Heft 11, 249-276. In Milestones in microbiology,pp. 49-56. Edited by T.D.Brock Englewood Cliffs, N. J.: Prenticehall Inc.

Demharter W, Hensel R (1989) "Bacillus thermocloaceae sp.nov., a new thermophilic species from sewage sludge". Syst Appl Microbiol 11:272–276

Derekova A, Mandeva R, Kambourova M (2008) "Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs". World J Microbiol Biotechnol 24:1697–1702

Doetsch RN (1981) "Determinative methods of light microscopy" in: Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GH (eds) "Manual of methods for general bacteriology". American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 21–33

Ehrenberg, C. G. 1835. "Dritter beitrag Zur erkemtniss grosser organisation" in der richtung des kleinstein raumes.Abhanlungen der koniglasse Akademie der wissenschaften zu Berlin aus dem jahre 1833, 145-336.

Fritze ,Dagmar. 2004."Taxonomy of the Genus Bacillus and Related Genera : The Aerobic Endospore-Forming Bacteria" The American Phytopathological Society–1245 :(11) 94 .1248

Koch, R. 1877. "Die aetiologie der milzbrandkrankheit", begrundet aut die entwicklungsgeschichte des *Bacillus antharcis*. Beitrage zur Biologie der Pflanzen, 2, Heft 11, 227-230. In Milestones in Microbiology, pp. 89-95. Edited by T.D. Brock. Englewood Cliffs, N. J. : Prentice-Hall Inc (1961).

Logan, N. A., and R. C. W. Berkeley. 1981. "Classification and identification of members of the genus *Bacillus". In* Berkeley and Goodfellow (Editors), The Aerobic Endospore-Forming Bacteria, Academic Press, London, pp.105-140.

Logan, N. A., and R. C. W. Berkeley. 1984. "Identification of *Bacillus* strains using the API system". J. Gen. Microbiol. 130: 1871-1882.

Palmisano MM, Nakamura LK, Duncan KE, Istock CA, Cohan FM (2001) "Bacillus sonorensis sp. nov., a close relative of Bacillus licheniformis, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona". Int J Syst Evol Microbiol 51:1671–1679

Prazmowski A. 1880. "Untersuchung über die Entwickelungsgeschichte and Fermentwirking" einiger Bacterien-Arten, p. 23. Hugo Voigt, Leipzig.

Stackebrandt, E., and Swidersky, J. 2002. "From phylogeny to systematics". Pages 8-22 in: Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. Blackwell Publishing, Oxford.