

عزل البكتريا الانزلاقية الثمرية *Polyangium cellulorum* من ترب الحظائر

هالة عبد الحافظ عبد الرزاق¹ و خليل مصطفى خماس² و عصام فاضل الجميلي³
¹قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية
²قسم التقنيات الاحيائية / معهد الهندسة الوراثية / جامعة بغداد

تاريخ تقديم البحث 2008/4/6 - تاريخ قبول البحث 2009/6/29

ABSTRACT

The fruiting gliding bacteria have been isolated from pasture soil samples collected from different regions of Baghdad using Stanier's mineral salts agar supplemented with sterilized filter paper. The results showed that 40 *Polyangium cellulorum* isolates were obtained from 100 pasture soil samples based on the morphological characteristics of the fruiting bodies.

الخلاصة

تم عزل البكتريا الانزلاقية الثمرية من عينات ترب الحظائر الحيوانية المنتشرة في اماكن مختلفة بمدينة بغداد وباستخدام الوسط الزراعي آكار ستاينر- الاملاح المعدنية المزود بورقة ترشيج معقمة . اظهرت نتائج البحث الحصول على 40 عزلة تعود للنوع *Polyangium cellulorum* من اصل 100 عينة تربة اعتماداً على التوصيف المظهري للاجسام الثمرية النامية.

المقدمة

تعد مجموعة البكتريا الانزلاقية الثمرية Fruiting gliding bacteria عصيات سالبة لصبغة كرام تتواجد بشكل طبيعي في التربة مستغلة المواد العضوية فيها كمغذيات طبيعية ، فضلاً عن مهاجمتها وتحليلها الاحياء المجهرية الاخرى سواء الحية منها أم الميتة ، فتؤدي بذلك دوراً رئيسياً في تدوير المواد العضوية في النظام البيئي للتربة ، و تتماز مستعمراتها بظاهرة الحشد او العج Swarming وذلك لقابلية خلاياها على الحركة الانزلاقية Gliding او الزاحفة Creeping على السطوح الصلبة او اوساط الاكار (1) وهذا وتتماز بدورة حياة معقدة يتخللها تمايزاً مظهرياً يبلغ ذروته بتكوين الاجسام الثمرية Fruiting bodies عند ظروف التجويع ، يُعد ذلك بمثابة ستراتيجية البقاء لهذه المجموعة لاحتوائها على الابواغ المقاومة للظروف القاسية لفترة طويلة (2) ، وقد تستثمر هذه الخاصية و بنجاح لأجل عزل البكتريا الانزلاقية الثمرية ومن المصادر المختلفة ، و تفضل التربة كمصدر رئيس لعزل معظم أنواعها لا سيما النوع *Polyangium cellulorum* المحلل للسليولوز (3) ، والذي يتميز حشده الثمري Fruiting swarm بكثافته وبتعدد الوانه الزاهية كما يتزامن نموه مع ظهور مناطق تحلل في مزارع اوراق الترشيج (4) ، كما وللعديد من سلالاته القدرة على تحليل الكايتين واستهلاك مدى واسع من المركبات العضوية ، هذا و يعد هذا النوع غير ممرض سواء للانسان وللحيوانات والنباتات المختلفة (5)، ونظراً لقلّة الدراسات المتوفرة حول عزل الاجسام الثمرية العائدة للنوع *P. cellulorum* من ترب الحظائر ولأهمية هذا النوع بأعتبره واحداً من أهم الأنواع المنتجة للمركبات الكيميائية الفعالة ومنها المضادات الحيوية المستخدمة ضد العديد من الممرضات النباتية والبشرية جاء هذا البحث.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات : جمعت 100 عينة - وزن الواحدة بحدود 150 غراما ومن عمق (10- 15) سم تحت سطح التربة - من ترب الحظائر الحيوانية المختلفة المنتشرة في مدينة بغداد وشملت حظائر المجترات والدواجن وحيوانات الحمل (الفصيلة الخيلية) للفترة ما بين

أول أذار ونهاية حزيران 2004 ، هذا ووضعت العينات داخل أكياس نايلون معقمة غير مستعملة لغرض نقلها الى المختبر (6، 7).

2- عزل الاجسام الثمرية : اجري عزل الاجسام الثمرية على وفق الخطوات المذكورة في المصدر (9) وكالاتي :

أ_ وضعت ورقة ترشيح معقمة قياس 9 سم بوساطة ملقط معقم على سطح وسط آكار ستاينز_ الأملاح المعدنية Stanier's mineral salts agar المحضر كما جاء في المصدر (10) من المكونات الاتية:

0.75 غرام نترات البوتاسيوم ، 0.75 غرام فوسفات ثنائي البوتاسيوم ، 0.2 غرام كبريتات المغنسيوم المائية ، 0.2 غرام كلوريد الحديدك ، 0.1 غرام كلوريد الكالسيوم المائي ، اذبيت المواد الأنفة الذكر في لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ثم اضيف 20 غرام اكار و 1 مل/لتر من محلول صبغة البلورات البنفسجية 0.14%

ب_ وضع 5 غرام من نموذج التربة المحضرة في طبق معقم بوساطة Spatula معقمة ثم رطبت بقطرات من محلول مضاد السايكلوهكساميد المحضر بتركيز نهائي 50 مايكروغرام/لتر ماء مقطر ، ومزجت جيداً بحيث تكفي الكمية المضافة لتكوين عجينة ذات قوام سميك.

ج_ قسمت العجينة الى قطع صغيرة Spots وزعت على سطح ورقة الترشيح الموضوعة على الوسط الزراعي.

د_ حضنت الأطباق في حاضنة بدرجة حرارة 28 م° ولمدة (7-21) يوماً وفي جو مشبع بالرطوبة وذلك بوضع اناء حاوي على الماء المقطر المعقم في الحاضنة طيلة فترة الحضانة.

هـ_ لأجل ملاحظة ظهور الأجسام الثمرية ، فحصت الأطباق ابتداء من اليوم الثالث للحضن بوساطة المجهر التشرحي بقوتي التكبير 20x و 40x .

3 التوصيف المظهري للاجسام الثمرية:

اعتمد التوصيف المظهري لعزلات النوع *P. cellulorum* على المصادر العلمية (11,12,13,14) واستناداً الى نتائج العزل في (الفقرة 2) تم ملاحظة معدل نمو الجسم الثمري ولونه وحجمه وطريقة ترتيبه او تجمعه وأضافة لملاحظة ظاهرة التاكل وتحليل السليلوز على ورقة الترشيح.

النتائج والمناقشة

شخصت 40 عزلة كجسم ثمري تعود للنوع *P. cellulorum* من 100 عينة ترب تعود للحظائر الحيوانية المختلفة ، اذ اثبتت الطريقة الموصوفة من قبل (15) كفاءتها في انجاح العزل ، فعند فحص الأطباق بأستخدام المجهر التشرحي بقوتي التكبير 20x و 40x و بعد مرور (7-21) يوماً لوحظت الأجسام الثمرية المكونة من حويصلات بوغية دقيقة كروية او مضلعة متراسة مع بعضها البعض وبشكل مجاميع او تجمعات صغيرة وكثيفة مترابطة فيما بينها مكونة كتلا اكبر مؤدية الى تكوين طبقة كثيفة مستمرة برتقالية اللون خصوصاً على سطح ورقة الترشيح ومنبتقة من حبة التراب . هذا وترتبت الحويصلات البوغية خلال اليااف السليلوز في الغالب بما يشبه حبات سبحة Beads محزومة على طول ليف السليلوز كما في الصورة (1 ، 2) .

ورافق أنتشار الاجسام الثمرية على سطح ورقة الترشيح ظهور مناطق شفافة دالة على تحلل السليلوز وهذا ضمن الخواص العامة لاشكال الاجسام الثمرية النامية على الاوساط الزراعية لنوع البكتريا *P. cellulorum* و حسبما اشارت المراجع العلمية (16 ، 17 ، 18).

توفر ترب الحظائر ظروفًا جيدة لنمو أنواع الأحياء المجهرية المحللة للسليلوز لا سيما البكتريا الانزلاقية لاحتواء هذه الترب على المواد العضوية المختلفة ومنها فضلات الحيوانات والمواد النباتية المتمثلة بالعلف والمكونة أساساً من مادة السليلوز (19)، تركت

العينات لتجف بالهواء ولمدة تراوحت ما بين (4-6) اسابيع ثم حفظت في درجة حرارة الغرفة ، وذلك لأجل التخلص من البكتريا غير المكونة للابواغ ومنعاً للتعفن تمهيداً لعزل البكتريا الانزلاقية ، اذ انها تتواجد في التربة الجافة بهيئة حويصلات دقيقة ساكنة Microcytes او ابواغ مخاطية Myxospores (20) .

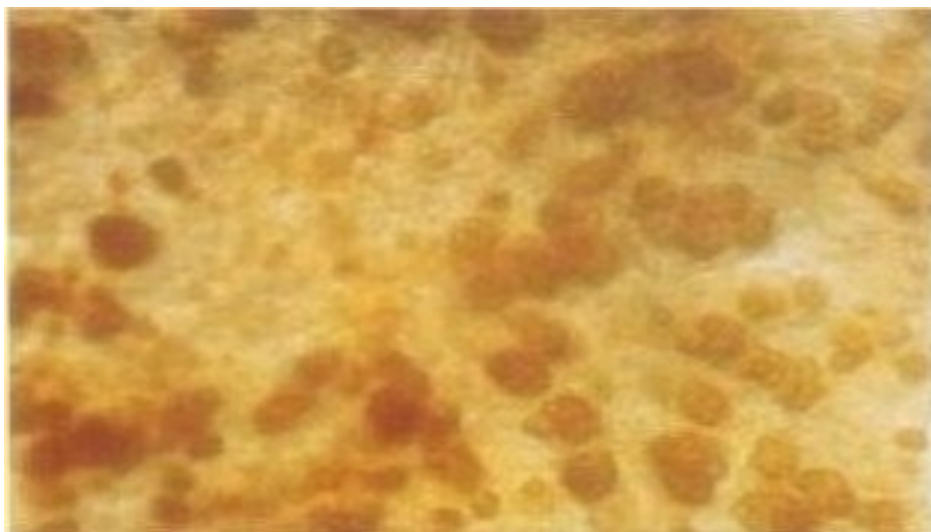
كان لتنمية عزلات النوع *P. cellulorum* عند درجة حرارة 28م دورا فعالا في الحد من نمو الملوثة البكتيرية و خصوصا الممرضات التي تحتاج لكي تنمو الى درجات حرارية أعلى تتراوح ما بين (35-37) م (21).

لوحظ ان استخدام عجينة سميكة من التربة لأجل العزل يوفر فرصة اكبر للنمو والتكاثر وتكوين الاجسام الثمرية من دون اللجوء الى طريقة التخافيف التي لاتجدي نفعا مع البكتريا الانزلاقية لفقدان الاجسام الثمرية المتطورة من خلية مفردة في التخافيف العليا، وفي التخافيف الأولى يلاحظ أن الملوثة و على الاغلب تجد وقتاً كافياً لتنتشر على سطح الاكار ما بين المستعمرات الناشئة والتي تعود للبكتريا الانزلاقية المحللة للسليولوز التي تحتاج للقاح كثيف لتنمو على طبق عزل الاجسام الثمرية ، هذا وتعد اوساط الاملاح المعدنية المزودة بورقة الترشيح بمثابة اوساط غذائية لأجل العزل (22).

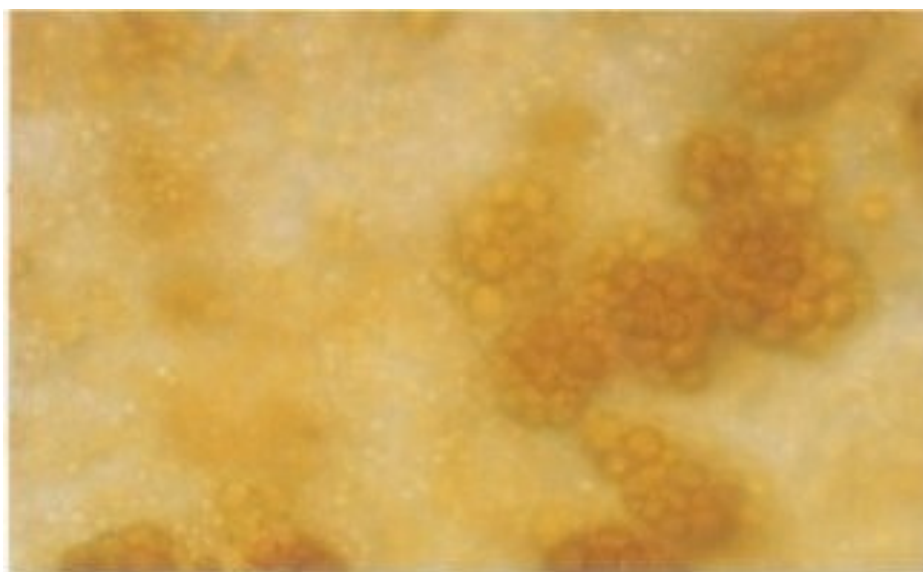
وضحت النتائج ان تقنية الأسطياد مماثلة لما يلاحظه (23) في دراسته التي اجراها لعزل الاجسام الثمرية للبكتريا الانزلاقية والتي تعود لعائلة Polyangiaceae اذ أستخدم نفس الطريقة بوضع ورقة ترشيح معقمة كمصدر وحيد للكربون على سطح وسط آكار ستاينر الأملاح المعدنية بمثابة الاصطياد للبكتريا الانزلاقية خصوصاً المحللة للسليولوز عن طريق تكوين اجسام ثمرية مرتبة على طول ليف السليولوز او صغيرة محزومة بقوة ، كما ان هذا الوسط الزراعي يسمح بنمو انواع كثيرة من الاحياء المجهرية كالفطريات لذلك يضاف محلول المضاد الحيائي السايكلوهكسميد بتركيز 40 : 1 الى الوسط الزراعي لاجل منع النمو ، وأستخدمت نفس التقنية من قبل (24) حين عزل الاجسام الثمرية للبكتريا الانزلاقية المحللة للسليولوز من تربة مسمدة بالسما Compost خلال فصل الصيف أذ تمكن من عزل 17 عزلة تعود للنوع *Sorangium solediatum* من 30 عينة تربة جمعت تحت ظروف معقمة و ذلك بعد مرور 6 اسابيع عند درجة حرارة حضان تراوحت ما بين (24-26) م°.

وقد جاءت نتائج البحث متفقة مع ما توصل اليه (25) في دراسة اجريت لاجل الحصول على عزلات بكتريا *S. cellulorum* بأستخدام تقنية الاصطياد لنماذج تربة جمعت من مناطق مسمدة واخرى غير مسمدة، ملاحظين أزياد اعداد البكتريا الانزلاقية في المناطق التي يدس لها فضلات اكلات الاعشاب فهو بما يشبه مادة نمو طبيعية او طعم طبيعي بما تحويه من مواد عضوية متحللة عند كل المستويات ، فضلاً عما توفره من خليطاً غنيا من الخلايا سواء الحية منها أو الميتة و من كل أنواع الأحياء المجهرية بأعتبر البكتريا الانزلاقية هي قانصات صغيرة وكانسات.

كما استطاع (26) من أصطياد 96 عزلة تعود الى النوع *P. cellulorum* من 400 عينة تربة حقول دواجن غنية بفضلات قديمة في حين تدنى عدد العزلات للنوع نفسه من عينات تربة حقول دواجن غنية بفضلات جديدة ، وعلل ذلك الى ان عامل الجفاف يلعب دوراً مهماً في التخلص من المواد ذات الوزن الجزيئي الواطيء الموجودة في الخثرة البيضاء Clot والتي تعمل على تثبيط انبات الابواغ المخاطية.



صورة -1: اجسام ثمرية تعود للنوع *Polyangium cellulosum* معزولة من ترب حظائر الابقار على وسط آكار ستانير- الاملاح المعدنية مع ورقة الترشيح بعد مرور (7-14) يوماً، يبدو الحشد الثمري ذو اللون البرتقالي البني متراصاً ومحزوماً ومرتباً على امتداد ليف السليلوز قوة التكبير 100x



صورة -2: اجسام ثمرية تعود للنوع *Polyangium cellulosum* معزولة من ترب حظائر الدواجن على وسط آكار ستانير- الاملاح المعدنية مع ورقة الترشيح بعد مرور (7-14) يوماً، تبدو الاجسام الثمرية ذات اللون الاصفر متراصة ومحزومة ومرتببة على امتداد ليف السليلوز قوة التكبير 400x

المصادر

1. Reichenbach, H. Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy. In: Dworkin, M.; Kaiser, D. (Eds), Myxobacteria. American Society for Microbiology, Washington(1993).
2. Dworkin, M.. The myxobacterales In: Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A. (ed.), Handbook of microbiology, Vol.I. CRC Press, Boca Raton, FL(1977).
3. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore(1974).
4. Reichenbach, H. and Dworkin, M. The order myxobacteriales In: The prokaryotes (Starr, M.P.; Stolp. H; Truper, H.G.; Balows, A. and Schlegel, H.G., eds.). Springer-Verlag, Berlin(1982).
5. Reichenbach, H. the fruiting gliding bacteria: The myxobacteria. In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. (Holt JG, NR. Krieg, PHA Sneath, JT Staley and ST Williams, eds.), Williams and Wilkins, Baltimore(1994).
6. Alexander, M. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. Wiley International Edition. USA(1977).
7. Atlas, R.M. Principles of microbiology, 1st ed. Mosby-year Book, Inc(1995).
8. Singh, B.N. Myxobacteria in soils and composts: their distribution, number and lytic action on bacteria. J.Gen. Microbiol.1: 1-10(1947).
9. Brockman, E.R. and Boyd, W.L. Myxobacteria from soils of the Alaskan and Canadian arctic. J. Bacteriol. 86: 605-606(1963).
10. McCurdy, H.D. Studies on the taxonomy of the Myxobacteriales. I. Record of Canadian isolates and survey of methods. Can. J.Microbiol. 15: 1453-1461(1969).
11. Dworkin, M. Biology of the myxobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 20: 75-106(1966).
12. Reichenbach, H. A simple method for the purification of myxobacteria. J. Microbiol. Methods. 1: 77-79(1983).
13. Dworkin, M. Introduction to the myxobacteria. In, Prokaryotic development, edited by Y.V. Brun and L.J. Shimkets, American Society for Microbiology, Washington(2000).
14. Shimkets, L. Social and developmental biology of the myxobacteria. Microbiol. Rev. 54: 473-501(1990).

15. Stanier, R.Y. The cytophaga group: a contribution to the biology of the myxobacteria. *Bacteriol. Rev.* 6: 143-196(1942).
16. Kaiser, D. and Welch, R.. Dynamic of fruiting body morphogenesis. *J. Bacteriol.* 186(4): 919-927(2004).
17. Atlas, R.M. and Bartha, R. *Microbial ecology fundamentals and application.* 4thed. Benjamin/Cummings Science Publishing. California(1998).
18. Pronina, N.I. A description of new species and varieties of cellulose decomposing myxobacteria. *Microbiology.* 31: 384-390(1962).
19. Dawid, W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 403-427(2000)
20. Reichenbach, H. The ecology of the myxobacteria .*Environ. Microbiol.* 1:15-21(1999).
21. Nester, E.W.; Anderson, D.G.; Roberts, C.E.; Pearsall, N.N. and Nester, M.T. *Microbiology a human perspective.* 3rd ed. McGraw-Hill(2001).
22. Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. *Baily and Scott's Diagnostic Microbiology.* 11th ed. Mosby. Co: Baltimore. Philadelphia(2002).
23. Starr, MP.; H. Stolp.; HG. Truper; A. Ballows and H. Schlegel *The prokaryotes: A hand book on Habits, Isolation and Identification of Bacteria.*Springer-Verlag, Berlin(1981).
24. Li, Z.; Liu, J. and Gao, P. A simple method for the isolation of cellulolytic myxobacteria and cytophagales. *J. Microbiol. Methods.*25: 43-47(1996).
25. Fang, X. M. and Zhang, L.P. A preliminary study on ecological of myxobacteria. *Biodiv. Sci.* 9: 207-213(2001).
26. Lecianova, L.; Zakova, Z. and Novotny, V. Fruiting gliding bacteria from poultry farms. *J. Microbiol. Method.* 30: 177-181(2005).