عزل وتشخيص البكتريا المخاطية *Myxococcus xanthus* من ترب المقابر

هالة عبد الحافظ عبد الرزاق الجبوري
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

أستلم البحث في : 2013/3/12 ، قبل البحث في : 2013/5/19

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لعزل وتشخيص البكتريا المخاطية *Myxococcus xanthus* من (50) عينة تربة جمعت من ترب المقابر في النجف الأشرف واستخدمت ظروف نمو خاصة لتشجيع نموها وتثبيط نمو الاحياء المجهرية الاخرى وشملت هذه الظروف (التجفيف و تراكيز عالية من المضادات الحياتية و اوساط نمو خاصة) وأخضعت العزلات للفحوصات المظهرية والزرعية والكيموحيويه اللازمة لتشخيصها ويمكن تلخيص النتائج التي امكن الحصول عليها كمايأتي:

1. تتواجد البكتريا المخاطية فلورا طبيعية في ترب المناخ الجاف.

2. تم الحصول على (10) عزلات جسما ثمريا تعود للنوع *M. xanthus* باستخدام تقنية الاصطياد بطعم خميرة الخبز.

3. يعد الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب وخميرة الخبز ملائما لتنمية الحشد الخضري للعزلات بوصفه مزروعا نقيا.

الكلمات المفتاحية : البكتريا المخاطية ، ترب المقابر، Myxobacteria ، *Myxococcus xanthus*

المقدمة

تمتاز البكتريا المخاطية *M. xanthus* بكونها عصيات سالبة لصبغة كرام متطاولة ذات نهايات مستدقة او مستديرة ، هوائية مجبرة وعضوية التغذية chemoorganotroph [1] ،نموها بطيئ اذ يتراوح زمن الجيل مابين(4-14) ساعة،متحركة بحركة أنزلاقيةgliding على السطوح الصلبة والأوساط الزرعية بوساطة الذيول المخاطية مكونة الحشد او العجswarm [2] ،شائعة في روث الحيوانات والترب الغنية بالمواد العضوية ذي الرقم الهيدروجيني المتعادل او القاعدي [3]. تمتلك هذه البكتريا دورة حياة ترتكز على ثلاثة مظاهر، اذ تميل هذه البكتريا للبقاء مع بعضها مع بعض كمجموعة من الخلايا المتحركة فضلا عن حركتها كأفراد[4]وتكوين أجسام ثمرية متعددة الخلايا Multicellular (Fruiting bodies) عند أستنفاذ المواد الغذائية تهاجر الخلايا الخضرية على طول الذيل المخاطي وتتجمع بوساطة الانجذاب الكيميائي لتكوين أعداد هائلة من الخلايا تتطور هذه التجمعات فيما بعد الى أجسام ثمرية بألوان زاهية و مرتفعة فوق سطح الآكار ،تعاني الخلايا الخضرية المهاجرة الى أعلى الجسم الثمري تمايزا مظهريا الى السبورات المخاطية Myxospores [5] المقاومة للحرارة والجفاف والأشعاع اذ تبقى حية سنوات عدة [6]وتعد هذه البكتريا مفترسات اوقانصات صغيرة (micropredaters) لقدرتها على مهاجمة وتحلل الأحياء المجهرية سواء الحية او الميتة بسبب أنتاجها لطيف واسع من مركبات الأيض الثانوي ذي فعالية حيوية قوية [7]،كما توصف هذه البكتريا بأنها كانساتscavengers لقدرتها على تحليل الجزيئات الكبيرة ، مما يؤهلها الى ان يكون لها دور معنوي في تنظيف التربة وربما بقية البيئات[8] ولعدم توافر دراسات محلية لعزل هذه البكتريا من بيئات فريدة ،مثل ترب المقابر جاءت هذه الدراسة.

المواد وطرائق العمل

1. جمع العينات وعزل البكتريا

جمعت (50) عينة تربة وزن الواحدة بحدود (150) غراما ومن عمق (5-10) سم تحت سطح التربة من القبورالمحفورة حديثا والمنتشرة في مدينة النجف الأشرف وللمدة من أول حزيران والى نهاية ايلول 2012 مع مراعاة خلو المنطقة من الغطاء النباتي وضعت العينات داخل أوعية بلاستيكية معقمة وغير مستعملة لغرض نقلها الى المختبر ثم خزنت في الظلام بدرجة حرارة الغرفة مدة (7)أيام [1] على وفق الطريقة المشارإليها [9، 10] وكما يأتي:

2. عزل الاجسام الثمرية

أ. حضر وسط مستخلص التربة Soil extract medium من المكونات الاتية:-

1. مستخلص التربة Soil extract : تضاف (1)كغم عينة تربة (من بيئة العزل نفسها) الى (1) لتر من الماء المقطر ومزجت جيدا بقضيب زجاجي وعقمت في جهاز الموصدة مدة (10) دقائق ، رشح العالق بقمع زجاجي مزود بورقتي ترشيح وترك مدة (24) ساعة ليتخمروأضيف (10) غرام من كاربونات الكالسيوم CaCo3 ، عدل الرقم الهيدروجيني الى حد 7.0 ثم عقم بالموصدة .
2. وسط مستخلص التربة السائل Soil extract broth : حضر بوزن (1)غم كلوكوز (0.5)غرام فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين HPO_2k_4 و(0.1)غرام نترات البوتاسيوم KNO3 اذيبت جميع المكونات في (900) مليلتر من الماء المقطر عدل الرقم الهيدروجيني الى حد(6.8- 7.0)، اكمل الحجم الى (1) لتر باضافة (100) مليلتر من مستخلص التربة،ثم عقم بالموصدة .
3. وسط مستخلص التربة الصلب Soil extract agar : حضر باضافة (18) غرام من الاكار لكل لتر الى الوسط السائل أعلاه ، و (1) مليلتر من محلول صبغة البلورات البنفسجية (0.14) % عقم الوسط بالموصدة وزود بمحلول المضاد السايكلوهكسمايد cycloheximide(25) ملي غرام /لتر.

ب. تم التحري عن وجود البكتريا المخاطية في عينات التربة بتحويرالطريقة المذكورة في [9، 10] من الباحث،أذلقح الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب بعالق خميرة الخبز(7.08 غرام/30 مليلتر ماء مقطر) معقم بالموصدة كطعم لاصطياد البكتريا المخاطية بطريقة التخطيط بثلاثة اتجاهات (فرش الحصير) وبقطيلة معقمة swabs، تركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة مدة (5) دقائق،أضيفت(5)غرامات من أنموذج التربة في طبق معقم بوساطة Spatula معقمة ثم رطبت بقطرات من محلول مضاد السايكلوهكسمايد(50)ملي غرام /لتر ومزجت جيداً بحيث تكفي الكمية المضافة لتكوين عجينة ذي قوام سميك،قسمت العجينة على قطع صغيرة (Spots) ووزعت على سطح الوسط الزرعي، حضنت الاطباق في حاضنة مبردة بدرجة حرارة (20-22) م وتم تهيئة جو مشبع بالرطوبة بوضع اناء حاوي على الماء المقطر المعقم في الحاضنة طوال مدة الحضانة (2-8)أسابيع.

3. عزل الحشد الخضري

تم الحصول على الحشد الخضري بتحوير الطريقة المذكورة في [9، 10] من الباحث، باخذ اقراص بقطر (5) مليمتر بوساطة ثاقب الفلين من الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب المنمى عليه الأجسام الثمرية،ثم وضعت على سطح الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب المزود بمحلول المضاد الفانكومايسينvancomycin(40) مايكروغرام/مليلتر وبمحلول المضاد السايكلوهكسمايد(25)ملي غرام/لتر) والملقح بنشر(0.1) مليلترمن عالق خميرة الخبز(1× 106)خلية/مليلتر ،حضنت الأطباق في حاضنة مبردة بدرجة حرارة (20-22)م ومدة (2-3) أيام لاجل الحصول على مستعمرات نقية للخلايا الخضرية وباستخدام عروة معدنية معقمة اجريت نقلات عدة من حواف المستعمرات الحشديةSwarm colonies الى الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب وبظروف التنمية نفسها.

4. تشخيص البكتريا المخاطية

تمت عملية التشخيص تبعا لما ورد في [1 ، 2] وكما يأتي:

أ. فحصت الأطباق الخاصة بعزل الاجسام الثمرية ابتداء من اليوم الثالث للحضن بوساطة المجهر التشريحي بقوتي تكبير 20x و 40x لمشاهدة تكون الأجسام الثمرية.

ب. فحصت الأطباق الخاصة بتنمية الحشد الخضري ابتداء من اليوم الثاني للحضن لمشاهدة الصفات الزرعية الخاصة بالمستعمرات وأخضعت العزلات البكتيرية المخاطية للفحوصات الكيموحيوية شملت انتاج انزيم الكاتاليزوالاوكسديزوادمصاص صبغة الكونغو الحمراء وتحلل النشا والكازائين والجيلاتين واليوريا والدم والدهون توين 80 والتايروسين واستهلاك الاسكولين وأختزال النترات وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين والنمو في درجة حرارة (40)م واختبارحساسيتها لمضاد الكانامايسين kanamycin (10) مايكروغرام/قرص (بطريقة الاقراص فضلا عن اجراء الفحص المجهري المباشر تبعا لما ورد في [11].

النتائج والمناقشة

تم الحصول على (10) عزلات بكتيرية تعود للنوع *M. xanthus* من أصل (50) عينة أخذت من ترب المقابر اعتمادا على التوصيف المظهري للاجسام الثمرية والحشد الخضري العائديين للنوع نفسه واستنادا الى الصفات المذكورة في المراجع العلمية [2، 5،8]،كان لوقت جمع العينات في فصل الصيف الاثر الواضح في التخلص من الملوثات المكروبية وبقاء السبورات المخاطية بداخل الحويصلات الدقيقة microcystsحية فهي مقاومة لعامل الجفاف والحرارة.

فبعد مرور(21) يوما من بدء الحضانة ظهرت الاجسام الثمرية صفراء كروية ومرتفعة قليلا عن سطح الاكار صورة (1) تحت المجهر التشريحي بقوتي تكبير20 X و40X وهي صفة مظهرية تشخيصية تأكيدية للنوع *M. xanthus* [1] . يعد الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب المزود بخميرة الخبز وسط انتقائي لتنمية العزلات البكتيرية المخاطية فقد بدت المستعمرات النامية بهيئة الحشد او العج بلون اصفر متلاصقة ومشكلة طبقة مخاطية متحركة باتجاهات بعيدة عن منطقة الزرع مما يصعب تمييزها الى مستعمرات منفصلة قياسا ببقية المستعمرات البكتيرية بسبب انتاجها لمادة المخاط Slime رافق نمو المستعمرات مناطق تحلل واضحة حولها صورة (2)، وهي صفة مظهرية تشخيصية تاكيدية للنوع *M. xanthus* [4، 9] فضلا عن تفرد العزلات البكتيرية لهذا النوع بمقاومتها لمضاد الفانكومايسين بوصفها صفة تشخيصية تاكيدية تميزها من باقي افراد مجموعة الانزلاقيات الثمرية اذ ان إضافة هذا المضاد الى الوسط الزرعي مستخلص التربة كان على درجة من الاهمية بوصفها خطوة تنقية اذ ادى الى تقليص اكبر عدد ممكن من البكتريا المنافسة والملوثة التي رافقت نمو الاجسام الثمرية لاسيما البكتريا المكونة للأبواغ Streptomyces،Bacillus في الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب كما ابدى الفحص المجهري المباشر كونها عصيات سالبة مستدقة النهايات منفردة او متجمعة.[12]

اكدت نتائج الدراسة الحالية ان استخدام تقنية الاصطياد تعد طريقة كفوءة للحصول على الاجسام الثمرية و الحشد الخضري اذ تضمنت هذه التقنية خطوتي العزل والتنقية في آن واحد ،اذ مثل الأصطياد الأول الاجسام الثمرية المنبثقة على سطح الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب الملقح بخميرة الخبزالمقتولة بالحرارة ، بينما مثل الأصطياد الثاني الحشد الخضري المنبثق من أنبات الأبواغ المخاطية على الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب الملقح بخميرة الخبز الحية، تعد هذه التقنية اقتصادية بأعتبار الوسط الزرعي مستخلص التربة وخميرة الخبز مصدر تغذوي طبيعي مشابه الى بيئة البكتريا الانزلاقية الثمرية الا وهي التربة وما تحويه من المغذيات التي تحفز على تكوين الاجسام الثمرية والحشد الخضري المميزين مما يسهل عملية التشخيص[10]

تبين من نتائج الفحوصات الكيموحيوية التاكيدية لتشخيص العزلات البكتيرية المخاطية في جدول(1) بانها تعود للنوع *M. xanthus* بكونها سالبة لاختبار الاوكسيديز وموجبة لاختبار الكاتاليز وقد ابدت جميع العزلات قابليتها على ادمصاص صبغة الكونغو الحمراء على سطح المستعمرات النامية وتحليل النشا بعد مرور (10) أيام والكازائين والجيلاتين والدهون توين 80والتايروسين، في حين كانت جميع العزلات البكتيرية غير قادرة على تحليل الدم واليوريا وانتاج غاز

كبريتيد الهيدروجين واختزال النترات واستهلاك الاسكولين والنمو في درجة حرارة (40)م وكانت جميع العزلات حساسة لمضاد الكانامايسين. [11 ، 13]

تصنف ترب المقابر ضمن ترب المناخ الجاف على الرغم من ذلك فهي توفر ظروفا جيدة لنمو أنواع الأحياء المجهرية المكونة للأبواغ لاسيما البكتريا المخاطية لاحتواء هذه الترب على المواد العضوية المختلفة التي مصدرها الجثث المتحللة، اذ تتواجد هكذا أحياء بهيئة حويصلات دقيقة اوسبورات مخاطية [3 ، 9]

كان لتنمية عزلات النوع *M. xanthus* عند درجة حرارة (20- 22) مْ دور فعال في الحد من نمو الملوثات البكتيرية لاسيما الممرضات التي تحتاج لكي تنمو الى درجات حرارية أعلى تتراوح مابين(35-37) مْ 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 المخاطية لفقدان الاجسام الثمرية المتطورة من خلية مفردة في التخافيف العليا، وفي التخافيف الأولى يلاحظ أن الملوثات و في الاغلب تجد وقتاً كافياً لتنتشر على سطح الاكار ما بين المستعمرات الناشئة التي تعود للبكتريا المخاطية التي تحتاج للقاح كثيف لتنمو على طبق عزل الاجسام الثمرية.[2 ، 12]

تمتازعزلات بكتريا *M.* xanthus بقدرتها لتحليل مختلف المركبات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة لقابليتها على انتاج مختلف الانزيماتcell wall lytic enzymes، lipases، proteases، nucleases كما تستطيع النمو بصورة جيدة في اوساط تضم انواع اخرى من الاحياء المجهرية سواء الحية ام الميتة، كذلك النمو في اوساط تحوي البروتينات كالكازائين ،او مزيج الاحماض الامينية مثل الميثونين methionine ،واللوسينleucine ،والايزلوسين isoleucine لاسيما وسط مستخلص التربة كمصادر كاربون ونتروجين و تتحمل تراكيز عالية نسبيا من املاح الكالسيوم والمغنسيوم الذي يفسر ظاهرة وجود هذا النوع من البكتريا بكميات كبيرة في ترب المناخ الجافهذا ما اكدته العديد من البحوث [6 ،8،14، 15]

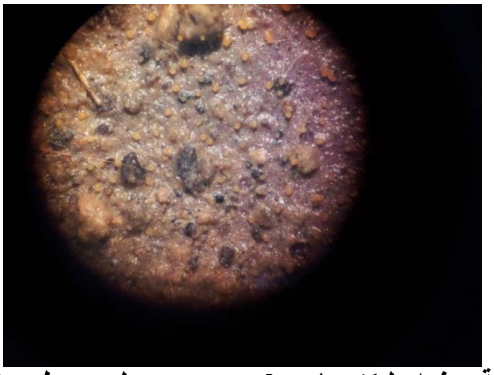
جاءت هذه النتائج متفقة مع[16] في دراسته التي اجراها لاجل الحصول على عزلات نقية للجنس Myxococcus اذ تمكن من عزل وتنقية (74) عزلة تعود للنوع*M. xanthus* من اصل (100) عينة تربة جمعت من ترب المدافن اذ استخدم الوسط الزرعي مستخلص التربة الصلب المزود بخميرة الخبز المشابه الى بيئة البكتريا المخاطية الا وهي التربة وما تحويه من خليط غني من الاحياء المجهرية الحية والميتة فضلا عما توفره من مواد عضوية متحللة عند كل المستويات .

جاءت هذه النتائج متماشية مع ما توصل اليه [17]في دراسته التي أجراها على صحراء المكسيك التي تستقبل أمطار موسمية قليلة ،اذ أستطاع عزل أنواع مختلفة من البكتريا المخاطية لاسيما النوع *M. xanthus* من (57)عينة تربة جمعت من أماكن جافة جدا وتفتقر للخضرة،وبهذا فهي شائعة كفلورامايكروبية في هكذا بيئات بهيئة خلايا ساكنة وعند توفر المواد الغذائية وظروف النمو مثل الرطوبة تنشط وتنبت الى خلايا خضرية ذي فعاليات بايولوجية.

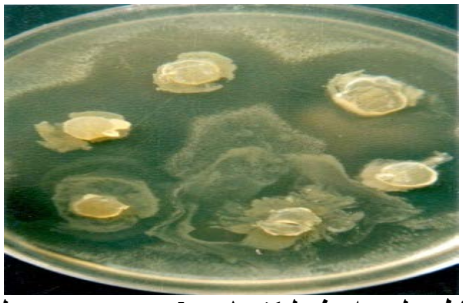
المصادر

1. Reichenbach ،H ؛ .Lawrence,J.S.andDworkin,M (2006). .The myxobacteria. In:The prokaryotes) ،Balows A ؛.Truper ، H.G ؛.Dworkin,M.;Harder ،W.andKHschleifer ، K.H،.eds ،(.Springer Verlag2 ،nded. V I I ، New York.
2. Reichenbach,H.andDworkin,M.(2010)Themyxobacteria.In:The prokaryotes, ,(Balows,A., Truper,H.G.;Dworkin,M.;Harder,W.and KH Schleifer , K.H.,eds.)Springer Verlag, 3thed., IV ,New York,pp885
3. Fang, X. M. and Zhang, L.P. .(2001) A preliminary study on ecological ofmyxobacteria. Biodiv. Sci. 9: 207-213
4. Coucke,P. (2003)Morphology and morphogenesis of Myxobacteriaceae. J.Appl.Bact.18:506-610
5. Kaiser , D.andWelch,R. (2004) Dynamic of fruiting body morphogenesis. J.Bacteriol.186(4):919-927
6. Dworkin , M.(2002). Recent advance in the social and developmental biology of themyxobacteria. Microbiol. Rev..70(1):90-123
7. Reichenbach, H. .(2001)Myxobacteria ,producers of novel bioactive substances .J.Ind. Microbiol. Biotechnol.27:149-156
8. Dawid,W.(2000) .Biology and global distribution of myxobacteia in soils . FEMS Microbiol Rev.24:403-427
9. Sunga,GN.; Kadam, S. Karwowski , Jp and Mcalpine, JB. (2009)Isolation of *Myxococcus xanthus* from Yard soil . J.of Ind. Microbiol.13:930 – 936
10. Larkin, E.R. (2008) Myxobacters from grave soil.Appl. Environ. Microbiol. 72 (1): 4642-4644.

11. Forbes,B.A.;Sahm,D.F.and eissfeld,A.S. (2002)BailyandScott's Diagnostic Microbiology, Mosby Co:Baltimore,1th ed.,Philadelphia, pp753
12. Shean,J.M. (2005)Isolation and diagnosis of Myxobacteria as pure culture.Can J Microbial 32:1-4.
13. Holt., J.G.; Krieg, N.R.; Sreath, P.H.A.; Staley, J.T. and Nilliams, S.T. .(2010) Bergey's manual of determinative bacteriology, 3th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA
14. McDonald,J.(2000)Studies on the genus Myxococcus(Myxococcales). Nature57:737-747
15. Reichenbach,H. (2000)Biology and chemistry of microbial compounds, Scientific Annual Report , 1st ed., Braunschweig,pp1559
16. Novotny, V.;Lecianova, L. and Zakova, Z.(2012)Fruitinggliding bacteria from burial ground. J. Microbiol. Method. 10: 577-581
17. Evenson,A.(2013)Gliding bacteria from Mexican desert. SoilSci. Soc. Am. Press. 37(1):808-809



صورة رقم (1) أجسام ثمرية كروية صفراء لبكتيريا *M. xanthus* على وسط مستخلص التربة الصلب وخميرة الخبز المقتولة بالحرارة بعد حضانة (21) يوما قوة تكبير40 x



صورة رقم (2) حشد خضري مخاطي بلون اصفر لبكتريا *M. xanthus* حوله مناطق تحلل واضحة على وسط مستخلص التربة الصلب وخميرة الخبز الحية بعد حضانة (3) أيام

جدول رقم (1) الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية لعزلات بكتريا *M. xanthus*

رقم العزلة	الجسم الثمري كروي أصفر مرتفع	الحشد الخضري أصفر مخاطي	سالبة لصبغة كرام عصوية مستقة	طبيعة التغذية تحلل الخلايا	الأوكسيديز	الكتاليز	أمصاص صبغة الكونغو الحمراء	تحلل النشا10يوم	تحلل الكازائين	تحلل الجيلاتين	استخدام توين 80	تفكيك التايروسين	تحلل الدم	اليوريز	انتاج غاز H_2S	أختزال النترات	استهلاك الأسكيولين	النمو بدرجة حرارة40م	المقاومة للكانامايسين
1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
7	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
10	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S

(+)نتيجة موجبة للفحص ، (-) نتيجة سالبة للفحص ، (S) حساسة للمضاد الحياتي

Isolation and Identification of the *(Myxococcus xanthus)* Myxobacterium from the Grave Soil

Halah A.H. Al-Jebori Halah
Department of Biology / College of Science / Al-Mustansiryah University

Received in : 12/3/2013 , Accepted in : 19/5/2013

Abstract

The study was performed to isolate and identify the *Myxococcus xanthus* from (50) samples of grave soils .Special growth conditions had been used to support the growth of *M. xanthus* and to suppressed the growth of other microorganisms like (Drying , High concentration of antibiotics and specific growth media) *M. .xanthus* isolates had been subjected to the morphological, cultural and biochemical examinations for identification . Results obtaind could be summarized as follows:

1. Myxobacteria were found as normal flora inhabitants of the arid soils.
2. Ten local isplates of *M. xanthus* out of (50) soil samples were isolated as fruiting bodies depending on baiting technique by baker ' s yeast.
3. Soil extract agar with baker 's yeast was suitable for obtaining the best growth of vegetative swarms as pure culture

Keywords : Myxobacterium , grave soil ، *Myxococcus xanthus* .