عزل وتشخيص البكتريا الانزلاقية الثمرية المحللة للسليلوز بأستعمال سعف النخيل

هالة عبد الحافظ عبد الرزاق

محمد عباس عبد الحسين

الجامعة المستنصرية /كلية العلوم

الخلاصة

عزلت البكتريا الانزلاقية الثمرية المحللة للسليلوزمن عينات تربة طينية مسمدة بأسمدة عضوية منتشرة في اماكن مختلفة بمدينة بغداد باستعمال سعف النخيل كمادة خام لأصطياد الأجسام الثمرية وتحضير وسط زرعي محلي من المخلف السليلوزي لسعف النخيل لعزل الحشد الخضري ، وقداظهرت نتائج البحث الحصول على 10 عزلات تعود للمجموعة من اصل 25 عينة تربة اعتماداً على التوصيف المظهري للاجسام الثمرية والحشد الخضري .

المقدمة

تتواجد مجموعة البكتريا الانزلاقية الثمرية Fruiting gliding bacteria بشكل طبيعي في التربة مستغلة المواد العضوية فيها كمغذيات طبيعية ، فضلاً عن مهاجمتها وتحليلها الاحياء المجهرية الاخرى سواءً الحية منها أم الميتة ، مؤدية دوراً رئيساً في تدوير المواد العضوية في النظام البيئي للتربة ، و تمتاز مستعمراتها بظاهرة الحشد Swarming لقدرتها على الحركة الانزلاقية Gliding او الزاحفة Creeping على السطوح الصلبة [1] أذ يتميز الحشُد الثمري Fruiting swarm بكثافته وبتعدد الوانه الزاهية [2] ، للعديد من أجناسه القدرة على تحليل الكايتين واستهلاك مدى واسع من المركبات العضوية ، وتعد هذه البكتريا غير ممرضة سواء للانسان أم للحيوانات والنباتات المختلفة [3] ، كما و تكوّن عند ظروف التجويع الاجسام الثمرية Fruiting bodiesالحاوية على الابواغ المخاطية Myxospores خلال دورة حياة معقدة [4] ، و

تفضل التربة كمصدر رئيس لعزل معظم أنواعها ولا سيما المحللة للسليلوز [5] ، والذي يعد البوليمر الحيوي الأكثر وفرة في الطبيعة والمنتج من عمليات البناء الضوئي في النبات والمنتج بكمية 10^{10} طن سنويا فهو المركب الأساسي في الخلايا النباتية كسكر عديد على هيئة ألياف اومخلفات نباتية ،أذ تستعمل الكتلة الحيوية للنباتات عالية السليلوز كمصادر مهمة في إنتاج الوقود و الاغذية الحيوانية و تصنيع العديد من المواد الكيميائية المهمة كصناعة الورق واللدائن والمنسوجات النباتية والمتفجرات عالية القدرة [6].يتميز العراق بوفرة المواد السليلوزية الخام من المخلفات الزراعية مباشرة المتمثلة بسعف النخيل وكوالح الذرة وغابات القصب والبردي أوالمخلفات الزراعية الصناعية غير مباشرة ككسبه البذور الزيتية ومخلفات صناعة الدبس ومعامل الورق التي استعملت كوسط زرعي فضلاعن الاوساط الجاهزة[7] . إن تحويل كتلة السليلوز الحيوية الى سكريات بسيطة بطرائق التخمير باستعمال إنزيمات التحلل السليلوزي المشتقة من الإحياء المجهرية القادرة على التحلل السليلوزي من المقترحات المهمة لإنتاج الوقودالبديل الايثانول [8] ونظراً لقلة الدراسات المتوفرة حول عزل البكترياالأنزلاقية المحللة للسليلوز بأعتبارها واحدا من أهم الأنواع الكانسة والمحللة للمواد العضوية [9]لأجل التخلص من التلوث البيئي السليلوزي جاء هذا البحث.

المواد وطرائق العمل

1-تحضير مسحوق سعف النخيل:

تم غسل سعف النخيل بالماء ولعدة مرات لإزالة الأتربة والأوساخ ثم قطعت العينات إلى قطع صغيرة وجففت بفرن كهربائي بدرجة حرارة70م ولمدة 48 ساعة، طحنت بطاحونة يدوية وأعيد طحنها بطاحونة كهربائية ثم نخلت عبر المنخل لتحضيرمسحوق ناعم بهدف زيادة المساحة السطحية للتحلل ،عوملت المواد السليلوزية بوضع100غم من مسحوق المادة الخام في دورق سعة 2 لترثم يضاف 1.5 لتر ماء مقطر ومحلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز4 % ثم وضع المزيج في حمام مائي مغلي ولمدة 15 دقيقة مع التحريك المستمرورشح المزيج بورق ترشيح نوع (Whatman 4). ثم غسل النموذج المترسب على ورقة الترشيح بماء محمض بحامض الهيدروكلوريك ثم غسل بالماء المقطر وجفف بدرجة حرارة 70م ولمدة 48 ساعة ثم سحق من جديد[10] .

2-جمع عينات التربة :

جمعت 25 عينة تربة – وزن الواحدة بحدود 150 غراماً ومن عمق 10الى15 سم تحت سطح التربة – من ترب طينية مسمدة عضويا والمنتشرة في مدينة بغداد الغنية بأشجار النخيل للفترة ما بين أول أذار ونهاية مايس 2014 ، وضعت العينات داخل أكياس نايلون معقمة ونقلت الى المختبر[11] .

3- عزل وتشخيص البكتريا:

أ-أستعمل سعف النخيل كطعم لأصطياد الأجسام الثمرية وفق ما أشار اليه [12] وكما يلي:

عقمت قطع صغيرة من سعف النخيل بمحلول كلوريد الزئبق $HgCl_2$بتركيز1% لمدة دقيقة واحدة وتركت لتجف بالهواء ، لوثت قطع سعف النخيل بعينة التربة ووضعت داخل وعاء زجاجي نظيف ومعقم ثم حضن الوعاء في حاضنة بدرجة حرارة 28م ولمدة 7الى21 يوم وفي جو مشبع بالرطوبة وذلك بوضع اناء حاو على الماء المقطر المعقم في الحاضنة طيلة مدة الحضانة. فحصت الأطباق ابتداء من اليوم الثالث للحضن بوساطة المجهر التشريحي بقوتي التكبيرx40 لأجل ملاحظة ظهورالأجسام الثمرية .اعتمد تشخيص الأنزلاقيات على التوصيف المظهري للجسم الثمري ولونه وحجمه وطريقة ترتيبه او تجمعه وفق المصادر العلمية [13- 16]

ب- اجري عزل الحشد الخضري بتحوير الطريقة التي بينها [17]وكالاتي :

1- وسط الأملاح المعدنية الصلب Mineral Salts Agar المحضر من المكونات الاتية:

0.75 غم نترات البوتاسيوم و0.75 غم فوسفات ثنائي البوتاسيوم و 0.2 غم كبريتات المغنسيوم المائية و 0.2 غم كلوريد الحديديك و 0.1 غم كلوريد الكالسيوم المائي ، اذيبت المواد الآنفة الذكر في لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ثم اضيف 20 غرام اكار و1 مللتر/1000مللتر من محلول صبغة البلورات البنفسجية 0.14 % تم أضافة مسحوق سعف النخيل 20غم/لترالى الوسط الزرعي ، وتم معادلة ال PHلحد 7 ، عقمت في جهاز الاوتوكليف ثم تبريدها في درجة حرارة الغرفة وصبها في الاطباق البلاستيكية .

2- وضع 5 غم من نموذج التربة المحضرة في طبق معقم بوساطة Spatula معقمة ثم رطبت بقطرات من محلولي مضاد السايكلوهكسمايد المحضر بتركيز نهائي 50 مايكروغرام/مللتر ماء مقطر ومضاد الكانامايسين بتركيز100مليغرام/مللتر ، ومزجت جيداً بحيث تكفي الكمية المضافة لتكوين عجينة ذات قوام سميك.

3- قسمت العجينة الى قطع صغيرة Spots وزعت على سطح الوسط الزرعي.

4- حضنت الاطباق في حاضنة بدرجة حرارة 28 م ولمدة 7 أيام وفي جو مشبع بالرطوبة وذلك بوضع اناء حاو على الماء المقطر المعقم في الحاضنة طيلة مدة الحضانة.

5- ابتداء من اليوم الثالث للحضن يجرى فحص الاطباق لاجل مشاهدة ظهور الحشد الخضري وبعد مرور21 يوماً و بوساطة المجهر التشريحي بقوة التكبير40x يجري فحص الأطباق نفسها لمشاهدة ظهورالاجسام الثمرية.

النتائج والمناقشة

اكدت نتائج الدراسة الحالية ان استعمال تقنية الاصطياد بسعف النخيل تعد طريقة كفوءة للحصول على الاجسام الثمرية ، فعند فحص الاطباق بأستعمال المجهر التشريحي بقوة التكبير 40x و بعد مرور14 يوماً ، أذ ظهرت الأجسام الثمرية بشكل تجمعات كروية ملونة بألوان مختلفة البرتقالي والأصفر والأحمر والبني مرتفعة عن سطح سعفة النخيل شكل(1) . شخصت 10 عزلات كجسم ثمري تعود للبكتريا الأنزلاقية الثمرية المحللة للسليلوز من25 عينة ترب طينية مسمدة عضويا ، اذ اثبتت الطريقة المحورة كفاءتها في انجاح العزل ، لوحظ الحشد الخضري بهيئة طبقة مخاطية كثيفة مستمرة داكنة اللون ومنبثقة من حبة التراب كما في شكل (2) . ورافق أنتشار الحشد الخضري على سطح الآكار ظهور مناطق شفافة دالة على تحلل السليلوز وهذا ضمن الخواص العامة لنوع البكتريا الأنزلاقية النامية على الاوساط الزرعية الصلبة يعد الوسط الزرعي الأملاح المعدنية والمخلف السليلوزي لسعف النخيل وسط انتقائي لتنمية العزلات البكتيرية الأنزلاقية فقد بدت المستعمرات النامية بهيئة الحشد او العج بلون غامق 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 أذ تدعى أحيانا بالبكتريا المخاطية، رافق نمو المستعمرات مناطق تحلل واضحة حولها ،

وهي صفة مظهرية تشخيصية تاكيدية للأنزلاقية [18] فضلا عن تفرد العزلات البكتيرية لهذا النوع بمقاومتها لمضاد الكانامايسين بوصفها صفة تشخيصية تاكيدية تميزها من باقي افراد مجموعة الانزلاقيات الثمرية الغير محللة للسليلوز اذ ان إضافة هذا المضاد الى الوسط الزرعي الأملاح المعدنية والمخلف السليلوزي لسعف النخيل 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 نفسه ، وعند فحص الاطباق بأستعمال المجهر التشريحي بقوة التكبير 100x بعد مرور21 يوماً ظهرت الأجسام الثمرية و ثبت انها تعود للمجموعة الأنزلاقية شكل(3)وحسبما اشارت المراجع العلمية[19–21].

توفر التربة ظروفا جيدة لنموأنواع الأحياء المجهرية المحللة للسليلوز لا سيما البكتريا الانزلاقية لاحتوائها على المواد العضوية المختلفة ومنها المواد النباتية والمكونة أساسا من مادة السليلوز [22]،تركت العينات لتجف بالهواء ولمدة تراوحت ما بين 4الى6اسابيع 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 [23] . كان لتنمية عزلات عند درجة حرارة 28م دور فعّال في الحد من نمو الملوثات البكتيرية و خصوصا الممرضات التي تحتاج لكي تنمو الى درجات حرارية أعلى تتراوح مابين 35الى37 م [24] .

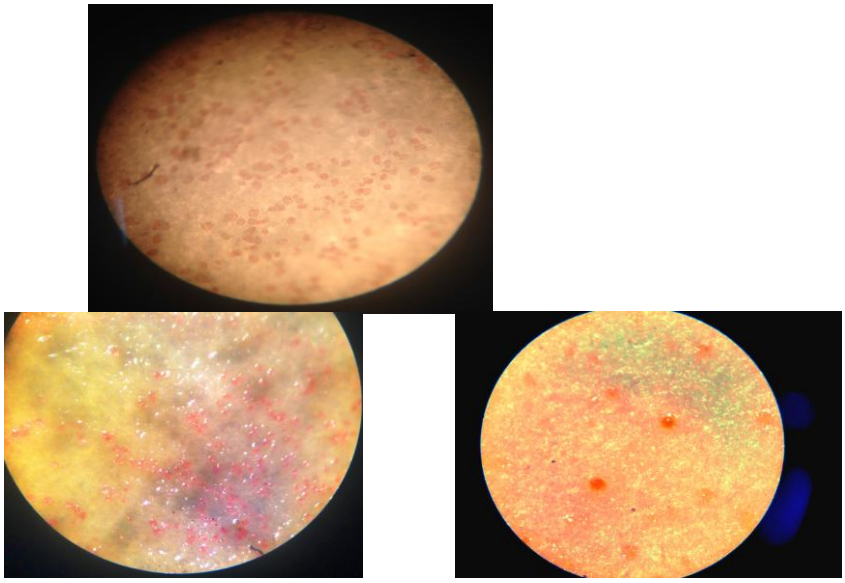
لوحظ ان استعمال عجينة سميكة من التربة لأجل العزل يوفر فرصة اكبر للنمو والتكاثر وتكوين الاجسام الثمرية من دون اللجوء الى طريقة التخافيف التي لاتجدي نفعا مع البكتريا الانزلاقية لفقدان الاجسام الثمرية المتطورة من خلية مفردة في التخافيف العليا، وفي التخافيف الأولى يلاحظ أن الملوثات و على الاغلب تجد وقتاً كافياً لتنتشر على سطح الاكار ما بين المستعمرات الناشئة والتي تعود للبكتريا الانزلاقية المحللة للسليلوز التي تحتاج للقاح كثيف لتنمو على طبق عزل الاجسام الثمرية ، هذا وتعد اوساط الاملاح المعدنية المزودة بالمخلفات السليلوزية بمثابة اوساط غذائية مثالية لأجل العزل [25] .

أوضحت النتائج ان تقنية الأصطياد مماثلة لما لاحظ كل من [26 , 27] في الدراسة التي اجريت لعزل الاجسام الثمرية للبكتريا الانزلاقية والتي تعود لعائلة Polyangiaceae اذ أستعمل الطريقة نفسها بأضافة المخلفات السليلوزية كمصدر وحيد للكاربون الى وسط الأملاح المعدنية الصلب بمثابة الاصطياد للبكتريا الانزلاقية خصوصاً المحللة للسليلوز عن طريق تكوين اجسام ثمرية صغيرة محزومة بقوة ، كما ان هذا الوسط الزرعي يسمح بنمو انواع كثيرة من الاحياء المجهرية كالفطريات لذلك يضاف محلول المضاد الحياتي السايكلوهكسمايد بتركيز40 :1 الى الوسط الزرعي لاجل منع النمو. أستخدمت نفس التقنية من قبل [28] حين عزل الاجسام الثمرية للبكتريا الانزلاقية المحللة للسليلوز من ترب مسمدة بالسماد العضوي خلال فصل الصيف أذ تمكن من عزل 30 عزلة تعود للمجموعة الأنزلاقية من 76 عينة تربة جمعت تحت ظروف معقمة و ذلك بعد مرور3 اسابيع عند درجة حرارة حضن تراوحت ما بين 24الى26 م في حين تدنى عدد العزلات جمعت خلال فصل الشتاء من عينات التربة نفسها ، وعلل ذلك الى ان عامل الجفاف يلعب دوراً مهماً في التخلص من المواد ذات الوزن الجزيئي الواطىء الموجودة في الأسمدة العضوية والتي تعمل على تثبيط انبات الابواغ المخاطية.

وقد جاءت نتائج البحث متفقة مع ما توصل اليه [29] في دراسة اجريت لاجل الحصول على عزلات بكتريا الانزلاقية بأستعمال تقنية الاصطياد ملاحظين أزدياد اعداد البكتريا في الأطباق التي يدس لها المخلفات السليلوزية فهو طعم طبيعي .

شكل(1): اجسام ثمرية للمجموعة الأنزلاقية على ورقة سعف النخيل معزولة من تربة مسمدة بعد مرور14 يوماً، يبدو الحشد الثمري المتراص بالألوان البرتقالي و الأحمر و البني والأصفر قوة التكبير 40x

شكل (2): الحشد الخضري المخاطي البني للبكتريا الأنزلاقية على وسط الاملاح المعدنية والمخلف السليلوزي لسعف النخيل بعد مرور 7 أيام



شكل(3): الأجسام الثمرية للمجموعة الأنزلاقية على وسط الأملاح المعدنية و المخلف السليلوزي لسعف النخيل تحت المجهر التشريحي بقوة تكبير 100X بعد مرور21 يوماً

المصادر

1- Reichenbach, H. Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy. In: Dworkin, M.; Kaiser, D. (Eds), Myxobacteria. American Society for Microbiology, Washington,(2010).

2- Dworkin, M. The myxobacterales In: Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A. (ed.), Handbook of microbiology, Vol.I. CRC Press, Boca Raton, FL,(2012).

3- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore,(2006).

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,(2015).

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,(2006)

.

6- Alexander, M. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. Wiley International Edition. USA,(1977).

7- علي ، هالة محمد ذكي .الاستفادة من بعض المخلفات الزراعية لإنتاج أنزيم السليليز أطروحة دكتوراه – قسم علوم الأغذية – جامعة القاهرة (2002)

8- Atlas, R.M. Principles of microbiology, 1st ed. Mosby-year Book, Inc,(1995).

9- Fang, X. M. and Zhang, L.P. A preliminary study on ecological of myxobacteria. Biodiv. Sci. 9: 207-213,(2001).

10-Han, Y.W. and Callihan, C. D.(1974).Cellulose fermentation ,effect of substrate pretreatment on microbial growth.Appl microbiol. 27: 159-165.

11-Singh, B.N. Myxobacteria in soils and composts: their distribution, number and lytic action on bacteria. J.Gen. Microbiol.1: 1-10,(1947).

12- Mcalpine, JB. Myxobacteria from soils of the big gardens .J. Bacteriol. 87: 100106,(2011).

13- 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).

14- Dworkin, M. Biology of the myxobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 20: 75-106,(1966).
15- Reichenbach, H. A simple method for the purification of myxobacteria. J. Microbiol. Methods. 1: 77-79,(1983).
16- Rose,S.;Eliott,E.T.Soil Biology.2nded. McGraw-Hill,(2013).
17- Shimkets, L. Social and developmental biology of the myxobacteria. Microbiol. Rev. 54: 473-501,(1990).
18-Dworkin, M. Introduction to the myxobacteria. In, Prokaryotic development, edited by Y.V. Brun and L.J. Shimkets, American Society for Microbiology, Washington,(2014).
19- 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).
20- Kaiser, D. and Welch, R. Dynamic of fruiting body morphogenesis. J. Bacteriol. 186(4): 919-927,(2004).
21- Atlas, R.M. and Bartha, R. Microbial ecology fundamentals and application. 4thed. Benjamin/Cummings Science Publishing. California,(1998).
22- Stanier, R.Y. The cytophaga group: a contribution to the biology of the myxobacteria. Bacteriol. Rev. 6: 143-196,(1942).
23- Reichenbach, H. The ecology of the myxobacteria .Environ. Microbiol. 1:15-21,(1999).
24- 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).
25- Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. Mosby. Co: Baltimore. Philadelphia,(2002).
26- Dawid, W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. FEMS Microbiol. Rev. 24: 403-427,(2000).
27-Pronina, N.I. A description of new species and varieties of cellulose decomposing myxobacteria Microbiology. 31: 384-390,(1962).
28- Li, Z.; Liu, J. and Gao, P. A simple method for the isolation of cellulolytic myxobacteia and cytophagales. J. Microbiol. Methods.25: 43-47,(1996).
29- Lecianova, L.; Zakova, Z. and Novotny, V. Fruiting gliding bacteria from poultry farms. J. Microbiol. Method. 30: 177-181,(2005).

Isolation and identification of fruiting gliding cellolulytic bacteria by Date palm

ABSTRACT

The fruiting gliding bacteria have been isolated from compost soil samples collected from different regions of Baghdad using date palm leaves as raw material for baiting fruiting bodies and prepare locale media agar from cellulose waste of date palm to isolate vegetative swarms .The results showed that 10 isolates were obtained from 25 soil samples based on the morphological characteristics of the fruiting bodies and vegetative swarms.