عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus subtilis* متحملة التراكيز العالية من المعادن الثقيلة

محمد احمد طه **د. الهام اسماعيل الشمري**

المستخلص

تم الحصول على 55 عزلة بكتيرية من الغربلة النوعية للعزلات المستحصل عليها، اخضعت جميعها للغربلة الكمية للحصول على عزلتين بكتيريتين الاولى من نموذج الحي الصناعي تميزت بسرعة نموها على الوسط المغذي الصلب الحاوي على الحديد والنحاس والكادميوم والزنك والرصاص والنيكل بتركيز400 ملغم/ لتر كلا على انفراد في حين تميزت العزلة الثانية المستحصل عليها من مصفى الدورة بسرعة نموها على الوسط المغذي الصلب الحاوي على معدن الكروم وبالتركيز نفسه ، وقد شخصت العزلتين بالاعتماد على صفات المستعمرات المظهرية والمجهرية عند تنميتها على الوسط المغذي الصلب وشخصت العزلتين بجهاز VITEK فضلا عن الفحوصات الكيموحيوية كخطوة تكميلية لتشخيص العزلتين لبكتريا *Bacillus* ، وقد اظهرت العزلتين مقاومتها للمضادات الحيوية Penicillin، Tetracycline، Ampcillin ، Methicillin و Chloramphenicol وبالتراكيز mcg10 ، mcg10 ، mcg10 ، mcg5 ، mcg30 على التوالي ، واظهرت العزلتين قدرة عالية للنمو في درجات الحرارة العالية من 50مْ الى 60مْ بلغ التركيز المتحمل الاعلى للعزلة1 *Bacillus subtilis* بين 800 الى 2000 ملغم/ لتر للعناصر المعدنية النحاس والرصاص والزنك والكادميوم والحديد والنيكل على التوالي ، في حين بلغ التركيز المتحمل الاعلى للكروم 2000 ملغم/لتر.

المقدمة

تعد العناصر المعدنية الثقيلة النزرة من أكثر الملوثات البيئة المائية ضررا لتأثيرها المباشر على نمو وتواجد الأحياء المائية، اذ ان تلوث المياه بهذه العناصر يعد من المشاكل الكبيرة في جميع أنحاء العالم ، بسبب تراكمها في المياه والتربة وفي داخل انسجة الأحياء المائية اذ تؤثر بصورة مباشرة على مجمل الفعاليات الحيوية التي تقوم بها معظم الكائنات الحية (Larry,2006).وتختلف العناصر النزرة في مستوى جاهزيتها الحيوية وسميتها (Tokalioglu,2000).

وقد اشارت الخفاجي (2008)الى ان التنوع الحيوي ضروري لمعالجة التلوث البيئي لضمان وجود اليات متعددة في المعالجة، اذ تعمل الاحياء المجهرية بشكل تأزي للوصول الى افضل النتائج، فضلا عن ما تمتلكه هذه الاحياء من مرونة عالية في التأقلم مع البيئة التي تعيش فيها وان تطور امكانية الاحياء المجهرية لأستعمال المواد الدخيلة كمصادر للكاربون من خلال استعانتها بشبكة من الانزيمات والمسارات الحيوية التي تساعدها في تكسير المواد العضوية الى مركبات وسطية يمكن استعمالها في عملياتها الايضية ، فضلا عن امكانية استعمال المعادن الثقيلة لانتاج الطاقة من خلال دورات الاكسدة والاختزال.

اذ تمتلك غالبية الكائنات الحية بما فيها النباتات المائية والطحالب و البكتريا والفطريات قدرة على تحمل وتراكم المعادن الثقيلة, اذ أثبتت الأحياء المجهرية ومنها البكتريا قدرتها على تحمل تراكيز مختلفة من المعادن الثقيلة بآليات متنوعة مثل عملية التراكم الحيويBioaccumulation (Majare and Bulow,2001) والأدمصاص الفيزيائي Physical adsorption أو تكوين المعقدات الكيميائية Complexation Chemical من خلال المجاميع الفعالة للاحماض الامينية والاحماض الكاربوكسيلية المتواجدة على سطح الخلية البكتيرية وكذلك يمكن ان ترتبط أيونات المعادن الموجبة الشحنة مع الشحنات السالبة المتواجدة على سطح الخلية , إذ تعمل كمواقع ارتباط فعالة لحماية نفسها من التأثيرات السمية(Silver and Phung,1996;Little et al, 1997).

وعليه **هدفت الدراسة الى عزل وتشخيص بكتريا** *Bacillus Subtilis*. تتميز بقدرة عالية في ازالة المعادن الثقيلة، ودراسة حساسيتها لبعض من المضادات الحيوية وتحديد التركيز الاعلى المتحمل من المعادن الثقيلة.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات:

جمعت عينات العزل من اماكن مختلفة من محافظة بغداد شملت تربة ومياه شركة مصافي الوسط (مصفى الدورة) وتربة ومياه وحدة الطاقة الكهربائية /الدورة وتربة معمل بطاريات النور /ابوغريب .ومياه الشركة العامة للالبان / ابو غريب ومياه معمل البان كلية الزراعة / جامعة بغداد وتربة الحي الصناعي وتربة ومياه شركة ذات الصواري للأحبار، وجمعت العينات في قناني زجاجية داكنة نظيفة ومعقمة ولاتحوي على اي نوع من المواد الكيميائية وبواقع مكررين وبعدها وضعت في الثلاجة بدرجة 4 مْ

تقدير تركيز المعادن الثقيلة من مصادر العزل:

قدر مستوى تلوث العينات بالمعادن الثقيله والمأخوذه من مصادر العزل المختلفة بوساطة مطياف الامتصاص الذري AA-7000Shimadzu حسب الطريقة المذكورة من قبل خماس (2008) .

العزل:

اختيرت النماذج من مصادر العزل والتي اعطت اعلى تركيز من المعادن الثقيلة بعد فحصها بجهاز مطياف الإمتصاص الذري والتي شملت النماذج المأخوذة من الحي الصناعي ومصفى الدورة لأستعمالها في عملية العزل .

اجريت عملية العزل للنماذج الماخوذة من الحي الصناعي ومصفى الدورة والحاوية على اعلى تركيز من المعادن الثقيلة قيد الدراسة بوزن 10غم تربة من كل نموذج واضافته الى قناني التخفيف كلا على انفراد ووضعت القناني في حمام مائي بدرجة حرارة 90م لمدة 10 دقائق ،اكملت بعد ذلك التخافيف العشرية لحين الوصول الى تخفيف 10^6 و.م.م/مل،اجريت عملية الزرع بأستعمال طريقة صب الاطباق كما ورد في (Harrigan,1976) وبأستعمال الوسط المغذي الصلب وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م مدة 48 ساعة واجريت عملية التنقية بأعادة عملية الزرع للمستعمرات المنفردة النامية بطريقة التخطيط Streaking method على الوسط المغذي الصلب وتم حفظ العزلات النقية.

الغربلة النوعية للعزلات:-

حضر المحلول الخزين لاملاح المعادن الثقيلة والتي شملت نترات الرصاص وكلوريد الحديد وكلوريد الكادميوم وكلوريد النيكل وكلوريد النحاس وكلوريد الخارصين وكلوريد الكروم بتركيز 1000 ملغم/لتر لكل معدن وعقم بالطريقة الباردة بأستعمال وحدة التعقيم المايكروبية الجاهزة (Syringe Filter)، وحفظت المحاليل في دوارق معقمة. (Bergey and Holt, 1989)،و اضيفت محاليل املاح المعادن الثقيلة المعقمة الى الوسط المغذي الصلب المعقم و بدرجة حرارة 60م بحيث اصبح التركيز النهائي للمعادن 400ملغم /لتر في الوسط،كلا على انفراد، وصب الوسط في اطباق بتري بلاستيكية معقمة وترك ليتصلب، زرعت الأطباق بعد تصلبها بطريقة التخطيط من العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها من عملية العزل اعلاه، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م مدة 48 ساعة ولوحظ النمو وسجلت النتائج (Ahmed *et al*., 2005).

الغربلة الكمية للعزلات

استعملت طريقة صب الاطباق في اختيار العزلات الافضل بازالة المعادن ،اذ نقل 1 مل من مزارع العزلات تحت الاختبار(من التخفيف الحاوي على 10^6 وحدة مكونة للمستعمرة/ مل) الى اطباق بتري معقمة واضيف لها الوسط المغذي الصلب المعقم والمضاف له املاح المعادن الثقيلة المعقمة بحيث يصبح التركيز النهائي لها في الوسط 400ملغم /لتر وكلا على انفراد، و حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37م مدة 48 ساعة وسجلت النتائج حسب سرعة النمو(Barros *et al*. 2006).

تشخيص العزلات البكتيرية

1-الصفات المزرعية

تشخيص العزلات البكتيرية مبدئيا اعتمادا على الصفات الشكلية للمستعمرات ولونها وارتفاعها وقوامها وفحصت مجهريا لغرض وصف اشكال الخلايا بعد معاملتها بصبغة كرام، وتم التشخيص بأستعمال نظام الفايتك VITEK2 System حسب الطريقة المذكورة من قبل (Anonymous,(2010، كما اجريت الاختبارات الكيموحيوية والتي شملت فحص الاوكسديز حسب الطريقة المذكورة من قبل (2000).,Macfaddin وفحص الكاتليز وفحص انتاج Acetyl methyl carbinol من تخمر الكلوكوز وفحص النشا حسب الطريقة المذكورة من قبل (1995)*.*,Atlas *et al* وفحص السترات وفحص الحركة وفحص انتاج انزيم الجلاتينيز حسب الطريقة المذكورة من قبل (Parry *et al*.,(1983 وفحص النمو بتركيز ملحي عالي حسب الطريقة المذكورة من قبل Starr *et al*.,(1981) وفحص تخمر اللاكتوز وتحليل الكازين وفحص تخمر السكريات وانتاج الغاز حسب الطريقة المذكورة من قبل (2007)*.*,Forbes *et al*

فحص الحساسية للعزلات البكتيرية

اجري فحص الحساسية للعزلتين تجاه 5 مضادات حياتية مختلفة وهي ,Penicillin Tetracycline, Ampcillin, Methicillin, Chloramphenicol .واجري الاختبار باستعمال الوسط المغذي الصلب واعتمد قياس قطر التثبيط حسب ما جاء Johncy Rani *et al*.,(2010).

دراسة تحمل البكتريا للتراكيز العالية من المعادن الثقيلة

اضيفت محاليل املاح المعادن الثقيلة المعقمة تعقيما باردا الى الوسط المغذي الصلب المعقم بدرجة حرارة 60م بتراكيز مختلفة تراوحت بين 400 الى 2000 ملغم /

لتر لأختيار العزلات المتحملة للتراكيز العالية من المعادن الثقيلة قيد الدراسة و التي تم الحصول عليها من الغربلة الكمية بطريقة صب الاطباق، اذ اضيف 1 مل من لقاح العزلات البكتيرية الى الاطباق(يحوي المل الواحد على 10^6 و.م.م/مل ،تم اجراء حساب عدد الخلايا باستعمال طريقة صب الاطباق) كلا على انفراد واضيفت الاوساط الحاوية على المعادن المختلفة بتراكيز مختلفة الى جميع العزلات تحت الاختبار. حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م مدة 48 ساعة وقرأت النتائج(Jabbari et al. 2014) .

دراسة قابلية البكتريا على النمو في درجات الحرارة العالية

نميت العزلتين البكتيريتين المنشطة قيد الدراسة على الوسط المغذي الصلب بطريقة التخطيط Striking methodبدرجات حرارية مختلفة شملت 50م و 55م و60م لمدة 24 ساعة وبعدها لوحظ النمو وسجلت النتائج(Mansour pour *et al*.,2013).

النتائج والمناقشة Results and Discussion

تقدير تركيز المعادن الثقيلة في نماذج العزل باستعمال جهاز مطياف الإمتصاص الذري

تعد عملية العزل الحجر الاساس والاهم لهذه الدراسة لذلك كان لابد من تحديد مصادر العزل بصورة صحيحة من خلال تحديد تركيز المعادن الثقيلة في النماذج المختلفة والتي تم الحصول عليها من مناطق عدة شملت تربة شركة مصافي الوسط (مصفى الدورة) ، مياه معمل البان ابو غريب ، مياه معمل البان كلية الزراعة، تربة مصنع الاحبار (حي الخضراء)، تربة معمل بطاريات النور (ابو غريب)، وتربة المحطة الحرارية للطاقة الكهربائية (الدورة)، تربة الحي الصناعي، مياه مبزل (الرضوانية). وباستعمال جهاز مطياف الامتصاص الذري ، اذ يبين جدول (2) تراكيز المعادن الثقيلة في نماذج العزل ، اذ يلاحظ ان اعلى تركيز للنحاس Fe تم الحصول عليه من نموذج التربة للحي الصناعي ومعمل بطاريات النور ووحدة الطاقة الكهربائية في الدورة ومصفى الدورة ومصنع الاحبار وبتراكيزبلغت11.3ملغم/لتر، 19.6ملغم/لتر،21.3ملغم /لتر، 20.6 ملغم/لتر ،49.3 ملغم/لتر على التوالي ، في حين بلغت اعلى تراكيز للنيكل 6.5 ملغم/لتر و 6.3 ملغم/لتر و5.4ملغم/لتر على التوالي في النماذج المأخوذة من الحي الصناعي ومعمل بطاريات النور ومصنع الاحبار ، اما الخارصين Zn فبلغ اعلى تركيز له في نموذج الحي الصناعي تلاه نموذج معمل بطاريات النور ثم نموذج مصنع الاحبار وبتراكيز بلغت 19.8 ملغم/لتر و 17.1 ملغم/ لتر 13.8 ملغم/لتر على التوالي ، في حين

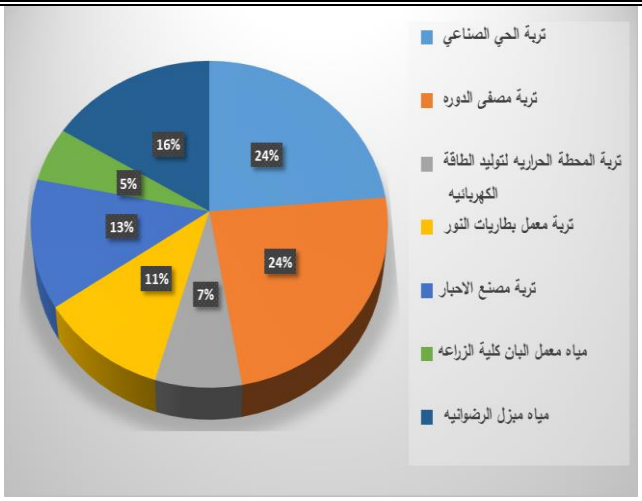
كان اعلى تركيز للكادميوم Cd في نموذج معمل بطاريات النور اذ بلغ 4.3 ملغم/لتر يليه النموذج المأخوذ من الحي الصناعي ثم مصنع الاحبار وبتراكيز بلغت 3.7 ملغم/ لتر و 3.6ملغم/ لتر على التوالي ، اما بالنسبة للرصاص Pb فأعلى تركيز له كان في نماذج الحي الصناعي ثم مصنع الاحبار بعدها معمل بطاريات النور والمحطة الحرارية للطاقة الكهربائية وبتراكيز بلغت 59.05ملغم/ لتر و 57.6 ملغم/لتر 56.2 ملغم/لتر و 15.69 ملغم/لتر على التوالي ، في حين بلغ اعلى تركيز للكروم Cr في النموذج المأخوذ من مصفى الدورة وبتركيز 16.7 ملغم / لتر ثم تلاه النموذج المأخوذ من المحطة الحراية للطاقة الكهربائية وبتريكز مقارب بلغ 10.3ملغم/ لتر ، اما النحاس فكانت لمصفى الدورة ومصنع الاحبار والحي الصناعي اذ بلغت 7.2 ملغم/لتر و 6.09 ملغم/لتر و 5.02 ملغم/لتر على التوالي ، وبناءا على النتائج المستحصل عليها من جدول (1) تم اختيار النماذج المأخوذة من المحطة الحرارية للطاقة الكهربائية في الدورة ومعمل بطاريات النور ومصنع الاحبار والحي الصناعي ومبزل الرضوانية في عملية العزل للحصول على عزلات بكتيرية من جنس *Bacillus* ذات قابلية عالبة لتحمل وازالة العناصر المعدنية الثقيلة، وقد اشار Lairine *et al.*(2009) الى ان الاحياء المجهرية المعزولة من المواقع الملوثة تعطي قابلية اعلى على تحملها للمعادن الثقيلة من تلك المأخوذة من البيئة الطبيعية غير الملوثة. واشار Baldrian and Gabriel.,(2002) الى انة عادة ما تكون المواقع الملوثة لاتحوي على نوع واحد من الملوثات وانما عادة ماتكون متعددة التلوث مما يجعل من الكائن المجهري المعزول من تلك المواقع متحمل لاكثر من نوع من المعادن الثقيلة.

جدول (1) تراكيز المعادن الثقيلة ملغم/لتر في نماذج العزل المأخوذة من مصادر مختلفة

المصدر	تركيز المعادن ملغم /لتر						
	Fe	Ni	Zn	Cd	Pb	Cr	Cu
تربة معمل البطاريات	19.6	6.3	17.1	4.3	56.2	7.5	4.8
تربة المحطة الحرارية للطاقة الكهربائية	21.36	5.78	1.56	1.23	15.69	10.32	5.36
تربة مصفى الدوره	20.6	1.9	1.8	1.1	12.5	16.7	7.2
تربة مصنع الاحبار	49.3	5.4	13.8	3.6	57.6	0.8	6.09
تربة الحي الصناعي	11.3	6.5	19.8	3.7	59.05	3.5	5.02
مياه الصرف لمعمل البان كلية الزراعه	0.2	0.01	0.03	0.2	0.9	0.1	0.3
مياه معمل البان ابوغريب	1.978	0.48	0.22	0.138	1.45	0.55	0.622
مياه مبزل الرضوانية	0.25	1.29	2.65	3.69	20.65	1.69	0.78

العزل:

تعد عملية العزل وانتخاب الكائن المجهري في مثل هذه الدراسات مفصلا اساسيا تنبثق من المفاصل الاخرى للدراسة،اذ تم الحصول على 55 عزلة بكتيرية من مصادر العزل المعتمدة والتي شملت نماذج التربة المأخوذة من الحي الصناعي والتربة والمياه لمصفى الدورة ومحطة الطاقة الكهربائية والتربة لمعمل بطاريات النور والتربة والمياه لمصنع الاحبار والمياه لمعمل كلية الزراعة ومبزل الرضوانية اذ بلغ عدد العزلات 13 و 13 و 4 و 6 و 7 و 3 و 9 على التوالي، وبأستعمال الوسط المغذي الصلب وطريقة صب الاطباق، و اعتمدت الطريقة المذكورة من قبل (Rewati *et al.*,(2016 في تحضير نماذج التربة لعملية العزل ، اذ عوملت نماذج التربة بعد اضافتها لمحلول التخفيف بدرجة حرارة 90م لمدة ربع ساعة في حمام مائي للتخلص من الخلايا الخضرية الموجودة للتنوع الكبيرمن الاحياء المجهرية في ترب نماذج العزل ، اذ تعد التربة مخزن كبير للاحياء المجهرية المختلفة والاستفادة من الخلايا السبورية المقاومة للحرارة واعادة تنميتها على الوسط المغذي الصلب في ظروف بيئية مناسبة للحصول على الخلايا الخضرية.والشكل (1) يوضح النسب المئوية لاعداد العزلات البكتيرية المستحصل عليها من مصادر العزل المختلفة



شكل (1) النسب المئوية لاعداد العزلات البكتيرية المستحصل عليها من مصادر العزل المختلفة

الغربلة النوعية للعزلات

اجريت غربلة نوعية اولية لتميز العزلات القادرة على النمو في وسط يحوي على تركيز معين من المعادن الثقيلة، وتوضح نتائج الغربلة النوعية للعزلات المستحصل عليها بعد التنمية على الوسط المغذي الصلب والحاوي على 400 ملغم/لتر من املاح المعادن قيد الدراسة كلا على انفراد، اذ لوحظ نمو جميع العزلات البكتيرية على هذا الوسط .

الغربلة الكمية للعزلات

تعد الغربلة الكمية اختبار اضافي تأكيدي للغربلة النوعية ، وتعطي تقييم حقيقي لقدرة الاحياء المجهرية على التطبيق الصناعي، ويلاحظ من خلال النتائج في جدول (2) التفاوت في قابلية العزلات البكتيرية على تحملها للمعادن من خلال تأثيرها في سرعة النمو، اذ اظهرت العزلة A1 قدرة على تحملها للعديد من العناصر المعدنية الثقيلة بتركيز 400 ملغم/لتر والتي شملت النحاس Cu والخارصين Zn والرصاص Pb والكاديوم Cd والنيكل Ni والحديد Fe ، في حين اظهرت العزلة البكتيرية A2 اعلى قدرة في تحملها لمعدن الكروم Cr من خلال متابعة سرعة النمو لها ، وقد اشاركل من Khan *et al.*(1983) و Prscott *et al* .,(2002) الى دور سمك وتركيب الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة لصبغة كرام في امتزاز وتراكم العديد من المعادن الثقيلة في الوقت ذاته ، اذ ان طبقة البيبتدوكلايكان المكون الرئيسي للجدار الخلوي لهذا النوع من البكتريا تهيئ مواقع لتبادل الايونات الموجبة بشكل كبير في غشاء الخلية ، ووجد كل من Volesky and

Holan.,(1995) ان بعض الانواع البكتيرية ومنها جنس *Bacillus* له القدرة على الارتباط بمعظم المعادن الثقيلة دون انتقائية محددة ، في حين تتميز انواع اخرى بخاصية انتقائية لانواع محددة من المعادن. وبناءا على النتائج المستحصل عليها تم اختيار العزلتين A1 و A2 في التجارب اللاحقة .

جدول رقم (2) نتائج الغربلة الكمية للعزلات البكتيرية المستحصل عليها من الغربلة النوعية

رقم العزلة	تراكيز المعادن الثقيلة 400 ملغم /لتر						
	Cu	Cr	Cd	Zn	Ni	Pb	Fe
A1	+++	+	+++	+++	+	++++	+++
A2	+	+++	+	+	+	++	+
A3	+	+	+	+	+	+	+
A4	+	+	+	+	+	+	+
A5	+	+	+	+	+	+	+
A6	+	+	++	+	+	+	+
A7	+	+	+	+	+	++	+
A8	+	+	+	+	+	+	+
A9	+	+	+	+	+	+	+
A10	+	+	+	+	+	+	+
A11	+	+	+	+	+	+	+
A12	+	+	+	+	++	+	+
A13	+	+	+	+	+	+	+
A14	+	+	++	+	+	+	+
A15	+	+	+	+	+	+	+
A16	+	+	+	+	+	+	+
A17	+	+	+	+	+	++	+
A18	+	+	+	+	+	+	+

A19	+	+	++	+	+	+	+
A20	+	+	+	+	+	+	+
A21	+	+	++	+	++	+	+
A22	+	+	+	+	+	+	+
A23	+	+	+	+	+	+	+
A24	+	+	+	+	+	+	+
A25	+	+	+	+	+	+	+
A26	+	+	++	+	+	+	+
A27	+	+	+	+	++	+	+
A28	+	+	+	+	+	+	+
A29	+	+	+	+	+	+	+
A30	+	+	+	+	+	++	+
A31	+	+	+	+	+	+	+
A32	+	+	+	+	+	+	+
A33	++	+	+	+	++	+	+
A34	+	+	++	+	+	+	+
A35	+	+	+	+	+	+	+
A36	+	+	+	+	+	+	+
A37	+	+	+	+	+	+	++
A38	+	+	+	+	+	+	+
A39	+	+	+	+	++	+	+
A40	+	+	+	+	+	+	+
A41	+	+	+	+	+	+	+
A42	+	+	+	+	+	+	+
A43	+	++	+	+	+	+	+
A44	+	+	++	+	++	+	+
A45	+	++	+	+	+	+	++

A46	+	+	+	+	+	+	+
A47	+	+	+	+	+	+	+
A48	+	+	+	+	+	+	+
A49	+	+	+	+	+	+	+
A50	+	+	++	+	++	+	+
A51	+	+	+	+	+	++	+
A52	+	++	+	+	+	+	+
A53	+	+	+	+	++	+	+
A54	+	+	+	+	+	+	+
A55	+	+	+	++	+	++	+

تشخيص العزلات البكتيرية

1- الخواص المزرعية والشكلية للعزلتين البكتيرية

اخضعت العزلتين البكتيرية الى الاختبارات المزرعية والمظهرية وفحص الفايتكVitc2 فضلا عن بعض الفحوصات الكيموحيوية ، اذ ظهرت مستعمرات العزلات النامية على سطح الوسط المغذي الصلب بشكل منتشر ذات حافات غير منتظمة ومسطحة نوعا ما وذات لون كريمي مائل الى البني لزجة ذات سطح املس وناعم في الغالب وبينت العزلتين قدرتهما على الحركة من خلال زرعهما بطريقة الطعن وظهور النمو حول منطقة الطعن ، اظهرت الخلايا عند تصبيغها بصبغة كرام متجمعة بشكل خلايا عصوية مزدوجة او مفردة بشكل سلاسل ، وتميزت بنهايتها الدائرية او المحدبة وابعاد الخلايا الخضرية تتراوح بين (0.5 ×12 µm) الى (2.5×10) µmواستجابتها لصبغة غرام موجبة وشكل السبورات اهليلجي مع احتوائها على بوغ spor واحد فقط اما في مركز الخلية او في نقطة قريبة من المركز (Norris *et al* ., 1981; Parry *et al*., 1983; Collins and Lyne, 1985; Duguid, 1996 ; Sneath *et al*.,1986)ويظهر الجدول (3) الخواص المزرعية والشكلية للعزلتين البكتيرية المطابقة لجنس *Bacillus*.بعدها اكد استعمال جهاز الفايتك Vit2 نتائج الفحوصات التشخيصية للعزلتين المستحصل عليها من الغربلة الكمية، وقد تضمن هذا الجهاز 63 فحص والتي من خلالها تم الاستنتاج بعودة العزلتين الى *Bacillus subtilis* بنسبة 89 %

وتميزت العزلتين بقابليتها على تحلل النشا (جدول 3)عند تنميتها على الوسط الحاوي على 1 % نشا ذائب اذ احيطت المستعمرات على سطح الاطباق بهالة شفافة دلالة على تحلل النشا وقد تم التأكد باضافة محلول اليود واصطبغت الاطباق بلون ازرق عدا الهالة حول النمو البكتيري دلالة تحلل النشا في هذه المنطقة وبالتالي التأكيد على امتلاك العزلتين لانزيم Amlase المحلل للنشا.كما تميزت العزلتين البكتيرية بقدرتها على تحليل الكازين عند تنميتها على الوسط الحاوي على الحليب الفرز بعد مرور 48 ساعة مدة حضن على درجة حرارة 37 م وظهرت المستعمرات محاطة بهالة شفافة دلالة على تحلل الكازين وامتلاك العزلة للانزيمات المحللة للبروتين،واوضحت النتائج قدرة العزلتين على اسالة الجيلاتين مما يؤكد قدرتهما على انتاج انزيم الجيلاتينيز Gelatinase وبقاء الوسط بحالته السائلة بعد نقله من الحاضنة في نهاية مدة الحضن الى الثلاجة لأكثر من 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 م، و اثبتت العزلتين قدرتهما على انتاج الحامض من تخمر السكريات (زايلوز ، السكروز ، مالتوز ، مانيتول ، ارابينوز، الكلوكوز). ونتيجة سالبة لانتاج الحامض عند تنميتها على الوسط نفسه الحاوي على اللاكتوز كمصدر كاربوني وحيد بعد مدة حضن تراوحت بين 2الى5 ايام على درجة حرارة 37 م ويستدل على نتيجة الفحص من تغير لون الكاشف بروموكريسول البنفسجي الى اللون الاصفر اما فحص انتاج الغاز ثاني اوكسيد الكاربون فلم تنتج العزلتين غاز في انبوبة درهم ولغاية 5 ايام من الحضن على درجة حرارة 37 م عند تنميتهما على الوسط الحاوي على السكريات السابقة كمصادر كاربون مما يدل على سالبية الفحص وعدم قدرة البكتريا على انتاج الغاز ، و اعطت العزلتين نتيجة موجبة لفحص Vogesproskauer م خلال قدرتهما على اختزال السترات عند تنميتها على وسط Simmons citrate agar مدة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 م وتغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق،و لوحظ تخثر وسط اللتموس بعد 48 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 37 م وتكون خثرة ذات قوام ضعيف وعدم تغير لون الوسط مما يدل على ايجابية الفحص بالنسبة للعزلتين، و اظهرت العزلتين نتيجة موجبة لانتاج انزيم الكاتاليز من خلال تكون فقاعات هوائية على سطح النمو البكتيري عند اضافة قطرات من محلول بيروكسيد الهيدروجين ،واظهرت العزلتين قدرتهما على انتاج انزيم Oxidase اذ ظهر لون بنفسجي على ورقة الترشيح بعد مرور 10 ثواني من الفحص والذي يعد نتيجة موجبة للفحص ، و كما اخفقت العزلة بالنمو في

الظروف اللاهوائية عند حضنها على درجة حرارة 37 مْ مدة 4 ايام مما يدل على ان البكتريا هوائية ولا تستطيع النمو بغياب الاوكسجين، و كذلك اثبت العزلة بان لها القدرة على النمو في الوسط ذي تركيز ملحي عالي حوالي 7% من كلوريد الصوديوم بعد مدة حضن 48 ساعة بدرجة 37 مْ ،وبناءا على النتائج المستحصل عليها من الفحوصات الكيموحيوية تم التأكد من انتماء العزلتين الى *Bacillus subtilis* وبذلك سميت العزلتين *Bacillus subtilis*1و *Bacillus subtilius*2.

جدول (3) نتائج الفحوصات الكيموحيوية للعزلتين البكتيرية A1 و A2

الفحص		النتيجة
فحص Oxidlase		موجبة
فحص Catalase		موجبة
فحص Vogesproskauer		موجبة
تحلل النشا		موجبة
تحلل الكازين		موجبة
فحص اختزال السترات		موجبة
فحص اسالة الجيلاتين		موجبة
فحص Litmus milk		موجبة
النمو بوسط (NaCl 7%)		موجبة
النمو بظروف لاهوائية تخمر السكريات		سالبة
كلكوز	موجبة	
ارابينوز	موجبة	
زايلوز	موجبة	
لاكتوز	سالبة	
سكروز	موجبة	
مانيتول	موجبة	
مالتوز	موجبة	

حساسية العزلتين البكتيرية للمضادات الحيوية

اظهرت العزلتين *Bacillus subtilis.1* و *Bacillus subtilis.2* المستحصل عليها في هذه الدراسة مقاومة تجاه المضادات الحيوية Penicillin و Ampcillin و Tetracycline و Methicillin و Chloramphenicol وبالتراكيز

30mcg,5mcg,10mcg,10mcg,10mcgعلى التوالي ، جدول (4) وهذا قد يشير الى وجود علاقة مابين مقاومة البكتريا للمعادن الثقيلة ومقاومتها للمضادات الحيوية، وهذا ما وجده Vajiheh *et al*.,(2003) اذ اكد وجود علاقة مابين مقاومة التراكيز العالية لمعادن النحاس Cu والرصاص Pb والخارصين Zn من قبل بكتريا *Bacillus* sp. والمضادات الحيوية، كما اكد بأن العزلات البكتيرية المقاومة لأنواع متعددة من المعادن تظهر مقاومة عالية تجاه مجموعة من المضادات الحيوية ،وقد اشار Gupta *et al* .,(2012) انه من الحالات المؤكدة بأن الية تحمل المعادن مسؤولية عن زيادة التحمل للمضادات الحيوية ، وان حدوث هذه الظاهرة قد يعزى الى تجمع جينا مهم على البلازميد.

جدول (4) مقاومة العزلتين البكتيرية لبعض المضادات الحيوية

المضاد الحيوي	تركيزه	النتيجة
Penicillin	10mcg	مقاومة
Tetracycline	10mcg	مقاومة
Ampcillin	10mcg	مقاومة
Methicillin	5mcg	مقاومة
Chloramphenicol	30mcg	مقاومة

وهذه النتائج تنطبق مع ماتوصل اليه Samanta *et al*.,(2012) من مقاومة بكتريا *Bacillus* sp. لهذه المضادات الحيوية ، كما اوضح ان هذه النتائج تشير الى اظهار بكتريا *Bacillus* sp. لمقاومة تجاه مدى واسع من المضادات الحيوية ، كما اوجد Singh *et al*.,(2013) ان معظم عزلات ال *Bacillus*المستحصل عليها في دراسته كانت متحملة للمعادن الثقيلة والمضادات الحيوية والتي شملت Amoxycillin و Ampcillin و Amikacin و Methicillin و Kanamycin و Tetracycline في حين كانت حساسة للVancomyain و Ofloxacin و Ceftriaxone كما اوجد Sekhar ,(2013) بأن عزلات*Bacillus* التي حصل عليها بدراسته والتي كانت مقاومة للمعادن الثقيلة كانت ايضا مقاومة لل Penicillin.

تحمل التراكيز العالية من المعادن الثقيلة

اظهرت العزلتين لبكتريا *Bacillus subtilis*. سلوكا مختلفا في النمو بوجود تراكيز مختلفة من المعادن الثقيلة ، اذ يظهر جدول (5) مستويات مختلفة من التحمل

للمعادن الثقيلة من قبل العزلتين البكتيرية قيد الدراسة ، اذ يبين الجدول ان اعلى تركيز تتحمله العزلة*Bacillus subtilis*1 لمعادن النحاس والخارصين والرصاص والكروم والنيكل والحديد والكادميوم بلغ مابين 800 الى 2000 ملغم/لتر على التوالي في حين بلغ اعلى تركيز تحملته العزلة *Bacillus subtilis*2بلغ مابين 600 الى 2000 ملغم/لتر على التوالي، مع ملاحظة الاختلاف في كثافة النمو للعزلتين بزيادة التركيز للمعادن المختلفة قيد الدراسة ، اذ وجد ان هنالك انخفاض في الكثافة بزيادة التراكيز ، وقد اشار Samanta *et al* .,(2012) الى ان انخفاض في النمو بزيادة التركيز للمعادن الثقيلة مؤشر للتأثير السمي للمعادن الثقيلة على نمو الاحياء المجهرية ، في حين اوضح Sekhar.,(2013) امتلاك بكتريا *B.anthracis* و *B.subtilis* قابلية تحمل عالية تجاه معادن النحاس والكروم مما يشجع على استعمالها في عملية الازالة الحيوية للمعادن الثقيلة. اشار Marc *et al* .,(2012) الى امتلاك البكتريا الموجبة لصبغة كرام ولاسيما *Bacillus* sp مدى واسع لامتزاز المعادن الثقيلة ويعود ذلك الى الطبقات المتعددة من الببتيدوكلايكانPeptidoglycan الموجودة في جدارها الخلوي فضلا عن وجود احماض التكويك Teichoic acid

اشار Lairini *et al*.,(2009) الى ان سمية العناصر المعدنية تختلف اعتمادا على العديد من العوامل منها العزلة وموقع العزل ، اذ ان بعض العزلات تكون متحملة للتراكيز العالية في حين العزلات الاخرى تتفاعل بصورة سلبية حتى في التراكيز المنخفضة من المعادن وهذا يمكن ان يوضح اهمية موقع العزل في الحصول على العزلة المطلوبة ، في حين اوضح Badar *et al*.,(2000) استجابة العزلات للعناصر المعدنية اذ ان ذلك يعتمد على العديد من العوامل منها مايخص العزلة نفسها ومنها مايعتمد على نوع المعدن الذي تم اختياره وتركيزه في الوسط.

جدول (5) قابلية التحمل الاعلى (MTC) للعزلتين البكتريتين *Bacillus subtilis.1* و *Bacillus subtilis.2*

	تراكيز المعادن الثقيلة Cu ملغم/لتر									
رقم العزلة	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000	2200
B.subtilis.1	+++	+++	+++	+	+	–	–	–	–	–
B.subtilis.2	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–

Zn ملغم/لتر										
B.subtilis.1	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	–
B.subtilis.2	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Pb ملغم/لتر										
B.subtilis.1	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	–
B.subtilis.2	+++	++	+	+	–	–	–	–	–	–
Cr ملغم/لتر										
B.subtilis.1	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
B.subtilis.2	++++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	–
Ni ملغم/لتر										
B.subtilis.1	+++	+	+	+	–	–	–	–	–	–
B.subtilis.2	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Fe ملغم/لتر										
B.subtilis.1	++	+	+	–	–	–	–	–	–	–
B.subtilis.2	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Cd ملغم/لتر										
B.subtilis.1	++	++	+	+	–	–	–	–	–	–
B.subtilis.2	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–

المصادر

1. **خماس**, زهير عبد الأمير.(2008). مطيافية الإمتصاص الذري اللهبي النظرية والتطبيق. وزرارة التعليم العالي والبحث العلمي. كلية العلوم للبنات, جامعة بغداد.
2. **الخفاجي**, زهرة محمود.(2008). التقنية الحيوية الميكروبية. وزرارة التعليم العالي والبحث العلمي . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية . جامعة بغداد.
3. **Ahmed,** ، N. Nawaz, A. and Badar,، U. (2005). Screening of copper tolerant bacterial species and their potential to remove copper the environment. Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology 47:19-226.
4. **Anonymous**,(2010).VITEK2 System product information.Durham, North Carolina 27704-0969/USA,2-22.
5. **Atlas,** R.M. ; Parks L. C and Brown, A. E (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby_ Year Book, Baltimore.
6. **Barros**, M., Prasad , S., Duarte, V. and Gowveia,A. (2006). The Process of biosorption of heavy metals in bioreactors loded with sanitary sewage sludge . Brazil .J. Chem. Engi .23 (2):1-14.

7. **Badar**,U.;Ahmed,N.;Beswick,A.J.;Pattanapipitpaisal,p.andMacask.,LE. (2000).Redution of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi.Pakisten.Biotechnol.Lett.22:829-836.
8. **Bergey**, D,H., and Holt, J,G., (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer.
9. **Baldrain**, P. and Gabriel, J. (2002). Intra specific variability in growth response to cadmium of the wood rotting funus piptoporus betulinus. Mycologia,94.428-436.
10. **Collee**, J.G.; Miles, R.S. and Watt, B. (1996). Tests for the identification of Bacteria. In: Collee, J.G., Fraser A.G., Marimon, B.P. and Simmons, A. (14th ed.). Practical Medical Microbiology – p.p. 317 – 327.
11. **Collins**, C.H. and Lyne, P.M. (1985). Microbiological methods. Fifth edition. Chapter 34 (genus Bacillus), p.p. 356 – 360.
12. **Duguid**, J.P. (1996). Genus Bacillus. In: "Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (14th ed.)". Practical Medical Microbiology. Vol. 1. Mackie and McCartney. p.p. 131 – 149.
13. **Forbes**, A. ; D. Sahm and Wessfeld , A. (2007). Dignostic Microbiology, 12th edition. Elsevier, Houston, Texas.
14. **Gubta,** K., Chatterjee. C. &Gupta, B. Biologia (2012). Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram- positive bacteria with bioremedial properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata).Wast Bengal. India. Biologia. 67(5):827-836.
15. **Harrigan**, W.F. and McCance, M.K. (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London, New york.
16. **Jabbari**, N. Faezi, G. Farahmend, M. and Shakibaie, R. (2014). Remediation by metal – Resistant Mutated Bacteria isolated from active sludge of mdustrial effluent. Iran .J. Environ . Health Sci. Eng ., Vol.7. No 4, pp.244-286.
17. **Johncy Rani**, B. Hemambika*, J. Hemapriya and V. Rajesh Kannan (2010). Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: A biosorption approach, Vol. 4(2), pp. 077-083.
18. **Khan** , M.; Barny, F. and Hamiltion,O. (1983). Specialized membranous structres that protect DNA transformation.procnati.J.Acad Sci USA.(80):927-931.
19. **Larry**,W. (2006). World Water Day: A Billion people Worldwide Lack safe Drinking Water Intern. J.Enviro.Sci.(7):1-6 .
20. **Lairini**, K.; Ezzouhri, L.; Castro, E.; Moya, M. and Espinola, F.(2009).Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from Polluted sites in Tangier, Morocco.African Journal of Microbilogy Research,3(2):35-48.

21. **Little**, B. Wagner, P. Lewandowski, Z.(1997) Spatial relaation ships between bacteria and mineral surface. Rev Mineral 35:123-159.
22. **Lairini**, K.; Ezzouhri, L.; Castro, E.; Moya, M. and Espinola, F.(2009).Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from Polluted sites in Tangier, Morocco.African Journal of Microbilogy Research,3(2):35-48.
23. **Macfaddin**, F. J. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd Ed. Printed in United State of America.
24. **Majare**, M.and Bulow,L. (2001). Metal-binding proteins and peptiles in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. TIBTECH. Vol. 19 ,PP. 67-73
25. . **Mansouripour** S,Esfaudiari,Z,Natelghi L (2013).The effect of heat process on the survival and increased viabillty of probiotc by microcapsulation:areview. Ann.Biolong.Res.4:83-87.
26. **Marc**, M.; Jeremy, P.B. and Grego,R.(2012). Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals throught Microbial processes: apotential Role for probiotics . Appl. Environ. Microbiol . 78(18):6397.
27. **Norris**, J.R.; Berkeley, R.C.W.; Logan, N.A. and O'Donnell, A.G. (1981). The genera Bacillus and sporoLactobacillus. In: The prokaryotes: a hand book on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. ed. By: Starr, M.P.; Staolp, H.; Truper, H.G.; Balows, A. and Schlegel, H.G. Vol.2, p.1711 – 1742. Springer – Verlag, Berlin.
28. **Parry**, J.M.; Turnbull, P.C. and Gibson, J. R. (1983). Methods and characterization tests. In: Acolour Atlas of Bacillus sp. Wolf medical publication Ltd.
29. **Prescott** LM, Harley JP and Klein DA.(2002).Microbiology, Fifth Edition. New York ,US. McGraw-Hill Higher Education. 95-112.
30. **Rewati** Raman Bhattarai,; Nawaraj Gautam,; Malik Adil Nawaz,; Suman Kumar; Lal Das . (2016). Isolation and Identification of dominant Latic acid bacteri from dahi : An Indigenous Dairy product of Nepal Himalayas,5.4.358-363.
31. **Samanta**, A.; Bera, P.; Khatun, M.; Sinha, C.; Pal, P.; Lalee, A. and Mandal,A. (2012). An investigation heavy metal Tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain Bacillus sp. isolated from municipal wast. Journal of Microbiology and Biotechnology Research , 2(1):178-189.
32. **Sekhar**, S.M. CH, (2013). Identification and Characterisation of Predominant heavy metal resistant bacteria isolated From industrial effluents,Society of Sci,Dev.in Agric. And Tech.8(special):315-318.

33. **Silver**, S. and Phung, L. (1996). Bacterial heavy metals resistance: New surprises. Annu Rer Microbial , 42:717-743.
34. **Singh**, Y.; Ramteke, P.W.; Tripathy,A.and, A. and Shukla, P.K. (2013).Isolation and charaterigation of Bacillus resistant to multiple heavy metals . Int. J. curr.Microbid. APP.Sci.2(11):525-530.
35. **Sneath**, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharp., M.E. and Holt, J.G. (1986). Bergerys mannual of systematic bacteriology, p.p. 1105 – 1138, Williams and Wilkins, U.S.A.
36. **Starr**, M. P. ; H. Stolp ; H. G. Truper ; A. Balows and H.G Schlegel , (1981). The Prokaryotes. Vol. II. Springer- Verlag NewYork.
37. **Tokalioglu**, S. Kartal , S. and Elci, L . (2000). Speciation and determination of heavy metals in lake water by atomic absorption spectrometry actor sorption on amber lite . Xad-16 Resin . Analytical Sciences , 16:1169-1174
38. **Vajiheh**,K.; Badami, N. and Emtiaz , G.(2003).Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in ahospital in Isfahan , Iran.African Journal of Biotechnology, 2(10):379-383.
39. **Volesky** B, Holan ZR. Biosorption of heavy metals. Biotechnol Prog1995;11:235–50.

ABSTRACT

Bacterial Qualitative screening was used to get fifty five bacterial isolates from the obtained ones, all of which were undergone to bacterial quantitative screening to get two bacterial isolates. The first one which was taken from an industrial district, characterized by fast growth on Nutrient agar medium contained the minerals, Fe, Cu, Cd, Pb and Ni at concentration of 400 mg/l both individually, while the second one which was obtained from Al- Daura refinery, characterized by fast growth on Nutrient agar medium contained Ni element at the same concentration. The two isolates were identified on basis of the morphological and cultural properties, also VITEK test was done, in addition to the conduction of some complementary biochemical tests to make sure that they are Bacillus subtilis bacteria. The first isolate was named as Bacillus subtilis 1 and the second as Bacillus subtilis 2 Both isolates showed their resistance to the antibiotics Penicillin, Tetracycline, Ampcillin, Methicillin, Chloramphenicol, at concentrations of 10mcg, 10mcg, 10mcg, 5mcg, 30mcg,. both isolates showed a high ability to grow at high temperatures which included 50 to 60̊ c. consequently The maximum concentrations used for the Bacillus subtilis 1 isolate were from 800 to 2000for the minerals Cu, Zn, Pb, Ni, Fe, and Cd consequently, while the maximum concentrations used for Bacillus subtilis 2 isolate was 2000for the mineral Cr.