عزل وتشخيص انواع جنس .Sulfolobus Spp من الينابيع الحارة في منطقة حمام العليل في محافظة نينوى بالطرق التقليدية والاحيائية الجزيئية

محمد عبد الرزاق القطان[1] ، باسمة احمد عبد الله[1] ، وعد محمود رؤوف[2]

[1] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

[2] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: 2013/10/18---- تاريخ القبول: 2013/4/7)

الملخص

عزلت وشخصت الانواع التابعة لجنس .Sulfolobus spp باستخدام اوساط زرعيه اعتيادية وانتخابية اذ شخصت الانواع البكتيرية اعتماداً على الصفات المظهرية كشكل ولون وقوام المستعمرات بالإضافة الى الفحوصات الكيموحيوية .

كما اجري عليها اختبار الحساسية تجاه عدد من المضادات الحيوية بالاضافة الى الفحوصات الايضية والإحيائية الجزيئية . تم الحصول على نوعين هما, Sulfolobus solfataricus , Sulfolobus acidocaldarius . اظهرت نتائج فحص الحساسية للأنواع التابعة لمملكة الاركيا مقاومة عالية تجاه اغلب المضادات الحياتية قيد الدراسة باستثناء النوع Sulfolobus acidocaldarius الذي اعطى حساسية عالية تجاه المضاد الحيوي Gentamicin. كما اظهرت الانواع المعزولة نمواً في درجة حرارة مثالية تراوحت (37–40)°م اذ اظهرت العزلات التابعة لجنس.Sulfolobus Spp نموا بمدى حراري تراوح (35–70)°م . وعند تنميتها بمديات مختلفة من الدالة الحامضية .Sulfolobus spp نمت عند دالة حامضية تراوحت (3–7) بينما كان افضل نمو لها عندpH (3–4) . وعند تنمية العزلات بتراكيز متغايرة من كلوريد الصوديوم أعطت الأفراد التابعة لجنس .Sulfolobus Spp أفضل نمو تركيز (2–3%) من كلوريد الصوديوم . تم اجراء تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR المعتمد على تضخيم الـ DNA المجيني وذلك باستخدام البادئ الخاص بافراد مملكة الاركيا اذ لوحظ ظهور حزم بوزن جزيئي تراوح تقريباً 930–950 زوج قاعديbp ، بعد إجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز agaros gel .

المقدمة

ان وجود البكتريا القديمة مقتصر في البيئات التي تكون درجة حرارتها عالية او الملوحة العالية البيئات الحامضية وبعد العديد من الدراسات عرض الباحثون نوع مختلف من البكتريا القديمة واسعة الانتشار وغير متطرفة وتعيش في درجات حرارة معتدلة وبيئات باردة تتضمن ترب ورواسب البحيرات والمحيطات والمياه العذبة اي انها توجد في كل مكان وتؤشر هذه الاكتشافات بداية عصر جديد للتحري عن البكتريا القديمة Archaea وبشكل خاص خصائصها الايضية (الفسلجية) ودورها الحيوي بين مجتمعات الاحياء المجهرية [3,2,1] . تعد الينابيع الحارة في منطقة حمام العليل بمحافظة نينوى بيئية متطرفة لمعيشة الانواع البكتيرية ومنها البكتريا القديمة Archaea اذ شبهت الاركيا منجماً ذهبياً من ناحية خصائصها الحيوية الفريدة وربما العديد منها لم يكشف لحد الان [4] . اظهرت الدراسات التي اجريت من قبل الطيار واخرون [5] ومصطفى واخرون [6] تأثير مياه الينابيع الحارة الكبريتية على الاحياء المجهرية التي تسبب انخفاض الدالة الحامضية وزيادة تركيز المغنيسيوم والكالسيوم والكاربونات والبيكاربونات ، ان جميع الخصائص التي ذكرت انفاً تعتبر بيئة غير ملائمة وبيئة غير طبيعية الا لأنواع قليلة استطاعت ان تكيف نفسها لتحمل درجة حرارة الماء والملوحة والحامضية غير الطبيعية . ان البكتريا القديمة Archaea لها القدرة على تحمل هذه الظروف غير الطبيعية ومن اهم انواعها بكتريا الكبريت الـ .Sulfolobusspp والبكتريا المحبة للملوحة . Halobacteriumspp والـ .Halococcusspp ولا يقصد بالملوحة نسبة كلوريد الصوديوم فقط وانما تلعب الاملاح الاخرى دوراً مهماً مثل املاح الكالسيوم والمغنيسيوم اضافة الى بكتريا النتروجين والكبريت [7] ، هناك انواع اخرى من البكتريا الحقيقية تتحمل الظروف المتطرفة لمياه الينابيع الحارة والحامضية والمالحة مثل :

.Bacillus spp مثل النوع Bacillus Vietnamensis ، وبكتريا .Staphylococcus spp مثل النوع Staphylococcus Saprophyticus ، وانواع اخرى شائعة مثل :

Halothio bacillus spp. Thiobacillusthiooxidous

Thermithio bacillus spp

اضافة الى انواع مختزلة للكبريت مثل :

Desulfovibriodesulfuricous ، Desulfovibriogigas [8, 9] . كما ذكرنا ، [10] والـ [11] Sawaf ، انه تم تشخيص ثلاثة اجناس هي :

.Thiothrixspp.،Thiospirillumspp.،DesulfovibrioSpp

والتي تعود الى العوائل التالية :

Acteriodaceae ، Chromatiaceae، Leucotrichaceae على التوالي هذه الأجناس المذكورة تم عزلها من العيون الكبريتية في حمام العليل حيث تستطيع هذه البكتريا تحمل درجة حرارة مياه الينابيع التي تصل (45–60)°م ، كما قد تتحمل درجة حرارة عالية قد تصل الى

(100)°م لامتلاكها انزيمات تتحمل الحرارة المتطرفة [7] . صنفت بكتريا الSulfolobus اعتمادا على موسوعة بيركي التصنيفية Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [12] ضمن شعبة ال Crenarchaeota والتي تملك رتبة Sulfolobales عائلة Sulfolobaceae وجنس ال.SulfolobusSPP اذ يعد هذا الجنس من البكتريا القديمة والتي يقدر عمرها بثلاثة بليون سنة تظهر خلاياها كروية أوعصوية اوغير منتظمة او حلزونية قطرها حوالي (0.7–2) مايكروميتر وتكون اما مفردة او بشكل ازواج . سالبة لصبغة كرام . غير مكونة للأبواغ غير متحركة وقد تحوي على سوط واحد او تركيب يشبه الشعيرات او تراكيب تشبه الاقدام الكاذبة . تعيش في الينابيع الحارة والحامضية اذ عثر عليها في مناطق حارة جداً ونتموا بمدى حراري (60–80) مْ وبدالة حامضية تتراوح من (2–5.5) pH . تنمو في الظروف الهوائية اذ تعمل على اكسدة الكبريت او غاز كبريتيد الهيدروجين وتنتج حامض الكبريتيك H_2SO4 . ان عدد من الانواع والسلالات التابعة لجنس Sulfolobus يعمل على اكسدة الكبريت باستخدام ايون الحديديك Fe^{3+} او ايون الموليبيديوم MoO_4^{2-} كمستقبل للالكترونات . يمكن ان يستبدل الكبريت بايون الحديدوز Fe^{2+} او بالهيدروجين الجزيئي كإلكترون مانح في حال انعدام الأوكسجين . اي تكون اختيارية في تغذيتها العضوية الضوئية حيث ان الذاتية التغذية تنمو بأكسدة الكبريت الحر (S^o)او الكبريتات الرباعية tetrathionate وتنتج حامض الكبريتيك . تنمو العضوية التغذية بالاعتماد على المركبات العضوية الأساسية المعقدة مثل خلاصة اللحم ألبقري Beef extract البيبتون peptone وخلاصة الخميرة Yeast extract والسكريات والأحماض الامينية [13] .عزل Sulfolobus من مناطق واسعة في القارة الاوربية ومن مناطق الينابيع الحارة في Yellowston في امريكا . كما عزل في اليابان والمانيا من رواسب الترب الحارة ومناطق اخرى ذات ظروف متطرفة في انحاء العالم [14,15] تحتاج الى اوساط زرعية بسيطة وغنية حيث استخدم وسط حضر من قبل Allen المحور [16] تستخدم الكبريت او الكبريتات ومركبات عضوية اساسية او الهيدروجين الجزيئي كمصدر للطاقة كما يمكن استخدام وسط يحوي خلاصة الخميرة والبيبتون والتربتون او خلاصة اللحم والسكريات والاحماض الامينية وبالتحضين في ظروف هوائية وفي درجات حرارة مثالية تتراوح بين (50–80) مْ وبدالة حامضية للوسط المحضر بين (2–5.5) Ph . ويمكن استخدام اطباق حاوية على Gelrite والنشأ Starch او السيلكا polysilicate لعزلها [17,18]. ان عدد من السلالات للأنواع التالية :

S.Solfataricus،.Shibatae،Sulfolobusacidocaldarius

تستطيع النمو على المركبات العضوية الاساسية المعقدة والمذكورة آنفاً. كما يمكنها استخدام السكريات المختلفة والاحماض الامينية كمصدر للطاقة والكاربون في غياب الاوكسجين . كما ان من اهم انواع هذا الجنس Sulfolobus السائد هي:

SulfolobusSolfataricus،Sulfolobusacidocaldarius،Sulfolobusshibatae،SulfolobusMetallicus

Sulfolobusyangmingensis ،Sulfolobushaakouensis .

المواد وطرائق العمل

جمعت (75) عينة ماء من (15) ينابيع حارة في منطقة حمام العليل بمدينة الموصل (5عينة/ينبوع) خلال الفترة من تشرين الثاني 2011 لغاية شهر آذار 2012 بوساطة قناني معقمة سعة 250 سم^3، وذلك بتغطيس القنينة تدريجياً ليكون اتجاهها مواجه لجريان الماء، اخذت العينة واعيد سد فوهة القنينة بإحكام داخل الماء وعلقت بورق الألمنيوم الاحكام الغلق وحفظت في صندوق من الفلين المثلج لحين نقلها الى المختبر لإجراء فحوصات الاحياء المجهرية عليها استخدمت الأوساط الآتية لعزل وتشخيص الجرثومة وسط خلاصة الخميرة peptone yeast extract ووسط ال Laurie bertani لقحت الاوساط المذكورة وحضت في درجة حرارة 37+– 1 لمدة 24–48 ساعة ، شخصت الانواع التابعة لجنس ال.Sulfolobus spp اعتماداً على مفاتيح التشخيص في موسوعة بيركي التصنيفية . من خلال الطرق التقليدية باستخدام الاوساط الزرعية الانتقائية والفحص ألمجهري اذ شخصت الانواع البكتيرية اعتماداً على الصفات المظهرية كشكل ولون وقوام المستعمرات بالإضافة الى الفحوصات الكيموحيوية كفحص اختبار الكتاليز والاكسيديز واختزال النترات ، استهلاك الكاربوهيدرات ، النمو اللاهوائي ، اختبار IMViC وإنتاج بعض انزيمات الضراوة مثل البروتيزprotease، اللسيثينيز Lecithinase واللايبيز Lipase . وحساسيتها للمضادات الحيوية Amoxicillin AMC30 Mg، Carbenicillin PY 25 Mg، Gentamicin CN 30Mg ، Novobiocin NV 30Mg،Erythromycin E 15Mg، Tetracyclin TE 10Mg،Streptomycin S 10Mg، Piperacillin PRL 30Mg،Penicillin P 10Mg، المجهزة من شركة Bioanalyse التركية ، بالاضافة الى الاختبارات الايضية من خلال تنميتها في درجات حرارية ودالة حامضية مختلفة وتراكيز متباينة من كلوريد الصوديوم ، في حين تم تاكيد التشخيص من خلال التحري على المستوى الجزيئي باستخدام تفاعل بلمرة سلسلة ال DNA تقنية ال PCR باستخدام بادئ خاص بمملكة الاركيا الجدول (1) . حضر المزيج الرئيس لعدة عينات وذلك بمزج 12.5 مايكروليتر من Green master mix، 1.5 مايكروليتر من كل برايمر، 5 مايكروليتر من DNA template و 4.5 مايكروليتر من Nuclease free distilled water في أنبوبة Eppendorff tube سعة 0.2 سم^3 وقد تم اضافة جميع هذه المواد بالأنابيب في الثلج ، مزجت مكونات التفاعل جيدا وذلك بتدوير الأنابيب لمدة 10 ثواني في جهاز الطرد المركزي الدقيق Microcenterifuge لترسيب قطرات محلول التفاعل الموجودة على جدار الانبوب الداخلي ، ادخلت الانابيب بعد ذلك في جهاز المبلمر الحراري الحلقي Thermo cycler بحذر وعناية

لانجاز تفاعلات التضاعف باستعمال البرنامج المناسب الذي طبق

1 Cycle 94°C for min 4

35 Cycle 94°C for 1 min
55°C for 1 min
73°C for 3 min

وبعد انتهاء وقت التفاعل رفعت العينات من الجهاز وسحبت عينات الدنا المتضاعفة بمقدار 15 مايكروليتر وتم تحميل المزيج في هلام الاكاروز بتركيز (2%) تم ترحيل العينات بجهاز الترحيل الكهربائي لمدة 120 دقيقة .

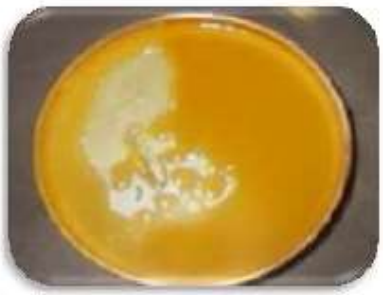
الجدول (1) تسلسل البادئ المستخدم قيد الدراسة

ت	5→3	المنشأ
Up	TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA	Promiga USA
Down	YCC GGC GTT GAM TCC AATT	

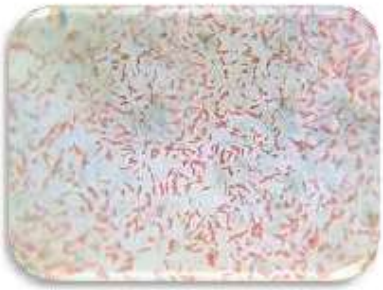
على التفاعلات اللاحقة قيد الدراسة وكالاتي:

النتائج والمناقشة

ابدت مستعمرات جنس.Sulfolobusspp قدرة على النمو بشكل متميز وواضح على وسط النمو P-YE ووسط L.B ، اذ ظهرت العزلة الأولى بشكل مستعمرات صفراء اللون ملساء محدبة ما في الصورة (2,1) ، في حين اظهرت العزلة الثانية مستعمرات صفراء شاحبة وملساء كما فيالصورة (4,3) بالاضافة الى قدرتها على النمو بشكل واضح على وسط الاكار المغذي واكار الماكونكي وهذا مااشار اليه Motamedi وجماعته [19] بالإضافة لـsegerer،stetter [20] في امتلاك الأنواع التابعة لهذا الجنس صبغات والوان مختلفة فضلا عن ان مستعمرات ذات إشكال مختلفة . في حين أظهرت نتائج الفحص ألمجهري بعد صبغ المسحات بصبغة كرام خلايا عصوية كروية سالبة لصبغة كرام وغير متحركة .



الصورة (1) شكل المستعمرات التابعة للنوع Sulfolobus acidocaldarius



(2) شكل الخلايا التابعة للنوع Sulfolobus acidocaldarius بقوة تكبير 1000X

الصورة (3) شكل المستعمرات التابعة للنوع Sulfolobus solfataricus

(4) شكل الخلايا التابعة للنوع Sulfolobus solfataricusبقوة تكبير X1000

كما اتصفت العزلات التابعة لهذا الجنس بكونها موجبة لفحص الكتاليزبدلالة تكون الفقاعات الهوائية بعد إضافة بيرو كسيد الهيدروجين. كما اعطت نتيجة موجبة لفحص الاكسيديز وتحلل الكازائين وتحلل النشأ والنمو اللاهوائي . بينما كانت النتيجة متباينة لاختزال النترات. كما ابدت العزلة الاولى نتيجة سالبة لاختبار تحلل الجيلاتين بينما اعطت العزلة الثانية نتيجة موجبة للفحص كما اظهرت نتائج العزلة الاولى التابعة لجنس .Sulfolobusspp نتيجة موجبة لانتاج انزيم اللايبيز Lipeas والليسيثينيز Lecithinase والبروتيز protease . في حين أعطت العزلة الثانية نتيجة سالبة لهذه الانزيمات . من ناحية اخرى تباينت قدرة العزلات التابعة لهذا الجنس على تخمير السكريات كما موضح في الجدول (2) حيث اعطت هذه العزلات نتيجة موجبة لتخمر سكر الكلوكوز، الارابينوز، الفركتوز،

الكالاكتوز، التريهالوز، المالتوز والسكروز، بينما اعطت العزلة الأولى نتيجة سالبة لتخمير كل من سكر اللاكتوز والمانوز ونتيجة موجبة السوربيتول والمانتول ، بينما اظهرت العزلة الثانية نتيجة موجبة لتخمير كل من سكر اللاكتوز والمانوز وسالبة لتخمير كل من السوربيتول والمانتول ، اما بالنسبة لاختبار IMViC حيث اعطت العزلة الاولى نتيجة سالبة لفحص الاندول واختبار المثيل الأحمر بينما كانت النتيجة موجبة لفحص فوكسبر وسكور وسيمون ستريت بينما اعطت العزلة الثانية نتيجة موجبة لاختبار الاندول و الفوكس بروكسور والسيمون ستريت بينما أعطت نتيجة سالبة لاختبار المثيل الأحمر. [19,21,12] . تؤثر العوامل الفيزيائية على نمو الكائنات المجهرية والتي تتضمن درجة حرارة والدالة الحامضية وتركيز كلوريد الصوديوم وعادة تنمو هذه البكتريا مدى معين من الظروف البيئية . اذا يلاحظ تأثير لدرجة الحرارة على نمو العزلات التابعة للاركيا وعلى الإنزيمات الخلوية . اظهرت الدراسة الحالية ان الدرجة المثلى لنمو العزلات التابعة للاركيا تراوحتبين (40-37) م° حيث يزداد نشاط الانزيمات في هذه الدرجة الحرارية وتعمل زيادة مدة الطور اللوغارتمي . كما ارتفاع درجة الحرارة اكثر مما ينبغي يؤدي إلى مسخ الانزيمات الضرورية لحياة الخلية كما ويؤدي إلى اختزال الطور اللوغارتي، وقد تؤثر على دهون الغشاء الخلوي للخلايا البكتيرية ، كذلك من المهم ملاحظة قدرة هذه الجراثيم على التضاعف عند درجة حرارة الثلاجة (5) م° ان هذه الدرجة تؤدي إلى خمول وتوقف نشاط البروتينات [22,21,12] . اذ نمت العزلات التابعة لجنس الـ Sulfolobus spp. عند درجة حرارة تراوحت بين (65-70) م°، سبب تحمل هذه العزلات التابعة للاركيا

لدرجة الحرارة العالية تعود لعدة اسباب منها وجود بروتينات الصدمة الحرارية الحرارية حيث تعمل البكتريا على زيادة تكوين هذه البروتيناتل تحمل الدرجات الحرارية القاتلة [23,24,25] بالإضافة إلى طبقة الـS-layer [26] اذ لوحظ حوالي 20 نانوميتر من الغشاء السايتوبلازمي يرتبط بهذه الطبقة عن طريق بروتينات غير معروفة لحد الآن ، كذلك دهون الغشاء السايتوبلازمي تكون ثنائية الكليسيرول رباعية الايثر وكمية القواعد النيتروجينية ثلاثية الأواصر الكوانين والسايتوسينG≡C تكون في الاركيا أعلى من البكتيريا التي لا تتحمل درجات حرارية عالية [27,28,29,30] . كما اظهرت النتائج ان الجراثيم التابعة لجنس ال Sulfolobus تستطيع النمو عند تركيز (2-4.5%) من كلوريد الصوديوم اذ كان افضل نمو لهذه الجراثيم (2-3%) وأعلى تركيز نمت فيه (4.5-5%) تقريبا، كما اظهرت العزلات التابعة لجنس الـ Sulfolobus قدرة على التضاعف بدالة حامضية تراوحت (4-7) ، اذ انها تستطيع النمو في البيئات الحامضية والحاوية على الكبريت حيث بينت الدراسة الحالية قدرت هذه العزلات على النمو عند دالة حامضية (3) . كما ان هذه الجراثيم التابعة للاركيا تستطيع النمو في دالة حامضية متعادلة وهذا يعود إلى طبيعة التركيب الوراثي لهذه الجراثيم [12] .

الجدول (2) التنميط الشكلي والايضي والكيموحيوي للجراثيم التابعة لجنس Sulfolobus من الينابيع الحارة والكبريتية.

العينات الاختبارات	Sulfolobus acidocaldarius	Sulfolobus solfataricus
صبغة كرام	–	–
الشكل	عصوي كروي	عصوي كروي
لون المستعمرة	اصفر–برتقالي	اصفرشاحب
المدى الحراري	60-35	70-35
تركيزPH	7.5-3	7.5-4
%NaCL	5-2	5-2
كتاليز	+	+
الاوكسيديز	+	+
ماكونكي أكار	+	+
الاكار المغذي	+	+
الحركة	–	–
تحلل الجيلاتين	–	+
اختزال النترات	v	v
تحلل النشا	+	–
الكازائين	+	+
النمو اللاهوائي	+	+
اللاييز	+	–
اللسيثينيز	+	_
البروتيز	+	–

Glocos	+	+
Arabinos	+	+
Lactose	−	+
fructos	+	+
Galactos	+	+
Maltos	+	+
mannos	-	+
sorbitol	+	−
sucrose	+	+
trehalos	+	+
مانتول أكار	+	−
اختبارالاندول	−	+
اختبار المثيل الاحمر	−	−
فوكس بروس كور	+	+
استهلاك السترات	+	+

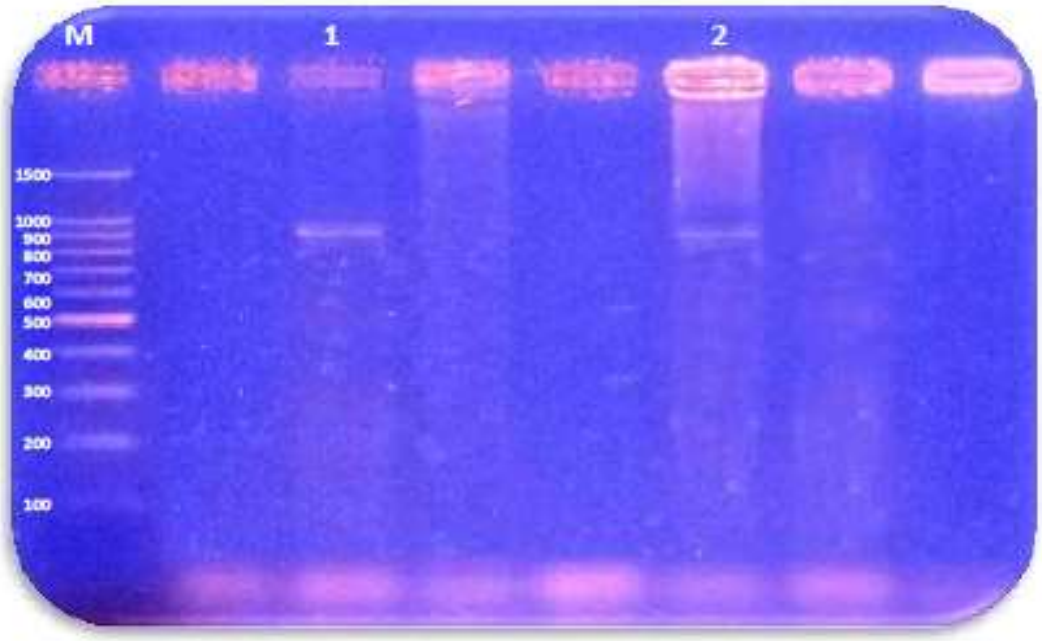
+ نتيجة ايجابية ، − نتيجة سلبية ، V نتيجة متباينة

كما بينت النتائج مدى مقاومة وحساسية العزلات الجرثومية التابعة لجنس .Sulfolobus spp باستخدام (9) مضادات حيوية وفقا لطريقة Kirby-Bauer بطريقة نشر الأقراص (CLSI,2010) على وسط Muler Hinton agar . اذ اظهرت الدراسة الحالية لعزلات الاركيا مقاومة عالية لجميع المضادات الحيوية المستخدمة باستثناء مضـــــاد ال Gentamicin اذ اظهـــــر النـــــوع Sulfolobus acidocaldarius حساسية عالية لهذا المضاد الصورة (5) . تملك البكتريا عدة آليات لمقاومة المضادات الحيوية وذلك من خلال منع المضاد من الوصول الى الموقع الهدف عن طريق تقليل نفاذية اقنية الغلاف الخارجي، تكوين هدف بديل للارتباط الحياتي ، تحطيم المضاد او تثبيط نشاطه بوجود انزيمات تنتجها البكتريا مثل B-Lactamase علاوة على ذلك فان الاركيا تكتسب آلية مقاومة اخرى للبنسلينات وذلك لاحتواء جدارها على روابط ايثرية3-B1 بدلا من-B1 4 في البكتريا الحقيقية والتي تعد هدفا للبنسلينات [31,32].

الصورة (5) مقاومة الـ Sulfolobus acidocaldarius للجنتامايسين

كما تم خلال الدراسة الحالية استخلاص وتنقية المادة الوراثية DNA للعزلات التابعة لجنس .Sulfolobus spp، بينت الدراسة الحالية ان العزلات التابعة لهذا الجنس اعطت نتيجة موجبة لتضخيم جين 16srRNAوبحجم 950-930 زوج قاعدي تقريبا، اذ قدرت الأوزان الجزيئية للDNAاعتمادا على المسافات التي قطعتها هذه

الجزيئات في الهلام والتي تتناسب عكسيا مع أوزانها الجزيئية وباستخدام قطع من ال DNA معروف الوزن الجزيئي هي الدلائل الحجمية اذ استعمل الدليل DNA Ladder الذي اعطىعلى هلام الاكاروز احدى عشر حزمة ذات أوزان جزيئية معلومة. الشكل(6). [3] .



الصورة (6) حزم تضاعف الـ DNAالمعزول من الانواع التابعة لجنس .Sulfolobus spp بواسطة مؤشر الـ PCR والمرحلة على هلام الاكاروز

M: تمثل الدليل ألحجميDNA Ladder

1: يمثـــل الـــ DNA الكروموســـومي المتضـــاعف للنـــوع Sulfolobusacidocaldarius

2: تمثـــل الـــ DNA الكروموســـومي المتضـــاعف للنـــوع Sulfolobussolfataricus

لذا يمكن القول ان وسط P.YEو L.B يعد وسطاً مثاليا لعزل الأفراد التابعة لجنس ..Sulfolobus spp اذ أظهرت الانواع المدروسة تبايناً شكليا واضحا في ألوان المستعمرات على هذه الأوساط . كما أبدت الانواع المدروسة مقاومة عالية لمعظم المضادات الحيوية في الدراسة الحالية باستثناءالنوع Sulfolobusacidocaldarius، الذي اظهر حساسية عالية لمضاد الـ Gentamicin .وأدت صعوبة الحصول على جداول تشخيصية تعتمد على الصفات الشكلية والكيموحيوية والفسلجية بدقة الى استخدام تقنية الـ PCR والذي كان له الأثر الكبير في تاكيد التشخيص. في حين تم الحصول على عزلات تابعة لجنس ال .Sulfolobus SPPعن طريق استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وظهور حزم واضحة بعد إجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز .

المصادر

1. AL-Tayar, Taha A., Mustafa, Muath.H.and AL-Naqib, Salim.Q. (1992). Pollution ofTigris river water by natural Acid Seepages in Zanquba area- South of Mosul City Center.18th, WEDC, Conf. Kathmandu – Nepal. Water Engineering management.

2. DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89:5685–5689.

3. Forterre, P.; Gribaldo, S. and Brochier- Armanet, C. (2007).Natural history of the archaeal domain. In Garrett, R. A. and Klenk, J. (ed) Archaea: evolution physiology and Moleculor biology. Black well publiching. PP: 17-28.

4. Fuhrman,J.A. and Ouverney,C.C. (1998). Marine microbial diversity studied via 16s rRNA sequences: Cloning.Vol. 32,(1):3-15.

5. Fuhrman,J.A., McCallum,K., and Davis,A.A. (1992). Novel major archaebacterial group from marine plankton.Nature 356: 148-149.

6. Mustafa, Muath, H., Al-Ni'ma, Bsheer A. & Al-Qaddo, Salma M. (1997).Evaluation of some water resources at Al-Jaren location mosul-Iraq.Scientific jour, vol. 4, No. 1, p84-95.

7. خلف، صبحي حسين(1987) . علم الأحياء المجهرية المائي. مديرية دار الكتب للطباعة والنشر. كلية العلوم ،جامعة الموصل : 11- 60 ص.

8. AL-Modhidi, Jabbar.F.and Adnan,H. Mahmood. (1987). The potentiality of thiobascillusThioxidans in leaching Uranium from phosphate mine ORE. JBSR., 18 (I): 91-101 .

9. Mustafa, M. H. and AL-Qaddo. S. M. (1996). Natural environment of Al-Zanquba area. AL-Aphidian Engineering, J., 4 (1-2): 26-40.

10- كنة ، عبد المنعم علي حسين(2001). دراسة نوعية المياه الجوفية الكبريتية في محافظة نينوى . رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الموصل .

11. Al-Sawaf, F.D.S. (1977). Sulphate Reduction &Sulphur Deposition in the lower Fars formation, Northern Iraq. Economic Geology Journ, vol. 72, pp. 68-618.

12. Boone, D. R.; Garrity, G. M. and Holt, J. G. (2001). Bergeys Manual of Systematic Bacteriology 2nd.ed., Vol. 1. The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Springer-Verlag, New York, Berlin Heidelberg.,PP:169-355.

13. Emtiyazi , G.(2002)."Soil microbio-logy" Mani Publisher, Esfahan. PP: 125-159.Extreme Environments, Edited byHorikoshi, K. and Grant, W.D., NY. Wiley,pp: 93–132.

14. Balows, A., H. G. Truper, M. D workin, W. Harder and K. –H, Schlefer (eds), (1992). The prokaryotes.2nd edn. Springer – Verlag, New York, 4: 4126.

15. Barans, S. M. and S. A. NierZwicki – Bauer.(1997). Microbial diversity in Ocean, Surface and Sub surface envieronments, Chaper Z. In Ban field, J. F. and K. H. Nealson (eds), Geomicrobiology: Interactions Betw-een Microbes and Minerals, Rev. Mineral., 35: 35-79.

16. Allen, M. B. (1959). Studies with cyanidium caldarium, ananomalously pigmented chlorophyte. Arch. Microbiol.,32:270–277.

17. Huber,R. and Stetter,K.O. (1992). The order thermoproteales. In:The Prokaryotes. A handbook of Bacteria:Ecophysiology, isolation, identify-cation, applications, Vol.1.Edited by Balows, Trüper, Dworkin, Harder, and Schleifer.NY.: Springer-Verlag., PP: 677-683.

18. Huber,R.;Stohr,J.;Hohenhaus,S.;Rachel,R.;Burggraf,S.;Jannasch,H.W.and Stetter,K.O. (1995).Thermococcuschitonophagus, sp.nov, a novel, chitin-degrading, hyperthermophillicarch-aeum from a deep-sea hydrothermal vent environment. Archives of Microbiology,164: 255-264.

19. Motamedi, S.; Marandi, R.; Mazhar, S.F. and Tahvidari, K. (2011). The Identification of sulfolobus species form a Biocorrosion of Waste water pipes Int. J. Ind. Chem., 2 (1), pp :63-67.

20. Segerer, A. H. and. Stetter, K. O. (1992). The order Sulfolobales.In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W.Harder, and K.-H. Schleifer (Eds.) The Prokaryotes, 2nd ed. Springer-Verlag. New York, NY., 684-701 .

21. Wolfe, R.S. (2006). The Archaea: Apersonal OverView of the formative years. In:prokaryotes .Ahandbook on the Biology of Bacteria: Archaea. 3rd ed., pp: 3-289.

22. Akokar,A.V. (2009). Isolation and Characterization of Halophilicarchaea production, Characterization and application of Extra cellular protease from Halo bacterium Sp., PHD. Thesis in Department of microbiology and biotechnology Centre faculty of Science,INDIA .

23. Trent, J. D.; Gabrielsen, M.;Jensen, B.; Neuhard, J.and Olsen J. (1994).Acquired thermotolerance and heat-shockproteins in thermophiles from the three domains. J. Bacteriol.,176:6148-6152.

24. Kagawa, H. K.; Osipiuk, J. ; Maltsev, N. ; Overbeek, R. ; Quaite-Randall, E.; Joachimiak, A.and Trent. J. (1995).The60 kDa heat shock proteins in the hyperthermophilicarchaeon Sulfolobus shibatae. J. Molec. Biol., 253:712-725.

25. Lopez-Garcia, P., and Forterre, P. (1999). Control of DNAtopology during thermal stress in hyperthermo-philicarchaea: DNA topoisomerase levels, activities andinducedthermoto-lerance during heat and cold shock.Molec .Microbiol., 33:766-777.

26. Weiss, R. L. (1974). Subunit cell wall of Sulfolobus acidocaldarius. J. Bacteriol. 118:275-284.

27. Taylor, K. A.; Deatherage, J. F. and Amos, L. A. (1982) .Structure of the S-layer of Sulfolobus acidocaldarius. NatureLond. 299:840-842. Thermo-philic archaeobacteria, In: MolecularBiology and Biotechnology of Extremophiles,Edited by Herbert, R.A.Blackie, NY.

28. Deatherage, J. F.; Taylor, K. A.and Amos, L. A.(1983).Threedimensionalarrangement of the cell-wall protein of Sulfolobus acidocaldarius. J. Molec. Biol., 167:823-852.

29. Lembacke, G.; Dürr, R.; Hegerl, R.and Baumeister, W. (1991).Image analysis and processing of an imperfect twodimensionalcystal: the surface layer of the archaebacteriumSulfolobus acidocaldariusi re-investigated. J.Microscopy., 161:263-278.

30. Lembacke, G.; Baumeister, W. ; Beckmann, E . and Zemlin, F. (1993). Cyro-electron microscopy of the surface protein of Sulfolobus shibatae. Ultramicroscopy., 49:397-406 .

31. Neu,H.C.(1989).New understandings of resistance and modes of action: over view of mechanisms of bacterial resistance. Diagn.Microbiol. Infect., 12: 109 - 116.

32. Willey, J.M.; Sherwood, L.M. and Wool verton, C.J. (2009).Prescott's principles of microbiology,the McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

Isolation and identification of SulfolobusSPP. From hot spring using classical and molecular methods in Hammam AL-Allel by nenavah governorate

WaadMohmoodRaof[1],Basima A. Abdullah[2], Mohammed Abdul-Razak Al-Qatan[2]

[1]*College of Science ,Dep. Biology , microbiology ,University of Tikrit , Tikrit , Iraq*
[2]*College of Science ,Dep. Biology , microbiology , University of Mosul , Mosul , Iraq*

(Received:18/10/2013---- Accepted:7/4/2013)

Abstract

The isolates of Sulfolobus were identified depending on Microbiological characteristics as colour , consistency of colonies , in addition to biochemical characteristics of growing colonies . also the susceptibility of antibiotic tests, moreover to physiological and molecular characteristics. So two species were obtained : Sulfolobus acidocaldarius , Sulfolobus solfataricus . The result of antibiotic sensitivity of the species was in dictated their high resistance to all antibiotics under study , except Sulfolobus acidocaldarius which gave high sensitivity to Gentamicin . The isolates were indicated good growth at optimum temperature between (37-40)c^{o} , also isolates of SulfolobusSPP.gave growth at rang of temperature between (35-70) C^{o} . When we cultivated the isolates at different level of PH the SulfolobusSPP. Were grown at PH between (3-7). And the best at (3-4). And when the isolates were cultivated at different level of sodium chloride , the species of SulfolobusSPP. Gave best growth at (2-3%) of NaCL. The PCR technique were done based on amplification of genomic DNA using special primer for Archaeal species which indicated distinct bands with molecular weight of 930-950 bp when they electrophrized on agaros gel .