تشخيص البكتريا المنتجة للسليلوز المعزولة من امعاء الكارب الاعتياديCyprinus carpio والكارب العشبي Ctenopharyngodon idella المتواجدة في مياه مدينة البصرة

تماضر محمد خريبط
فرع الاحياء المجهرية كلية الطب البيطري جامعة البصرة

الخـــلاصـــة
تمت في دراسة سابقة عزل بكتريا منتجة للسليلوز من امعاء اسماك الكارب الاعتيادي Cyprinus carpio والكارب العشبي Ctenopharyngodon idella والتي تم اصطيادها من مياه مدينة البصرة. تم الاحتفاظ بهذه البكتريا بعد تنقيتها في اوساط الحفظ حتى يتم تشخيصها لاحقاً. تم في هذه الدراسة تشخيص البكتريا بعد تنشيطها واجراء الفحوصات المظهرية والفسلجية والاختبارات الكيموحيوية لها وقد كانت العزلات الناتجة من كلا نوعي الاسماك تتصف بالصفات التالية:
بكتريا هوائية، موجبة لصبغة كرام، مكونة للسبورات بالاضافة الى باقي الصفات البايوكيمياوية، حيث عزيت في النهاية الى انها عزلات ضمن جنس الـ Bacillus والنوع Bacillus circulans.

المـقـدمـــة
تعتمد اغلب الكائنات الحية بشكل رئيسي على المواد الكاربوهيدراتية والانزيمات المحللة لتلك المواد والتي تلعب دوراً مهماً في تحللها الى مكوناتها الاولية لتستفيد منها. ومن هذه الانزيمات هو انزيم السليليز cellulose، فمعظم شعب اللافقريات تتضمن افراد قادرة على انتاج هذا الانزيم بينما الفقريات والتي تبدو انها تفتقد هذه القابلية على انتاج هذا الانزيم (١).
كان يعتقد سابقاً ان الاسماك من الفقريات التي تمتلك العديد من الانزيمات المحللة للكاربوهيدرات ومنها الـ lactase, amylase, invertase, maltase and sucarase بينما تفتقر لانزيم السليلوليز (٢)، الا ان البحوث الحديثة اثبتت وجود فعالية سليلوليزية في العديد من انواع الاسماك ومنها الدراسة التي قام بها (٣) والتي اثبت فيها وجود فعالية سليلوليزية في ١٧ جنس من اصل ٦٢ جنس من الاسماك التي استخدمها في دراسته، ثم تلتها دراسات اخرى اثبتت دور الاحياء المجهرية الدقيقة في تحلل مادة السليلوز داخل امعاء الاسماك ومنها الدراسة التي قام بها (٤).
اشار (٥) الى انه قام بعزل بكتريا محللة للسليلوز من امعاء اسماك الـ (Lagodon (pin fish rhomboides وقد قام بتشخيصها (٦). كما ان الباحثة مع اخرين اثبتت في دراسة سابقة (٧) تواجد البكتريا المحللة للسليليلوز في امعاء اسماك الكارب الاعتيادي والعشبي المتواجدة في مياه مدينة البصرة وهذه الدراسة تعتبر مكملة لها.

الـمـواد وطـرائق العمـل
١. العـزل
تم عزل البكتريا المحللة للسليلوز من امعاء اسماك الكارب الاعتيادي والكارب العشبي على وسط carboxymethyl cellulose agar (CMC-

agar)، تمت تنقية العزلات والبالغ عددها حوالي ٢٢ عزلة لكلا نوعي الاسماك واحتفظ بها في اوساط الحفظ المائلةslant agar لغرض تشخيصها فيما بعد.

تم تنشيط العزلات على وسط peptone-yeast extract glucose mediumحيث حضنت بدرجة حرارة ٣٧م٠ ولمدة ٤٨-٧٢ ساعة لغرض استخدامها في اختبارات التشخيص.

٢. التشخيص

تضمن التشخيص اختبار الصفات المظهرية والفسلجية بالإضافة إلى الاختبارات البايوكيميائية، حيث تضمنت الصفات المظهرية:

١. تصبيغ كرام وشكل الخلايا البكتيرية
٢. الحركة
٣. تكوين السبورات وموقعها

إما الصفات الفسلجية فكانت:

١. النمو في درجة حرارة ٦٥م
٢. النمو على الوسط المغذي Nacl 7%
٣. النمو في درجة حرارة ٥٠م
٤. النمو اللاهوائي anaerobic agar

تم ترتيب الاختبارات البايوكيميائية في جدول رقم (١) واستخدم الـ API system ، كما اعتمد الجدول رقم (٢) في تشخيص نوع جنس البكتريا وذلك باعتماد المصدر (٨) كمفتاح تصنيفي، بالإضافة إلى اختبار إنتاج الصبغة من قبل البكتريا.

النتائج

كانت نتيجة الصفات المظهرية للعزلات ١-١٨ إنها بكتريا عصوية، هوائية، موجبة لصبغة كرام، متحركة، مكونة للسبورات والسبورات مركزية الموقع كما يتضح ذلك في شكل رقم (١).

أما الجدول أدناه فأنه يوضح الاختبارات التشخيصية المعتمدة في تشخيص البكتريا المعزولة، حيث يلاحظ في الجدول رقم (١) الصفات الفسلجية والاختبارات البايوكيميائية للعزلات تحت الدراسة. أما الجدول رقم (٢) فلوحظ من خلال تتبع المفتاح التصنيفي تحديد النوع species التابع لجنس البكتريا المحللة للسليلوز.

أما العزلات ١٨-٢٢ فاظهر اختلافاً في الصفات عن العزلات الأخرى، حيث إنها بكتريا عصوية لاهوائية إجبارية موجبة لصبغة كرام متحركة ومكونة للسبورات، كما إنها أعطت نتائج مختلفة في الاختبارات البايوكيميائية.

المناقشة

تستوطن القناة المعوية لأسماك الكارب الاعتيادي والعشبي العديد من البكتريا التعايشية micro flora المختلفة التغذية، والتي تتضمن الهوائية واللاهوائية. ومن البكتريا اللاهوائية التعايشية التي تم دراستها في الكارب الاعتيادي هي Aeromonas hydrophila, Bacteroides type A, Pseudomonas citrpbacter freundii, Micrococcus sp. أما البكتريا الهوائية التعايشية في الكارب العشبي فهي A. hydrophila, Bacteroides type A. (9) حيث لوحظ أنها جميعاً تساهم في إنتاج أنزيمات لها أهميتها في الهضم في الأسماك.

وبما أن الإنزيمات الموجودة في أمعاء الأسماك تأتي أما من البنكرياس أو من الخلايا الفارزة الموجودة في جدار الأمعاء، بالإضافة إلى الإنزيمات التي تنتجها الإحياء المجهرية التعايشية في الأمعاء والتي لها دور في هضم العديد من المواد كالسليلوز والتي عادةً مايكون القليل من الحيوانات قادرة على هضمه بالاعتماد على أنزيماتها (١٠). اذا لابد من وجود بكتريا مسؤولة عن أنتاج هذا الإنزيم، والتي اتضح فعلاً من خلال هذا البحث أن العزلات من ١-١٨ منتجة لإنزيم السليليز cellulose- producing وهي عزلات لبكتريا عصوية هوائية، لاهوائية، اختيارية، موجبة لصبغة كرام، متحركة ومكونة للسبورات، أما نتائج الاختبارات البايوكيميائية فقد تمثلت بالجدول رقم (١). كما لوحظ أن العزلات قادرة على إنتاج صبغة صفراء إلى بنية، وبمقارنة هذه الصفات مع الجداول التشخيصية المأخوذة من المصدر (١١) اتضح إن هذه العزلات تعود إلى جنس الـ Bacillus وعند أجراء المفتاح التصنيفي فأن العزلات عزيت للنوع Bacillus circalans. وهذا يتفق مع دراسة قام بها (١٢) حيث قام بتشخيص البكتريا المنتجة للسليليز والمعزولة من القناة الهضمية لأسماك الـ (tilapia) Oreochomis mossambica واسماك الكارب العشبي Ctenopharyngodon idella والتي وجد بأنها تعود لجنس الـ Bacillus circalcans, Bacillus megaterium.

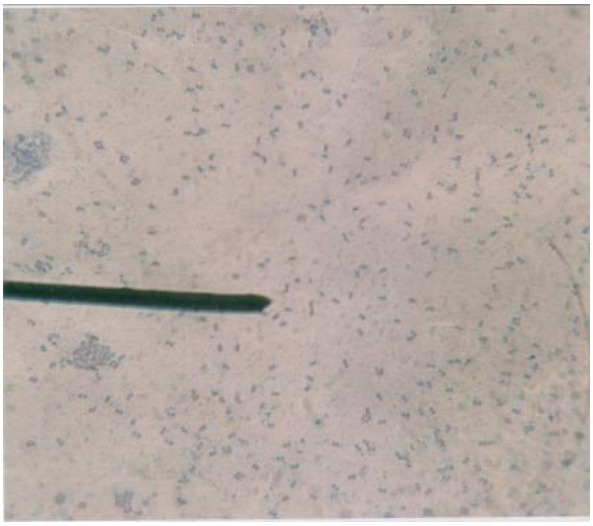
آما بالنسبة للعزلات من ١٨-٢٢ وبعد ملاحظة صفاتها التشخيصية اتضح بأنها تعود الى جنس الـ Clostridium ، والفرق بينها وبين العزلات السابقة يمكن ملاحظتها بسهولة حيث إن الأولى لاهوائية إجبارية بينما الثانية هوائية أو لاهوائية اختيارية، بالإضافة الى الاختلاف في شكل الخلية وحجمها والسبورات التي تكونها (١٢).

وهذا يتفق مع (١٠) الذي أكد على عزل البكتريا المحللة للسليلوز من أمعاء اسماك الـ pin fish وان ٢٥ عزلة من اصل٣٦ وجدت بأنها تعود الى الأجناس Clostridium, Eubacterium, Fusobacterium and Bacteroides type A and B.

يعزى الاختلاف في تنوع الإحياء المجهرية التعايشية في الأسماك الى عدة أسباب منها أسلوب تغذية الأسماك، الوقت الذي يتم فيه الهضم، وقت طرح الفضلات، تركيب القناة المعدية المعوية، مكونات سوائل الهضم والظروف الفيزيائية للحيوان المضيف بالإضافة الى جنس الأسماك نفسها (١١).

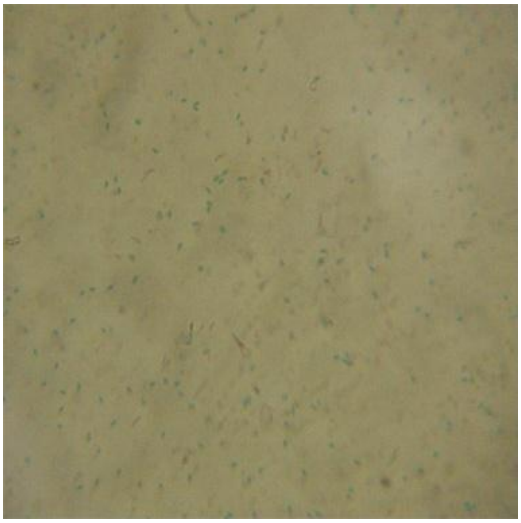
V: Variable character
CT: Catalase
IN: Indole
VP: Vogas prskuor
NR: Nitrate reductase
UR: Urease
GE: Hydrolysis of Gelatin
ST: Hydrolysis of Starch
GL: Glucose

strain	physiological				biochemical															
	Growth at 50c	Growth at 65c	Growth on Nacl7%	Growth in anaerobic	CT	IN	VP	NR	UR	GE	starch	GL	SC	AR	LC	ML	MN	RH	AR	LY	CA
١	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
٢	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
٣	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
4	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
٥	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
٦	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
٧	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
٨	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
٩	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
١٠	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
١١	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
١٢	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
١٣	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
١٤	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
١٥	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
١٦	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
17	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
١٨	+	_	V	V	+	+	_	V	+	+	+	+	_	_	+	_	+	+	+	+	V
19	+	_	+	+	_	+	_	_	_	+	+	+	_	_	+	_	_	+	_	+	+
20	+	_	+	+	_	+	_	_	_	+	+	+	_	_	+	_	_	+	_	+	+
21	+	_	+	+	_	+	_	_	_	+	+	+	_	_	+	_	_	+	_	+	+
22	+	_	+	+	_	+	_	_	_	+	+	+	_	_	+	_	_	+	_	+	+



شكل (١) تصبيغ كرام لبكتريا *Bacillus Circulanus*

SC: Sucrose
AR: Arabinose
LC: Lactose
ML: Maltose
MN: Mannitol
RH: Rhamnose
AR: Arginin
LY: Lysen
CA: Hydrolysis of casein



شكل (٢) تصبيغ السبورات لبكتريا
Bacillus Circulanus

المصادر

المصادر العربية

١. الدبيكل، عادل يعقوب، التميمي، تماضر محمد والمهناوي، بتول حسين.(٢٠٠٥) تواجد البكتريا المحللة للسليلوز في الأمعاء ونسبة السكر في الدم لأسماك الكارب الاعتياديCyprinus carpio والكارب العشبي Ctenopharyngodon idella .

المصادر الأجنبية

1. Yoko, Y. and Yasumasu, T. (1964). The distribution of cellulose in invertebrates. Comp. Biochem. Physio. 13: P 223-233.

2. Phillips, A. M. Jr. (1969). Nutrition, digestion and energy utilization. In fish physiology (Eds Hora, W. S. and Randall, D. J.) 1: 391-432. New York: Academic Press.

3. Stickney, R. R. and Stumway, S. E. (1974). Occurrence of cellulose activity in the stomach of fishes. J. Fish Biol. 6: 779-790 .

4. Trust, T. J., Bull, L. M., Currie, B. R. and Buckley, J. T. (1979). Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal micro flora of the grass carp Ctenopharyngodon idella, gold fish Carassius auratus, and rainbow trout Salmo gairdneri. J. Fish Res. Board Can 36: 1174-1179.

5. Luczkovich, J. J. and Stellwag, E. J. (1993). Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish, Logodon rhomboids: size-related changes in diet and microbial abundance. Mar. Biol. 116: 381-388.

6. Luczkovich, J. J., Smith, T. D. and Stellwag, E. J. (1995). Characterization and ecology of carboxymethyl cellulose-producing anaerobic bacterial

communities. Associated with the intestinal tract of the pinfish, Logodon rhomboids. App. And Envir. Microb. 813-816.

7. Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G. (1981). The prokaryotes. A hand book on habitats, isolation, and identification of bacteria. 11. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, New York.

8. Sugita, H. Tokuyama, K. and Deguchi, Y. (1985). The intestinal micro flora of carp Cyprinus carpio, grass carp Ctenopharyngodon idella and Tilapia Sarotherodon niloticus. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 51: 1325-1329.

9. Sugita, H., Kawasaki, J. and Deguchi, Y. (1997). Production of amylase by the intestinal micro flora in cultured fresh water fish. Lett. In Appl. Microb. 24: 105-108.

10. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2000). 2nd. Ed.

11. Suha, S., Roy, R. N., Sen, S. K. and Ray, A. K. (2006). Characterization of cellulose- producing bacteria from the digestive tract of Tilapia Oreochromis mossambica (peters) and grass carp Ctenopharyngodon idella (Valenciennes). Aqua. Resea. 37: 380.

٥- د. بهاء الدين حسين معروف،الوقاية من الإشعاعات المؤينة، منشورات منظمة الطاقة الذرية العراقية، ١٩٨٩.

٦- محاضرات الدورة التدريبية الإقليمية حول البرنامج المهني الأساسي للوقاية من الإشعاع ، الوكالة الدولية للطاقة الذرية ،الجزء الثاني ،دمشق ،١٩٩٧ .

7-Glenn ,I. Knoll ,Radiation Detection And Measurement ,2nd Edition, New York,1979.

8-Ludlum Measurements, INC. 501 Oak St., P.O.Box810,Sweetwater.

٩- محاضرات الدورة التدريبية الإقليمية حول البرنامج المهني الأساسي للوقاية من الإشعاع، الوكالة الدولية للطاقة الذرية، الجزء الثالث ،دمشق ١٩٩٧.

10- J.G. Wilson, Comic Rays, THE University of Leeds, The Wykeham Science Series,1975.