تشخيص بعض انواع الـ Archaea من مياه الينابيع الحارة في حمام العليل بمدينة الموصل بالاعتماد على الصفات المظهرية والفحوصات الايضية و تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

Identification of Archaea species from hot spring water in Hammam AL-Allel at Mosul Governorate

محمدعبدالرزاق ابراهيم القطان باسمة احمد عبدالله وعد محمود رؤوف*

كلية العلوم/ جامعة الموصل

كلية العلوم/ جامعة تكريت*

Mohammed A .AL-Qatan Basima A. Abdullah Waad Mahmood Raoof*

College of Science/ University of Mosul

* College of Science/ University of Tikrit

المستخلص

عزلت وشخصت الأفراد التابعة لمملكة الاركيا (البكتريا القديمة) من مياه الينابيع الحارة في منطقة حمام العليل بمدينة الموصل خلال عام2012. اذ جمعت 75عينة ماء من 5 ينابيع حارة اذ عزلت الانواع التابعة لمملكة الاركيا باستخدام اوساط زرعيه اعتيادية وانتخابية وشخصت اعتماداً على الصفات المظهرية كشكل ولون وقوام المستعمرات . اظهرت الانواع المعزولة نموا جيدا في درجات الحرارة التي تراوحت بين 37-40م فالجراثيم التابعة لجنس *Halobacterium* spp. اظهرت نموا في مدى حراري تراوح بين30-50°م , بينما العزلات التابعة لجنس *Sulfolobus* spp. فنمت بمدى حراري تراوح بين35-70°م. وعند تنميتها بمديات مختلفة من الدالة الحامضية ، اظهرت الانواع التابعة لجنس *Halobacterium* spp. قدرة على النمو بدالة حامضية تراوحت بين 4-7 وكان أفضل نمو لها عند 3.5-4.5، كما نمت العزلات التابعة لجنس *Sulfolobus* spp. عند دالة حامضية تراوحت بين 3-7و كان افضل نمو لهاعند 3-4. وعند تنمية العزلات بتراكيز متغايرة من كلوريد الصوديوم أعطت الأفراد التابعة لجن س *Halobacterium* spp. أفضل نمو عند تركيز 4.5 -5.5%، كما أعطت الأفراد التابعة لجنس *Sulfolobus* spp. أفضل نمو عندالتركيز 2-3%من كلوريد الصوديوم. تم اجراء تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المعتمد على تضخيم الـ DNA المجيني وذلك باستخدام بادئات خاصة بأفراد مملكة الاركيا لتأكيد تشخيص الانواع قيد الدراسة ولوحظ ظهور حزم لثلاث عزلات بوزن جزيئي تراوح بينً 930-950 زوج قاعدي تقريبا مقارنة بالدليل الحجمي 100bp، بعد إجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز Agaros اظهرت نتائج التشخيص شيوع ثلاث انواع من الاركيا هي:- *Halobacterium salinarum* *Sulfolobus solfataricus, Sulfolobus acidocaldarius* .

الكلمات المفتاحية : الاركيا ، مياه الينابيع الحارة ، *Halobacterium* spp ، Sulfolobus species

ABSTRACT

Isolate, Identify of some species belonging to Archaea from water of hot and sulphid springs in Hammam Al-Allel City/ Nenavah Governorate. Seventy five samples were collected from hot springs during 2012. The Archaea species were isolated using ordinary and selective media then identified according to morphological characters such as shape, colour, consistency of colonies,The isolated Archaeal species showed optimum growth at temperatures between 37-40 C°, while *Halobacterium spp.* grown at 30-50 C°, and *Sulfolobus spp*. between 35-70 C°. and when grown in different levels of pH. The results showed the ability of *Halobacterium spp*. to grow at pH between 4-7 and optimum growth at 3.5-4.5, while *Sulfolobus spp.*was shown good growth at 3-7 and optimum growth at 3-4, when grown in different concentrations of sodium chloride.The results showed that *Halobacterium spp.*were grow well in concentrations between 4.5-5.5% while *Sulfolobus spp.*were grown in concentrations between 2-3%. PCR technique based on amplification of genomic DNA using Specific primers for Archaeal species, was used to confirm the identification of Archaeal and the result indicated one distinct band with molecular size of 930-950 bp in comparison with DNA ladder after electrophoresis on agaros gel.The result of identification showed three species of Archaea in these studied springs, *Sulfolobus solfataricus, Sulfolobus acidocaldarius, Halobacterium salinarum*.

Keywords: Archaea, Hot spring water, Halobacterium spp. , Sulfolobus species

المقدمة

تعدالآركيا اليوم احدى امبراطوريات الحياة الثلاث فهي كائنات بدائية النواة ازدهرت على الارجح في مواطنها منذ اكثر من (3) بليون سنة [2,1] اذ انها استوطنت البيئات المتطرفة مثل البيئات الساخنة جداً او الساخنة الحامضية او المالحة جداً او العالية الحموضة والعالية القاعدية [3] . اثبتت العديد من الدراسات انها واسعة الانتشار في مختلف البيئات البرية والبحرية وحتى في درجات الحرارة المنخفضة وفي القنوات الهضمية لبعض الحيوانات [4] . ان احدى اكثر الاكتشافات الرائعة غير المتوقعة كانت اكتشاف اعداد هائلة من البكتريا القديمة غير المتطرفة وبعد العديد من الدراسات ولعدة سنوات عرض الباحثون نوعاً مختلفاً من البكتريا القديمة واسعة التنوع وغير متطرفة وبدرجات حرارة معتدلة وبيئات باردة تتضمن ترب ورو اسب البحيرات والبحار والمياه العذبة اي أنها توجد في كل مكان و

يؤشر هذا الاكتشاف بداية عصر جديد للتحري عن البكتريا القديمة وبشكل خاص خصائصها الوظيفية ودورها الحيوي بين مجتمعات الاحياء المجهرية[5]. تبدي البكتريا القديمة تنوعاً بيئياً واسعاً فهي واسعة الانتشا ر في مختلف البيئات الهوائية واللاهوائية كذلك في البيئات شديدة البرودة او البيئات الحامضية او البيئات مرتفعة الحرارة اي في البيئات المتطرفة [7,6] وتتواجد في الترسبات اللاهوائية للمستنقعات والبحيرات والعيون والمياه العذبة [8] وحديثاً وجدت في طبقات الفحم الحج ري [9]، كما تتواجد ايضاً في الهاضمات اللاهوائية لمياه المجاري وخزانات انتاج الغاز الحيوي كما تتواجد في القنوات الهضمية لبعض انواع الحيوانات كالأرانب والخيول والدجاج وفي معدة الحيوانات المجترة كالأبقار والاغنام [11,10]، كذلك تتواجد في تنخرات الاسنان الكبيرة [12] وفي المهبل [13] كما لوحظ ازدياد اعدادها في امعاء مرضى فاقدي الشهية [15,14] لذا بدأ الاهتمام جدياً بدراسة دورها في احداث الامراض لدى الانسان [12]. مجموعة الآركيا متنوعة جداً في الشكل والايض و قد تكون سالبة او موجبة لصبغة كرام . تظهر بأشكال مختلفة فقد تكون بشكل عصيات قصيرة او طويلة، خيطية او منحنية، وقد تكون كروية منتظمة او غير منتظمة وقد تكون بشكل تجمعات كاذبة قد تظهر بشكل حلزونيات او تجمعات متعددة الخلايا . وقد تكون مسطحة او متعددة الاشكال pleomorphic. متحركة او غير متحركة وتظهر مستعمراتها على سطح الاكا ر بعدة اشكال فقد تبدو دائرية محدبة او مسطحة وذات حواف منتظمة او متعرجة وربما خيطية منتشرة . تتراوح اقطارها ما بين (0.5-5) ملم [16] تظهر المستعمرات بيضاء اللون أو كريمية . او صفراء اوبنية غامقة أو حمراء او زرقاء فاتحة وهذه الصفات تعتمد على الجنس والنوع [18,17] تملك البكتريا القديمة خصائص مميزة تمكنها من التكيف كالدهون والتي تكون فريدة من نوعها بسبب تطور الكائن الحي والتي مكنتها من العيش في درجات الحرارة العالية او في البيئات الحامضية جداً او في كليهم ا [19] كما لوحظ وجود تحوير في الجدار الخلوي لـ Halococcus مكنها من العيش في البيئات عالية الملوحة كما لوحظ وجود اختلاف في تركيب الجدار الخلوي للبكتريا القديمة عن البكتريا النموذجية الاخرى اذ انها تكون فاقدة لمتعدد الببتيد سجل سابقاً فقدان لمتعد د الببتيد للنوع *Halococcus morrhuans* ولجنس الـ Sulfolobus فضلاً عن وجود بروتينات الهستون ووجود الروابط الايثرية في دهون الغشاء السايتوبلازمي [19]. تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص وتوصيف انواع الاركيا *Sulfolobus solfataricus* . بالطرق التقليدية اعتماداً على الفحوصات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية والفحوصات الايضية . وتأكيد تشخيص انواع الاركيا باستعمال تقنية الـ PCR من خلال استخدام بادئات متخصصة .

المواد وطرائق العمل

العينات: جمعت75 عينة ماء من 15 ينبوع حار في منطقة حمام العليل بمدينة الموصل 5 عينة/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 و غلفت بورق الألمنيوم لأحكام الغلق وحفظت في صندوق من الفلين المثلج لحين نقلها الى المختبر لإجراء فحوصات الاحياء المجهرية عليها.

التشخيص التقليدي : استخدمت الأوساط الآتية لعزل وتشخيص جرثومة الاركيا وسط خلاصة الخميرة peptone yeast extract ووسط الـ Laurie bertani لقحت الاوساط المذكورة وحضت في درجة حرارة 37±1 لمدة 24-48 ساعة، شخصت الانواع التابعة لجنس *Sulfolobus spp.* اعتماداً على مفاتيح التشخيص في موسوعة بيركي التصنيفية . باستخدام الاوساط الزرعية الانتقائية والفحص ألمجهري اذ شخصت الانواع البكتيرية اعتماداً على الصف ات المظهرية كشكل ولون وقوام المستعمرات بالاضافة الى الاختبارات الايضية من خلال تنميتها في درجات حرارية ودالة حامضية مختلفة وتراكيز متباينة من كلوريد الصوديوم .

التشخيص الجزيئي : تأكيد التشخيص من خلال التحري على المستوى الجزيئي باستخدام تفاعل بلمرة سلسلة DNA تقنية الـ PCR باستخدام بادئ خاص بمملكة الاركيا جدول (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 لإنجاز تفاعلات التضاعف باستعمال البرنامج المناسب الذي طبق على التفاعلات اللاحقة قيد الدراسة وكالاتي:

الخطوة	درجة الحرارة /م	الزمن/ دقيقة	عدد الدورات
1	94	4	1
	94	1	
2	55	1	35
	73	3	
3	72	1	1

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.

جدول (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	

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

تم التركيز على عزل وتشخيص الجراثيم التابعة لمملكة البكتريا القديمة Archaea والتي لم تعزل سابقاً في الدراسات المحلية من مياه الينابيع الحارة، وذلك للتعرف عليها ودراسة مواصفاتها بشكل اكثر تفصيلاً حيث تم تشخيص عزلات تابعة لجنس

الـ*Halobacterium* spp. وجنس الـ *Sulfolobus* ssp. شخصت باستخدام الأوساط الزرعية والفحص المجهري والفحوصات الكيموحيوية والايضية .كانت الانواع التي تم الحصول عليها تابعة لجنسين *Halobacterium* spp. و*Sulfolobus* spp. كما موضح في جدول (2)

جدول (2): انواع واعداد بكتريا الاركيا التي تم تشخيصها من مياه الينابيع قيد الدراسة

رقم الينبوع	الجنس	النوع	عدد العزلات
1	-	-	-
2	***Halobacterium***	***Salinarum***	**3**
	Sulfolobus	***acidocaldarius***	**5**
3		***solfataricus***	**5**
4	-	-	-
5	***Sulfolobus***	***acidocaldarius***	**2**
	العدد الكلي		**15**

تملك هذه الانواع التابعة لمملكة الاركيا القابلية على تحمل ظروف المنطقة البيئية من حيث درجات الحرارة العالية والملوحة والدالة الحامضية ووجود الكبريت بنسب عالية في هذه الينابيع الحارة التي عزلت منها ، تم تشخيص الانواع البكتيرية أنفة الذكر من خلال الصفات الشكلية والمظهرية حيث اظهرت مستعمرات الجنس Halobacterium وSulfolobus القدرة على النمو بشكل متميز و واضح على وسط النمو P-YE ووسط LB الصلب اذ بدأت بتكوين مستعمرات ذات ألوان مختلفة منها الأحمر ، البني، الأصفر، البرتقالي والكريمي وعند الفحص المجهري وجد بأنها بكتريا عصوية كروية سالبة لصبغة كرام غير متحركة، وذات حافات منتظمة ومحدبة وصغيرة وكما في جدول (3) ، حيث ظهرت بعض المستعمرات النامية بشكل متميز وواضح على وسط النمو PYE ووسط LB المدعمة بالأملاح مثل كبريتات المغنيسيوم المائية وكبريتات الامونيوم وكلوريد الحديد، والصوديوم والبوتاسيوم وكلوريد الكالسيوم، حمراء اللون على سطح الوسط الزرعي كما في صور ه (1) ، ان مستعمرات الجراثيم التابعة لجنس الـ *Halobacterium* تكون ذات لون احمر بني أو وردي خاصة وان نموها في الينابيع المالحة والحارة يؤدي الى استنفاذ الأوكسجين بسرعة وعلى الرغم من ان هذه الجراثيم هوائية لكنها تنمو في ظروف انخفاض الأوكسجين ، اذ يعمل بروتين الغشاء الـ Bacteriorhodopsin على تزويد الاركيا بالطاقة الكيميائية ويعطيها المظهر المحمر عن طريق مضخات الدفق [21,20] كما استطاعت النمو على وسط الاكار الاعتيادي ووسط اكار الماكونكي بسبب احتوائه على العوامل الغذائية المشجعة لنموها في حين ظهرت عصوية وعصوية كروية سالبة لصبغة كرام كما موضح في صورة (2) كما انها غير متحركة أو متحركة لكنها ضعيفة الحركة [16] وهذا ما يشير الى ان هذه المستعمرات تعود للجنس *Halobacterium* كما أظهرت عزلات اخرى مستعمرات مختلفة على وسط النمو P-YE ووسط LB، إذ اظهرت مستعمرات صفراء اللون ملساء محدبة كما في صورة (3)، في حين اظهرت العزلة الثانية مستعمرات صفراء شاحبة و كريميه ملساء كما في صورة (4) بالاضافة الى قدرتها على النمو بشكل واضح على وسط الاكار المغذي واكار الماكونكي وهذا ما اشار إليه [32] بالإضافة لـ[22] في امتلاك الأنواع التابعة لهذا الجنس Sulfolobus صبغات وألوان مخ تلفة فضلا عن ان مستعمراتها ذات اشكال مختلفة. في حين أظهرت نتائج الفحص المجهري بعد صبغ المسحات بصبغة كرام خلايا عصوية كروية سالبة لصبغة كرام وغير متحركة [22] وهذا ما يشير الى ان هذه العزلات تعود للجنس Sulfolobus .

جدول (3): الصفات الزرعية المظهرية و المجهرية للعزلات قيد الدراسة

الجنس	صبغة كرام	شكل الخلايا	قطر الخلايا	لون المستعمرات
***Halobacterium* spp.**	**سالبة**	**عصوية- كروية غير متحركة**	**1.2-5.0 مايكروميتر**	**حمراء وردية وبنية وبيضاء**
***Sulfolobus* spp.**	**سالبة**	**عصوية- كروية غير متحركة**	**0.7-2 مايكروميتر**	**كريمي برتقالي صفراء**

تأثير العوامل الفيزيائية على نمو العزلات التابعة للاركيا

درجة الحرارة

اظهرت الدراسة الحالية ان درجة الحرارة المثلى لنمو الانواع قيد الدراسة التابعة للاركيا تراوحت بين 37 -40م. حيث يزداد نشاط الانزيمات في هذه الدرجة الحرارية وتعمل زيادة مدة الطور اللوغارتمي. كما ان ارتفاع درجة الحرارة اكثر مما ينبغي يؤدي إلى مسخ الانزيمات الضرورية لحياة الخلية كما ويؤدي إلى اختزال الطور اللوغارتمي ، وقد تؤثر على دهون الغشاء الخلوي للخلايا البكتيرية ، كذلك فان انخفاض درجة الحرارة اقل مما ينبغي تؤدي إلى خمول أو توقف نشاط البروتينات [24,23,16] واظهرت النتائج ان درجة الحرارة الدنيا التي نمت عندها الانواع التابعة لجنس Halobacterium كان30م ودرجة الحرارة القصوى كانت 50م اما فيما يخص الانواع التابعة لجنس الـ Sulfolobus فقد أظهرت نموا بدرجة حرارة تراوحت بين 35-70م، ان تحمل هذه العزلات لدرجات الحرارة العالية قد يعود لعدة اسباب منها وجود بروتينات الصدمة الحرارية حيث تعمل هذه البكتريا على زيادة تكوين هذه البروتينات لتحمل الدرجات الحرارية القاتلة [26,25] بالإضافة إلى طبقة الـ S-layer كذلك دهون الغشاء السايتوبلازمي تكون ثنائية الكليسيرول رباعية الايثر وكمية ا لقواعد النيتروجينية ثلاثية الأواصر الكوانين والسايتوسين G≡C تكون في الاركيا أعلى من البكتريا التي لا تتحمل درجات حرارية عالية [26].

الدالة الحامضية

بينت النتائج قدرة العزلات التابعة لجنس الـ Halobacterium على التضاعف عند مدى دالة حامضية تراوح بين 5-8 بينما تراوح بين 4-7للعزلات التابعة لجنس الـ Sulfolobus إذ ان العزلات التابعة لجنس Halobacterium يتوقف نشاط وفعالية انزيماتها وثبات البروتينات ولا تستطيع النمو عند الدالة الحامضية اقل من 3 لان الحامضية العالية تقلل من نشاط البروتينات وتؤثر على عملية نقل المواد داخل الخلية وخارجها. بينما العزلات التابعة لجنس الـ Sulfolobus تستطيع النمو في البيئات الحامضية والحاوية على الكبريت

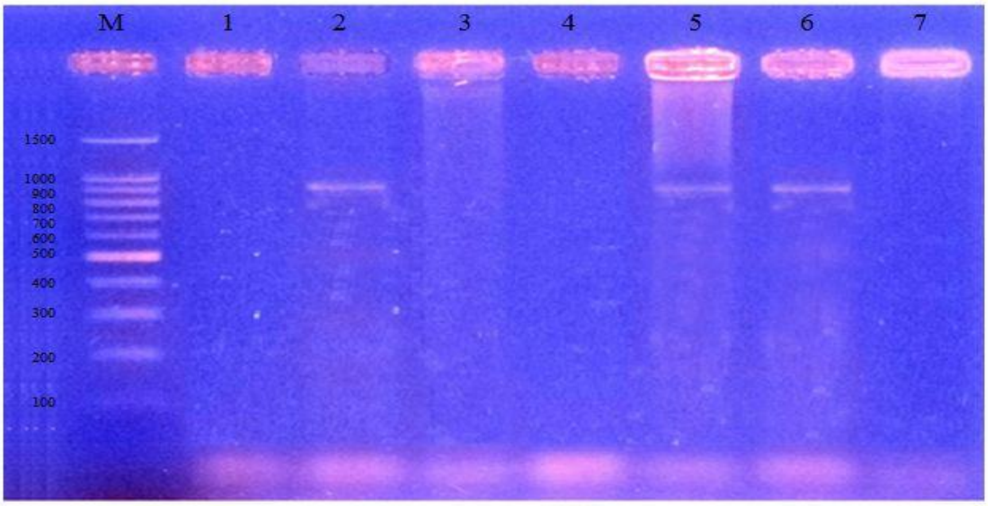
اذ انها قادرة على التضاعف عند دالة حامضية 3. كما ان هذه الجراثيم التابعة للاركيا تستطيع النمو في دالة حامضية متعادلة وهذا يعود إلى طبيعة التركيب الوراثي لهذه الجراثيم [28]، واشار [15] ان نمو العزلات التابعة لجنس الـ Halobacterium كان عند دالة حامضية مثالية تراوحت بين 3.5-4.5، بينما كان نمو الجراثيم التابعة لجنس الـ Sulfolobus عند الدالة الحامضية تراوحت بين 3-4.

تأثير كلوريد الصوديوم NaCl

بينت النتائج ان الجراثيم التابعة لجنس الـ Sulfolobus تستطيع النمو عند تركيز كلوريد الصوديوم تراوح بين 2-4.5% و كان افضل نمو لهذه الجراثيم بين 2-3% وأعلى تركيز نمت فيه5% . بينما نمت الجراثيم التابعة لجنس الـ Halobacterium عند التركيز 2-8% اذ كان افضل نمو لها 4.5-5.5% واعلى تركيز نمت عنده هذه الجراثيم 8% تقريبا بينما كان نموها ضعيفا عند تركيز 2% من كلوريد الصوديوم. ان التراكيز المختلفة من الكلوريد الصوديوم تحث إلى احداث تغيرات في مظهر البكتيريا التابعة لجنس الـ Halobacterium حيث تتواجد هذه الجراثيم بشكل خلايا عصوية منتظمة عند التراكيز المثالية لكلوريد الصوديوم لكنها تظهر بأشكال متغايرة عند نموها بتراكيز ملحية غير مثالية لكلوريد الصوديوم حيث يتحول شكلها من العصوي إلى الكروي والذي يعاني التحلل فيما بعد . ان الجراثيم التابعة لجنس الـ Halobacterium لديها استجابة للزيادة الحاصلة في تراكيز كلوريد الصوديوم الموجودة في البيئة حيث ان الجراثيم التابعة لهذا الجنس تكون ثابتة ومستقرة عند 2% وان ارتفاع تراكيز كلوريد الصوديوم يؤدي إلى تحلل خلايا هذه الجراثيم , اذان التحلل يحدث في الأوساط الزرعية بين 5-10% من كلوريد الصوديوم [29].ان الجراثيم التابعة لجنس الـ Halobacterium لها القدرة على تحمل الملوحة من خلال قابليتها على إحداث موازنة بين داخل الخلية ومحيطها . حيث ان جدران واغشية خلاياها ورايبوسوماتها تحتاج إلى نسبة من كلوريد الصوديوم للمحافظة ع لى الثبات اذ ان غلافها الخارجي يتكون من بروتينات سكرية ذات وزن جزيئي عالي مسؤول عن سلامة الجدار الخلوي وبسبب الربط المنتظم للوحدات الثانوية للبروتين السكري تكون متماسكة بوجود نسبة من كلوريد الصوديوم اذ تعمل على ضخ الملح الى خارج الخلية والماء الى داخل الخ لية باستمرار [28] كما ان كلوريد الصوديوم يحافظ على تماسك البروتينات في جدرانها ويساعد على دخول المواد المذابة الى داخل الخلية , لكن الزيادة في تركيز كلوريد الصوديوم اكثر من الحد المسموح يؤثر على ايض هذه الجراثيم ويصبح المظهر الخارجي للخلايا غير طبيعي ، بينما تتحلل هذه الجراثيم في تراكيز قليلة من كلوريد الصوديوم لأن الملح يحافظ على تماسك البروتين في جدرانها ويمنع تحللها ويساعد على دخول المواد المذابة في الماء إلى داخل الخلية[23,16].

تشخيص انواع الاركيا من خلال تضخيم الجين16SrRNA باستخدام تقنية البلمرة المتسلسل PCR

تم خلال الدراسة الحالية استخلاص وتنقية المادة الوراثية DNA لـ15 عزلة قيد الدراسة، واظهرت نتائج الترحيل الكهربائي ظهور حزم الـ DNA ذات وزن جزيئي 950 bp مقارنة مع الدليل الحجمي 100bp في ثلاث عزلات من عزلات الاركيا قيد الدراسة وهذا ما يؤكد نتائج التشخيص بالطرق التقليدية المظهرية، قدرت الاوزان الجزيئية للـDNAاعتمادا على المسافات التي قطعتها هذه الجزيئات في الهلام والتي تتناسب عكسيا مع اوزانها الجزيئية وباستخدام قطع من ال - DNA معروف الوزن الجزيئي هي الدلائل الحجمية اذ استعم ل الدليل DNA Ladder 100bpالذي اعطى على هلام الاكاروز احدى عشرة حزمة ذات اوزان جزيئية معلومة وكما في شكل (1)، استخدم البادئ الخاص بالجين 16SrRNA المستخدم في الدراسة الحالية لتحديد عزلات الاركيا ، اذ كانت حجوم الحزم التي حصل عليها تقريبا 950 زوج قاعدي، وفي دراسة اخرى انجزت من قبل [30] استخدم البادئ أنف الذكر لتحديد العزلات التابعة لمملكة الاركيا حيث كانت نتيجة التضخيم مقاربة لهذه الدراسة ، تم اعتماد 16SrRNA كجين حافظ للصفات الوراثية للسلالات الجرثومية لوجود مواقع معينة ضمن هذا الجين تمتاز بثبات تسلسلا ريوكليوتيدات عبر الاجيال والتي تعد هدفا لتشخيص الاجناس والانواع باستخدام تقنية الـ PCR [32,31].



شكل (1): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لـ DNA عزلات منتخبة من بكتريا الاركيا وانواع اخرى معزولة من مياه الينابيع الحارة باستعمال بادئات متخصصة للجين 16SrRNA على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت لمدة 75 دقيقة

المسار M: الدليل الحجمي (DNA Ladder100bp)

المسار2: ناتج عملية التضخيم للجين 16SrRNA لـ DNA العزلةالـ ***Sulfolobus solfataricus***

المسار5 : ناتج عملية التضخيم للجين 16SrRNA لـ DNA العزلة الـ ***Halobacterium salinarum***

المسار6 : ناتج عملية التضخيم للجين 16SrRNA لـ DNA العزلة ***acidocaldariusSulfolobus***

المسا ر: 17,4,3, : سيطرة سالبة

المصادر

1. 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.
2. Karlin, S., Brocchieril, T. J., Blaisdell, B. E. and Marazek, I. (2002). Heterogeneity of genome and proteome content in bacteria, archaea, and eukaryotes. Theor. Popul. Biol. 16: 367-390.
3. Woese, C.R. (1992). Prokaryotes systematic: The evolution of ascience, in the prokaryotes, 2nd ed., springer-Verlag, New York. pp:1-8
4. Schleper, C., Jurgens, G. and Jonuscheit, M. (2005). Genomic studies uneultivated archaea. Nat. Rev. Microbiol. 3: 479-488.
5. DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:5685–5689.
6. Gao, B. and Gupta, R. (2007). Phylogenic analysis of proteins that are distinctive of archaea and its main sub groups and the origin of methanooenesis, BAAS Genomic. 8: 86-108.
7. Brauer, S., Quiroz, H. C, Ward, R. J., Yavitt, J. B. and Zinder, S. H. (2011). Methamoregulaboonei gen. nov., Sp. Now., and acidiphilic methanogen isolated from and acidic peat bog. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 61: 45-52.
8. Dubey, S. K. (2005). Microbial ecology of methane emission in rice agroecosystem: areview. Appl. Ecol. Environ. Res. 3(2): 1-27.
9. Strapoc, D., Picardal, F.W., Turich, C., Schaperdoth, I., Macalady, J.L., Lipp, J.S., Lin, Y.S., Ertefai, T. F., Schubtz, F. and Hinrichs, K. (2008). Methane-producing microbial Community in a Coal bed of Ininois basin. Appl. Environ. Microbiol. 74 (8): 2424-2432.
10. Saengkerdsub, S. Anderson, R. C., Wilkinson, H. H., Kim, W. K., Nisbet, D. J. and Ricke, S. C. (2007). Identification and quantification of methanogenicarchaea in adult chichenCeCa. Appl. Environ. Microbiol. 73 (1): 353-356.
11. Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2003). Brock biology of micro organisms. 10th ed. Pearsom Education. Inc. USA.
12. Vianna, M. E., Conrads, G., Gomes, B. P. F. A. and Horz, H. P. (2009). T-RFLP-based mcrA gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a nove Methanobrevi bacterphylo type. Oral Micro boil. Immunol. 24: 417–422.
13. Armougom, F., Hery, M., Vialettes, B., Raccah, D. and Raoult, D. (2009). Monitoring bacterial Community of human gut microbata reveals an increase in lactobacillus in obese patients and methanogens in anorexic patients. Plos one. 4(9): 1-8.
14. Samuel, B. S., Hansen, E. E., Manchester, J. K., Coutinho, P.M., Henrissat, B. Fulton, R., Latreille, P., Kim, K., Wilson, R. and Gordon, J. I. (2007). Gonomic and metabolic adaptations of methano brevibacterSmithii to the humangut. PANS. 104 (25): 10643-10648.
15. 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.
16. Garrity, G.M. and Holt, J.G. (2001). Euryarchaeota, In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology 2nd, Vol. I. The Archaea and deeply bremching and photo trophic bacteria. Boone, D. R., et al., (ed). Springer- Verlag New York
17. Prescott, H. and Klein. (2011). Foundations in microbiology, 8thed. Hotfile Rapid share mega upload.
18. Brock, T. D. (1978). Thermophilic micro organisms and life at high temperatures. NY. Springer-Verlag. Berlin, Germany.
19. Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A. and Oren, A. (2004). Characterization of extremely *halophilc archaea* isolated from the Ayvzliksalterns, Turkey. World J. Microbiol. Biotechnol. 20: 719–725.
20. Andersson, M. (2009). Structural dynamics of light-driven proton pumps, Structure. 17(9):1265.
21. Stetter, K.O. (1998). Volcanoes, hydrothermal venting, and the origin of life. In:Volcanoes and the environment. Edited by Marti, J. and Ernst, G. J., Cambridge: Cambridge University Press.
22. Wolfe, R. S. (2006). The Archaea: Apersonal Over View of the formative years. In: prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria: Archaea. 3rd ed., pp: 3-289.
23. Akolkar, A.V. (2009). Isolation and Characterization of Halophilic archaea 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.
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 hyper thermophilic archaeon Sulfolobus shibatae. J. Molec. Biol. 253:712–725.

25. Lopez-Garcia, P., and Forterre, P. (1999). Control of DNA topology during thermal stress in hyper thermophilic archaea: DNA topoisomerase levels, activities and induced thermo tolerance during heat and cold shock. Molec. Microbiol. 33:766–777.

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

27. Grant, W.D. and Larsen, H. (1989). Extremely *halophilic archaeo* bacteria, In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 1st ed., Vol. 3. Edited by Staley, Bryant, Pfennig, and Holt, Baltimore: The Williams and Wilkins Co. pp: 2216-2219.

28. Kushner, D. J. (1985). The Halobacteriaceae. In: C. R. Woese, and R. S. Wolfe (Eds.) The bacteria-a treatise onstructure and function. Archaebacteria Academic Press. Orlando, FL. VIII: 171–214.

29. Jurgens, G. (2002). Molecular phylogeny of archaea in boreal foreast soil, Fresh water and temperate estuarine sediment. Ph. D. Thesis in Department of applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology, University of Hel- sinki. Finland.

30. Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., et. al. (2002). Sequencing of 16 srRNA gene: Arapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. Emerging In factious Diseases. 8: 1117-1123.

31. Clarridge. III, J. E. (2004). Impact of 16srRNA gene Sequence analysis for identification of bacteria on clinical Microbiology and infectious diseases. Elin. Microbiol. Rev. 17: 840-862.

32. 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.