تحديد مقاومة عزلة محلية للبكتريا المحبة للحرارة *Bacillus stearothermophilus* والمعزولة من التربة لبعض العناصر الثقيلة وتأثيراتها الضارة

Determination of Heavy Metals Tolerance and their Damaging Effects on a Local Soil Thermophilic Isolate *Bacillus stearothermophilus*

خلود عبد الاله محمد الخفاجي صفاء عبد الرحيم محمود
دائرة البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنولوجيا
Khlood A. A. Al-Khafaji **Saffa A. Raheem**
Agricultural Research Directorate/ Ministry of Science and Technology

E-mail: khloodalkhafaji@yahoo.com

الملخص

يهدف البحث الحالي الى التحري عن مقاومة عزلة محلية محبة للحرارة تعود للنوع *Bacillus stearothermophilus* لبعض العناصر الثقيلة وتحديد التركيز المثبط الادنى لها و درس المحتوى الوراثي لتحديد وجود عناصر وراثية خارج كروموسومية (البلازميدات) وعلاقتها مع المقاومة للعناصر الثقيلة. تم تقييم التأثيرات الضارة لعناصر الزئبق والكروم والكوبلت على شكل ونمو البكتريا وحصول تغييرات على طيف امتصاص الدنا للاطوال الموجية 200-400 نانومتر, كما درس التأثير المطفر لهذه العناصر. وجد ان العزلة المحلية المحبة للحرارة تقاوم تركيز يصل الى 80 ملي مولاري لعناصر الخارصين والموليبديوم والفضة واظهرت العزلة حساسية تجاه عناصر الزئبق والكروم والكوبلت وقد قدرت قيم التركيز المثبط الادنى للزئبق بتركيز0.004 ملي مولاري وللكروم بتركيز 0.03 ملي مولاري وللكوبلت بتركيز0.007 ملي مولاري وقد بين الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز خلو العزلة المحلية من البلازميدات. ادت تنمية البكتريا بوجود الزئبق والكروم والكوبلت الى حصول تغييرا في اشكال بعض من الخلايا الحية اذ ظهرت الخلايا بشكل كروي او كروي عصوي كما ظهرت بعض الخلايا متكسرة بشكل كبير, وقد تأثر نمو البكتريا بشكل كبير لعناصر الزئبق والكروم حيث لوحظ انخفاض في النمو البكتيري بعد 18 ساعة مقارنة مع مزروع السيطرة بينما ظهر تأثر نمو المزروع المعامل بالكوبلت بصورة اقل وقد ادى استخدام الزئبق والكوبلت الى الحصول على طفرات حساسة للحرارة وبعدد وصل الى 200- 300 خلية بكتيرية طافرة/ مل على التتابع لكل 10^4 خلية/ مل وعدم ظهور طفرات لمعاملات الكروم. أظهر طيف امتصاص مستخلص الاحماض النووية للاطوال الموجية 200- 400 نانومتر عدم تغير طيف الامتصاص عند استعمال الزئبق وحصول تغير في شكل وامتداد منحني الدنا عند اخذ طيف الامتصاص للمزارع المعاملة بالكروم والكوبلت.

الكلمات المفتاحية: بكتريا محبة للحرارة, *B. stearothermophilus*, عناصر ثقيلة, بلازميدات, تركيز مثبط ادنى, تطفير, طيف امتصاص، الاحماض النووية.

Abstract

This research aimed to detect the tolerance of a local soil thermophilic isolate to some heavy metals (HM) and determine of minimal inhibition concentration (MIC). Also, plasmid profile was studied and its relationship with HM resistant. Deleterious effect of mercury (Hg), chromium (Cr) and Cobalt (Co) were evaluated on bacterial shape, growth and DNA scan between 200-40nm. Mutation effect was also studied. Local thermophilic *Bacillus stearothermophilus* was resist zinc, molbidium, silver at a concentration reached 80mM; it is sensitive to Hg, Cr and Co with MIC reached 0.004, 0.03 and 0.007 respectively. Plasmid profile revealed the absence of plasmid from *B. stearothermophilus*. Some of bacterial shapes were changed to short bacilli, coccobacilli and cocci; many bacterial cell fragment were seen after treatment with Hg, Cr and Co. Bacterial growth decreased when treated with Hg and Cr after 18h while, little effect was seen with Co treatment with Hg and Co induced heat sensitive mutation with 200-300 mutated cfu /ml from 10^4 cfu/ml; no heat sensitive mutation were detected for Cr treatment. DNA UV scan 200-400nm showed no changes with Hg while, curve shape changed for Cr and cobalt.

Key words: thermophilic bacteria, *Bacillus stearothermophilic*, heavy metal, plasmid, MIC, mutation

المقدمة

تعرف المعادن الثقيلة عادة بانها مجموعة المعادن التي تملك كثافة ذرية اكبر من 5 غم/سم3 ويلعب بعض هذه العناصر الثقيلة ادوارا مهمة في الفعاليات الايضية للكائن المجهري وتكون ضرورية بتراكيز ضئيلة اذ انها تدخل في العديد من التفاعلات الانزيمية كمواد مساعدة على التفاعل ونقل الاكترونات ولزيادة ثبات الجزيئات الاخرى ويعد الكوبلت والكروم والزنك والنيكل والحديد والمغنيسيوم امثلة على هذه العناصر. من جهة اخرى تكون بعض العناصر الثقيلة ضارة او سامة حتى في تراكيزها الضئيلة جدا كما هو الحال مع الزئبق والرصاص والكادميوم [1،2] وتؤثر كلا المجموعتين وبتراكيزها العالية على نمو وشكل والفعاليات البايوكيميائية للعديد من مجاميع الاحياء المجهرية مؤدية الى انخفاض في اعدادها وانتشارها في المناطق الملوثة بمثل تلك العناصر[3-5] وتتأتى سمية العناصر الثقيلة بانها تعمل على تخريب او ايقاف عمل المجموعات الفعالة في الجزيئات البايولوجية المهمة حيث يؤدي وجودها الى الضرر بالاغشية الخلوية وتؤثر على قنوات النقل وتغيير خصوصية الانزيمات من خلال احلال العنصر الثقيل محل العناصر المساعدة للانزيمات كما انها تعمل على تغيير في تركيب العوامل الوراثية, اذ اشار Doreswamy [2] الى ان الزئبق والكادميوم والفضة ترتبط مع مجاميع SH الموجودة على المواقع الفعالة في الانزيم مؤدية الى تثبيط الانزيمات الحاوية عليها. كما اشار Edward Raja [5] الى تثبيط تصنيع البروتين بوجود عناصر الزئبق والكادميوم والنحاس وان الكروم والنحاس يعملان على توليد

مجاميع اوكسجين فعالة والتي تعمل على تحفيز اضافة مجاميع البيروكسيد لدهون الاغشية الخلوية وحصول الضرر التأكسدي. وتعتبر الاحياء المجهرية ومنها البكتريا المتواجدة في التربة بتماس مباشر مع العناصر الثقيلة سواء الطبيعية منها ام المطروحة من قبل فعاليات الانسان باستخدامه المبيدات والاسمدة ومخلفات الصناعات الاخرى والتي تسبب في زيادة تراكيز بعض من هذه العناصر في تلك البيئات والتي اصبحت احد اهم المشاكل البيئية. ومن اكثر انواع البكتريا انتشارا في التربة هي انواع من الجنس *Bacillus* اذ تنتشر سبوراتها في معظم البيئات وتقاوم الظروف البيئية المتطرفة وتنتشر سبورات النوع *B. stearothermophilus* والتي اصبحت تعرف ومنذ 2001 بالنوع *Geobacillus stearothermophilus* وانواع اخرى محبة للحرارة في معظم البيئات الحارة وغير الحارة وهي من الانواع البكتيرية المهمة في انتاج العديد من الانزيمات لمقاومتها لدرجات الحرارة العالية وقد عزلت افراد من هذا النوع من البيئات الملوثة بالكادميوم والكوبلت وغيرها [7،6]. هدفت الدراسة الحالية الى تحديد التركيز المثبط الادنى لكل من عنصر الزئبق والكروم والكوبلت والخارصين والفضة والموليبيديوم على عزلة محلية للبكتريا المحبة للحرارة النوع *B. stearothermophilus* وكذلك التحري عن احتواء العزلة على البلازميدات وعلاقتها مع مقاومة المعادن الثقيلة, دراسة تأثير كل من عنصر الزئبق والكروم والكوبلت على نمو البكتريا وشكلها والحث على تكوين طفرات حساسة للحرارة وتأثير تلك العناصر على طيف امتصاص الحامض النووي المستخلص من البكتريا المعاملة.

المواد وطرق العمل

العزلة البكتيرية وتنميتها

تم اعتماد العزلة البكتيرية المحبة للحرارة *B. stearothermophilus* والتي عزلت وشخصت من قبل الخفاجي [8]. نميت العزلات البكتيرية على وسط لوريا برتاني Lauria Bertani (LB) السائل او الصلب (1% تريبتون و0.5% مستخلص الخميرة و1% ملح الطعام وضبط الرقم الهيدروجيني (pH) الى 7.2). تم اختبار نمو العزلة البكتيرية بدرجات حرارة 37،56م, وتمت تنمية البكتريا على وسط LB السائل وبدرجة 65م ولمدة خمس ساعات واستعمل كمزروع ابتدائي في الدراسة الحالية. تم تحضير عدد من التخافيف العشرية وزراعتها على وسط LB الصلب لحساب عدد الخلايا/ مل.

تحضير محاليل المعادن الثقيلة

حضرت محاليل ملي مولارية خزينة لعناصر الزئبق والكروم والكوبلت والخارصين والموليبيديوم والفضة باستخدام املاح كلوريد الزئبق كرومات البوتاسيوم وكلوريد الكوبلت وكبريتات الخارصين ومولبدات الصوديوم ونترات الفضة. تمت اضافة حجوم معينة من المحاليل الخزينة لكل عنصر الى الوسط لوريا برتاني الصلب للحصول على تراكيز متسلسلة (0.0001 ملي مولاري -80 ملي مولاري) للعناصر قيد الدراسة.

تحديد مقاومة عزلة *B. stearothermophilus* المحلية للعناصر الثقيلة

اضيف 10 مايكروليتر من المزروع الابتدائي (10^8خلية/ مل) على سطح الاكار ذي التراكيز المختلفة من العناصر الثقيلة وتركت الاطباق لمدة نصف ساعة لأدمصاص القطرة وحضنت الاطباق المزروعة بدرجة 56م ولمدة 48 ساعة. عد ظهور النمو البكتيري نتيجة موجبة ودليل على مقاومة البكتريا لتركيز العنصر الثقيل المضاف (R) وعدم ظهور نمو بكتيري دلالة على حساسية البكتريا (S) وكما جاء في [9،6]. تم تحديد التركيز المثبط الادنى للعنصر الثقيل من خلال انعدام النمو في ذلك التركيز,كما تمت دراسة تأثير ثلاث تراكيز مختلفة من العناصر الثقيلة على نمو وشكل بكتريا *B. stearothermophilus* وقابليتها التطفيرية وتأثيرها على طيف امتصاص الاحماض النووية DNA جدول (1).

جدول(1): تراكيز عناصر الزئبق والكروم والكوبلت

صر الثقيل	يز المثبط الادنى	ز اعلى من المثبط الادنى	ركيز اقل من لمثبط الادنى
الزئبق	0.004	0.005	0.002
الكروم	0.03	0.05	0.02
لكوبلت	0.007	0.01	0.005

استخلاص الدنا البكتيري والترحيل الكهربائي

تم اعتماد طريقة الترسيب بالملح المحورة في استخلاص الدنا الكلي من العزلة *B. stearothermophilus* قيد الدراسة وتم فحص نتائج الاستخلاص باستخدام الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز وبتركيز 1% وبفولتية ثابتة بلغت 5 فولت/ سم ولمدة ساعتين. صبغ الهلام بصبغة الايثيديوم بروماید وفحص تحت الاشعة فوق البنفسجية وباستخدام جهاز UV transilluminator [11،10].

تأثير العناصر الثقيلة على نمو وشكل البكتريا *B. stearothermophilus*

تمت دراسة تأثير التراكيز الثلاث لكل من الزئبق والكروم والكوبلت على منحنى النمو والشكل المجهري للعزلة المحلية المحبة للحرارة *B. stearothermophilus* اذ لقح 20 مل من وسط LB السائل بوساطة 0.2 مل من المزروع الابتدائي وحضن بدرجة 65م لمدة ساعتين ثم اضيفت تراكيز عناصر الزئبق والكروم والكوبلت واستمر حضن المزارع 18 ساعة اضافية, وقد تم اخذ قراءات للامتصاص الضوئي عند الطول الموجي 600 نانوميتر على فترات مختلفة شملت زمن الصفر, ساعتين, اربع ساعات و18 ساعة ورسمت العلاقة بين قراءات الامتصاص الضوئي وبين الوقت لتحديد الاختلافات مع مزروع السيطرة [12]. كما تم تصبيغ شرائح بصبغة كرام للمزارع البكتيرية المعاملة وللتراكيز جميعها وقورنت اشكال وتجمعات الخلايا والاختلافات الناتجة عن كل معاملة مع مزروع السيطرة.

التأثير المطفر لكل من الزئبق والكروم والكوبلت على بكتريا *B. stearothermophilus*

تم نشر حجم 0.1 من المزارع البكتيرية المعاملة بالتراكيز الثلاث لكل من الزئبق والكروم والكوبلت كما جاء اعلاه على سطح وسط LB الصلب وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 18-48 ساعة, والتقطت المستعمرات الناتجة وزرعت باستعمال الوسط السابق ثم حضنت بدرجة حرارة 60-65م للتأكد من حساسيتها للحرارة. كما تم اخذ تخافيف من مزروع السيطرة ونشر 0.1 منها وحضنت بدرجة 65 م لقياس تردد الطفرات الحساسة للحرارة [13].

تأثير الزئبق والكروم والكوبلت على طيف امتصاص الاحماض النووية للاطوال 200- 400 نانوميتر

تمت دراسة الاختلافات في طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لنماذج الاحماض النووية المستخلصة وللمعاملات جميعها وبتخفيف 1:25 حيث قرأ طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية بين الطول الموجي 200 الى 400 نانوميتر لكل نموذج وباستعمال جهاز المطياف الضوئي (Analytikjena specord 205, Germany) اعتمادا على [14] .

النتائج والمناقشة

اعتمدت العزلة المحلية المحبة للحرارة والتي تعود للنوع البكتيري *B. stearothermophilus* في تحديد التراكيز المثبطة الدنيا لكل من الزئبق والكروم والكوبلت والخارصين والفضة والمولبيديوم, تمتاز هذه العزلة البكتيرية بكونها تنمو بين درجة حرارة 45- 65م ولا تستطيع النمو في 37م كما انها حساسة لعدد واسع من المضادات الحيوية ومن بينها الريفامبسين والستريبتومايسين, وامتازت العزلة كذلك بكونها ذات نمو سريع في درجة حرارة 65م اذ تصل العزلة الى نهاية الطور اللوغارتمي خلال خمسة ساعات كما اشار لذلك الخفاجي [8] في تحديد اطوار نمو العزلة المحلية.

أوضح فحص مقاومة العزلة المحلية لبكتريا *B. stearothermophilus* لعدد من التراكيز المتسلسلة لعناصر شملت الزئبق والكروم والكوبلت والخارصين والفضة والمولبيديوم اختلاف حساسية العزلة لهذه العناصر, اذ اظهرت مقاومة لتركيز وصل الى 80 ملي مولاري من الخارصين والمولبيديوم والفضة واظهرت حساسية لتركيز اعلى من 0.001 و0.025 و0.005 ملي مولاري لكل من الزئبق والكروم والكوبلت على التتابع كما هو واضح في جدول (2). وقد تم تحديد التركيز المثبط الادنى باستعمال مدى اخر من التراكيز الملي مولارية لكل من الزئبق والكروم والكوبلت لتكون التراكيز المثبطة الدنيا 0.004 و0.03 و0.007 ملي مولاري على التتابع.

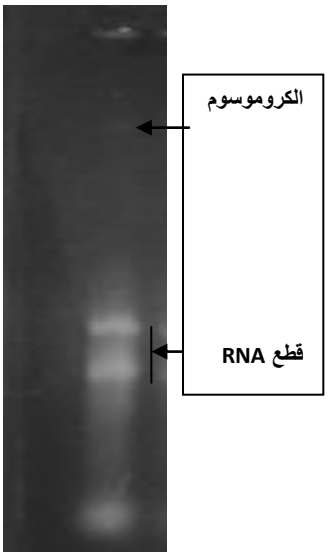
جدول(2): التحري عن مقاومة العزلة المحلية المحبة للحرارة *B. stearothermophilus* لبعض العناصر الثقيلة

العنصر	تركيز العنصر الثقيل (ملي مولاري)																
الثقيل	0.0005	0.001	0.005	0.01	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	5	10	20	40	80
زئبق	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
كروم	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
كوبلت	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
مولبيديوم	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
خارصين	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
فضة	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R= مقاومة, S= حساسة

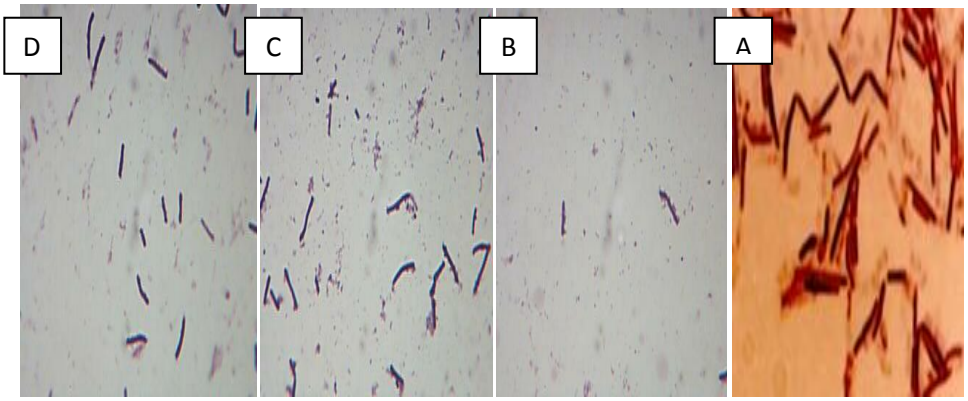
قد تطور الاحياء المجهرية واحدة او اكثر من اليات مقاومة العناصر الثقيلة السامة لتمكنها من مقاومة التراكيز العالية والمتوفرة في بيئاتها ومن تلك الاليات حواجز النفاذية والتقييد داخل الخلايا والتحول الانزيمي واختزال العنصر ليكون اقل سمية وضخ العناصر الثقيلة الى خارج الخلايا وقد اشار العديد من الباحثين الى تلك الاليات اذ وجد Kais [15] ان خلايا *B. cereus* تعمل على تجميع وادمصاص الكروم على سطح الخلايا كما درس كلا من Hetzer وجماعته [6] و Ozdemir وجماعته [7] تجميع الكادميوم والنحاس والكوبلت والمنغنيز داخل خلايا انواع مختلفة من البكتريا المحبة للحرارة شملت الانواع *G. thermoantracticus* و *G. stearothermophilus* و *G. toebii* و *G. thermoleovorans* كما اوضح Pahan [16] حصول عملية تبخير volatilization لعنصر الزئبق اللاعضوي والعضوي من قبل بكتريا *B. pasteurii* اضافة للتحول الانزيمي المسؤول عن عملية مقاومة عنصر الزئبق كما عزل Singh [17] و Singh [18] انواع من الجنس *Bacillus* ذات مقاومة للعناصر الثقيلة وبين علاقتها مع قابلية البكتريا على انتاج بعض الانزيمات الخارجية.

أظهر الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز خلو العزلة المحلية *B. stearothermophilus* من العوامل الوراثية خارج الكروموسوم (البلازميدات) وكما هو واضح في شكل (1) وقد يعد ذلك دليلا على حمل جينات مقاومة العناصر الثقيلة على الكروموسوم وان عدم وجود البلازمد في هذه البكتريا يقلل من احتمالية التحول الوراثي او التكامل الوراثي الطبيعي والتي غالبا ما تكون مرتبطة مع البلازميد. وذلك يتوافق مع ما اشار اليه Hetzer وجماعته [6] من خلو العزلة *G. stearothermophilus* ذات المقاومة لعنصر الكادميوم من البلازميدات وذلك يتوافق ايضا مع ما وجده Canan- Kamala [19] من ان الجينات المسؤولة عن مقاومة العناصر الثقيلة محمولة على الكروموسوم في عدد من عزلات *Bacillus* اذ ان تحييد البلازميدات في هذه العزلات لم تؤثر على مقاومتها للعناصر الثقيلة والعديد من المضادات الحيوية بينما ادى تحييد البلازميدات في عزلات اخرى تعود للنوعين *B. lichniformis* و*B. Subtilis* الى فقدان مقاومة العناصر الثقيلة والمضادات الحيوية. كما اشار الى ان العزلات البيئية من المناطق الملوثة بالعناصر الثقيلة وغيرها تكون عرضة للتبادل الوراثي فيما بينها واكتساب صفات المقاومة من خلال انتقال البلازميدات.



شكل (1): الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز لمستخلصات دنا بكتريا*B. stearothermophilus*
(هلام الاكاروز بتركيز 1% و5 فولت/ سم , لمدة ساعتين)

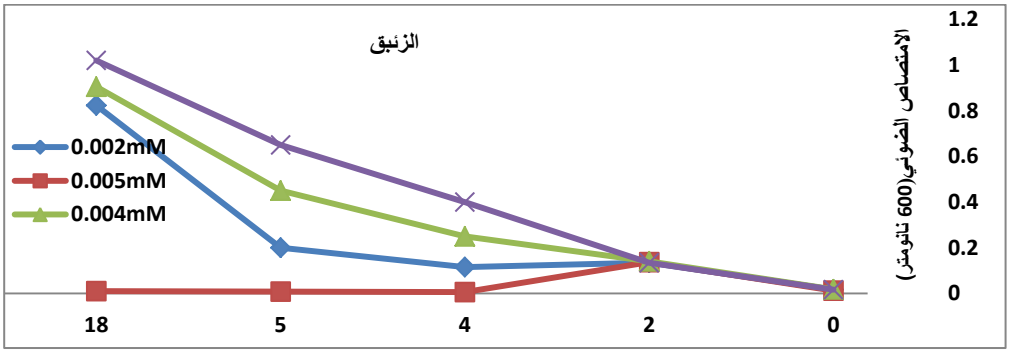
وأظهر الفحص المجهري لشرائح صبغت بصبغة كرام التغير الحاصل في اشكال الخلايا وتجمعاتها اذ ادى التركيز المثبط الادنى (0.004 ملي مولاري من الزئبق و0.03 ملي مولاري من الكروم و0.007 ملي مولاري من الكوبلت) والتراكيز فوق المثبطة الدنيا (0.005 و0.05 و0.01 ملي مولاري على التوالي) الى تحول شكل بعض الخلايا من العصوي ذي الحافة المستديرة الى عصيات قصيرة او اقرب الى الكروية وظهور البعض بشكل غير منتظم ومكسر ومتناثر بينما ظهرت الخلايا بشكل اقرب الى الطبيعي عند التراكيز الاقل من التركيز المثبط الادنى لكل من الزئبق والكروم والكوبلت وبتراكيز ملي مولارية شملت 0.002 و0.02 و0.005 على التتابع شكل (2).



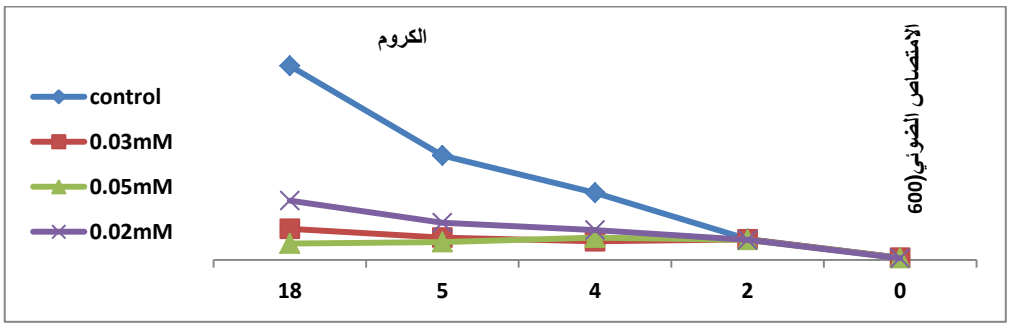
شكل(2): تأثير تراكيز مختلفة من عنصر الكوبلت على اشكال خلايا العزلة المحلية المحبة للحرارة *B. stearothermophilus*
A= مزروع السيطرة
B= تركيز 0.01 ملي مولاري كوبلت
C= تركيز 0.005 ملي مولاري كوبلت
D= تركيز 0.007 ملي مولاري كوبلت

أوضحت دراسة تأثير تراكيز مختلفة من الزئبق والكروم والكوبلت ان التركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل والتركيز المنخفض لعنصر الكروم سبب تأخرا في نمو البكتريا اذ لوحظ انخفاض شديد في الامتصاصية الضوئية مقارنة مع مزروع السيطرة وعلى جميع الفترات المدروسة, بينما لوحظ ارتفاع في الامتصاص الضوئي بعد 18 ساعة حضن مع تركيز المثبط الادنى لعنصر الزئبق والكوبلت وقد يعزى ذلك الى تطبع الخلايا لذلك التركيز او حصول مقاومة لذلك التركيز خلال فترة الحضن. وقد وجد عدم تأثر نمو المزروع البكتيري عند اضافة التركيز تحت المثبط الادنى لعناصر الزئبق والكوبلت اذ سجلت قراءات الامتصاص الضوئي قيماً مقاربة لقراءات مزروع السيطرة بينما لوحظ تأخر النمو عند اضافة الكروم حيث سجلت قيم الامتصاص الضوئي 0.397 مقارنة مع 1.3 لنموذج السيطرة وكما هو واضح في شكل (3). قد يعزى تغير شكل الخلايا البكتيرية وانخفاض نمو البكتريا الى تأثير الزئبق والكروم والكوبلت في العديد من الفعاليات الحيوية للبكتريا عند وجود هذه العناصر بتراكيز عالية وعلى الرغم من تحفيز الكوبلت لبعض الانزيمات الخلوية المنتجة من قبل بكتريا *B. stearothermophilus* كما اشار لذلك [20] Markowicz غير ان تأثيراته كانت ضارة في العزلة المحلية قيد الدراسة.

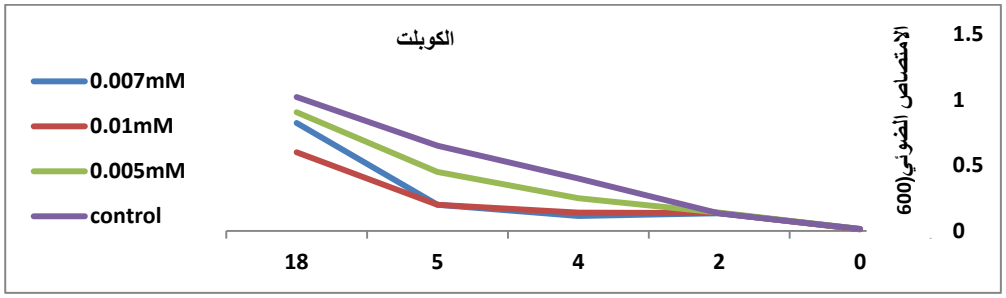
بينت دراسة التأثير المطفر لعناصر الزئبق والكروم والكوبلت استحثاث طفرات حساسة للحرارة بعد المعاملة مع تركيز 0.005 ملي مولاري من الزئبق وتركيز 0.01 ملي مولاري من الكوبلت اذ ظهرت 200 و 300 مستعمرة حساسة للحرارة على التتابع امتازت بنموها على درجة 37 □م وفقدت القدرة على النمو بدرجة 55 □م كما امتاز سطح المستعمرات الطافرة باللون البرتقالي الغامق والسطح المجعد مقارنة مع شكل المستعمرة الام ذات الشكل الشفاف والسطح الاملس.



الوقت (ساعة)



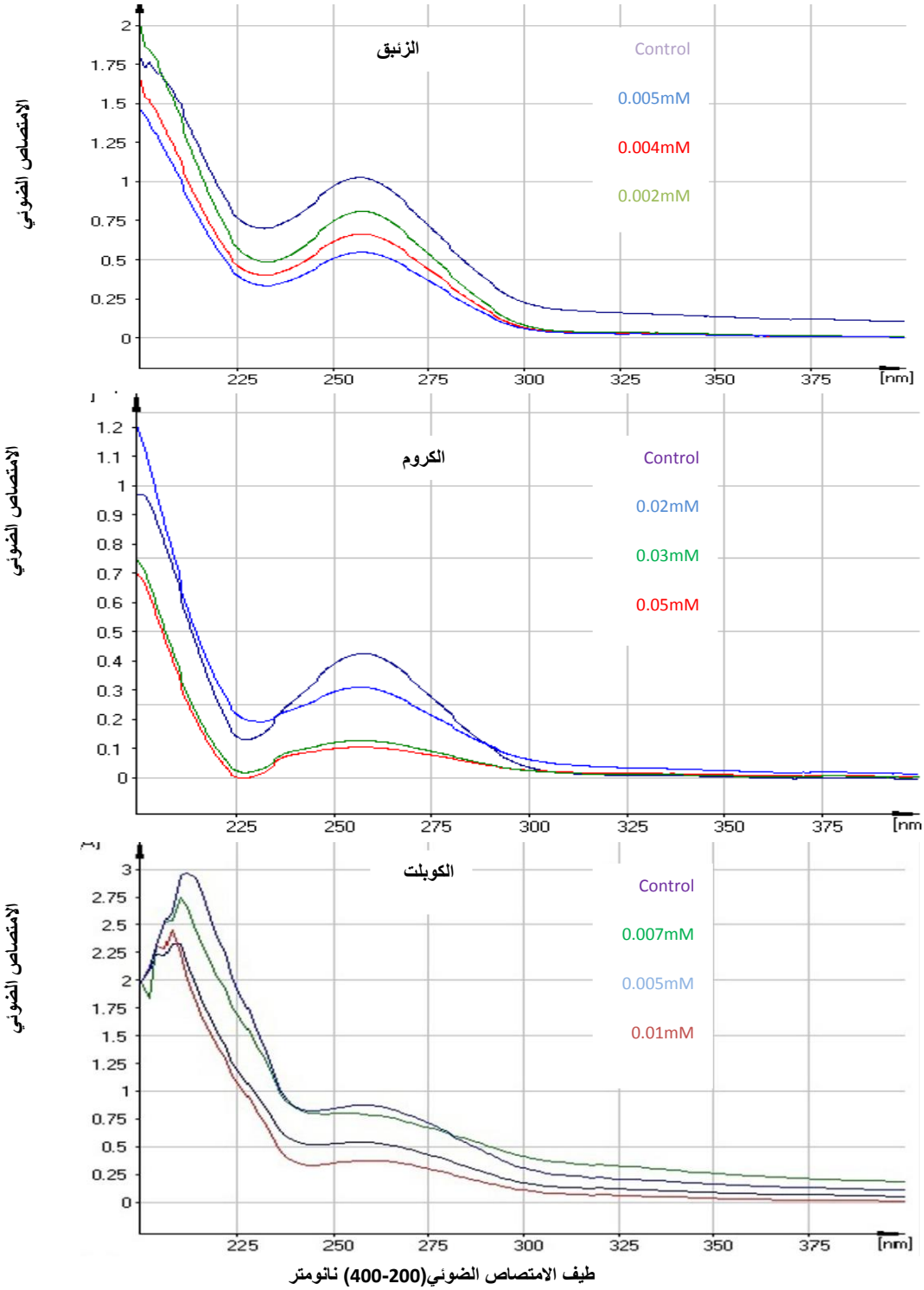
الوقت (ساعة)



الوقت (ساعة)

شكل(3): تأثير تراكيز مختلفة من العناصر الثقيلة على نمو العزلة المحلية المحبة للحرارة *B. stearothermophilus*

أوضحت دراسة طيف امتصاص الاحماض النووية للاطوال الموجية بين 200-400 نانومتر عدم اختلاف طيف الامتصاص لمستخلصات معاملات تراكيز الزئبق الثلاث عن طيف امتصاص مستخلص الدنا لمزروع البكتريا غير المعامل كما تبين وجود اختلافات بسيطة تقع ضمن الاطوال الموجية بين 225-300 نانومتر اذ لوحظ اختلاف شكل المنحني عن نموذج السيطرة من حيث شكل القمة وامتداد الاطراف لمستخلصات الدنا للمزارع البكتيرية المعاملة بالكروم والكوبلت وعدم اختلاف قمة طيف الامتصاص عند الاطوال الموجية الخاصة بالدنا (260 نانومتر) وكما هو واضح في شكل (4). وقد تعود تلك الاختلافات في طيف الامتصاص الى التغيرات البايوكيمياوية ذات العلاقة مع ارتباط عنصر الكروم اوالكوبلت وتأثيراتهما وتغير المحتوى الوراثي الخلوي.



شكل(4): طيف امتصاص الاحماض النووية عند الاطوال الموجية 200-400 نانوميتر للعزلة المحلية *B. stearothermophilus* المعاملة بالزئبق والكروم والكوبلت

نستنتج من هذه الدراسة اختلاف مقاومة العزلة المحلية للبكتريا المحبة للحرارة *B. stearothermophilus* لعدد من المعادن الثقيلة اذ اظهرت مقاومة لتركيز وصل الى 80 ملي مولاري لعناصر المولبيديوم والخارصين والفضة وحساسية متفاوتة لعناصر الزئبق والكروم والكوبلت مما يؤهلها للاستخدام في مجال التعدين البايولوجي في الطبيعة او ازالة الملوثات البيئية (Bioremediation) سيما في المناطق ذات الحرارة المرتفعة. تبين خلو العزلة المحلية من البلازميدات مما يشير الى حمل المحددات الوراثية المسئولة عن مقاومة العناصر الثقيلة على الكروموسوم. وجد تأثير لعناصر الزئبق والكروم والكوبلت على منحنى النمو وشكل الخلايا اذ تبين انخفاض شديد في منحنى النمو مقارنة مع مزروع السيطرة ولجميع الفترات الزمنية عند المعاملة بعنصر الكروم وحصول تطبع لخلايا البكتريا عند بعض التراكيز لعنصري الزئبق والكوبلت بعد الفترات الطويلة من المعاملة. حدوث تغييرات في طيف امتصاص مستخلصات DNA للبكتريا المعاملة بالكروم والكوبلت وانعدام التغييرات بعد المعاملة بالزئبق مع وجود تأثير مطفر لعنصر الزئبق في تراكيزه العالية.

References

1. Brunis, M. R. (2000). Microbial resistance of metals in the environment. Ecotoxicol. Environm. Saf. 45:198-206.
2. Doreswamy, K. (2004). Nickel induced oxidative stress in testis of mice. Evidence of DNA damage and genotoxic effects. J. Androil, 25:996.
3. Hassen, A. (1998). Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringensis*. Bioresource. Technol65:73.
4. Nies, D. H. (1999). Microbial heavy metal resistant. Applied Microbiology Biotechnology. 51: 730- 750.
5. Edward Raja, C., Selvam, G. S. and Omine, K. (2009). Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. International joint Symposium on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia. 205- 211.
6. Hetzer, A., Dauphney, C. J., and Morgan, H. W. (2006). Cadmium ion biosorption by the thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* and *G.thermocatenulatus*. Appl. Environ. Microbiol. 72(6): 4020- 4027.
7. Ozdemir, S., Kilinc, E., Po, A., Nicolans, B. and Guven, K. (2012). Cd, Cu, Mn and Zn resistance and bioaccumulation by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* subsp decanicus and *Geobacillus thermoleovorans* subsp. stromboliensis. World J. of Microbiol. And Biotechnol. 28(1): 155- 163.
8. الخفاجي, خلود عبد الاله. (2009). استخلاص انزيمات التقييد من عزلات محلية لانواع جنس *Bacillus*.. المؤتمر العلمي السادس لكلية التربية /جامعة تكريت/ قسم علوم الحياة. 24-25.
9. Filali, B. K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F. Z., Talbi, M. and Blaghen. (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Current Microbiology. 41: 151- 156.
10. Al-khafaji, K. A. and Al- Thwani, A.N. (2011). A comparative study among clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* at their antibiotic resistance and plasmid profile. J. biotechnology research center(special ed.). vol.5 (2):3-9
11. Sambrook , J., Fritsh, F. E. and Maniatis , T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual 2nd Ed . Cold spring Harbor Laboratory press. New York.
12. Rathnayake, I. V. N., Megharaj, M., Bolan, N. and Naidu, R. (2009). Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. World Academy of Science and Technology. 53: 1185- 1189.
13. الخفاجي, خلود عبد الاله، صفاء عبد الرحيم محمود، عبد الكريم قاسم، صفاء عبد الهادي صالح، ياسمين ابراهيم فرحان، عصام شاكر حمزة، فرقد عبد الله، محمود عبد الله رمضان. (2013). تأثير عنصر الرصاص على طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لدنا بكتريا *Bacillus stearothermophilus* المعزولة محليا واستحثاثه المطفر. المجلة الدولية للتنمية- المجلد الاول- العدد الاول. 37-44.
14. Morys, M. and Daniel, B. (1993). The accurate measurements of biologically effective ultraviolet radiation. International Symposium on High Latitude Optics, Tromso, Norway.
15. Kais, K. G., Al- Daraghi, W. A. and Lateef, N. S. (2013). Study the heavy metals tolerance biosorption and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from diesel fuel polluted soil. International J. Biological and Pharmaceutical Research. 4(7): 502-506.
16. Pahan, K., Chaudhuri, J., Ghosh, D.K., Gachhui, R., Ray, S. Mandal, A. (1996). Voltalization of mercury from natural water by a broad- spectrum Hg- resistant *Bacillus pasteurii* strain DR2. The Environmentalist. 16(3): 179- 185.
17. Singh, S. K., Tripathi, V. R., Jain, R. K., Vikram, S. and Garg, S. K. (2010). An antibiotic, heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. Microbial cell factory. 9:59.
18. Singh, Y., Ramteke, P. W., tripathy, A. and Shukla, P. K. (2013). Isolation and characterization of *Bacillus* resistant to multiple heavy metals. International J. Current Microbiology and Applied Sciences. 2(11):525-530.
19. Kamala- Kannan, S. and Lee, K. J. (2008). Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* isolated from Sunchon Bay sediments, South Korea. Biotechnology. 7(1): 149- 152.
20. Markowicz, A., Plociniczak, T. and Piotrowska- Seget, Z. (2010). Response of bacteria to heavy metals measured as changes in FAME profiles. Polish J. of Environ. Stud. 19(5): 957- 965.