العلاقة المظهرية والجينية لانواع جنس *Streptomyces* spp. المعزولة من الترب الملوثة بالهيدروكاربونات

Phenetic and Phylogenetic Analysis of *Streptomyces* spp. Isolated from Hydrocarbons Polluted Soil

اسراء غانم حازم السماك
كلية العلوم / جامعة الموصل
Essra Gh. Alsammak
College of Science/ University of Mosul

Essra_alsammak@yahoo.com

الملخص

يهدف البحث الى تسليط الضوء على دور التصنيف المتعدد Polyphasic والذي يضم كل من التصنيف المظهري والجيني لتحديد وتثبيت صفات النوع ضمن جنس الـ Streptomyces الصعب التصنيف نتيجة كثرة الانواع والتغاير الكبير في الصفات المظهرية اضافة لدورها في مجالات عدة منها البيئة من خلال تحملها العديد من املاح العناصرالثقيلة الموجودة في البيئات الملوثة بالهيدروكاربونات واشتراكها في التخلص من الملوثات. تم عزل وتشخيص ست عزلات من البكتريا الخيطية التابعة لجنس Streptomyces من عشرين عينة تربة ملوثة بالهيدروكاربونات وترب حدائق . شخصت الى ثلاثة انواع اعتمادا على دراسة الصفات المظهرية والجينية من خلال دراسة تتابع جزء الـ16SrDNA باستخدام البادئ 27f و 1392r وشخصت سلالتين على انها تابعة للنوع *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 وسلالتين للنوع *Streptomyces coelicolor* A3(2) واخيرا سلالتين تابعة للنوع *Streptomyces albus* J1074 . اعتمادا على الصفات المظهرية والبالغة 48 صفة و باستخدام التصنيف العددي والربط باستخدام المعدل الموزون و معامل التشابه البسيط Simple matching coefficient (Ssm) باستخدام البرنامج الاحصائي SPSS ، تعنقدت السلالات في ثلاثة عناقيد ضمن المخطط الشجري ضم العنقود A سلالتين للنوع *Streptomyces coelicolor* مرتبطة عند نسبة تشابه 99% في حين تعنقدت سلالتي النوع *Streptomyces albus* ضمن العنقود B وعند نسبة تشابه 95% كما تعنقدت سلالتي النوع *Streptomyces flavogriseus* ضمن العنقود C وبنسبة تشابه 95% . اظهرت الانواع المعزولة مستعمرات طباشيرية رصاصية الى بيضاء وتميز الغزل الهوائي للنوع *Streptomyces albus* بكونه حلزوني مكبوس متفرع وكثيف في حين تميز بكون خيوط الغزل الهوائي متعرج وغير متفرع للنوع *Streptomyces flavogriseus* وظهر الغزل الهوائي للنوع *Streptomyces coelicolor* متفرع متحلزن ومتعرج و جميعها منتجة لرائحة التربة. اظهرت جميع الانواع قيد الدراسة حساسية لاملاح كل من كلوريد وكبريتات الزئبق ، في حين اظهرت جميع الانواع مقاومة لكل من كلوريد ونترات الكوبلت و كبريتات الزنك و نترات وخلات الرصاص و كبريتات النيكل و خلات الفضة وثنائي اوكسيد التيتانيوم . اعطت جميع الانواع حساسية للمضاد الحيوي، Ciprofloxacin 10 مايكروغرام، Tobramycin 10 مايكروغرام ، Gentamicin 10 مايكروغرام ، Vancomycin 30 مايكروغرام ، 10Amikacin مايكروغرام، Imipenem10مايكروغرام. كما تعنقدت الانواع ايضا عند استخدام التصنيف الجيني الى ثلاثة عناقيد ضمن الشجرة التطورية وبنسب تشابه تراوحت بين 96.7 -99.4 % باستخدام Clustal W وطريقة maximum likelihood method باستخدام برنامج Mega 5.

الكلمات المفتاحية: 16s rDNA، التصنيف المظهري ، التصنيف الجيني.

Abstract

The research aims to highlight the role of polyphasic classification, which includes both phenotypic and genetic classification to determine and stabilize species characteristics within the genus Streptomyces, which is difficult to classify due to the large number of species and the large heterogeneity of phenotypic traits, in addition to its role in several areas, including Environments through resistance to many salts of heavy elements present in environments contaminated with hydrocarbons and their participation in the disposal of pollutants. In this study 6 isolates of Streptomyces obtained from 20 hydrocarbons contaminated and garden soil have been isolated and identified through phenotypic & genotypic characteristics using nucleotide sequence of the 16s rDNA gene by universal primers 27f & 1392r following strains were identified to two strains that similar to *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 , two strains belongs to *Streptomyces albus* J1074 & two strains belongs *Streptomyces coelicolor* A3(2). Depending on 48 of phenotypic characteristic by using numerical taxonomy , average linkage method and simple matching coefficient (Ssm) using statistical program SPSS. The strains grouped to three clusters in hierarchical tree, the two strains belongs to *Streptomyces coelicolor* grouped in cluster A at similarity of 99%, the two strains belongs to *Streptomyces albus* grouped in cluster B at similarity of 95% & the two strains that belongs to *Streptomyces flavogriseus* accumulate in cluster C at similarity of 95%. The color of colony of all strain was grey to white ,the aerial mycelium of *Streptomyces coelicolor* was branched spiral & rectalflex, while *Streptomyces albus* have branched condense spiral aerial mycelium , *Streptomyces*

***flavogriseus* produced unbranched & rectalflex aerial mycelium. all of strains produced earthy odor. The all isolates showed tolerant to Nickel sulphate, Zinc sulphate, Lead acetate& nitrate, Silver acetate, Titanium dioxide, Cobalt nitrate & chloride. Also all isolates showed sensitivety to Mercuric sulphate & chloride. The results showed that all of strains were sensitive to Ciprofloxacin10 µg, Gentamicin10µg, Vancomycin 30 µg, Amikacin 10 µg, Imipenem 10 µg, Tobramycin 10 µg. In phylogenetic tree the species clustered in three group also as in phenetic tree in similarity percent between (96.7- 99.4%) by Clustal W program and Maximum likelihood method, using Mega5.**

Key words: 16s rDNA, phenotypic taxonomy , genotypic taxonomy.

المقدمة

تعد الانواع البكتيرية التابعة لمجموعة البكتريا الخيطية الـ Streptomycetes صعبة العزل والتشخيص ولازالت تعاني من صعوبات في التصنيف على مستوى الجنس بسبب كثرة اعدادها وقلة وتداخل تصنيفها على مستوى النوع ، في حين تاثر تصنيف هذه المجموعة بشكل ايجابي بالتصنيف المتعدد polyphasic taxonomy والذي يأخذ بنظر الاعتبار الصفات المظهرية والجينية [1].

يضم جنس Streptomyces بحدود 150 نوعا يقع ضمن رتبة Actinomycetales، ضمن صنف Actinobacteria افراده موجبة لصبغة كرام ، هوائية اجبارية ،تكون مستعمرات جلدية القوام مكونة للغزل الهوائي الطباشيري الشكل لوجود الغزل الهوائي المكون من سلسلة من السبورات غير المتحركة [2،3].

تعد مجموعة الـStreptomycetes المنتجة لاكثر من 10000 مركب حيوي معروف في مجال الصناعة والدراسة الاكاديمية ولاكثر من 50 عام رغم انه لازال تصنيفها مربك وخاصة على مستوى النوع والسبب التنوع في الصفات الشكلية و الزرعية و الفسلجية والكيموحيوية [4]. وتعد من بكتريا التربة الطبيعية وتلعب دور في معدنة وتحلل المركبات المعقدة ومنها الهيدروكاربونات وذلك من خلال انتاجها لمواد ناشره حيوية biosurfactants والتي لها دور كبير في المعالجة الحيوية bioremediation للمركبات العضوية وغير العضوية (المعدنية) ومنها المعادن الثقيلة [5،6].

المواد وطرائق العمل

اخذت 20 عينة تربة من مناطق ملوثة بالهيدروكاربونات البترولية ولا سيما مناطق وجود مخلفات المولدات الكهربائية لمناطق مختلفة من مدينة الموصل وترب حدائق. استخدمت طريقة التخافيف العشرية حيث اخذ ا سم^3 عينة التربة وصولا الى التخفيف 10^{-3} زرعت بطريقة الصب على وسط اكار الاكتينومايسيتات، حضنت هوائيا في درجة حرارة 28 ±1س° للفترة من 7-10 ايام .تم انتقاء 6 عزلات من 21 عزلة شخصت اعتماد على الصفات الشكلية للمستعمرة ، حجمها ، لون الغزل الارضي والهوائي ، انتاجها للصبغات الخارجية وشكل الغزل الهوائي باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية .نموها على اكار الدم والنمو بتراكيز ملحية مختلفة من ملح الطعام (1,3,5,7%) و انتاجها للرائحة [7].

التحمل للمعادن الثقيلة

تم التحري عن قدرة العزلات على تحمل المعادن الثقيلة والمتوقع انها موجودة ضمن الهيدروكاربونات البترولية وهي كلوريد ونترات الكوبلت وكبريتات الزنك و نترات وخلات الرصاص و كبريتات النيكل و خلات و كلوريد الفضة وثنائي اوكسيد التيتانيوم و كلوريد وكبريتات الزئبق. اعتمادا على طريقة الباحث [8] حضر المحلول القياسي من كل ملح بتركيز 1000 مايكرو غرام مل$^{-1}$ باستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي (PBS) عند pH 6.8 وعقم المحلول لمدة 15 دقيقة عند 120 ±1س° باستخدام المؤصدة.

استخدمت طريقة الانتشار بالاكار باستخدام الحفر على وسط مولر هنتون ونميت العزلات بالوسط السائل لمدة 7 ايام ولقح الوسط الزرعي بالعزلات قيد الدراسة و تم وضع 100 مايكروليتر من كل محلول ملحي محضر وحضن الوسط الزرعي هوائيا في درجة حرارة 28 ±1س° لمدة 7 ايام . تم قياس منطقة التثبيط واعتبرت العزلة متحملة للملح في حالة كون منطقة التثبيط 10 مليميتر[8].

الحساسية للمضادات الحيوية

استخدمت طريقة الانتشار بالاقراص Kirby-Bauer disk diffusion method المعتمدة من قبل [9] National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS باستخدام المضادات الحيوية الاتية: 10 Erythromycin مايكروغرام و 10 Ampocillin مايكروغرام و 10 Pencillin وحدة دولية و 10 Norfloxacin مايكروغرام و 10 Ciprofloxacin مايكروغرام و 30 Ceftriaxone مايكروغرام و 30 Chloramphenicol مايكروغرام و 30 Cephalothin مايكروغرام و5 Methicillin مايكروغرام و 10 Tobramycin مايكروغرام و 10 Gentamicin مايكروغرام و 1.25 Trimethoprim و 25 Sulfaminoxazole مايكروغرام و 30 Tetracycline مايكروغرام و 30 Vancomycin مايكروغرام و 10Amikacin مايكروغرام و 10 Imipenem مايكروغرام.

التشخيص الجيني

عزل الدنا الجرثومي

عزل الدنا البكتيري باستخدام طريقة Colony PCR: [10].

1- اخذت مستعمرة فتية واحدة واضافتها الى eppendroff tube معقمة تحتوي على 50 مايكروليتر ماء مقطر منزوع الايونات معقم DDW
2- حضنت في الحاضنة بدرجة 30 ±1س° لمدة 3 دقائق.
3- وضعت الانبوبة في المضخم الحراري PCR او حمام مائي بدرجة حرارة 95±1س° لمدة 15 دقيقة.
4- اجري طرد مركزي بسرعة 13000 دورة دقيقة- وبدرجة 4 ±1س° ولمدة 15 دقيقة.

تقدير الدنا وقياسه

قدرت نقاوة وتركيز الدنا المستخلص من العينات المعزولة باستخدام جهاز Biodrop Spectrophotometer (شركة Cambridge CB4 , England) وعند طول موجي 280/260 نانوميتر ، حفظت العينات في -20±1س° لحين الاستخدام.

عدة عمل الـ PCR للتحري عن جين 16s rDNA

استخدم في هذه الدراسة بوادئ عامة Universal Primers للتحري عن جين 16srDNA والمجهز من شركة promega بهيئة مجفدة Lophilized form ، ولتحضير محلول العمل ذوب البادئ في ماء مقطر معقم وبتركيز نهائي 10 pmol \ µl كما موضح في جدول (1)

جدول (1): تسلسل البوادئ المستخدمة للتحري عن جين 16s rDNA

ت	3̀ → 5̀	أسم الجين المستخدم
27f Upstream 1392r Downstream	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GACGGGCGGTGTGTAC	16srDNA

[11]

تفاعلات PCR للتحري عن جين 16s rDNA

حضر المزيج الرئيس بحجم 50 مايكروليتر لجميع العينات والذي يحتوي على المكونات الموضحة في الجدول (2) أدخلت الانابيب بعد ذلك في جهاز المضخم الحراري PCR لانجاز التضاعف وباستعمال البرنامج الاتي:

جدول (2): أحجام الإضافات في مزيج تفاعل PCR

المكونات	حجم العينة / مايكروليتر
D.W	14
Green master mix	25
Primers forward	1.5
Primers reverse	1.5
DNA template	8
حجم العينة النهائي	50 مايكروليتر
التركيز النهائي	50 نانوغرام/مايكروليتر

min	5	1 Cycle
sec	35	
min	1.35	35 Cycle
min	1.35	
min	10	1 Cycle

رحلت العينات بجهاز الترحيل الكهربائي ،باستخدام هلام الاكاروز 2% بفولتية 50 لمدة 75 دقيقة ومن ثم فحص الهلام باستخدام الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغه لمدة 45 دقيقة بصبغة الإثيديم برومايد للتحري عن وجود جين 16s rDNA عند الموقع 1350 bp، مقارنة مع 100bp ladder(promega) .

تحديد تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16s

اجري تحديد التتابعات الوراثية لجين 16srDNA وأنجز الفحص في شركة (Macro gen , USA) تم التحري عن التطابق الجيني باستخدام برنامج (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool والمتوفر في المركز الوطني لمعلومات التقانات الحياتية (NCBI) National Center Biotechnology Information وعلى الموقع (http://www.ncbi.nlm.nih.gor)

العلاقة التطورية للسلالات المشخصة

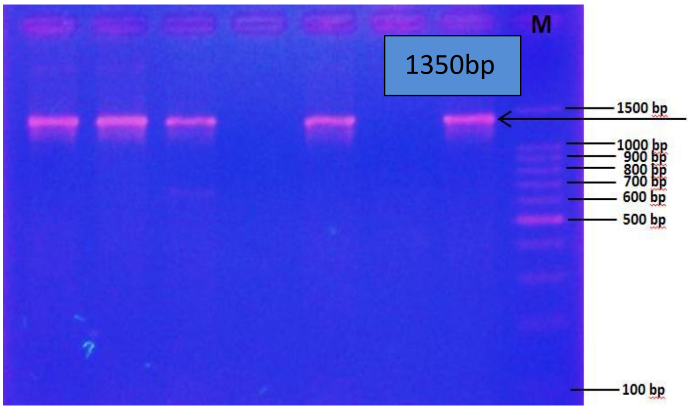
Phylogenetic relationships of strains

حصل على العلاقة التطويرية بين السلالات التابعة لجنس Streptomyces البالغ عددها 6 باستخدام Clustal W و طريقة Maximum likelihood ضمن برنامج Meg 5 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) إعتماداً على نموذج [12].

النتائج والمناقشة

شخصت ست عزلات انها تابعة لجنس Streptomyces من الترب الملوثة بالهيدروكاربونات اعتمادا على الصفات المظهرية ومنها شكل ولون المستعمرات الجلدية القوام وشكل الغزل الهوائي وانتاج الصبغات الخارجية ورائحة التربة [2] .

اعتمادا على التشخيص الجيني ظهرت الحزم لناتج البلمرة PCR لجزء 16s rDNA عند 1350 زوج قاعدي مقارنة بالسلم القياسي 100 زوج قاعدي (ladder 100bp) ، كما موضح في الصورة (1).



صورة (1): الحزم التابعة لجزء 16s rDNA عند 1350 زوج قاعدي مقارنة بالسلم القياسي 100 زوج قاعدي

شخصت العزلات جينيا اعتمادا على تحليل تتابع جزء الـ 16s rDNA عند مقارنتها مع السلالات القياسية ضمن برنامج NCBI الى الانواع *Streptomyces flavogriseus* و *Streptomyces coelicolor* و *Streptomyces albus* وبنسب تشابه تراوحت بين (94- 96 %) كما موضح في شكل (1) وجدول (3).

Sequences producing significant alignments:

Select for downloading or viewing reports	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Streptomyces flavogriseus ATCC 33331 chromosome, complete genome	1932	11566	98%	0.0	95%	NC_016114.1

Sequences producing significant alignments:

Select for downloading or viewing reports	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Streptomyces flavogriseus ATCC 33331 chromosome, complete genome	1866	11167	98%	0.0	96%	NC_016114.1

Show/hide columns of the table presenting sequences producing significant alignments

Sequences producing significant alignments:

Select for downloading or viewing reports	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Streptomyces albus J1074, complete genome	1982	13866	98%	0.0	94%	NC_020990.1

Select for downloading or viewing reports	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Streptomyces albus J1074, complete genome	1762	12339	92%	0.0	95%	NC_020990.1

Select for downloading or viewing reports	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Streptomyces coelicolor A3(2) chromosome, complete genome	1941	11635	94%	0.0	96%	NC_003888.3

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

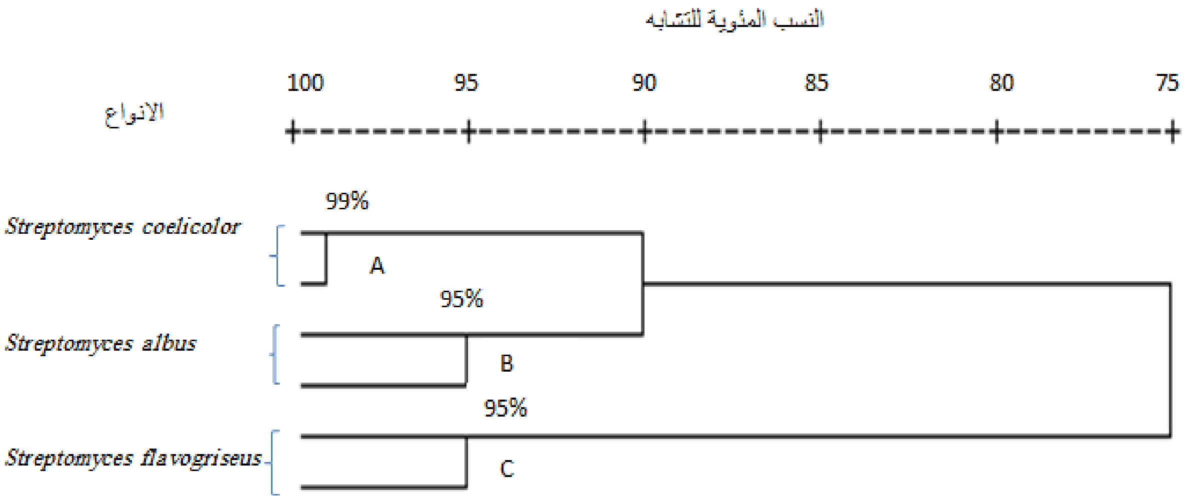
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
	Streptomyces coelicolor A3(2) chromosome, complete genome	1964	11784	93%	0.0	96%	NC_003888.3

شكل (1): نتائج تشخيص العزلات التابعة لجنس Streptomyces اعتمادا على تحليل تتابع جزء الـ 16s rDNA عند مقارنتها مع السلالات القياسية ضمن برنامج NCBI .

جدول (3): تشخيص الانواع المعزولة اعتمادا على تحليل تتابع جزء الـ 16s rDNA مقارنة بالسلالات القياسية ضمن برنامج NCBI اضافة الى منطقة العزل.

ت	منطقة العزل	اسم السلالة المفحوصة	نسبة التشابه مع السلالات القياسية	
1	تربة ملوثة بالهيدروكاربونات	*Streptomyces flavogriseus*	95%	*Streptomyces flavogriseus* ATCC33331
2	تربة ملوثة بالهيدروكاربونات	*Streptomyces flavogriseus*	96%	*Streptomyces flavogriseus* ATCC33331
3	تربة ملوثة بالهيدروكاربونات	*Streptomyces albus*	94%	*Streptomyces albus* J1074
4	تربة ملوثة بالهيدروكاربونات	*Streptomyces albus*	95%	*Streptomyces albus* J1074
5	تربة ملوثة بالهيدروكاربونات	*Streptomyces coelicolor*	96%	*Streptomyces coelicolor* A3(2)
6	تربة حديقة	*Streptomyces coelicolor*	96%	*Streptomyces coelicolor* A3(2)

أوجدت العلاقة المظهرية بين الانواع المعزولة باستخدام التصنيف العددي وذلك بمقارنة عدد 48 من الصفات الشكلية والفسلجية باستخدام التحليل العددي بطريقة الربط بالمعدل الموزون وباستخدام معامل التشابه البسيط حيث حصل على ثلاثة عناقيد ارتبطت عند نسب تشابه تراوحت بين (95-99 %) ضمن المخطط الشجري الشكل 2 . حيث تعنقدت السلالات في ثلاثة عناقيد ضمن المخطط الشجري ضم العنقود A سلالتين للنوع *Streptomyces coelicolor* مرتبطة عند نسبة تشابه 99% في حين تعنقدت سلالتي النوع *Streptomyces albus* ضمن العنقود B وعند نسبة تشابه 95% كما تعنقدت سلالتي النوع *Streptomyce flavogriseus* ضمن العنقود C وبنسبة تشابه 95% .



شكل (2): المخطط الشجري للأنواع قيد الدراسة باستخدام الربط بالمعدل الموزون ومعامل التشابه البسيط

جدول (4): النسب المئوية للصفات للانواع التابعة لجنس Streptomyces ضمن العناقيد في الشجرة التصنيفية المظهرية شكل (2)

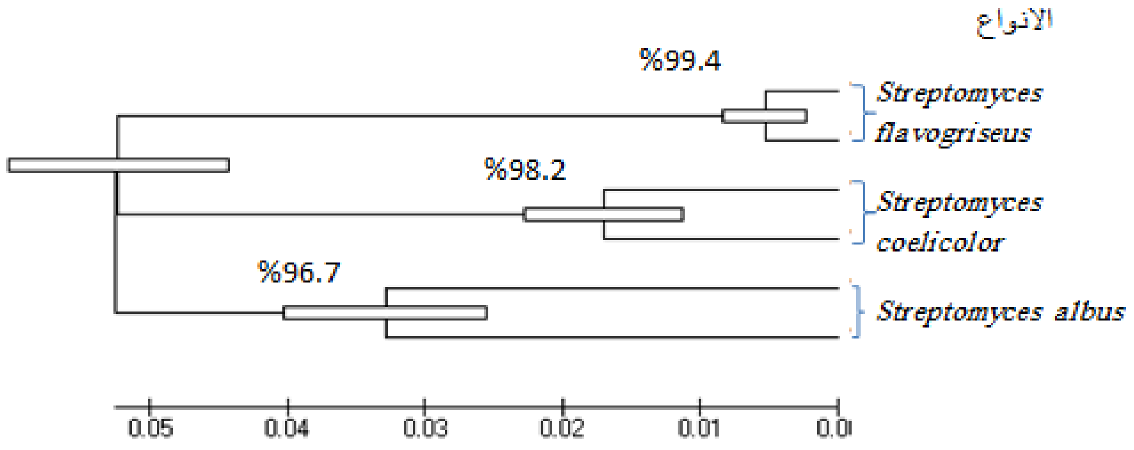
رمز العنقود		A	B	C
الانواع		*Streptomyces coelicolor*	*Streptomyces albus*	*Streptomyces flavogriseus*
عدد السلالات		2	2	2
الصفات		النسب المئوية للصفات		
فات المستعمرة على وسط مولر هنتون	حجم المستعمرة	m	m	m
القوام	ملتصقة	0	0	0
اللون	برتقالي	0	0	100
	عسلي	0	100	0
	قهوائي	100	0	0
سطح المستعمرة	طباشيري	100	100	100
اللون	ابيض	50	50	50
	رصاصي	100	100	100
شكل الغزل الهوائي	متفرع	100	100	0
	حلزوني	50	100	0
	متعرج	50	0	100
	لزون مكبوس كثيف	0	100	0
ج الصبغات الخارجية	برتقالية او وردية	0	0	100
	قهوائية	0	0	0
انتاج رائحة التربة		100	100	100
تحليل الدم خلال 24 ساعة		100	0	100
تحليل الدم خلال 72 ساعة		100	0	100
لنمو بتراكيز ملحية (ملح الطعام)	%1	100	100	100
	%3	100	100	100
	%5	100	100	100
	%7	100	50	0
كلوريد الزئبق		100	100	100
كلوريد الكوبلت		0	0	0
كبريتات الزئبق		100	100	100
كبريتات الزنك		0	0	0
نترات الكوبلت		0	0	0
نترات الرصاص		0	0	0
كبريتات النيكل		0	0	0
خلات الرصاص		0	0	0
خلات الفضة		0	0	0
ثنائي اوكسيد التيتانيوم		0	0	0
كلوريد الفضة		0	50	50
Ampicillin 10 µg		0	0	0
Penicillin 10 iu		0	0	0
Norfloxacin10 µg		50m	50	50m
Erythromycin 10 µg		0	50	0
Ciprofloxacin 10 µg		100	100	100
Ceftriaxone30 µg		0	0	0
Chloramphenicol 30 µg		0	100m	50/50m
Cephalothin30 µg		0	0	0
Methicillin 5 µg		0	0	0
Tobramycin 10 µg		100	100	100
Gentamycin 10 µg		100	100	100
Trimethoprim1.2 5 µg sulfamethaxazol 25 µg		0	0	0
Tetracycline 30µg		0	50	0
Vancomycin 30 µg		100	100	100
Amikacin 10 µg		100	100	100
Imipenem 10 µg		100	100	100

m متوسطة الحجم .
s صغيرة .
100% حساسة .
0% مقاومة.
m متوسطة الحساسية.

ان تحمل بكتريا التربة لبعض املاح المعادن الثقيلة في البيئة يمكن ان يفسر على اساس امتلاكها اليات داخل وخارج خلوية ومنها افرازها chelates و siderophore و biomineralization وامتزاز الجدار الخلوي cell wall adsorption والتخزين الداخل خلوي intracellular storage [13]. اظهرت جميع العزلات سواء المعزولة من بيئة ملوثة اوغير ملوثة القدرة نفسها على تحمل المعادن المستخدمة في الدراسة مما يدل على قابلية الانواع المفحوصة على مقاومة الظروف البيئية واحتمالية تحليلها لمختلف المركبات

المعقدة والتي تعود لامتلاكها عدد كبير من الجينات لاكبر جينوم بكتيري معروف مما مكنها من التاقلم مع مختلف البيئات والظروف حتى لو كانت طارئة ، وهذا ماشار اليه الباحث [14] عن دور النوع *Streptomyces coelicolor* في تحليل مختلف المركبات العضوية وغيرالعضوية والناتجة عن امتلاكها لاكبر جينوم بكتيري خطي مما مكنها من امتلاك اعداد كبيرة من الجينات وبالتالي تاقلمها لمختلف البيئات.

حصل على المخطط التطوري للعلاقة بين الانواع اعتمادا على تحليل تتابعات جزء الـ16srDNA باستخدام الـW Clustal وطريقة Maximum Likelihood ضمن برنامج Mega 5 كما موضح في المخطط الشجري شكل (3) حيث أتضح وجود على ثلاثة عناقيد ضم العنقود الاول سلالتي النوع *Streptomyces flavogriseus* وبنسبة تشابه 99.5% وارتبطت سلالتي النوع *Streptomyces albus* عند نسبة تشابه 96.5%، وارتبطت سلالتي النوع *Streptomyces coelicolor* عند نسبة تشابه 98.5% .



شكل (3): العلاقة الجينية بين الانواع قيد الدراسة اعتمادا على دراسة تتابع جزء الـ16srDNA باستخدام طريقة الـW Clustal وطريقة Maximum Likelihood ضمن برنامج Mega 5.

ضرورة اعتماد وتثبيت الصفات المظهرية باستخدام اوساط زرعية وظروف تحضين قياسية وتثبيتها بدقة للعمل على تثبيت الصفات المظهرية للنوع نظرا للتغاير الكبير في الصفات المظهرية باختلاف الاوساط الزرعية خاصة شكل ولون المستعمرة وانتاجها للصبغات الخارجية مما ادى الى ادراج انواع عديدة قد تعود لنوع نتج عنه صعوبة تشخيص الانواع التابعة لجنس الـStreptomyces والعمل على تثبيتها مع التشخيص الجيني والذي اثبت توافقه مع التشخيص المظهري ضمن المخطط الشجري للصفات المظهرية شكل(2) مع المخطط الشجري للصفات الجينية الشكل 3 حيث تعنقدت الانواع مع بعضها في ثلاثة عناقيد مع اختلاف بسيط في نسب التشابه وهذا ما شار اليه الباحثين [1،4] عن دور التصنيف المتعدد polyphasic taxonomy المعتمد على الصفات الجينية genetic وكذلك الصفات المظهرية phenotypic في التاثير على تصنيف مجموعة الـStreptomycets . مع هذا الانواع المتقاربة والتابعة لجنس Streptomyces مازالت غير مثبتة او محددة ، وان انواع عديدة تمتلك تسميات اخرى كما في النوع حاليا *Streptomyces flavogriseus* الذي يمتلك تسمية اخرى سابقا وهو *Sterptmyces flavovirens* [14].

من خلال دراسة الباحث [15] وجد علاقة قوية وممتازة بين التصنيف الجيني والمظهري المعتمد على دراسة التصنيف العددي لاكبر عدد من الانواع التابعة لجنس Streptomyces حيث تجمعت الانواع ذات الصفات المظهرية المشتركة في عنقود واحد وهو مشابه لما توصلنا اليه من نتائج البحث الحالي .

المصادر

1. Rong, X. and Huang, Y. (2010). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology . 60: 696–703.
2. Madigan, T.M., Martinko, M.J., Stahl, A.D. and Clark, P.D. (2013). Brock Biology of Microorganisms. Thirteenth Edition publishing as Benjamin Cummings, San Francisco.
3. Garrity, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T.C. (2004). Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology . 2nd ed. Springer New york, Inc. U.S.A, pp1-401.
4. Anderson, A. S. and Wellington, E.M.H. (2001). The taxonomy of Streptomyces and related genera . International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51:797-814.
5. Chater, K. F. , Biro, S ., Lee, K. J., Palmer, T. and Schrempf, H. (2010).The complex extracellular biology of Streptomyces. FEMS Microbiol Rev . 34:171–198.
6. Karanth, N.G.K., Deo, P. G. and Veenanadig, N. K. (2005). Microbial production of biosurfactants and their importance. http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles19.htm.

7. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P.H.A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (2000). Bergeys Manual of Determination Bacteriology. 9^{th} ed., Lipponcott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA., pp: 189-255.

8. Lakshmipathy, T.D., Prasad, S.A. and Kannabiran, K. (2010). Production of biosurfactant and heavy metal resistance activity of *Streptomyces* sp.VITDDK3-a novel halo tolerant Actinomycetes isolated from Saltpan Soil . Advances in Biological Research. 4 (2): 108-115.

9. National Committee for Clinical Laboratory. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing–Twenty–First Information Supplement. NCCLs.M100-21.31(1). National Committee for Clinical Laboratory Clinical and Laboratory Standards Institute. USA.

10. Bodour, A.A., Drees, K.P. and Maier, R.M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated Arid Southwestern Soils. Appl. Environ. Microbiol. 69(6): 3280-3287.

11. Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. in nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M.John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom. pp. 115–175.

12. Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution. 10:512-526.

13. Kothe, E., Dimkpa, Ch., Haferburg, G., Schmidt, A., Schmidt, A . and Chutze, E. (2010). Soil Biology :soil heavy metals. Vol 19 . springer Berlin Heidelberg. pp.225-235.

14. Bently, S.D.,Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D. et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycetes *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature.417:141-147. online

15. Labeda, D.P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A.C., Lanoot, B. et al. (2011). Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae . Antonie Van Leeuwenhoek. Published.