

التحري عن مقاومة المعادن الثقيلة والمضادات الحيوية في بعض عزلات بكتريا الجنس *Bacillus* المعزولة من الترب العراقية

خلود عبد الاله الخفاجي وصفاء عبد الرحيم محمود وصفاء عبد الهادي صالح

الدائرة الزراعية وتكنولوجيا الاغذية/ مركز التقانات الاحيائية/ قسم الهندسة الوراثية/ وزارة العلوم والتكنولوجيا

الخلاصة:

تم التحري عن مقاومة المعادن الثقيلة والمضادات الحيوية في بعض العزلات المحلية لبكتريا شخصت بانها تعود لجنس *Bacillus* وكان عدد من هذه العزلات محبة للقاعدة او محبة للحرارة، بينت النتائج وجود اختلاف في مقاومتها لعدد من المعادن الثقيلة شملت الرصاص والزنثيق والكروم والكوبلت والموليبيديوم والزنك. واختلفت مقاومتها لعدد من المضادات الحيوية والتي شملت الامبسلين والكلورام فينيكول والستريبتومايسين والريفامبين والنتراسايكلين والكاناماييسن حيث أظهرت بعض العزلات المقاومة للمعادن الثقيلة مقاومة للمضادات الحيوية، بين فحص الدنا لبعض عزلات *B. alcalophilus* وجود بلازميدات مختلفة الاحجام ونمط الترحيل الكهربائي وخلو عزلات بكتريا *B. stearothermophilus* منها. كلمات مفتاحية: معادن ثقيلة، *B. alcalophilus*، *B. stearothermophilus*، بلازميد.

Detection of heavy metal and antibiotics resistant in some isolates of *Bacillus* isolated from Iraqi soil.

Al- Khafaji, K. A.; Saffa A. R. and Saffa, abid al- Hadi

Genetic Engineering and Food Biotechnology Center, Agricultural and Food Technology Directorate, Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq.

Abstract:

Heavy metals and antibiotic resistance were screened for local isolates of *Bacillus* species which either alkalophil or thermophil. Differences in their heavy metals resistant were detected against Pb, Hg, Cr, Co, Mo and Zn. Antibiotic resistant for ampicillin, cholaramphenicol, tetracycline, kanamycin, rifampcin and streptomycin were detected. Some of the isolates belong to *B. alcalophilus* have heavy metals and antibiotic resistance. DNA electrophoresis showed difference in plasmids size and electrophoresis profile of some isolates of *B. alcalophilus*, no plasmid was recognized in DNA samples of *B. stearothermophilus*.

Key words: heavy metals, *B. alcalophilus*, *B. stearothermophilus*, plasmid.

تحتوي البيئة على العديد من المواد ذات الطبيعة المختلفة والتي قد توجد بالتركيب الاساسي للبيئة او المدخل بفعل العمليات المختلفة للانسان من زراعة وصناعة وتربية حيوان، احد اهم العناصر البيئية هي العناصر الثقيلة والتي تعرف بانها مجموعة من العناصر ذات كثافة ذرية اكبر من 5 غرام/سنتيمتر³. تلعب بعض العناصر الثقيلة دوراً حيوياً في عمليات ايض البكتريا ويحتاجها الكائن المجهرى بكميات نزره وفقدائها يسبب العديد من المشاكل الايضية لكونها ذات علاقة مع انتقال الالكترونات لزيادة ثباتية بعض الجزيئات من خلال التفاعلات الالكتروستاتيكية ولها دور في فعالية الانزيمات والمحافظة على الضغط التناضدي، وبالمقابل هناك بعض العناصر الثقيلة التي لا يحتاجها الكائن الحي في فعالياته الحيوية وهي تعد ضارة له وان كانت في تراكيز منخفضة ومع ذلك تصبح التراكيز العالية من العناصر الثقيلة جميعها سامة للكائن الحي.

تؤثر العناصر الثقيلة على العدد البكتيري من خلال تأثيرها على النمو والشكل المظهري والفعاليات البايوكيميائية وبالنتيجة تقل الكتلة الحيوية والانتشار البيئي لهذه الكائنات حيث تعد الاحياء المجهرية احد اهم الشواهد على التغيرات الحاصلة في البيئة فهي تكون حساسة للتراكيز المنخفضة من العناصر الثقيلة (1) فهي تعمل على تحطيم الغشاء الخلوي وتغير في خصوصية الانزيمات وتعمل ضرر كبير للدنا البكتيري وتأتي سمية هذه العناصر من خلال احلال العنصر الثقيل مواقع العناصر الطبيعية للمواقع الفعالة للانزيمات او تداخلها مع هذه المواقع بالاضافة الى تغييره لشكل وتركيب البروتين والاحماض النووية وتداخلها مع عمليات الفسفرة التاكسدية والسيطرة التناضدية (2,3). ولقد طورت الاحياء المجهرية العديد من الاليات ذات العلاقة مع مقاومة العناصر الثقيلة لتلافي سميتهما والتي تشمل الازالة بعمل الحواجز (permeability barrier)، الحجز الخلوي (cellular sequestration) والتحول الانزيمي واختزال العنصر لتحويله الى اقل سمية وطرح العنصر الى خارج الخلية وادمصاص العنصر الى الجدار الخلوي للبكتريا. للحصول على مثل هذه المقاومة تشفر الاحياء المجهرية للعديد من الجينات المسؤولة عن هذه الاليات ويكون بعض من هذه الجينات موجودا على الكروموسوم والبعض الاخر محمولا من قبل عناصر خارج كروموسومية (البلازميدات) والتي يكون للعديد منها القدرة على الحركة والانتقال من بكتريا لاخرى خلال النظام البيئي مثل التربة والمياه وعادة ما تكون المقاومة للمعادن الثقيلة مقترنة مع المقاومة للمضادات الحيوية (4,5). حيث عزل العديد من الاحياء المجهرية المقاومة للعناصر الثقيلة من مصادر بيئية ملوثة او غير ملوثة بها. لذا هدف البحث الى التحري عن مقاومة المعادن الثقيلة لعزلات بكتيرية محبة للقاعدة لنوع *Bacillus alcalophilus* وعزلات محبة للحرارة تعود للنوع *B. Stearothermophilus* والمقارنة بين مقاومتها وتحديد التركيز المثبط الادنى للعناصر الثقيلة اضافة الى تحديد حساسية تلك العزلات الى المضادات الحيوية والتحري عن البلازميدات واختلافاتها بين العزلات المحبة للقاعدة والمحبة للحرارة.

مواد وطرق العمل

عزل البكتريا:

عزلت البكتريا المحبة للقاعدة العائدة لجنس *Bacillus* بنشر 0.1 مليلتر من محلول التربة المبستر على سطح الاكار القاعدي والذي يتكون من المكونات الاتية (10 غرام كلوكوز و5 غرام ببتون و5 غرام من المستخلص الخميرة و10 غرام من فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين و0.2 غرام من كبريتات المغنيسيوم المائية و15 غراك اكار و900 مليلتر ماء مقطر) اضيف بعد تعقيم الوسط 100 مليلتر من 20% كربونات الصوديوم لتعطي وسطا ذي رقم هيدروجيني 11 حظنت الاطباق بدرجة 35 °م لمدة 24-48 ساعة والتقطت المستعمرات المفردة وكما هو وارد في (6). عزلت البكتريا المحبة للحرارة باستعمال وسط المرق المغذي الصلب وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 65 °م ولمدة 18 ساعة.

تشخيص العزلات البكتيرية:

شخصت العزلات البكتيرية من خلال فحص شرائح مجهرية مصبوغة بصبغة كرام للعزلات المعزولة لتحديد كونها ايجابية ام سالبة لملون كرام وشكل البكتريا ووجود السبورات ومواقعها وشكلها بالاضافة لذلك اعتمدت فحوصات الكيمياء الحيوية لتحديد جنس ونوع البكتريا المعزولة.

تتمية البكتريا:

زرعت العزلات البكتيرية على الوسط المغذي السائل وحظنت بدرجة 35 °م للعزلات المحبة للقاعدة و55 °م للعزلات المحبة للحرارة.

فحص الحساسية للمضادات الحيوية:

اعتمد فحص الانتشار بالاكار باستعمال اقراص المضادات الحيوية (7) لفحص الحساسية للمضادات الحيوية وحضنت الاطباق بدرجة 35 °م او 55 °م وسجلت اقطار مناطق التثبيط حول قرص المضاد لتحديد مقاومة البكتريا.

فحص الحساسية للعناصر الثقيلة:

استعملت تراكيز مضاعفة وهي (0.0025، 0.005، 0.01، 0.05، 0.1، 0.5، 1، 2.5، 5، 10، 20) ملي مولاري لعدد من العناصر الثقيلة شملت الرصاص والزنك والارصين والكروم والكوبلت والمولبيديوم. تمت اضافة العنصر الثقيل الى وسط الاكار المغذي ونشرت العزلات وحضنت بدرجة 35 °م او 55 °م ولمدة 18-72 ساعة قرأت النتائج بوجود نمو (R) للبكتريا المقاومة او عدمه (S) للبكتريا الحساسة وكما هو وارد في Filali (5).

استخلاص الدنا و التحري عن المحتوى البلازميدي :

اتبعت طريقة الترسيب بالملح للتحري عن المحتوى البلازميدي في العزلات قيد الدراسة وكما اشار اليه AI-Khafaji (8). اجري الترحيل الكهربائي لنماذج الدنا بهلام الاكاروز ذي التركيز 1% وبفولتية ثابتة قدرها 5

مختلفة من محافظات بغداد والبصرة والنجف و كربلاء وبين
الفحص المجهرى للعزلات جميعها ان البكتريا هي عصيات
تعود للمجموعة الموجبة لملون كرام واعطت المستعمرات
فحصا موجبا لانزيم الكاتاليز. واحتوت المجموعة المحبة
للقاعدة على سيورات وسطية الموقع دائرية الى بيضوية
الشكل بينما ظهرت سيورات البكتريا المحبة للحرارة بشكل
بيضوي قريب من نهاية الخلية وادى البعض منها الى انتفاخ
في الخلية الام وانتظمت معظم الخلايا بشكل ازواج وكما هو
واضح في الشكل (1).

فولت /سم، فحص هلام الاكاروز تحت الاشعة فوق
البنفسجية باستخدام جهاز UV transilluminator (9).

النتائج والمناقشة:

تم عزل عشر عزلات محبة للقاعدة وثلاث عزلات محبة
للحرارة تعود لجنس *Bacillus* من نماذج ترب لمناطق



شكل(1): شكل خلايا بكتريا النوع *B. stearothermophilus* صبغت بصبغة كرام

شخصت الفحوصات الفسلجية المختلفة وفحوصات الكيمياء الحيوية ان البكتريا المحبة للقاعدة تعود للنوع *B. alcalophilus*
وذلك اعتمادا على تخميرها للسكريات وقابليتها على النمو بارقام هيدروجينية عالية وصلت الى 11. كما شخصت عزلات البكتريا
المحبة للحرارة بانها تعود للنوع *B. stearothermophilus* حيث امكن الحصول على نمو واضح للعزلات بدرجة حرارة 65 °م
وكما هو واضح في جدول(1).

جدول(1): الصفات المظهرية والفسلجية والفحوصات الكيمياء الحيوية لتشخيص عزلات بكتريا *Bacillus*

المحبة للحرارة			المحبة للقاعدة										الصفة التشخيصية
H	H	H1	T	X	I.1	G.	1	II.	5	1	G.	10.	
3	2		.2			2.2	8	4	5	2	2	2	
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	انتفاخ الخلية
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	شكل السيور وموقعه
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	انتاج بلورات
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	كاتاليز
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	اوكسيديز
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	تخمير السكريات
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الكلوكوز
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ارابينوز
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	زايلوز
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	مانيتول
+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	تحليل النشاء
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	تحليل الجلوتين
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	تحليل الكازاين
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	نمو في رقم هيدروجيني 6.8

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	نمو في رقم هيدروجيني 5.7
													نمو بدرجات حرارة مختلفة
-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10° م
-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25° م
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	40° م
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45° م
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50° م
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65° م
													نمو بتراكيز ملحية مختلفة
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0%
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2%
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5%
-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	7%
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10%

A= سبور اسطواني مركزي، B= سبور اسطواني تحت نهائي

اوضح فحص الحساسية لعدد من المضادات الحيوية شائعة الاستعمال ظهور عزلات بكتيرية للنوع *B. alcalophilus* مقاومة لبعض المضادات الحيوية منها الامبسلين والكلورامفينكول والكاناميسين والاريثرومايسين والستريبتومايسين وحساسيتها للريفامبسين والتيتراسايكلين بينما اظهرت عزلات النوع *B. stearothermophilus* حساسية شديدة للمضادات الحياتية قيد الدراسة (جدول2) .

جدول2: حساسية عزلات بكتريا *B. alcalophilus* وبكتريا *B. stearothermophilus* لبعض المضادات الحياتية

العزلة البكتيرية	امبسلين	تتراسايكلين	كلورامفينكول	كاناميسين	ريفامبسين	اريثرومايسين	ستريبتومايسين
<i>B. alcalophilus</i>							
10.2	+	-	-	+	-	+	+
G.2	+	-	+	+	-	+	+
12	+	-	+	+	-	+	+
55	+	-	+	+	-	+	-
II.4	+	-	-	+	-	+	-
18	+	-	-	+	-	+	-
G.22	+	-	-	+	-	+	-
I.1	+	-	-	+	-	+	-
X	+	-	-	+	-	+	+
T.2	+	-	-	+	-	+	-
<i>B. stearothermophilus</i>							
H.1	-	-	-	-	-	-	-
H.2	-	-	-	-	-	-	-
H.3	-	-	-	-	-	-	-

+ = مقاومة للمضاد الحيوي، - = حساسة للمضاد الحيوي

مخلفات المضادات الحيوية او بقاياها الى البيئة بصورة عامة من تربة او مياه مما ادى الى تطوير اليات للمقاومة من قبل البكتريا وذلك نتيجة للضغط الانتخابي وتطور عوامل المقاومة لتلك المضادات او انتقال بعض العوامل الوراثية

تظهر العديد من الاحياء المجهرية المقاومة للعديد من العوامل منها المضادات الحيوية حيث سبب ازدياد استعمال المضادات الحيوية العشوائي من قبل البشر في علاج امراض الانسان او الحيوان الى طرح كميات كبيرة من

-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	الخاصين
العزلة II.4										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	الزئبق
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	الخاصين
العزلة 18										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	الزئبق
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الخاصين
العزلة G.2.2										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	الزئبق
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	الخاصين
العزلة I.1										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	الزئبق
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	الخاصين
العزلة X										
-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	الزئبق
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الخاصين
العزلة T.2										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-الزئبق
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الخاصين
العزلة H1										
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الزئبق
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	الكوبلت

+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الخاصين
العزلة H.2										
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الزئبق
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الخاصين
العزلة H.3										
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	الرصاص
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	الزئبق
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	الكروم
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	الكوبلت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المولبيديوم
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الخاصين

بينت النتائج تشابه التراكيز المقاومة لبعض العناصر الثقيلة مثل المولبيديوم والكروم والكوبلت بين عزلات النوع الواحد للبكتريا *B. alcalophilus* و *B. stearotherophilus*. بينما لوحظ اختلاف في تراكيز مقاومة كل من الرصاص والزرنيق والخاصين بين عزلات النوع الواحد حيث لوحظ ارتفاع التركيز المثبط الأدنى في عزلات *B. alcalophilus* للرصاص الى 3.5 ملي مولاري للعزلة X و 3 ملي مولاري للعزلات 10.2 و G2 و 12 وانخفاضه ليصل الى اقل من 0.0025 في العزلات II4 و 18 و G22 و II و يظهر قياس التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات المحبة للقاعدة اختلاف عن ما وجدته Singh and Ashok (15) من ارتفاع التراكيز المثبطة الدنيا للزرنيق والزنك لعزلات بكتيرية محبة للقاعدة تعود لجنس *Bacillus* والذي وصل الى 2.5 ملي مولاري للزرنيق و 3.7 ملي مولاري للزنك. كما بينت النتائج اختلاف التركيز المثبط الأدنى للعنصر الثقيلة قيد الدراسة بين عزلات *B. alcalophilus* و عزلات *B. stearotherophilus* ويوضح جدول(4) التراكيز المثبطة الدنيا لكل عنصر وللعزلات جميعها.

جدول4: التراكيز المثبطة الدنيا للعناصر الثقيلة لبكتريا *B. alclophilus* وبكتريا *B. sterotherophilus*

العزلات البكتيرية													
H3	H2	H1	T2	X	II	G2 2	18	II4	55	12	G2	10 .2	العنا صر
التركيز المثبط الأدنى ملي مولاري													
0.2 5	0.2 5	0.2 5	> 0.0 025	3.5	> 0.0 025	> 0.0 025	> 0.0 025	> 0.0 025	> 0.0 025	3	3	3	رصا ص
> 0.0 025	> 0.0 025	> 0.0 025	0.0 075	0.0 03	0.0 03	0.0 075	0.0 075	0.0 075	اقل 0.0 025	0.0 075	0.0 03	0. 00 75	زئبق
0.0 75	0.0 75	0.0 75	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	< 10	< 10	كروم
0.0 3	0.0 3	0.0 3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0. 3	كوبلت
10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	< 10	< 10	مولبيد يوم
10<	10<	10<	> 0.0 025	> 0.0 025	0.7 5	0.0 3	0.3	0.0 3	0.0 075	0.3	0.0 3	0. 03	خارص ين

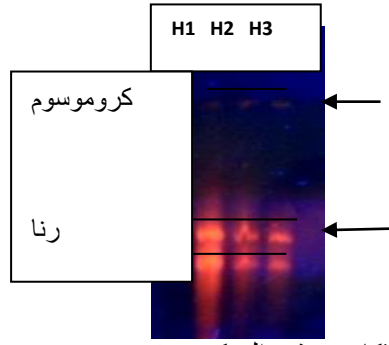
وقد تكون الجينات المسؤولة عن مقاومة المولبيديوم والخارصين محمولة على الكروموسوم.

تشفر العديد من الاحياء المجهرية الى المقاومة للمعادن الثقيلة وقد تحمل جينات المقاومة على الكروموسوم او على البلازميدات وقد يكون للبعض منها القدرة على الانتقال بين البكتريا وقد يكون العديد من جينات المقاومة للمعادن الثقيلة ارتباطاً ومجاورة لمقاومة المضادات الحيوية وتعزى اختلاف مقاومة العزلات للعناصر الثقيلة بينها وبين غيرها الى عدد من العوامل منها مصادر عزل الكائن المجهري والضغط الانتخابي لمناطق العزل وانواع وتراكيز بعض المواد المتأينة ذات الشحنة المتوفرة عند الفحص ووجود بعض العناصر سالبة الشحنة قد يغير من جاهزية العنصر الثقيل في الوسط وسميته للكائن المجهري كما هو الحال مع عنصر الكلور الذي قد يغير من التراكيز المثبطة الدنيا للعناصر الثقيلة وذلك يتوافق مع ما جاء به Bezverbanaya (16). ويعزى سبب مقاومة البكتريا المحبة للحرارة الى عناصر الكادميوم والمولبيديوم لعدد من الامور منها ان البكتريا المحبة للحرارة تنمو في البيئات الحارة ذات التراكيز العالية من العديد من العناصر الثقيلة والمتوفرة بصورة طبيعية مما يعطي فرصة لهذه البكتريا في تحوير بعض الاجزاء الخلوية ومنها الجدران الخلوية لتساهم في الادمصاص الحيوي للعناصر الثقيلة الى السطح الخارجي من الخلية مؤديا الى ظهور المقاومة لهذه البكتريا وتختلف النتائج مع ما اشار اليه Raicevic وجماعته (17) من عزله لبكتريا *B. stearotherophilus* مقاومة لعنصر الكروم وتراكيز تصل الى اكثر من 40 مليمولاري وقد اشار Naik وجماعته (18) الى عزله لبكتريا تعود للنوع *B. subtilis* تملك المقاومة لعنصر الرصاص تصل الى 0.2 ملي مولاري وتحمل جينات المقاومة على بلازميد وقد اشار Singh (4) الى عزله للنوع *B. cereus* من التراب الهندية ويظهر مقاومة لمعادن الارسينيت والرصاص والسيلينيوم و لمضادات البنسلين والينكوميسين وكلوكساسولين وبيفلوكساسين .

بينت المقارنة بين المقاومة للعناصر الثقيلة مع المقاومة للمضادات الحيوية عدم وجود علاقة بين مقاومة مضادات الكاناميسين والامبسلين والاريثروميسين وبين حساسية او مقاومة العزلات المحبة للقاعدة للعناصر الثقيلة وبوجود علاقة بين حدوث مقاومة الكلورامفينكول والستربتومييسين وبين العزلات المقاومة لتراكيز عالية من الرصاص والزنك وقد يكون للمحتوى الوراثي من العوامل خارج كروموسومية علاقة مع وجود مقاومة المضاد الحيوي ومقاومة المعدن الثقيل.

اظهر الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز احتواء العزلات المحبة للقاعدة جميعها على بلازميد تكرر في عزلات *B. alcalophilus* وعند مقارنة وزنه الجزيئي قد يكون له علاقة مع بلازميدات pUB والتي تتكرر في جنس *Bacillus* و جنس *Staphylococcus* وقد تكون له علاقة مع مقاومة المضاد الحيوي الكاناميسين وهذا يتوافق مع فحص الحساسية اذ أظهرت عزلات *B. alcalophilus* قيد الدراسة مقاومة لمضاد الكاناميسين.

بين الترحيل الكهربائي لنماذج دنا العزلات H1,H2,H3 ان العزلات الثلاث خالية من العناصر الوراثية خارج الكروموسوم (البلازميدات) وكما هو واضح في شكل (2)



شكل(2) الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز ذي التركيز 1% وبفرق جهد 5 فولت/سم لنماذج دنا العزلات *B. stearothermophilus*

تظهر بكتريا النوع *B. stearothermophilus* حساسية شديدة للعديد من المواد وقد يعود سبب ذلك تواجدها في البيئات الحارة والتي يكون وصول الملوثات اليها قليل نسبة للبيئات معتدلة درجات الحرارة وقد يعزى سبب امتلاك هذه البكتريا الى مقاومة بعض المعادن مثل المولبيديوم والخاصين الى وجود مثل هذه المعادن كاحد مكونات التربة وقد تكون جينات المسؤولة عن التثفير لمقاومة هذه العناصر محمولة على الكروموسوم البكتيري وأشار Silver (19) ان بعض جينات المقاومة لبعض المعادن مثل الزئبق والارسينيت محمولة على الكروموسوم والبلازميد في بعض الانواع البكتيرية.

المصادر:

- 1- Roane, T. M. Pepper, I. L. (2000). Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microbial ecology*, 38: 358- 364.
- 2- Gremion, F.; Chatzinotas, A.; Kaufmann, K.; Von Sigler, W.(2004). Impact of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve- month microcosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 273- 283.
- 3- Poole, R. K.and Gadd, G. M.(1989). *Metals Microbe interactions*, IRL Press Oxford: 1-37.
- 4- 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 factories*, 9: 59.
- 5- Filali, B. K.; Taoufik, J; Zeroual, Y.; Dzairi, F. Z.; Talbi, M. and Blaghen, M.(2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Current Microbiology*, 41: 151-156.
- 6- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. and Turck, M.(1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathology*. 36: 493- 496.
- 7- Claus, D. and Berkeley, R. C. (1986). Genus *Bacillus* In *Bergeys manual of systematic bacteriology*.
- 8- 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.) vol5(2):3-9*.
- 9- Sambrook , J.; Fritsh, F. E. and Maniatis , T. (1989) . *Molecular cloning : A laboratory manual* 2nd Ed . Cold spring Harbor Laboratory press . New York .
- 10- 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.

- 11- الخفاجي، خلود عبد الاله(2001). عزل بلازميدات من بكتريا مقاومة للمضادات في وقائع المؤتمر العلمي الاول للهيئة الوطنية لبحوث *Bacillus* الحيوية محبة للقاعدة للجنس التقنيات الاحيائية، بغداد 18-19 ايلول : 45-53.
- 12- Messer, JW.; Leslie,JE.; Houghtby, GA.; Peeler, J. T. and Barnett, J.(1982). *Bacillus stearothermophilus* disc assay for detection of inhibitors in milk collaborative study. J. Assoc. off. Anal Chem, 65(5): 1208- 1214.
- 13- Keyhani, E.; Abdi- Oskouei, F.; Attar, F. and Keyhani, J.(2007). DNA strand breaks by metal induced oxygen radicals in purified *Salmonella typhimurium* DNA. Annals of the New York Academy of Science, 1091: 52- 64.
- 14- Collin- Hansen, C.; Ahdersen, R. A. and Stednnes, E. (2005). Damage to DNA and lipids in *Boletus edulis* exposed to heavy metals. Mycological research, 109(12): 1386- 1396.
- 15- Singh, K. L. and Ashok, K. (1998). Incidence of multiple heavy metal resistance in a *Bacillus* species. J. Microbiology and Biotechnology, 8(5): 497- 500.
- 16- Bezverbanaya, I. P. Buzoleva, L. S. and Khristoforova, S. (2005). Metal resistant hetrotrophic bacteria in coastal waters of Primorye. Russ. J. Mar. Biol. 31: 73- 77.
- 17- Raicevic, V.; Golic, Z.; Lalvic, B.; Jovanovic, L.; Kikovic, D.; Mladenovic, S. A.(2010). Isolation of chromium resistant bacteria from a former bauxite mine area and their capacity for Cr(VI) reduction. African J. Biotechnology, 9(40): 6727- 6732.
- 18- Naik, M. M.; Shamim, K. and Dubey, S. K.(2012). Biological characterization of lead resistant bacteria to explore role of bacterial metallothionein in lead resistance. Current Science, 103(4): 25.
- 19- Silver, S. Misra, TK. And Laddaga, RA.(1989). DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances. Boil. Trace Elem. Res.21: 145- 163.