التصنيف العددي بالتحليل العنقودي لانواع من البكتريا الخيطية المحبة للحرارة *Thermoactinomyces* مقارنة بأنواع من الجنسين *Bacillus* و*Paenibacillus*

إسراء غانم السماك

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2008/2/26 ؛ تاريخ القبول 2008/6/9)

الملخص

عزلت من 27 عينة تربة انواع تابعة للبكتريا الخيطية المحبة للحرارة *Thermoactinomyces* المكونة للسبورات الداخلية وقورنت مع بعض العصيات المقاومة للحرارة التابعة لنفس المجموعة والعائدة لجنسي *Bacillus* و *Paenibacillus*, بلغت اعداد مستعمرات البكتريا الخيطية المحبة للحرارة في وسط العزل الاولي (1-4) مستعمرة/غم/10^2 في حين بلغت اعداد البكتريا العصوية (3-137) مستعمرة /غم/ 10^2.

تم انتقاء (35) عزلة ودرست الصفات الشكلية والكيموحيوية والفسلجية وحساسيتها للمضادات الحيوية وصنفت عدديا باستخدام معامل التشابه البسيط (Simple matching coefficient) Ssm والربط بطريقة المعدل, توزعت العزلات على عنقودين رئيسين A وB ضمن المخطط الهرمي الشجري. ضم العنقود A ثلاث عناقيد ثانوية منها A1 الذي ضم 3 سلالات للنوع *Thermoactinomyces vulgaris* وضم العنقود الثانوي A2 سلالة واحدة للنوع *Thermoactinomyces intermedius* والعنقود الثانوي A3 ضم 9 سلالات للنوع *Thermoactinomyces vulgaris*, في حين ضم العنقود الثانوي B1 15 سلالة للنوع *Bacillus mycoides* وB2 ضم 7 سلالات للنوع. *Paenibacillus* spp, وهذا التوزيع يشير الى التقارب الشديد بين الانواع المختلفة التابعة لنفس المجموعة.

Numerical Classification by Cluster Analysis of *Thermoactinomyces* Species as Compared with Some Species of Two Genera *Bacillus* and *Paenibacillus*

Essra G. Al-Sammak
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

Isolation of species belong to endospore forming *Thermoactinomyces* were cared out from 27 soil samples and compared with thermoresistant bacilli belong to two genera *Bacillus* and *Paenibacillus*.

The number of Thermophilic Actinomycetes in primary isolation was (1-4) colony /gm/10^2 but that of Bacilli was (3-137) colony /gm/10^2.

Morphological, biochemical, physiological characters and sensitivity to antibiotics were studied for (35) isolates, and classified numerically by using simple matching coefficient (Ssm) and average linkage method.

Two main clusters A and B were cared out from the herarichichal tree in which cluster A included 3 sub clusters, A1 included 3 strains of the species *Thermoactinomyces vulgaris*, the sub clusterA2 included one strain of the species *Thermoactinomyces intermedius*, and A3 included 9 strains of the species *Thermoactinomyces vulgaris*, were the sub cluster B1 included 15 strain of the species *Bacillus mycoides*, and the sub cluster B2 included 7 strains of the species *Paenibacillus* spp.

This indicated the close relationship between the different species which belong to same group.

المقدمة

اقترح جنس *Thermoactinomyces* من قبل الباحث Tsilinsky 1899 كما اشار الى ذلك Yoon وجماعته (2005), ضم نوع واحد *Thermoactinomyces vulgaris* ثم شخصت انواع اخـرى تابعـة لنفس الجنس. امتازت افراده الموجبة لصبغة كرام بتكوينها للسبورات المفردة الداخلية في كل من الغـزل الهوائي والارضي والمشابهة لسبورات العصيات في مقاومتها للحرارة اذ تقاوم درجة حرارة 90 °م لمدة 30 دقيقة لاحتوائها على عنصر الكالسيوم وحامض Dipicolinic حيث بقيت سبوراتها كامنة لمدة 7500 سنة وتنمو في درجة حرارة (45-60)°م عـدا افـراد النـوع *Thermoactinomyces peptonophilis* (Prescott *et al*., 2005). سبوراتها الداخلية كروية الشكل غير محمولة او محمولة على حامل سـبوري متفرع او غير متفرع، عضوية التغذية، هوائية لها القدرة على استهلاك مـدى واسـع مـن السـكريات وتحليل العديد من المركبات العضوية مستعمراتها دائرية مسطحة او صلبة على وسط الاكـار المغـذي

وتمتـاز بمقاومتهـا للمضـاد الحيـوي Novobiocin بتركيـز 25 مـايكروغرام /سـم^3 (Nilsson and Renberg, 1990). كمـا تمتلـك الحـامض الامينـي meso-diaminopimelic acid (meso-DAP) ولاتمتلك سكريات مميزة للجدار, يعتقد ان افراده متغايرة جينيا Heterogeneous group وتمتلك اكثر من جنس اعتمادا على التحليلات التطورية Phylogenetic، تتواجد في بيئات مختلفة منهـا التربة والهواء والماء والترسبات المائية وفي انظمة التكييف والبيئات الساخنة والقش الرطـب والسـماد الحيواني ومخازن الحبوب وتعتبر المسبب الرئيس لحساسية الجهاز التنفسي لدى المزارعين والمسمى بداء الفلاحين Farmer's lung disease (Yoon and HaPark, 2000; Holt *et al*., 1994).

يعتبر التاريخ التصنيفي لهذا الجنس مربك حيث وضع ولفترة طويلة ضمن المجموعة 28 للبكتريـا الخيطية Actinomycetes في موسوعة بيركي المقررة (Holt *et al*., 1994)، واعتمادا علـى تكوينهـا للسبورات الداخلية ونسبة الكوانين والسايتوسـين GC% (52-55) مـول التـي هـي اقـل مـن تلـك الموجودة في البكتريا الخيطية والتقارب في تتـابع جـزء 16srRNA و5srRNA نقـل هـذا الجـنس الـى عائلـة *Thermoactinomycetaceae* ضـمن رتبـة *Bacillales* وصـنف *Bacilli* (Yoon *et al*., 2000; Yoon and HaPark, 2000)، حيث تعـد عائلـة *Bacillaceae* الاكبـر ضـمن الرتبة اذ وضع العديد من الانواع التابعة لها في اجناس وعوائل جديـدة اعتمـادا علـى دراسـة تتـابع 16s rRNA ومن اهم الاجناس التابعة لها جنس *Bacillus* وكذلك جنس *Paenibacillus* ضـمن عائلـة *Paenibacillaceae* الذي يعتبر من الاجناس الجديدة (Prescott *et al*., 2005).

بسبب التغاير الكبير في افراد جنس *Thermoactinomyces* واهمية افراده من الناحيـة الصـحية ودورها الكبير في حساسية الجهاز التنفسي ونقله من مجموعة البكتريا الخيطيـة الـى رتبـة العصـيات *Bacillales* ارتأت الدراسة التعرف على اهم الصفات التصنيفية المظهريـة مقارنـة بجنسـي *Bacillus* و*Paenibacillus* العائدان لنفس المراتب التصنيفية وتصنيفها عدديا بأستخدام معامـل التشـابه البسـيط والربط بطريقة المعدل.

المواد وطرائق العمل

جمعت 27 عينة تربة من مناطق مختلفة ومتباعدة من محافظة نينـوى واشـتملت تـرب حـدائق ومزارع وحافات نهر للفترة من 2006/12/6 لغاية 2007/4/24, من عمق (2-5) سم, جففت العينات في درجة حرارة 37°م لمدة (2-4) ايام, حضرت تخافيف عشرية وصولا الـى التخفيـف 10^{-3}, سـخنت التخافيف في حمام مائي لمدة 10 دقائق في درجة حرارة95 °م, اخذ 1 سم^3 من التخفيـف 10^{-2} وزرع بطريقة الصب على وسط اكار الاكتينومايسيتات Actinomycetes isolation agar المجهز مـن شـركة Difco والمحضر حسب تعليماتها باضافة 5 سم^3 كليسيرول /لتر من الوسط بعد الغليان وقبـل التعقـيم,

وحضنت العينات في درجة حرارة 45°م لمدة 4-10 ايام في ظروف هوائية مع مراعات وضع الاطباق في اكياس بلاستيكية لمنع جفافها اثناء فترة التحضين (Hleyn and Bicknell, 2001).

حسبت اعداد المستعمرات النامية لكل عينة وسجلت الصفات الشكلية والمجهرية لها، وتم انتقاء 35 عزلة لاجراء الاختبارات الكيموحيوية والفسلجية وحساسيتها للمضادات الحيوية.

استخدمت اوساط زرعية مختلفة علما ان الوسط الاساسي المستخدم اكار ومرق الصويا Trypticase soy agar and broth لاجراء الاختبارات التشخيصية والتصنيفية مع اجراء تحوير باضافة 2% كليسيرول و0.5% لكل من مستخلص الخميرة واللحم لتلائم نمو البكتريا الخيطية المحبة للحرارة. كما استخدمت تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية لملاحظة شكل الغزل الارضي والهوائي للبكتريا الخيطية، واجريت الاختبارات في درجة حرارة 45°م لمدة 1-10 أيام لبطئ نمو البكتريا الخيطية(السماك، 1998)؛ (Shida *et al*., 1997; Koneman *et al*.,1997; Harley and Prescott, 1996; Holt *et al*., 1994; Barrow and Feltham, 1993; Vandepitte *et al*., 1991; Lennette *et al*., 1985; Finegold and Martin, 1982; Starr *et al*., 1981; Kurup and Fink, 1975).

التحليل العددي

اختيرت (35) عزلة تابعة للبكتريا الخيطية والعصوية لاجراء التحليل العنقودي Cluster analysis باستخدام النظام الاحصائي Statistical Package for Sosial Sciences (SPSS).

اشتمل التصنيف العددي على (54) صفة من الصفات الشكلية والفسلجية والكيموحيوية وحساسيتها للمضادات الحيوية ولم تدخل 10 صفات ضمن العملية التصنيفية لكون كل السلالات سالبة او موجبة لها، شفرت البيانات واختير معامل التشابه البسيط Simple matching coefficient (Ssm) وطريقة المعدل Between groups (Average) (عبد الله، 1996; Prescott *et al*., 2005; السماك، 2006).

النتائج والمناقشة

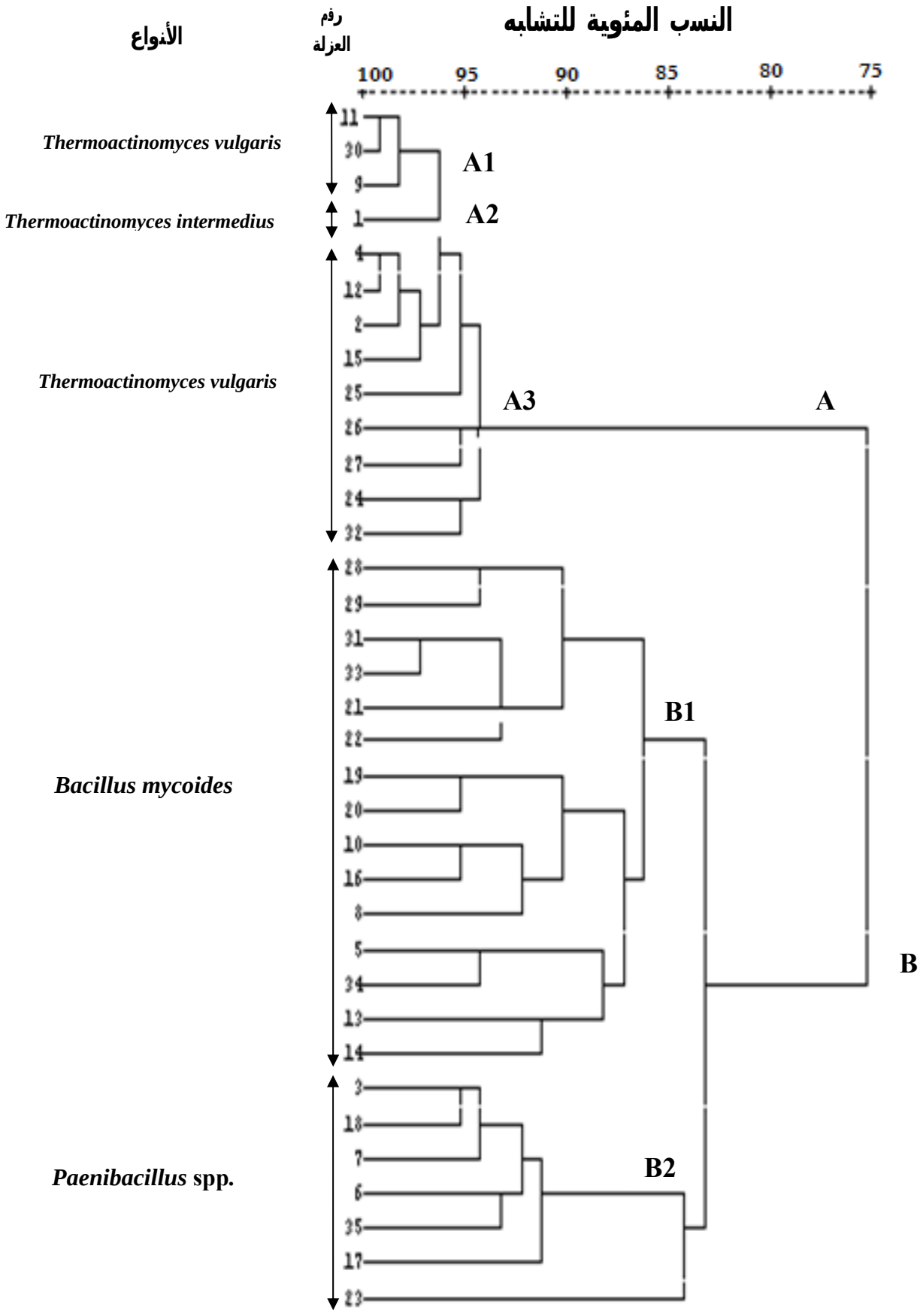
ظهرت البكتريا الخيطية *Thermoactinomyces* في 11 عينة من مجموع 27 عينة وتراوحت اعدادها بين (1-4) مستعمرة/غم/10^2 في حين ظهرت البكتريا العصوية في كل العينات وتراوحت اعدادها بين (3-137) مستعمرة/غم/10^2, كما موضح في الجدول (1).

انتشرت اغلب المستعمرات التابعة للعصيات في الوسط الزرعي بحيث طغت على باقي المستعمرات خاصة الخيطية مما ادى الى صعوبة عزلها, اوضحت دراسة للباحث Xu وجماعته (1996) ان البكتريا الخيطية المحبة للحرارة عزلت بنسبة0.1-2.0 % مستعمرة/غم/10^2 وهي نسبة قليلة مقارنة بانواع البكتريا الخيطية الاخرى, كما لم تعزل ايضا من كل العينات.

الجدول 1: عدد المستعمرات عند التخفيف 10^{-2} لكل من البكتريا العصوية والخيطية

عدد العينات	عدد المستعمرات عند التخفيف 10^{-2}	
	Bacillus , Paenibacillus	*Thermoactinomyces*
1	137	1
2	3	-
3	90	3
4	51	-
5	41	-
6	59	2
7	55	-
8	115	-
9	42	-
10	2	-
11	82	1
12	72	3
13	27	-
14	20	-
15	121	3
16	68	2
17	49	-
18	90	4
19	30	2
20	51	-
21	32	-
22	55	2
23	31	-
24	120	3
25	130	-
26	7	-
27	105	-

تم انتقاء 35 عزلة اعتمادا على الاختلافات الشكلية للمستعمرات في العزل الاولي وان تسخين عينة التربة ادى الى تحديد الانواع المعزولة وبعد اجراء الاختبارات التشخيصية وتصنيفيها عدديا تم الحصول على عنقودين رئيسين (B,A) المرتبطان عند مستوى تشابه 75% ضمن المخطـط الهرمـي الشـجري الشكل (1).



الشكل 1: المخطط الهرمي الشجري للأنواع قيد الدراسة بالتحليل العددي باستخدام طريقة المعدل ومعامل التشابه البسيط Ssm

ضم العنقود A سلالات تابعة للبكتريا الخيطية المحبة للحرارة جنس *Thermoactinomyces* التـي وقعت ضمن ثلاثة عناقيد ثانوية مرتبطة عند مستوى تشابه 94 %, بينما ضم العنقود B عنقودين ثانويين ارتبطا عند مستوى 83%, ضم العنقود الثانوي B_1 سلالات تابعة للنوع *Bacillus mycoides* وبينما ضم B_2 سلالات للنوع *Paenibacillus* spp. كما موضح في الجدول (2).

الجدول 2: النسب المئوية لتشابه الانواع ضمن العناقيد الرئيسة والثانوية اعتمادا على المخطط الشجري الشكل (1)

رمز العنقود	عدد السلالات	الأنواع	نسبة التشابه%
A			
A1	3	*Thermoactinomyces vulgaris*	98
A2	1	*Thermoactinomyces intermedius*	96
A3	9	*Thermoactinomyces vulgaris*	94
B			
B1	15	*Bacillus mycoides*	86
B2	7	*Paenibacillus* spp.	84
المجموع	35		

امتازت السلالات قيد الدراسة بكونها موجبة لصبغة كرام والكتاليز ومكونـة للسـبورات الداخليـة ومحللة للجلاتين وحساسة للمضاد الحيوي Vancomycine ولم تنمو على وسط الماكونكي ولـم تؤكسـد الكلوكوز ولم تنتج غاز كبريتيد الهايدروجين وصبغات خارجية ورائحـة وهـي تعتبـر مـن الصـفات التشخيصية الثابتة والمهمة والتي استحصلت من نتائج الدراسة الحالية ولم تدخل ضمن الجدول التصنيفي (3) لعدم تاثيرها في العملية التصنيفية.

تشابهت الانواع التابعة لجنس *Thermoactinomyces* في اغلـب صـفاتها كمـا موضـح فـي الجدول (3).

حيث ظهرت مستعمراتها في العزل الاولي دائرية مسطحة ذات مركز مرتفع احيانا متوسطة الحجم ذات غزل ارضي مغمور بالاكاروغزل هوائي ابيض قصير وسهل الازالة كما موضح في الصـورة (1) وعند اعادة زرعها اصبحت جادية القوام ملتصقة متعرجة عسلية وذات غزل هوائي ابيض وغزير وكمـا موضح في الصورة (2) خلاياها خيطية مكونة لغزل ارضي وهوائي متفرع حاوي على سبورات داخليـة كروية مفردة بدون حامل سبوري لوحظ من خلال مزرعة الشريحة وكما موضح في الصورة (3).

الجدول 3 : العناقيد التي تم الحصول عليها من الشجرة التصنيفية والنسب المئوية لإظهار الصفات

عدد السلالات الصفات		رموز العناقيد				
		A1	A2	A3	B1	B2
		3	1	9	15	7
العزل الاولي	حجم المستعمرة	66.7m/33.3L	100L	55.6m/44.4L	60m/40L	42.9s/57.1m
القوام	مخاطية	0	0	0	0	42.9
	ملتصقة	0	0	0	66.7	28.6
الحواف	مفصصة	0	0	0	0	14.3
	متعرجة	0	0	0	6.7	14.3
	متجذرة	0	0	0	60	0
معتمة		100	100	100	100	57.1
شاحبة		100	100	100	100	28.6
السطح	طباشيري	100	100	100	0	0
اللون	ابيض	100	100	100	0	0
	عسلي فاتح	0	0	0	□ 100	□ 100
تكوين الغزل الهوائي		100	100	100	0	0
شكل الخلايا	عصوية	0	0	0	100	100
	خيطية	100	100	100	53.3	13.3
موقع السبور	داخلي كروي	100	100	100	0	0
	داخلي بيضوي	0	0	0	100	100
انتفاخ الخلية		0	0	0	♦ 33.3	85.7
شكل النمو في الوسط السائل	طبقة سطحية سميكة	0	0	22.2	66.7	71.4
	رقيقة	◄ 100	◄ 100	◄ 77.8	33.3	14.3
	راسب	0	0	0	40	71.4
	متعكر	0	0	0	0	28.6
كفاءة النمو في الوسط السائل		100w	100	22.2/77.8w	100	100
انتاج الصبغة في الوسط السائل		0	0	0	0	14.3
الحركة في درجة حرارة 45° م		0	0	0	100	100
النمو في درجة حرارة 25° م		0	0	0	93.3/6.7w	14.3/57.1w
النمو في درجة حرارة 37° م		0	0	0	100	85.7
السترات		● 0	0	0	46.7	0
الاوكسديز		33.3/66.7w	100w	33.3/55.6w	53.3/40w	100
الاندول		66.7	100	100	100	100
تحلل البروتين		100	100	88.9	60	71.4
اللسثنيز		66.7	100	66.7	66.7	100
تحلل الدهون		0	100	66.7	0	42.9
تحلل الاسكولين		0	100	0	100	85.7
كفاءة النمو على وسط الاسكولين		100	100	88.9/11.1w	100	71.4/28.6w
تخمر المانيتول		0	0	0	53.3	0
مخاطية القوام على وسط السكريات		0	0	0	86.7	◘ 14.3
النمو بتراكيز ملحية	%3	0	100	11.1	100	42.9
	%5	0	0	0	93.3	0
	% 7	0	0	0	86.7	0
النمو على اكار الدم الخالي من الكليسيرول		100	100	55.6	100	100
تحلل الدم		100	100	55.6	100	85.7
حساسيتها للمضادات الحيوية						
Tetracyclin 30µg		100M	100	100	46.7/6.7M	28.6/42.9M
Gentamycin 10 µg		100	100	100	46.7/46.7M	100
Doxycyclin 30 µg		100	100	77.8/22.2M	40/26.7M	58.7/14.3M
Lincomycin 2 µg		100	100	66.7/33.3M	13.3/20M	85.7
Chloramphenicol 30 µg		100	100	88.9/11.1M	46.7/26.7M	100
Erythromycin 15 µg		100	100	88.9/11.1M	20/6.7M	57.1/42.9M
Rifampicin5 µg		100	100	88.9	86.7	85.7
Ciprofloxacin 100 µg		100	100	55.6/33.3M	100	100
Trimethoprim 5 µg		33.3M	100M	11.1/11.1M	40	28.6/28.6M
Augmantin 30 µg		0	0	0	6.7	0
Ampicillin 75 µg		0	0	0	6.7	0
Amoxyllin 30 µg		0	0	0	6.7	0
Nitrofurontoin 300 µg		100	100	88.9/11.1M	80	100

□ - بعض المستعمرات يميل لونها للعسلي الغامق او الابيض .

♦ - يظهر انتفاخ بسيط عند تكوينها للسبور الداخلي .

◄- مستعمرات صغيرة على الحواف او سطح الوسط الزرعي .

● - لم تنمو على وسط السترات .

◘ - مخاطية القوام اصلا .

L مستعمرات كبيرة .

m متوسطة الحجم .

s صغيرة .

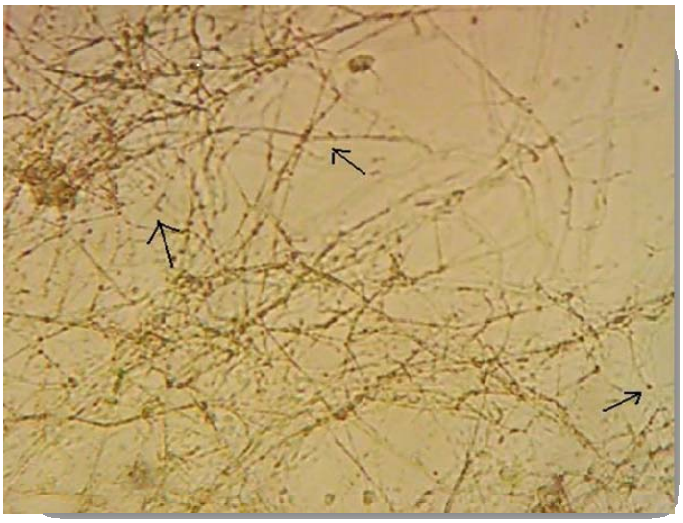
w نمو ضعيف .

M متوسطة الحساسية .

التصنيف العددي بالتحليل العنقودي لانواع من البكتريا.....

الصورة 1: مظهر مستعمرات البكتريا الخيطية المحبة للحرارة في العزل الاولي على وسط اكار الاكتينومايسيتات

الصورة 2: مظهر مستعمرات البكتريا الخيطية المحبة للحرارة عند تكرار الزرع



الصورة 3: مظهر الغزل البكتيري الحامل للسبورات المفردة في البكتريا الخيطية المحبة للحرارة قوة التكبيرx1000

تشابه النوعان *Thermoactinomyces vulgaris* و *Thermoactinomyces intermedius* في اغلب الصفات عدا كون الاخيرموجب للاسكولين (Holt *et al.*, 1994) كما امتازت بصعوبة العزل والنمو في الاوساط الخالية من الكليسيرول وعليه تم اضافته للاوساط قيد الدراسة واحيانا لاتنمو على نفس الوسط الذي نمت عليه سابقا خاصة وسط العزل الاولي، واظهرت نموا ضعيفا في وسط المرق المغذي الخالي من الكليسيرول ومرق الصويا الحاوي على الكليسيرول حيث ظهرت بشكل مستعمرات صغيرة ملتصقة على الحواف السطحية للوسط السائل او صغيرة جدا صعب تمييزها عدا ثلاث عزلات نمت بشكل طبقة سطحية سميكة وعند تكرار زرعها اظهرت نموا ضعيفا ايضا أي ان نموها بصورة عامة في الوسط السائل ضعيف وعليه اخذت المستعمرات مباشرة وفرشت على وسط اكار الصويا والكليسيرول لدراسة حساسيتها للمضادات الحيوية كم تم اضافة الكليسيرول ومستخلص اللحم والخميرة للاوساط الجاهزة لاجراء الاختبارات التشخيصية والتصنيفية. اظهرت كفاءة عالية في تحليلها للجلاتين، كما انتجت الاندول بصورة ضعيفة. اظهرت افضل نمو في وسط الاسكولين وبعض السلالات لم تنمو على وسط اكار الدم الخالي من الكليسيرول في حين نمت جميعا وحللت الدم في وسط الصويا والكليسيرول وانعدام نموها في درجة حرارة (25 - 37)°م وهي صفات مهمة لعزلها من العينات المرضية.

اظهرت دراسة للباحثان Kurup وFink (1975) حساسية النوع *Thermoactinomyces vulgaris* للمضادان الحيويان Chloramphenicol و Gentamicin وهذه النتائج تتطابق مع نتائج الدراسة الحالية.

كما امتازت سلالات النوع *Bacillus mycoides* بمستعمراتها العسلية المائلة للبياض احيانا والكبيرة غير المنتظمة ذات الحواف المتجذرة وبعضها ظهرت دائرية صغيرة في العزل الاولي ثم اصبحت متجذرة وفقدت الصفة عند تكرار الزرع (Priest *et al.*, 1994)، وهذا مطابق لنتائج الدراسة الحالية حيث اصبحت عسلية غامقة جلدية مجعدة ملتصقة على وسط اكار الدم، ومخاطية على وسط الكلوكوز، غير متحركة في درجة حرارة 37°م ومتحركة في درجة حرارة 45°م، سالبة للاندول عادة ولكن انتجت الاندول بشكل ضعيف في الدراسة الحالية وقد يكون تعرضها للحرارة العالية منذ بداية العزل ادى الى تكيفها وتغيير بعض صفاتها الفسلجية وتعد من الانواع المتحملة لدرجات الحرارة العالية، سبوراتها لاتؤدي الى انتفاخ الخلية، تنمو في 7% ملح الطعام (Murray *et al.*, 1995)، وهي صفات مهمة ادت الى انفصالها عن العنقود الثانوي B_2 الذي ضم سلالات للنوع *Paenibacillus* spp. امتازت بتكوينها للسبورات التى تؤدي الى انتفاخ الخلية وعدم نموها في 7% ملح الطعام وانتاجها للاندول غالبا وهذا مطابق لما اشار اليه (Murray *et al.*, 1995) في حين تشير اغلب المصادر الى كونها سالبة للاندول، واظهرت بعض سلالاتها قواما مخاطيا وسلالة واحدة لم تحلل الدم والاسكولين كما لوحظ انتاج مادة لماعة منتشرة حول المستعمرات على وسط اكار الدم عدا عزلة واحدة وهي صفة لم تشير اليها المصادر.

ظهرت اختلافات ضمن السلالات التابعة لنفس النوع في كونها موجبة او سالبة لاختبار او صفة معينة وهذا وارد جدا في دراسات التصنيف العددي ومنها الدراسة الحالية (السماك، 1998; Gil *et al.*, 1986).

اظهرت دراسة تتابع جزء 16 s rRNA ارتباطا للانواع *Thermoactinomyces vulgaris* و*Thermoactinomyces intermedius* و*Thermoactinomyces candidus* عند مستوى تشابه 90.1 % يليها عنقود لانواع جنس *Bacillus* واخر لانواع جنس *Paenibacillus* واللذان ارتبطا مع العنقود الاول التابع للبكتريا الخيطية عند مستوى تشابه 86.3% (Yoon *et al.*, 2005 ; Yoon and HaPark, 2000) وهذا مشابه لنتائج الدراسة الحالية مما يدل على كفاءة العملية التصنيفية والصفات المظهرية المستخدمة والتي تعد انعكاسا للصفات الجينية.

اقترح الباحث Yoon وجماعته (2000) اعتمادا على دراسة علاقة DNA:DNA ان النوع *Thermoactinomyces candidus* مرادف للنوع *Thermoactinomyces vulgaris* والنوع *Thermoactinomyces thalophilus* مرادف للنوع *Thermoactinomyces sacchari* عند مستوى تشابه 90.8-92.8% حيث يعتبر الفرد تابع لنفس النوع عند نسبة تشابه 70% فما فوق، واعتمادا على دراسة تشابه جزء 16srRNA والتي بلغت 99.4% اعتبر النوع *Thermoactinomyces intermedius* مشابه للنوعين *Thermoactinomyces candidus* و*Thermoactinomyces vulgaris* واعتمادا على دراسة تتابع جزء 16srRNA في دراسة للباحث Xu وجماعته (2002) وقع النوع *Thermoactinomyces intermedius* في عنقود مجاور للنوع *Thermoactinomyces vulgaris* وبعيدا عن باقي الانواع وهو مشابه لنتائج الدراسة الحالية.

تم التعرف على ما لايقل عن عشر مجاميع تطورية ضمن جنس *Bacillus* خمسا منها اعيد تصنيفها في مجاميع جديدة ومنها جنس *Paenibacillus* اعتمادا على دراسة تتابع جزء 16srRNA (Shida *et al.*, 1997)، وفي دراسة للباحث Pettersson وجماعته 1996 تعنقدت الانواع التابعة لجنس *Bacillus* بصورة منفصلة عن انواع جنس *Paenibacillus* وهو مقارب لنتائج الدراسة الحالية.

ان الانواع التابعة للاجناس الثلاثة ترتبت تصنيفيا اعتمادا على صلة قرابتها من بعضها، علما ان الصفات المستخدمة هي مظهرية وليست جينية والتي تعد انعكاسا للصفات الجينية مما يدل على كفاءة الصفات المستخدمة، وهو مطابق لما توصلت اليه البحوث الحديثة والتي ذكرت اعلاه.

المصادر العربية

السماك، اسراء غانم، 2006، دراسة تصنيفية لمجموعة البكتريا الخيطية، اطروحة دكتوراه، جامعة الموصل.

السماك، اسراء غانم، 1998، التصنيف المظهري لانواع جنس العصيات باستخدام التحليل العددي، رسالة ماجستير، جامعة الموصل.

عبد الله، باسمة احمد، 1996، التصنيف العددي بالتحليل العنقودي لجراثيم اشباه القولونيـات، اطروحـة دكتوراه، جامعة الموصل.

المصادر الاجنبية

Barrow, G.I., and Feltham, R.K.A., 1993. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge, pp.87-90.

Finegold, S.M., and Martin, W.J., 1982. Diagnostic Microbiology. 6th ed. C.V. Mosby company, London. 657p.

Gil, M.C.; Rosa, M.C.; Mosso, M.A., and Garcia, M.L., 1986. Numerical taxonomy of *Bacillus* isolated from orally administered drugs. J. Appl. Bacteriol., 61: pp.347-356.

Harley, J.P., and Prescott, L.M., 1996. Laboratory Exercises in Microbiology. 3rd ed. McGraw-Hill company. U.S.A. 141p.

Hleyn, J., and Bicknell, M., 2001. Microbiology Experiments: a Health Science Perspective. 3rd ed. McGraw-Hill companies, New York. pp.63-188.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T., and Williams, S.T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimore. pp.699-700.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C., and Jr, W.C.W., 1997. Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia. pp.655-664.

Kurup, V.P., and Fink, J.N., 1975. A scheme for the identification of thermophilic actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis. J. Clin. Microbiol. 2(1): pp.55-61.

Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J., and Shadomy, H.J., 1985. Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. American Society for Microbiology. Washington. pp.1004-1083.

Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C., and Yolken, R.H., 1995. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. ASM press. Washington , D.C. pp.349-356.

Nilsson, M., and Renberg, I., 1990. Viable endospores of *Thermoactinomyces vulgaris* in lake sediments as indicators of agricultural history. Appl. Environ. Microbiol. 56(7): pp.2025-2028.

Pettersson, B.; Lembke, F.; Hammer, P.; Stackebrandt, E., and Priest, F.G., 1996. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. Inter. J. Syst. Bacteriol. 46 (3): pp.759-764.

Prescott, L.M.; Harley, J.P., and Klein, D.A., 2005. Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies, Inc, New York. pp.503-519.

Priest, F.G.; Muro, M.A., and Kaji, D.A., 1994. Systematic of insect pathogenic bacilli: uses in strain identification and isolation of novel pathogens.Plenum press, New York. pp.275-295.

Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Nakamura, L.K., and Komagata, K., 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus, Bacillus kobensis,and Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus.* Inter. J. Syst. Bacteriol. 47(2): pp.289-298.

Starr, M.P.; Stolp, H.; Truper, H.G.; Balows, A., and Schlegel, H., 1981. The Prokaryotes. 2nd ed. Springel-verlag. New York., pp.1743-1754.

Vandepitte, J.; Engbaek, K.; Piot, P., and Heuck, C.C., 1991. Basic Laboratory Procedures In Clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva., pp.84-95.

Xu, L.; Li, Q., and Jiang, C., 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. Appl. Environ. Microbiol. 62 (1): pp.244-248.

Xu, J.; Rao, J.R.; Millar, B.C.; Elborn, J.S.; Evans, J.; Barr, J.G., and Moor, J.E., 2002. Improved molecular identification of *Thermoactinomyces* spp. associated with mushroom worker's lung by 16s rDNA sequence typing. J. Med. Microbiol. 51: pp.1117-1127.

Yoon, J., and HaPark, Y., 2000. Phylogenetic analysis of the genus *Thermoactinomyces* based on 16s rDNA sequences. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: pp.1081-1086.

Yoon, J.; Shin, Y.K., and HaPark, Y., 2000. DNA-DNA relatedness among *Thermoactinomyces* species: *Thermoactinomyces candidus* as a synonym of *Thermoactinomyces vulgaris* and *Thermoactinomyces thalophilus* as a synonym of *Thermoactinomyces sacchari.* Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: pp.1905-1908.

Yoon, J.: Kim, I.; Shin, Y., and HaPark, Y., 2005. Proposal of the genus *Thermoactinomyces senso strict* and three new genera, *Laceyella, Thermoflavimicrobium* and *Seinonella,* on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: pp.395-400.