

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.* ضد البكتريا المكونة للأغشية الحيوية

ايمان عبدالله الامارة¹ و غيداء جاسم الغزاوي²

¹مركز علوم البحار - جامعة البصرة - البصرة - العراق eman_ab74@yahoo.com

²كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة البصرة - العراق

المستخلص

جُمعت خمسون عينة مياه و ترسبات من مناطق مختلفة في محافظة البصرة جنوب العراق، وُعزلت منها عشرون عزلة مكونة للأبواغ من بكتيريا جنس *Bacillus* التي أظهرت فعالية تثبيطية تجاه بعض أنواع البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام، والتي شُخصت كيموحيويًا باستخدام عدة التشخيص VITEK BCL cards والاختبارات التفريقية، التي أظهرت عائدة 15 عزلة للنوع *Bacillus subtilis* و 5 عزلات للنوع *B. amyloliquefaciens*، كما شُخصت العزلات جينياً بتضخيم الجين *gyr A* إذ تم تشخيص العزلات الخمسة عشر العائدة إلى النوع *B. subtilis* إلى مستوى تحت النوع حيث شُخصت ثمانية عزلات بأنها تعود إلى تحت النوع *B. subtilis subsp. spizizinii* فيما شُخصت العزلات السبع المتبقية على أنها تعود إلى تحت النوع *B. subtilis subsp.* *subtilis*، كما عُزلت 5 عزلات من البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية (البكتيريا الهدف) والتي شُخصت كيموحيويًا باستخدام عدتي التشخيص VITEK GP & GN cards إذ أظهرت نتائج التشخيص أن 3 عزلات تعود إلى الأنواع التالية الموجبة لصبغة غرام وهي: *Staphylococcus sciuri*، *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* و *Kocuria kristinae* فيما شُخص النوعان الآخران ضمن البكتيريا السالبة لصبغة غرام وهما *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*. أنتجت وأُستخلصت الأيوض الثانوية لعزلات بكتيريا جنس *Bacillus* وقد أظهرت نتائج اختبار كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography(TLC) احتواء مستخلصات الأيوض الثانوية على الحوامض الأمينية، أظهرت قيم متوسط الجريان *Rf* للمستخلصات تقارباً نسبياً حيث تراوحت بين (0.750-0.897). حُدثت قيمة البروتينات الكلية في المستخلصات بطريقة Biuret وكانت أعلى قيمة للبروتينات الكلية في مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS8 إذ بلغت 13.78 غم/لتر تليها العزلة BS14 بقيمة 12.02 غم/لتر واختير المستخلصان لإكمال الدراسة. نُقّي المستخلصان وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي أن الوزن الجزيئي لمستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS8 كان 3779 دالتون فيما بلغ الوزن الجزيئي لمستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS14 694 دالتون. شُخص المستخلصان باستخدام كروماتوغرافيا الغاز ومطياف الكتلة GC-MS وقد أظهرت نتائج التحليل احتواء

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* spp.

مستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS8 على عدد من الحوامض الأمينية ومشتقاتها والبيتيدات الدهنية ذات الفعالية التثبيطية الميكروبية ، فيما احتوى مستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS14 على نوعين من المركبات ذوات الفعالية التثبيطية القوية ضد البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام أحدهما أستر والآخر هيدروكربون. دُرس تأثير الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة في الفعالية التضادية للمستخلصين ضد البكتيريا الهدف وقد أظهرتا ثباتية عالية عند درجات الحرارة المستخدمة في التجربة ماعدا درجة الحرارة 121°س حيث حصل تثبيط لفعاليتها البكتيرية، كما أظهر المستخلصان ثباتية عالية في جميع قيم الرقم الهيدروجيني المستخدمة في البحث.

Effect of Some Environmental Conditions on the Inhibitory Activity of Secondary Metabolites of *Bacillus* spp. Against Biofilm Forming Bacteria

Abstract

Fifty water and sediments samples were collected from different locations in Basrah Governorate, southern Iraq. Twenty bacterial spore forming isolates showing antibacterial activity towards gram negative and positive bacteria were isolated from them. The isolates were identified biochemically by VITEK BCL cards and differential tests. The identification results showed that 15 isolates belong to *Bacillus subtilis* whereas the remaining 5 isolates belong to *B. amyloliquefaciens*. The isolates were also identified genetically by amplifying *gyr A* gene which identified the 15 *B. subtilis* to subspecies rank. Eight isolates were identified as *B. subtilis* subsp. *spizizinii*, whereas the remaining 7 isolates were identified as *B. subtilis* subsp. *Subtilis*. Also, five biofilm forming bacterial isolates (target bacteria) were isolated and identified by VITEK GB & GN cards. The identification results showed that 3 isolates belong to gram positive bacteria: *Staphylococcus sciuri*, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and *Kocuria kristinae*, whereas 2 isolates belong to gram negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. The secondary metabolites (sm) were produced and extracted from *Bacillus* spp. Results of Thin Layer Chromatography test showed that *Bacillus* s.m. contain free amino acids. Relative flow (*Rf*) values showed a relatively close association which ranged between 0.750-0.897. Total proteins were determined by Biuret method, the highest value was for BS8 (13.78 g/L) followed by BS14 (12.02 g/L). Secondary metabolites extracts of BS8 and BS14 were chosen for complete study; s.m. extracts of BS8 and BS14 were purified and results of electrophoresis showed that the molecular weight of BS8 s.m. was 3779 Daltons, while the molecular weight of BS14 s.m. was 694 Daltons. The purified s.m. were identified by GC-MS. The results showed that BS8 s.m. extract contained a number of amino acids and their derivatives as well as lipopeptides which have antimicrobial activity, whereas BS14 s.m. extract contained two compounds which have powerful antibacterial activity against both gram positive and negative bacteria. One of them was an ester the other was a hydrocarbon. The effects of temperature and pH on the antibacterial activity of BS8 and BS14 s.m. extracts against target bacteria were studied, both s.m. showed high thermo stability at the temperature used in the study, but they were inactivated at 121°C, also both s.m. showed high stability to the pH values used in the study.

Keywords: *Bacillus* spp.; Secondary metabolites; Environmental conditions; Bacterial biofilms; Iraq.

المقدمة

تضم الأيوض الثانوية الميكروبية مجموعة واسعة من المركبات المنتجة طبيعياً والتي تقوم بعدد كبير من الفعاليات الحيوية. تختلف الأيوض الثانوية عن الأيوض الأولية في أنها لا تشترك في فعاليات البناء والهدم التي يتطلبها النمو الطبيعي، لكن هذه الأيوض تعطي للميكروب صفات تساعد على افضلية البقاء في البيئة التي يعيش فيها (Choudoir et al., 2018). تلعب الأيوض الثانوية دوراً مهماً في التكيف الفسيولوجي والتلاؤم البيئي للميكروبات المنتجة لها إذ أن هذه الأيوض تمكن الميكروب المنتج لها من تثبيط نمو الميكروبات المنافسة (Yan et al., 2018).

تعرّف الأيوض الثانوية Secondary metabolites بأنها مواد عضوية منخفضة الوزن الجزيئي تنتج أثناء الطور المكتمل (idiophase) لأنواع قليلة نسبياً من الميكروبات يتم إنتاجها كرد فعل للضغوط البيئية، ومن الأمثلة على الأيوض الثانوية: المضادات الحيوية والصبغات والأحماض والسموم والعوامل المؤثرة على التنافس البيئي والتعايش symbiosis ومثبطات الإنزيمات ومضادات الأورام والمبيدات ومحفزات النمو للنباتات والحيوانات (Demain and Fang, 2000). يبدأ إنتاج الأيوض الثانوية عندما يتباطأ نمو الأنواع العنصرية بسبب استهلاك أحد مصادر المغذيات: الكربون أو النتروجين أو الفوسفات.

يستطيع افراد جنس *Bacillus* إنتاج الكثير من الأيوض الثانوية ذات الفعالية المضادة للميكروبات الاخرى مثل الببتيدات الدهنية lipopeptides، الببتيدات المتعددة polypeptides، اللاكتونات الكبيرة macrolactones، الأحماض الدهنية fatty acids، الكيتايدات المتعددة polyketides، والكيومارينات المتناظرة isocumarines (Mondol et al., 2013)، وقد استخدمت بشكل واسع في الصناعات الطبية والصيدلانية (Leifert et al., 1995) بسبب قدرة افراد هذا الجنس على بناء المواد المضادة للميكروبات في تركيب البروتين الذائب كما أن لهذه المواد تأثيرات ملحوظة على الأنواع العنصرية الهدف، لذلك يعدّ هذا الجنس مرغوباً للإنتاج التجاري (Priest et al., 1995).

أجريت العديد من الدراسات التي تضمنت عزل وتشخيص الأيوض الثانوية من بكتيريا *Bacillus* ودراسة تأثيرها التثبيطي ضد العديد من الممرضات النباتية والحيوانية وضد البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية (Sirtori et al., 2006 ; Hassan et al., 2015 ; Anju et al., 2015) إذ اشارت أغلب هذه الدراسات إلى أن الأيوض الثانوية المنتجة من قبل افراد جنس *Bacillus* هي ببتيدات دهنية lipopeptides منخفضة الوزن الجزيئي وذات فعالية تضادية ثابتة ضمن مديات حرارية واسعة وبعضها مثل surfactin تمتلك خواص شبيهة بالمنظفات detergents تجاه الأغشية الحية من خلال تقليل قوة الشد السطحي بين هذه الأغشية وسطح الالتصاق مما جعل اهتمام الباحثين يتجه نحو إجراء المزيد من الدراسات حول إمكانية استخدام هذه المركبات في القضاء على الأغشية الحيوية الضارة والمسببة للعديد من المشاكل البيئية ، ولأجل الحصول على عزلات محلية من بكتيريا جنس *Bacillus* منتجة للأيوض الثانوية المثبطة لنمو البكتيريا

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus spp.*

ودراسة ثباتية الفعالية التثبيطية لهذه الأبيوض ضمن مديات حرارية ورقم هيدروجيني متغيرة فقد أجريت هذه الدراسة.

المواد وطرائق البحث

جُمعت 50 عينة مياه وترسبات في الفترة من يناير 2016- أبريل 2016 من أماكن مختلفة في محافظة البصرة ونُقلت العينات إلى المختبر لتشخيصها حيث وُضعت العينات في حمام مائي بدرجة حرارة 80°س لقتل الأنواع البكتيرية غير المكونة للأبواغ (PHE, 2015).

عينات الترسبات

جُمعت العينات (حوالي 20 غم لكل عينة) باستخدام أكياس البولي اثيلين المعقمة الجافة، وبوساطة الملوقة spatula المعقم وفي ظروف معقمة ، أُضيف 1 غم من كل عينة إلى أنبوبة اختبار تحتوي على 10 مل ماء مقطر ثم عُملت سلسلة تخافيف عشرية لغاية 10×10^{-6} وحدة تكوين مستعمرة (cfu)/مل من الماء المقطر، رشحت التخافيف 10×10^{-1} ، 10×10^{-3} ، 10×10^{-6} باستخدام أوراق الترشيح نوع 0.45 µm millipore filter paper ، وُضعت أوراق الترشيح في أطباق بتري حاوية على الوسط الزراعي الصلب Lauria- Bertani (Hi Media , LB agar) وحُضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 35°س لمدة 18 ساعة ثم أُخذت مسحات من المستعمرات النامية وصبغت بصبغة غرام وفحصت تحت المجهر الضوئي. اختيرت العصيات الموجبة لصبغة غرام والمكونة للأبواغ لإتمام عملية تشخيصها بوساطة عدة التشخيص VITEK2 BCL card (bioMérieux, France) وحسب Pincus (2005). كما وشُخصت جينياً بتضخيم الجين المشفر لإنتاج إنزيم *gyrase* باستخدام عدة استخلاص Wizard DNA (Promega-USA).

عينات المياه

جُمعت عينات المياه باستخدام قناني زجاجية معقمة من نوع Nalgen polycarbonate conical flasks (Merck, Germany) وبواقع 250 مل لكل عينة . في ظروف معقمة، أُضيف 1 مل من كل عينة إلى 9 مل من الماء المقطر المعقم وعُملت سلسلة تخافيف عشرية (10×10^{-1} - 10×10^{-4}) وحدة تكوين مستعمرة / مل من الماء المقطر، رشحت التخافيف (10×10^{-3} - 10×10^{-4}) ونُميت كما ذكر في عينات الترسبات، ويبين جدول 1 مواقع وأعداد العينات المفحوصة ونتائج التخافيف لمتوسط أعداد البكتيريا في عينات المياه والترسبات.

إنتاج الأيوض الثانوية Secondary metabolites production

أُنتجت الأيوض الثانوية حسب طريقة Dusane et al. (2013) بعد حضن المزرعة البكتيرية في الحاضنة الهزازة لمدة 48 ساعة وبسرعة 120 دورة / دقيقة وعند درجة حرارة 30°س.

جدول 1. مواقع وأعداد العينات المفحوصة ونتائج التخافيف لمتوسط أعداد البكتيريا في عينات المياه والترسبات.

ت	الموقع	عدد العينات	أنواع العينات ومتوسط أعداد البكتيريا فيها		
			ترسبات	Cfu/10 ⁻⁶	مياه
1	أحواض تربية الأسماك في مركز علوم البحار	4	2	35	2
2	ميناء خور الزبير	10	5	19	5
3	ميناء أم قصر	17	8	27	9
4	ميناء أبي فلوس	4	2	18	2
5	أبي الخصيب	8	4	43	4
6	ميناء الفاو	2	1	15	1
7	السيبة	2	1	29	1
8	المياه المصاحبة لأحد الآبار في الحقل النفطي زبير 1	1			
9	ps1 المياه المصاحبة لأحد الآبار في الحقل النفطي	1			
10	المياه المصاحبة لأحد الآبار في منطقة أرطاوي	1			

استخلاص الأيوض الثانوية لأنواع بكتيريا *Bacillus* spp.

استخلصت الأيوض الثانوية لأنواع بكتيريا *Bacillus* spp. حسب طريقة Amin et al. (2015) إذ أُضيفت خلاات الاثيل إلى المزرعة البكتيرية بنسبة 1:1 وتم تحريك المزيج بوضعه على المازج المغناطيسي magnetic stirrer لمدة ست ساعات ، ثم فُصلت الطبقة العضوية العليا بواسطة قمع الفصل ووضعت في جهاز النبد المركزي على سرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ثم ازيلت طبقة خلاات الاثيل ونقلت إلى دورق نظيف، وجمع المستخلص وجفف في المبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة 50°س ثم إذيب المستخلص في الكحول الاثيلي ، اختيرت العزلتان الأكثر إنتاجاً

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* spp.

للأبيض الثانوي حسب طريقة Biuret وباستخدام العدة التشخيصية لتحديد البروتينات الكلية والمجهزة من شركة Biolabo company- Italy باتباع التعليمات المرفقة مع العدة التشخيصية لإكمال باقي خطوات الدراسة.

تنقية الأيوض الثانوي لأنواع بكتيريا جنس *Bacillus*

أجريت خطوات كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion Exchange Chromatography وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography طبقا لطريقة (Anju et al. (2015) فيما أُجري الترحيل الكهربائي حسب (Laemmli (1970). أُختبرت الفعالية البكتيرية للأبيض الثانوي المنقاة ضد الأنواع البكتيرية: *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)، *Staphylococcus sciuri* و *Kocuria kristinae* بطريقة الانتشار عبر الآجار (Dusane et al., 2011) إذ زُرعت الاطباق الزرع الحوية على وسط LB الصلب بنشر 0.1 مل من المزارع البكتيرية السائلة للأنواع المذكورة اعلاه بواسطة الناشر L- shape spreader ثم حُضنت بدرجة 35° س لمدة 15 دقيقة ثم ثقب الوسط الزرع الصلب باستخدام ثاقب الفلين cork porer ومُلئت الثقوب بـ 50 µL من الراشح المعقم لبكتيريا جنس *Bacillus*، حُضنت الاطباق بدرجة 35° م لمدة 18 ساعة ثم قيس قطر التثبيط (ملم) باستخدام المسطرة وسُجلت النتائج.

التقدير الكلي للأبيض الثانوي في بكتيريا *Bacillus* spp.

أجري هذا الاختبار حسب طريقة Biuret وباستخدام العدة التشخيصية لتحديد البروتينات الكلية والمجهزة من شركة Biolabo company- Italy باتباع التعليمات المرفقة مع العدة التشخيصية. قدرت البروتينات الكلية (الأبيض الثانوي) في العينة حسب المعادلة

$$\text{البروتين الكلي في العينة} = \frac{\text{امتصاصية العينة}}{\text{امتصاصية العينة القياسية}} \times 60$$

تشخيص الأيوض الثانوي باستخدام كروماتوغرافيا الغاز ومطياف الكتلة (GC-MS) Gas chromatography and mass spectroscopy

حُدثت الجزيئات الفعالة في الأيوض باستخدام جهاز (GC-MS) حسب طريقة (Mohan et al. (2016) فُرئت الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 550 نانومتر وسُجلت النتائج.

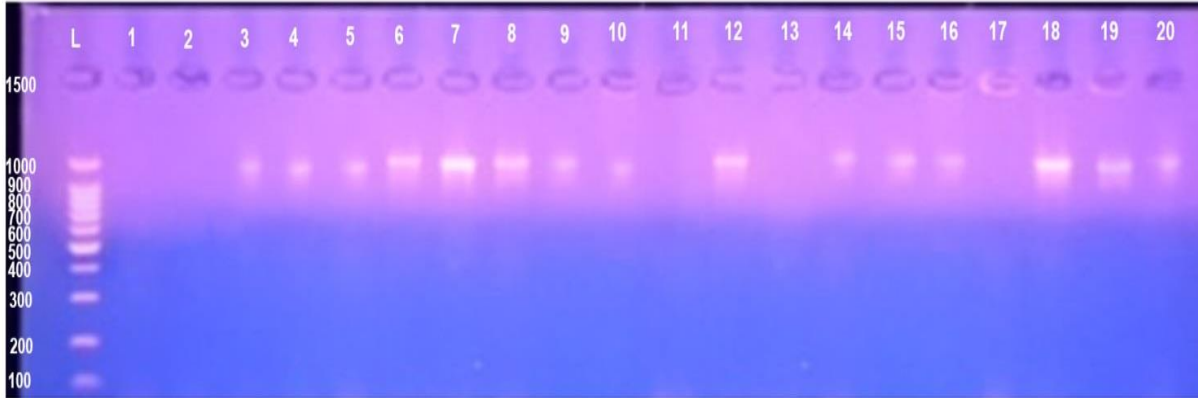
ايمان عبدالله الامارة و غيداء جاسم الغزاوي

دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة على الفعالية التضادية لمستخلصات الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* spp.

حُضنت مستخلصات الأيوض الثانوية عند الدرجات الحرارية 30، 40، 50، 60، 70، 80، 100، 121 °س لمدة 30 دقيقة. كما تم اختبار تأثير الرقم الهيدروجيني pH في الفعالية التضادية للمستخلصات من خلال تغيير الرقم الهيدروجيني للمستخلصات عند 3، 5، 7، 9، 11 ثم حُضنت المستخلصات بدرجة 30 °س لساعتين وتم تحديد الفعالية التضادية للمستخلصات ضد البكتيريا الهدف باستخدام طريقة الانتشار خلال الآجار (Dusane et al., 2013) ثم حُضنت الاطباق لمدة 18 ساعة عند درجة 35 °م وقرئت النتائج.

التحليل الإحصائي

والأنواع العسوية الهدف حيث *Bacillus* تم عمل التحليل الإحصائي لتجارب الفعالية التضادية بين عزلات بكتيريا (أختبرت 2009 SPSS) تم أخذ متوسط القراءة لثلاثة مكررات ثم حلت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي الحاسوبي ($p < 0.05$) عند مستوى احتمالية L.S.D العوامل المدروسة بالاعتماد على اقل فرق معنوي بين المتوسطات)



شكل 1. نتائج التشخيص الجيني لعزلات العسوية *Bacillus* بتضخيم الجين المشفر لإنتاج إنزيم *gyrase*.
L: Ladder , بادئ ذو وزن جزيئي 1500 زوج قاعدي.

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.*

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص بكتيريا جنس *Bacillus spp.*

تم الحصول على 20 عزلة بكتيرية تابعة للجنس *Bacillus spp.* كما مبين في جدول 2 وقد أظهرت نتائج التشخيص أن 15 عزلة تعود إلى النوع *Bacillus subtilis* فيما شُخصت 5 عزلات على أنها تعود للنوع *B. amyloliquefaciens* وهذا ما اكده التشخيص الجيني (شكل 1) إذ أظهرت العزلات التابعة للنوع *B. subtilis* نتائج موجبة لعملية التضخيم فيما أبدت العزلات التابعة للنوع *B. amyloliquefaciens* نتائج سالبة.

جدول 2. مصادر العزلات التابعة لجنس *Bacillus spp.*

ت	نوع العينة	مصدر العزلة	النوع البكتيري المعزول
1	ماء	أحواض تربية الأسماك في مركز علوم البحار	<i>B. amyloliquefaciens</i>
2	ماء	أحواض تربية الأسماك في مركز علوم البحار	<i>B. amyloliquefaciens</i>
3	ترسبات	ميناء خور الزبير	<i>B. subtilis</i>
4	ترسبات	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
5	ترسبات	ميناء خور الزبير	<i>B. subtilis</i>
6	ترسبات	ميناء خور الزبير	<i>B. subtilis</i>
7	ماء	ميناء أبي الخصيب	<i>B. subtilis</i>
8	ترسبات	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
9	ترسبات	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
10	ترسبات	ميناء الفاو	<i>B. subtilis</i>
11	ترسبات	ميناء الفاو	<i>B. amyloliquefaciens</i>
12	ترسبات	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
13	ترسبات	ميناء أم قصر	<i>B. amyloliquefaciens</i>
14	ترسبات	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
15	ماء	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
16	ماء	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
17	ماء	ميناء أم قصر	<i>B. amyloliquefaciens</i>
18	ماء	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
19	ماء	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>
20	ماء	ميناء أم قصر	<i>B. subtilis</i>

عزل البكتيريا الهدف (المكونة للأغشية الحيوية)

عُزلت 5 عزلات بكتيرية مكونة للأغشية الحيوية إذ اختبرت قابليتها على تكوين الأغشية الحيوية بتنميتها في صفيحة المعايرة الدقيقة الحاوية على الوسط الزرعي الملائم لكل نوع بكتيري، عزلت 4 عزلات من الترسبات بواقع عزلتين من ميناء أم قصر وعزلة واحدة من كل من ميناء الفاو والسببة، في حين عزلت عزلة واحدة من المياه من أبي الخصيب. شُخصت العزلات باستخدام عدتي التشخيص VITEK GP للعزلات الموجبة لصبغة غرام و VITEK GN card للعزلات السالبة لصبغة غرام على التوالي (Pincus, 2005) ويبين جدول 3 نتائج تشخيص عزلات البكتيريا الهدف.

جدول 3. الأنواع البكتيرية المنتجة للأغشية الحيوية وأماكن عزلها.

ت	النوع البكتيري	مكان العزل
1	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ترسبات أم قصر
2	MRSA	ترسبات أم قصر
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	مياه أبي الخصيب
4	<i>Escherichia coli</i>	ترسبات الفاو
5	<i>Kocuria kristinae</i>	ترسبات السببة

إنتاج الأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* spp.

تراوحت فترة تنمية افراد هذا الجنس في البحوث و الدراسات السابقة لغرض إنتاج الأيوض الثانوية بين 24-72 ساعة (Valle et al., 2006; Teasdale et al., 2009; Sharma et al., 2010) , وقد اشارت هذه البحوث إلى أن أعلى إنتاج للأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* spp. كان بعد مرور 48 ساعة من النمو عند دخول المزرعة البكتيرية في مرحلة idiophase من طور الثبات stationary phase، كما تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Barrios- Gonzalez et al. (2003) الذين اشاروا إلى أن إنتاج الأيوض الثانوية يبدأ عندما يتناقص متوسط النمو البكتيري نتيجة استهلاك احدى المغذيات الرئيسية مثل الكاربون و النتروجين او الفسفور. تتفق هذه النتائج مع ما ذكره

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* spp.

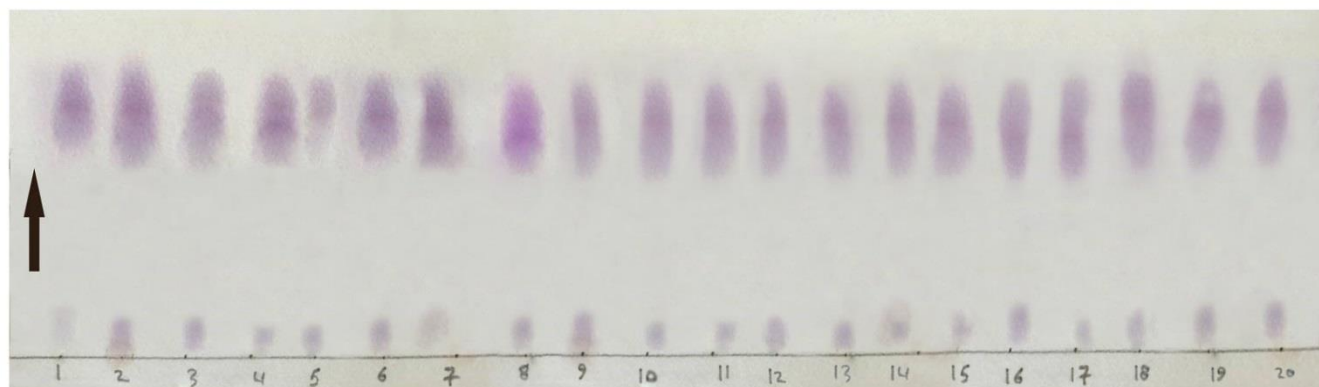
Motta et al. (2007) أن بكتيريا *Bacillus* المعزولة من قبلهم أنتجت الأبيض الثانوي في طور اللوغاريتمي ووصل الإنتاج إلى ذروته في طور الثبات stationary phase.

استخلاص الأبيض الثانوي لأنواع العصوية *Bacillus* spp.

ذكرت البحوث والدراسات استخدام عدة مذيبات لاستخلاص الأبيض الثانوي من بكتيريا *Bacillus* مثل استخدام كل من المذيبات ن-هكسان ، داي كلوروميثان ، الكلوروفورم ، الميثانول ، داي ميثيل سلفوكسايد (DMSO) ، وخلات الاثيل Ethyl acetate (Barrios- Gonzalez et al., 2003; Marhaeni et al., 2011) ، إذ أظهرت الأبيض الثانوي المستخلصة في الدراسات السابقة بواسطة خلاص الاثيل افضل فعالية تضاد ملحوظة ضد الأنواع العصوية الهدف مقارنة بالأبيض المستخلصة بالمذيبات العضوية الاخرى وهذا يتفق مع الدراسة الحالية إذ أظهرت الأبيض الثانوي لأنواع العصوية *Bacillus* فعالية تثبيطية واضحة ضد الأنواع العصوية المستخدمة في الهدف بنوعها السالبة والموجبة لصبغة غرام، وهذا يتفق مع ما ذكره Mohan et al. (2016) أن استخدام خلاص الاثيل في استخلاص الأبيض الثانوي لأنواع العصوية *Bacillus* يحافظ على الفعالية التثبيطية لهذه الأبيض ضد الأنواع العصوية الهدف.

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin layer chromatography

اشارت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC إلى ظهور بقع بنفسجية عند استخدام كاشف الننهايدرين مما يدل على احتواء الأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* على الأحماض الأمينية كما مبين في شكل 2. يبين جدول 4 قيم متوسط الجريان لمستخلصات الأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* إذ كانت القيم متقاربة حيث تراوحت القيم بين 0.750-0.897.



شكل 2. نتائج تحليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلصات الأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* spp.

ايمان عبدالله الامارة و غيداء جاسم الغزوي

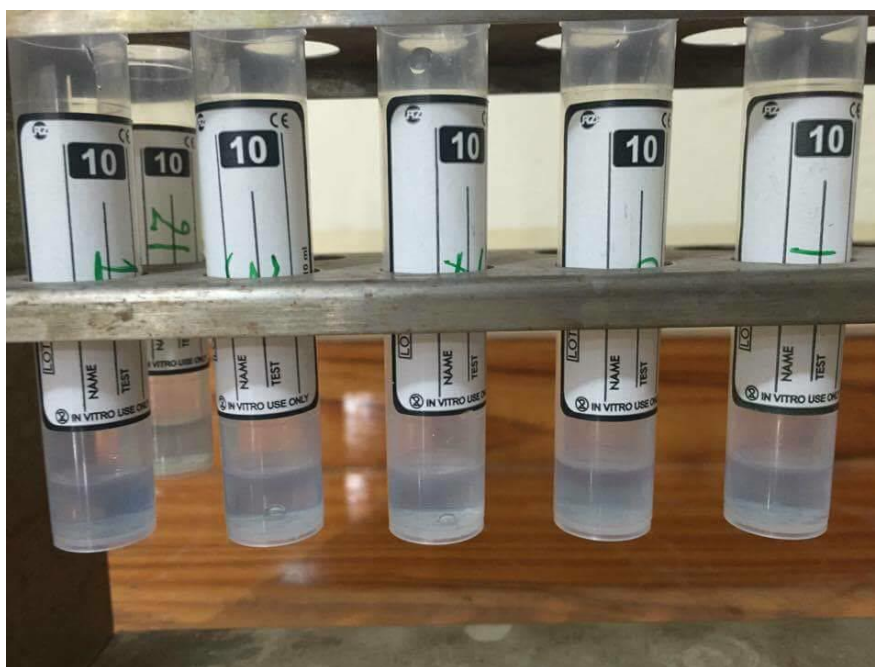
جدول 4. حساب قيمة متوسط الجريان للأيونات

ت	مسافة تحرك العينة	مسافة تحرك المذيب	متوسط الجريان Rf
BA1	7.8	8.8	0.886
BA2	7.5	8.8	0.852
BS3	7.6	8.8	0.863
BS4	7.5	8.8	0.852
BS5	7.4	8.8	0.840
BS6	7.3	8.8	0.829
BS7	6.6	8.8	0.750
BS8	7.8	8.8	0.886
BS9	7.9	8.8	0.897
BS10	7.9	8.8	0.897
BA11	7.8	8.8	0.886
BS12	7.9	8.8	0.897
BA13	7.5	8.8	0.852
BS14	7.4	8.8	0.840
BS15	7.8	8.8	0.886
BS16	7.3	8.8	0.829
BA17	7.8	8.8	0.886
BS18	7.9	8.8	0.897
BS19	7.8	8.8	0.886
BS20	7.9	8.8	0.897

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* spp.

تحديد البروتينات الكلية في الأبيض الثانوي

اشارت النتائج الموجودة في جدول 5 إلى أن أعلى قيمة للبروتينات الكلية في مستخلصات الأبيض الثانوي كانت في مستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS8 إذ بلغت 13.78 غم /لتر تليها العزلة BS14 بقيمة 12.02 غم/لتر فيما كانت اقل قيمة للبروتينات الكلية في مستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS19 بقيمة 5.28 غم/لتر كما يبين شكل 3 تحول لون المستخلصات إلى اللون البنفسجي بعد اضافة الكاشف إلى أنابيب الاختبار بسبب تكوين معقد بين ذرة النحاس في البايوريت مع النايتروجين في السلاسل الببتيدية.



شكل 3. وجود البروتينات الكلية في مستخلصات الأبيض الثانوي لعزلات بكتيريا *Bacillus* (لاحظ تكون اللون البنفسجي).

تنقية الأبيض الثانوي لأنواع العصوية *Bacillus* spp.

1. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion Exchange Chromatography

تم بواسطة هذه الخطوة فصل خليط المركبات المكونة لمستخلصات الأبيض الثانوي اعتماداً على شحنتها بعد وضعها على سطح المبادل الأيوني داخل عمود الفصل بمرحلتين (الشكلان 4 و 5):

جدول 5. تحديد البروتينات الكلية في مستخلصات الايوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* بطريقة Biuret.

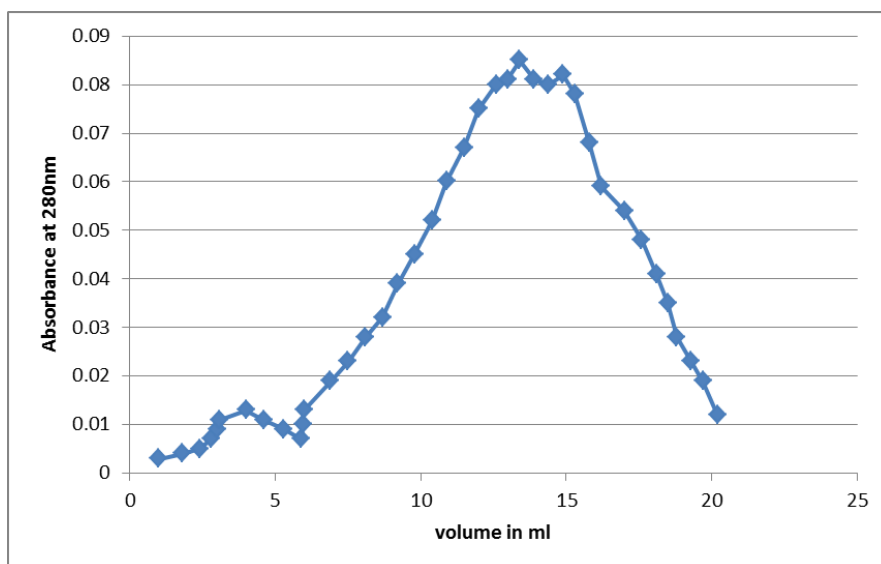
رقم العزلة	الامتصاصية	قيمة البروتين الكلي في العينة (غم/لتر)
blank	0.133	
standard	0.843	
BA1	1.483	10.55
BA2	1.376	9.79
BS3	1.511	10.75
BS4	1.387	9.87
BS5	1.345	9.57
BS6	1.523	10.83
BS7	1.496	10.64
BS8	1.937	13.78
BS9	1.189	8.46
BS10	1.376	9.79
BA11	1.253	8.91
BS12	0.937	6.67
BA13	1.388	9.88
BS14	1.690	12.02
BS15	1.207	8.59
BS16	0.904	6.43
BA17	1.150	8.18
BS18	0.894	6.36
BS19	0.742	5.28
BS20	0.972	6.91

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus spp*

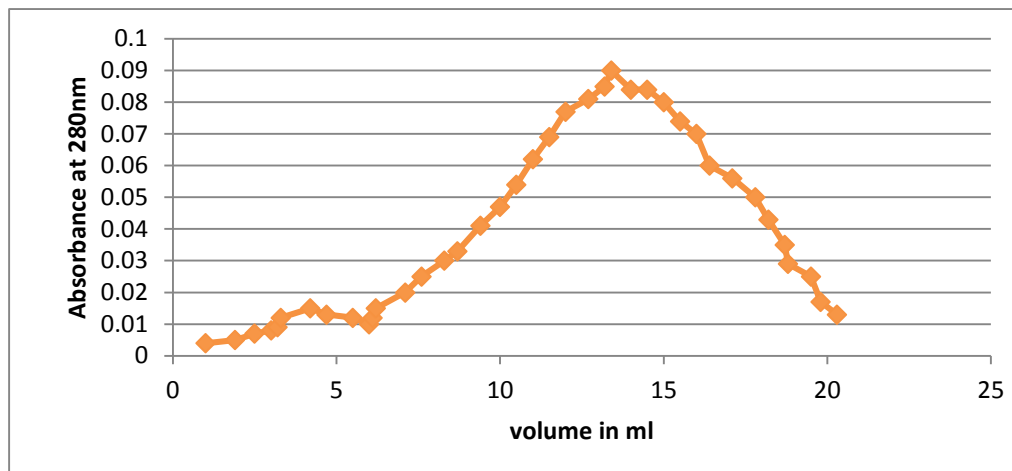
أولاً- غسل الأجزاء غير المرتبطة (وهي الأجزاء الفعالة من المستخلصات) وتكون ذات شحنة موجبة مشابهة لشحنة المبادل الأيوني والتي مرت دون أن ترتبط بالمبادل مع محلول الغسل بشكل قمة واحدة ، ظهور هذه القمة يدل على خروج الببتيدات وبعض المركبات ذات الشحنة الموجبة نتيجة حصول تنافر للشحنات فيما بينها وبين المبادل.

ثانياً - غسل الأجزاء المرتبطة ذات الشحنة السالبة التي ارتبطت بالمبادل الأيوني إذ بدأت هذه الأجزاء بمغادرة العمود اعتماداً على كثافة شحنتها بشكل قمة واحدة وذلك بزيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم ، مما دل على ارتباط الببتيدات الأخرى ذات الشحنة السالبة نتيجة حصول تجاذب فيما بينها وبين مادة المبادل والتي اعتمدت شدته على محصلة كثافة الشحنة التي تمتلكها هذه الببتيدات .

يحدث الترسيب بملح كبريتات الأمونيوم للبروتينات بسبب الاخلال disruption الذي تحدثه الايونات الملحية بطبقة جزيئات الماء المحيطة بالبروتين أي خفض درجة الذائبية عن طريق تكوين أملاح بين ايونات الملح والسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية المتأينة للبروتين التي تكون اقل ذائبية من البروتين لوحده (Mannerat and Phetron, 2007). تتفق هذه النتائج مع ما ذكره Bechard et al. (1998) و Gordillo and Maldonado (2012) الذين أشاروا إلى إن خطوة التبادل الأيوني مؤثرة جدا في إزالة المواد الصبغية التي تلوث العينة والتي فصلت المستخلص في قمة منفصلة عن القمة الأخرى التي مثلت المواد غير الفعالة في المستخلص الخام.



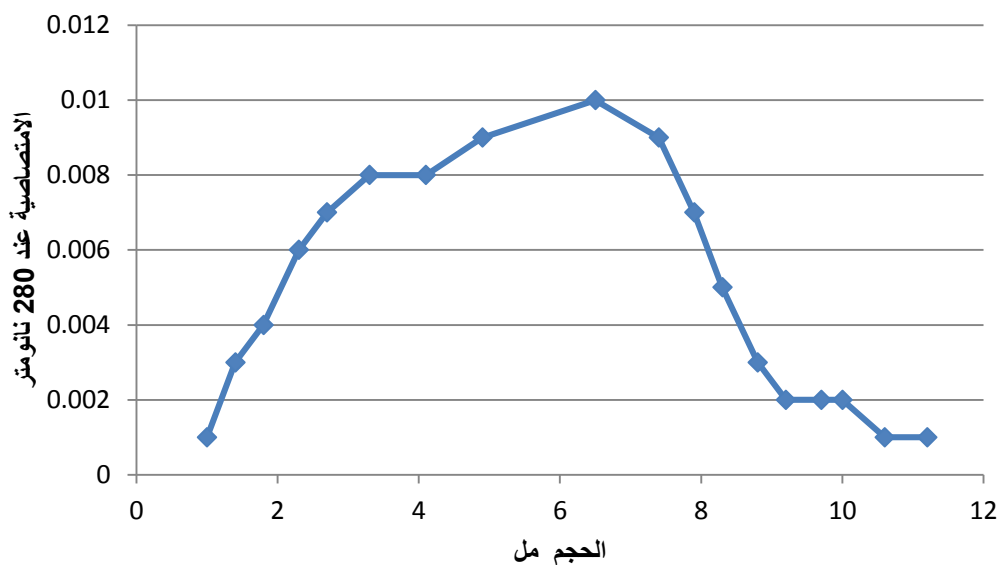
شكل 4. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للأبيض الثانوي للعزلة BS8.



شكل 5. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للأبيض الثانوية للعلزلة BS14.

2. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography

أُجري الترشيح الهلامي باستعمال هلام السيفادكس S-25 في تنقية الألبومين الثانوية وذلك نظراً لما يمتاز به هذا النوع من الهلام من سمات مرغوبة وهي استيعابه الواسع وفصله العالي للمواد وسهولة تحضيره وإمكانية إعادة تنشيطه واستعماله لعدة مرات (شكل 6)، تتفق النتائج مع ما توصل إليه (Teixeira et al., 2013) أن استعمال هلام السيفادكس في الترشيح الهلامي يعد اختياراً ناجحاً جداً إذ ساهم في زيادة الفعالية التثبيطية للألبومين الثانوية ضد الأنواع العنصرية الهدف.



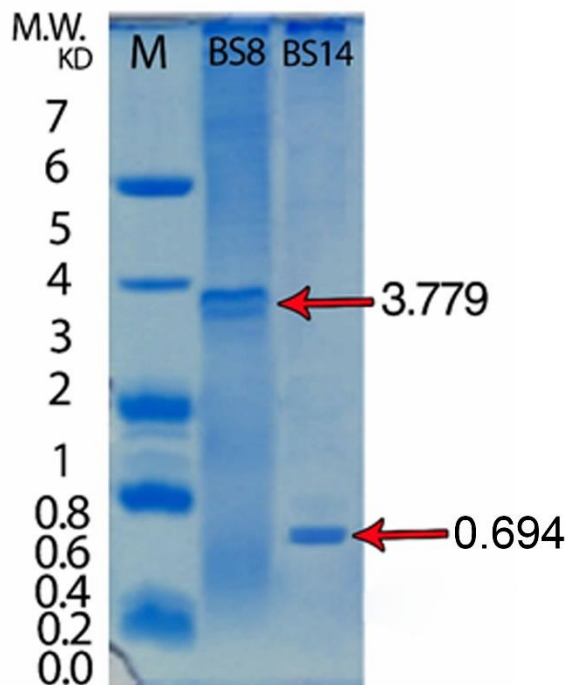
شكل 6. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للعلزتين BS8 و BS14.

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* spp.

3. الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمستخلصات الأبيض الثانوي

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي باستخدام معلم الوزن الجزيئي aporinin ذو الوزن الجزيئي 6512 دالتون وجود حزمتين ببتيديتين خاليتين من التلوث بواقع حزمة واحدة لكل مستخلص مما يدل على كفاءة الطريقة المستخدمة في استخلاص وتنقية مستخلصات الأبيض الثانوي وقد بلغ الوزن الجزيئي للحزمة الاولى 3779 دالتون وكانت لمستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS8، فيما بلغ الوزن الجزيئي للحزمة الثانية 694 دالتون وكانت لمستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS14 كما موضح في شكل 7.

اتفقت النتائج مع ما توصل إليه Bechard et al. (1998) الذين ذكروا أن الببتيدات المستخلصة من بكتيريا *Bacillus subtilis* والتي قاموا بتمريرها في الهلام بطريقة SDS- PAGE قد ظهرت بشكل تجمعات aggregates مكونة تركيبا يشبه الغزل micelle structure وهي صفة شائعة للببتيدات التي تمتلك خواص الشد السطحي مثل surfactin والتي تمتلك قدرة على تنظيف السطوح الملوثة بالإضافة إلى قدرتها التثبيطية ضد أنواع بكتيرية عديدة مما يؤهلها لتكون بدائل حيوية للمواد الكيميائية المستخدمة لعلاج عدد من المشاكل البيئية ومنها الأغشية الحيوية.



شكل 7. الترحيل الكهربائي للأبيض الثانوي للعزلتين BS8 و BS14 على الهلام بوجود مادة SDS.

1- (M. (Marker) (aprotinin) ببتيد -1

2- الأبيض الثانوي للعزلة BS8

3- الأبيض الثانوي للعزلة BS14.

تشخيص الأيوض الثانوية باستخدام كروماتوغرافيا الغاز

ومطياف الكتلة (GC-MS) Gas chromatography and mass spectroscopy

أظهرت نتائج تحليل كروماتوغرافيا الغاز ومطياف الكتلة للأيوض الثانوية التي أنتجت من قبل العزلتين BS8 وBS14 كما هو مبين في الجدولين 6 و 7 أن الأيوض الثانوية للعزلتين تحتوي على العديد من المركبات ذات الفعالية التضادية تجاه البكتيريا الهدف مثل الأحماض الأمينية ومشتقاتها والاسترات والمركبات العضوية الهيدروكربونية وغيرها وهذه النتائج تتوافق مع دراسة Ramyabharathi and Raguchander (2014) الذين ذكروا أن الأيوض الثانوية التي قاما بتحليل مكوناتها بجهاز GC-MS احتوت على المركبات العضوية الحاوية على الحوامض الأمينية، تمتلك هذه المركبات فعالية تثبيطية ميكروبية مثل L- Lucine و Norvaline n- propaglyoxycarbonyl-, nonylester و d- proline , N – metoxycarbonyl – , pentyl ester و N- cycloprpyl carbonyl-, butyl والتي أيضا تم عزلها من مستخلصات الأيوض الثانوية في الدراسة الحالية ، إذ اشارا إلى أن وجود الأحماض الأمينية والإسترات في مستخلصات الأيوض الثانوية لبكتيريا *B. subtilis* يعطي لهذه المستخلصات فعالية تثبيطية قوية ضد الاحياء المجهرية مما يؤهلها لتكون عوامل سيطرة بيولوجية تساهم في القضاء على العديد من المشاكل البيئية التي تسببها هذه الاحياء المجهرية مما يساعد في التقليل من استخدام المواد الكيماوية في علاج هذه المشاكل البيئية، واتفقت النتائج مع ما اشار إليه Leiman et al. (2013) في أن الأحماض الأمينية من نوع d تثبط تكوين الأغشية الحيوية بشكل غير مباشر من خلال تداخلها مع تصنيع البروتين، كما تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Skariyachan et al. (2013) الذين ذكروا أن *B. subtilis* تنتج العديد من البروتينات الخارج خلوية خلال طور الثبات من منحنى النمو، إذ ظهرت لديهم خلال الترحيل الكهربائي للعزلة التي اطلقوا عليها اسم 168 *B. subtilis* 100-110 بقعة في الهلام ، اختيرت منها 38 بقعة لتحليل تتابعات الأحماض الأمينية الموجودة في النهاية الأمينية N- terminal والتي أظهرت تواجد العديد من الأحماض الأمينية مثل الألانين والغالين والليوسين ومشتقاتها حيث ذكروا أن بوادئ هذه الأحماض الأمينية تتواجد في غشاء الخلية البكتيرية ثم تتجمع هذه الأحماض الأمينية في الساييتوبلازم بمساعدة إنزيمات ببتيدازات الإشارة signal peptidases لتُحرر إلى الوسط الزراعي أثناء طور الثبات.

يبين جدول 8 الفعالية التضادية للأيوض الثانوية المنقاة للعزلتين BS8 وBS14 على التوالي إذ حصلت زيادة في الفعالية التثبيطية للأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* تجاه الأنواع العصوية الهدف مع كل خطوة من خطوات التنقية. وأظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) في الفعالية التثبيطية بين عزلي جنس *Bacillus* إذ تفوقت العزلة BS8 ($p < 0.05$) في فعاليتها التثبيطية ضد البكتيريا الهدف، كما أظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) بين عزلات الأنواع العصوية الهدف إذ تفوقت بكتيريا *Kocuria kristinae* على باقي عزلات البكتيريا الهدف في حساسيتها لمستخلص الأيوض الثانوية المنقاة لعزلي جنس *Bacillus* عند مستوى ($p < 0.05$) في حين تفوقت بكتيريا *P. aeruginosa* على باقي عزلات البكتيريا الهدف في مقاومتها لمستخلص الأيوض

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus spp.*

الثانوية المنقاة لعزلي جنس *Bacillus* عند مستوى ($p < 0.05$). تتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه Liu et al. (2018) أن الأبيض الثانوي المنتجة من العزلات البحرية لجنس *Bacillus* تمتلك صفات تؤهلها لأن تكون مضادات حيوية قادرة على تثبيط العديد من الممرضات البكتيرية، كما تتفق النتائج مع ما ذكره Wilson et al. (2011) بأن الفعالية التثبيطية لمستخلص الأبيض الثانوي المنقاة لأنواع العصوية *Bacillus* أعلى منها في الراشح الخام لنفس السلالة عند تتميتها في المزارع البكتيرية السائلة ، كما تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه كل من Delcoue (2009) و Wiener and Horanyi (2011) الذين ذكروا أن سبب كون التأثير التضادي للأبيض الثانوي لأنواع العصوية *Bacillus* ضد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام أعلى منه في البكتيريا السالبة لصبغة غرام ربما يُعزى ذلك إلى النفاذية المنخفضة للغشاء الخارجي لأنواع العصوية السالبة لصبغة غرام وكذلك وجود طبقة عديد السكريات الدهني lipopolysaccharide التي تُمثل حاجزاً ضد المركبات الكارهة للماء.

تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني على الفعالية التضادية

لمستخلصات الأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus spp.*

أظهرت الأبيض الثانوي المنقاة للعزلتين BS8 و BS14 ثباتية عالية عند درجات الحرارة المستخدمة في التجربة ماعدا درجة الحرارة 121°س حيث تناقصت فعاليتها البكتيرية ضد البكتيريا الهدف، إذ يبين شكل 8 تأثير درجات الحرارة على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي للعزلة BS8 إذ بلغت أقطار مناطق التثبيط للبكتيريا الهدف 14، 15، 17، 19، 20 ملم لكل من الأنواع *P. aeruginosa* ، *E. coli* ، *S. sciuri* ، MRSA و *K. kristinae* على التوالي ضد الأبيض الثانوي للعزلة BS8 بعد تعريض هذه الأبيض لدرجات الحرارة 30-100°س فيما تناقصت أقطار مناطق التثبيط إلى 8، 10، 13، 14، 15 ملم عند درجة الحرارة 121°س ، اما شكل 9 فيبين تأثير درجات الحرارة على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي للعزلة BS14 حيث بلغت أقطار مناطق التثبيط للبكتيريا الهدف 13، 16، 17، 19، 20 ملم لكل من الأنواع *P. aeruginosa* ، *E. coli* ، *S. sciuri* ، MRSA و *K. kristinae* على التوالي ضد الأبيض الثانوي للعزلة BS14 بعد تعريض هذه الأبيض لدرجات الحرارة 30-100°س فيما تناقصت أقطار مناطق التثبيط إلى 9، 10، 12، 13، 15 ملم عند درجة الحرارة 121°س.

كما أظهرت الأبيض الثانوي ثباتية عالية في جميع قيم الرقم الهيدروجيني المستخدمة في التجربة فقد حافظت على فعاليتها التضادية ضد البكتيريا الهدف كما هو مبين في شكل 10 الذي يبين تأثير اختلاف قيم الرقم الهيدروجيني على الفعالية التثبيطية لمستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS8 ضد البكتيريا الهدف، إذ بلغت أقطار مناطق التثبيط للبكتيريا الهدف 15، 17، 18، 19، 21 ملم لكل من الأنواع *P. aeruginosa* ، *E. coli* ، *S. sciuri* ، MRSA و *K. kristinae* على التوالي ضد الأبيض الثانوي للعزلة BS8 بعد تعريض هذه الأبيض لقيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني تراوحت بين 3-11.

جدول 6. نتائج تحليل الأيوض الثانوية للعزلة المحلية BS8 بواسطة جهاز GC- MS.

Compound Table

Compound Label	RT	Name	Formula	MFG Formula	DB Formula	Hits (DB)
Cpd 4: 2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	13.644	2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	C4H11NO2	C4H11NO2	C4H11NO2	6
Cpd 6: Phenol, 4-(2-aminoethyl)-	15.015	Phenol, 4-(2-aminoethyl)-	C8H11NO	C8H11NO	C8H11NO	10
Cpd 7: 1,3,5-Trioxane	15.471	1,3,5-Trioxane	C3H6O3	C3H6O3	C3H6O3	2
Cpd 8: 2H-Thiopyran, 5,6-dihydro-	15.71	2H-Thiopyran, 5,6-dihydro-	C5H8S	C5H8S	C5H8S	5
Cpd 9: Diethylene glycol, O,O-di(pivaloyl)-	15.902	Diethylene glycol, O,O-di(pivaloyl)-	C14H26O5	C14H26O5	C14H26O5	1
Cpd 10: Pyrrole, 2-methyl-5-phenyl-	16.276	Pyrrole, 2-methyl-5-phenyl-	C11H11N	C11H11N	C11H11N	10
Cpd 11: Phenethylamine, N-benzyl-p-chloro-	16.586	Phenethylamine, N-benzyl-p-chloro-	C15H16ClN	C15H16ClN	C15H16ClN	10
Cpd 12: 1-(1'-pyrrolidinyl)-2-butanone	16.983	1-(1'-pyrrolidinyl)-2-butanone	C8H15NO	C8H15NO	C8H15NO	10
Cpd 13: 2-Cyclohexen-1-one, 3,5-dimethyl-	17.375	2-Cyclohexen-1-one, 3,5-dimethyl-	C8H12O	C8H12O	C8H12O	3
Cpd 14: 3-Ethoxy-4-methoxyphenol	17.699	3-Ethoxy-4-methoxyphenol	C9H12O3	C9H12O3	C9H12O3	10
Cpd 16: 1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine	18.041	1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine	C5H5N5	C5H5N5	C5H5N5	10
Cpd 17: 2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3,4-dimethyl-	18.162	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3,4-dimethyl-	C7H10O2	C7H10O2	C7H10O2	10
Cpd 18: Indolizine, 5-methyl-	18.328	Indolizine, 5-methyl-	C9H9N	C9H9N	C9H9N	10
Cpd 19: Methyl-6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-O-methyl-beta-D-galactopyranoside	18.569	Methyl-6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-O-methyl-beta-D-galactopyranoside	C10H19FO5	C10H19FO5	C10H19FO5	2
Cpd 20: l-Norvaline, n-propargyloxycarbonyl-, nonyl ester	18.863	l-Norvaline, n-propargyloxycarbonyl-, nonyl ester	C18H31NO4	C18H31NO4	C18H31NO4	10
Cpd 21: 1-Propanone, 1-(5-methyl-2-thienyl)-	19.114	1-Propanone, 1-(5-methyl-2-thienyl)-	C8H10O5	C8H10O5	C8H10O5	1
Cpd 22: Pentadecanoic acid, ethyl ester	19.228	Pentadecanoic acid, ethyl ester	C17H34O2	C17H34O2	C17H34O2	3
Cpd 23: Ethyl 13-methyl-tetradecanoate	19.314	Ethyl 13-methyl-tetradecanoate	C17H34O2	C17H34O2	C17H34O2	10
Cpd 24: l-Leucine, N-cyclopropylcarbonyl-, butyl	19.855	l-Leucine, N-cyclopropylcarbonyl-, butyl	C14H25NO3	C14H25NO3	C14H25NO3	10
Cpd 25: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	20.021	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	C11H18N2O2	C11H18N2O2	C11H18N2O2	10

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus* spp.

جدول 7. نتائج تحليل الأيض الثانوي للعزلة BS14 بواسطة جهاز GC- MS.

Compound Table

Compound Label	RT	Name	Formula	MFG Formula	DB Formula	Hits (DB)
Cpd 2: d-Proline, N-methoxycarbonyl-, pentyl ester	10.843	d-Proline, N-methoxycarbonyl-, pentyl ester	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	10
Cpd 6: 6-Ethyl-4,5,7,8-tetrathiaundecane	20.362	6-Ethyl-4,5,7,8-tetrathiaundecane	C ₉ H ₂₀ S ₄	C ₉ H ₂₀ S ₄	C ₉ H ₂₀ S ₄	1

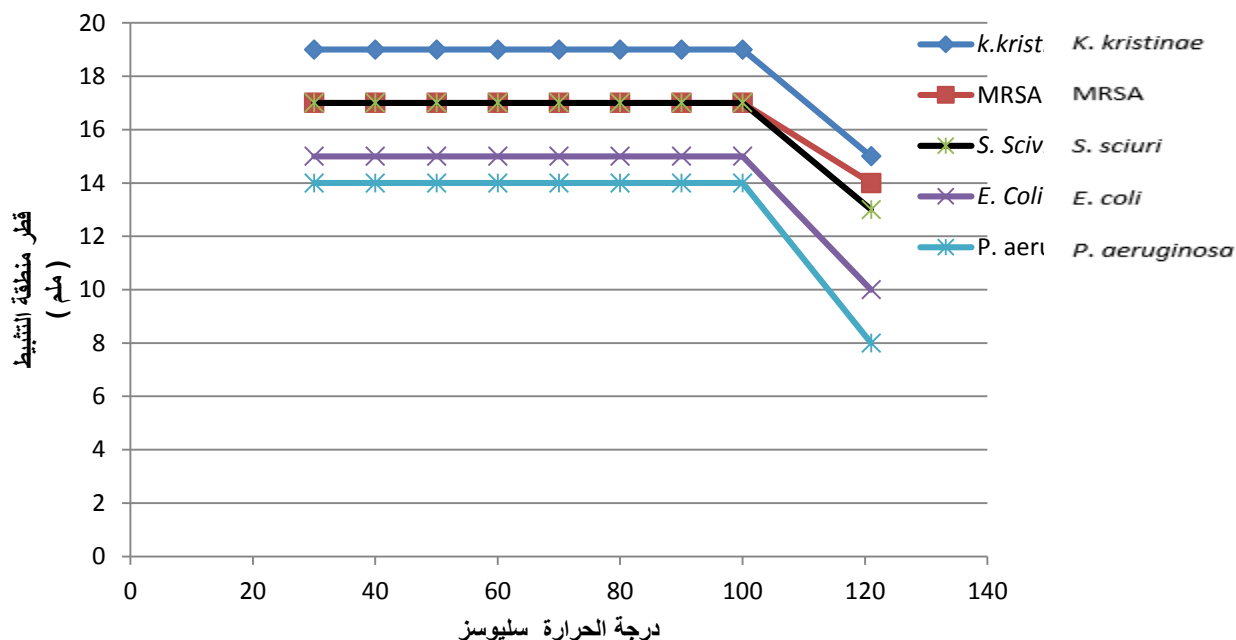
وكذلك يبين شكل 11 تأثير اختلاف قيم الرقم الهيدروجيني على الفعالية التثبيطية لمستخلص الأيض الثانوي للعزلة BS14 ضد البكتيريا الهدف حيث بلغت أقطار مناطق التثبيط للبكتيريا الهدف 14، 15، 16، 17، 19 ملم لأنواع *P. aeruginosa*، *E. coli*، *S. sciuri*، *MRSA* و *K. kristinae* على التوالي ضد الأيض الثانوي للعزلة BS14 بعد تعريض هذه الأيض لقيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني تراوحت بين 3-11.

جدول 8. الفعالية التضادية للأبيض الثانوي المنقاة للعزلتين BS8 و BS14.

قطر منطقة التثبيط (ملم)					ت	خطوات التنقية
<i>S. sciuri</i>	<i>K. kristinae</i>	<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
20	22	19	17	16	BS8	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني
19	22	20	16	14	BS14	
23	24	22	20	19	BS8	كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي
21	23	22	18	18	BS14	
23	24	22	20	21	BS8	الرحلان الكهربائي
21	23	22	19	19	BS14	

• ظهور فروق معنوية عند مستوى ($p < 0.05$).

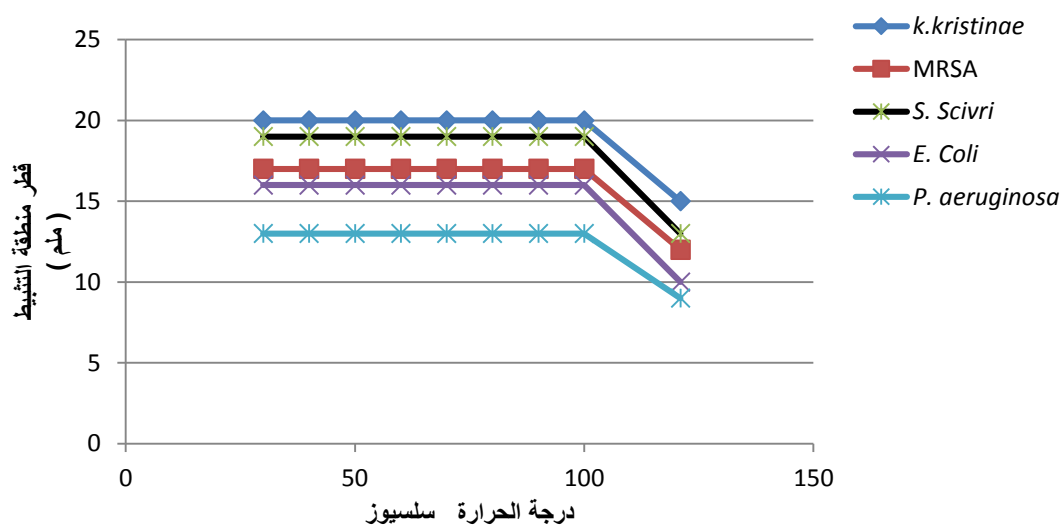
• الأرقام تمثل متوسط قراءة ثلاثة مكررات.



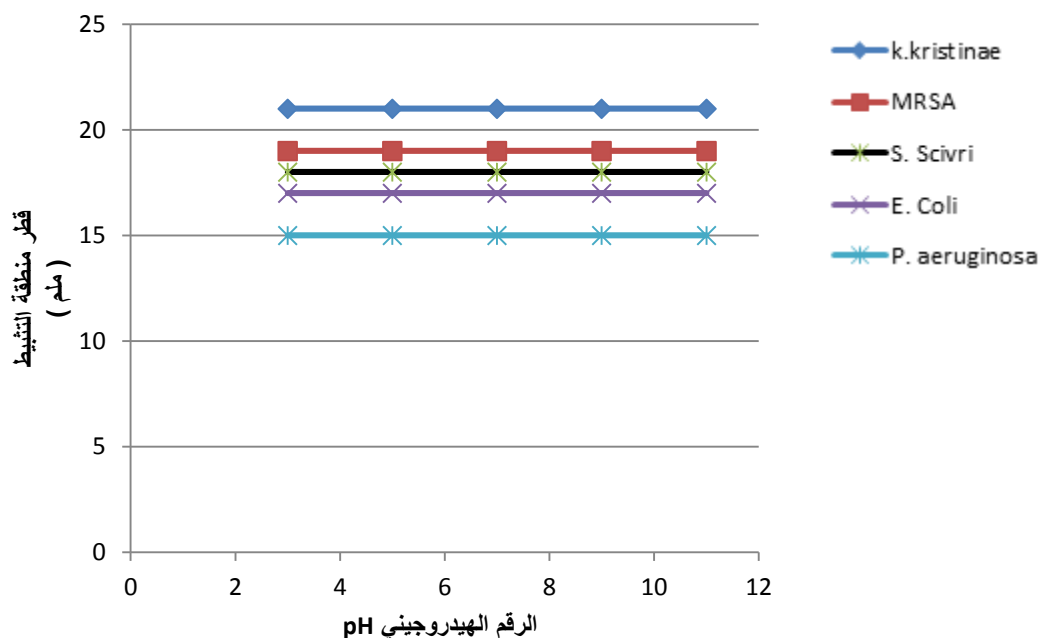
شكل 8. تأثير اختلاف درجات الحرارة على الفعالية التثبيطية لمستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS8 ضد البكتيريا الهدف.

تتفق نتائج الدراسة مع ما توصل إليه Sirtori et al. (2006) الذين عزوا سبب ثباتية الأيوض الثانوية تجاه التغير في درجات الحرارة والرقم الهيدروجيني إما إلى الثباتية العالية لتركيب الأيوض الثانوية لبكتيريا *B. subtilis* أو أن هذا الببتيد يستطيع أن يطوى ذاتياً إلى تركيبه الصحيح، كما تتفق النتائج مع ما توصل إليه Cladera-Olivera et al. (2004) الذين أشاروا إلى أن سبب عدم تأثر الفعالية التثبيطية للأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* بالتغير في درجات الحرارة أو الرقم الهيدروجيني ربما يُعزى إلى احتوائها على مركبات حلقة تضم حوامض أمينية غير اعتيادية، كما تتفق الدراسة الحالية مع ما ذكره Ebrahimipour et al. (2014). أن سبب ثباتية المستخلصات في المدى الواسع من الحرارة والرقم الهيدروجيني ربما يُعزى إلى حجمها الصغير والصفات التركيبية الخاصة بها. إن الاستنتاج الذي خلصت به الدراسة الحالية هو أن للأيوض الثانوية المنتجة من قبل بكتيريا *Bacillus spp.* كان لها ثباتية عالية فيما يتعلق بدرجات الحرارة والرقم الهيدروجيني وهذا يعني نجاح استخدامها وإمكانية فعاليتها التثبيطية ضد البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية.

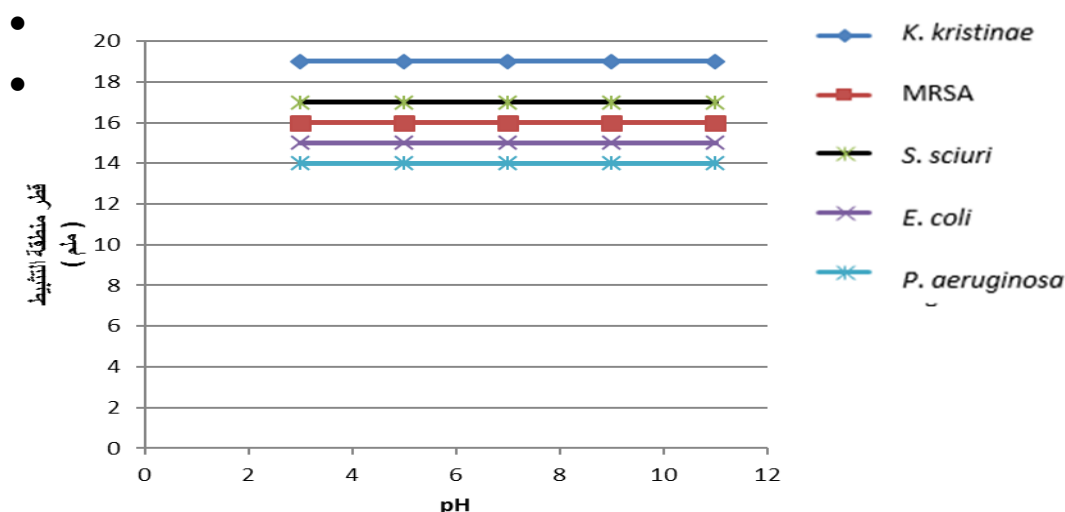
تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوي لبكتيريا *Bacillus spp.*



شكل 9. تأثير اختلاف درجات الحرارة على الفعالية التثبيطية لمستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS14 ضد البكتيريا الهدف.



شكل 10. تأثير اختلاف قيم الرقم الهيدروجيني على الفعالية التثبيطية لمستخلص الأبيض الثانوي للعزلة BS8 ضد البكتيريا الهدف.



شكل 11. تأثير اختلاف قيم الرقم الهيدروجيني pH على الفعالية التثبيطية لمستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS14 ضد البكتيريا الهدف.

المراجع

- Amin, M., Rakhisi, Z. and Ahmady, A. Z. (2015). Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna Clin. Microb. Infec.*, **2** (1),1-4.
- Anju, K. M., Archana, M. M., Mohandas, C. and Nambisan, B. (2015). Purification and identification of an antibacterial protein from the symbiotic bacteria associated with novel entomopathogenic nematode, *Rhabditis (Oscheius)* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**(4), 621-632.
- Barrios-Gonzalez, J., Fernandez, F. J. and Tomasini, A. (2003). Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian Journal of Biotechnology*, **2**(3). 322-333.
- Bechard, J., Eastwell, P. L., Sholberg, G., Mazza, G., and Skura, B. (1998). Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food. Chem.*, **46**(12): 5355- 5361.
- Choudoir, M. J., Pepe-Ranney, C. and Buckley, D. H. (2018). Diversification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters coincides with lineage divergence in *Streptomyces*. *Antibiotics*. **7**(1): pii: E12. doi: 10.3390/antibiotics7010012.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G. R. and Brandelli, A. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett. Appl. Microbiol.*, **38**(4), 251–256.
- Delcoue, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochem. Biophys. Acta*, **1794**(5), 808-816 .

- Demain, A. L. and Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., **69**, 1- 39.
- Dusane, D. H., Damare, S. R., Nancharaiah, Y. V., Ramaiah, N., Venugopalan, V. P., Kumar, A. R. and Zinjarde, S. S. (2013). Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. PLoS One, **8**(5), 1-12.
- Dusane, D. H., Pawar, V. S., Nancharaiah, Y. V., Venugopalan, V. P., and Kumar, A. R. (2011). Antibiofilm potential of a glycolipid biosurfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*. Biofouling, **27**(6), 645–654.
- Ebrahimipour, G. H., Khosravibabadi, Z., Hossein Sadeghi, H. and Aliahmadi, A. (2014). Isolation, partial purification and characterization of an antimicrobial compound, produced by *Bacillus atrophaeus*. Jundishapur J. Microbiol., **7**(9): e11802.
- Gordillo, M. A. and Maldonado, M. C. (2012). Purification of peptides from *Bacillus* strains with biological activity. Chapter 11, pp: 201-224 In: Dhanarasu, S.(ed.). Chromatography and its applications. Publisher InTech. Croatia.
- Hassan, S. W. M., Abdul-Raouf, U. M. and Ali, M. A. R. (2015). Antagonistic interactions and phylogenetic diversity of antimicrobial agents producing marine bacteria in Suez bay. The Egyptian Journal of Aquatic Research, **41**(1), 57-67.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**(5259), 680-685.
- Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., Epton, H. and Harbour, A. (1995) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. J Appl Bacteriol. **78**, 97–108
- Leiman, S. A., May, J. M., Lebar, M. D., Kahne, D., Kolter, R. and Losick, R. (2013). D-amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. J. Bacteriol., **195**(23), 5391–5395.
- Liu, Z., Wang, Y., Jia, X. and Lu, W. (2018). Isolation of secondary metabolites with antimicrobial activities from *Bacillus amyloliquefaciens* LWYZ003. Transactions of Tianjin University. <https://doi.org/10.1007/s12209-018-0137-7>.
- Mannerat, S. and Phetrong, K. (2007). Isolation of biosurfactant producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. Songklanakarin J. Sci. Technol., **29**(3), 781-791.
- Marhaeni, B., Radjasa, O. K., Khoeri, M. M., Sabdono, A., Bengen, D. G. and Sudoyo, H. (2011). Antifouling activity of bacterial symbionts of sea grasses against marine biofilm forming bacteria. Journal of Environmental Protection, **2**(9), 1245-1249.
- Mohan, G., Kumar, A., Thangappanpillai, T. and Ramasamy, B. (2016). Antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of sponge endosymbiotic bacteria, *Bacillus* sp. at Agatti Island Lakshadweep Archipelago. Biotechnol. Reports, **11**, 44- 52.
- Mondol, M.; Shin, H. and Islam, M. (2013). Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: Chemistry and biological activity. Mar. Drugs, **11**(8), 2846–2872.

- Motta, A. S., Cannavan, F. S., Tsai, S. M. and Brandelli, A. (2007). Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from amazon basin. Arch. Microbiol., **188**, 367–375.
- PHE: Public Health England (2015). UK standards for microbiology investigation: identification of *Bacillus* species. Issue No.3, pp: 1- 27
- Pincus, D. H. (2005). Microbial identification using the VITEK® 2 bioMérieux system bioMérieux Hazelwood, MO, USA .
- Priest, F., Aquino deMuro, M. and Aji, D. (1995). Systematics of insect pathogenic Bacilli uses in strain identification and isolation of novel pathogens. **In:** Bacterial Diversity and Systematics. Priest, F.; Ramos-Cormenzana, A. and Tindaall, B. (eds). Plenum Press, New York, 275- 295
- Ramyabharathi, S. A. and Raguchander, T. (2014). Efficacy of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* EPCO16 against tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Mycology and Plant Pathology, **44**(2), 148-153.
- Sharma, P. K., Goel, M., Dureja, P. and Uniyal, P. L. (2010). Isolation and identification of secondary metabolites from hexane extract of culture filtrate of *Bacillus lichniformis* MTCC 7445. Archives of Phytopathology and Plant Protection, **43**(16), 1636-1642.
- Sirtori, L. R., Cladera-Olivera, F., Lorenzini, D. M., Tsai, S. M. and Brandelli, A. (2006). Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. J. Gen. Appl. Microbiol., **52**(6), 357- 363.
- Skariyachan, S., Rao, A. G., Patil, M.R., Saikia, B., Bharadwaj, K. N. V. and Rao, J. S. G. (2013). Antimicrobial potential of metabolites extracted from bacterial symbionts associated with marine sponges in coastal area of Gulf of Mannar Biosphere, India. Letters in Applied Microbiology, **58** (3), 231-241.
- SPSS: Statistical Package for Social Sciences. (2009). Statistical package for windows. Ver.17.0, Chicago, SPSS, Inc.
- Teasdale, M. E., Liu, J., Wallace, J., Akhlaghi, F. and Rowley, D. C. (2009). Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in Gram-negative bacteria. Applied and Environmental Microbiology, **75**(3), 567–572.
- Teixeira, M. L., Rosa, A. D. and Brandelli, A. (2013). Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus subtilis* subsp. *spizezinii* showing inhibitory activity towards *Haemophilus parasuis*. Microbiology, **159**(5), 980- 988.
- Valle, J., Re, S. D., Henny, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P. and Ghigo, J. M. (2006). Broad- spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. PNAS, **103**(33), 12558- 12563.
- Wiener, M. C. and Horanyi, P. S. (2011). How hydrophobic molecules traverse the outer membranes of Gram-negative bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **108**(27), 10929-10930 .

تأثير بعض الظروف البيئية على الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* spp.

- Wilson, G. S., Raftos, D. A. and Nair, S. V. (2011). Antimicrobial activity of surface attached marine bacteria in biofilms. *Microbiol. Res.*, **166**(6), 437-448.
- Yan, Q., Lopes, L. D., Shaffer, B. T., Kidarsa, T. A., Vining, O., Philmus, B., Song, C., Stockwell, V. O., Raaijmakers, J. M., McPhail, K. L., Andreote, F. D., Chang, J. H. and Loper, J. E. (2018). Secondary metabolism and interspecific competition affect accumulation of spontaneous mutants in the GacS-GacA regulatory system in *Pseudomonas protegens*. *MBio*, 9:e01845-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01845-17>.