

دراسة قابلية بكتيريا *Bacillus* spp. على تثبيط الاغشية الحيوية باستخدام المجهر الالكتروني الماسح

إيمان عبدالله الامارة^{1*}، و غيداء جاسم الغزاوي²

¹ قسم التقييم الحيوي، مركز علوم البحار، جامعة البصرة، البصرة، العراق.

² قسم الأحياء، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة البصرة، البصرة، العراق.

* البريد الإلكتروني: eman_ab74@yahoo.com

Study of The Ability of Secondary Metabolites of *Bacillus* spp. in Biofilm Inhibition by Using Scanning Electron Microscope

Eman A. Al-Imara^{1*}, and Ghaidaa J. Al-Gazzawy²

¹ Department of Biotic Evolution, Marine Science Center, Basrah University, Basrah city, Iraq.

² Department of Biology, Faculty of Education for Pure Science, Basrah University, Basrah city, Iraq.

الملخص

عزلت 20 عزلة بكتيرية من عينات مياه وترسبات من مناطق مختلفة من محافظة البصرة جنوب العراق، شخّصت العزلات شكلياً وكموحياتياً وباستخدام نظام التشخيص VITEK II compact تبين بانها تعود لأنواع مختلفة للجنس *Bacillus* كما عزلت 5 عزلات بكتيرية تعود لـ 5 أنواع مكونة للأغشية الحيوية (البكتيريا الهدف)، ثلاث منها موجبة لصبغة غرام هي *Staphylococcus sciuri*, *Kocuria kristinae* و *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)، ونوعين سالبة لصبغة غرام وهما *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*. تم انتاج واستخلاص الأيوض الثانوية من بكتيريا جنس *Bacillus* واختبرت فعاليتها التثبيطية ضد البكتيريا الهدف حيث كانت فعاليتها التثبيطية ضد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام اعلى منها ضد البكتيريا السالبة لصبغة غرام، فصلت مكونات الأيوض الثانوية باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والتي اظهرت ان هذه الأيوض ذات طبيعة بيتيدية حيث اختبرت العزلة التي اظهرت اعلى قيمة لمعدل الجريان Rf وقد سميت BS8، درست قدرة العزلة BS8 على تثبيط الاغشية الحيوية باستخدام المجهر الالكتروني الماسح حيث اظهرت الصور قدرة هذه العزلة على تثبيط تكوين الاغشية الحيوية وكذلك على تمزيق الاغشية الحيوية حديثة التكوين.

الكلمات الدالة: *Bacillus* spp.، الاغشية الحيوية، المجهر الالكتروني الماسح، الأيوض الثانوية.

Abstract

Twenty *Bacillus* spp. isolates were isolated from sediment and water samples from different locations in Basrah Governorate, Iraq. The bacterial isolates were cultivated, identified by morphological, biochemical and by using VITEK BCL card, it found that they belong to different species, also 5 biofilm forming bacterial isolates were isolated from the same locations, three were gram positive: *Staphylococcus sciuri*, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Kocuria kristinae*, and two species were gram negative: *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Secondary metabolites were produced and extracted from *Bacillus* and their antibacterial effect against target bacteria were examined, the antibacterial effect against gram positive bacteria was higher than gram negative bacteria, constituents of secondary metabolites were separated by using thin layer chromatography which showed that the chemical nature of the secondary metabolites was peptides, the isolate which showed the higher Rf value was chosen to complete the study and designated BS8. The ability of BS8 in

inhibition of biofilms were studied by scanning electron microscope, the images showed that the isolate had the ability to inhibit the biofilms as well as to disrupt the pre formed biofilms.

Keywords: *Bacillus spp.*, *Biofilm*, *Scanning Electron Microscope*, *Secondary Metabolites*.

1. المقدمة

تميل البكتيريا الموجودة في الطبيعة الى العيش ضمن مجتمعات ملتصقة بالأسطح تدعى الاغشية الحيوية biofilms وفيها تنظم البكتيريا في مادة رابطة متبلمرة خارج خلوية (EPS) Extracellular Polymeric Matrix لتحمي نفسها من الضغوطات البيئية والعوامل المضادة للأحياء المجهرية. تستطيع العديد من انواع البكتيريا تكوين الاغشية الحيوية ومن اكثر الانواع شيوعا بكتيريا: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Kochuria kristinae*, *Klebsilla pnunoniae* وغيرها الكثير (Kesel et al., 2017).

تسبب الاغشية الحيوية كما هائلا من المشاكل الصناعية والغذائية والطبية والبيئية برغم حجمها الصغير نسبيا، ففي الجانب الصناعي تستطيع الاغشية الحيوية زيادة قوة الاحتكاك واختزال كفاءة نقل الحرارة (Yebara et al., 2004) كما تسبب الاغشية الحيوية فساد العديد من الاغذية والمشروبات مثل منتجات الالبان والعصائر وغيرها (Charlebois et al., 2017). اما في مجال الاستزراع السمكي فان تكون الاغشية الحيوية في نظام تدوير المياه والانابيب والمضخات وفي احواض التغذية يسبب حصول اوبئة تؤدي الى نسب وفيات عالية بين الاسماك (Cai and Arias, 2017).

لقد تمت تجربة العديد من الطرق الفيزيائية والكيميائية لحل مشكلة الاغشية الحيوية مثل الحقول الكهربائية النبضية combined pulsed electric fields (Khan et al., 2016)، او استخدام الدقائق النانوية nanoparticle المصاحبة للمضادات الحيوية (Ahmed et al., 2016) لكن هذه المواد اما انها باهظة الثمن او تحتاج الى امد طويل لتظهر نتائجها او عند تحللها تنتج مواد سامة بيئياً، لهذا اتجه الاهتمام الى البحث عن مواد من مصادر طبيعية صديقة للبيئة ومنخفضة التكلفة وذات سمية منخفضة او عديمة السمية ومنها الاحياء المجهرية كاستخدام بكتيريا جنس *Bacillus* الذي يضم افرادا واسعة الانتشار في البيئة وذات متطلبات نمو بسيطة وتستطيع انتاج مدى واسع من المواد منخفضة او عديمة السمية و الفعالة ضد الاحياء المجهرية الاخرى وذات قدرة عالية على تحمل الظروف البيئية المتطرفة مثل ارتفاع او انخفاض الحرارة او الدالة الحامضية مما جعل افراد هذا الجنس محط اهتمام وانظار الباحثين لاستخدام هذه البكتيريا او ايوضها الثانوية لغرض استئصال الاغشية الحيوية وتثبيط نمو البكتيريا المنتجة لها (Sawale et al., 2014). ولأجل التعرف على امكانية بكتيريا جنس *Bacillus* المعزولة من البيئة المحلية على انتاج هذه الأيوض ودراسة صفاتها التثبيطية فقد اقترحت هذه الدراسة والتي تضمنت الحصول على عزلات بكتيرية محلية تعود للجنس *Bacillus* واستخلاص الأيوض الثانوية منها ودراسة قابليتها التثبيطية ضد بكتيريا الاغشية الحيوية باستخدام المجهر الضوئي الماسح (SEM) Scanning Electron Microscope.

2. المواد والطرق

1.2. جمع العينات

جمعت خمسون عينة مياه وترسبات للفترة من (كانون الثاني 2016 – نيسان 2016) من اماكن مختلفة في محافظة البصرة، تم نقل جميع العينات الى المختبر لتشخيصها حيث قسمت كل عينة الى جزئين، جزء لعزل البكتيريا المكونة للاغشية الحيوية (البكتيريا الهدف)، والجزء الاخر لعزل بكتيريا جنس *Bacillus spp.* وقد وضعت اجزاء العينات المخصصة لعزل بكتيريا جنس *Bacillus spp.* في حمام مائي بدرجة حرارة 80 °م لقتل البكتيريا غير المكونة للاسبوريات (PHE, 2015).

1.1.2. عينات الترسبات (*Samples Sediments*)

جمعت عينات الترسبات بواقع 20 جم لكل عينة باستخدام اكياس البولي اثيلين المعقمة الجافة، وبوساطة الملوقة spatula المعقم وفي ظروف معقمة، اضيف 1 جم من كل عينة الى انبوبة اختبار تحتوي على 10 مليلتر ماء مقطر ثم تم عمل سلسلة تخفيف عشرية لغاية 10×10^{-6} cfu/مليلتر من الماء المقطر، رشحت التخفيفات 10×10^{-1} ، 10×10^{-3} ، 10×10^{-6} باستخدام اوراق الترشيح millipore filter paper نوع $0.45 \mu m$ وضعت اوراق الترشيح في اطباق بتري حاوية على وسط Lauria-Bertani agar (LB agar) وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 35 °م لمدة 18 ساعة ثم اخذت مسحات من المستعمرات النامية وصبغت بصبغة غرام وتم فحصها تحت المجهر الضوئي. اختبرت البكتيريا العسوية الموجبة لصبغة غرام والمكونة للاسبوريات لاختبارات التشخيص التأكسدي والتي تضمنت تشخيص الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية واستخدام عدة التشخيص الزرعية: Nutrient agar و Endo agar و *Pseudomonas isolation agar* و *Staphylococcus 110 agar* و Mannitol salt agar و حضنت الاطباق بدرجة 35 °م لمدة 18 ساعة ثم عُملت مسحات صبغة غرام للمستعمرات النامية تمهيدا لتشخيصها.

2.1.2. عينات المياه (*Water Samples*)

لعزل بكتيريا جنس *Bacillus spp.* فقد جمعت عينات المياه باستخدام قناني زجاجية معقمة من نوع Nalgen polycarbonate conical flasks وبواقع 250 مليلتر لكل عينة. في ظروف معقمة، اضيف 1 مليلتر من كل عينة الى 9 مليلتر من الماء المقطر المعقم وتم عمل سلسلة تخفيف عشرية (10×10^{-1} - 10×10^{-4}) cfu/مليلتر من الماء المقطر، رشحت التخفيفات (10×10^{-3} - 10×10^{-4}) وتمت تنميتها كما ذكر في عينات الترسبات، اما لعزل البكتيريا الهدف فقد جمعت عينات المياه كما ذكر اعلاه وتمت تنميتها كما ذكر في عينات الترسبات، تم حفظ البكتيريا المعزولة من الترسبات والمياه بطريقتي التخطيط *streaking* على وسط Brain Heart Infusion (BHI) الصلب المائل *slant* وحفظت بدرجة 4 °م لعدة اشهر، وبالتحفيد والحفظ بدرجة 20 °م.

2.2. التشخيص (Identification)

لتشخيص عزلات جنس *Bacillus* فقد نمت العزلات على وسط LB الصلب وحضنت هوائيا بدرجة حرارة 35 °م لمدة 18 ساعة ثم شخصت بواسطة عدة التشخيص VITEK2 BCL card في مستشفى الصدر العام في محافظة ميسان حسب طريقة (Pincus, 2011). اما لتشخيص عزلات البكتيريا الهدف فقد نمت العزلات على الاوساط الزرعية ودرجة حرارة الحضانة المناسبة لكل نوع وصبغت بصبغة غرام وشخصت بواسطة عدتي التشخيص VITEK GB card للبكتيريا الموجبة الغرام و VITEK GN card للبكتيريا السالبة الغرام.

3.2. انتاج الأيوض الثانوية (Secondary metabolites production)

نمت عزلات جنس *Bacillus* في وسط LB السائل المحضر في المختبر حسب (Dusane et al., 2013) وحضنت في الحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 30 °م لمدة 48 ساعة، ثم وضعت المزراع البكتيرية في جهاز النبذ المركزي بسرعة 3500 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم عقم الراشح supernatant بتمريره عبر اوراق الترشيح 0.22 µm millipore filter paper واختبرت الفعالية البكتيرية للراشح ضد الانواع البكتيرية: *Pseudomonas aeruginosa*, *Methicillin* و *Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) و *Kocuria kristinae* و *Escherichia coli* بطريقة الانتشار عبر الاغار (Dusane et al., 2011).

4.2. استخلاص الأيوض الثانوية لبكتيريا (*Bacillus spp.*)

تم استخلاص الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.* حسب طريقة (Amin et al. (2015)، ثم اذيب الناتج في الكحول الايثيلي لإكمال باقي خطوات الدراسة.

5.2. فصل مكونات الأيوض الثانوية باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

Thin layer chromatography (TLC)

تم استخدام صفائح جل السيليكا الزجاجية (silica gel F 254 Merck, 0.25 mm layer thickness) و بأبعاد 20×20 سم كطور ثابت فيما كان الطور المتحرك محلول مكون من (كحول ايثيلي: حامض الخليك: ماء مقطر) بنسبة (v:v:v 17:38:50) وذلك حسب (Al-Sarairah et al., 2015)، حسبت قيمة معدل الجريان (Rf) من القانون التالي:

$$Rf = \frac{\text{المسافة التي قطعتها العينة}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}} \dots (1)$$

6.2. دراسة تثبيط الاغشية الحيوية باستخدام المجهر الالكتروني الماسح

Scanning Electron Microscope (SEM)

اجري الاختبار طبقا لما ورد ذكره (Dusane et al., 2013) كما يلي: نمت كل من بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* (اختيرت لكونها عسوية وسالبة لصبغة غرام) وبكتيريا *Staphylococcus sciuri* (اختيرت لكونها مكورات موجبة لصبغة غرام) على شرائح زجاجية (1 سم×1 سم) وضعت الشرائح في صفيحة المعايرة الدقيقة ذات 24 حفرة كل حفرة تحتوي على 3 مليلتر من وسط LB السائل وضيفت لها الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.* وحضنت الشرائح لمدة 18 ساعة عند درجة 35°م ثم قورنت النتائج مع عينات السيطرة control التي نمت فيها البكتيريا الهدف بنفس الظروف بدون اضافة الأيوض الثانوية، صورت النتائج بواسطة المجهر الالكتروني الماسح SEM المجهر من شركة (Gemini) الايطالية في كلية الصيدلة/جامعة البصرة.

7.2. دراسة تحطيم Disruption الاغشية الحيوية حديثة التكوين Preformed biofilms

تمت تنمية نوعي البكتيريا المذكورة اعلاه لمدة 18 ساعة بدرجة 35°م في الصفيحة المعايرة ثم اضيفت لها الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.* وحضنت مرة اخرى لمدة 18 ساعة بدرجة 35°م ثم قورنت النتائج مع عينات السيطرة control التي نمت فيها البكتيريا الهدف بنفس الظروف بدون اضافة الأيوض الثانوية، صورت النتائج بواسطة المجهر الالكتروني الماسح SEM.

3. النتائج والمناقشة

1.3. عزل وتشخيص بكتيريا جنس *Bacillus spp.*

يشير الجدول (1) الى ان الغالبية العظمى من العزلات تم الحصول عليها من المياه البحرية وواقع 17 عزلة من موانئ البصرة في حين تم الحصول على 3 عزلات فقط من المياه العذبة من احواض تربية الاسماك في مركز علوم البحار في جامعة البصرة وميناء ابي الخصيب جنوب محافظة البصرة، ربما يعود السبب في ان مصدر غالبية العزلات هو البيئة البحرية وتتصف هذه البيئة بكونها قليلة المغذيات وعالية الملوحة مما يجد من نمو وازدهار البكتيريا فيها سوى البكتيريا التي تتحمل هذه الظروف المتطرفة مثل بكتيريا *Bacillus* تتفق هذه النتائج مع ما ذكر في دراسة (Parvathi et al., 2009) اذ ان افراد جنس *Bacillus spp.* المعزولة من البيئة البحرية تمثل مصادر واعادة للحصول على العديد من المركبات الفعالة حيويًا والتي من الممكن استغلالها في حل العديد من المشاكل البيئية المستعصية مثل مشكلة الالتصاق البكتيري.

استخدم نظام VITEK BCL card لتشخيص هذه العزلات العشرون حيث شخصت 12 عزلة على انها بكتيريا تابعة للجنس *Bacillus spp.* اما التشخيص لحد مستوى النوع بموجب هذا النظام فقد كان التشخيص محصورا بين احد الانواع الثلاثة *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. atrophaeus*. لم يتمكن النظام من تشخيص العزلات الثماني المتبقية فتم تشخيصها بواسطة الاختبارات الكيموحيوية المذكورة في موسوعة بيركي التشخيصية (Logan and DeVos, 2015) تبعا

للمفتاح التشخيصي لانواع جنس *Bacillus* الموجود في الموسوعة ونتائج الاختبارات المذكورة في الجدول (2)، تمكن نظام التشخيص VITEK BCL card من تشخيص 12 عزلة من اصل 20 اي بنسبة 60% وقد تراوح تقييم جهاز VITEK II compact لعملية تشخيص عزلات جنس *Bacillus spp.* بين المقبول الى جيد جدا، تعتبر هذه النسبة اقل مما ذكره (Halket et al., 2010) حيث كانت النسبة المتوقعة للعزلات التي قاموا بتشخيصها بموجب هذا النظام 93%، ربما يعود السبب في انخفاض التشخيص بين الدراسة الحالية وبين ما توصل اليه الباحثون اعلاه الى ان العزلات الشمالي المحلية محاطة بمادة مخاطية كثيفة سببت صعوبة في تعرف الجهاز عليها وبالتالي عدم القدرة على تشخيصها بالإضافة الى الفرق في عدد العينات المفحوصة اذ انهم فحصوا 109 عينات استطاع النظام تشخيص 101 عزلة لحد مستوى النوع فيما شخصت 6% من العزلات بشكل غير صحيح و1% فقط من العزلات لم يتمكن النظام من تشخيصها.

جدول 1. مصادر العزلات التابعة لجنس *Bacillus spp.*

ت	نوع العينة	مصدر العزلة
1	ماء	احواض تربية الاسماك في مركز علوم البحار
2	ماء	احواض تربية الاسماك في مركز علوم البحار
3	ترسبات	ميناء خور الزبير
4	ترسبات	ميناء ام قصر
5	ترسبات	ميناء خور الزبير
6	ترسبات	ميناء خور الزبير
7	ماء	ميناء ابو الخصيب
8	ترسبات	ميناء ام قصر
9	ترسبات	ميناء ام قصر
10	ترسبات	ميناء الفاو
11	ترسبات	ميناء الفاو
12	ترسبات	ميناء ام قصر
13	ترسبات	ميناء ام قصر
14	ترسبات	ميناء ام قصر
15	ماء	ميناء ام قصر
16	ماء	ميناء ام قصر
17	ماء	ميناء ام قصر
18	ماء	ميناء ام قصر
19	ماء	ميناء ام قصر
20	ماء	ميناء ام قصر

جدول 2. انواع جنس *Bacillus* المعزولة في الدراسة وطرق تشخيصها

طريقة التشخيص	اسم النوع الذي تعود اليه العزلة	ت
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	1
الاختبارات الكيموحيوية	<i>B. thurigenis</i>	2
الاختبارات الكيموحيوية	<i>B. pasteurii</i>	3
الاختبارات الكيموحيوية	<i>B. pasteurii</i>	4
الاختبارات الكيموحيوية	<i>B. thurigenis</i>	5
الاختبارات الكيموحيوية	<i>B. pasteurii</i>	6
الاختبارات الكيموحيوية	<i>B. pasteurii</i>	7
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	8
الاختبارات الكيموحيوية	<i>B.pasteurii</i>	9
الاختبارات الكيموحيوية	<i>B. thurigenis</i>	10
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	11
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	12
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	13
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	14
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	15
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	16
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	17
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	18
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	19
VITEK BCL card	<i>B. amyloquifaciens</i>	20

2.3. عزل وتشخيص البكتيريا الهدف (المكونة للاغشية الحيوية)

تم عزل 5 عزلات بكتيرية مكونة للأغشية الحيوية حيث اختبرت قابليتها على تكوين الاغشية الحيوية بتنميتها في صفيحة المعايرة الدقيقة الحاوية على الوسط الزراعي الملائم لكل نوع بكتيري، اختبرت العزلتان *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus sciuri* واعتبارها البكتريا الهدف وبين الجدول (3) اسماء العزلات واماكن عزلها.

جدول 3. انواع البكتيريا المنتجة للأغشية الحيوية واماكن عزلها

ت	نوع البكتيريا	مكان العزل
1	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ترسبات ام قصر
2	MRSA	ترسبات ام قصر
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	مياه ابو الخصيب
4	<i>Escherichia coli</i>	ترسبات الفاو
5	<i>Kocuria kristinae</i>	ترسبات السيبة

ربما يرجع سبب ان مصدر 4 عزلات بكتيرية مكونة للأغشية الحيوية هو الترسبات فيما كان مصدر عزلة واحدة فقط هو المياه حيث ان البكتيريا تتخذ دقائق الترسبات كأوساط للاتصاق والتي تمثل المرحلة الاساسية والاهم في عملية تكوين الغشاء الخلوي biofilms وقد اكدت الدراسات ان 99.9% من الاحياء المجهرية لها القدرة على تكوين الاغشية الحيوية على مدى واسع من الاسطح الحية وغير الحية، اذ سجلت قدرة العديد من الانواع البكتيرية مثل *Staphylococcus sciuri* و MRSA و *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و *Kocuria kristinae* على تكوين الاغشية الحيوية (Naves et al., 2010) اذ تميل بكتيريا *P. aeruginosa* بشدة لتكوين الاغشية الحيوية اذ تتجمع الخلايا المفردة وتحيط نفسها بغلاف سميك من مادة عديد السكريات extracellular polysaccharide matrix هذا الغلاف شديد المقاومة للمواد المثبطة للأغشية الحيوية (Hentzer et al., 2005) كما تقوم بكتيريا *Staphylococcus* بتدوير recycling البروتينات في السيتوبلازم لتكوين الغشاء الحيوي الخارج خلوي حيث تحفز هذه البروتينات ثباتية وتأقلم البكتيريا ضد الظروف البيئية غير الملائمة كما تشجع تكون الاغشية الحيوية سواءً المتكونة من نوع واحد او عدة انواع تابعة لهذا الجنس (Foulston et al., 2014).

3.3. انتاج الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.*

بعد تنمية بكتيريا *Bacillus spp.* لمدة 48 ساعة تمكنت من انتاج الأيوض الثانوية و بشكل عام تراوحت فترة تنمية افراد هذا الجنس في البحوث و الدراسات السابقة لغرض انتاج الأيوض الثانوية بين 24-72 ساعة اذ اشارت هذه البحوث الى ان اعلى انتاج للايوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.* كان بعد مرور 48 ساعة من النمو عند دخول المزرعة البكتيرية في مرحلة idiophase من طور الثبات stationary phase، اذ ان انتاج الأيوض الثانوية يبدأ عندما يتناقص معدل النمو البكتيري نتيجة استهلاك احد المغذيات الرئيسية مثل: الكربون، النتروجين او الفسفور (Teasdale et al., 2009).

4.3. استخلاص الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.*

استخلصت الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.* باستخدام خللات الايثيل Ethyl acetate ونسبة (50:50)، اذ اظهرت الأيوض الثانوية المستخلصة بواسطة خللات الايثيل افضل فعالية تضادية ملحوظة ضد البكتيريا الهدف مقارنة بالأيوض المستخلصة بالمذيبات العضوية الاخرى وقد ذكرت الدراسات امكانية استخدام عدة مذيبات لاستخلاص الأيوض الثانوية من

بكتيريا *Bacillus* مثل استخدام كل من المذيبات ن-هكسان، داي كلوروميثان، الكلوروفورم، الميثانول، داي ميثيل سلفوكسايد (DMSO)، وخلات الايثيل (Marhaeni et al., 2011) وقد اسفرت الدراسة الحالية عن قدرة الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* بأبداء فعالية تثبيطية واضحة ضد البكتيريا الهدف بنوعيتها السالبة والموجبة لصبغة غرام وهذا يتفق مع دراسة (Mohan et al., 2016). بعد الحصول على مستخلصات الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* تم اختبار فعاليتها البكتيرية ضد البكتيريا الهدف اذ كان التأثير التضادي للمستخلص ضد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام متمثلة بالنوعين *K. kristinae* و MRSA على منه في البكتيريا السالبة لصبغة غرام متمثلة بالنوعين *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* (كما هو مبين بالجدول 4).

جدول 4. الفعالية التثبيطية لمستخلصات الأيوض الثانوية لبكتيريا جنس *Bacillus* ضد البكتيريا الهدف

قطر منطقة التثبيط (مم)				ت
<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	MRSA	<i>K. kristinae</i>	
10	12	16	16	BA1
9	10	12	12	BA2
11	12	12	14	BS3
9	9	11	12	BS4
7	9	10	11	BS5
12	14	14	15	BS6
7	9	9	11	BS7
15	15	17	20	BS8
10	10	12	12	BS9
12	14	12	16	BS10
11	12	14	14	BA11
10	10	13	15	BS12
13	14	16	17	BA13
12	16	16	18	BS14
10	14	13	14	BS15
13	10	12	12	BA16
12	12	14	16	BA17
10	13	15	15	BS18
10	12	14	13	BS19
11	10	12	14	BS20

كما اظهرت النتائج ان الفعالية التضادية للمستخلصات اعلى من الفعالية التضادية للراشح البكتيري الخام لنفس العزلة وهذا يتفق مع ما ذكره (Wilson et al., 2011) بان الفعالية تثبيطية لمستخلص الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* اعلى منها في الراشح الخام لنفس السلالة عند تنميتها في المزارع البكتيرية السائلة، وان سبب ذلك ربما يعزى الى النفاذية المنخفضة للغشاء الخارجي للبكتيريا السالبة لصبغة غرام وكذلك وجود طبقة lipopolysaccharide التي تمثل حاجزا ضد المركبات الكارهة للماء.

3.5. فصل مكونات الايوض الثانوية باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

بينت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC ظهور بقع بنفسجية عند استخدام كاشف الننهايدرين مما يدل على احتواء الايوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* على الاحماض الامينية، اي ان الايوض الثانوية طبيعتها الكيميائية عبارة عن ببتيدات، peptides، هذا يتفق مع دراسة (Sawale et al., 2014) اذ انهم استخلصوا مركبات متعددة الببتيد من احدى عزلات جنس *Bacillus* spp. المحبة للملوحة والتي اظهرت فعالية تثبيطية ضد كلا من البكتيريا والفطريات، كما ظهرت بقع الايوض الثانوية على مستوى مقارب ماعدا العزلة رقم BS8 .

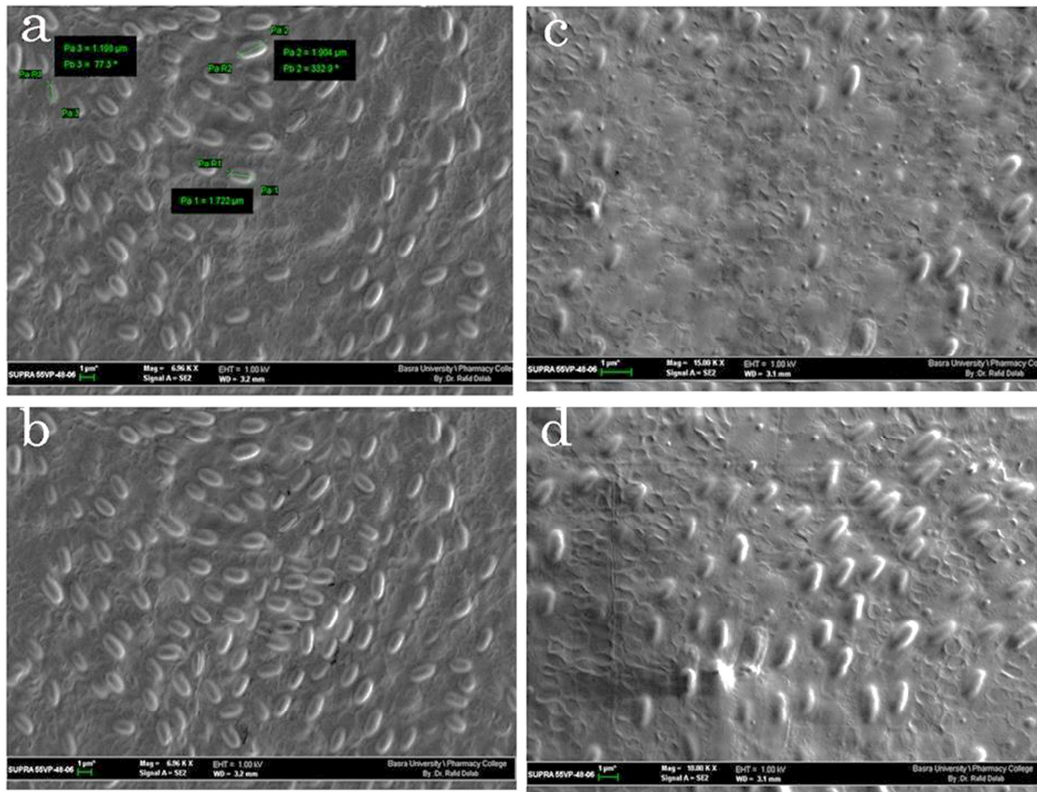
يبين الجدول (5) قيم معدل الجريان لمستخلصات الايوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* اذ كانت القيم متقاربة حيث تراوحت القيم بين (0.750 - 0.897) وهي قيمة مقارنة لقيمة معدل الجريان لمادة surfactine القياسية البالغة 0.7 فيما عدا العزلة BS8 التي بلغت قيمة معدل الجريان للايوض الثانوية التي انتجتها 1.556 وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Sharon et al., 2013) الذين ذكروا ان تقارب قيم معدل الجريان ناتج عن تقارب الاوزان الجزيئية للمستخلصات. وقد تم اختيار العزلة BS8 بناءً على النتائج المتحصل عليها.

3.6. دراسة تثبيط نمو او تمزق الاغشية الحيوية بواسطة المجهر الالكتروني الماسح

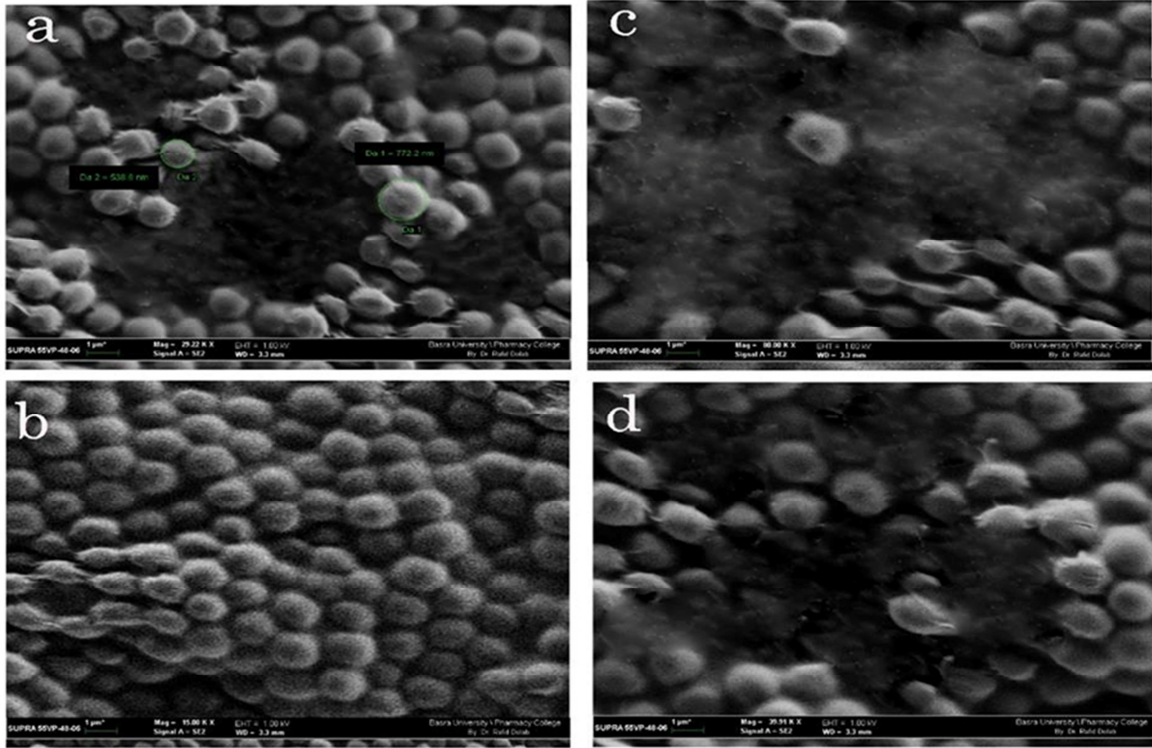
اظهرت صور المجهر الالكتروني الماسح قدرة العزلة BS8 على تثبيط تكون الاغشية الحيوية للبكتيريا الهدف المستخدمة في التجربة والمتمثلة بالنوعين *Pseudomonas aeruginosa* (الشكل 1) و *Staphylococcus sciuri* (الشكل 2) كذلك تحطيم الاغشية الحيوية الاولى للبكتيريا الهدف، تتفق هذه النتائج مع دراسة (Sriram et al., 2011) الذين ذكروا ان الايوض الثانوية المنتجة من بكتيريا *Bacillus cereus* تثبط نمو الاغشية الحيوية للبكتيريا الهدف من خلال منع التصاقها على سطح صفيحة المعايرة الدقيقة مما ادى الى منع تكون هذه الاغشية، كما تتفق هذه النتائج مع دراسة (Sayem et al., 2011) والذين ارجعوا قدرة الايوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus lichniformis* على تثبيط تكون الاغشية الحيوية للبكتيريا الهدف الى عدة اسباب منها ان هذه الايوض الثانوية تتداخل مع المركبات الموجودة على سطح البكتيريا الهدف لتعيق اتصال خلايا البكتيريا الهدف فيما بينها مما يمنع وصول اعداد خلايا البكتيريا الهدف الى العدد المطلوب لتكوين الاغشية الحيوية وهو ما يدعى بادراك النصاب quorum sensing، او ان هذه الايوض تستطيع تحوير الصفات الفيزيوكيميائية والترتيب الهندسي للسطح الخارجي للبكتيريا المكونة للاغشية الحيوية وهذه الظاهرة شبيهة بآلية فعل بعض المضادات الحيوية.

جدول 5. قيمة معدل الجريان للايوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

ت	مسافة تحرك العينة	مسافة تحرك المذيب	معدل 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	13.7	8.8	1.556
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
BA16	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



الشكل 1. صور المجهر الالكتروني لدراسة تأثير الايوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* في تثبيط تكون الغشاء الحيوي لبكتيريا *P. aeruginosa* (a) عينة سيطرة control وتمثل الغشاء الحيوي للبكتيريا الهدف التي تمت نميتها بدون اضافة مستخلص الايوض الثانوية. (b) الغشاء الحيوي حديث التكوين pri-formed biofilm ويمثل المرحلة الاولى من مراحل تكون الغشاء الحيوي تمت نميته بدون اضافة مستخلص الايوض الثانوية. (c) الغشاء الحيوي للبكتيريا الهدف تمت نميته مع اضافة مستخلص الايوض الثانوية. (d) الغشاء الحيوي حديث التكوين للبكتيريا الهدف تمت نميته مع اضافة مستخلص الايوض الثانوية.



الشكل 2. صور المجهر الالكتروني لدراسة تأثير الايوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* في تثبيط تكون الغشاء الحيوي لبكتيريا *S. sciuri*. (a) عينة سيطرة control وتمثل الغشاء الحيوي لبكتيريا الهدف التي تمت تنميتها بدون اضافة مستخلص الايوض الثانوية. (b) الغشاء الحيوي حديث التكوين pri-formed biofilm ويمثل المرحلة الاولى من مراحل تكون الغشاء الحيوي تمت تنميته بدون اضافة مستخلص الايوض الثانوية. (c) الغشاء الحيوي للبيكتيريا الهدف تمت تنميته مع اضافة مستخلص الايوض الثانوية. (d) الغشاء الحيوي حديث التكوين للبيكتيريا الهدف تمت تنميته مع اضافة مستخلص الايوض الثانوية).

4. الاستنتاجات

اسفرت نتائج هذه الدراسة عن امكانية استخدام الايوض الثانوية لبكتيريا جنس *Bacillus* كبديل واعد للمضادات الحياتية وللعوامل المضادة للميكروبات بسبب سهولة الحصول عليها من البيئة المحلية ورخص تكلفة انتاجها وكفاءة قدرتها التثبيطية ضد البكتيريا المهمة وفي المجالات الطبية والصناعية والزراعية والغذائية والبيئية.

المراجع

Ahmed A., Khan A.K., Anwar A., Ali S.A., and Shah M.R. (2016). Biofilm inhibitory effect of chlorhexidine conjugated gold nanoparticles against *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 98: 50–56.

- Al-Sarairah H., Al-Zereini W.A., and Tarawneh K. (2015). Antimicrobial activity of secondary metabolites from a soil *Bacillus* sp. 7BI isolated from South Al-Karak, Jordan. *J. J. Biol. Sci.*, 8(2): 127-132.
- 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.
- Cai W., and Arias C.R. (2017). Biofilm formation on aquaculture substrates by selected bacterial fish pathogens. *J. Aquatic Animal Health*, 29(2): 1-13.
- Charlebois A., Jacques M., Boulianne M., and Archambault M. (2017). Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. *Food Microbiol.*, 62: 32-38.
- 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: 645- 654.
- Dusane D.H., Damari S.R., Nancharaiah Y.V., Ramaiah N., Venugopalan V.P., Kumar A.R., and Zinjarde S.S. (2013). Disruption of microbial Bergy's manual biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus lechniformis*. *PLoS One*, 8(5): 1-12.
- Foulston L., Elsholz K.W., DeFrancesco A.S., and Losick R. (2014). The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises Cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. *MBio.*, 5(5): e01667- 14.
- Halket G., Dinsdale A.E., and Logan N.A.(2010). Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endospore formers. *Letters in appl. Microbiol.*, 50: 120-126.
- Hentzer M., Eberl L., and Givskov M. (2005). Transcriptom analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofouling* , 2 :37-61.
- Kesel S., von Bronk B., Garcia C.F., Gotz A., Lieleg O., and Opitz M. (2017). Matrix composition determines the dimensions of *Bacillus subtilis* NCIB 3610 biofilm colonies grown on LB agar. *RSC. Adv.*, 7: 31886- 31898.
- Khan S.I., Bulmrosen G., Vecchio D., Golberg A., McCormack M.C., Yarmush M.L., Hamblin M.R., and Austen Jr W.G. (2016). Eradication of multidrug resistant *Pseudomonas* biofilm with pulsed electric fields. *Biotechnol. Bioengineering*, 113(3): 643-650.
- Logan N.A., and De Vos P. (2015). *Bacillaceae*. In : *Bergey's manual of systematics of Archea and bacteria* . Whitman, W.B.(Ed.). John Wiley and Sons, Inc., in association with Bergey's manual Trust. 146 p.
- Marhaeni B., Radjasa O.K., Khoeri M.M., Sabdono A., Bengen D.G., and Sudoyo H. (2011). Antifouling activity of bacterial symbionts of seagrasses against marine biofilmforming bacteria. *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif.)*, 02: 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.
- Naves P., Del Prado G., Huelves L., Rodriguez V., Ruiz V., Ponte M., and Soriano F. (2010). Effect of human serum albumin, ibuprofen and N- acetyl-l- cysteine against biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *J. Hosp. Infect.*, 76: 165-170.
- Parvathi A., Krishna K., Jose J., Joseph N., and Nair S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazillian J. Microbiol.*, 40: 269- 275.
- PHE (Public Health England) (2015). UK standards for microbiology investigation; identification of *Bacillus* species. Issue No.3, 27p. Available online at [www.sfam.org.uk].
- Pincus D.H. (2011). *Microbial identification using the VITEK® 2 bioMérieux system bioMérieux Hazelwood, MO, USA.*
- Sawale A., Kadam T.A., and Karale M.A. (2014). Antimicrobial activity of secondary metabolites from halophilic *Bacillus pumilus* sp. *Int. J. Current Microbiol. Appl.Sci.*,3(6): 506-512.
- Sayem S.M.A., Manzo E., Ciavatta L., Tramice A., Cordone A., and Zanfardino A. (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial cell Factories*,10: 74-83.
- Sharon S.F.B., Kalidas S., and Daniel R.R. (2013). Qualitative analysis of antimicrobial compound by high performance thin layer chromatography method. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 6(4): 117-120.
- Sriram M.I., Kalishwaralal K., Deepak V., Gracerosept R., Srisakthi K., and Gurunathan S. (2011). Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids Surf .B Biointerfaces*, 85(2):174-81.
- Teasdale M., Liu J., Wallace J., and Rowley D.C. (2009). Secondary metabolites produced by a marine *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing controlled phenotypes in Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(3): 567-572.
- Wilson G.S., Raftos D.A., and Nair S.V. (2011). Antimicrobial activity of surface attached marine bacteria in biofilms. *Microbiol. Res.*, 166: 437-448.
- Yebra D.M., Kill S., and Dam-Johansen K. (2004). Antifouling technology- past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2):75-104.