دراسة التأثير التثبيطي لبكتريا Subtilis Bacillusالمعزولة من التربة العراقية على بعض عزلات بكتريا Staphylococcus aureus و Escherichia coli المعزولة من الجروح والحروق

شهرزاد نجم عبد الله الشويلي
قسم علوم حياة – كلية علوم–الجامعة المستنصرية

الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع (20) عينه تربة من ترب عراقية مختلفة من المحافظات كربلاء, نجف , بابل فضلا عن العاصمة بغداد , إذ أمكن الحصول على (50) عزلة تعود إلى الجنس Bacillus أخضعت العزلات البكتيرية جميعها للفحوصات المجهرية , الزرعية والكيموحياتية و التي شملت فحص الكاتاليز , فحص ألاوكسيديز , فحص الحركة، النمو في ظروف لا هوائية , النمو في(2%، 5% ،7% ،10%) من ملح الطعام, فحص الاندول , فحص استهلاك الستريت كمصدر وحيد للكربون , فحص فوكس – بروسكور، القدرة على تحلل النشا،أنتاج غاز من سكر الكلوكوز،فضلا عن قدرتها على تخمير (7) مصادر كاربوهدراتية، حيث أمكن الحصول على (8) عزلات تعود إلى النوع *Bacillus subtilis* ,كما تم اختبار قدرة العزلات على أنتاج مواد مثبطه عند نموها على الوسط الزرعي Nutient broth بدرجة حرارة (37) مْ ولمدة (4) أيام , ثم ركزت رواشح العزلات المنماة في الوسط السائل مرة و مرتين لزيادة فعاليتها التثبيطية ،اختبرت قدرة عزلات بكتريا *Bacillus subtilis* على تثبيط نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* وبكتريا *Escherichia coli* المعزولة من الجروح والحروق وذلك باستعمال طريقة الانتشار بالحفر حيث أظهرت النتائج إن رواشح بكتريا *Bacillus subtilis* غير المركزة والمنماة على وسط Nutient broth تمتلك فعالية تثبيطية قليلة ضد عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* والتي أظهرتها رواشح العزلات *Bacillus subtilis* (4,2,1

) ولم يعطي راشح العزلة *Bacillus subtilis*–1 إي فعالية تثبيطية تذكر، ولم تمتلك هذه الرواشح غير المركزة إي فعالية تثبيطية ضد عزلات بكتريا *Escherichia coli* . وقد أدى تركيز رواشح البكتريا جميعها لمرة ولمرتين إلى أظهار فعاليتها التثبيطية ،إذ امتلكت الرواشح المركزة فعالية عالية في تثبيط نمو عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* ،في حين امتلكت فعالية تثبيطية اقل ضد عزلات بكتريا *Escherichia coli* .

المقدمة

يلعب التأثير ألتضادي بين الأحياء المجهرية دورا مهما في السيطرة الإحيائية (Biological control) مما جعله يحظى باهتمام كبير من قبل الباحثين الذين حاولوا وما زالوا يحاولون الإفادة من هذا التأثير بما يخدم حياة الإنسان . لذا فقد شهدت السنوات الأخيرة توجها واسعا في مجال استخدام الأحياء المجهرية ونواتجها الايضية في علاج بعض الحالات المرضية .إن التضاد الميكروبي بمعناه الشامل يعني إن كائنا مجهريا ما يستطيع إن يقتل أو يضر أو يوقف نشاط ونمو كائن مجهري أخر بصورة مباشرة أو غير مباشرة .ومن أهم أنواع التضاد ،هو التضاد الناتج عن إفراز الأحياء المجهرية لمواد خاصة تعرف بالمضادات الحيوية (Antibiotics) ومواد أخرى شبيهه بالمضادات تدعى البكتريوسينات (Bacterocins) فضلا عن مواد أخرى. ففي السنوات الأخيرة الماضية ازداد الاهتمام باستعمال الأنظمة الحيوية لعلاج الإمراض بعد إن لوحظ إن استعمال المضادات الحيوية في العلاج يمكن إن يؤدي إلى ظهور تأثيرات صحية جانبية ومن ناحية زيادة كلفتها العالية وغيرها من الأسباب الأخرى جعل اللجوء إلى استخدام الطرائق الطبيعية كإحدى الوسائل التي اخذ الباحثون يركزون عليها ، ومن هذه الطرائق استخدام الجنس *Bacillus* في مجالات استعمال الإحياء المجهرية في الإنتاج الصناعي ، إذ لم يعد استخدامها مقتصرا على إنتاج بعض المركبات الصناعية بل تعداه ليشمل أنتاج اعقد المركبات الدوائية والكيميائية وأهمها مضادات الحياة والهرمونات والفيتامينات والمبيدات والأسمدة الحيوية (1) .

ومن الصفات التي يجب توفرها في الميكروب الصناعي قدرته على أنتاج كتلة حيوية كبيرة فضلا عن إنتاجه لخلايا خضرية أو سبورات أو حدات تكاثرية بأعداد كبيرة وتحمله للظروف البيئية القاسية غير الملائمة للنمو وقدرته على البقاء لمدة طويلة في التربة وفي المستحضر الحيوي ونموه بمدى حراري واسع وحموضة واسعة وهذه المواصفات تتوافر في جنس البكتريا *Bacillus* الذي يمتاز بمقاومته للظروف البيئية غير الملائمة القاسية بسبب أنتاجه للسبورات (2) وكذلك بسبب تميز هذا الجنس عن البكتريا

الأخرى بإنتاجه للمركبات الايضية الأولية والثانوية كالمضادات الحيوية والأنزيمات والأحماض وبكميات كبيرة (3) . تنتج بكتريا *Bacillus subtilis* العديد من المضادات الحيوية أما ذات بناء رايبوسومي (Ribosomially synthesis) أو غير رايبوسومية البناء، وتمتاز هذه المضادات بفعالية عالية تجاه بعض الأحياء المجهرية التي تصيب النبات والإنسان (4)،ومن هذه المضادات Fengycin وBactericin وSubtilosin وTas A وSubtilin وDifficidin وOxydifficidin Surfactin وBacillomycin وBacillysin وDifficidin وMacrolactin وBacillibactin (5 , 6) .كذلك تمتاز بكتريا *Bacillus subtilis* في إنتاج المادة الشبيهة بالمضاد البكتيري Bacteriocin والذي له فعالية عالية ضد العديد من الاحياء المجهرية الممرضة (8,7). تعد التهابات الجروح والحروق من المشاكل الكبيرة التي يتعرض لها المريض بعد حادثة الجرح أو الحرق لاسيما لو حدث تلوث في المنطقة .إذ إن الالتهابات البكتيرية هي السبب الرئيس في وفاة المرضى المصابين بحالات الجروح والحروق الحادة (9) ،حيث إن البكتريا الموجبة لصبغة كرام تنمو بشكل سريع خلال (48) ساعة وبعد ذلك تحل محلها البكتريا السالبة لصبغة كرام (10)،وتعد بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Pseudomonas aerogenosa* من الأنواع الشائعة والمسئولة عن اغلب حالات التهابات الجروح والحروق (11) ،وتمتاز هذه الأنواع بمقاومتها العالية للعديد من المضادات الحيوية المستخدمة في علاج الجروح والحروق . لذلك جاءت هذه الدراسة لتهدف إلى ما يلي :

- عزل وتشخيص بعض العزلات المحلية التي تعود إلى بكتريا *Bacillus subtilis* من ترب عراقية مختلفة .
- اختبار الفعالية الثبيطية لرواشح هذه العزلات ضد عزلات بكتريا *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* المعزولة من الجروح والحروق .

المواد وطرائق العمل:

حضرت المواد حسب ما جاء في (14,13,12) , استعملت المواد الكيماوية والبايولوجية الآتية: كلوريد الصوديوم Nacl , كلوريد الباريوم , حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4, احمر المثيل Methyl red, كحول اثيلي , α- haphthol , هيدروكسيد البوتاسيوم , فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين , بلازما (Plasma) , دكستروز Dextrose ،ببتون Peptone ،يود

،يوديد البوتاسيوم ،Glucose، Lactose، Starch، Crystal violate، Sufranine
. Galactose، Fructose، Sucrose، Xylose، Mannitol،

كاشف كوفاكس يتكون من المواد الآتية:

Iso amyl alcohol , Para dimethyl aminobenzaldehyde , Concentration Hcl

كاشف الكاتاليز Catalase Reagent : محلول بيرو كسيد الهيدروجين (3%) H_2O_2 .

كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent:

. (N-N-N-N) Tetra methyl -p- phenylene diamine dihydrochloride

الأوساط الزرعية:

حضرت بالاعتماد على تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة الخاصة بها تم ضبط الأس الهيدروجيني إلى (7).

وسط المانيتول – الملحي Mannitol –Salt Agar، وسط أكار الماكونكي MaCconkey's Agar، وسط أساس أكار الدم Blood Base Agar، وسط الاكار المغذي Nutrient Agar ، الوسط المغذي السائل Nutrient Broth ، وسط أكار سيمون – ستريت Simmon – Citrate Agar ، وسط تخمر السكريات Sugar fermentation medium.

جمع العينات :

جمعت (20) عينة تربة من محافظات مختلفة كربلاء ،نجف،بابل ومناطق مختلفة من العاصمة بغداد في أكياس نظيفة ومعقمة ،وزن (2)غم من التربة وذوب في (20)مل من الماء المقطر المعقم ،ووضعت في حمام مائي بدرجة حرارة (80) م لمدة (15) دقيقة من أجل القضاء على الخلايا الخضرية غير المكونة للأبواغ ،أجريت على هذا العالق سلسلة من التخافيف العشرية بواسطة أنابيب اختبار معقمة وحاوية على (9) مل ماء مقطر معقم رقمت هذه الأنابيب (10^{1}– 10^{10-}) ، سحب (0.1) مل من التخفيف(10^{-5} و 10^{-6}) ووزع على أطباق بتري حاوية على (20) مل من الوسط الزرعي Nutrient Agar ونشر بواسطة ناشر زجاجي ومن ثم حضنت الأطباق بالحاضنة بدرجة حرارة (37)م ولمدة (24) ساعة حسب ما جاء في (15) .

- **<u>عزلات البكتريا المرضية المستعملة في الدراسة :</u>**

تم الحصول على عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الجروح والحروق ،من طلبة الدراسات العليا – قسم علوم الحياة – كلية العلوم – الجامعة المستنصرية ومن المختبرات التعليمية/ دائرة مدينة الطب وتم أعادة تشخيصها للتأكد من صحة التشخيص .

<u>تشخيص العزلات:</u>

شخصت البكتريا المعزولة اعتمادا على صفاتها المظهرية المتضمنة حجم ولون وحافات وارتفاع المستعمرات وتفاعلاتها الكيموحياتية من خلال إجراء الفحوصات التالية:

- الفحوصات الكيموحياتية المستخدمة لغرض التشخيص الأولي لبكتريا : *Staphylococcus aureus*

Catalase Test , Oxidase Test , Coagulase Test

وزرع البكتريا على وسط Mannitol Salt Agar

- الفحوصات الكيموحياتية التي استخدمت لإغراض التشخيص الأولي لبكتريا *coli* *Escherichia* هي فحص IMViC TEST

ويتضمن هذا الفحص عددا من الفحوصات هي :

Indole Test , Methyl red – Voges proskaur Test , Citrate utilization Test

أجريت الفحوصات الكيموحياتية حسب ما جاء في (16,13)

استخدمت العدد التالية في التشخيص النهائي لبكتريا *Staphylococcus aureus* و *coli Escherichia*

1- عدة التشخيص Api 20 E , 2- عدة التشخيص Api Staph.

- الفحوصات الكيموحياتية التي استخدمت لإغراض تشخيص بكتريا *Bacillus subtilis* هي : Catalase Test وOxidase Test وMotility Test و Indol Test و Voges proskaur Testو Citrate utilization Test و Starch hydrolysis ،Sugar fermentationو Growth in different concentration of Nacl و Growth in anaerobic conditionو Glucose with gas وكما هو موضح في

جدول رقم (1) وحسب ما جاء في (17) .

دراسة الفعالية التثبيطية لبكتريا *Bacillus subtilis* :

لدراسة الفعالية التثبيطية لبكتريا *Bacillus subtilis* ضد عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* استخدمت طريق الانتشار في الحفر The well diffusion method وحسب ما جاء في (18) .

- حضرت رواشح المزارع السائلة بتنمية عزلات بكتريا *Bacillus subtilis* في وسط Nutrient broth ذي أس هيدروجيني (7) حضنت الأنابيب بدرجة حرارة (37)ْ م لمدة (4) أيام.
- بعد النبذ المركزي (5000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق) تم الحصول على سائل الخلايا الحرة للمزروع الذي رشح من خلال مرشحات نوع Millipore بقطر (0.22) مايكروميتر.
- زرعت عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* في وسط Nutrient broth وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة (37)ْ م لمدة (24)ساعة ،وتم عمل عالق قورنت عكورتة بأنبوبة محلول العكورة القياسي.
- نقل (0.1) مليلتر من لعالق ونشر على سطح وسط Nutrient agar ،ثم تركت الأطباق لتجف بدرجة حرارة المختبر.
- استعمل ثاقب الفلين لعمل حفر قطرها (5) ملم في الوسط الصلب ثم ملئت الحفر بـ(100)مايكروليترمن راشح المزرعة السائلة لعزلات بكتريا *Bacillus subtilis* ،ثم تركت الأطباق لتجف بدرجة حرارة المختبر ،حصنت بعدها بدرجة حرارة (37)ْ م لمدة (24)ساعة .
- تم بعد ذلك قياس أقطار مناطق التثبيط بـ(ملم) حول الحفر.
- تم تركيز رواشح المزارع السائلة لعزلات بكتريا *Bacillus subtilis* جميعها باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) وذلك للحصول على تثبيط بالنسبة للعزلات التي لم تظهر روا شحها غير المركزة فعالية ضد بكتريا الاختبار ،ركزت الرواشح لمرة ولمرتين وذلك بتذويب الراشح المركز في (10) مل و(5)مل من الماء المقطر.ثم بعد ذلك قورنت الرواشح المركزة مع الرواشح غير المركزة من حيث الفعالية التثبيطية.

جدول (2) الفعالية التثبيطية لبكتريا1− *Bacillus subtilis* على عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الحروق والجروح.

عزلات Sta / Esc / عزلة Bs1	Sta1	Sta2	Sta3	Sta4	Sta5	Esc1	Esc2	Esc3	Esc4	Esc5
رواشح غير مركزه	7	0	8*	10	0	0	0	0	0	0
رواشح مركزه مره واحده	15	10	16	17	10	11	12	12	10	11
رواشح مركزه مرتين	22	19	20	24	19	19	18	18	17	19

جدول (3) الفعالية التثبيطية لبكتريا 2− *Bacillus subtilis* على عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الحروق والجروح.

عزلات Sta / Esc / عزلة Bs2	Sta1	Sta2	Sta3	Sta4	Sta5	Esc1	Esc2	Esc3	Esc4	Esc5
رواشح غير مركزه	0	0	7*	9	8	0	0	0	0	0
رواشح مركزه مره واحده	10	10	12	15	17	9	9	12	13	11
رواشح مركزه مرتين	19.5	19	20	22	24	15	17	18	19	17

Esc = *Escherichia coli* ,Bs=*Bacillus subtilis* , Sta = *Staphylococcus aureus*

*الارقام تمثل اقطار مناطق التثبيط مقاسة بالملم .

جدول (4) الفعالية التثبيطية لبكتريا *Bacillus subtilis* 3- على عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الحروق والجروح.

عزلات Sta / Esc / عزلة Bs3	Sta1	Sta2	Sta3	Sta4	Sta5	Esc1	Esc2	Esc3	Esc4	Esc5
رواشح غير مركزه	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
رواشح مركزه مره واحده	7	*9	9.5	10	8	9	7	7	8	9
رواشح مركزه مرتين	13	15	15	19	13	12	12	11	13	15

جدول (5) الفعالية التثبيطية لبكتريا *Bacillus subtilis* 4- على عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الحروق والجروح.

عزلات Sta / Esc / عزلة Bs4	Sta1	Sta2	Sta3	Sta4	Sta5	Esc1	Esc2	Esc3	Esc4	Esc5
رواشح غير مركزه	0	*7	0	8.5	0	0	0	0	0	0
رواشح مركزه مره واحده	10	13	9	15	10	10	9	12	10	10
رواشح مركزه مرتين	20	19	19	23	19	16	15	18.5	16.5	15

Esc = *Escherichia coli* ,Bs=*Bacillus subtilis*, Sta = *Staphylococcus aureus*

*الارقام تمثل اقطار مناطق التثبيط مقاسة بالملم .

جدول (1) الاختبارات البايوكيميائية والتشخيصية لبكتريا *Bacillus subtilis* .

	الاختبارات	الـنتيـجة
1	Catalase	+
2	Oxidase	-
3	Motility	+
4	Starch hydrolysis	+
5	Indole	-
6	Voges-proskauer	+
7	Citrate utilization	+
8	Glucose with Gas	-
9	Lactose	-
10	Galactose	+
11	Glucose	+
12	Mannitol	+
13	Sucrose	+
14	Fructose	+
15	Xylose	+
16	Anaerobic Growth	-
17	Nacl 2%,5%,7%	+
18	Nacl 10%	-

(+)=Positive result , (-) Negative result

النتائج والمناقشة

الفعالية التثبيطية لرواشح المزارع السائلة لبكتريا *Bacillus subtilis* :

من اجل الكشف عن قابلية بكتريا *Bacillus subtilis* المنماة في الوسط السائل على تثبيط عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الجروح والحروق ،اختبرت فعالية رواشح المزارع السائلة لعزلات بكتريا *B. subtilis* جميعها بعد تنميتها في وسط Nutrient broth بدرجة حرارة (37) ولمدة (4) أيام . استخدمت رواشح المزارع السائلة مباشرة بدون تركيز ضد البكتريا المستخدمة في الدراسة ،كما تم اختبار فعالية هذه الرواشح بعد تركيزها باستخدام جهاز المجفد (Lyophilizer) مرة واحدة ومرتين ،وذلك لغرض الحصول على الرواشح المركزة لمزارع العزلات والتي امتازت بفعاليتها العالية التي تفوق فعالية الرواشح غير المركزة . تبيَن النتائج في الجداول (5,4,3,2) إن الرواشح غير المركزة لعزلات بكتريا *B. subtilis* جميعها لم تظهر أية فعالية تثبيطية ضد إي من عزلات بكتريا *coli E.* المستخدمة في الدراسة ، حيث كانت النتائج سالبة عندما لم تظهر مناطق تثبيط النمو البكتيري حول الحفر المملوءة بتلك الرواشح . إما بالنسبة لعزلات بكتريا *S. aureus* فنلاحظ من خلال الجداول إن الرواشح غير المركزة لعزلات بكتريا *B. subtilis* 1 و2 و4 قد أظهرت فعالية تثبيطية قليلة نسبيا وذلك عندما تراوحت أقطار مناطق التثبيط لهذه الرواشح بين (7-10) ملم . في حين كانت الفعالية التثبيطية لرواشح العزلة 3- *B. subtilis* غير المركزة معدومة . وعند تركيز رواشح بكتريا *B. subtilis* لمرة واحدة أظهرت الرواشح الأربعة مناطق تثبيط لنمو بكتريا *S. aureus* فقد تراوحت قيم أقطار مناطق التثبيط بين (7-17) ملم ، وكذلك أظهرت النتائج مناطق تثبيط لنمو بكتريا *E .coli* فقد تراوحت قيم أقطار مناطق التثبيط بين (7-13) ملم . يتضح من النتائج المذكورة والمبينة في الجداول إن اقل قطر منطقة تثبيط لرواشح بكتريا *B.subtilis* المركزة مرة واحدة ضد عزلات بكتريا *S. aureus* كان (7) ملم والذي أظهره راشح العزلة 3-*B.subtilis* على العزلة 1- *S. aureus* ،فيما كان أعلى قطر منطقة تثبيط (17) ملم والذي أظهره راشح العزلة 1-*B.subtilis* ضد العزلة4-*S. aureus* . وبلغ قطر اقل منطقة تثبيط ضد عزلات بكتريا *E. coli* لرواشح عزلات بكتريا *B. subtilis* المركزة مرة واحدة (7) ملم والذي يعود للعزلة 3- *B. subtilis* على العزلتين *E. coli* (3,2) ،إما راشح

العزلة *B. subtilis-2* فقد أعطى أعلى منطقة تثبيط ضد هذه البكتريا والذي بلغ (13) ملم ضد العزلة *E. coli*−4 . إما بالنسبة إلى تأثير رواشح البكتريا المركزة مرتين على عزلات بكتريا *S. aureus* وكما يظهر في الجداول (5,4,3,2) ،فقد أبدت الرواشح جميعها فعالية تثبيطية ضد عزلات هذه البكتريا ،إذ كان اقل قطر منطقة تثبيط لرواشح بكتريا *B. subtilis* (13) ملم الذي أظهره راشح العزلة *B. subtilis* −3 ضد العزلـة*S. aureus*-1 . وبلغ أعلى قطر منطقة تثبيط للرواشح نفسها (24) ملم والذي أظهره راشحا العزلتين *B. subtilis* 1و2 ضد العزلتين *S. aureus* 4 و 5 على التوالي. إما فيما يتعلق بتأثير رواشح البكتريا المركزة مرتين على عزلات بكتريا *E. coli*فقد أظهرت الرواشح جميعها فعالية تثبيطية ضد عزلات هذه البكتريا ،إذ كان اقل قطر منطقة تثبيط لرواشح بكتريا *B. subtilis* (11) ملم ، والذي أظهره راشح العزلة *B. subtilis*-3 ضد العزلة *E. coli-3* . وبلغ أعلى قطر منطقة تثبيط للرواشح نفسها (19) ملم والذي أظهره راشحا العزلتين *B. subtilis* 1و2 ضد عزلات بكتريا *E .coli* 1و5 – 4 على التوالي . ونلاحظ من خلال الجداول إن الرواشح المركزة مرة واحدة ومرتين ولجميع عزلات بكتريا *B.subtilis* قد أظهرت فعالية تثبيطية عالية ضد عزلات بكتريا *S.aureus* ،في حين كانت الفعالية التثبيطية اقل على عزلات بكتريا *E .coli* جميعها .ونلاحظ أيضا إن الرواشح غير المركزة الأربعة لبكتريا *B.subtilis* اظهرت فعالية تثبيطية قليلة نسبيا على عزلات بكتريا *S.aureus* ،في حين لم يكن لها إي تأثير على عزلات بكتريا *E. coli* جميعها . وقد يعزى السبب إلى طبيعة وتركيب الجدار الخلوي للبكتريا ،حيث وجد إن سمك الجدار الخلوي يلعب دورا مهما في كون الخلية البكتيرية مقاومة أو حساسة للمادة المضادة للميكروبات ،إذ وجد إن البكتريا السالبة لصبغة كرام تكون أكثر مقاومة للمواد المضادة للميكروبات مقارنة مع الموجبة لصبغة كرام .وذلك بسبب امتلاكها المقاومة الداخلية المتمثلة بالطبقة الخارجية (Outer layers) ، والتي يدخل في تركيبها عديد السكرايد الشحمي (Lipopolysaccharides) (LPS) الذي تفتقر إليه البكتريا الموجبة لصبغة كرام (19) ،إذ وجد إن هذه الطبقة تعمل كحاجز نفاذية (Permeability barrier) ، يحد من دخول العديد من المواد الكيميائية ومن ضمنها المواد المضادة للميكروبات .في حين أن الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة لصبغة كرام يتكون من الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) وحامض التيكوك (Teichoic acid) (20) وهذه

المكونات لاتمنع دخول المواد المضادة للميكروبات إلى داخل الخلية البكتيرية ، ووجد إن المواد الكيميائية ذات الأوزان الجزيئية العالية تتمكن بسهولة من اجتياز الجدار الخلوي لبكتريا Staphylococcusوالخلايا الخضرية لبكتريا *Bacillus spp* وهذا يفسر حساسية هذه الإحياء المجهرية للعديد من المواد المضادة للميكروبات مثل المضادات الحيوية والمطهرات الكيميائية ومواد أخرى (21) . ونلاحظ من خلال النتائج إن رواشح عزلات بكتريا *B .subtilis* المركزة وغير المركزة تختلف من حيث كفاءتها التثبيطية على عزلات بكتريا *S.aureus* و *coli E.* ،إذ نلاحظ إن رواشح العزلة *B. subtilis* 3– المركزة وغير المركزة كانت الأقل تأثيرا تثبيطيا مقارنة برواشح العزلات الأخرى ،في حين كانت رواشح العزلة *B. subtilis* 1– هي الأكثر تأثيرا من الناحية التثبيطية على عزلات بكتريا *S.aureus* و *E. coli* وقد يعزى السبب إلى عدة عوامل منها فترة الحضن ومدة التضاد حيث أشار(22) إلى كفاءة البكتريا *B.subtilis* في إنتاج المادة الشبيهة بالمضاد البكتيري Bacteriocin من خلال تنمية البكتريا *B.subtilis* في الأوساط السائلة والصلبة وكان لهذه المادة فعالية كبيرة في تحطيم مجموعة من الأحياء المجهرية المختبرة ومنها *B.mycoides* وكذلك كل من بكتريا *B.cereus* و*B.polymyxa* وكان الفعل التحطيمي لمادة Bacteriocin مؤثرا ومتزايدا بزيادة مدة التحضين وكذلك بزيادة مدة التضاد على الوسط ألزرعي .واشار (23) إلى إن بكتريا *B.subtilis* تستطيع إنتاج المضاد الحيوي Bacillysoin والذي يتميز بفعالية عالية ضد البكتريا *S. aureus* .

المصادر

1-العاشور،علي جابر جاسم .(2009).تقيم كفاءة بعض العزلات المحلية التابعة للجنس *Bacillus* في السيطرة على بعض الفطريات الممرضة لنباتي الحنطة و البامية .أطروحة دكتوراه، قسم علوم الحياة،كلية العلوم ،جامعة الكوفة .

2-Prescott,L.M;Harley,J.P.and Klein,D.A.(2005). Microbiology.6th ed. McGraw-Hill,USA.

3-ساجدي , عادل جورج ;علي , يحيى محمد .(1987) .الميكروبيولوجي الصناعي . الجزء الأول . أساسيات التخمرات الصناعية . مطبعة جامعة البصرة .(551) صفحة .

4 -Ara, K. (2007). *Bacillus* minimum genome factory : effective utilization of microbial genome information .Appl. Biotechnol.Biochem.46(3):169-78.

5--Jamil ,B.(2007). Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production .PAK.Jour. Pharm Sci..20(1):26-31

6- Chen , X.H. ; Koumoustsi , A. ; Scholz , R. and Eisenreich, A .(2007).Comparative analysis of the plant growth –promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 .Nature biotechnology .Vol:25:NO:9.

7--Eppelmann,K.;Doeket,S. and Marahiel ,M.A.(2001).Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic in the surrogate host *Bacillus subtilis*. J.Biol.Chem.276:34824-34831.
8--Rietkotter,E.;Hoyer,D. and Mascher,T.(2008).Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis* .J.Mole.Microb,68:768-785
9--Mims,C.;Dockrell,H.M,;Goering,R.V.;Roitt,I.;Wakelin,D.and Zuckerman, M.(2004).Medical Microbiology.3th ed.Updated ,Elsevier Limited.
10--Brooks,G.F.;Butel,J.S.;Carroll,K.C.and Morse,S.A.(2010). Jawetze ,Melnick &Adelbergs Medical Microbiology.25th ed. McGraw- Hill Companies, USA.
11- Spicer,W.J.(2000).Clinical Bacteriology Mycology and Parasitology : An illustrated colour text, Churchill Livingstone.
12-Koneman,E.W.;Alten,S.D.;Jawa, W.M.;and Sachreekeber, P.C.(1992). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4 thed.J.B.ippincott Company .Philadelphia.
13- Forbes, B.A.;Sahm,D.F.; and Weissfeled, A.S.(2002) .Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology . 11 thed .Mosby Inc,st.Louis.
14- Morello, : Mizer, H.E.; and Granat,P.A.(2006). Laboratory Manual and Book in Microbiology Applications to Patient Care. 8thed. McGraw- Hill,USA.
15-McFadden, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Williams and willkins company. USA., pp. 912.
16--Brown,A.E.(2005). Microbiological Applications-Laboratory Manual in general Microbiology. McGraw- Hill, New York.
17--Sreekumar,G. and Krishnan,S.(2010).Isolation and characterization of probiotic *Bacillus subtilis* SKO9 from daireffluent .Indian Journal of Science and Technology. 3(8):863-866.
18-Schwable,R.;Moor,L.S.and Good,A.C.(2007).Antimicrobial susceptibility testing protocols .Taylorr and Frams Group.
19-Gillbert ,P.and Brown,M.R.W.(1995).Some perspectives on preservation and disinfection in the present day .Int.Biodeterior.Biodegard .36:219-226.
20-Paulsen,I.T.;Park,J.H.;Choi,P.S.;and Saier,M.H.(1997).A family of gram –negative outer membrane factors that function in the export of proteins ,carbohydrates, drugs and heavy metals from gram – negative bacteria .FEMSmicrobial .Lett.,156:1-8.
21-Russell,A.D.(1991).Mechanisms of bacterial resistance to non –antibiotics: disinfectants and preservatives.J.Hosp.Infect.,6:9-16.
22- -Sood ,A.; Sharma ,S.; Kumar ,V.; and Thakur , R.L.(2008). Established and abandoned Tea (*Camillia sinensis* L.) Rhizosphere: Dominant bacteria and their antagonism. J. Microbiol., Vol 57. 1:71-76.
23-Tamehiro , N. ; Okamoto-Hosoya , Y. ; Okamoto , S. ; Ubukata , M. ; Hamada , M. ; Naganawa , H. and Ochi ,K.(2002). Bacilysocin ,a novel phospholipids antibiotic produced by Bacillus subtilis 168 . antimicrob agents chemother. 46:315-320

Study the Inhibiting Effects of *Bacillus subtilis* which Isolated from Iraqi Soil on some Isolates of

Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* which Isolated from wounds and Burns

Shahrazad Najem Abdu-Allah Al-Shuwaili
Department of Biology- College of Science - University of Al-Mustansiryia

Abstract

Form various soil samples which were collected from different areas of Iraq (Baghdad , Najaf , Karbala ,Babel) ,(50) Bacillus isolates were obtained , (8) Isolates belong to *Bacillus subtilis*. All isolates were subjects to the microscopical , cultural and biochemical examination which included ability to produce : Catalase, oxidase, growth in anaerobic condition, growth in the presence of (2%,5%,7%,10%) Nacl ,indole production test ,citrate utilization test ,voges-proskaur test ,starch hydrolysis ,glucose with gas and ability to ferment (7) carbohydrate sources. Capability of these isolates to produce inhibitory materials when grown in Nutrient broth against tow pathogenic bacteria isolated from burns and wounds (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*)were tested by used of the agar well diffusion method . To increase their activity, filtrates of the isolates that grown in liquid medium were concentrated .Four isolates were chosen due to their highest antibacterial activity .The results of this study showed that: unconcentrated filtrates of bacterial isolates did not show any inhibitory effect against pathogenic bacteria in the study , except (3) filtrates belonged to *Bacillus subtilis*-1, *Bacillus subtilis*-2 and *Bacillus subtilis*-4 which gave low inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* .while the concentration of all bacterial filtrates for one and two-fold exhibited their activity .The concentration of all bacterial filtrates showed high inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* while showed low inhibitory effect against the isolates of *Escherichia coli* .