

دراسة قابلية الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus spp.* على تثبيط تكون الأغشية الحيوية

إيمان عبدالله عبد العالي الامارة^{1*}، وغيداء جاسم عبدالنبي الغزاوي²

¹ قسم التنوع الاحيائي، مركز علوم البحار، جامعة البصرة، البصرة، العراق.

² قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة البصرة، البصرة، العراق.

البريد الإلكتروني: eman_ab74@yahoo.com

Study of The Ability of Secondary Metabolites from *Bacillus spp.* in Inhibition of Formation of Bacterial Biofilms

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

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

²) Department of Biology, Collage of Education for Pure Science, Basrah University, Basrah, Iraq.

Received: 16 September 2019; Revised: 26 November 2019; Accepted: 28 November 2019

الملخص

عزلت 20 عزلة بكتيرية من عينات مياه وترسبات من مناطق مختلفة من محافظة البصرة جنوب العراق، شخّصت العزلات شكلياً وكيموحيوياً وباستخدام نظام التشخيص VITEK II compact الذي اظهر ان هذه العزلات تعود الى نوعين تابعين للجنس *Bacillus* كما عزلت 5 عزلات بكتيرية تعود لـ 5 أنواع مكونة للأغشية الحيوية، ثلاث منها موجبة لصبغة غرام هي *Staphylococcus sciuri*, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Kocuria kristinae*، ونوعين سالبة لصبغ غرام هما *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*. أنتجت واستخلصت ونقيت الأيوض الثانوية من بكتيريا جنس *Bacillus* واختبرت فعاليتها التثبيطية ضد البكتيريا الهدف حيث كانت فعاليتها التثبيطية ضد البكتيريا الموجبة لملون غرام اعلى منها ضد البكتيريا السالبة لملون غرام، فصلت مكونات الأيوض الثانوية باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والتي اظهرت احتواء الأيوض الثانوية على الأحماض الامينية وهذا ما اكده تحليل الأيوض باستخدام جهاز مطياف الكتلة والامتصاص الذري، حددت قيمة البروتينات الكلية في الأيوض الثانوية لتحديد العزلة الأكثر انتاجاً للأيوض الثانوية لاختيارها لإكمال الدراسة حيث اختبرت العزلة BS8 و BS14 لإكمال البحث، درس التحديد الكمي للبكتيريا الهدف على تكوين الأغشية الحيوية باستخدام صبغة البنفسجي البلوري حيث سجلت اعلى قيم الامتصاصية لبكتيريا *P. aeruginosa*، أما اقل القيم فقد كانت لبكتيريا *K. kristinae*، كما حددت قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC لمستخلصي الأيوض الثانوية.

درس التأثير التثبيطي لمستخلصي الأيوض الثانوية للعزلتين BS8 و BS14 في تكون الاغشية الحيوية في صفيحة المعايرة الدقيقة microtiter plate ومقارنته بالتأثير التثبيطي للمضادين الحيويين حامض النالديكسك والتتراسايكلين إذ لوحظ حدوث انخفاض كبير في النسبة المئوية لتكوين الاغشية الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* و *S. sciuri* عند حضنها مع المستخلص لاسيما عند التركيز الذي يمثل التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص ضد هذه البكتيريا والتراكيز التي تليه، أما نتائج التأثير التثبيطي للمضادين الحيويين فقد كانت اقل نسبياً من نتائج التأثير التثبيطي للمستخلص ضد البكتيريا الهدف.

الكلمات الدالة: الأيوض الثانوية، *Bacillus spp.*، الفعالية التثبيطية، الأغشية الحيوية، المضادات الحيوية.

Abstract

Twenty bacterial isolates were isolated from different locations in Basrah Governorate, southern Iraq. The isolates were identified biochemically by VITEK2 BCL cards, which showed that these isolates belong to two species of *Bacillus*. Also, five biofilm-forming bacterial isolates (target bacteria) were isolated and identified by VITEK GP & 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, extracted, and purified from *Bacillus* spp. their antibacterial activity against gram-positive was higher than those against gram-negative bacteria, and results of Thin Layer Chromatography showed that *Bacillus* secondary metabolites contain free amino acids, this was confirmed by GC-MS analysis, total proteins were determined to choose the isolates which produce the higher quantity of secondary metabolites, so SM extracts of BS8 and BS14 were chosen to complete the study.

Results of quantitative determination of biofilm which formed by target bacteria in microtiter plate showed that *P. aeruginosa* was the higher biofilm producer among gram-negative bacteria while *S. sciuri* was the less biofilm producer. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined against target bacteria. The inhibitory effect of BS8 and BS14 SM in the inhibition of biofilm formation of *P. aeruginosa* and *S. sciuri* in microtiter plate in comparison to the inhibitory effect of nalidixic acid and tetracycline was studied, and the results showed that there was a decrease in the percentage of both bacterial species especially from the MIC of the s. m. extract and the concentrations beyond, the inhibitory effect of the antibiotics was less than that of the SM extracts.

Keywords: Secondary metabolites, *Bacillus* spp., Antibacterial activity, Biofilms, Antibiotics.

1. المقدمة

يضم جنس *Bacillus* أفراداً واسعة الانتشار في البيئة وذات متطلبات نمو يسيرة وتستطيع إنتاج مدى واسع من المواد منخفضة السمية أو عديمة السمية و الفعالة ضد الأحياء المجهرية الأخرى (Sharma *et al.*, 2010) كما أن قدرتها العالية على تحمل الظروف البيئية المتطرفة مثل ارتفاع أو انخفاض الحرارة أو الدالة الحامضية أو الظروف الأزموزية، كل هذا جعل أفراد هذا الجنس محط عناية الباحثين لغرض استخدام هذه البكتيريا أو أبيضها الثانوية لغرض استئصال الأغشية الحيوية وتثبيط نمو البكتيريا المنتجة لها، إذ استخلص العديد من الأيوض الثانوية من أفراد هذا الجنس التي تنوعت في طبيعتها الكيماوية سواءً بروتينات أم سكريات متعددة أو بروتينات دهنية (Valle *et al.*, 2006) وقد أظهرت هذه المركبات فعالية كيميائية ملحوظة ضد الأحياء المجهرية المكونة للأغشية الحيوية سواءً قبل تكون الغشاء الحيوي أو حتى عند تكون المرحلة الأولى من مراحل تكونه إذ استطاعت الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* spp. تثبيط البكتيريا المكونة للمرحلة الأولى من الغشاء الحيوي عن إتمام تكوين بقية المراحل وذلك ضمن مديات واسعة من الحرارة والدالة الحامضية (Sawale *et al.*, 2014).

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 أفضل 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 قليلة الوزن الجزيئي تنتج أثناء طور الذاتية (idiophase) لأنواع قليلة نسبياً من الميكروبات يتم إنتاجها كرد فعل للضغوط البيئية ومن الامثلة على الأيوض الثانوية: المضادات الحيوية والصبغات والاحماض والسموم والعوامل المؤثرة على التنافس البيئي والتعايش symbiosis ومشبطات الانزيمات ومضادات الاورام والمبيدات ومحفزات النمو للنباتات والحيوانات (Demain and Fang, 2000).

تستطيع 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 (Mondol et al., 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 العصبوية الهدف لذلك يعد هذا الجنس مرغوباً للإنتاج التجاري (Priest et al., 1995). يبدأ إنتاج الأيوض الثانوية عندما يتباطأ نمو الأنواع بكتيريا بسبب استهلاك أحد مصادر المغذيات: الكاربون او النتروجين أو الفوسفات.

ولأجل الحصول على عزلات بكتيرية من جنس *Bacillus* معزولة من البيئة المحلية ودراسة قابلية أبيضها الثانوية على تثبيط الأغشية الحيوية البكتيرية فقد صممت هذه الدراسة.

2. المواد وطرق العمل

جمعت خمسون عينة مياه وترسبات للفترة من يناير 2016 – أبريل 2016 من أماكن مختلفة في محافظة البصرة و تُقلت العينات إلى المختبر لتشخيصها حيث وضعت العينات في حمام مائي بدرجة حرارة 80°م لقتل أنواع البكتيريا غير المكونة للأبواغ (PHE, 2015).

1.2. عينات الترسبات

جمعت العينات (20 جم لكل عينة) باستخدام أكياس البولي إيثيلين المعقمة الحافة، وبوساطة الملقق spatula المعقم وفي ظروف معقمة، أُضيف 1 جم من كل عينة إلى انبوبة اختبار تحتوي على 10 مل ماء مقطر ثم عُملت سلسلة تخفيف عشرية لغاية 10^{-6} وحدة لتكوين مستعمرة (cfu)/مل من الماء المقطر، رشحت التخفيف 10^{-1} ، 10^{-3} ، 10^{-6} باستخدام أوراق الترشيح نوع 0.45 µm millipore filter paper، وضعت أوراق الترشيح في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي الصلب Lauria- Bertani (Hi Media, LB agar) وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 35°م لمدة 18 ساعة ثم أخذت 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 (France , bioMérieux) كما و شخصت جينياً بتضخيم الجين المشفر لإنتاج إنزيم gyrase باستخدام عدة استخلاص (Promega) Wizard DNA (- USA) (Pincus, 2005).

2.2. عينات المياه

مُجمعت 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 وعُمِلت سلسلة تخفيف عشرية ($10 \times 1^{-1} - 10 \times 1^{-4}$) وحدة تكوين مستعمرة/مل من الماء المقطر، رشحت التخفيف ($10 \times 1^{-3} - 10 \times 1^{-4}$) وتُيئت كما ذكر في عينات الترسيبات، ويبين الجدول (1) مواقع وأعداد العينات المفحوصة ونتائج التخفيف لمعدل أعداد البكتيريا في عينات المياه والترسيبات.

جدول 1. مواقع وأعداد العينات المفحوصة ونتائج التخفيف لمعدل أعداد البكتيريا في عينات المياه والترسيبات.

ت	الموقع	عدد العينات	انواع العينات ومعدل اعداد البكتيريا فيها		
			ترسيبات	Cfu/10 ⁻⁶	مياه
1	أحواض تربية الأسماك في مركز علوم البحار	4	2	35	22
2	ميناء خور الزبير	10	5	19	12
3	ميناء ام قصر	17	8	27	15
4	ميناء ابو فلوس	4	2	18	10
5	ابو الخصب	8	4	43	28
6	ميناء الفاو	2	1	15	7
7	السيبة	2	1	29	13
8	المياه المصاحبة لاحد الابار في الحقل النفطي زبير1	1			
9	المياه المصاحبة لاحد الابار في الحقل النفطي ps1	1			
10	المياه المصاحبة لاحد الابار في منطقة ارطوي	1			

3.2. انتاج الأيوض الثانوية (Secondary metabolites production)

أنتجت 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 °م.

4.2. استخلاص الأيوض الثانوية لانواع بكتيريا *Bacillus spp.*

أُستخلصت الأيوض الثانوية لأنواع بكتيريا *Bacillus spp.* حسب طريقة (Amin *et al.*, 2015) إذ أُضيفت خلاصات الإيثيل إلى المزرعة البكتيرية بنسبة (1:1) وتم تحريك المزيج بوضعه على المازج المغناطيسي magnetic stirrer لمدة ست ساعات، ثم فصلت الطبقة العضوية العليا بواسطة قمع الفصل ووضعت في جهاز النبذ المركزي على سرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ثم أُزيلت طبقة خلاصات الإيثيل ونقلت إلى دورق نظيف، وجمع المستخلص وجفف في المبخر الدور Rotary evaporator بدرجة 50 °م ثم أُذيب المستخلص في الكحول الإيثيلي، اختيرت العزلتان الأكثر إنتاجاً للأيوض الثانوية 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.

5.2. تنقية الأيوض الثانوية لأنواع بكتيريا جنس *Bacillus*

أُجريت خطوات كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion Exchange Chromatography وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography طبقاً لطريقة (Anju et al., 2015)، فيما أُجري الرحلان الكهربائي حسب Laemmler (1970). أُختبرت الفعالية البكتيرية للأيوض الثانوية المنقاة ضد الأنواع البكتيرية: *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) و *Staphylococcus sciuri* و *Kocuria kristinae* بطريقة الانتشار عبر الأغار (Dusane et al., 2011) إذ زُرعت الأطباق الزرع الحاسوبية على وسط LB الصلب بنشر 0.1 مل من المزارع البكتيرية السائلة للأنواع المذكورة أعلاه بواسطة الناشر L- shape spreader ثم حُضنت بدرجة 35°م لمدة 15 دقيقة ثم ثقب الوسط الزرع الصلب باستخدام ثاقب الفلين cork poorer ومُلئت الثقوب بـ 50 µL من الراشح المعقم لبكتيريا جنس *Bacillus*، حُضنت الأطباق بدرجة 35°م لمدة 18 ساعة ثم قيست أقطار التشييط (مم) باستخدام المسطرة وسجلت النتائج.

6.2. التقدير الكلي للأيوض الثانوية 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 (الأيوض الثانوية) في العينة حسب المعادلة

$$(1) \dots\dots\dots \frac{\text{امتصاصية العينة}}{\text{امتصاصية العينة القياسية}} = \text{البروتين الكلي في العينة} \times 60$$

7.2. تشخيص الأيوض الثانوية باستخدام كروماتوغرافيا الغاز ومطياف الكتلة

(GC-MS) Gas Chromatography and Mass Spectroscopy

حُدثت الجزئيات الفعالة في الأيوض باستخدام جهاز (GC-MS) حسب طريقة (Mohan et al., 2016).

8.2. التحديد الكمي للأغشية الحيوية *Quantitative Determination of the Biofilm*

تم إجراء هذا الاختبار حسب (O'Toole 2011).

9.2. تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

حُفّف مستخلص الأيوض الثانوية (100 مايكروجرام/مل) بوسط مولر هنتون السائل باستخدام صفيحة المعايرة الدقيقة ذات 96 حفرة 96- well microtiter plate إذ حُضرت سلسلة التخفيف التالية (100، 50، 25، 12.5، 6.25، 3.12، 1.6، 0.8، 0.4، 0.2، 0.1) مايكروجرام/مل ووضعت في الحفر بواقع 100 مايكروجرام/مل في الحفرة الواحدة، أُضيفت 100 مايكروتر من الوسط الزرع السائل الحاوي على (5×10^5 cfu/مل) البكتيريا الهدف إلى كل حفرة من هذه الحفر وحُضنت بدرجة 35°م لمدة 18 ساعة ثم قُرئت النتائج حيث حُدد التركيز المثبط الأدنى على أنه أقل تركيز يثبط نمو البكتيريا الهدف target bacteria، استخدم كلا من المضادين الحيويين التراسايكلين (الذي يتداخل مع قدرة البكتيريا على إنتاج البروتينات) وحامض الناليديكسك (الذي يحول دون استنساخ الحامض النووي البكتيري) بالتركيز التالية (1250، 2500، 624، 312، 160، 80، 40، 20، 10، 5، 2.5) مايكروجرام/مل للمقارنة (Dusane et al., 2013).

10.2. دراسة تشييط تكون الاغشية الحيوية في صفيحة المعايرة الدقيقة

تم اجراء هذا الاختبار حسب (Dusane et al., 2013).

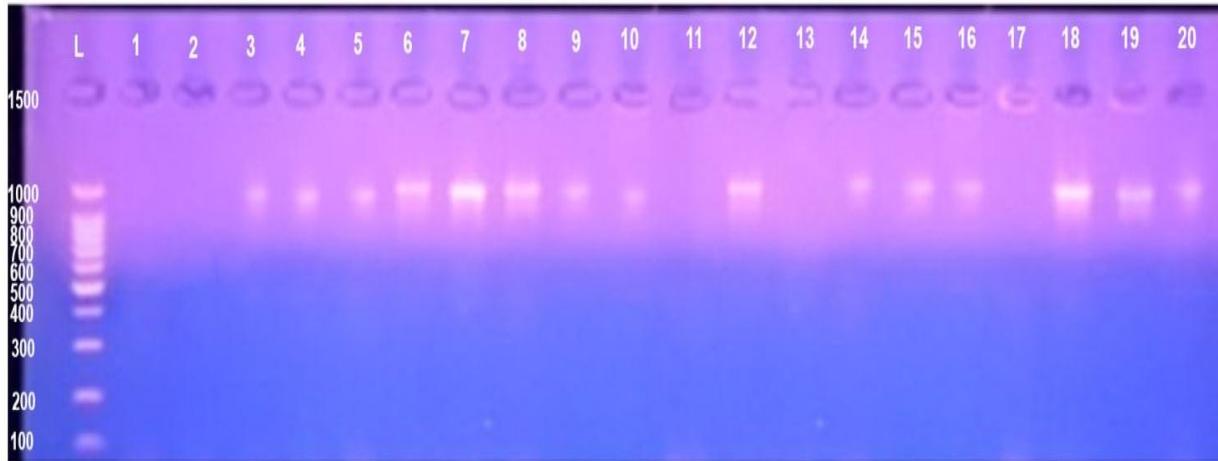
11.2. التحليل الاحصائي

تم عمل التحليل الاحصائي لتجارب الفعالية التضادية بين عزلات بكتيريا *Bacillus* والانواع العسوية الهدف حيث تم أخذ معدل القراءة لثلاث مكررات ثم خللت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي الحاسوبي (SPSS, 2009)، وأختبرت العوامل المدروسة بالاعتماد على أقل فرق معنوي بين المتوسطات (L.S.D) عند مستوى احتمالية ($p < 0.05$).

3. النتائج والمناقشة

1.3. عزل وتشخيص بكتيريا جنس *Bacillus* spp.

تم الحصول على 20 عذلة بكتيرية تابعة للجنس *Bacillus* spp. (جدول، 2)، أظهرت نتائج التشخيص أن 15 عذلة تعود إلى النوع *Bacillus subtilis* فيما شخصت 5 عزلات على أنها تعود للنوع *B. amyloliquefaciens* وهذا ما أكده التشخيص الجيني (شكل 1) إذ اظهرت العزلات التابعة للنوع *B. subtilis* نتائج موجبة لعملية التضخيم فيما أبدت العزلات التابعة للنوع *B. amyloliquefaciens* نتائج سالبة.



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

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

ت	نوع العينة	مصدر العزلة	النوع البكتيري المعزول
1	ماء	احواض تربية الاسماك في مركز علوم البحار	<i>B. amyloliquefaciens</i>
2	ماء	احواض تربية الاسماك في مركز علوم البحار	<i>B. amyloliquefaciens</i>
3	ترسبات	ميناء خور الزبير	<i>B. subtilis</i>
4	ترسبات	ميناء ام 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 ابو الخصب	<i>B. subtilis</i>
8	ترسبات	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>
9	ترسبات	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>
10	ترسبات	ميناء الفاو	<i>B. subtilis</i>
11	ترسبات	ميناء الفاو	<i>B. amyloliquefaciens</i>
12	ترسبات	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>
13	ترسبات	ميناء ام قصر	<i>B. amyloliquefaciens</i>
14	ترسبات	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>
15	ماء	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>
16	ماء	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>
17	ماء	ميناء ام قصر	<i>B. amyloliquefaciens</i>
18	ماء	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>
19	ماء	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>
20	ماء	ميناء ام قصر	<i>B. subtilis</i>

2.3. انتاج الأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus spp.*

تراوحت فترة تنمية أفراد هذا الجنس في البحوث والدراسات السابقة لغرض إنتاج الأيوض الثانوية بين 24-72 ساعة (Valle *et al.*, 2006; Teasdale *et al.*, 2009; and Sharma *et al.*, 2010) وقد أشارت هذه البحوث إلى أن أعلى إنتاج للأيوض الثانوية للأنواع العصوية *Bacillus spp.* كان بعد مرور 48 ساعة من النمو عند دخول المزرعة البكتيرية في مرحلة idiophase من طور النبات stationary phase، كما تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Barrios- Gonzalez *et al.*, 2003) والذين أشاروا إلى أن إنتاج الأيوض الثانوية يبدأ عندما يتناقص معدل النمو البكتيري نتيجة استهلاك أحد المغذيات الرئيسية مثل: الكاربون، النتروجين أو الفسفور. وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره (Motta *et al.*, 2007) بأن بكتيريا *Bacillus* المعزولة من قبلهم أنتجت الأيوض الثانوية في الطور اللوغاريتمي ووصل الإنتاج إلى ذروته في طور النبات stationary phase.

3.3. استخلاص الأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus spp.*

ذكرت البحوث والدراسات 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 الإيثيل Ethyl acetate (Barrios-Gonzalez et al., 2003; Marhaeni et al., 2011)، إذ أظهرت الأيوض الثانوية المستخلصة في الدراسات السابقة بواسطة خلات الإيثيل أفضل فعالية تضادية ملحوظة ضد الأنواع العصوية الهدف مقارنة بالأيوض المستخلصة بالمذيبات العضوية الأخرى وهذا يتفق مع الدراسة الحالية إذ أظهرت الأيوض الثانوية 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)، كما أن استخدام خلات الإيثيل في استخلاص الأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* يحافظ على الفعالية التثبيطية لهذه الأيوض ضد الأنواع العصوية الهدف.

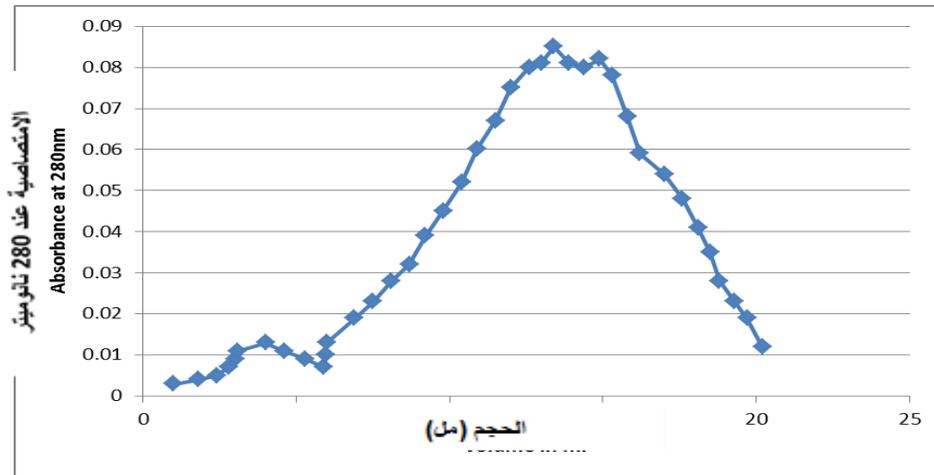
4.3. تنقية الأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus spp.*

1.4.3. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion Exchange Chromatography

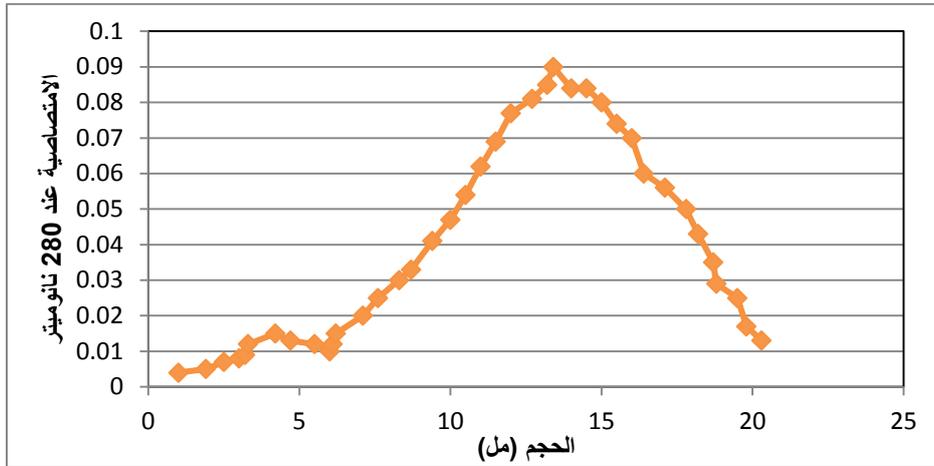
تم بواسطة هذه الخطوة فصل خليط المركبات المكونة لمستخلصات الأيوض الثانوية اعتماداً على شحنتها بعد وضعها على سطح المبادل الأيوني داخل عمود الفصل بمرحلتين (شكل 2 و3):

أولاً: غسل الأجزاء غير المرتبطة (وهي الأجزاء الفعالة من المستخلصات) وتكون ذات شحنة موجبة مشابهاً 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 أيضاً 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.



شكل 2. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للأيوض الثانوية للعزلة BS8

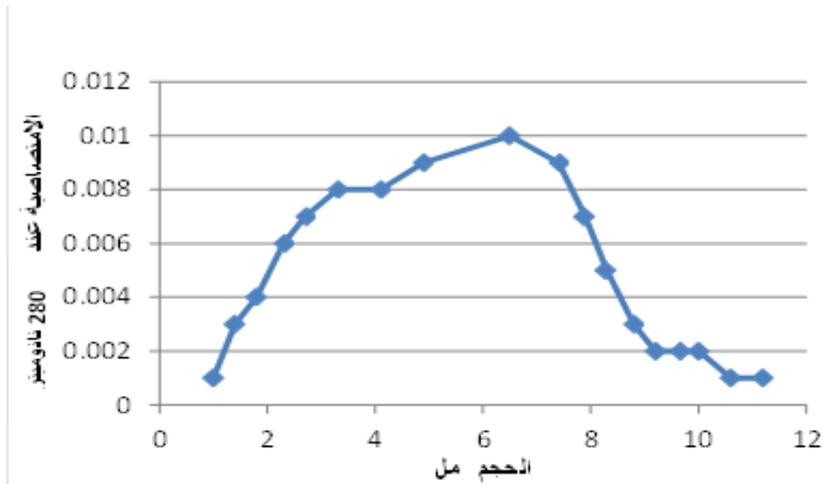


شكل 3. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للأبيض الثانوية للتعزلة BS14

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

2.4.3. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel Filtration Chromatography

أجري الترشيح الهلامي باستعمال هلام السيفادكس S-25 في تنقية الأيوض 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 4)، تتفق النتائج مع ماتوصل إليه (Teixeira, *et al.*, 2013) أن استعمال هلام السيفادكس في الترشيح الهلامي يعد اختياراً ناجحاً جداً إذ ساهم في زيادة الفعالية التثبيطية للأبيض الثانوية ضد الأنواع العسوية الهدف.



شكل 4. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للتعزتين BS8 و BS14

3.4.3. الرحلان الكهربائي Electrophoresis لمستخلصات الأيوض الثانوية

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي باستخدام معلم الوزن الجزيئي aptinin ذو الوزن الجزيئي 6512 دالتون وجود حزمتين بيتيديتين خاليتين من التلوث بواقع حزمة واحدة لكل مستخلص مما يدل على كفاءة الطريقة المستخدمة في استخلاص وتنقية مستخلصات الأيوض الثانوية بلغ الوزن الجزيئي للحزمة الأولى 3779 دالتون وكانت مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS8، فيما بلغ الوزن الجزيئي للحزمة الثانية 379 دالتون وكانت مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS14 كما موضح في الشكل (5). اتفقت النتائج مع ما توصلت إليه دراسة (Bechard *et al.*, 1998) والتي ذكرت أن الببتيدات المستخلصة من بكتيريا *Bacillus subtilis* والتي قاموا بتمريرها في الهلام بطريقة SDS-PAGE قد ظهرت بشكل تجمعات aggregates مكونة تركيباً 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 الاغشية الحيوية.

4.4.3. تشخيص الأيوض الثانوية باستخدام كروماتوغرافيا الغاز ومطياف الكتلة

(GC-MS) Gas Chromatography and Mass Spectroscopy

أظهرت نتائج تحليل كروماتوغرافيا الغاز للأيوض الثانوية التي أنتجت من قبل العزلتين BS8 و BS14 أن الأيوض الثانوية للعزلتين تحتوي على العديد من المركبات ذات الفعالية التضادية تجاه البكتيريا الهدف مثل الاحماض الامينية ومشتقاتها والإسترات والمركبات العضوية الهيدروكربونية وغيرها، وهذا يوافق ما وجدته (Ramayabharathi and Raguchander, 2014) الذين ذكروا أن الأيوض الثانوية التي قاما بتحليل مكوناتها بجهاز GC-MS احتوت على المركبات العضوية الحاوية على الاحماض الامينية، تمتلك هذه المركبات فعالية تثبيطية ميكروبية مثل L- Lucine ، و Norvaline n- propaglyoxycarbonyl-, nonylester ، N- cycloprpyl carbonyl-, butyl d- proline ، N – metoxycarbonyl -, pentyl ester والاسترات مثل N- cycloprpyl carbonyl-, butyl والتي أيضا تم عزلها من مستخلصات الأيوض الثانوية في الدراسة الحالية، إذ أشارا إلى أن وجود الاحماض الأمينية والإسترات في مستخلصات الأيوض الثانوية لبكتيريا *B.subtilis* يعطي لهذه المستخلصات فعالية تثبيطية قوية ضد الاحياء المجهرية مما يؤهلها لتكون عوامل سيطرة بايولوجية تساهم في القضاء على العديد من المشاكل البيئية التي تسببها هذه الاحياء المجهرية مما يساعد في التقليل من استخدام المواد الكيميائية في علاج هذه المشاكل البيئية، واتفقت النتائج مع ما أشار إليه (Leiman *et al.*; 2013) أن الاحماض 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 ان *B. subtilis* تنتج العديد من البروتينات الخارج خلوية خلال طور الثبات من منحنى النمو إذ ظهرت لديهم خلال الترحيل الكهربائي للعزلة التي أطلقوا عليها اسم *B. subtilis* 100-110 بقعة في الهلام اختيرت منها 38 بقعة لتحليل تتابعات الأحماض الأمينية الموجودة في النهاية الامينية N- terminal والتي اظهرت تواجد العديد من الاحماض الامينية مثل الالانين والفالين والليوسين ومشتقاتها حيث ذكروا ان بوائى هذه الأحماض الأمينية تتواجد في غشاء الخلية البكتيرية ثم تتجمع هذه الأحماض الأمينية في السائتوبلازم بمساعدة انزيمات signal peptidases لتحرر الى الوسط الزرعى أثناء طور الثبات.

جدول 3. نتائج تحليل الأيوض الثانوية للعزلة المحلية BS8 بواسطة جهاز GC- MS

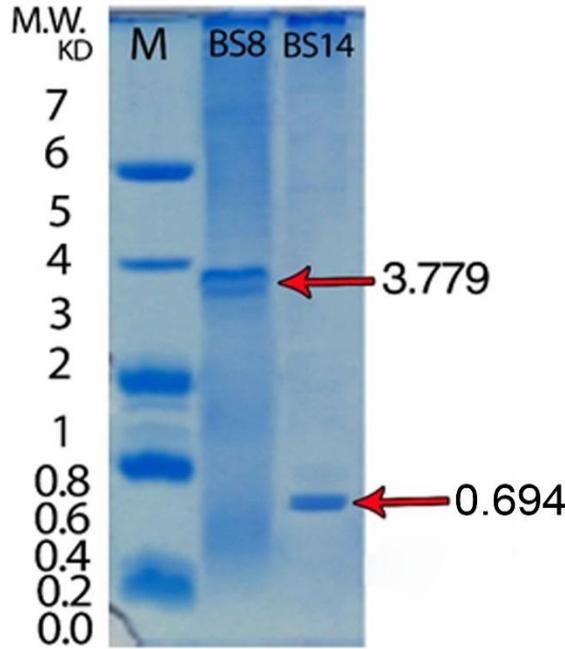
Compound Table

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-Cyclopentan-1-one, 2-hydroxy-3,4-dimethyl-	18.162	2-Cyclopentan-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

جدول 4. نتائج تحليل الأيوض الثانوية 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	C12H21NO4	C12H21NO4	C12H21NO4	10
Cpd 6: 6-Ethyl-4,5,7,8-tetrathiaundecane	20.362	6-Ethyl-4,5,7,8-tetrathiaundecane	C9H20S4	C9H20S4	C9H20S4	1



شكل 5. الرحلان الكهربائي للايوض الثانوية للعلزتين BS8 و BS14 على الهلام بوجود مادة SDS

(1) Marker ببتيد aproinin ذو الوزن الجزيئي 6.512 كيلو دالتون. (2) الأيوض الثانوية للعلزلة BS8 ذات وزن جزيئي 3.779 كيلو دالتون. (3) الأيوض الثانوية للعلزلة BS14 ذات وزن جزيئي 0.694 كيلو دالتون.

يبين جدول (5) الفعالية التضادية للأيوض الثانوية المنقاة للعلزتين BS8 و BS14 على التوالي إذ حصلت زيادة في الفعالية التثبيطية للأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* تجاه الأنواع العصوية الهدف مع كل خطوة من خطوات التنقية. أظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) في الفعالية التثبيطية بين عزلتي جنس *Bacillus* إذ تفوقت العزلة BS8 ($p < 0.05$) في فعاليتها التثبيطية ضد الأنواع العصوية الهدف، كما أظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) بين عزلات الأنواع العصوية الهدف إذ تفوقت بكتيريا *Kocuria kristinae* على باقي عزلات الأنواع العصوية الهدف في حساسيتها لمستخلص الأيوض الثانوية المنقاة لعزلتي جنس *Bacillus* عند مستوى ($p < 0.05$) في حين تفوقت بكتيريا *P. aeruginosa* على باقي عزلات الأنواع العصوية الهدف في مقاومتها لمستخلص الأيوض الثانوية المنقاة لعزلتي جنس *Bacillus* عند مستوى ($p < 0.05$). تتفق النتائج مع ما أشار إليه (Liu et al., 2018) أن الأيوض الثانوية 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 الأيوض الثانوية المنقاة لأنواع العصوية *Bacillus* أعلى منها في الراشح الخام لنفس السلالة عند تنميتها في المزارع البكتيرية السائلة، كما تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه كل من (Wiener and Horanyi, 2011; Delcoue, 2009) الذين ذكروا أن سبب كون التأثير التضادي للأيوض الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* ضد الأنواع العصوية الموجبة لصبغة غرام أعلى منه في الأنواع العصوية السالبة لصبغة غرام ربما يعزى إلى النفاذية المنخفضة للغشاء الخارجي للأنواع العصوية السالبة لصبغة غرام وكذلك وجود طبقة عديد السكريات الدهني lipopolysaccharide التي تمثل حاجزا ضد المركبات الكارهة للماء.

جدول (5) الفعالية التضادية للأيوض الثانوية المنقاة للعزلتين BS14 و BS8

قطر منطقة التثبيت (ملم)

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

— ظهور فروق معنوية عند مستوى ($p < 0.05$)

— الأرقام تمثل معدل قراءة ثلاث مكررات

5.3. تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) Minimum Inhibitory concentration للأيوض الثانوية ضد البكتيريا الهدف

يشير الجدول (6) الى نتائج تحديد التركيز المثبط الأدنى للأيوض الثانوية ضد البكتيريا الهدف إذ أشارت النتائج إلى أن مستخلصات الأيوض الثانوية لبكتيريا جنس *Bacillus spp.* أظهرت فعالية تضادية تجاه البكتيريا الموجبة ملون غرام أعلى منها تجاه البكتيريا السالبة ملون غرام إذ كانت قيم MIC للأيوض الثانوية للعزلة BS8 تجاه البكتيريا الموجبة ملون غرام هي (0.2، 0.4، 1.6) مايكروجرام/مل لكل من الأنواع *K. kristinae*، *MRSA* و *S. sciuri* على التوالي ومن الملاحظ أن النوع *K. kristinae* هو الأكثر تأثراً بالمستخلص، أما قيم MIC للأيوض الثانوية للعزلة BS8 تجاه البكتيريا السالبة ملون غرام فقد بلغت (1.6، 3.12) مايكروجرام/مل لكل من النوعين *P. aeruginosa* و *E. coli* على التوالي.

كانت قيم MIC للأيوض الثانوية للعزلة BS14 تجاه البكتيريا الموجبة ملون غرام هي (0.4، 8.0، 3.12) مايكروجرام/مل لكل من الأنواع *K. kristinae*، *MRSA* و *S. sciuri* على التوالي إذ كان النوع *K. kristinae* هو الأكثر تأثراً بالمستخلص، في حين بلغت قيم MIC للأيوض الثانوية للعزلة BS14 تجاه البكتيريا السالبة ملون غرام (6.25) مايكروجرام/مل لكل من النوعين *P. aeruginosa* و *E. coli*.

إن الفعالية التضادية التي أظهرتها هذه المستخلصات ضد البكتيريا الهدف كانت أعلى من الفعالية التضادية للمضادين الحيويين المستخدمين للمقارنة (التتراسايكلين وحمض النالديكسك) إذ بلغت قيمة MIC لحمض النالديكسك ضد أنواع البكتيريا الهدف الموجبة ملون غرام هي (312، 624، 1250) مايكروجرام/مل لكل من الأنواع *K. kristinae*، *MRSA* و *S. sciuri* على التوالي إذ كان النوع *K. kristinae* هو الأكثر تأثراً بالمضاد الحيوي، في حين بلغت قيمة MIC لحمض النالديكسك ضد أنواع البكتيريا الهدف السالبة ملون غرام هي (2500، 1250) مايكروجرام/مل لكل من النوعين *P. aeruginosa* و *E. coli* على التوالي، أما للتتراسايكلين فقد كانت قيمة MIC ضد أنواع البكتيريا الهدف الموجبة ملون غرام هي (20، 20، 40) مايكروجرام/مل لكل من الأنواع *K. kristinae*، *MRSA* و *S. sciuri* على التوالي إذ كان

النوعان *K. kristinae* ، *MRSA* هما الأكثر تأثراً بالمضاد الحيوي، في حين بلغت قيمة MIC للنتراسايكلين ضد أنواع البكتيريا الهدف السالبة للملون غرام هي (80، 40) مايكروجرام/مل لكل من النوعين *P.aeruginosa* و *E. coli* على التوالي، تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Das et al., 2008) الذين ذكروا أن الأيوض الثانوية المعزولة من البكتيريا البحرية تمتلك قابلية تشييطية عالية تجاه البكتيريا الممرضة خاصة الأنواع المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية وكذلك البكتيريا المسببة للمشاكل البيئية والصناعية.

جدول 6. نتائج تحديد التركيز المثبط الأدنى (مايكروجرام/مل) للأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* ضد البكتيريا الهدف

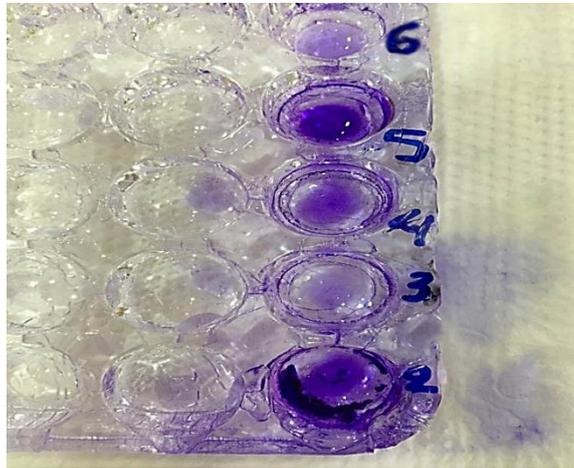
<i>K.kristinae</i>	<i>MRSA</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	العامل التضادي
					التركيز المثبط الأدنى (مايكروجرام/مل)
0.2	0.4	1.6	1.6	3.12	BS8
0.4	0.8	3.12	6.25	6.25	BS14
312	624	1250	1250	2500	Nalidixic acid
20	20	40	40	80	Tetracycline

6.3. التحديد الكمي للأغشية الحيوية *Quantitative determination of the biofilm*

يبين الجدول (7) نتائج تجربة التحديد الكمي للأغشية الحيوية التي كونتها البكتيريا الهدف في حفر الصفيحة المعيارية باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer، أظهرت النتائج وجود علاقة طردية بين حجم اللقاح البكتيري بالميكروليتر وامتصاصية الجهاز، أظهرت النتائج أن البكتيريا السالبة للملون غرام الأكثر انتاجاً للأغشية الحيوية هي *P. aeruginosa* في حين كانت بكتيريا *S. sciuri* هي البكتيريا الأكثر انتاجاً للأغشية الحيوية بين البكتيريا الموجبة للملون غرام، ويمثل الشكل (6) تكوين الأغشية الحيوية من قبل البكتيريا الهدف في الصفيحة إذ لوحظ أن تكوين بكتيريا *P. aeruginosa* للأغشية الحيوية كان على جوانب حفر الصفيحة بسبب كونها بكتيريا متحركة (العينة رقم 2) أما نمو بكتيريا *S. sciuri* فقد كونت الأغشية الحيوية في قعر حفر الصفيحة لأنها بكتيريا غير متحركة (العينة رقم 5). تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Yaryura et al., 2008) الذين اشاروا إلى كمية الاغشية الحيوية التي تكونها البكتيريا ترتبط عكسياً مع عدد الخلايا التي في طور الثبات، كما أشاروا إلى أن ظروف النمو التي تكون أقل من الظروف المثلى suboptimal conditions هي المفضلة لزيادة كمية الأغشية الحيوية المنتجة من قبل البكتيريا، كما تتفق مع ما توصل إليه (Sanchez et al., 2013) الذين أشاروا إلى أن القدرة على تكوين الأغشية الحيوية بكميات كبيرة تعتبر إحدى عوامل الضراوة للبكتيريا ووجدوا أن البكتيريا المقاومة للعوامل المضادة للميكروبات غالباً ما تتمتع بالقدرة على تكوين الأغشية الحيوية بكميات كبيرة.

جدول 7. قيم الامتصاصية للبكتيريا المكونة للأغشية الحيوية باستخدام صبغة البنفسجي البلوري

الامتصاصية عند 590 نانومتر					حجم اللقاح البكتيري (مايكروليتر)
<i>K. kristinae</i>	<i>sciuri S.</i>	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
0.172	0.328	0.311	0.522	0.661	0.1
0.180	0.442	0.423	0.598	0.788	0.2
0.450	0.687	0.641	0.714	0.823	0.4
0.734	0.756	0.722	0.823	0.903	0.8
0.953	0.879	0.838	0.917	1.122	1.6
1.007	1.034	1.113	1.395	1.872	3.12
1.595	1.611	1.564	2.479	2.231	6.25
2.131	2.543	2.468	3.215	3.446	12.50
2.954	3.204	3.094	4.686	4.290	25
3.466	4.923	4.876	5.324	5.304	50
4.817	5.295	5.201	6.033	6.112	100



شكل 6. تكوين الاغشية الحيوية من قبل البكتيريا الهدف في صفيحة المعايرة الدقيقة

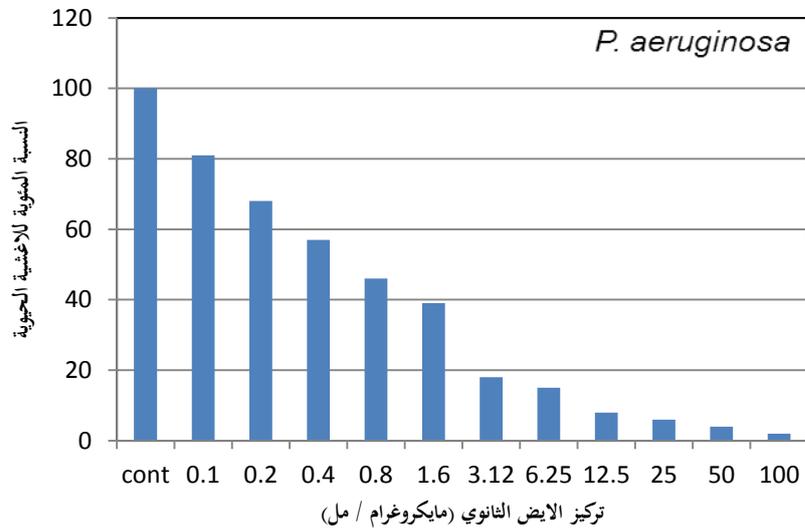
الارقام تمثل الأنواع: (2) *P. aeruginosa* (3) *E. coli* (4) MRSA (5) *S. sciuri*

(6) *K. kristinae*

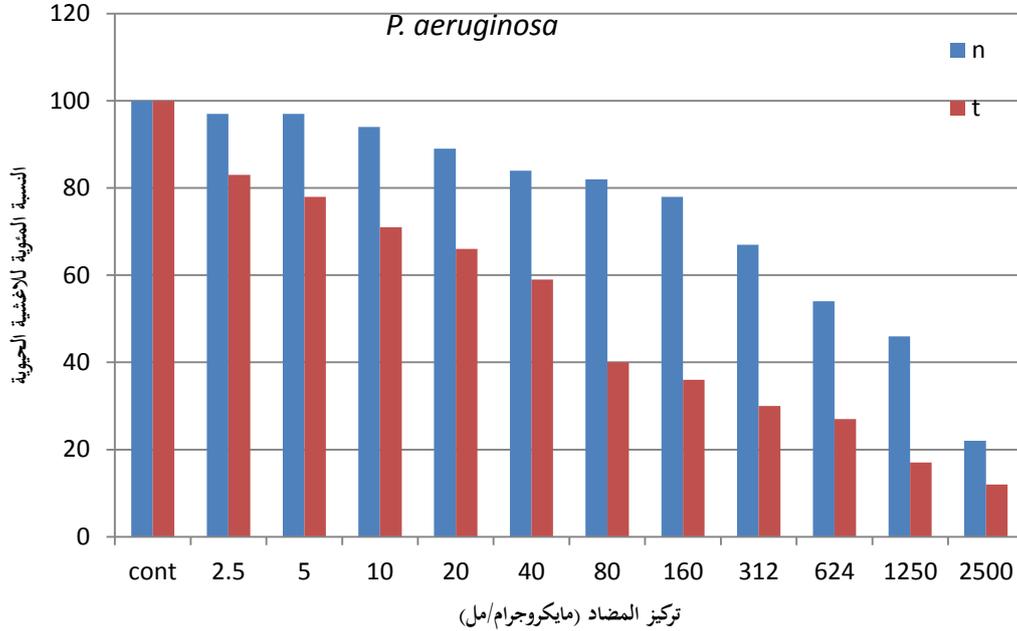
7.3. دراسة تثبيط تكون الأغشية الحيوية في صفيحة المعايرة الدقيقة Microtiter Plate

تشير الأشكال (7 الى 12) إلى نتائج دراسة تثبيط تكون الأغشية الحيوية للبكتيريا الهدف بفعل مستخلصي الأيوض الثانوية للعزلتين BS8 و BS14 في صفيحة المعايرة الدقيقة ومقارنتها بالتأثير التثبيطي للمضادين الحيويين حامض النالديكسك

والتتراسايكلين تجاه البكتيريا ذاتها إذ تم اختيار النوع *P. aeruginosa* بصفته النوع الأكثر إنتاجاً للأغشية الحيوية بين البكتيريا السالبة لملون غرام في حين اختير النوع *S. sciuri* بصفته النوع الأكثر إنتاجاً للأغشية الحيوية بين البكتيريا الموجبة لملون غرام، إذ يبين الشكل (7) نتائج تثبيط تكون الأغشية الحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* بعد الحضان مع الأبيض الثانوي للعزلة BS8 فيما يبين الشكل (8) نتائج تثبيط تكون الأغشية الحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* بعد الحضان مع الأبيض الثانوي للعزلة BS14، إذ يلاحظ في الشكل (7) أنه بالمقارنة مع عينة السيطرة والتي تمثل بكتيريا *P. aeruginosa* التي نمت في الصفيحة بدون إضافة مستخلصات الأيوض الثانوية وكونت الأغشية الحيوية بنسبة 100%، فقد كانت النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* التي نمت في الصفيحة مع إضافة مستخلصات الأيوض الثانوية تتناقص بزيادة تركيز مستخلص الأبيض الثانوي المضاف لعينة بكتيريا *P. aeruginosa* إذ بلغت النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية (81، 68، 57، 46، 39، 15، 18، 8، 6، 4، 2)% على التوالي وذلك عند حضان بكتيريا *P. aeruginosa* مع مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS8 بالتركيز (0.1، 0.2، 0.4، 0.8، 1.6، 3.12، 6.25، 12.5، 25، 50، 100) مايكروجرام/مل على التوالي، إذ لوحظ انخفاض ملموس في النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* عند حضانها مع المستخلص ابتداء من تركيز 3.12 مايكروجرام/مل والذي يمثل التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص ضد هذه البكتيريا إذ انخفضت النسبة المئوية من 39% عند التركيز 1.6 مايكروجرام/مل إلى 18% عند التركيز 3.12 مايكروجرام/مل، أي أن مقدار الانخفاض في النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية كان 21%.



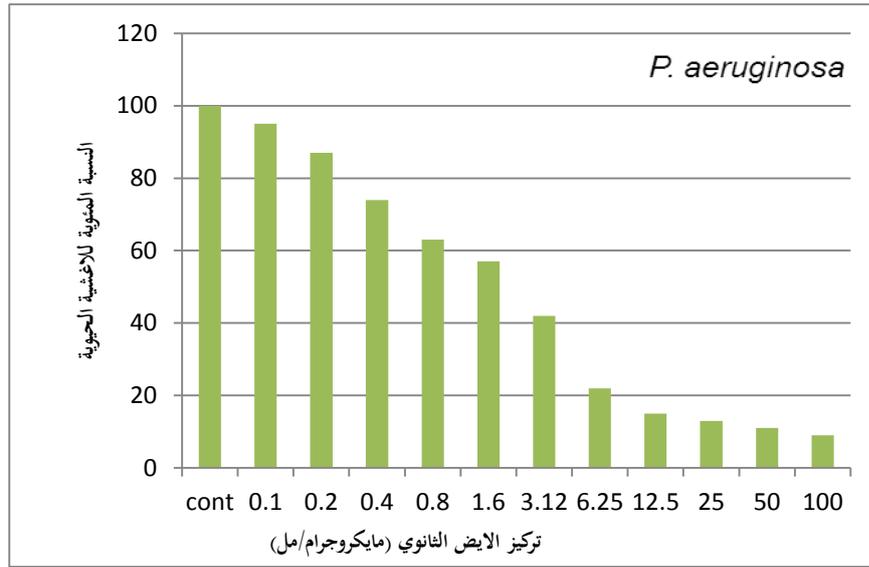
شكل 7. تثبيط تكون الأغشية الحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* بعد الحضان مع مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS8



شكل 8. تثبيط تكون الاغشية الحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* بعد الحضان مع مستخلص الايوض الثانوية للعزلة BS14

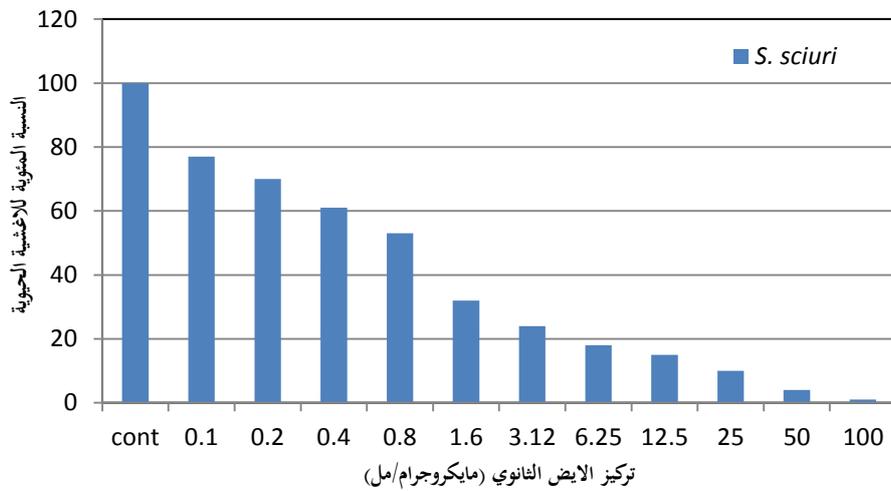
بين الشكل (8) أنه بالمقارنة مع عينة السيطرة والتي تمثل بكتيريا *P. aeruginosa* التي نمت في الصفيحة بدون إضافة مستخلصات الأيوض الثانوية وكونت الاغشية الحيوية بنسبة 100%، فقد كانت النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* التي نمت في الصفيحة مع إضافة مستخلصات الأيوض الثانوية تتناقص بزيادة تركيز مستخلص الأيوض الثانوي المضاف لعينة بكتيريا *P. aeruginosa* إذ بلغت النسبة المئوية (95، 87، 74، 63، 57، 42، 22، 15، 13، 11، 9) على التوالي وذلك عند حضان بكتيريا *P. aeruginosa* مع مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS14 بالتركيزات (100، 50، 12.5، 25، 6.25، 3.12، 1.6، 0.8، 0.4، 0.2، 0.1) مايكروجرام/مل على التوالي، إذ لوحظ انخفاض ملموس في النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* عند حضانها مع المستخلص ابتداء من تركيز 6.25 مايكروجرام/مل والذي يمثل التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص ضد هذه البكتيريا إذ انخفضت النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية من 42% عند التركيز 3.12 مايكروجرام/مل إلى 22% عند التركيز 6.25 مايكروجرام/مل من المستخلص مما يدل على أن مقدار الانخفاض في النسبة المئوية لقدرة النوع *P. aeruginosa* كانت 20%.

يتضح من مقارنة الشكلين (7) و (8) ان التأثير التثبيطي لمستخلص الايوض الثانوية للعزلة BS8 في النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* اعلى من التأثير التثبيطي لمستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS14 في النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في البكتيريا ذاتها.



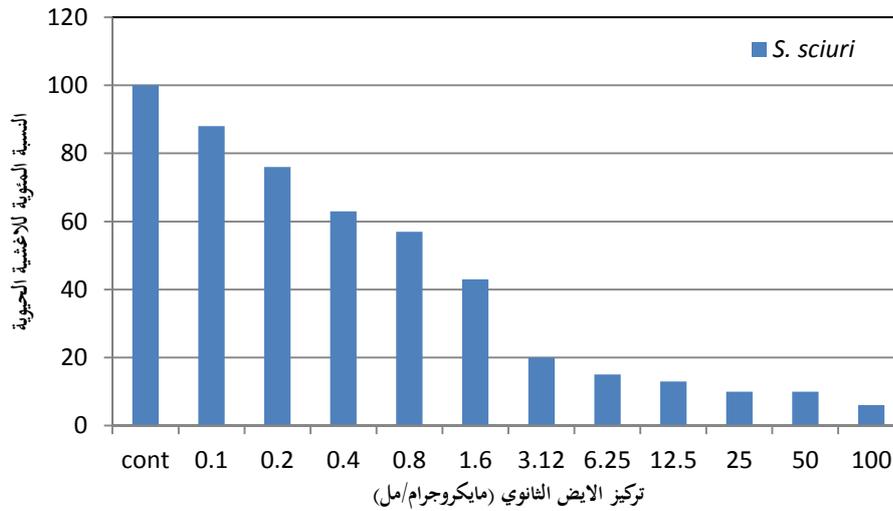
شكل 9. تثبيط تكون الاغشية الحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* بعد الحضان مع المضادين الحيويين حامض النالديكسك n (الاعمدة الزرقاء) والتتراسايكلين t (الاعمدة الحمراء)

أما نتائج التأثير التثبيطي للمضادين الحيويين التتراسايكلين (t) وحامض النالديكسك (n) في النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* والموضحة في الشكل (9) فقد كانت أقل نسبياً من نتائج التأثير التثبيطي للمستخلصين في نفس البكتيريا، إذ بالمقارنة مع عيني السيطرة للمضادين كان التناقص في النسب المئوية لقدرة بكتيريا *P. aeruginosa* على تكوين الأغشية الحيوية قليلاً نسبياً مع تزايد تراكيز المضادين الحيويين إلا عند قيمة MIC لكلا المضادين وهي 80 و 2500 مايكروجرام/مل للتتراسايكلين وحامض النالديكسك على التوالي إذ بلغت (40% و 22%) على التوالي، كما يلاحظ من الشكل (9) أن التأثير التثبيطي للتتراسايكلين ضد بكتيريا *P. aeruginosa* أعلى من التأثير التثبيطي لحامض النالديكسك ضد البكتيريا نفسها.



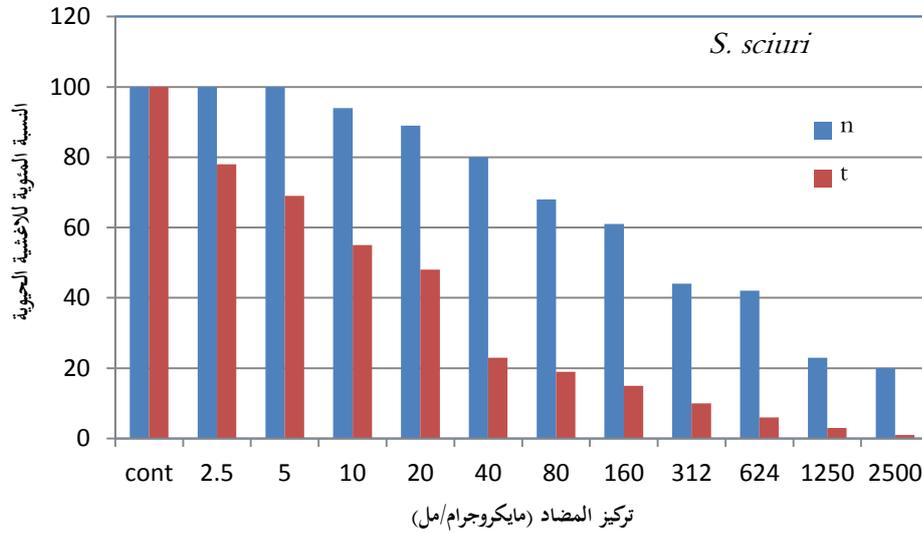
شكل 10. تثبيط الاغشية الحيوية لبكتيريا *S. sciuri* بعد الحضان مع مستخلص الايوض الثانوية للعلزلة BS8

يوضح الشكل (10) نتائج دراسة تثبيط تكون الأغشية الحيوية لبكتيريا *S. sciuri* بعد الحضانة مع الأيوض الثانوي للعزلة BS8 إذ أنه بالمقارنة مع عينة السيطرة (100%) كان تأثير مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS8 في هذا النوع أعلى مما هو عليه الحال في بكتيريا *P. aeruginosa*، إذ كانت النسب المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *S. sciuri* (77، 70، 61، 53، 32، 24، 18، 15، 10، 4، 1%) عند حضانة بكتيريا *S. sciuri* مع مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS8 بالتركيزات (0.1، 0.2، 0.4، 0.8، 1.6، 3.12، 6.25، 12.5، 25، 50، 100) مايكروجرام/مل على التوالي إذ لوحظ انخفاض النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية عند قيمة MIC وهي 1.6 مايكروجرام/مل إذ بلغت 32%.



شكل 11. تثبيط تكون الأغشية الحيوية لبكتيريا *S. sciuri* بعد الحضانة مع مستخلص الأيوض الثانوي للعزلة BS14

يبين الشكل (11) نتائج دراسة تثبيط تكون الأغشية الحيوية لبكتيريا *S. sciuri* بعد الحضانة مع الأيوض الثانوي للعزلة BS14 إذ أنه بالمقارنة مع عينة السيطرة (100%) كان تأثير مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS14 أعلى مما هو عليه الحال في بكتيريا *P. aeruginosa*، إذ كانت النسب المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في بكتيريا *S. sciuri* (88، 76، 63، 57، 43، 20، 15، 13، 10، 10، 6%) عند حضانة بكتيريا *S. sciuri* مع مستخلص الأيوض الثانوية للعزلة BS14 بالتركيزات (0.1، 0.2، 0.4، 0.8، 1.6، 3.12، 6.25، 12.5، 25، 50، 100) مايكروجرام/مل على التوالي إذ لوحظ انخفاض النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية عند قيمة MIC وهي 3.12 مايكروجرام/مل إذ بلغت 20%.



شكل 12. تثبيط تكون الأغشية الحيوية لبكتيريا *S. sciuri* بعد الحضانة مع المضادين الحيويين حامض النالديكسك (*n* الأعمدة الزرقاء) والتتراسايكلين (*t* الأعمدة الحمراء)

يبين الشكل (12) نتائج تثبيط تكون الأغشية الحيوية لبكتيريا *S. sciuri* بعد الحضانة مع المضادين الحيويين حامض النالديكسك والتتراسايكلين إذ يلاحظ من الشكل أن الإنخفاض في النسب المئوية لتكوين الأغشية الحيوية عند الحضانة مع المضادين الحيويين أقل من الإنخفاض في النسب المئوية عند الحضانة مع مستخلصي الأيوض الثانوية للعتلتين BS14 و BS8 وقد لوحظ حصول انخفاض كبير في النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية عند قيمة MIC للمضادين وهي (40، 1250) مايكروجرام/مل لكل من التتراسايكلين وحامض النالديكسك على التوالي إذ بلغت النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية (23%)، على التوالي.

أظهرت النتائج أعلاه أن النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية في البكتيريا الهدف التي نمت في الصفيحة قد تناقصت بزيادة تركيز مستخلص الأيوض الثانوي للعتلة BS8 المضاف لها، إذ لوحظ انخفاض حاد في النسبة المئوية لتكوين الأغشية الحيوية للبكتيريا الهدف عند حضانة مع المستخلص ابتداء من التركيز الذي يمثل التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص ضد هذه البكتيريا، أما نتائج التأثير التثبيطي للمضادين الحيويين فقد كانت أقل نسبياً من نتائج التأثير التثبيطي للمستخلص إذ بتزايد تراكيز المضادين الحيويين كان الفرق في النسب المئوية للتناقص قليلاً نسبياً إلا عند قيمة MIC لكلا المضادين.

تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Sriram et al., 2011) الذين ذكروا أن الأيوض الثانوية المنتجة من بكتيريا *Bacillus cereus* تثبط نمو الأغشية الحيوية للبكتيريا الهدف من خلال منع التصاقها على سطح صفيحة المعايرة الدقيقة مما أدى إلى منع تكون هذه الأغشية. ويمكن تفسير هذه النتائج مع ما سجله (Abu Sayem et al., 2011) والذين أرجعوا قدرة الأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus licheniformis* على تثبيط تكون الأغشية الحيوية للبكتيريا الهدف إلى عدة أسباب منها أن هذه الأيوض الثانوية تتداخل مع المركبات الموجودة على سطح البكتيريا الهدف لتعيق اتصال خلايا البكتيريا الهدف فيما بينها مما يمنع وصول أعداد خلايا البكتيريا الهدف إلى العدد المطلوب لتكوين الأغشية الحيوية وهو ما يدعى بادراك النصاب quorum

sensing، أو أن هذه الأيوض تستطيع تحويل الصفات الفيزيوكيميائية والترتيب الهندسي للسطح الخارجي للبكتيريا المكونة للأغشية الحيوية وهذه الظاهرة شبيهة بآلية فعل بعض المضادات الحيوية، كما يمكن القول أن النتائج تتفق مع ما توصل إليه (Dusane *et al.*, 2013) الذين أشاروا إلى صور المحرر الإلكتروني أظهرت أن التأثير التثبيطي للأيوض الثانوية لبكتيريا *Bacillus* تمثل في إزالة طبقة EPS الضرورية لتثبيت الغشاء الحيوي وتحديد شكله الهندسي والتي ربما تمنح الغشاء الحيوي صفة مقاومة المضادات الحيوية والمبيدات.

تتفق النتائج المستحصلة في هذه الدراسة مع ما توصل إليه (Cherif *et al.*, 2008) الذين أشاروا إلى الببتيدات المستخلصة من الأيوض الثانوية لأعضاء جنس العصوية *Bacillus* تتمتع بالعديد من الصفات التي تجعلها خياراً مثالياً لاستخدامها بصفاتها عوامل سيطرة إحيائية من الممكن استخدامها في القضاء على العديد من الميكروبات المسببة للعديد من الأمراض والمشاكل البيئية.

كما تنسجم الدراسة مع توصل إليه (Sriram *et al.*, 2011) الذين أشاروا إلى أن الببتيدات الدهنية المنتجة من قبل أفراد جنس *Bacillus* أظهرت فعالية تثبيطية عالية ضد البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية مما يؤهلها لتكون أحد العلاجات الناجعة لهذه المشكلة البيئية المستعصية.

المراجع

- Abu Sayem S.M., Manzo E., Ciavatta L., Tramice A., Cordone A., Zanfardino A., De Felice M., and Varcamonti M. (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 10: 74- 81.
- 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.
- Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., and Boudabous A. (2008). Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. *Microbiol Res.*, 163(6): 684- 692.
- 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.
- Das P., Mukherjee S., and Sen R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.*, 104(6): 1675-1684.

- 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.
- Gordillo M.A., and Maldonado M.C. (2012). Purification of peptides from *Bacillus* strains with biological activity. Chapter 11, pp: 201-224. In: *Chromatography and its applications*. Dhanarasu, S.(ed.). Publisher InTech. ISBN: 978-953-51-0357-8
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural protein 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(2): 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*. Published online:19 February2018,7p <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. *Songklanakarinn 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. doi:10.1007/s00203-007-0257-2.
- O'Toole G.A. (2011). Microtiter dish formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47: 1-2.
- PHE: Public Health England (2015). UK standards for microbiology investigation; identification of *Bacillus* species. 3: 1- 27.
- Pincus D.H. (2005). *Microbial identification using the VITEK® 2 bioMérieux system bioMérieux Hazelwood*. MO, USA.

- Priest F., Aquino de Muro M., and Aji D. (1995). Systematics of insect pathogenic Bacilli uses in strain identification and isolation of novel pathogens. p: 275- 295. In: *Bacterial Diversity and Systematics*. Priest F., Ramos-Cormenzana A., and Tindaall B. (eds.). Plenum Press, New York, USA.
- 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.
- Sanchez C.J. Jr., Mende K., M.L., Akers, K.S., Romano, D.R., Wenke, J.C., and Murray, C.K. (2013). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.*, 13(1): 47.
- 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.
- 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 Phytopathol. Plant Protection*, 43(16): 1636-1642.
- 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.
- Sriram M.I., Kalishwaralal K., Deepak V., Gracerosepat 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 and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2): 174-181.
- 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* sub sp. *spizezinii* showing inhibitory activity towards *Haemophilus parasuis*. *Microbiology*,159(Pt 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.
- 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.



Yaryura P.M., Leon M., Correa O.S., Kerber N.L., Pucheu N.L., and Garcia A.F.(2008). Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyliquefaciens* BNM 339. *Curr. Microbiol.*, 56(6): 625-632.