

قدرة بعض أنواع البكتريا الخيطية و العصوية المكونة للسبورات الداخلية على إنتاج مضادات حيوية

إسراء غانم حازم السمك
أوس إبراهيم سليمان
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل – العراق

الخلاصة

درست قدرة (٣٥) عزلة من التربة تابعة لأنواع من البكتريا الخيطية والبكتريا المكونة للسبورات الداخلية والعائدة لأنواع *Thermoactinomyces intermedius* و *Thermoactinomyces vulgaris* و *Bacillus mycoides* و *Paenibacillus* spp. على إنتاج مضادات حيوية ضد بعض الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة كرام. *Corynebacterium* spp. و *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* و *subsp. Aureus* والسالبة لصبغة كرام *Klebsiella oxytoca* و *Klebsiella* spp. و *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa*. فصل المضاد الحيوي من ثلاث عزلات اعطت اعلى فعالية ضد الانواع قيد الدراسة ، عزلتين تابعة للنوع *Paenibacillus* spp. وعزلة تابعة للنوع *B. mycoides* باستخدام كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة. إذ حددت البقع باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV) واستخلص المضاد من البقع و قيس معدل الجريان (R_f (Running Factor) و طيف الامتصاص بالـ UV مقارنة بالمضادات القياسية. أظهرت العزلة التابعة للنوع *Paenibacillus* spp. $R_f = 0,42$ ، وأعلى امتصاصية عند الطول الموجي = ٢٠٠ مما يدل على أن المضاد تابع لمجموعة Tetracycline بينما أظهرت العزلة الثانية التابعة للنوع نفسه $R_f = 0,87$ وطول موجي ٢٠٠ نانوميتر مما يدل على أن المضاد تابع لمجموعة β -Lactame وأظهرت العزلة التابعة للنوع *B. mycoides* $R_f = 0,63$ وطول موجي ٢٠٠ نانوميتر مما يدل على ان المضاد المنتج تابع لمجموعة بيتا لاكتام أيضاً إن ظهور أكثر من بقعة عند الفصل قد يعود ربما إلى إنتاج البكتريا لمؤيذات ثانوية أخرى أو أن المضاد واسع الطيف إذ قد تكون البكتريا منتجة لأكثر من مضاد حيوي ، أظهرت العزلات التابعة للنوع *Thermoactinomyces intermedius* وعزلات النوع *Thermo. vulgaris* تأثيراً ضعيفاً في الأنواع قيد الدراسة.

المقدمة

إن أفراد جنسي *Paenibacillus* و *Bacillus* هوائية أو لاهوائية إختيارياً خلاياها عصوية مكونة عائلة Paenibacillaceae بينما ضمت عائلة Bacillaceae جنس *Bacillus* والجنس الجديد *Thermoactinomyces* الذي تمتاز خلاياها بكونها خيطية مكونة للسبورات الداخلية في كل من الغزل لهوائي والمشباهة لسبورات العصيات في مقاومتها للحرارة لامتلاكها لأيون الكالسيوم و حامض (Prescott) Dipicolinic .

من البكتريا المكونة للسبورات على إنتاج مضادات حيوية ومنها *Paenibacillus polymyxa* تجة لمجموعة من المضادات وهي ، فضلا عن إنتاجها مضادات للفطريات مثل Seldin) Polymxin, Gatavalin, Fusaricidin, Gavaserin and Saltavalin and Reynaldi

كما تم تشخيص عدد من المضادات البكتيرية والفطرية مثل Polymyxin Bacillomycin المنتجة من بعض الأنواع التابعة لجنسي *Paenibacillus* و *Bacillus* (Chung) . امتازت البكتريا الخيطية المحبة للحرارة *Thermoactinomyces* عن قدرتها للبكتريا بإنتاجها (Lemriss) .

استخدام العلاجات الجديدة المضادة للحياة المجهريّة الممرضة اصبح ملحا مع زيادة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية *Staph. aureus subsp. aureus* بامراضيتها المختلفة | تعد من الجراثيم طبيعية التواجد على الأغشية المخاطية | المسببات الرئيسية لعدوى المستشفيات (Nosocomial infection) بسبب مقاومة أكثر من تاريخ تسلم البحث / / و قبوله / /

% *Staph. aureus subsp. aureus* للمضادات الحيوية منها البنسلين ومشتقاته
% Methicillin Oxacillin أظهرت % هذا النوع من عدوى المستشفيات

زيادة في مقاومة لمضاد الحيوي Methicillin (MRSA) أظهرت
 Bacillus cereus (Jr) Vancomycin (VRSA) ومنها النوع
 Amoxicillin Ampicillin Bacillus cereus
 Cephalosporins لاسيما المسببة منها لعدوى المستشفيات)
 Brooks .

أظهر العديد من *Corynebacterium* الانتهازية الممرضة
 مرضية مختلفة و بيعية التواجد على الجهاز التنفسي العلوي
 Penicillin Ampicillin (*Klebsiella spp.*)
 المسببة لعدوى المستشفيات والمعزولة من الحروق والجروح بمقاومتها
 Cefotazidime Tetracycline ,
 للمضاد الحيوي Imipenem Ciprofloxacin (*Pseudomonas aeruginosa*)
 ولزيادة مقاومة البكتيريا الممرضة للمضادات الحيوية الحاجة الملحة لاستخدام مضادات حيوية جديدة
 تشخيص مضادات حيوية منتجة من اع بكتيرية مكونة للسبورات الداخلية.

مواد البحث و طرائقه

الأحياء مجهرية:
Thermoactinomyces Bacillus (*Paenibacillus*)
 قدرتها على
 مضادات حيوية ضد بكتريا
Bacillus Corynebacterium spp.
Klebsiella spp. *Staphylococcus aureus subsp. aureus cereus*
Pseudomonas aeruginosa Proteus mirabilis Klebsiella oxytoca
 اعتمادا على طريقة (Waksman)
 بشكل خط مستقيم وسط الطبق
 لآكار الصويا المضاف له % كليسروم لتنمية العزلات التابعة لجنس *Thermoactinomyces*
 ظهور النمو البكتيري بشكل غزير - أيام و
 بكتريا الاختبار بشكل ثمانية خطوط متعامدة على خط التلقيح وسط الطبق ومن كلتا الجهتين و حضنت

Bacillus Paenibacillus

أيضاً بشكل خط مستقيم وسط
 خطوط متعامدة على خط التلقيح الرئيس و حضنت في درجة حرارة
 إنتاج المضاد الحيوي: فصل المضاد الحيوي اعتماداً على طريقة Ilic
 نواع من بكتريا الاختبار
 اعطت اكبر مناطق تثبيط

نفسه

الظروف في جهاز الهزاز بقوة / دقيقة ايام.
 للتخلص من الخلايا البكتيرية بوساطة ترشيع اعتيادية Whatmann
 No1 وأضيف المذيب العضوي n-butanol ethyl acetate :
 المذيب / المزيج
 طبقة المائية عن الكحولية بو
 - أيام للتجفيف الجاف من كلتا الطبقتين وأذيب
 المقطر المعقم وأذيب الكحولي بنفس المذيب المستخدم وغمست بهم ترشيع بقطر
 للتحري عن إنتاج المضاد الحيوي.
 تم استخدام طريقة لقتل الخلايا البكتيرية و لمزيج
 الحيوبي الذائب بالماء و عن فعالية المضاد المنتج

لفصل المضادات الحيوية المتبقية أتبعنا طريقة Ugur Sahin () السيلكا
 (×) . مليون باستخدام المذيب بيوتانول : الخليك : acetic acid :
 water: butanol (: :) لسيطرة وهي Ampicillin Penicillin
 Running Factor (R_f) UV و قيست المسافة التي قطعها البقع أظهرت
 Amoxicillin Tetracycline Erythromycin

تحديد البقع ثم إزالتها وإذابتها
 من الميثانول ورسبت للتخلص من السيلكا وقيس طيف
 جهاز المطياف (Cecil Model: Ce 1021) فوق البنفسجية.
 بالاعتماد على طريقة Vandepite () درست حساسية
 الحيوي الحيوية:

Augmantin 30mg, Ampicillin 75mg and Amoxicillin 30mg.

النتائج و المناقشة

Thermoactinomyces Bacillus

البكتيرية الموجبة و

مضادات حيوية ضد عدد

ضحها

Paenibacillus

أظهرت تأثيرات



يوي تبط نمو الأنواع البكتيرية .

Paenibacillus spp.

() :

الجدول () : قدرة أنواع البكتريا المكونة للسبورات الداخلية على إنتاج مضادات حيوية ضد بعض أنواع البكتيريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام.

النوع البكتيري المنتج	<i>Pseudo. aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Paenibacillus spp.</i>	-	-	-	-	+++	-	+
<i>Paenibacillus spp.</i>	-	-	-	-	+	-	++
<i>Paenibacillus spp.</i>	++	+++	+++	-	++	++	++
<i>Paenibacillus spp.</i>	++	+	+	+	-	++	++
<i>Paenibacillus spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus spp.</i>	-	+++	+++	-	-	++	-
<i>Paenibacillus spp.</i>	+++	+	+	++	+	++	+

++	+	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
+	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
+	+	-	-	-	++	+	<i>Bacillus mycoides</i>
++	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
++	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
+	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
-	+	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
-	-	+	+	+	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
-	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus mycoides</i>
-	+	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus mycoides</i>
+	+	-	+	-	-	-	<i>Thermoactinomyces intermedius</i>
-	-	+	+	+	-	+	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	+	+	-	+	-	-	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	-	+	+	+	-	-	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
+	-	+	+	+	-	+	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	+	+	+	+	-	-	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	-	+	+	+	+	-	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	-	-	-	+	-	-	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	-	-	-	-	-	-	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	+	+	+	+	-	+	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	+	+	+	+	-	+	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
-	-	+	+	+	-	-	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>

مسافة التنشيط او انعدام النمو

. () Shimizu \geq =+++ - =++ - =+ > = -/+

إذ أظهرت السلالات التابعة للنوع *Thermoactinomyces intermedius* أقل تأثيراً. اختير اثنين من النوع *Paenibacillus spp.* *Thermoactinomyces vulgaris*

Bacillus mycoides التي أعطت أعلى تأثيراً في الأنواع قيد الدراسة. طريقة Ilic () n-butanol ethyl acetate لامتزاجه مع الراشح المائي للمزرعة البكتيرية وصعوبة فصله كطبقة كما أن المضاد لم يفصل بطبقة n-butanol وعليه فقد أعيدت التجربة و استخدم فقط الراشح الزراعي المائي مع إضافة الكلوروفورم ظهر الراشح بعد التجفيف بلون بني مصفر و الذي اظهر تأثير في الأنواع قيد الدراسة مما يدل على انفصال المضاد في الطبقة المائية. دراسة للباحثين Augustine () ظهر اختلاف في قابلية المضاد المنتج على الذوبان بالمذيبات العضوية المختلفة هو مشابه لدراستنا حيث أن المضاد لم يستخلص بالمذيب العضوي وتم استخدام

أظهر النوعان *Bacillus mycoides* *Paenibacillus* spp. Penicillin Ampicillin Amoxicillin وانطلاقاً من الحقيقة العلمية كون البكتريا المنتجة للمضاد الحيوي تكون مقاومة له (Waksman) واعتماد على قيمة الـ R_f مقارنة بمضادات البيتا لاكتام والتي أظهرت معدل جريان مقارنة لمعدل الجريان للمضادات المستخلصة الموضحة في الجدول () وأعلى امتصاصية عند الطول الموجي نانوميتر. مما يدل على أن المضاد المنتج غالباً يعود لمجموعة بيتا لاكتام ، بينما المضاد المنتج من العزلة التا *Paenibacillus* spp. والتي أظهرت R_f Tetracycline غالباً يعود لهذه المجموعة.

() : قيم معدل الجريان R_f للمضادات المفصولة بكرماتوكرافيا الطبقة الرقيقة

R_f		R_f	
,	Tetracycline	,	<i>Paenibacillus</i> spp.
,	Amoxicillin	,	<i>Paenibacillus</i> spp.
-	Erythromycin	,	<i>Bacillus mycoides</i>
		,	Penicillin(control)

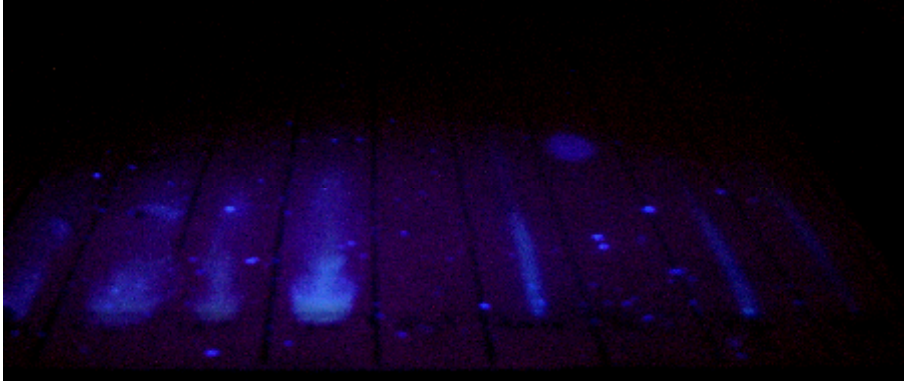
يتضح $R_f =$ ، متصاصية R_f أنها نانوميتر *Paenibacillus* spp. بينما ظهر $R_f =$ ، متصاصية عند نانوميتر Tetracycline *Paenibacillus* spp. مما يدل على انه يعود لمجموعة بيتا لاكتام *Bacillus mycoides* الذي اظهر $R_f =$ ، متصاصية نانوميتر ، يدل على انه يعود البيتا نفسها *Paenibacillus* spp. (Mascaretti) Carbapenems Monobactams Penicillins Cephalosporins استخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة و

ظهرت الأشعة فوق البنفسجية () المضاد واسع الطيف Ilic () . *Paenibacillus* spp. Chung () فطرية وبكتيرية وهذا مشابه لدراستنا إذ أظهرت اغلب العزلات تأثيراً تثبيطياً على أنواع بكتيرية موجبة

Paenibacillus spp. أعلى فعالية وهو مطابق لدراسة (Seldin)

() *P. polymyxa* من إظهار فعالية ضد *Micrococcus* spp. *Corynebacterium* spp. ومنها *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Proteus* spp. إضافة لتثبيطها عدد من الفطريات وبهذا تعد منتجة

للمضادات واسعة الطيف وقد يكون المضاد المنتج مختلف عن المضادات التي تنتج عادة من النوع *P. polymyxa* وقد تبين من خلال الدراسات التطفيرية على هذه العزلة إنها *Polymyxin* و هذه النتيجة قد وضحت أيضا من قبل Zuber Nakana () إذ أظهرت *Bacillus subtilis* إنتاجها لأكثر من مضاد و تعد من المضادات الواسعة الطيف والتي قد تكون الحل لتثبيط الأنواع البكتيرية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية (Ugur Sahin).



() :مناطق انفصال المضاد الحيوي بكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة

THE ABILITY OF SOME ENDO-SPORE FORMING ACTINOMYCES AND BACILLI TO PRODUCE ANTIBIOTICS

Essra Gh. H. Al-Sammak

Aws Ibrahim Sulaiman

Department of Biology / College of Science / University of Mosul - Iraq

ABSTRACT

The ability of 35 isolates from soil which belong to the endo-spore forming bacteria *Thermoactinomyces vulgaris* , *Thermoactinomyces intermedius* , *Bacillus mycoides* and *Paenibacillus* spp. to produce antibiotics against some gram positive bacteria *Corynebacterium* spp. , *Staphylococcus aureus* subsp.aureus , *Bacillus cereus* and gram negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* , *Proteus mirabilis* , *Klebsiella oxytoca* , *Klebsiella* spp. were card out , The antibiotics separated from three strains which gave highest activity against bacteria under study, two strains from *Paenibacillus* spp. and one strain form *B.mycoides*, by using thin-layer Chromatographic technique , the spots distinguished by UV and Running factor (R_f) compared with standard antibiotics , The extracted antibiotics from spots were measured by UV spectrophotometry The maximum absorbance of antibiotic extracted from *Paenibacillus* spp. was 200 nm and $R_f = 0.42$ which belong to Tetracycline group , while the extracted antibiotic from the second strain which belong to the species and gave $R_f = 0.87$ and maximum absorbance at 200nm so ,which indicate this antibiotic belong to the β -Lactams also the antibiotic extracted from the strain belong to *Bacillus mycoides* developed $R_f = 0.63$ and 200nm which appearance this antibiotic belong to β -Lactams group. The presence more than one spots on TLC plate may indicate that the bacteria had produced other secondary metabolites or the antibiotic is broad spectrum and produced more than one antibiotic. Strains which belong to species *Thermoactinomyces intermedius* and *Thermoactinomyces vulgaris* had a weak effect against the bacteria under the study.

() . دراسة تصنيفية لمجموعة البكتيريا الخيطية . كلية العلوم .

() . التصنيف العددي بالتحليل العنقودي لأنواع من البكتيريا الخيطية المحبة

Thermoactinomyces مقارنة بأنواع من الجنس *Bacillus* *Paenibacillus* .

علوم الرافدين . () : - . دراسة بكتريولوجية للحروق ، العمليات الجراحية و لميات الطارئة في مدينة الموصل وأمكانية علاجها بالملتقم البكتيري . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة تكريت .

Augustine, S. K. ; S. P., Bhavsar and B. P. , Kapadnis (2005). Anon-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* 23. J. Bio.Sci., 30(2): 201-211.

Brooks, G. F. ; K. C. , Carroll ; J. S., Butel and S. A. ,Morse (2007). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology . 24th ed. McGraw Hill Companies.

Chung, Y. R. ; C. H. , Kim ; I. , Hwang and J., Chun (2000). *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces antiurin like antifungal compound. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. So. : 1495 – 1500.

Ilic, S. B. ; S. S. , Konstantinovic and Z. B. , Todorovic (2005). UV/ VIS analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. Medicine and Biology, 12(1) : 44-46.

Jr , W , W. ; S. , Allen ; W., Janda ; E. ,Koneman ; G. , Procop ; P. , Schreckenberger, and G. ,Woods (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins.

Lemriss, S. ; F., Laurent ; A. , Couble ; E. , Casoli ; J. M., Lancelin ; D. S., Bonaccio ; S. , Rifai ; A., Fassouane and P. , Boiron (2003). Screening of non polygenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Can. J. Microbiol., 49:669-674.

Mascaretti, O. (2003). Bacteria Versus Antibacterial Agents: an integrated Approach. ASM Press. Pp., 98-99

Nakano, M. M. and P., Zuber (1990). Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus* . Critical Reviews in Biotechnology . 10: 223-240.

Prescott, L. M. ; J. P., Harley and D. A., Klein (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill Companies Inc. New York. Pp. S03-S19.

Reynaldi, F. J. ; M. R., Giusti and A. M. , Alippi (2004). Inhibition of the growth of *Ascosphaera apis* by *Bacillus* and *Paenibacillus* strains isolated from honey. Revista Argentina de Microbiologia. , 36 : 52-55.

Sahin, N. and A., Ugur (2003). Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. Turk. J. Biol., 79-84.

Seldin, L.; F. S., Azevedo; D. S., Alviano; C. S., Alviano and M. S., Freire Bastos (1999). Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE 2 against human pathogenic micro-organisms. Letters in Applied Microbiology. 28: 423-427.

Shimizu, M; Y., Nakagawa; Y., Sato, T.; Furumai; Y.; Igarashi; H., Onaka; R., Yoshida and H., Kunoh.(2000). Studies on entophytic Actinomycetales (1) *Streptomyces* sp. Isolated from *Rhododendrom* and antifungal activity . J. Gen. Plant. Pathol., 66: 360-366.

Vandepitte, J.; K., Engbaek; P., Piot and C. C., Heuck. (1991). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. World Health Organization. Geneva. Pp.84-90

Waksman, S. A. (1967). The actinomycetes A summary of current knowledge. Roland Press Company. USA. pp. 194-247.