استخلاص وتنقية المستقلبات الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* spp. ودراسة خواصها التثبيطية ضد بعض أنواع البكتيريا

إيمان عبدالله الإمارة[1] و غيداء جاسم الغزاوي[2]

(1) مركز علوم البحار، جامعة البصرة، البصرة، العراق
(2) كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة البصرة، البصرة، العراق

استلام 22 مايو 2018م - قبول 13 اكتوبر 2018م

الملخص

نظرا لازدياد شيوع صفة مقاومة المضادات الحيوية بين البكتيريا اتجه الاهتمام إلى البحث عن مواد فعالة حيويا يكون مصدرها بكتيريا غير ممرضة ومنتشرة في البيئة؛ لهذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى تنقية المستقلبات الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus species* المعزولة محليًا ودراسة خواصها التثبيطية ضد بعض أنواع البكتيريا إذ جمعت خمسون عينة مياه وترسبات من مناطق مختلفة في محافظة البصرة في جنوب العراق وعزلت منها عشرون عزلة من بكتيريا العصوية *Bacillus*. أُنتجت واستخلصت المستقلبات الثانوية لعزلات بكتيريا جنس العصوية *Bacillus*، واختيرت العزلتان الأكثر إنتاجًا للمستقلبات الثانوية وسميتا BS8 وBS14 لإكمال البحث إذ نُقّي مستخلصا المستقلبات الثانوية للعزلتين وقد أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي أن الوزن الجزيئي لمستخلص المستقلبات الثانوية للعزلة BS8 كان (3779) دالتون فيما بلغ الوزن الجزيئي لمستخلص المستقلبات الثانوية المنتجة من العزلة BS14 (379) دالتون ما يدل على أنها ببتيدات منخفضة الوزن الجزيئي. اختبرت الفعالية التثبيطية للمستقلبات الثانوية ضد 5 أنواع بكتيرية موجبة وسالبة لصبغة غرام إذ أظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) في الفعالية التثبيطية بين العزلتين؛ 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 كوزوريا كرستنية *Kocuria kristinae* على بقية عزلات الأنواع العصوية الهدف في حساسيتها للمستقلبات الثانوية عند مستوى ($p < 0.05$)، في حين تفوقت بكتيريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas. aeruginosa* على باقي عزلات الأنواع العصوية الهدف في مقاومتها لمستخلص المستقلبات الثانوية عند مستوى ($p < 0.05$). أسفرت نتائج الدراسة عن إمكانية الحصول على مواد فعالة بيولوجيا تساهم في حل العديد من المشاكل البيئية، وقد أوصت الدراسة بالبحث عن مواد جديدة فعالة بيولوجيا ضد الأنواع العصوية كون مصدرها الأحياء المجهرية الموجودة في البيئة المحلية.

الكلمات المفتاحية: أنواع العصوية، الببتيدات المضادة للبكتيريا، التأثير التنافسي.

المقدمة

تضم المستقلبات الثانوية الميكروبية مجموعة واسعة من المركبات المنتجة طبيعيًا تقوم بعدد كبير من الفعاليات الحيوية، تختلف المستقلبات الثانوية عن المستقلبات الأولية أنها لا تشترك في فعاليات البناء والهدم التي يتطلبها النمو الطبيعي لكن هذه المستقلبات تعطي للميكروب صفات تساعده على أفضلية البقاء في البيئة التي يعيش فيها (Choudoir *et al.*; 2018). تؤدي المستقلبات الثانوية دورًا مهمًّا في التكيف الفسيولوجي والتلاؤم البيئي للميكروبات المنتجة لها؛ إذ إن هذه المستقلبات تمكّن الميكروب المنتج لها من تثبيط نمو الميكروبات المنافسة (Yan *et al.*, 2018).

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

يستخدم جهاز الفايتك في تشخيص أنواع البكتيريا المختلفة ومنها أنواع العصوية *Bacillus* إذ يحتوي على 64 اختبارًا كيموحيويا يتم من خلال مقارنة نتائجها مع قاعدة البيانات data base الموجودة في الجهاز تَعَرُّف التشخيص الدقيق للبكتيريا إلى حد مستوى النوع (Pincus, 2005).

تستطيع أفراد جنس *Bacillus* إنتاج الكثير من المستقلبات الثانوية ذات الفعالية المضادة للميكروبات الأخرى مثل الببتيدات الدهنية lipopeptides، الببتيدات المتعددة polypeptides،

اللاكتونات الكبيرة macrolactones، الأحماض الدهنية fatty acids، الكيتايدات المتعددة polyketides، والكيومارينات المتناظرة isocumarines (Mondol *et al*., 2013)، وقد استخدمت بشكل واسع في الصناعات الطبية والصيدلانية (Leifert *et al*., 1995)، بسبب قدرة أفراد هذا الجنس على بناء المواد المضادة للميكروبات في تركيب البروتين الذائب، كما أن لهذه المواد تأثيرات ملحوظة على الأنواع العصوية الهدف؛ لذلك يعد هذا الجنس مرغوبا للإنتاج التجاري (Priest *et al*., 1995).

أجريت عدة دراسات في مجال استخدام المستقلبات الثانوية لتثبيط تكوين الأغشية الحيوية مثل Wilson *et al*. (2011)، Marhaeni *et al*. (2011) Dusane *et al*. (2013) إذ أشارت هذه الدراسات إلى أن المستقلبات الثانوية للبكتيريا البحرية أظهرت قدرة واضحة على تثبيط تكون الأغشية الحيوية وعلى تمزيق الأغشية الحيوية حديثة التكوين، ولأجل تَعَرُّف إمكانية الحصول على عزلات محلية من جنس *Bacillus* منتجة للمستقلبات الثانوية ذات الفعالية التثبيطية تجاه الأحياء المجهرية ولعدم إجراء دراسات محلية سابقة فقد أجريت هذه الدراسة.

المواد وطرق العمل

جمعت خمسون عينة مياه وترسبات للفترة من يناير 2016م، إلى أبريل 2016م، من أماكن مختلفة في محافظة البصرة، ونُقلت العينات إلى المختبر لتشخيصها؛ حيث وضعت العينات في حمام مائي بدرجة حرارة 80°م لقتل الأنواع العصوية غير المكونة للأبواغ (PHE, 2015).

عينات الترسبات

جمعت العينات (حوالي 20 غم لكل عينة) باستخدام أكياس البولي إثيلين المعقمة الجافة، وبوساطة الملوق spatula المعقم، وفي ظروف معقمة، أضيف 1 غم من كل عينة إلى أنبوبة اختبار تحتوي على 10 مل ماء مقطر، ثم عُملت سلسلة تخافيف عشرية لغاية 1×10^{-6} وحدة تكوين مستعمرة (cfu)/ مل من الماء المقطر، رشحت التخافيف 1×10^{-1}، 1×10^{-3}، 1×10^{-6} باستخدام أوراق الترشيح نوع 0.45 mμ 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، وتم تصبيغها بصبغة غرام وفحصت تحت المجهر الضوئي. اختيرت العصيات الموجبة لصبغة غرام والمكونة للأبواغ لإتمام عملية تشخيصها بوساطة عدة التشخيص VITEK2 BCL ard (bioMérieux, France)، كما شخصت جينيًّا بتضخيم الجين المشفر لإنتاج إنزيم gyrase باستخدام عدة استخلاص Wizard DNA (Promega - USA).

عينات المياه

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

جدول (1): مواقع وأعداد العينات المفحوصة ونتائج التخافيف لمعدل أعداد البكتيريا في عينات المياه والترسبات

ت	الموقع	عدد العينات	نوع العينة			
			ترسبات	Cfu/10-6	مياه	$Cfu/10^{-4}$
1	أحواض تربية الأسماك في مركز علوم البحار	4	2	35	2	22
2	ميناء خور الزبير	10	5	19	5	12
3	ميناء أم قصر	17	8	27	9	15
4	ميناء أبو فلوس	4	2	18	2	10
5	أبو الخصيب	8	4	43	4	28

تابع جدول رقم (1):

ت	الموقع	عدد العينات	نوع العينة			
			ترسبات	Cfu/10-6	مياه	Cfu/10^{-4}
6	ميناء الفاو	2	1	15	1	7
7	السيبة	2	1	29	1	13
8	المياه المصاحبة لأحد الآبار في الحقل النفطي زبير1	1				لا يوجد نمو
9	المياه المصاحبة لأحد الآبار في الحقل النفطي ps1	1				لا يوجد نمو
10	المياه المصاحبة لأحد الآبار في منطقة إرطاوي	1				لا يوجد نمو

إنتاج المستقلبات الثانوية Secondary metabolites production

أنتجت المستقلبات 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.

استخلاص المستقلبات الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* spp.

استخلصت المستقلبات الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* spp. حسب طريقة Amin *et al.*, (2015)؛ إذ أضيفت خلات الإثيل 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 أزيلت طبقة خلات الإثيل ونقلت إلى دورق نظيف، وجمع المستخلص وجفف في المبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة 50°م، ثم أذيب المستخلص في الكحول الإثيلي. اختيرت العزلتان الأكثر إنتاجًا للمستقلبات 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.

تنقية المستقلبات الثانوية لأنواع العصوية جنس *Bacillus*

أجريت خطوتي كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion Exchange Chromatography وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filteration chromatog-raphy طبقا لطريقة Anju *et al.* (2015) فيما أجري الرحلان الكهربائي طبقا إلى Laemmli (1970). اختبرت الفعالية البكتيرية للمستقلبات الثانوية المنقاة، بطريقة الانتشار عبر الآغار (Dusane *et al.*, 2011)، ضد الأنواع البكتيرية: *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus sciuri* و *Kocuria kristinae* *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)، إذ زرعت الأطباق الزرعية الحاوية على وسط LB الصلب بنشر 0.1 مل من المزارع البكتيرية السائلة للأنواع المذكورة أعلاه بواسطة الناشر L- shape spreader، ثم حضنت بدرجة 35°م لمدة 15 دقيقة، ثم ثقب الوسط الزرعي الصلب باستخدام ثاقب الفلين cork poor-er، وملئت الثقوب بـ 50 μL من الراشح المعقم لبكتيريا جنس *Bacillus*، حضنت الأطباق بدرجة 35°م لمدة 18 ساعة ثم قيست أقطار التثبيط (ملم) باستخدام المسطرة وسجلت النتائج.

التحليل الإحصائي

تم عمل التحليل الإحصائي لتجارب الفعالية التضادية بين عزلات بكتيريا *Bacillus* والأنواع العضوية الهدف؛ حيث تم أخذ معدل القراءة لثلاثة مكررات، ثم حللت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي الحاسوبي (SPSS, 2009). اختبرت العوامل المدروسة بالاعتماد على أقل فرق معنوي بين المتوسطات (LSD) عند مستوى احتمالية ($p< 0.05$).

النتائج والمناقشة

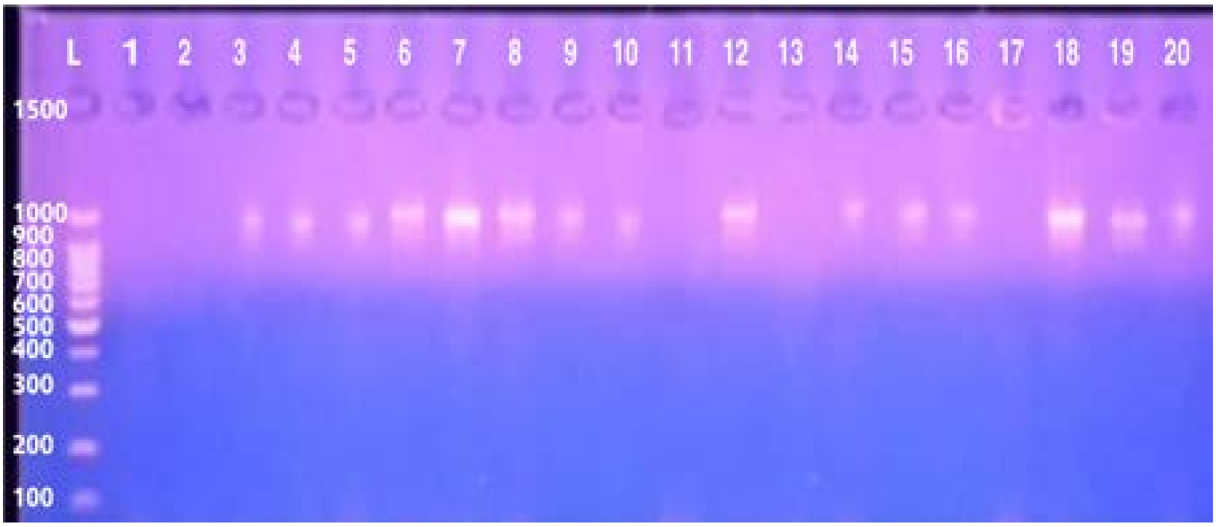
عزل وتشخيص بكتيريا جنس *Bacillus* spp.

تم الحصول على 20 عزلة بكتيرية تابعة للجنس

Bacillus spp.؛ كما هو مبين في جدول (2) أظهرت نتائج التشخيص أن 15 عزلة تعود إلى النوع *Bacillus subtilis* فيما شخصت 5 عزلات على أنها تعود للنوع *B. amyloliquefaciens* وهذا ما أكده التشخيص الجيني (شكل:1)؛ إذ أظهرت العزلات التابعة للنوع *B. subtilis* نتائج موجبة لعملية التضخيم فيما أبدت العزلات التابعة للنوع *amyloliquefaciens* نتائج سالبة.

جدول (2): مصادر العزلات التابعة لجنس *Bacillus* spp.

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



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

إنتاج المستقلبات الثانوية لأنواع العضوية *Bacillus* spp.

تراوحت فترة تنمية أفراد هذا الجنس في البحوث والدراسات السابقة لغرض إنتاج المستقلبات 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 للمستقلبات الثانوية لأنواع العضوية *Bacillus* spp. كان بعد مرور 48 ساعة من النمو عند دخول المزرعة البكتيرية في مرحلة idiophase الذاتية من طور الثبات stationary phase، كما تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Barrios-Gonzalez *et al*. (2003) الذين أشاروا إلى أن إنتاج المستقلبات الثانوية يبدأ عندما يتناقص معدل النمو البكتيري نتيجة استهلاك أحد المغذيات الرئيسية مثل: الكاربون، النتروجين أو الفسفور. تتفق هذه النتائج مع ما ذكره Motta *et al*. (2007) أن بكتيريا *Bacillus* المعزولة من قبلهم أنتجت المستقلبات الثانوية في الطور اللوغاريتمي ووصل الإنتاج إلى ذروته في طور الثبات stationary phase.

استخلاص المستقلبات الثانوية لأنواع العضوية. *Bacillus* spp.

ذكرت البحوث والدراسات استخدام عدة مذيبات لاستخلاص المستقلبات الثانوية من بكتيريا *Bacillus*؛ مثل استخدام كل من المذيبات ن- هكسان، داي كلوروميثان، الكلوروفورم، الميثانول، داي مثيل سلفوكسايد (DMSO)، وخلات الإثيلEthyl acetate (Barrios- Gonzalez *et al*., 2003; Marhaeni *et al*., 2011)؛ إذ أظهرت المستقلبات الثانوية المستخلصة في الدراسات السابقة بواسطة خلات الإثيل أفضل فعالية تضادية ملحوظة ضد الأنواع العضوية الهدف مقارنة بالمستقلبات المستخلصة بالمذيبات العضوية الأخرى، وهذا يتفق مع الدراسة الحالية؛ إذ أظهرت المستقلبات الثانوية لأنواع العضوية *Bacillus* فعالية تثبيطية واضحة ضد الأنواع العضوية المستخدمة في الهدف بنوعيها السالبة والموجبة لصبغة غرام، وهذا يتفق مع ما ذكره Mohan *et al*. (2016) أن استخدام خلات الإثيل في استخلاص المستقلبات الثانوية لأنواع العضوية *Bacillus* يحافظ على الفعالية التثبيطية لهذه المستقلبات ضد الأنواع العضوية الهدف.

تنقية المستقلبات الثانوية لأنواع العضوية *Bacillus* spp.

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

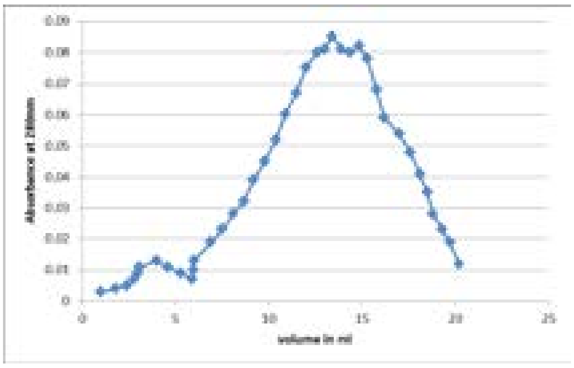
Ion Exchange Chromatography

تم بواسطة هذه الخطوة فصل خليط المركبات المكونة لمستخلصات المستقلبات الثانوية اعتمادا على شحنتها بعد وضعها على سطح المبادل الأيوني داخل عمود الفصل بمرحلتين (شكل: 2 و 3): -

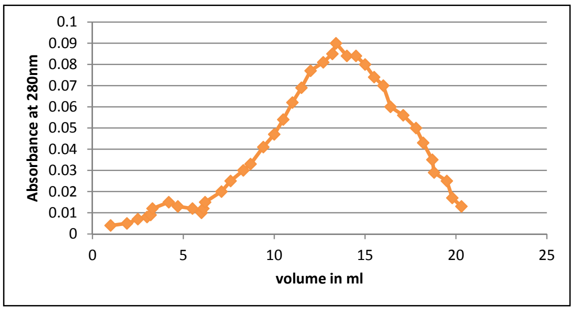
أولا: غسل الأجزاء غير المرتبطة (وهي الأجزاء الفعالة من المستخلصات) وتكون ذات شحنة موجبة مشابهة لشحنة المبادل الأيوني والتي مرت دون أن ترتبط بالمبادل مع محلول الغسل بشكل قمة واحدة، ظهور هذه القمة يدل على خروج الببتيدات وبعض المركبات ذات الشحنة الموجبة نتيجة حصول تنافر للشحنات فيما بينها وبين المبادل.

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

يحدث الترسيب بملح كبريتات الأمونيوم 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 جدًّا في إزالة المواد الصبغة التي تلوث العينة والتي فصلت المستخلص في قمة منفصلة عن القمة الأخرى التي مثلت المواد غير الفعالة في المستخلص الخام.



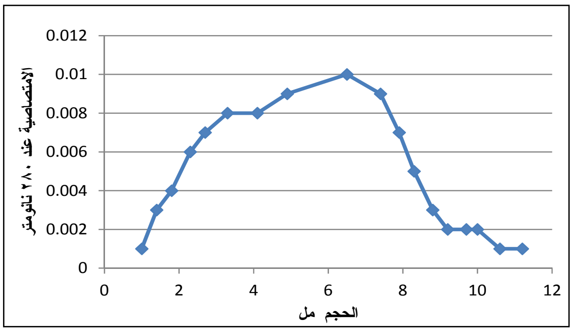
شكل (2): كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للمستقلبات الثانوية للعزلة BS8



شكل (3): كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للمستقلبات الثانوية للعزلة BS14

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filteration chromatography

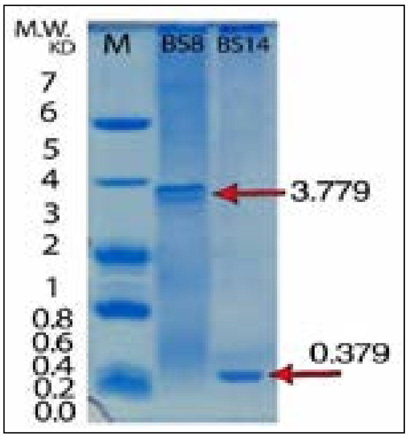
أجري الترشيح الهلامي باستعمال هلام السيفادكس S- 25 في تنقية المستقلبات الثانوية؛ وذلك نظرًا لما يمتاز به هذا النوع من الهلام من سمات مرغوبة، وهي استيعابه الواسع وفصله العالي للمواد وسهولة تحضيره وإمكانية إعادة تنشيطه واستعماله لعدة مرات (شكل:4). تتفق النتائج مع ما توصل إليه Teixeira, *et al.* (2013) أن استعمال هلام السيفادكس في الترشيح الهلامي يعد اختيارًا ناجحا جدًّا إذ ساهم في زيادة الفعالية التثبيطية للمستقلبات الثانوية ضد الأنواع العصوية الهدف.



شكل (4): كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للعزلتين BS8 و BS14

الرحلان الكهربائي Electrophoresis لمستخلصات المستقلبات الثانوية

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي باستخدام معلم الوزن الجزيئي aportinin ذو الوزن الجزيئي 6512 دالتون وجود حزمتين ببتيديتين خاليتين من التلوث بواقع حزمة واحدة لكل مستخلص مما يدل على كفاءة الطريقة المستخدمة في استخلاص وتنقية مستخلصات المستقلبات الثانوية، بلغ الوزن الجزيئي للحزمة الأولى 3779 دالتون وكانت لمستخلص المستقلبات الثانوية للعزلة BS8، فيما بلغ الوزن الجزيئي للحزمة الثانية 379 دالتون وكانت لمستخلص المستقلبات الثانوية للعزلة BS14، كما هو موضح في الشكل (5). اتفقت النتائج مع ما توصل إليه Bechard *et al.* (1998) الذين ذكروا أن الببتيدات المستخلصة من بكتيريا *Bacillus subtilis* التي قاموا بتمريرها في الهلام بطريقة SDS- PAGE قد ظهرت بشكل تجمعات aggregates مكونة تركيبًا 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 الكيمياوية المستخدمة لعلاج عدد من المشاكل البيئية ومنها الأغشية الحيوية.



شكل (5): الرحلان الكهربائي للمستقلبات الثانوية للعزلتين BS8 و BS14 على الهلام بوجود مادة SDS

1. Marker ببتيد aprotinin ذو الوزن الجزيئي 6.512 كيلو دالتون.
2. المستقلبات الثانوية للعزلة BS8 ذات وزن جزيئي 3.779 كيلو دالتون.
3. المستقلبات الثانوية للعزلة BS14 ذات وزن جزيئي 379 دالتون

يبين جدول (3) الفعالية التضادية للمستقلبات الثانوية المنقاة للعزلتين BS8 وBS14 على التوالي إذ حصلت زيادة في الفعالية التثبيطية للمستقلبات الثانوية لأنواع العصوية *Bacillus* تجاه الأنواع العصوية الهدف مع كل خطوة من خطوات التنقية.

جدول (3): الفعالية التضادية للمستقلبات الثانوية المنقاة للعزلتين BS8 و BS14

خطوات التنقية	ت	قطر منطقة التثبيط (ملم)				
		P. aeruginosa	*E. coli*	MRSA	*K. kristinae*	*S. sciuri*
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني	BS8	16	17	19	22	20
	BS14	14	16	20	22	19
كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي	BS8	19	20	22	24	23
	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 ثلاثة مكررات.

أظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) في الفعالية التثبيطية بين عزلتي جنس *Bacillus* إذ تفوقت العزلة ($p < 0.05$) BS8 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 المستقلبات 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 المستقلبات الثانوية المنقاة لعزلتي جنس *Bacillus* عند مستوى ($p < 0.05$). تتفق النتائج مع ما أشار إليه Liu *et al.* (2018) أن المستقلبات الثانوية المنتجة من العزلات البحرية لجنس *Bacillus* تمتلك صفات تؤهلها لأن تكون مضادات حيوية قادرة على تثبيط العديد من المرضات البكتيرية، كما تتفق النتائج مع ما ذكره Wilson *et al.* (2011) بأن الفعالية التثبيطية لمستخلص المستقلبات 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 للمستقلبات 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. تتفق النتائج المستحصلة في هذه الدراسة مع ما توصل إليه Cherif *et al.* (2008) الذين أشاروا إلى الببتيدات المستخلصة من المستقلبات الثانوية لأعضاء جنس العصوية *Bacillus* تتمتع بالعديد من الصفات التي تجعلها خيارا مثاليا لاستخدامها بصفتها عوامل سيطرة أحيائية من الممكن استخدامها في القضاء على العديد من الميكروبات المسببة للعديد من الأمراض والمشاكل البيئية. توصلت الدراسة إلى إمكانية الحصول على المواد الفعالة بيولوجيا التي من الممكن أن تساهم في حل العديد من المشاكل البيئية؛ ولذا نوصي بإجراء المزيد من الدراسات التي تبحث عن المواد الفعالة بيولوجيا ضد البكتريا يكون مصدرها الأحياء المجهرية الموجودة في البيئة المحلية وباستخدام طرق استخلاص بسيطة وغير مكلفة.

المراجع

Amin, M. , Rakhisi, Z., and Ahmady, A.Z. 2015. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. Avicenna Clin. Microb. Infec. 2 (1):1-4

Anju, K. M., Archana, M.M., Mohandas, C., and Nambisan, B. 2015. Purification and identification of an antibacterial protein from the symbiotic bacteria associated with novel entomopathogenic nematode, *Rhabditis* (*Oscheius*) sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 31(4): 621-632.

Barrios – Gonzalez, J., Fernandez, F.J., and Tomasini, A. 2003. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. Indian Journal of Biotechnology. 2: 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: 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.

Delcoue, A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochem. Biophys. Acta. 1794:808-816.

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: 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*: Dhanarasu, S.(Ed.). Chromatography and its Applications. Publisher InTech.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685

Leifert, C., Li, H., Chidburee, S.,Hampson, S., Workman, S.,Sigee, D., Epton, H., and Harbour, A. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. J. Appl. Bacteriol. 78, 97–108

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. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29(3): 781-791.

Marhaeni, B., Radjasa, O.K., Khoeri, M.M., Sabdono, A., Bengen, D.G., and Sudoyo, H. 2011. Antifouling activity of bacterial symbionts of sea grasses against marine biofilm-forming bacteria. Journal of Environmental Protection. 2: 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: 2846–2872.

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 (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: 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: 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. doi.org/10.1128/mBio.01845-17.

Motta, A.S., Cannavan, F.S., Tsai, S.M., and Brandelli, A. 2007. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from amazon basin. Arch. Microbiol. 188:367–375.

PHE: Public Health England.2015. UK standards for microbiology investigation; identification of *Bacillus* species. Issue No.3, pp: l- 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*: Priest, F., Ramos-Cormenzana, A., and Tindaall, B.(Eds.) Bacterial Diversity and Systematics. Plenum Press. New York.

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.

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.

Extraction and Purification of Secondary Metabolites from *Bacillus* spp. and Study of their Antimicrobial Activities against some Bacterial Species

Eman A. Al-Imara(1), and Ghaidaa J. Al-Gazzawy(2)

(1) Dept. of Biotic Evolution- Marine Science Center
Basrah University-Basrah-Iraq.
(2) Dept. of Biology- College of Education for Pure Science
Basrah University- Basrah -Iraq.

Received 22 May 2018 - Accepted 13 October 2018

ABSTRACT

Due to the increase in bacterial antibiotic resistance, there is a need to find new bioactive substance derived from non-pathogenic bacteria that is ubiquitous in environment. This study aimed to purify locally isolated *Bacillus* spp. secondary metabolites in addition to study their antimicrobial activities against some bacterial species. Fifty water and sediments samples were collected from different locations in Basrah Governorate, southern Iraq. Out of these isolates, twenty bacterial spore-forming isolates showed antibacterial activity against gram negative and positive bacteria. The isolates were identified biochemically by VITEK2 BCL cards, which showed that 15 isolates were *Bacillus subtilis* whereas the remaining five isolates were *B. amyloliquefaciens*. Secondary metabolites (SM) were produced and extracted from *Bacillus* spp. and SM extracts of BS8 and BS14 were chosen for further study.

SM extracts of BS8 and BS14 were purified. The results of electrophoresis showed that the molecular weight of BS8 SM was 3779 Dalton while the molecular weight of BS14 SM was 379 Dalton; i.e. low molecular weight peptides. Statistical analysis showed significant differences ($p < 0.05$) in inhibitory activity among *Bacillus* isolates. BS8 SM extract had the best antibacterial activity ($p < 0.05$) among *Bacillus* isolates against target bacteria. *K. kristinae* was the most susceptible species ($p < 0.05$) among target bacteria while *P. aeruginosa* was the most resistant species ($p < 0.05$) among target bacteria.

The results revealed the possibility of obtaining bioactive substances that can resolve many environmental problems. These substances are environmental friendly, cheap, easy to decompose, and do not leave toxic compounds. The study recommended the exploration of new antibacterial compounds originated from bacteria isolated from local environment using non-expensive extraction methods.

Key Words: Antibacterial Peptides, *Bacillus* species, Competition effect.