تأثير بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو بكتريا *Bacillus* المعزولة من الروسوبيات الشاطئية لمنطقة أفاميا

رامي حمود * د. أحمد قره علي ** ***د. بدر العلي

ملخص

أجريت الدراسة لتحديد تأثير بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو عزلات بكتريا بحرية من جنس الـ *Bacillus* معزولة من الرسوبيات الشاطئية لمدينة اللاذقية. جمعت عينات من الرسوبيات البحرية من منطقة أفاميا خلال الفترة (2019 – 2020). تم تحديد هوية هذه العزلات البكتيرية من خلال التحاليل المخبرية والميكروبيولوجية. تم إجراء عدد من التجارب لمعرفة تأثير تغيرات كل من درجة الحموضة (pH) والملوحة ودرجة الحرارة في نمو هذه العزلات البكتيرية. وقد بينت النتائج إن أفضل نمو للعزلات البكتيرية كان عند درجة حرارة حضن 35 مْ، وأدنى نمو لها عند درجة حرارة 10 مْ، وإن أعلى قيمة مسجلة لنمو عزلات جنس الـ *Bacillus* البحرية كانت عند درجة (7) pH وأدنى قيم للنمو سجلت عند درجة (5) pH. كما بينت النتائج أن أفضل نمو لتلك العزلات كان في وسط ذو تركيز ملحي 4%.وكان أفضل نمو للعزلات البكتيرية عند استخدام المصادر العضوية للنتروجين وخاصة الببتون مقارنة بالمصادر الاعضوية للنتروجين بينما أظهرت العزلات البكتيرية أدنى قيم للنمو عند استخدام نترات الصوديوم. كان أفضل نمو للعزلات البكتيرية عند استخدام المصادر العضوية للكربون وخاصة الغلوكوز وأظهرت العزلات البكتيرية أدنى قيم للنمو عند استخدام المالتوز.

كلمات مفتاحية: *Bacillus* ، الرسوبيات البحرية ، الاختبارات الكيمياحيوية

* طالب دكتوراه، قسم البيولوجيا البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

** أستاذ ، قسم الكيمياء البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين ، اللاذقية، سورية.

*** أستاذ مساعد، قسم البيولوجيا

The effectiv of some physical and chemical factors on the growth *Bacillus* isolacted of coastal sediment of the Apamea region

Rami HAMMOD [*] Dr. Ahmad kARA ALI [**]
Dr. Badr Al ALI [***]

ABSTRACT

The study was conducted to study of effect of some physical and chemical factors on the growth of marine bacterial isoloates of *Bacillus* species which were isolated from the coastal sediments of Lattakia city. Marine sediment samples were collected from the Apamea site during the period (2019-2020). laboratory analysis were done todeterment the to determine the identity of the species of the genus *Bacillus*.A number of experiments were conducted to find out the effect of changes in pH, salinity, temperature and changes in nutrient concentrations (carbon, nitrogen) on the growth of these bacterial isolates. The results showed that the best growth of bacterial isolates was at an incubation temperature of 35°C. Its lowest growth was at a temperature of 10°C, and the highest value recorded for the growth of marine *Bacillus* isolates was at pH (7), and the lowest values were recorded at pH (5). The best growth of those isolates was in a medium with a salt concentration of 4%, and the best growth of bacterial isolates was when using organic sources of nitrogen, especially peptone, compared to inorganic sources of nitrogen. The bacterial isolates showed the lowest values of growth when using sodium nitrate. The best growth of bacterial isolates was when using organic sources of carbon, especially glucose, and the bacterial isolates showed the lowest values of growth when using maltose**.**

Key words: *Bacillus*, marine sediments, biochemical tests

[*] **PhD Student , Dept of Marine biology at HIMR, Tishreen University , Lattakia, Syria.**

[**] **Professor, Dept. of Marine Chemistry at HIMR, Tishreen University, Lattakia, Syria**

[***] **Assistant Professor, Dept. of Marine biology at HIMR, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

اكتشف جنس *Bacillus* من قبل العالم Ehrenberg في عام 1835 وأطلق عليه اسم Vibrio، وفي عام 1872 أطلق عليه اسم *Bacillus* [16] . يتواجد بصورة واسعة في التربة والمياه والغذاء. ينتمي جنس الـ *Bacillus* إلى الجراثيم الحقيقية، رتبة Bacillaies، وعائلة Bacillacae. يعد من الجراثيم التي تعيش بشكل حر غير متطفلة، يتراوح قطر خلاياها بين 0.5–2 ميكرون، خلاياها عصوية الشكل، إيجابية صبغة غرام، هوائية أو لاهوائية اختيارية، مكونة للأبواغ الداخلية، تكون هذه الأبواغ مقاومة للحرارة والأشعة والجفاف والمواد المطهرة [19] . كما تبدو الخلايا مستقيمة أو منحنية الشكل قليلاً، وتكون الخلايا مفردة أو مزدوجة، وأحياناً بشكل سلاسل طويلة. تتحرك بوساطة سياط محيطية. تحاط الخلايا بمحافظ تكون سميكة مكونة من عديد الببتيدات، ومعظم أنواع هذا الجنس لا تحتاج إلى أوساط معقدة للنمو وتنمو على الأوساط الاعتيادية مثل وسط الآغار المغذي ووسط الآغار المدمّى [14].

تُعد أنواع جنس *Bacillus* من الأحياء المجهرية المهمة في المجالات الطبية، الصناعية والزراعية، إذ تنتج حوالي 167 مضاداً، فضلاً عن إنتاجها العديد من الأنزيمات المهمة في المجالات الطبية والصناعية [4]. ففي المجال الصناعي، لم يعد استخدامها مقتصراً على إنتاج بعض المركبات الصناعية فقط بل تعداه ليشمل إنتاج أعقد المركبات الكيميائية الدوائية وأهمها المضادات الحيوية، الهرمونات، الفيتامينات، المبيدات والأسمدة الحيوية [15] . كما يعد هذا الجنس معقداً على المستوى الوراثي و المظهري، التمثيل الغذائي، التصنيف وعلم البيئة. مما يسمح لها بأن تكون متعددة الاستخدامات للغاية في بيئات مختلفة، خاصة في التربة والمياه [13]. يتأثر نمو الجراثيم وإنتاجها للأنزيمات والمضادات الحيوية والمركبات الكيميائية بالعوامل الفيزيائية (كدرجة الحرارة، درجة الحموضة والرطوبة والملوحة) والكيميائية (كنوعية المصدر الكربوني والنتروجيني في

الوسط الزرعي وغيرها). يختلف تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية بحسب النوع والسلالة البكتيرية المستخدمة وذلك بالاعتماد على تركيبها الجيني وتكيفها مع البيئة التي تعيش فيها [12]. بينت الدراسات أن الكائنات الحية الدقيقة البحرية تمتاز بخصائص تختلف عن مثيلاتها على اليابسة بسبب الشروط البيئية الخاصة في البيئة البحرية وهذا ما يجعلها محط أنظار الباحثين.

- هدف الدراسة:

- دراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائية (كدرجة الحرارة والرطوبة) على نمو عدد من العزلات البكتيرية التابعة لجنس *Bacillus* البحرية المعزولة من الرسوبيات البحرية لمدينة اللاذقية.
- دراسة تأثير بعض العوامل الكيميائية (كدرجة الحموضة، الملوحة، نوعية المصدر الكربوني والنتروجيني في الوسط الزرعي) على نمو عدد من العزلات البكتيرية التابعة لجنس *Bacillus* البحرية المعزولة من الرسوبيات البحرية لمدينة اللاذقية.
- تحديد الشروط المثلى لنمو تلك العزلات البكتيرية التابعة لجنس *Bacillus*

مواد البحث وطرائقه:

أجريت الدراسة في موقع منطقة أفاميا (35°76'19.1"N; 35°54'19.3"E) التي تمثل منطقة مفتوحة متأثرة بنشاطات سياحية وقنوات صرف صحي. جمعت العينات الرسوبية البحرية بوساطة عبوات زجاجية معقمة سعة 500 مل خلال شهر تشرين الأول عام (2019 –2020)، ونقلت مباشرة إلى المخبر لإجراء الدراسة المخبرية الميكروبيولوجية.

- **عزل وتنميط أنواع مختلفة من جنس الـ *Bacillus sp*:**

تم تنميط عزلات بحرية لأنواع مختلفة من جنس الـ *Bacillus sp* وفقاً لإختلاف شكلها ولونها ونموها على وسط الآغار المغذي وإجراء الاختبارات الكيميائية الحيوية وهي:

(الكاتلاز ،السترات،اليورياز ،أحمر المتيل،الجيلاتيناز ،الأوكسيداز ،ارجاع النترات،الأندول وإنتاج H2S، تخمر السكريات (الغلوكوز، الاكتوز، السكروز والمانيتول)) ومقارنة النتائج مع دليل بيرجي وذلك لتحديد وتنميط هوية أنواع جنس الـ *Bacillus sp* وهي : (*B. cereus*، *B. subtilis*، *B. circulans*، *B. polymyxa*) .

-دراسة تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو عزلات الـ *Bacillus*:

تم إجراء عدد من التجارب لمعرفة تأثير تغيرات كل من درجة الحموضة، والملوحة ودرجة الحرارة في نمو هذه العزلات وكانت كما يلي: حضرت مزارع سائلة للعزلات البكتيرية الأربعة التابعة لجنس الـ *Bacillus* البحري في وسط المرق المغذي وحضنت بدرجة حرارة 30مْ لمدة 24 ساعة.

أجريت عدد من الاختبارات لدراسة تأثير العوامل السابقة كتأثير تغير كل من درجة الـ pH ودرجة الحرارة وتغيرات تركيز الملح وتأثير نوعية المصدر الكربوني والنتروجيني على نمو العزلات البكتيرية وذلك باستخدام وسط Sorenson broth medium (المزرعة الشاهد)[8] (الجدول 1)، وحضنت المزارع البكتيرية بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 24 ساعة. تم قياس النمو البكتيري لمزارع أنواع جنس*Bacillus* باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) لقياس الكثافة الضوئية للنمو البكتيري عند طول موجة 600 نانومتر خلال فترة الحضن [1] [8]

الجدول (1): المواد الكيميائية المستخدمة في تحضير الوسط Sorenson broth medium [8]

المادة	الكمية(غرام / لتر)
Xylan	2
NH_4NO_3	1
K_2HPO_4	0.5
NaCl	0.2
$MgSO_4.7H_2O$	0.5
$FeSO_4.6H_2O$	0.02

- دراسة **تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو عزلات الـ *Bacillus*:**

1. **<u>تأثير تغيرات درجة الحرارة على نمو عزلات الـ *Bacillus*:</u>**

اختبر تأثير الحضن بدرجات حرارة مختلفة (10، 20، 30، 40، 50) مْ على نمو مزارع عزلات الـ *Bacillus* المحضرة كما في الخطوة السابقة مع كثافة ضوئية 0.05 في بداية التجربة. وتم قياس الكثافة الضوئية بعد فترة حضن 24 ساعة لكل عزلة بكتيرية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 600 نانومتر لمعرفة أفضل درجة حرارة للنمو[6] .

2. **<u>تأثير تغيرات درجة الحموضة على نمو عزلات الـ *Bacillus*:</u>**

تم دراسة تأثير درجات حموضة(pH) مختلفة (5، 7 و9) للوسط على نمو عزلات بكتريا *Bacillus* وضبطت درجة الحموضة لوسط Sorenson broth medium باستخدام محلول كل من هيدروكسيد الصوديوم(NaOH) (40%) وحمض كلور الماء(HCL). تم القيام بتلقيح الوسط بحجوم قيمتها (0.1ml) من مزارع محضرة لكل العزلات البكتيرية بحيث تكون الكثافة الضوئية في بداية التجربة 0.05 باستخدم جهاز المطياف الضوئي ثم حضنت المزارع بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 24 ساعة لمعرفة أفضل درجة pH مناسبة للنمو[6].

3. تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم على نمو عزلات بكتريا الـ *Bacillus*:

أضيفت تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (0.5، 2، 4 و6) % إلى وسط Sorenson broth medium ثم لقحت بمزارع سائلة للعزلات البكتيرية التابعة لجنس *Bacillus* ثم حضنت بدرجة حرارة 30 مْ ولمدة 24 ساعة وأخذت قياسات الكثافة الضوئية باستخدم جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 600 نانومتر لمعرفة أفضل درجة ملوحة لنمو تلك العزلات البكتيرية في نهاية الحضن [18] [2].

4. تأثير مصدر الكربون على نمو عزلات بكتريا الـ *Bacillus*:

استبدل المصدر الكربوني في وسط Sorenson broth medium بمصادر بديلة بنفس التركيز لمعرفة أيهما أفضل لنمو عزلات جنس الـ *Bacillus*. إذ استخدمت مصادر كربونية مختلفة كالـ (Maltose، Cellulose و Glucos) في الوسط المستخدم قبل تلقيحه وبنفس الكمية الموجودة في الوسط وضبطت درجة الحموضة للوسط عند 7 وعقم بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة. لقح الوسط بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 30 مْ ولمدة 24 ساعة بهزازة ذات سرعة 200 دورة/دقيقة وأخذت قياسات الكثافة الضوئية باستخدم جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 600 نانومتر لمعرفة أفضل مصدر كربوني لنمو تلك العزلات البكتيرية في نهاية الحضن [8].

5. تأثير مصدر النتروجين على نمو عزلات بكتريا الـ *Bacillus*:

استبدل المصدر النتروجيني في وسط Sorenson broth medium بمصادر بديلة بنفس التركيز لمعرفة أيهما أفضل لنمو عزلات جنس الـ *Bacillus*. إذ استخدمت مصادر نتروجينية مختلفة منها عضوية كالـ (ببتون ومستخلص الخميرة) وأخرى لاعضوية كنترات البوتاسيوم (KNO_3) ونترات الصوديوم ($NaNO_3$) في الوسط المستخدم قبل تلقيحه وبنفس

الكمية الموجودة في الوسط وضبطت درجة الحموضة للوسط عند الدرجة 7 وعقم بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة ثم لقح الوسط بحجوم معينة من مزارع العزلات البكتيرية بحيث تكون كثافتها الضوئية في بداية التجربة 0.05 عند طول موجة 600 نانومتر وحضنت بدرجة حرارة 30 مْ ولمدة 24 ساعة بهزازة بسرعة 200 دورة/دقيقة وفي نهاية الحضن أخذت قياسات الكثافة الضوئية باستخدم جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 600 نانومتر لمعرفة أفضل درجة ملوحة لنمو تلك العزلات البكتيرية [9] .

النتائج والمناقشة:

تأثير تغيرات درجات الحرارة على نمو عزلات الـ *Bacillus* بعد24 ساعة حضن:

بالنسبة لعزلة *Bacillus subtilis* بينت النتائج أن أعلى كثافة ضوئية سجلت قيمتها(0.26) عند درجة حرارة 30 مْ وسجلت أدنى كثافة ضوئية (0.092) عند درجة حرارة 50 مْ (الشكل1).

بالنسبة لعزلة *Bacillus polymyxa* سجلت النتائج أن أعلى كثافة ضوئية بلغت (0.22) عند درجة حرارة 30 مْ وبلغت أدنى كثافة ضوئية (0.071) عند درجة حرارة 50 مْ (الشكل1).

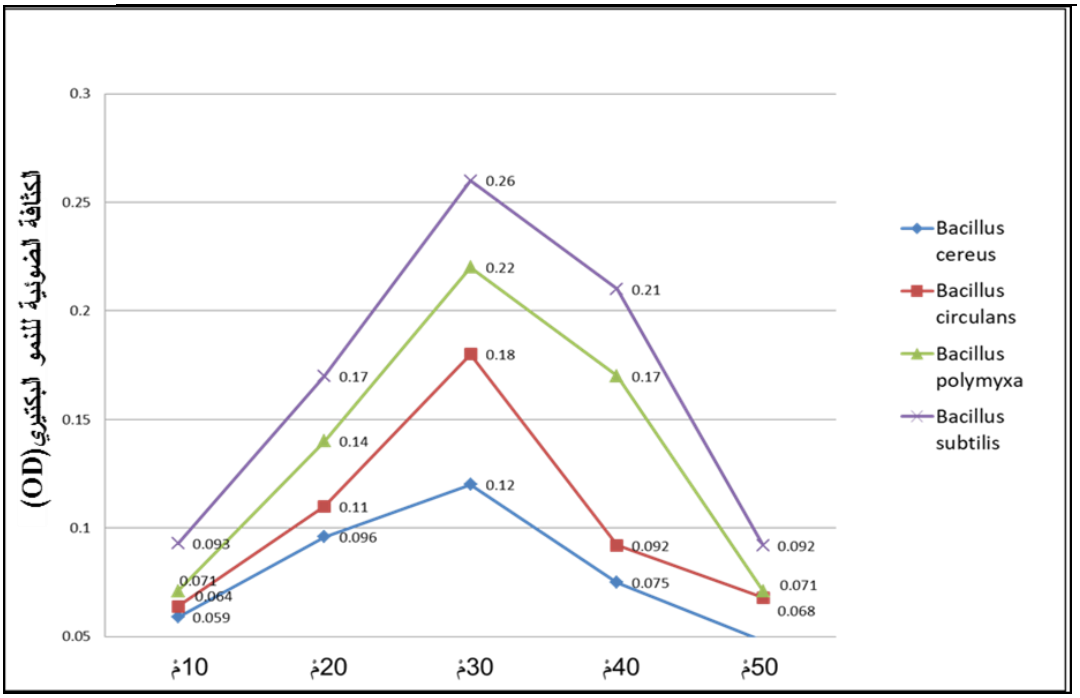
بالنسبة لعزلة *Bacillus circulans* أظهرت النتائج أن أعلى كثافة ضوئية سجلت (0.18) عند درجة حرارة 30 مْ وسجلت أدنى كثافة ضوئية (0.064) عند درجة حرارة 50 مْ (الشكل1).

بالنسبة لعزلة *Bacillus cereus* بينت النتائج أن أعلى كثافة ضوئية بلغت (0.12) عند درجة حرارة 30 مْ وسجلت أدنى كثافة ضوئية عند درجة حرارة 50 مْ وبلغت(0.048) (الشكل1).

تلعب درجة الحرارة دوراً هاماً في السلوك الكيميائي والفيزيولوجي للمكونات الحيوية للنظام البيئي المائي [17] . يختلف تاثير درجة حرارة المياه عادة بناءً على فصول السنة، الموقع الجيوغرافي، وقت الإعتيان ودرجة حرارة مصدر المياه الداخلة إلى الحوض المائي[6] .

يظهر (الجدول2 والشكل1) أن أفضل نمو للعزلات البكتيرية كان عند درجة حرارة حضن 30 مْ، ثم تلى ذلك نموها عند درجة حرارة 40 مْ، وأدنى نمو لها ظهر عند درجة حرارة 50 مْ وتلاها عند درجة حرارة 10 مْ. يمكن أن يعزى هذا التباين في النمو عند درجات حرارة مختلفة إلى تأثير تغير درجات الحرارة على الصفات الشكلية والفيزيولوجية وفعالية الأنزيمات للبكتريا البحرية [18] [5].

تنمو الجراثيم بشكل جيد فقط عند تأمين درجات الحرارة المثلى، إذ تنمو معظم البكتريا عند درجة حرارة 30–37 مْ المحددة لنمو البكتريا وتختلف الحرارة المثلى للنمو باختلاف نوع البكتريا ومنطقة الدراسة. يمكن أن يعزى ذلك إلى تأثير درجة الحرارة على النشاط الأنزيمي (وخاصة أنزيمات النقل) والوظائف الفيزيولوجية الأخرى المهمة في الخلية الميكروبية [2] . تلعب درجة الحرارة دوراً مهماً في نمو البكتريا والذي يعتمد على تكيف البكتريا وطبيعة غشائها السيتوبلاسمي وجدارها الخلوي وبالتالي يؤثر ذلك في فيزيولوجيا وإنتاج الأنزيمات وإنتاج المركبات الكيميائية [10]. يزداد معدل النمو البكتيري بارتفاع درجة حرارة الوسط وهذا ما يسبب استهلاك المواد العضوية وزيادة إنتاج المضادات مما يؤدي بالنتيجة إلى حدوث انخفاض في إنتاج الأنزيمات [4] .



الشكل (1): تأثير اختلاف درجة حرارة الحضن (10، 20، 30، 40، 50) م على النمو البكتيري للـ *Bacillus* بعد حضن (24) ساعة.

تأثير اختلاف درجة الحموضة على نمو عزلات الـ *Bacillus*:

بالنسبة لعزلة *Bacillus subtilis* بينت النتائج أن الكثافة الضوئية في نهاية الحضن كانت أعلاها عند درجة pH 7 وسجلت 0.26 وأدناها عند درجة pH 5 وسجلت 0.092. في حين كانت الكثافة الضوئية 0.19 عند درجة pH 9 في نهاية الحضن (الشكل 3).

بالنسبة لعزلة *Bacillus polymyxa* أظهرت النتائج أن أعلى كثافة ضوئية 0.24 سجلت عند درجة درجة pH 7 وسجلت أدنى كثافة ضوئية 0.081 عند درجة pH 5. بينما كانت الكثافة الضوئية 0.17 عند درجة pH 9 في نهاية الحضن (الشكل 3).

بالنسبة لعزلة *Bacillus circulans* أظهرت النتائج أن أعلى كثافة ضوئية للنمو سجلت 0.19 عند درجة pH 7 وبلغت أدناها 0.073 عند درجة pH 5. بينما كانت القيم المسجلة 0.14 عند درجة pH 9 (الشكل 3).

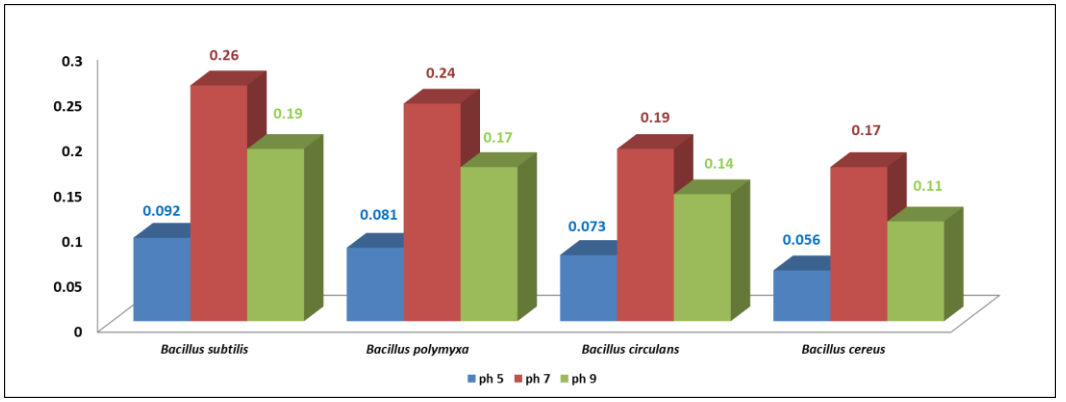
بالنسبة لعزلة *Bacillus cereus* لوحظ أن قيم الكثافة الضوئية الأعلى سجلت 0.17 عند درجة pH 7 في حين كانت القيمة الأدنى 0.056 عند درجة pH 5، وعند درجة pH 9 سجلت كثافة النمو البكتيري 0.11 (الشكل 3).

لوحظ من خلال النتائج المسجلة في الجدول (3) أن أعلى قيم سجلت لنمو عزلات جنس الـ *Bacillus sp* البحرية كانت عند درجة pH 7 وأدنى قيم للنمو سجلت عند درجة pH 5، في حين كانت قيم النمو المسجلة عند درجة pH 9 متوسطة. تؤكد هذه النتائج أن درجة الـ pH 7 هي الأفضل لنمو عزلات جنس الـ *Bacillus sp* وتترافق تلك النتائج مع دراسات سابقة [18] [9] .

تؤثر درجة الـ pH بشكل كبير في عمليات استقلاب ونمو الأحياء الدقيقة وبالتالي إنتاج المضادات الحيوية، وتمتلك تراكيز شوارد الهيدروجين أو الهيدروكسيد تأثيراً مباشراً على الخلية أو قد يكون التأثير غير مباشر من خلال تغير درجة تفكك المواد الكيميائية في الركيزة. كما تكتسب تغيرات درجة الـ pH أهمية في نشاط أنزيمات الأحياء الدقيقة وفي تفكيك وانحلال المنتجات الوسطية وغير ذلك إذ أن التغيرات في درجة حموضة الوسط تؤثر بشكل ملحوظ في مردود المنتجات النهائية لاستقلاب الأحياء الدقيقة ولهذا السبب من الضروري ضبط درجة حموضة الوسط قبل إجراء زراعة الأحياءالدقيقة [18] [9] .

وتعد طبيعة الجدار الخلوي إحدى الآليات التي تسيطر على إنتاج الأنزيمات الخارج الخلوية لدى الجراثيم وإن التغيرات في الجدار الخلوي البكتيري يؤثر على إنتاج الأنزيمات الخارجية وإطلاقها من الجدار الخلوي، ويعد عاملي درجة الحرارة ودرجة الحموضة (pH) من العوامل

التي تحفز على إحداث تغيير في الغشاء الخلوي والجدار الخلوي. ففي الجراثيم التابعة *Bacillus sp* يشارك الغلاف البروتيني السطحي لها في إفراز الأنزيمات الخارج خلوية وإنتاج المركبات الفعالة حيوياً[14] [11]



الشكل(3): تأثير اختلاف درجة pH الوسط على كثافة النمو البكتيري لـ *Bacillus* خلال فترة حضن (24) ساعة.

تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم على نمو عزلات الـ *Bacillus*:

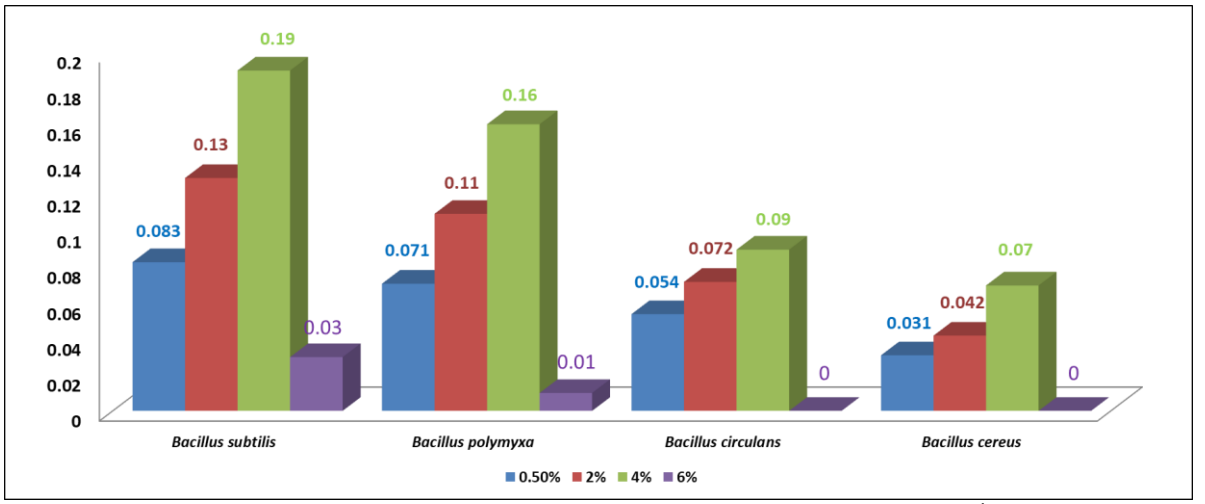
بينت النتائج أن أعلى كثافة ضوئية لنمو عزلات ***Bacillus subtilis*** سجلت عند تركيز كلوريد الصوديوم (0.5 %) بلغت 0.083 وبلغت 0.13 عند تركيز (2 %)، سجلت 0.19 عند تركيز كلوريد الصوديوم (4 %) وعند تركيز (6 %) سجلت كثافة النمو البكتيري 0.03 (الشكل 4).

بالنسبة لعزلة *Bacillus polymyxa* أظهرت النتائج أن أعلى قيمة للكثافة الضوئية سجلت 0.16 عند تركيز كلوريد الصوديوم (4%) بينما سجلت أدنى قيمة 0.01 عند تركيز (6%). أما عند تراكيز (0.5 و2) % فسجلت القيم 0.071 و0.11 على التوالي (الشكل4).

بالنسبة لعزلة *Bacillus circulans* بينت النتائج أن أعلى قيمة للكثافة الضوئية سجلت 0.09 عند تركيز كلوريد الصوديوم (4%) وأدنى قيمة سجلت (0) عند تركيز 6%. أما عند تراكيز (0.5 و2) % فسجلت القيم 0.054 و0.072 على التوالي (الشكل 4).

بالنسبة لعزلة *Bacillus cereus* لوحظ أن أعلى قيمة سجلت للكثافة الضوئية كانت 0.07 عند تركيز كلوريد الصوديوم (4 %) وأدنى قيمة سجلت (0) عند تركيز (6 %). أما عند تراكيز (0.5 و2) % فسجلت القيم 0.031 و0.042 على التوالي (الشكل 4).

بينت النتائج المسجّلة في الجدول (4) أن كلاً من العزلتين (*B. subtilis*، *B. polymyxa*) تنموان بشكل جيد في الوسط ذو التركيز الملحي 4 % ويعد التركيز الأمثل لنمو تلك العزلات البكتيرية، في حين لم تستطع بعض العزلات كـ (*B. cereus* ، *B. circulans*) من النمو على الوسط ذو التركيز الملحي 6 %. أما عند التركيز الملحي (0.5 و2) % كان النمو متفاوت لبعض العزلات البكتيرية المختلفة، وتترافق تلك النتائج مع دراسات سابقة [11].



الشكل (4): تأثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم على نمو عزلات جنس *Bacillus* .

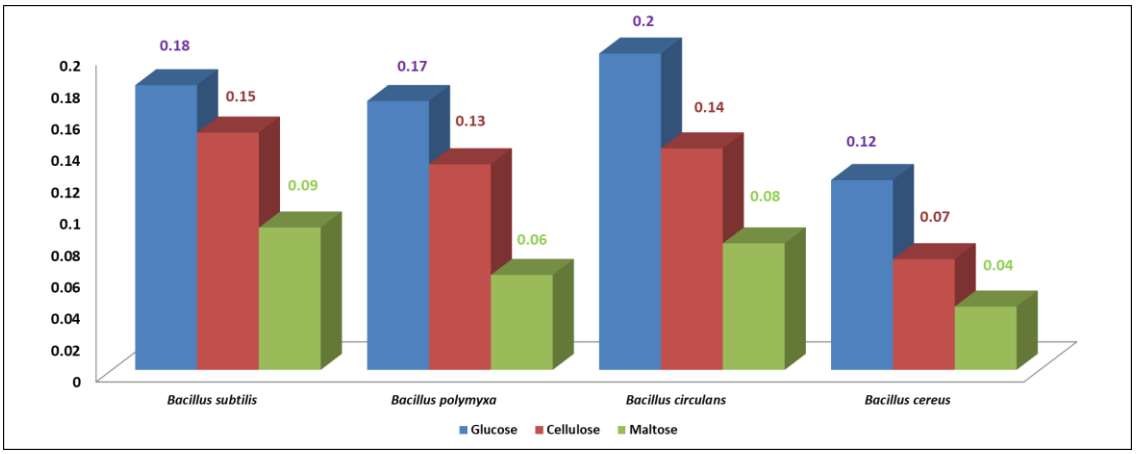
تأثير اختلاف مصدر الكربون على نمو عزلات الـ *Bacillus*:

لدى استخدام مصادر كربون مختلفة (غلوكوز، سيللوز ومالتوز) في الوسط المزروع بدلاً من الـ xylan وتأثيرها على نمو العزلات البكتيرية التابعة لجنس الـ *Bacillus* أظهرت النتائج أن أعلى كثافة ضوئية بالنسبة **لبكتريا *Bacillus subtilis*** سجلت 0.20 عند استخدام الغلوكوز، في حين كانت أدناها 0.09 عند استخدام المالتوز. أما عند استخدام السيللوز فبلغت الكثافة الضوئية 0.15، وكانت الكثافة الضوئية في المزرعة الشاهدة قد سجلت 0.19 (الشكل 5).

بالنسبة لعزلة *Bacillus polymyxa* أظهرت النتائج أن أعلى قيم الكثافة الضوئية للنمو كانت 0.17 عند استخدام الغلوكوز، في حين كانت أدناها 0.06 عند استخدام المالتوز كمصدر كربوني. أما عند استخدام السيللوز فبلغت الكثافة الضوئية 0.13 ، وكانت الكثافة الضوئية في المزرعة الشاهد 0.21 (الشكل 5).

بالنسبة لعزلة *Bacillus circulans* أظهرت نتائج إضافة مصادر كربونية مختلفة أن أعلى كثافة ضوئية للنمو البكتيري سجلت عند استخدام الغلوكوز وبلغت 0.18، بينما سجلت أدنى قيمة للكثافة الضوئية 0.08 عند استخدام المالتوز. أما عند استخدام السيللوز فكانت قيمة الكثافة الضوئية للنمو 0.14 ، وكانت الكثافة الضوئية في المزرعة الشاهدة قد سجلت 0.22 (الشكل 5).

بالنسبة لعزلة *Bacillus cereus* أظهرت نتائج إضافة مصادر كربونية مختلفة في أعلى كثافة ضوئية سجلت عند استخدام الغلوكوز وبلغت 0.12، بينما بلغت أدنى قيمة للكثافة الضوئية 0.04 عند استخدام المالتوز. أما عند استخدام السيللوز فوصلت قيمة الكثافة الضوئية إلى 0.07، وكانت الكثافة الضوئية في المزرعة الشاهدة قد سجلت 0.16 (الشكل 5).



الشكل (5): تأثير مصادر كربونية مختلفة على كثافة النمو البكتيري لعزلات جنس *Bacillus* بعد (24) ساعة من الحضن بدرجة حرارة 30 مْ.

من خلال النتائج المسجلة في الشكل (5). لوحظ أن أفضل كثافة ضوئية أو أفضل نمو للعزلات البكتيرية سجل عند إضافة الغلوكوز كمصدر كربوني بعد القيمة المسجلة في المزرعة الشاهدة، بينما أظهرت النتائج أن أدنى كثافة ضوئية سجلت عند استخدام المالتوز. يمكن أن يعزى ذلك إلى دور الغلوكوز في رفع الفعاليات الانزيمية لدورة كريبس داخل الخلايا البكتيرية وبالتالي تحفيزها على النمو، تترافق هذه النتيجة مع دراسات سابقة [7].

تمتلك المصادر الكربونية تأثير هام على نمو الأحياء الدقيقة وبالتالي على تشكيل المضادات الحيوية وذلك تبعاً للطبيعة الكيميائية ودرجة الأكسدة لهذه المصادر الكربونية. تنمو الأحياء الدقيقة وتركب المضادات الحيوية ولكنها تمتنع عن النمو إذا ما تغير مصدر الكربون المضاف إلى الوسط [5].

تأثير اختلاف المصدر النتروجيني على نمو عزلات الـ *Bacillus*:

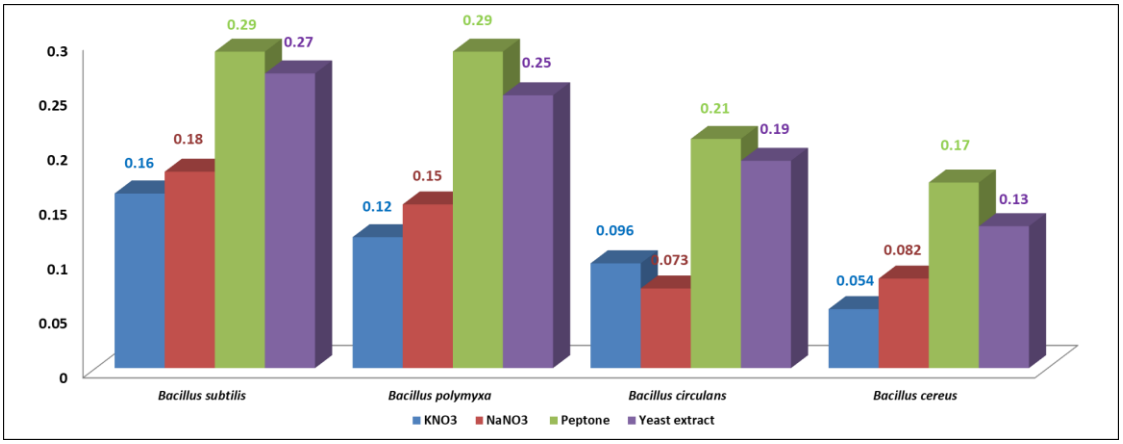
باستخدام مصادر نتروجينية مختلفة لاعضوية (كنترات البوتاسيوم (KNO_3) ونترات الصوديوم ($NaNO_3$)) وعضوية (البيبتون ومستخلص الخميرة) في وسط الزرع بدلاً من نترات الأمونيوم (NH_4NO_3) لدراسة تأثيرها على نمو العزلات البكتيرية البحرية التابعة لجنس الـ *Bacillus*.

بالنسبة لعزلة *Bacillus subtilis* أظهرت النتائج أن قيم الكثافة الضوئية للنمو كانت 0.12 عند استخدام نترات البوتاسيوم، في حين كانت الكثافة 0.15 عند استخدام نترات الصوديوم. أما عند استخدام البيبتون ومستخلص الخميرة فبلغت قيم الكثافة الضوئية 0.21 و0.25 على التوالي، وكانت الكثافة الضوئية المسجلة في المزرعة الشاهدة 0.29 (الشكل 6).

بالنسبة لعزلة *Bacillus polymyxa* كانت قيمة الكثافة الضوئية للنمو المسجلة 0.096 عند استخدام نترات البوتاسيوم كمصدر للأزوت، في حين كانت الكثافة الضوئية 0.073 عند استخدام نترات الصوديوم. أما عند استخدام البيبتون ومستخلص الخميرة فبلغت قيم الكثافة الضوئية 0.21 و0.19 على التوالي، وكانت الكثافة الضوئية للنمو في المزرعة الشاهدة 0.2 (الشكل 6).

بالنسبة لعزلة *Bacillus circulans* أظهرت النتائج أن قيمة الكثافة الضوئية المسجلة عند استخدام نترات البوتاسيوم يلغت 0.054، في حين كانت الكثافة الضوئية 0.082 عند استخدام نترات الصوديوم. أما عند استخدام البيبتون ومستخلص الخميرة فبلغت قيم الكثافة الضوئية 0.17 و0.13 على التوالي، أما الكثافة الضوئية للنمو في المزرعة الشاهدة بلغت 0.15 (الشكل 6).

بالنسبة لعزلة *Bacillus cereus* سجلت قيم الكثافة الضوئية للنمو 0.032 عند استخدام نترات البوتاسيوم، في حين كانت الكثافة الضوئية للنمو 0.041 عند استخدام نترات الصوديوم. أما عند استخدام البيبتون ومستخلص الخميرة فبلغت قيم الكثافة الضوئية 0.16 و0.15 على التوالي، كانت الكثافة الضوئية للنمو في المزرعة الشاهدة بلغت 0.16 (الشكل 6).



الشكل (6) تأثير مصادر نتروجينية مختلفة على كثافة النمو البكتيري لعزلات جنس *Bacillus* بعد (24) ساعة من الحضن بدرجة حرارة 30 مْ

لوحظ من خلال النتائج المسجلة في (الشكل 6). أن قيم الكثافة الضوئية لنمو للعزلات البكتيرية كانت أفضل عند استخدام المصادر العضوية للنتروجين وخاصة البيبتون مقارنة بالمصادر اللاعضوية للنتروجين. إذ أظهرت العزلات البكتيرية أدنى قيم للنمو عند استخدام نترات الصوديوم. وتترافق هذه النتيجة مع دراسات سابقة [7]. يمكن أن يعزى ذلك إلى أن المصادر العضوية للنتروجين تحرر شوارد الأمونيوم بشكل كبير مقارنة بالمصادر اللاعضوية وهذا ما يعمل على زيادة تحفيز النمو البكتيري [3]. تعد مصادر النتروجين هامة من أجل إنتاج الصادات الحيوية من قبل الأحياء الدقيقة ويمكن

لبعض الأوساط أن تؤمن شروط ملائمة لنمو الأحياء الدقيقة ولكن لا تتمكن هذه الأخيرة من إنتاج الصادات الحيوية [7].

الإستنتاجات والتوصيات:

بينت النتائج إن أفضل نمو للعزلات البكتيرية كان عند درجة حرارة حضن 35 مْ. وكان أفضل نمو لتلك العزلات عند درجة (7) pH. كما بينت النتائج أن أفضل نمو لتلك العزلات كان في وسط ذو تركيز ملحي 4%.وكان أفضل نمو للعزلات البكتيرية عند استخدام المصادر العضوية للنتروجين وخاصة الببتون مقارنة بالمصادر الاعضوية للنتروجين. كان أفضل نمو للعزلات البكتيرية عند استخدام المصادر العضوية للكربون وخاصة الغلوكوز.

نوصي بدراسة تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو عزلات أنواع مختلفة من جنس الـ *Bacillus* لما لها أهمية في المجالات الطبي، الصناعي والزراعي. حيث يتأثر نمو تلك الأنواع وإنتاجها للأنزيمات والمضادات الحيوية والمركبات الكيميائية بالعوامل الفيزيائية والكيميائية (كدرجة الحرارة، درجة الحموضة، الرطوبة، الملوحة وغيرها). يختلف تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية بحسب النوع والسلالة البكتيرية المستخدمة.

المراجع:

1- ABAD, M.;BEDOYA, L. and BERMEJO, P.Marine compounds and their antimicrobial activities.Science against microbial pathogens: communicating current research, Vol. 51, No. 3,2011,1293-1306.

2- ADAM, S.I.;AHMED, A.A.;OMER, A.K.,.In vitro Antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis leave extracts. Agri-Food Appl Sci, Vol. 1, No. 2,2014,15-21.

3- BATTAN, B.;SHARMA, J.;DHIMAN, S.S. and KUHAD, R.C.Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by Bacillus pumilus ASH and its potential application in paper industry.Enzyme, Vol. 41, No. 4,2007,733-739.

4- BEAR, S.E.;NGUYEN, M.T.;JASPER, J.T., et al.Removal of nutrients, *trace organic contaminants, and bacterial indicator organisms in a demonstration-scale unit process* open-water treatment wetland.Ecological engineering, Vol. 109, No. 3,2017,76-83.

5- BRENNER, D.J.;KRIEG, N.;STALEY, J. and GARRITY, G.Bergey's manual of systematic bacteriology. *The Proteobacteria*. NY: Springer, Vol. 2, No. 3,,2005.

6- CHASANAH, U.;NURAINI, Y. and HANDAYANTO, E.The potential of mercury-resistant bacteria isolated from small-scale gold mine tailings for accumulation of mercury.Journal of Ecological Engineering, Vol. 19, No. 2,2018.

7- DEDYSH, S.N. and IVANOVA, A.A.Planctomycetes in boreal and subarctic wetlands: diversity patterns and potential ecological functions. FEMS microbiology ecology, Vol. 95, No. 2,2019,fiy227.

8- GUPTA, U.;KAR, R. and TECHNOLOGY.Xylanase production by a thermo-tolerant Bacillus species under solid-state and submerged fermentation.Brazilian Archives of Biology, Vol. 52, No. 6,2009,1363-1371.

9- ISSAZADEH, K.;RAD, S.K.;ZARRABI, S. and RAHIMIBASHAR, M.R.Antagonism of Bacillus species against Xanthomonas campestris pv. campestris and Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum*.African Journal of Microbiology Research, Vol. 6, No. 7,2012,1615-1620.

10- MADDAMSETTI, R.;LENSKI, R.E. and BARRICK, J.E.Adaptation, clonal interference, and frequency-dependent

interactions in a long-term evolution experiment with Escherichia coli.Genetics, Vol. 200, No. 2,2015,619-631.

11- MUSSA, A. and ZIAYT, M.Study the effect of Purified Pyoluteorin Produced from P. aeruginosa, Isolated from Rhizospheric Plant Wheat on some UTI Bacteria Biofilm Formation.Research Journal of PharmacyTechnology, Vol. 11, No. 12,2018,5529.

12- NADEEM, M.;QAZI, J.I.;BAIG, S. and SYED, Q.U.A.Studies on commercially important alkaline protease from Bacillus Lichniformis N-2 isolated from decaying organic soil.Türk Biyokimya Dergisi, Vol. 32, No. 4,2007,171-177.

13- PRAKASH, P.;JAYALAKSHMI, S.;PRAKASH, B., *et al.*Production of alkaliphilic, halotolerent, thermostable cellulase free xylanase by Bacillus halodurans PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization.World Journal of Microbiology, Vol. 28, No. 1,2012,183-192.

14- QIN, Y.;WANG, Y.;HE, Y., *et al.*Characterization of subtilin L-Q11, a novel class I bacteriocin synthesized by Bacillus subtilis L-Q11 isolated from orchard soil, Vol. 10, No. 3,2019,484.

15- SCHMIDT, A.;KOCHANOWSKI, K.;VEDELAAR, S., *et al.The quantitative* and condition-dependent Escherichia coli proteome.Nature biotechnology, Vol. 34, No. 4,2016,104-110.

16- SINGH, D. and SINGH, B.Utility of acidic xylanase of Bacillus subtilis subsp. subtilis JJBS250 in improving the nutritional value of poultry feed. Biotech, Vol. 8, No. 12,2018,1-7.

17- TALLAPRAGADA, P. and VENKATESH, K.Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by Aspergillus niger under submerged fermentation.Microbiol Biotechnol Res, Vol. 1, No. 4,2011,137-147.

18- TURNBULL, P.C.;SIRIANNI, N.M.;LEBRON, C.I., *et al.*MICs of selected antibiotics for Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, and Bacillus mycoides from a range of clinical and environmental sources as determined by the Etest. Journal of clinical microbiology, Vol. 42, No. 8,2004,3626-3634.

19- YILMAZ, M.;SORAN, H. and BEYATLI, Y.Antimicrobial activities of some Bacillus sp. strains isolated from the soil.Microbiological research, Vol. 161, No. 2,2006,127-131.