مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (3) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (3) 2016

النشاط الصاد للجراثيم والخصائص المورفولوجية والفيزيولوجية والحيوية الكيميائية لعزلة الجنس Streptomyces من المياه البحرية لمدينة اللاذقية

الدكتورة أسمهان زينب*

(تاريخ الإيداع 29 / 12 / 2015. قبل للنشر في 9 / 5 / 2016)

☐ ملخّص ☐

تمّ الحصول على جراثيم *Streptomyces* من المياه البحرية لمدينة اللاذقية في موقع أفاميا فقط وزرعت العينات على وسط Marine-Agar medium ووسط Starch Casein Agar ووسط Actinomyces Isolation Agar، وتميزت مستعمراتها بأنها ذات أقطورة هوائية بلون أبيض وأفطورة ركائزية منغرسة ضمن الوسط بلون زهري وسلاسل الأبواغ حلزونية لا تنتج أصبغة منحلة ولا أصبغة الميلانين على وسط peptone-yeast extract-iron agar. أشارت نتائج دراسة الخصائص المورفولوجية والفيزيولوجية والزرعية والحيوية الكيميائية لعزلة *Streptomyces* وفقا لدليل بيرجي أنها تعود إلى النوع *Streptomyces rochei* .

أظهر النوع المعزول *Streptomyces rochei* خاصية التصادية الجرثومية تجاه جميع الجراثيم الممرضة البشرية السالبة صبغة غرام (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Proteus vulgaris*)، والموجبة صبغة غرام (*Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*) بتقانة الزرع المتعامدة، وتراوحت أقطار حلقات التثبيط لمستخلص النوع *Streptomyces rochei* بالمذيب خلات الإيتيل بتقانة الانتشار بالأقراص ضمن المجال 10 ملم و 34.6 ملم تجاه جراثيم *Escherichia coli* و *Staphylococcus albus* على التوالي.

الكلمات المفتاحية: *Streptomyces* sp.، مياه البحر، الخصائص المورفولوجية، الفيزيولوجية، الحيوية الكيميائية، التصادية الجرثومية، الجراثيم الممرضة البشرية.

* أستاذ مساعد – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (3) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (3) 2016

Antibacterial Activity and Morphological Physiological and Biochemical Characteristics of Streptomyces Isolated from sea water of Lattakia

Dr. Asmahan Zinab*

(Received 29 / 12 / 2015. Accepted 9 / 5 /2016)

□ ABSTRACT □

Bacteria of *Streptomyces* was isolated from sea water of Latakia at Afamia station only, by using Marine-Agar medium, Starch Casein Agar medium, Actinomyces Isolation Agar, their colonies were white aerial mycelia and pink substrate mycelia, spores were spirals, didn't produce soluble pigments and melanin on Peptone-Yeast Extract-Iron Agar. Results of morphological, physiological cultural, biochemical characteristics indicated that the *Streptomyces* isolated according to Bergey's manual of determinative bacteriology belongs to the species *Streptomyces rochei*.

Streptomyces rochei showed antibacterial activity against all human pathogenic Gram negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa*) and Gram positive bacteria (*Streptococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus*) by cross streak method.

Inhibition cycles of ethyl acetate extract of *Streptomyces rochei* by disc diffusion method ranged between 10 mm and 34.6 mm against *Escherichia coli* and *Staphylococcus albus* respectively.

Keywords: *Streptomyces*, sea water, morphological, physiological, biochemical characteristics, antibacterial activity, human pathogenic bacteria.

***Associate professor, department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia-Syria.**

مقدمة:

أدت زيادة الجراثيم المقاومة للصادات الحيوية Antibiotics إلى الاهتمام العالمي بالعوامل الصادة للميكروبات، وركز العديد من الباحثين على توصيف وتحديد الأنواع البحرية الفريدة المنتجة للعديد من المواد الفعالة الصادة المبكروبية. ويُعرف حالياً أكثر من 10000 صاد حيوي، وحوالي 50-55% ينتج من جنس *Streptomyces* (Subramani and Aalbersberg 2012).

يلقى الجنس *Streptomyces* ذا المنشأ البحري اهتماماً خاصاً للحصول على المُستقلبات الثانوية الطبيعية الفريدة وهي مركبات ذات وزن جزيئي منخفض وتشمل الصادات الحيوية والأصبغة والسموم والمثبطات الإنزيمية (Harounabadi *et al*., 2014)، وتأثيرها في الجراثيم الممرضة البشرية (Harounabadi *et al*., 2014,: Usha *et al*., 2015)، وهذا الجنس لا يشكل إلاّ نسبة قليلة من الفلورا الجرثومية البحرية مقارنة بنسبته العالية في فلورا التربة (Takizawa *et al*., 1993)، ويُعدّ الجنس *Streptomyces* البحري فريداً في إنتاج الصادات الحيوية مقارنةً بالمصادر الأخرى لانتشاره نسبةً إلى تغيرات العوامل الفيزيائية والكيميائية والحيوية للبيئة البحرية (Okazaki and Okami 1972; Subramani and Aalbersberg 2012)، وتمّ عزل جنس *Streptomyces* من إسفنج المياه البحرية في الهند (Kadiri *et al*., 2014) وتبين أنه يتمتع بخصائص صادة للجراثيم.

أدى الانتشار الواسع للصادات الحيوية في المراكز الصحية والزراعية إلى ظهور الجراثيم المقاومة التي بحاجة إلى مواد صادة أكثر فعالية، حيث أُنجزت في العقود الأخيرة أبحاث متعددة حول الجراثيم البحرية التي تعدّ مصدراً للمستقلبات الثانوية الطبيعية، والكثير من الجراثيم البحرية تنتج عوامل صادة أكثر فعالية من المواد الناتجة من جراثيم التربة (Subramani and Aalbersberg 2012).

ينتمي جنس *Streptomyces* إلى مجموعة الجراثيم الشعاعية Actinomycetes الإيجابية غرام ذات محتوى عالٍ من الغوانين والسيتوزين، وهي وحيدة خلية متفرعة وتشكل نوعين من الأفطورات هما: أفطورة ركائزية منغرسة ضمن الوسط substrate وأفطورة هوائية aerial، وتنتج الكثير من المركبات الفعالة حيوياً كالصادات الحيوية والإنزيمات الخارج خلوية (Das *et al*., 2008; Ebrahimi *et al*., 2009; Thumbar *et al*., 2010; Subash and Sasikumar 2013; Narendhran *et al*., 2014) ذات أهمية تطبيقية في المجال الطبي والصيدلاني والزراعي، وأكثر من 80% من الصادات الحيوية الطبيعية مستخرجة من *Streptomyces* وتستخدم في معالجة الأمراض الجرثومية البشرية والحيوانية والزراعية (Rajan and Kannabiran 2013) والأمراض الفطرية (Ebrahimi *et al*., 2009).

أهمية البحث وأهدافه:

تنبع أهمية البحث في التحري عن مصادر جديدة من الأحياء الدقيقة ذات المنشأ البحري خاصة جنس *Streptomyces* الذي يتميز بصفة إنتاج مركبات كيميائية تؤثر في الجراثيم وبالتالي تشبه الصادات الحيوية.

ويهدف البحث إلى:

1-الحصول على عزلات نقية لجنس *Streptomyces* من مياه البحر.

2-دراسة خاصية إنتاج الصادات الحيوية لعزلة *Streptomyces* وتأثيرها على بعض الجراثيم الممرضة.

3-دراسة الخصائص الزرعية والمورفولوجية والفيزيولوجية والحيوية الكيميائية لعزلة *Streptomyces*.

طرائق البحث ومواده:

جمع العينات:

جُمعت عينات المياه البحرية من: 1- شاطئ أفاميا، 2-شاطئ ابن هاني في مدينة اللاذقية، بعبوات زجاجية معقمة سعة 500 مل خلال حزيران وتموز وآب وأيلول وتشرين الأول لعام 2014، ونُقلت إلى المختبر للزرع والدراسة (Harounabadi *et al.*, 2014).

أُنجز هذا البحث في مختبر البحث العلمي لقسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم جامعة تشرين خلال 2014-2015.

زرع عينات المياه البحرية:

زرعت عينات المياه على وسط Marine-Agar medium ووسط Actinomyces Isolation agar ووسط Starch Casein agar وحُضرت بالمياه البحرية عوضاً عن الماء المقطر، وأُضيف nalidixic acid بمقدار 20 ملغ/مل و cyclohexamide بمقدار 25 ملغ/مل لتخفيف نمو الميكروبات المرافقة (Poosarla *et al.*, 2013; Thirumurugan and Vijyakumar 2013)، وتمّ تخفيف العينات بالمياه البحرية المعقمة بدلاً من محاليل واقية Bufer، وتمّ نقل 0.1 مل من الأنابيب المخففة وفُرشت فوق الأوساط المذكورة، وحضنت الأطباق في الدرجة 28° م لمدة 7-14 يوم (Naikpatil and Rathod, 2011).

عزل جنس *Streptomyces*:

عُزلت المستعمرات المشكوك فيها والتي أعطت أفطورة هوائية، وأفطورة ركائزية ضمن طبقة الآغار، تمّ تنقيتها على الأوساط المذكورة حتى الحصول على مزارع نقية، وحددت بعد إجراء دراسة الخصائص المورفولوجية والفيزيولوجية والحيوية الكيميائية (Williams *et al.*, 1989).

حفظ عزلات *Streptomyces*

حُفظت مزارع عزلات *Streptomyces* ضمن أنابيب تحوي آغار مائل لوسط Glycerol Asparagine agar في درجة حرارة المختبر في الدرجة 28 ± 2°م.

الجراثيم الممرضة البشرية:

تمّ عزل الجراثيم الممرضة من عينات مختلفة (بول ودم ومفرزات أذن) مأخوذة من مختبر مستشفى الأسد الجامعي في اللاذقية، واستُخدم العديد من أوساط الزرع وتنقية الجراثيم من العينات المرضية مثل وسط MacConky Agar ووسط إيوزين أزرق المتيلين EMB Agar ووسط M-FC Agar ووسط M-Enterococcus Agar ووسط KF-Streptococcus Agar ووسط شابمان آغار لزرع العنقوديات الذهبية ووسط Psedomonas agar p Base ووسط Acetamide agar لجراثيم *Psedomonas* ووسط الآغار الدموي Blood Agar لكشف التحلل الدموي، إضافة إلى الآغار المغذي والمرق المغذي ووسط مولر هنتون آغار، وجميع الأوساط المستخدمة من شركة Merck.

وصُنفت الجراثيم الممرضة بعد إجراء الاختبارات البيوكيميائية اللازمة (أوكسيداز وكاتالاز والإندول وأحمر الميتيل والسترات وفوجس بروسكاور والحركة واليوريا وتخمر السكاكر وإطلاق H_2S وتحلل الهلام والنشاء وإرجاع النترات ونزع الكربوكسيل من الحموض الأمينية وبعض الاختبارات الأخرى) وأحياناً استُخدمت أنظمة تحديد الجراثيم

(BioMérieux API Staph, API 20 Strep, API 20E System, France) وتمت المطابقة بالاعتماد على دليل بيرجي (Garrity *et al.*, 2004; Garrity *et al.*, 2005). وجميع الأوساط المستخدمة من شركة Merck.

اصطفاء العزلة المنتجة للصادات الحيوية لجنس *Streptomyces*:

تمّ اصطفاء العزلات *Streptomyces* المنتجة للصادات الحيوية، بتقانة الزرع المتعامدة، حيث زرعت كل عزلة نقية فوق وسط AIS على شكل خط مستقيم في منتصف الطبق وحضنت بدرجة حرارة 28° م لمدة 7 أيام، وبعد انتهاء الحضن تمّ صب طبقة من وسط مولر هنتون آغار المسخن والمبرد إلى الدرجة 45° م، وبعد تصلبه نُقلت الأطباق إلى البراد لمدة 4 ساعات حتى تنتشر المواد الناتجة من الجراثيم في طبقة الآغار، ثمّ أُخذت مزرعة الجراثيم الممرضة البشرية والنامية لمدة 24 ساعة في الدرجة 37° م في وسط المرق المغذي (محضر بماء البحر والماء المقطر بنسبة 50%) وزرعت بشكل متعامد مع الخط المستقيم لعزلات *Streptomyces* بدرجة حرارة 37° م لمدة 18-24 ساعة، وبعد انتهاء الحضن، تمّ اصطفاء العزلات التي أعطت فعالية صادة تجاه الجراثيم الممرضة البشرية اعتماداً على تثبيط النمو حول *Streptomyces* المزروعة بشكل خط مستقيم (Mohseni *et al.*, 2013; Poosarla *et al.*, 2013; Hossain and Rahman 2014; Sugathan *et al.*, 2015).

دراسة خصائص عزلة *Streptomyces* المنتجة للمواد الصادة للجراثيم:

دُرست خصائص العزلات وفقاً (Hossain and Rahman 2014) ولونت بصبغة غرام، وخضعت لمجموعة من الاختبارات منها:

-إنتاج Melanoid والأصبغة المنحلة: تمّ تحديد لون المستعمرة (الأفطورة الهوائية والأفطورة الركائزية) بزرع عزلات *Streptomyces* على وسط peptone-yeast extract-iron agar ووسط yeast extract malt agar وحُضنت في الدرجة 28 °م لمدة 48 ساعة.

-شكل المستعمرة: تمت دراسة الخصائص المورفولوجية باستخدام طريقة الساترة المائلة، حيث غُرست ساترة معقمة بشكل مائل في طبق بتري حاوي وسط casein-starch-peptone-yeast extract agar بزاوية مقدارها 45 درجة، ثمّ نُقلت قطرة من المعلق الجرثومي للمستعمرات المعزولة إلى نقطة التقاء الساترة بالوسط وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 28° م لمدة 7 أيام، وبعد انتهاء الحضن، سُحبت الساترة ووضعت فوق شريحة زجاجية معقمة، ودُرست خصائص الخيوط والأفطورات والأبواغ بالمجهر الضوئي (Williams *et al.*, 1989; Reddy *et al.*, 2011; Arbat *et al.*, 2014).

- تحمل تراكيز مختلفة لكلوريد الصوديوم: تمّ إضافة التراكيز (1-1.5-2-2.5-3- 5-7 % وزن/حجم) ملح NaCl إلى وسط yeast extract agar (Reddy *et al.*, 2011)، والتركيز الأعظمي هو أعلى تركيز يسمح بنمو الخلايا الجرثومية ضمنه.

-تخمر السكريات واستخدام الكربون: تمّ استخدام مصادر متعددة للكربون باستخدام السكريات التالية: الغلوكوز، كزيلوز، سكاروز، مالتوز، رامينوز، رافينوز، مانيتول، إينوزيتول، فراكتوز، كالاكتوز، أدونيتول، سوربيتول، دكستروز، بنسبة 10% إلى وسط معدني، وحضنت العزلات مع شاهد (الوسط المعدني بدون المصدر الكربوني) لمدة 10-14 يوماً في درجة حرارة 28° م (Dharmaraj *et al.*, 2010).

–ودرست الخصائص الفيزيولوجية والحيوية الكيميائية مثل النمو على وسط ماكونكي آغار، اختبارات الإندول، أحمر الميتيل، فوجس بروسكار، السترات، تحلل الكازئين، النشاء، اليوريا والهلام، تحلل الأرجينين، إطلاق H_2S اختبار الكاتالاز والسيتوكروم أوكسيداز (Williams *et al.*, 1989; Subash and Sasikumar 2013) .

استخلاص المواد الفعالة من عزلة *Streptomyces* بخلات الإيتيل:

تمّ زرع عزلة جنس *Streptomyces* والتي أظهرت فعالية تجاه الجراثيم الممرضة المعزولة بطريقة الزرع المتعامدة ضمن ارلينماير يحوي 250 مل وسط starch–casein broth، وحضنت في الدرجة 28° م في حاضنة هزازة بمعدل 180 هزة/د لمدة 7–10 أيام (Vijayakumar *et al.*, 2012; Thirumurugan and Vijyakumar 2013).

بعد انتهاء الحضن رشحت المزرعة عبر ورق ترشيح (Whatman No. 1) ونُقلت الرشاحة إلى ارلنماير معقم وأُضيف إليها ضعف كميتها بالحجم من المذيب ethyl–acetate، مزجت الرشاحة مع المذيب العضوي عن طريق وضعها في هزاز بسرعة 180 دورة /د لمدة ساعتين، وضعت في قمع الفصل وتركت حتى تستقر إلى طبقتين: علوية، تحوي المذيب العضوي والمادة الفعالة، وطبقة سفلية، تحوي الوسط الزرعي، تمّ التخلص منها وبقيت الطبقة العلوية، وجففت في المبخر الدوار بالدرجة 40° م، حتى الحصول على كمية قليلة، حفظت في الدرجة – 20° م لحين الاستخدام (Naikpatil and Rathod 2011).

فعالية المواد المستخلصة من *Streptomyces* تجاه الجراثيم الممرضة البشرية:

أنجزت التجربة بطريقة الانتشار بالأقراص، حيث شربت أقراص ترشيح قطر 6 مليمتر (Whatman, No.1, 6 mm) بمقدار 20 ميكرومتر من المستخلص وتركت لتجف في درجة حرارة المختبر، واستُخدمت أقراص ترشيح مشربة بمقدار 20 ميكرومتر من المذيب العضوي خلات الإيتيل كشاهد سلبي للاختبار.

بعدها أُخذت عدة مستعمرات من المزارع الجرثومية الممرضة النامية في وسط Nutrient Agar عمرها 24 ساعة، وضعت في محلول فيزيولوجي بحيث تعطي عكارة 0.5 ماكفرلاند McFarland Standard ما يعادل 1.5×10^{8} خلية/ مل، أو من المزارع الجرثومية النامية ضمن وسط Mueller Hinton Broth نفس العكارة، أُخذ 0.1 مل من المعلق الجرثومي ووضع فوق وسط Mueller Hinton Agar وفرش على السطح بماسحة قطنية تركت الأطباق 15 دقيقة في درجة حرارة المختبر ثمَ وُزعت أقراص الترشيح المشربة بالمستخلص والمشربة بالمذيب العضوي فوق سطح الوسط بملقط معقم وحُضنت في الدرجة 37° م مدة 24 ساعة، إن ظهور حلقات التثبيط Inhibition cycles واضحة في الآغار حول الأقراص دليل على تثبيط النمو الجرثومي، ثمّ سجلت أقطار حلقات التثبيط بعد انتهاء الحضن بالمليمتر بوساطة مسطرة مدرجة، أُعيدت التجربة بواقع ثلاثة مكررات (Sahin and Ugur 2003).

النتائج والمناقشة:

الجراثيم الممرضة البشرية المعزولة:

تمّ الحصول على ثمان عزلات جرثومية مرضية (خمس عزلات سالبة صبغة غرام وثلاث عزلات إيجابية صبغة غرام) من عينات مختلفة مأخوذة من مختبر مستشفى الأسد الجامعي في اللاذقية، الجدول (1)، مع الإشارة إلى أن جراثيم المكورات العنقودية الذهبية حالة للدم.

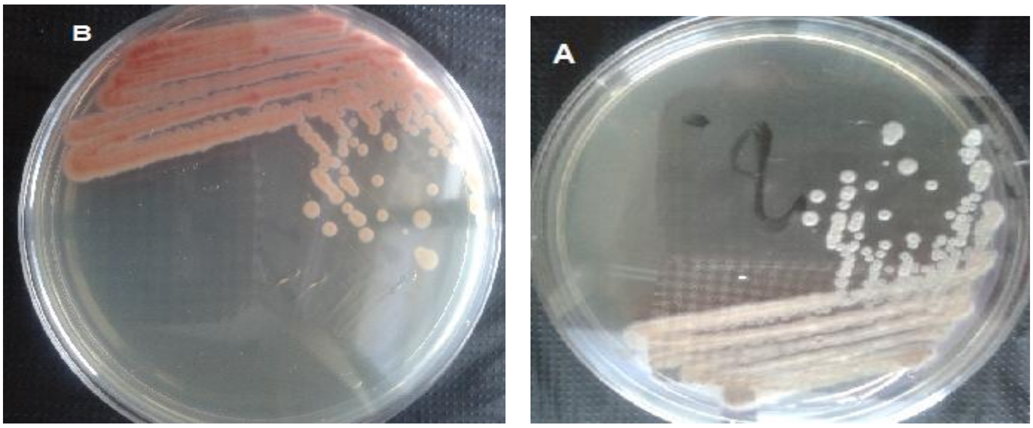
الجدول (1) الجراثيم الممرضة البشرية المعزولة ونوع العينة المأخوذة منها.

الجراثيم الممرضة	نوع العينة
Escherichia coli	بول
Klebsiella pneumoniae	دم
Serratia marcescens	بول
Pseudomonas aeruginosa	مفرزات أذن
Streptococcus faecalis	بول
Staphylococcus aureus	دم
Staphylococcus albus	بول
Proteus vulgaris	بول

نتائج الدراسة المورفولوجية والفيزيولوجية والحيوية الكيميائية لجنس *Streptomyces* المعزول من مياه البحر:

تمّ الحصول على ثلاث عزلات لجنس *Streptomyces*، تميزت عزلة واحدة بخصائص صادة تجاه الجراثيم الممرضة البشرية، عُزلت من مياه منطقة أفاميا البحرية في اللاذقية، ولم تُعزل من مياه منطقة ابن هاني.

يوضح الشكل (1) صورة للأفطورة الهوائية والأفطورة الركائزية لمستعمرة *Streptomyces* على وسط Marine-Agar medium.



الشكل (1) صورة لشكل مستعمرة *Streptomyces* (A) أفطورة هوائية، (B) أفطورة ركائزية ضمن وسط Marine-Agar medium.

بينت دراسة الساترة المائلة مجهرياً بعد تلوينها بصبغة غرام أن جراثيم *Streptomyces* المعزولة من المياه البحرية تظهر بشكل خلايا عصوية طويلة إيجابية صبغة غرام، وتأخذ شكل الخيوط أحياناً، وتترتب الأبواغ الخارجية بشكل سلاسل حلزونية، الشكل (2).

الشكل (2) صورة بالمجهر الضوئي تبين ترتيب سلاسل الأبواغ الحلزونية الشكل تكبير X 1000.

يوضح الجدول (2) بعض الصفات المورفولوجية لمستعمرة *Streptomyces* المعزولة من مياه البحر، وهي لا تنتج أصبغة منحلة ولا صبغة الميلانين، ولكنها تعطي أفطورة ركائزية ذات لون زهري على وسط Marine-Agar medium.

الجدول (2) بعض الصفات المورفولوجية لجنس *Streptomyces* المعزول من مياه البحر.

الصفات	النتائج
المستعمرة	مرتفعة فوق الوسط
سطح المستعمرة	أملس إلى مجعد قليلاً
الصبغة	صفراء
تلوين غرام	إيجابي
شكل الخلايا	عصوي طويل
الأبواغ	كروية الشكل
حركة الأبواغ	غير متحركة
لون الأفطورة الهوائية aerial mycelium	أبيض
لون الأفطورة الركائزية substrate mycelium	زهري إلى أحمر
سلاسل الأبواغ حلزونية	+
إنتاج أصبغة منحلة	-
إنتاج صبغة الميلانين على وسط peptone-yeast extract-iron agar	-

ويبين الجدول (3) بعض الصفات الحيوية الكيميائية لجراثيم جنس *Streptomyces* المعزول من مياه البحر، والملاحظ أن العزلة لا تنمو على وسط ماكونكي آغار، ولا تحلل الكازئين ولا النشاء ولا تطلق غاز H_2S، تحلل اليوريا والنترات والهلام والأرجنين، وإيجابية اختبار الكاتالاز والسيتوكروم أوكسيداز، أما اختبارات الإيميفيك فكانت سلبية الإندول وفوجس بروسكاور وإيجابية أحمر الميتيل والسترات، ولا تطلق غاز من سكر الغلوكوز.

وبيّن اختبار تحمل تراكيز مختلفة لملح كلوريد الصوديوم أن عزلة جنس *Streptomyces* تستطيع النمو في جميع التراكيز (1-1.5-2-2.5-3 -5 % وزن/حجم) باستثناء التركيز 7%، الجدول (3).

الجدول (3) بعض الصفات الحيوية الكيميائية لجنس *Streptomyces* المعزول من مياه البحر.

الاختبار	النتائج
النمو على وسط ماكونكي آغار	لا تنمو −
اختبار الإندول	−
اختبار أحمر الميتيل	+
فوجس بروسكار	−
اختبار السترات	+
إنتاج الغاز من الغلوكوز	−
تحلل الكازئين	−
تحلل النشاء	−

تابع الجدول (3) بعض الصفات الحيوية الكيميائية لجنس *Streptomyces* المعزول من مياه البحر.

تحلل اليوريا		+
إرجاع النترات		+
اختبار الستوكروم أوكسيد\از		+
تحلل الهلام		+
تحلل الأرجنين		+
إطلاق غاز H_2S		−
اختبار الكاتالاز		+
تحمل تراكيز مختلفة لكلوريد الصوديوم %NaCl وزن/حجم	1	+
	1.5	+
	2	+
	2.5	+
	3	+
	5	+
	7	−

الجدول (4) نتائج تخمر بعض السكريات وإنطلاق الحمض لجنس *Streptomyces* المعزول من مياه البحر.

السكر	النتيجة	السكر	النتيجة
غلوكوز	−	إينوزيتول	−
كزيلوز	−	فراكتوز	+
سكاروز	+	كالاكتوز	−
مالتوز	+	أدونيتول	−
رامينوز	+	سوربيتول	−

رافينوز	–	دكستروز	+
مانيتول	+		

يُظهر الجدول (4) أن جنس *Streptomyces* المعزول استخدم بعض السكريات كمصدر للكربون وأطلق الحمض من السكاروز والمالتوز والرامينوز والمانيتول والفراكتوز والدكستروز.

وبعد مطابقة الصفات المورفولوجية والفيزيولوجية والاختبارات الحيوية الكيميائية وتخمر السكريات المختلفة في الجداول (2 و 3 و 4) مع المراجع التصنيفية (Williams *et al.*, 1989; Sahin and Ugur 2003) لجنس *Streptomyces*، تبين أنه يطابق النوع *Streptomyces rochei* .

نتائج اختبار التصادية الجرثومية للنوع المعزول من مياه البحر *Streptomyces rochei* :

يوضح الجدول (5) خصائص التصادية الجرثومية للنوع المعزول *Streptomyces rochei* وتأثيره في نمو الجراثيم الممرضة البشرية بطريقة الزرع المتعامدة.

الجدول (5) نتائج التصادية الجرثومية للنوع المعزول *Streptomyces rochei* تجاه الجراثيم الممرضة البشرية.

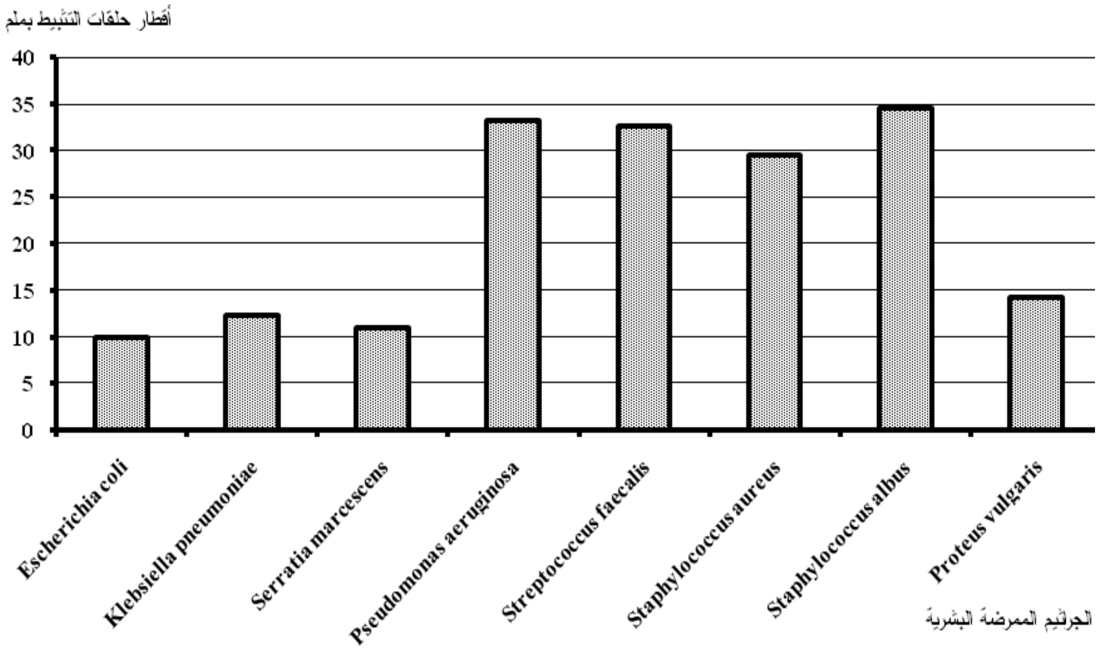
الأحياء الدقيقة	التأثير
Escherichia coli	+
Klebsiella pneumoniae	+
Serratia marcescens	+
Pseudomonas aeruginosa	+
Streptococcus faecalis	+
Staphylococcus aureus	+
Staphylococcus albus	+
Proteus vulgaris	+

وتبين أن المواد الناتجة من النوع المعزول *Streptomyces rochei* انتشرت ضمن طبقة الآغار وأثرت في جميع الجراثيم الممرضة البشرية المزروعة بشكل متعامد مع *Streptomyces rochei* ومنعت نمو الجراثيم السالبة صبغة غرام (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Proteus vulgaris*) والجراثيم الموجبة صبغة غرام (*Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*).

نتائج فعالية مستخلص *Streptomyces rochei* تجاه الجراثيم الممرضة البشرية بطريقة الانتشار بالأقراص:

كانت أقطار حلقات تثبيط مستخلص النوع *Streptomyces rochei* المعزول من مياه البحر تجاه الجراثيم الممرضة البشرية 34.6 ملم تجاه *Staphylococcus albus* و33.3 ملم تجاه *Pseudomonas aeruginosa*، و29.6 ملم تجاه *Staphylococcus aureus* و 32.6 ملم تجاه جراثيم *Streptococcus faecalis* ، وكانت

أقطار حلقات التثبيط تجاه بقية الجراثيم السلبية غرام أصغر وسجلت 10 ملم تجاه *Escherichia coli* و11 ملم تجاه *Serratia marcescens* و 12.3 ملم تجاه جراثيم الكليبسيلة الرئوية و 14.3 ملم تجاه جراثيم المتقلبة الشائعة، الشكل (3)



الشكل (3) أقطار حلقات التثبيط لمستخلص النوع *Streptomyces rochei* تجاه الجراثيم الممرضة البشرية بطريقة الانتشار بالقرص.

وتبين من خلال النتائج أن استخدام طريقة الزرع المتعامدة وطريقة الانتشار بالأقراص للمواد المستخلصة بخلات الإيتيل لدراسة الفعالية الصادة تجاه الجراثيم الممرضة البشرية حصلنا على نتائج متشابهة، إلاّ أنه في الطريقة الأولى لا يمكن قياس أقطار حلقات التثبيط، كما أنه تمّ استخدام المياه البحرية لتحضير الأوساط الزرعية بهدف تأمين أوساط تُحاكي الظروف الطبيعية للمياه البحرية وتساعد في نمو وعزل جراثيم *Streptomyces*.

قد تشابهت نتائج دراستنا مع دراسة (Rajan and Kannabiran 2013) حيث تمّ استخلاص المواد الفعالة بخلات الإيتيل من عزلة *Streptomyces* من جزر في المحيط الهندي، وأظهرت فعالية صادة لطيف واسع من الجراثيم في الزجاج، وخاصة جراثيم المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميسيلين Methicillin resistance *Staphylococcus aures* (MRSA) وجراثيم *Enterococci* المقاومة للفانكومايسين vancomycin–resistant *Enterococci* (VRE) وجراثيم *Bacillus* spp. وكذلك عُزلت جراثيم *Streptomyces* من المياه البحرية وأظهرت فعالية صادة للجراثيم في عدة دراسات، فقد عُزل النوع *Streptomyces griseus* من بحر قزوين Caspian في إيران (Harounabadi *et al.*, 2014) وأثرت في نمو الجراثيم السلبية غرام والإيجابية غرام، إلاّ أن أقطار حلقات التثبيط تجاه الجراثيم الإيجابية غرام أكبر من الجراثيم السلبية غرام، وهذا ما تطابق مع نتائج دراستنا. وتطابقت نتائجنا مع نتائج الباحث (Reddy *et al.*, 2011) في صفاته الصادة وطيفه الواسع تجاه جميع الأنواع الجرثومية الممرضة.

أن عدد المركبات الصادة للجراثيم الفريدة المكتشفة لأنواع جنس *Streptomyces* تضاعف بشكل أُسيّ خلال العقدين الأخيرين (Sahin 2003; Atta *et al.*, 2009)، وبالتالي فإن أنواع جنس *Streptomyces* تبقى المصدر الهام للصادات الحيوية المؤثرة في الجراثيم (Subash and Sasikumar 2013)، ويُعدّ النوع المعزول

Streptomyces rochei من الأنواع الهامة لكونه أثر في نمو الجراثيم الممرضة، فهو يفرز مستقلبات ثانوية ذات فعالية عالية في الجراثيم الممرضة البشرية المعزولة من عينات مرضية، وبالتالي يمكن استخلاص الصادات الحيوية منه ذات الطيف الواسع في تأثيرها في الجراثيم، وتجدر الإشارة إلى أنّ الأنواع الجرثومية المنتمية إلى جنس *Streptomyces* ذات المصدر البحري هي الأكثر أهمية في المجالات التطبيقية، إلاّ أن نموها بطيء مقارنةً بالجراثيم الأخرى.

الاستنتاجات والتوصيات:

تميّز النوع المعزول *Streptomyces rochei* من مياه البحر في منطقة أفاميا فقط بمدينة اللاذقية بخصائص صادة تجاه الجراثيم الممرضة البشرية، ومن الهام جداً التعرف على المستقلبات الثانوية الناتجة من النوع المعزول وفصلها وتحديدها. وتؤكد نتائج البحث أن مياه البحر وما تحويه من جراثيم *Streptomyces* يمكن أن تكون مصدراً لاكتشاف مواد صادة للجراثيم في المستقبل.

المراجع:

1-ARBAT, A. B. and ZODPE, S. N. *Biodiversity of Actinomycetes Species Isolated from Saline Belt of Akola District.* Microbiology, Vol. 4, N^{o}. 7, 2014, pp. 450-452.

2-ATTA H. M.; DABOUR S. M. and DESOUKEY S. G. *Sparsomycin Antibiotic Production by Streptomyces Sp. AZ-NIOFD1: Taxonomy, Fermentation, Purification and Biological Activities*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., Vol. 5 N^{o}. 3, 2009, pp. 368-377.

3-DAS, S.; LYLA, P.S.; AJMAL, K. S. *Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. Chin.* J. Oceanol. Limnol. Vol. 26, 2008, pp.166–77.

4-DHARMARAJ S.; ASHOKKUMAR B. and DHEVENDARAN K. *Isolation of marine Streptomyces and the evaluation of its bioactive potential.* African Journal of Microbiology Research Vol. 4, N^{o}. 4, 2010, pp. 240-248.

5-EBRAHIMI, Z. M.; SHAHIDI, B. G.H.; PADASHT, D. F.; AYATOLLAHI MOOSAVI SA, RASHID FAROKHI P, AGHIGHI S. *Biological control of rice blast (Magnaporthe oryzae) by use of Streptomyces sindeneusis isolate 263 in greenhouse.* Am. J. Appl. Sci. Vol. 6, 2009, pp. 194–9.

6-GARRITY, G. M.; BEH, J. A. and LILBURN, T. G., *Taxonomic Outline Of Prokaryotes, Bergey's manual of systemic bacteriology.* 2th edition, springer New York Berlin – Heidelberg, 2004, 401.

7-GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEGN. R., STIEY, J. T., *Bergey's manual of systemic bacteriology.* Springer USA, 2th edition, Vol. 2, 2005, pp. 1-1153.

8-HAROUNABADI, S.; MEIBODI, M. S.; COHAN, A. R.; MOSTAFAVI, K. S. S. *Identification of new Streptomyces driseus strains with potential antimicrobial activity isolated from Caspian Sea*. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. Vol. 43, N^{o}. 12, 2014, pp. 1-4.

9-HOSSAIN, N. and RAHMAN, M. *Antagonistic Activity of Antibiotic Producing Streptomyces sp. against Fish and Human Pathogenic Bacteria*. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 57, N^{o}. 2, 2014, pp. 233-237.

10-KADIRI, K. S.; YARLA, S. N. and VIDAVALUR, S. *Screening and Isolation of Antagonistic Actinobacteria Associated With Marine Sponges from Indian Coast*. J. Microb. Biochem. Technol. ISSN: 2014, Vol. 58, 2014, pp. 1-3.

11-MOHSENI, M.; HAMED, N.; HAMEDI, J.; ROOHI, A. *Screening of Antibacterial Producing Actinomycetes from Sediments of the Caspian Sea.* Int. J. Mol. Cell Med. Spring. Vol. 2, N^{o}. 2, 2013, pp. 63-71.

12-NAIKPATIL S. V. and RATHOD J. L. *Antimicrobial And Cytotoxic activity of actinomycetes from karwar coast, west coast of India.* World Journal of Science and Technology. Vol. 1, N^{o}. 1, 2011, pp. 7-10.

13-NARENDHRAN, S.; RAJIV, P.; VANATHI, P.; SIVARAJ, R. *Spectroscopic analysis of bioactive compounds from Streptomyces cavouresis kuv39: Evaluation of antioxidant and cytotoxicity activity*. Int. J. Pharm. Sci., 2014, Vol. 6, N^{o}. 7, pp. 319-22.

14-OKAZAKI T.; OKAMI Y. *Studies on marine microorganisms. II. Actinomycetes in Sagami Bay and their antibiotic substances.* J Antibiot (Tokyo) 1972, Vol. 25, N^{o}. 8, pp. 461-6.

15-POOSARLA, A.; RAMANA, V. and KRISHNA, M. R. *Isolation of potent antibiotic producing Actinomycetes from marine sediments of Andaman and Nicobar Marine Islands.* Journal of Microbiology and Antimicrobials. Vol. 5, N^{o}. 1, 2013, pp. 6-12.

16-RAJAN M. B. and KANNABIRAN, K. *Antagonistic activity of marine Streptomyces sp. VITBRK1 on drug resistant gram positive cocci.* Der. Pharmacia. Lettre, Vol. 5, N^{o}. 3, 2013, pp. 185-191.

17-REDDY, N. G.; RAMAKRISHNA, D.P.N. and RAJA GOPAL S. V. A *Morphological, Physiological and Biochemical Studies of Marine Streptomyces rochei (MTCC10109) Showing Antagonistic Activity Against Selective Human Pathogenic Microorganisms*. Asian J. Biol. Sci. Vol. 4, 2011, pp. 1-14.

18-SAHIN N. and UGUR A., *Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates.* Turk. J. Biol., Vol. 27, 2003, pp. 79-84.

19-SUBASH, N. and SASIKUMAR, C., *Isolation and Characterization of Bioactive Streptomyces from Agricultural Soil.* Elecronic Journal of Pharmacology and Therapy. Vol. 6, 2013, pp. 1-5

20-SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. *Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites.* Microbiological Microbiological Research, Vol. 167, 2012, pp. 571-580.

21-SUGATHAN, S.; MANILAL, A.; GEZMU, T.; MERDEKIOS, B.; SELVIN, J.; TSALLA, T.; IDHAYADHULLA, A. and KADAIKUNNAN, S. *Evaluating the Antibacterial Potential of Streptomyces* sp. iMedPub Journals. Vol. 6, N^{o}. 1:3. 2015, available in: www.jneuro.com.

22-TAKIZAWA, M.; COLWELL, R.R.; HILL, R.T., *Isolation and diversity of actinomycetes in the chesapeake bay.* Appl. Environ. Microbiol. 1993, Vol. 59, N^{o}. 4, pp. 997-1002.

23-THIRUMURUGAN, D. and VIJAYAKUMAR, R. *A potent fish pathogenic bacterial killer Streptomyces sp. isolated from the soils of east coast region, South India.* Journal of Coastal life Medicine. Vol. 13, 2013, pp. 175-180.

24-THUMAR, T. J.; DHULIA, K.; SINGH, P. S. *Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic Streptomyces aburaviensis strain Kut-8.* World J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 26, 2010, pp. 2081–2087.

25-USHA, N. S.; SANGARESHWARI, S.; KUMARI, L. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Bioactive Constituents From the Marine Streptomyces.* Asian J. Pharm. Clin. Res. Vol. 8, N^{o}. 2, 2015, pp. 244-246.

26-VIJAYAKUMAR, R.; PANNEERSELVAM, K.; MUTHUKUMAR, C.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A.; Saravanamuthu, R. *Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete Streptomyces afghaniensis VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India*. Indian J. Microbiol. Vol. 52, N^{o}. 2, 2012, pp. 230-239.

27-WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G., *Genus Streptomyces. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (ed), Williams ST. Sharope ME. Holt* JM. Vol. 4, Williams and Wilkins, Baltimore, 1989, pp. 2452-2492.