

## الفعالية المضادة لتكوين الغشاء الحيوي للـ Mersacidin المنتج من *Bacillus sp.-AE* ضد *Acinetobacter junii* و *Acinetobacter baumannii* المعزولة من عينات سريرية

اسراء غانم حازم السماك

آلاء نزار محمود النجم

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

p-ISSN: 1608-9391  
e-ISSN: 2664-2786

### Article information

Received: 26/1/2023

Revised: 20/ 3/ 2023

Accepted: 28/3/2023

DOI:

10.33899/rjs.2024.183433

### corresponding author:

آلاء نزار محمود النجم

[alaanazarmicro@gmail.com](mailto:alaanazarmicro@gmail.com)

اسراء غانم حازم السماك

[esrsbio19@uomosul.edu.iq](mailto:esrsbio19@uomosul.edu.iq)

### المخلص

جُمعت 160 عينة سريرية، عزلت 120 عزلة التابعة لجنس *Acinetobacter spp* وبنسبة 75%، وكانت أعلى نسبة من الحروق 85.7%، الجروح بنسبة 75.6%، قرحة القدم السكرية بنسبة 75%، مسحة اللوزتين بنسبة 66.6%، الادرار من حالات التهاب الجهاز البولي والفشل الكلوي بنسبة 50% وسائل النخاع الشوكي C.S.F بنسبة 25% من مستشفيات الموصل المختلفة. وتم انتقاء 13 عزلة تابعة للنوعين *Acinetobacter junii-AE*، *baumannii-AE* والاختبارات الكيموحيوية، تم إيجاد العلاقة التطورية اعتمادا على مقارنة تتابع rRNA 16S والحصول على 3 عناقيد التابعة لجنس *Acinetobacter* باستعمال برنامج (Mega7) وطريقة التعقد بالاعتماد على المعدل غير الموزون (UPGMA). إذ تعقدت سلالات النوع *A.baumannii* عند نسبة تشابه 98.05% ضمن العنقود (A) بينما تعقدت سلالات النوع *A. junii* عند نسبة تشابه 98.2% ضمن العنقود (B) وتعقدت سلالات النوع *A.junii* عند نسبة تشابه 98.75% ضمن عنقود (C). أظهرت النتائج أن جنس *Acinetobacter* منتج للغشاء الحيوي بنسبة 53.8% بشكل قوي بينما كان متوسط الانتاج على وسط CRA بنسبة 46.1% في حين اظهرت النتائج على MTP نسبة 53.8% انتاج قوي للطبقة المخاطية بغزارة وذات مستعمرات بلون غامق و 46.1% متوسطة الانتاج للغشاء الحيوي بمستعمرات بلون بني، إن التركيز المثبط الأدنى للبكتريوسين Mersacidin المستخلص من السلالة *Bacillus sp. -AE* ضد العزلات المرضية *A.junii* و *A.baumannii* ما بين (625-2500) مايكرو غرام/ مل بينما التركيز ما تحت المثبط الأدنى sub MIC ما بين (312.5-1250) مايكرو غرام/ مل، كذلك أظهرت السلالة *Bacillus sp.-AE* المنتجة للبكتريوسين من النوع Mersacidin أعلى تأثير مضاد لتكوين الغشاء الحيوي لسلالات النوع *A. junii* و *A.baumannii* المكونة للغشاء الحيوي وبشكل قوي.

الكلمات الدالة: الغشاء الحيوي، *Acinetobacter*، Mersacidin، *Bacillus sp.*

### المقدمة

البكتيريا المرضية هي البكتيريا التي تمتلك اليات تمكنها من انتشار العدوى البكتيرية، لذا ترتبط شدة إمرضية البكتيريا بعوامل محددة تعرف بعوامل الضراوة والتي من شأنها أن تعمل على الارتباط وغزو الأنسجة وتعزيز العدوى البكتيرية من خلال التهرب من الاستجابة المناعية للمضيف، فضلاً عن قدرتها على اكتساب مقاومة لأغلب المضادات الحيوية بالتالي يصعب علاجها، تعتبر هذه العوامل مقياساً لدرجة إمرضية البكتيريا حيث كلما ازدادت أنواع عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتيريا كلما كانت الإصابة أكثر ضراوة وتعزز استعمارها للمضيف (De Nies et al., 2021).

نشرت منظمة الصحة العالمية WHO (2019) قائمة خاصة بمسببات الأمراض المقاومة للأدوية المتعددة من هذه المسببات ESKAPE والتي تشمل *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. (Motiwala et al., 2022).

أهم الخصائص العامة لجنس *Acinetobacter* غير متحركة لكن تمتلك نوعاً من الحركة الارتعاشية لوجود الشعيرات القطبية Polar fimbriae (Doughari et al., 2011). تُعد واسعة الانتشار في الطبيعة، هوائية إجبارية، عصوية مكورة أو كروية Coccobacilli، سالبة لصبغة كرام، غير منتجة للأوكسيديز، بينما تنتج الكتاليز، وهي من مسببات الأمراض الانتهازية المعروفة بإصابات عدوى المستشفيات إذ أنها عزلت من مصادر متنوعة من أجهزة التنفس الصناعي وأجهزة البخاخات والمرضى الراقدين في المستشفى كما عزلت من جلد الأفراد العاملين ونسبة (25-40)% (Saharman et al., 2018).

تعد خلايا *Acinetobacter baumannii* عصوية قصيرة منتقخة بحجم (1.5-2.5) مايكرو ميتر تتميز أنها مقاومة للجفاف فتعيش على الأسطح الجافة غير الحية لتكوينها الغشاء الحيوي Biofilms (Benoit et al., 2020). بحيث تبقى لمدة أربعة أشهر على قيد الحياة ونموها عند درجة حرارة 44°م مما يميزها عن بقية أنواع جنس *Acinetobacter*، أكدت الدراسات ارتفاع معدل الإصابة بهذه البكتيريا في المستشفيات وذلك بسبب مقاومتها العالية للمضادات الحيوية مما أدت الى زيادة صعوبة العلاج السريري لها، ويمكن تمييزها بسهولة عند نموها على الأوساط الزرعية الانتقائية لها، منها وسط *Acinetobacter Agar Base* HiCrome™ والتي تبدو مستعمراتها بلون بنفسجي شاحب (Almasaudi, 2018; Benoit et al., 2020).

يعد النوع *Acinetobacter junii* واحداً من (51) نوع مختلفاً ينتمي الى جنس *Acinetobacter* ويرتبط بشكل اساس بعدوى المستشفيات، إذ يسبب التهابات متعددة للإنسان، ويستعمر الجلد والجروح والجهاز التنفسي مما يؤدي للالتهاب الرئوي وكذلك الجهاز الهضمي والتهاب جروح العمليات الجراحية (Abo-Zed et al., 2020).

لذلك أنجبه الكثير من الباحثين لاكتشاف الأحياء المجهرية المنتجة للبكتيروسينات بصورة واسعة في الطبيعة، لكن التربة اعتبرت المصدر الرئيسي لعزلها والحصول على سلالات منتجة للبكتيروسين أهمها افراد جنس الـ *Bacillus* التي تنتج انواعاً مختلفة من المضادات الحيوية وكذلك البكتيروسين والذي يُعد من أنظمة الدفاع الجرثومية تضمنت مركبات بروتينية أو بيتيدية، كمضادات حيوية بدرجة عالية من الخصوصية ضد الإصابات المرضية وبطيف واسع (Wu et al., 2018). تمتلك فعالية قاتلة للبكتيريا أو مثبطة لها وهذا يجعلها تتنافس في البيئة التي تعيش فيها (Rodrigues et al., 2019; Santhi and Aranganathan, 2021).

اتجهت الدراسات الحالية الى الأساليب الوقائية بدلاً من العلاجية، إذ تم استخدام المضادات الحيوية لعلاج البكتيريا المرضية المسببة للإمراض منذ أكثر من نصف قرن، لكن الاستخدام المتكرر وإساءة استخدام المضادات الحيوية من قبل الصناعات الغذائية والصيدلانية تسببت في ظهور كائنات متعدد المقاومة للمضادات الحيوية (Balouiri and Ibsouda, 2016).

يعد تكوين الغشاء الحيوي من أهم الآليات التي تمكن البكتيريا المرضية من الاستعمار وبالتالي أحداث الإصابة وإن تكوين الغشاء الحيوي عبارة عن عملية معقدة تحتاج إلى تنظيم بتجمع الخلايا البكتيرية مع بعضها على الأسطح خارج خلوية أو الخلايا الحية، لتشكل مجموعات مدمجة معاً مما يساعدها في تثبيت الغشاء الحيوي وإطالة بقائها في البيئة، وتتكون غالباً من نوع بكتيري واحد أو تشارك في تكوينه عدة أنواع بكتيرية مختلفة تتداخل مع بعضها ومع البيئة التي تعيش فيها (Kovács and Stanley-Wall, 2021).

تهدف الدراسة الحالية إلى التشخيص المظهري والجزئي لبكتريا *Acinetobacter* و *Acinetobacter baumannii* المعزولة من عينات سريرية مختلفة، إضافة إلى التحري عن التأثير التثبيطي للبكتريوسين المنتج من الـ *Bacillus junii* ضد تكوين الغشاء الحيوي للأنواع الممرضة المتعددة المقاومة والمعزولة من حالات مرضية.

### المواد وطرائق العمل

#### عزل وتشخيص

جمعت (160) عينة سريرية ضمت مسحات من الجلد للمصابين بالحروق والجروح وخراجات القدم المصابين بمرض السكري، بالإضافة إلى مسحات اللوزتين وعينات من سائل النخاع الشوكي C.S.F وعينات الأدرار، من مستشفيات الموصل: مستشفى ابن سينا التعليمي، مركز الموصل التخصصي للحروق والجراحة العامة، المستشفى الجمهوري خلال المدة ايلول 2021 إلى شباط 2022 وبأعمار مختلفة لكلا الجنسين. زرعت جميعها على الوسط الخاص *Acinetobacter* Agar Base <sup>TM</sup> Hi Crome من شركة (India) Himedia كوسط اختياري لبكتريا *Acinetobacter* spp. بطريقة التخطيط (Streaking method) فضلاً عن زرعها على وسط أكار الماكونكي ووسط أكار الدم من شركة Neogen (UK)، وحُضنت في ظروف هوائية بدرجة حرارة (37 م) ولمدة 24-48 ساعة (MacFaddin, 2000). فحصت مجهرياً لملاحظة أشكال وترتيب واحجام الخلايا البكتيرية المرضية وتفاعلها مع صبغة كرام (Jawetz et al., 2019). أجريت بعض الاختبارات الكيموحيوية التالية لتشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة كاختبار الاوكسيداز (MacFaddin, 2000)، اختبار الكتاليز (Cappuccino and Sherman, 2014)، اختبار تحلل الدم (Tille, 2017) واختبار النمو بدرجة حرارة 44°م (MacFaddin, 2000).

#### التشخيص الجزيئي

تم استخلاص الدنا البكتيري من أفراد جنس *Acinetobacter* spp. باستعمال Presto <sup>TM</sup> Mini g DNA Bacteria kit المجهز من شركة Geneaid (Taiwan)، ثم أجري الترحيل الكهربائي بجهاز Thermo cycler (PCR) سويدي المنشأ Maanlab AB M1000-G لنتائج تفاعل الـ PCR للكشف عن الدنا المضاعف باستخدام هلام الأكاروز المجهز من شركة Promega (USA) بتركيز (2%).

أستخدم البادئ العام Universal Primer، لتحديد مورث 16S r RNA كما موضح في (الجدول 1) والمجهز من شركة Alpha DNA بهيئة مُجفدة. تم استخدام البرنامج في جهاز المبلر الحراري PCR وكما في (الجدول 2).

الجدول 1: تسلسل وطول البادئ للتحري عن مورث 16SrRNA المستخدم لتشخيص *Acinetobacter* المعزولة في الدراسة

المصدر	طول الناتج (bp)	التسلسل 5'→3'	البادئ
Cotârlet <i>et al.</i> , 2010	1492	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16SrRNA-F
		ATGGACCAGGCCACGATTTT	16SrRNA-R

الجدول 2: برنامج تفاعل مزيج ال PCR في تضخيم مورث 16SrRNA

التسلسل	المرحلة	عدد الدورات	الحرارة (م°)	الوقت
1	المسخ الأولي لشريط ال DNA Initial Denaturation	1	95	6 دقائق
2	مسح القالب Denaturation	35	95	45 ثانية
3	ارتباط البادئ لقالب الدنا Annealing		58	1 دقيقة
4	استطالة البادئ المرتبط Extension		72	1 دقيقة
5	الاستطالة النهائية Final extension	1	72	5 دقيقة

تحديد تتابعات القواعد النروجينية لمورث 16S rRNA لعزلات جنس *Acinetobacter spp.* والعلاقة التطورية لها

أُرسلت نواتج تضخيم ال PCR للعزلات قيد الدراسة لمورث 16SrRNA الى مختبر MacroGene في كوريا الجنوبية (South Korea)، وتم مقارنة التتابعات المستحصل عليها للعزلات قيد الدراسة مع موقع ال NCBI باستخدام ال BLAST. تم تحديد العلاقة بين السلالات المشخصة قيد الدراسة من خلال مقارنة التتابعات بـ Clustal W للسلالات قيد الدراسة وتحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic Tree Analysis باستخدام برنامج MEGA 7 وطريقة المعدل غير الموزون Unweighted Pair-Group Average Method (Kaur and Kaur, 2015).

الفحص النوعي على تكوين الطبقة اللزجة باستخدام وسط أكار الكونغو الأحمر

أُخذت مستعمرة نقيه من وسط أكار نقيع القلب- الدماغ للعزلات البكتيرية قيد الدراسة، زُرعت على وسط أكار الكونغو الأحمر من شركة Merc (Germany)، حُضنت بدرجة حرارة (37 م°) لمدة (24 ساعة) في ظروف هوائية. النتيجة الموجبة تعتمد على ألوان المستعمرات: إنتاج قوي للطبقة اللزجة يتمثل بظهور مستعمرات سوداء أو رمادية مائلة الى اللون الأسود ذات تآلق بلوري، إنتاج ضعيف أو متوسط للطبقة اللزجة يتمثل بظهور مستعمرات باللون البني أو الوردية والنتيجة السالبة تتمثل بظهور مستعمرات باللون الأحمر الغامق أو باللون الوردية الداكن (Makled *et al.*, 2017; Kaiser *et al.*, 2013).

التحري عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على تكوين الغشاء الحيوي

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm باستعمال طريقة الصفيحة العيارية Microtiter Plate Method المعقمة والحويية على (96 حفرة) كما أشار لها الباحثون (Babapour *et al.*, 2016; Fusco *et al.*, 2017; Cruz-Soto *et al.*, 2020)، حُدثت كفاءة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي من خلال مقارنة القراءات وفقاً للمعادلات التالية: تُعد العزلة غير مكونة للغشاء الحيوي: إذا كان معدل الكثافة الضوئية لمعامل السيطرة سالبا Negative، أكبر، أو يساوي معدل الكثافة الضوئية للعزلة ( $OD \leq OD_c$ )، تُعد العزلة ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي: إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة أكبر من معدل الكثافة الضوئية للسيطرة، أو مساوياً، أو أصغر من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة Control ( $OD_c < OD \leq 2XOD_c$ )، تُعد العزلة متوسطة التكوين للغشاء الحيوي: إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة أكبر من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة، أو أصغر، أو يساوي أربعة أضعاف السيطرة Control

تُعد العزلة قوية التكوين للغشاء الحيوي: إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة أكبر من أربعة ( $2XOD < OD \leq 4XOD_C$ ). أضعاف السيطرة Control ( $OD > 4XOD_C$ ).

#### طريقة تحضير البكتريوسين

حُضر اللقاح البكتيري للعزلة المشخصة *Bacillus sp.-AE* في (10 مل) من وسط مرق نقيع القلب- الدماغ، الموزع في دوارق معقمة ساعة كل منها (250 مل)، حُضنت بدرجة حرارة (37 °م) لمدة (18-24) ساعة. باستخدام وسط Synthetic KI medium المحضّر بإضافة المواد المكونة من:

المكونات	غم / لتر
Glucose	(5)
CaCl <sub>2</sub>	(20)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(4)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(2.6)
MgSO <sub>4</sub>	(4)
NaCl	(2)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	(0.002)
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	(0.002)
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	(0.0015)

وإذابتها في (1 لتر) من الماء المقطر، ضُبط الأس الهيدروجيني عند (7.2)، ووزع في دوارق معقمة ساعة كل منها (250 مل)، عُقمت بالمؤسدة (121 °م) لمدة (24-48 ساعة)، نُفح الوسط باللقاح البكتيري، وحُضنت في حاضنة هزازة وبسرعة دوران (200 دورة/دقيقة) تحت ظروف هوائية بدرجة حرارة (37 °م) ولمدة (24-48 ساعة) (Teng et al., 2012; Lajis, 2020).

#### استخلاص البكتريوسين من جنس *Bacillus spp* بالطريقة المباشرة Direct method

أخذ الوسط Synthetic KI medium وأجري له نبذ مركزي مبرد بسرعة (10000 دورة/دقيقة) لمدة (15 دقيقة) وبدرجة حرارة 4 °م (Yousef, et al., 2011)، تم التخلص من الراسب وأخذ راسح المزرعة البكتيرية الخالي من الخلايا (CFCS) Cell free culture supernatant، ووضع في قنّان زجاجية صغيرة معقمة ومزج مع نفس الكمية من المذيبات (2 كلوروفوم: 1 ميثانول) حجم: حجم (Guyonnet et al., 2000)، أُستخدم قمع الفصل separating funnel للحصول على الطبقة المائية الأعلى ذات اللون الحليبي والحاوية على البكتريوسين. ثم رُشح بمرشحات دقيقة ذات قطر (0.45 مايكروميتر)، ووزع في أطباق زجاجية معقمة وجُففت بطريقتين:

الأولى: وضعت بالفرن Oven بدرجة حرارة (60 °م) لمدة (24 ساعة).

الثانية: وضعت في الحاضنة بدرجة (37 °م) لمدة (9 أيام).

تم الحصول على مادة جافة (Shubhrasekhar et al., 2013; Umar et al., 2021).

قياس التركيز المثبط الأدنى للبكتيريوسين المستخلص من جنس *Bacillus spp.* ضد بعض البكتيريا المرضية.

### 1- طريقة الأنبوب Tube method

أُستُخدمت طريقة التخفيف الكبيرة Macro Dilution Method و بواقع 10 أنابيب اختبار، أُجريت اعتماداً على طريقة (Saginur *et al.*, 2006) كالآتي:

أُضيف (1000 مايكرو ليتر) من وسط المرق المغذي Nutreint broth الى (10) أنابيب اختبار. وأُضيف (1000 مايكرو ليتر) من البكتيريوسين المُحضّر مسبقاً بتركيز (10000 مايكروغرام/مل) الى الأنبوب رقم (1) للحصول على تركيز (5000 مايكروغرام/مل)، ثم نقل (1000 مايكرو ليتر) من الأنبوبة رقم (1) الى الأنبوبة رقم (2)، ومزجت للحصول على تركيز (2500 مايكروغرام/مل). تم تكرار الخطوات وصولاً الى الأنبوبة رقم (9)، سحب منه (1000 مايكرو ليتر) وأهمّل، وبهذا تم الحصول على التراكيز الآتية: (19.5، 39، 78.125، 156.25، 312.5، 625، 1250، 2500، 5000) مايكروغرام/مل. أُضيف (100 مايكرو ليتر) من المعلق البكتيري للبكتيريا المرضية قيد الدراسة بعمر (18-24) ساعة الى كل الأنابيب، وبتركيز  $1.5 \times 10^8$  خلية/مل مقارنةً مع أنبوبة ماكفرلاند (0.5). يعتبر الأنبوب رقم (9) الحاوي على وسط المرق المغذي Nutreint broth الملقح بالبكتيريا كسيطرة موجبة ( $^{+ve}$  Control). الأنبوب رقم (10) حاوية على وسط المرق المغذي Nutreint broth والبكتيريوسين كسيطرة سالبة ( $^{-ve}$  Control). حُضنت جميع الأنابيب بدرجة حرارة (37 م°) ومدة (18-24 ساعة). وحدد التركيز المثبط الأدنى على أنه أقل تركيز يمنع ظهور العكارة المرئية.

تقدير الفعالية المضادة لتكوين الغشاء الحيوي للبكتيريوسين المنتج من *Bacillus sp.-AE* ضد بعض البكتيريا المرضية بطريقة الصفيحة العيارية

تمت الدراسة كما ورد عن (Salman and Abdullah, 2014) بالخطوات الآتية: حُضِر اللقاح البكتيري للبكتيريا المرضية من وسط مرق نقيع القلب- الدماغ بعمر (18-24) ساعة المضاف له 2% سكروز، وضع 200 مايكرو ليتر من وسط مرق نقيع القلب- الدماغ (الخالي من البكتيريا) في حفر الصف الأول من الصفيحة العيارية Microtiter plate وُعِدت كسيطرة سالبة. وضع 100 مايكرو ليتر من التركيز المثبط الأدنى للبكتيريوسين لحفر الصف الثاني مع عمل مكررين لكل تخفيف، بالإضافة الى وضع 100 مايكرو ليتر من تركيز البكتيريوسين تحت الأدنى في الحفر الأخيرة للصف السابع والثامن، وبنفس الطريقة أُتبعَت لكل نوع بكتيري ممرض قيد الدراسة. وضع 100 مايكرو ليتر من اللقاح ولجميع الحفر اعتماداً على نوع البكتيريا المرضية المستخدمة. حُضنت بدرجة حرارة (37 م°) لمدة 18-24 ساعة. تم التخلص من الخلايا البكتيرية غير الملتصقة، بغسلها بمحلول الملحي الفسيولوجي (200 مايكرو ليتر)، جُففت بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة، أُضيف 200 مايكرو ليتر من الصبغة البنفسجية Crystal Violet بتركيز 1% لكل حفرة، تركت الصفيحة العيارية لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 45 دقيقة. أخيراً أُضيف 200 مايكرو ليتر من كحول الايثانول بتركيز 99% الى كل حفرة. قيسَت الكثافة الضوئية (OD) عند الطول الموجي (630nm) باستعمال جهاز قارئ الاليزا (ELIZA Microplate reader) أمريكي المنشأ.

### النتائج والمناقشة

#### 1:4 العزل

جُمعت 160 عينة من مسحات (الحروق، الجروح، قرحة القدم السكرية Diabetic Foot Ulcer، مسحات اللوزتين، بالإضافة الى عينات الادرار من حالات التهاب الجهاز البولي والفشل الكلوي، وعينات سائل النخاع الشوكي (C.S.F)، عزلت منها 120 عزلة بنسبة 75% التابعة لجنس *Acinetobacter spp.* من كلا الجنسين بمختلف

الاعمار من مستشفيات الموصل المختلفة. وتم الحصول على سلالة قياسية من النوع *Acinetobacter baumannii* ATCC19606.

أظهرت النتائج وكما موضح بـ (الجدول 3) أن أعلى نسبة عزل كانت من الحروق بنسبة 85.7% ومسحة الجروح بنسبة 75.6% وقرحة القدم السكرية Diabetic Foot Ulcer بنسبة 75% ومسحة اللوزتين بنسبة 66.6% تليها الادرار بنسبة 50% وسائل النخاع الشوكي بنسبة 25%، نسب العزل بالنسبة للذكور 49.1% وبفرق قليل عن النسبة لمرضى الاناث حيث كانت 47.5%. إن تباين نسب العزل من الحروق ثم قرحة القدم السكرية والجروح وتليها بقية العينات المأخوذة من المرضى قد تعود الى أن بكتيريا *Acinetobacter* تُعد من الممرضات الانتهازية، المسببة لعدوى المستشفيات Nosocomial Infection إذ أنها تنتهز فرص حدوث أي اختلال عام أو موضعي في دفاعات الجسم خاصةً عند المرضى المثبطين مناعياً، ويمكن ان تكتسب من داخل المستشفيات بسبب الرقود في المستشفيات لأيام طويلة خاصة مرضى الحروق وبعد العمليات الجراحية وعند نقل الدم للمريض فتزيد من احتمالية الإصابة بها، وايضاً بسبب قدرتها الكبيرة على مقاومة الجفاف والبقاء على الأسطح الجافة في ظروف نقص المغذيات مما سهل من استمرار بقائها في البيئة (Younus and Essa, 2022; Fiji et al., 2022).

الجدول 3: النسب المئوية للعزلات التابعة لجنس *Acinetobacter* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة

ت	نوع العينة	عدد العينات	عدد عزلات <i>Acinetobacter</i>	نسبة العزل الى العدد الكلي للعينات	العدد والنسبة اعتماداً على الجنس		النسبة المئوية اعتماداً على نوع العينة
					ذكور	إناث	
1	مسحة الحروق Burn	84	72	42.5%	31 (43%)	40 (55.5%)	85.7%
2	مسحة الجروح Wound	37	28	17.5%	16 (43.2%)	11 (29.7%)	75.6%
3	قرحة القدم السكرية Diabetic Foot Ulcer	16	12	6.25%	4 (33.3%)	2 (16.6%)	75%
4	مسحة اللوزتين	13	4	2.5%	5 (38.4%)	3 (23%)	66.6%
5	الادرار	6	3	1.87%	2 (33.3%)	1 (16.6%)	50%
6	وسائل النخاع الشوكي Cerebrospinal Fluid	4	1	0.62%	1 (25%)	0%	25%
	العدد الكلي	160	120	75%	59 (49.1%)	57 (47.5%)	100%

تم اعتماد بعض الاختبارات لتشخيص أفراد جنس *Acinetobacter* وكما موضح في (الجدول 4). كما تم تشخيص أفراد جنس *Acinetobacter* باستخدام الوسط الخاص Crome™ *Acinetobacter* Agar Base Hi وأن شكل خلاياها عصوية قصيرة وسالبة لصبغة كرام وموجبة للكتاليز وسالبة للاوكسيديز (Gordon and Wareham, 2009; Fiji et al., 2022).

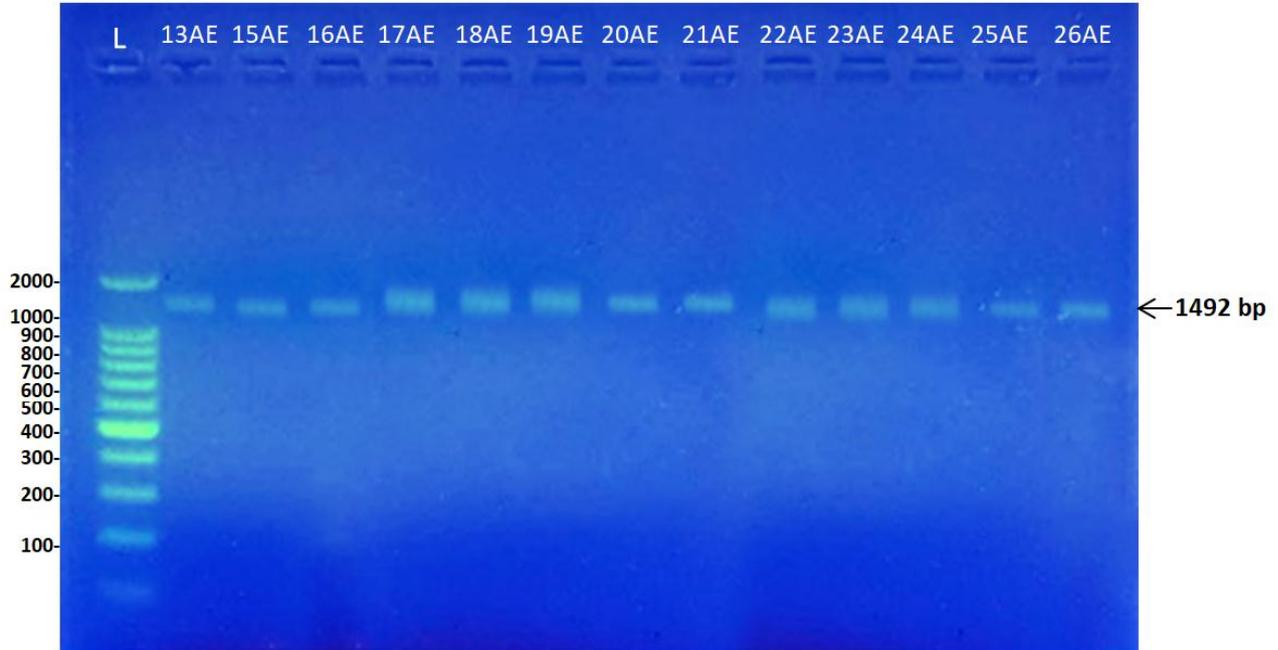
الجدول 4: الاختبارات الشكلية والكيموحيوية للعزلات المرضية قيد الدراسة

الاختبارات الكيموحيوية				العدد	اسم العزلة
النمو بدرجة حرارة 44°م	تحلل الدم	الكتاليز	الاوكسيديز		
+	-	+	-	120	<i>Acinetobacter</i> spp.-AE
+	-	+	-	سلالة مرجعية من ATCC	<i>A.baumannii</i> ATCC19606

+ موجبة، - سالبة

التشخيص الجزيئي لأنواع جنس *Acinetobacter* قيد الدراسة

استخدم البادئ العام Universal Primer RNA 16S r في التشخيص الجزيئي وتحديد الهوية البكتيرية بدراسة تتابعات المورث RNA 16S r لـ 13 عزلة التابعة لجنس *Acinetobacter* قيد الدراسة باستعمال تقنية المبلر الحراري الـ RCR الجزيئية الذي ظهر عند الموقع 1465 زوج قاعدي كما موضح في الصورة (1).

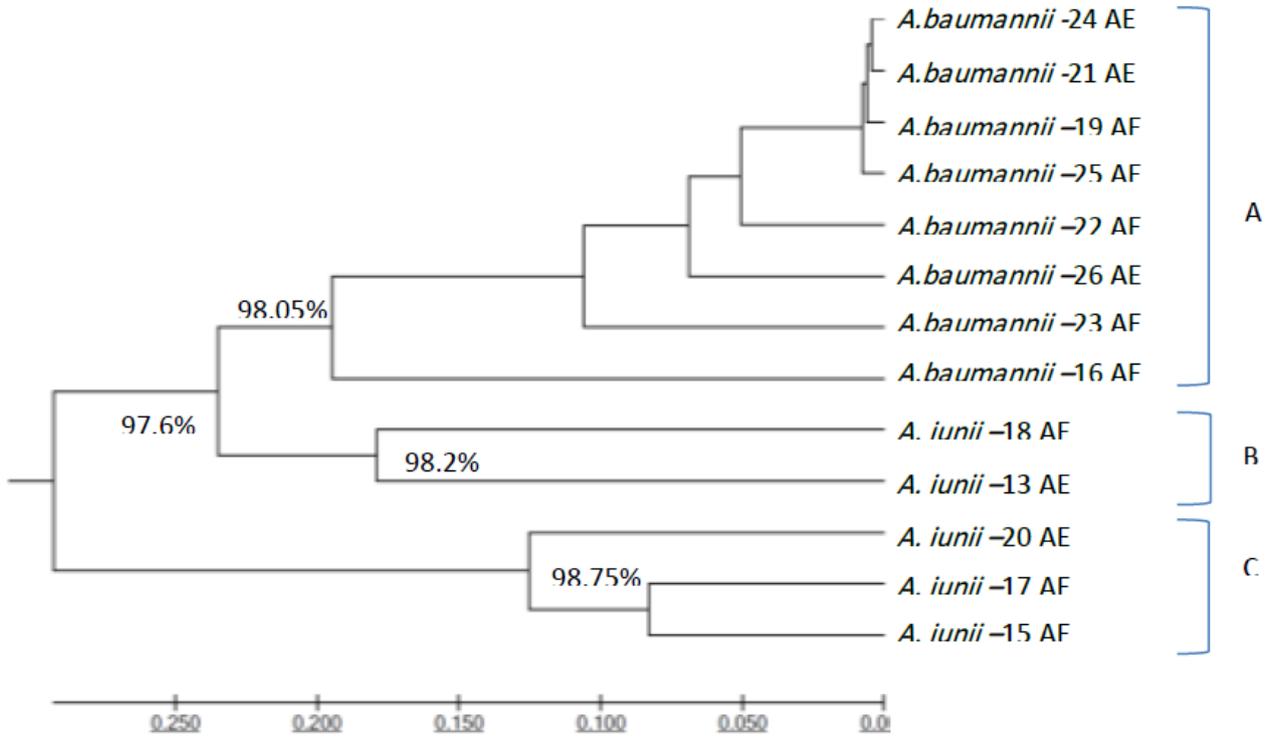


الصورة 1: نواتج تضخيم تفاعل الـ PCR لتحديد موقع الحزم لمورث 16 S rRNA عند الحجم الجزيئي 1465 bp للسلاسل التابعة للـ *Acinetobacter* باستخدام 2% من هلام الأكاروز واستخدام الدليل الحجمي M (2000) زوج قاعدي.

أن التشخيص السريع لأفراد جنس *Acinetobacter* بهذه التقنية الحديثة أدى الى التقليل من صعوبة تشخيصها نظرا لتشابه الانواع فيما بينها (Celandroni *et al.*, 2019). تم مقارنة النتائج ضمن المركز الوطني لمعلومات التقانات الحياتية NCBI باستخدام (BLAST)، وجد ان السلاسل أظهرت نسبة تشابهاً مع السلاسل المرجعية المسجلة بدرجات متفاوتة لسلاسل *Acinetobacter* التي تراوحت بين (88-100) اعتمادا على نوع السلالة. استخدم المورث RNA 16S r في تشخيص مدى واسع من الانواع أو الاجناس البكتيرية نظراً لكون هذا المورث متواجدا في جميع الأنواع البكتيرية (Alajlani, 2022).

## العلاقة التطورية بين السلاسل قيد الدراسة اعتمادا على مقارنة التتابعات للمورث 16S rRNA

تم دراسة تتابعات مورث RNA 16Sr للسلاسل التابعة لـ *Acinetobacter* قيد الدراسة والحصول على العلاقة التطورية بينها لتأكيد تشخيصها، وذلك باستخدام برنامج Clustal W وطريقة UPGMA ضمن برنامج Mega7 بالاعتماد على طريقة الباحثين Tamura و Nie عام 1993 كما موضح في المخطط الشجري الشكل (1) تم الحصول على 3 عناقيد للأنواع التابعة لـ *Acinetobacter*، إذ تعقدت سلاسل النوع *A. baumannii* عند نسبة تشابه 98.05% ضمن العنقود (A) بينما تعقدت سلاسل النوع *A. junii* عند نسبة تشابه 98.2% ضمن العنقود (B) وتعقدت سلاسل النوع *A. junii* عند نسبة تشابه 98.75% ضمن عنقود (C)، أن تعقد السلاسل العائدة لنفس النوع أكد الصفات المشتركة بينها. أثبت هذا المورث كفاءة عالية في التشخيص والتصنيف مما يدل على تقاربها الجيني العالي وثباتية المورث 16Sr RNA ودوره المهم في تحديد هوية البكتيريا.



الشكل 1: العلاقة بين أنواع الـ *Acinetobacter* ضمن المخطط الشجري اعتماداً على مورث 16S rRNA باستخدام Clustal W بطريقة UPGMA ضمن برنامج Mega7

شُخصت 13 عزلة تعود لجنس الـ *Acinetobacter*، 8 منها تابعة للنوع *A. baumannii* و 5 تابعة للنوع *A. junii* كما موضح في الصورة (2) من خلال نموها على الوسط الانتقائي الخاص بعزلها *Acinetobacter* Hi Crome™ Agar Base الذي أظهر كفاءة عالية في عزلها، إذ أظهرت المستعمرات البكتيرية لهذا الجنس خلال دراستنا شكلاً دائرياً محدباً صغيراً جداً وذات قوام أملس غير شفاف مع حافات ملساء وبلون بنفسجي فاتح للمستعمرة والوسط الانتقائي الخاص بها، بعد مرور 24 ساعة من التحضين عند درجة حرارة 37°م (Gordon and Wareham, 2009 ; Riedel et al., 2019).



*A. baumannii*-AE



*A. junii*-AE

الصورة 2: صفات واللوان المستعمرات على وسط *Acinetobacter* Hi Crome™ Agar

فيما ظهر شكل المستعمرات على وسط أكار الماكونكي Agar MacConkey بشكل دائري منتظم أملس مرتفع صغير بقطر 2-3 ملم وتندرج في لونها من مستعمرات وردية فاتحة لكونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز الى عديمة اللون شاحبة كما موضح في الصورة (3)، أحياناً تبقى بلون وردي فاتح بعد مرور 48 ساعة من التحضين (Procop et al.,2020).

*A. junii**A.baumannii*

الصورة 3: صفات واللوان المستعمرات على وسط MacConkey Agar

أما على وسط أكار الدم Blood Agar فتكون المستعمرات ناعمة ومحدبة، ومعتمة، ولونها أبيض مائل للرمادي أو رصاصية فاتحة أو بيضاء اللون، غير محللة للدم لعدم قابليتها على إنتاج الهيمولاسين للأصناف التالية *A. junii* و *A.baumannii* كما في الصورة (4) (AL Hadeedy et al., 2019; Procop et al., 2020).

*A. junni**A.baumannii*

الصورة 4: صفات واللوان المستعمرات على وسط أكار الدم Blood Agar

## قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي

تُعد قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي من أهم عوامل الضراوة التي تمتلكها كونها تزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية. كما يُعد الغشاء الحيوي مسؤول عن توفير حماية للبكتيريا ضد المضادات الحيوية والاستجابة المناعية للمضيف وبهذا يُعد عامل ضراوة مهم لبقاء البكتيريا على قيد الحياة والتعزيز من استعمارها للخلايا المضيفة (Abd El-Baky *et al.*, 2020).

تم الكشف عن قابلية 13 عزلة لجنس *Acinetobacter* spp. مختبرياً باستعمال طريقتين هما وسط أكار أحمر الكونكو Congo red agar (CRA)، الصورة (5) وطريقة الصفيحة العيارية (MTP) Microtiter plate method ذات الـ 96 حفرة، الصورة (6) ومقارنة كفاءتها بالتحري عن تكوين الغشاء الحيوي.

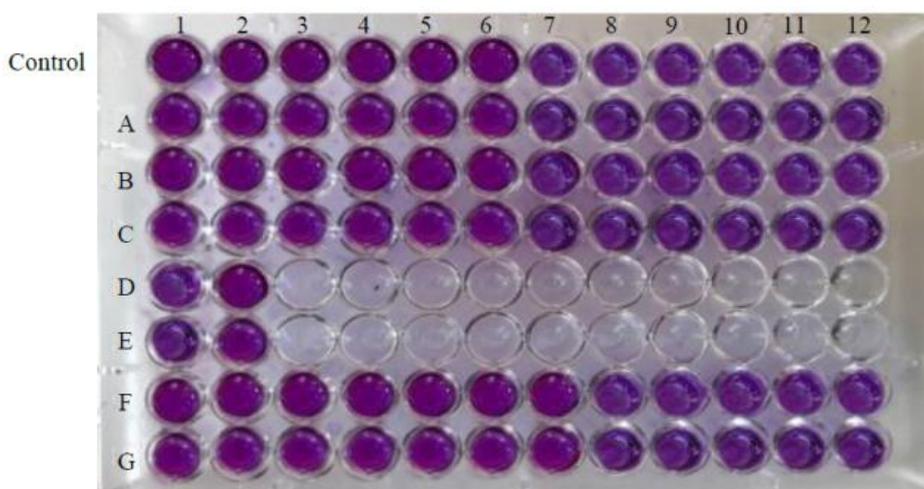
أظهرت نتائج العزلات المرضية لجنس *Acinetobacter* spp. أن نسبة (53.8%) كانت منتجة للطبقة اللزجة بشكل قوي بينما نسبة (46.1%) كانت متوسطة الانتاج للغشاء الحيوي على وسط CRA، في حين أظهرت النتائج على الصفيحة العيارية MTP نسبة (53.8%) قوية الانتاج للغشاء الحيوي و (46.1%) متوسطة الانتاج للغشاء الحيوي وذلك بالمقارنة مع السيطرة السالبة وهذا أتفق مع ما أشار اليه الباحث (Anbazhagam *et al.*, 2012; Khudhur, 2012) إذ بلغت نسبة تكوين الغشاء الحيوي 100%.



A. junii-AE

A.baumannii-AE (A)

الصورة 5: قابلية العزلات البكتيرية لأفراد جنس *Acinetobacter* على تكوين الطبقة المخاطية باستخدام وسط Congo Red Agar المنتجة للطبقة المخاطية بغزارة ذات مستعمرات بلون غامق مع تغير لون الوسط (نتيجة موجبة)



الصورة 6: قابلية العزلات البكتيرية لجنس *Acinetobacter* على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة MTP

أشار الباحث (2006) Mathur *et al.* أن كلا من الطريقتين CRA و MTP لا توجد علاقة بينها عن إنتاج المادة المخاطية والقدرة على تكوين الغشاء الحيوي بسبب أن طريقة MTP هي الأكفأ والأكثر دقة وواقعية وذات حساسية اعلى في قياس إنتاجية الغشاء الخلوي Biofilm بينما طريقة CRA تستخدم في التحري عن إنتاج السكريات المتعددة الخارج خلوية والسبب في ذلك يعود الى أن طريقة CRA تعتمد على المظهر العام للمستعمرات ولون المستعمرات وتغير لون الوسط، لكن في بعض الأحيان قد يساعد هذا النمط في التمييز بين الانواع البكتيرية لتكوين الغشاء الحيوي بشكل قوي أو ضعيف والذي يعكس حدة الاصابة وتقييم درجته لیساعد في تحديد العلاج الأولي (Seif El-Din *et al.*, 2011).

الجدول 5: قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة CRA و MTP

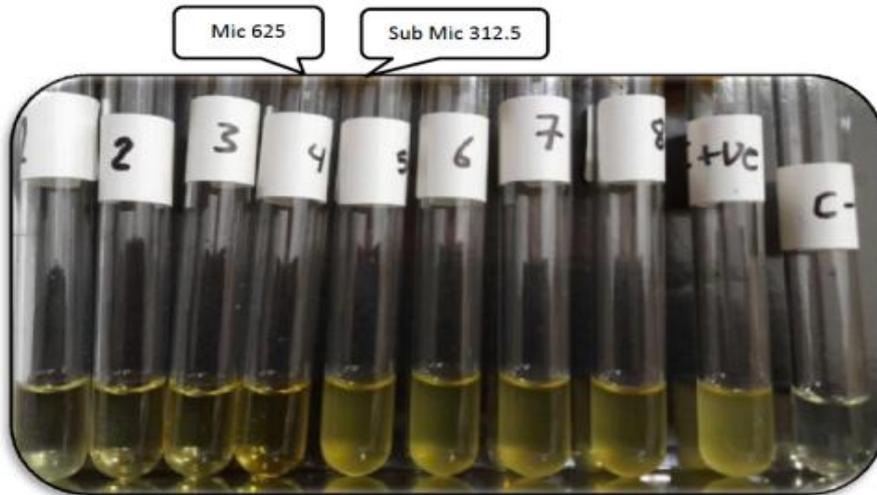
ت	الطريقة	العدد والنسبة لجنس الـ <i>Acinetobacter</i>		
		<i>Acinetobacter junii</i> (5)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (8)	المجموع الكلي (13)
1	وسط أكار أحمر	3(60%)	4(50%)	7(53.8%)
	الكونكو CRA	2(40%)	4(50%)	6(46.1%)
2	طريقة الصفيحة	3(60%)	4(50%)	7(53.8%)
	العيارية MTP	2(40%)	4(50%)	6(46.1%)

قياس التركيز المثبط الأدنى للبكتريوسين Mersacidin المستخلص من سلالة *Bacillus sp.-AE* ضد العزلات المرضية. تم تحديد تركيز الـ MIC والتركيز الـ sub MIC للبكتريوسين المستخلص من السلالة *Bacillus sp.-AE*، وتكمن أهميته بتحديد أقل تركيز من sub MIC الذي عمل على تثبيط نمو الخلايا البكتيرية وليس قتلها، لكن لا يعني أن MIC تراكيذه ثابتة وإنما تتأثر بعدة عوامل منها حجم اللقاح وطبيعة ومستقبلات الخلايا البكتيرية المستهدفة قيد الدراسة ومدة وظروف التحضين ونوع الوسط المستخدم (Joseph *et al.*, 2013).

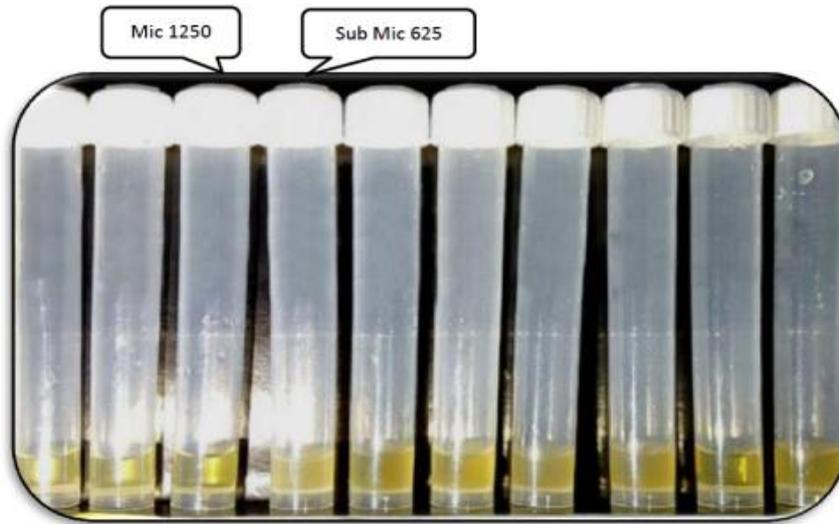
أظهرت النتائج أن التركيز المثبط الأدنى للبكتريوسين Mersacidin المستخلص من السلالة *Bacillus sp.* -AE ضد العزلات المرضية *A. baumannii* و *A. junii* ما بين (625-2500) مايكرو غرام/ مل بينما التركيز ما تحت المثبط الأدنى sub MIC ما بين (312.5-1250) مايكرو غرام/ مل كما موضح في (الجدول 6) والصورة (7).

الجدول 6: تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز ماتحت المثبط الأدنى sub MIC للبكتريوسين Mersacidin المنتج من السلالة *Bacillus sp.*-AE ضد سلالات الـ *Acinetobacter*

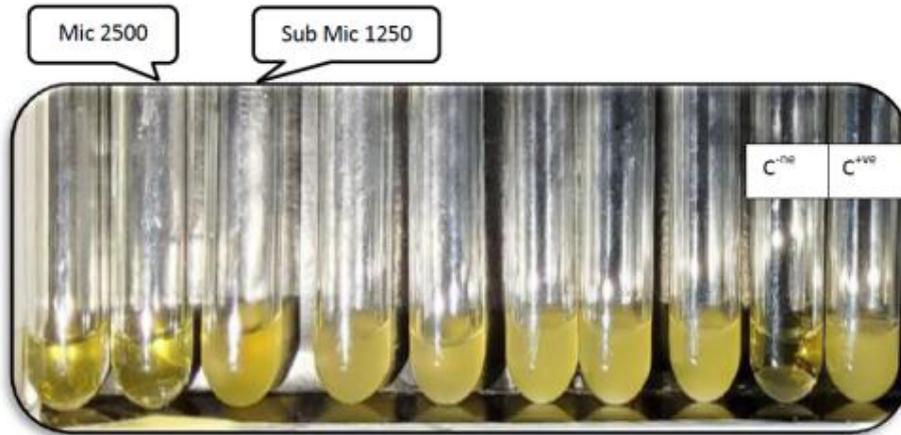
البكتريوسين ( $\mu\text{g/ml}$ )		البكتيريا	ت
MIC	sub-MIC		
625	312.5	<i>A. junii</i> -20AE	1
1250	625	<i>A. baumannii</i> -19AE	2
2500	1250	<i>A. baumannii</i> -22AE	3



الصورة 7: التركيز المثبط الأدنى للـ Bacteriocin ( $\mu\text{g/ml}$ ) المستخلص من سلالة *Bacillus sp.*-AE ضد سلالة *A. junii* -20AE



الصورة 8: التركيز المثبط الأدنى للـ Bacteriocin ( $\mu\text{g/ml}$ ) المستخلص من *Bacillus sp.-AE* ضد السلالة *A.baumannii* -19AE



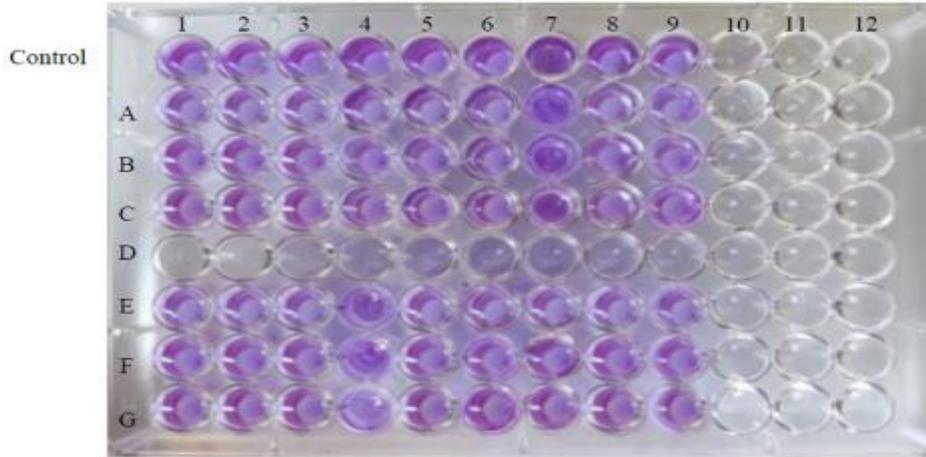
الصورة 9: التركيز المثبط الأدنى للـ Bacteriocin ( $\mu\text{g/ml}$ ) المستخلص من *Bacillus sp.-AE* ضد السلالة *A.baumannii* -22AE

تأثير البكتريوسين Mersacidin المستخلص من السلالة *Bacillus sp.-AE* على تكوين الغشاء الحيوي Biofilms ضد العزلات المرضية

تم اختبار تأثير البكتريوسين Mersacidin على تكوين الغشاء الحيوي ضد العزلات المرضية التي كانت إنتاجيتها قوية للغشاء الحيوي بطريقة (MTP) Microtiter plate، وكذلك بعد أن تم تحديد التركيز ما تحت المثبط الأدنى sub MIC و MIC الخاص لكل عزلة مرضية بطريقة التخفيف المضاعفة، وأظهرت النتائج وجود تأثير واضح وقوي للبكتريوسين Mersacidin على تكوين الغشاء الحيوي ضد الأنواع البكتيرية وهي *A. junii*-20AE و *A.baumannii*-19AE و *A.baumannii*-22AE، إذ تغيرت قابلية الانواع المتأثرة بالبكتريوسين على تكوين الغشاء الحيوي من قوية الانتاج الى غير منتجة للغشاء الحيوي، لان إمرضيتها اعتمدت على تكوين الغشاء الحيوي الذي يعمل كحاجز لحماية البكتيريا من عدة عوامل أهمها المضادات الحيوية (Abdelli et al., 2019).

يعمل البكتريوسين Mersacidin كمضاد للالتصاق البكتيريا على الأسطح، إذ يعمل على تغيير الكراهية لسطح الماء Hydrophobicity وبالتالي يؤثر على التصاقها (Simons et al., 2020). أظهرت النتائج أن البكتريوسين Mersacidin

المستخلص من السلالة *Bacillus* sp.-AE كان ذو تأثير واضح على التصاق جميع العزلات المرضية قيد الدراسة، إذ يمتلك البكتريوسين فعالية تثبيطية عالية ضد هذه الانواع من البكتيريا المرضية كما موضح في الصورة (10).



الصورة 10: تأثير التركيز MIC و MIC لمستخلص البكتريوسين Mersacidin المنتج من السلالة *Bacillus* sp.-AE على تكوين الغشاء الحيوي ضد العزلات المرضية للنوعين *A. junii* -AE و *A. baumannii* -AE باستخدام طريقة MT

#### الاستنتاجات

- 1- سيادة نسبة عزل انواع جنس *Acinetobacter* spp. من الحروق.
- 2- أهمية تحديد تتابعات القواعد النروجينية لمورث 16S rRNA للتشخيص ومعرفة العلاقة التطورية بين الأنواع قيد الدراسة.
- 3- أظهر البكتريوسين المنقى جزئياً كفاءة عالية في التأثير في البكتريا الممرضة خاصة النوعين *Acinetobacter baumannii* و *Acinetobacter junii*.
- 4- أفضل وأسرع طريقة لاستخلاص البكتريوسين النقي هي طريقة الترسيب، إذ تنتج ثابت حرارياً عند درجة حرارة 60°م وحساس لدرجتي 70 و 80°م.
- 5- أظهر التركيز المثبط الأدنى MIC وتحت الأدنى SubMIC للبكتريوسين تثبيطاً واضحاً لتكوين الأغشية الحيوية Biofilm لجميع السلالات الممرضة المدروسة بطريقة (MTP) Microtiter plate.

#### المصادر

- Abd El-baky, R.M.; Ibrahim, R.A.; Mohamed, D.S.; Ahmed, E.F.; Hashem, Z.S. (2020). Prevalence of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among pathogenic *E. coli* isolated from Egyptian patients with different clinical infections. *Inf. Drug Resist.*, **13**, 1221 – 1236. <https://doi.org/10.2147/IDR.S241073>.
- Abdelli, F.; Jardak, M.; Elloumi, J.; Stien, D.; Cherif, S.; Mnif, S.; Aifa, S. (2019). Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin (s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. *Biod.*, **30**, 287-300. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3164-3>.
- Abo-Zed, A.; Yassin, M.; Phan, T. (2020). *Acinetobacter junii* as a rare pathogen of urinary tract infection. *Urol. Case Rep.*, **32**, 101209. <https://doi.org/10.1016/j.eucr.2020.101209>.
- AL Hadeedy, U. E. I.; Mahdi, N. B.; AL Jebory, I. S. (2019). Isolation and diagnosis of *Acinetobacter Baumannii* recently isolated from patients in Kirkuk Hospitals and study their antibiotics resistance. *Kirkuk Uni. J. Scient. Stud.*, **14**(3), 155-173. <https://doi.org/10.32894/KUJSS.2019.14.3.12>.

- Alajlani, M.M. (2022). Characterization of subtilisin gene in wild type *Bacillus* Spp. and possible physiological role. *Scient. Rep.*, **12**(1), 10521. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13804-y>.
- Almasaudi, S.B. (2018). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J. Biol. Sci.*, **25**(3), 586-596. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>.
- Anbazzhagan, D.; Mansor, M.; Yan, G. O. S.; Md Yusof, M. Y.; Hassan, H.; Sekaran, S. D. (2012). Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *Plos One*, **7**(7), e36696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036696>.
- Babapour, E.; Haddadi, A.; Mirnejad, R.; Angaji, S. A.; Amirmozafari, N. (2016). Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.*, **6**(6), 528-533. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.04.006>.
- Balouiri, S.; Ibsouda. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Analys.*, **6**(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Benoit, T.; Cloutier, M.; Schop, R.; Lowerison, M. W.; Khan, I. U.H. (2020). Comparative assessment of growth media and incubation conditions for enhanced recovery and isolation of *Acinetobacter baumannii* from aquatic matrices. *J. Microb. Meth.*, **176**, 106023. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106023>.
- Cappuccino, J.G.; Sherman, N. (2014). "Microbiology: A Laboratory Manual". 10<sup>th</sup> ed. Pearson Education Inc., Glenview, Illinois, U.S.
- Celandroni, F.; Vecchione, A.; Cara, A.; Mazzantini, D.; Lupetti, A.; Ghelardi, E. (2019). Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *Plos One*, **14**(5), e0217021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217021>
- Cotârlet, Bahrim, Negoita, (2010). Comparative study for establishing the efficiency of some methods for chromosomal DNA extraction from cold adapted streptomycetes. *Romanian Biotech. Lett.*, **15**(4), 5483.
- Cruz-Soto, A. S.; Toro-Castillo, V.; Munguía-Magdaleno, C. O.; Torres-Flores, J. E.; Flores-Pantoja, L. E.; Loeza-Lara, P. D.; Jiménez-Mejía, R. (2020). Genetic relationships, biofilm formation, motility and virulence of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. *Rev. Mexicana De Cienc. Pecu.*, **11**(1), 167-182. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4998>.
- De Nies, L.; Lopes, S. B.; Galata, V.; Heintz-Buschart, A.; Laczny, C.C.; Wilmes, P. (2021). Path fact: A pipeline for the prediction of virulence factors and antimicrobial resistance genes in metagenomic data. *Microbom.*, **9**(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00993-9>
- Doughari, H. J.; Ndakidemi, P. A.; Human, I. S.; Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microb. Environ.*, **26**(2), 101-112. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179>.
- Fiji, E.; Anandharaj, B.; Jijo, G. V. (2022). Molecular determination of virulence factor genes of *Acinetobacter baumannii* isolates from clinical specimens. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.*, **12**(3), L150-158. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2022.12.3.L150-158>.
- Fusco, A.; Coretti, L.; Savio, V.; Buommino, E.; Lembo, F.; Donnarumma, G. (2017). Biofilm formation and immunomodulatory activity of *Proteus mirabilis* clinically isolated strains. *Intern. J. Microb. Sci.*, **18**(2), 414. <https://doi.org/10.3390/ijms18020414>.

- Gordon, N. C.; Wareham, D. W. (2009). A review of clinical and microbiological outcomes following treatment of infections involving multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with tigecycline. *J. Antim. Chemoth.*, **63**(4), 775-780. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn555>.
- Guyonnet, D.; Fremaux, C.; Cenatiempo, Y.; Berjeaud, J. (2000). Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microb.*, **66**(4), 1744-1748. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1744-1748.2000>.
- Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adelbergs, E. A.; Book, G.F.; Butel, J. S.; Morse, S. A. (2019). "Medical Microbiology". 16<sup>th</sup> ed. Appleton and Lang New York. Connecticut. pp. 254-260.
- Joseph, B.; Berlina, D.; Hena, V.; Raj, J. (2013). Bacteriocin from *Bacillus subtilis* as a novel drug against diabetic foot ulcer bacterial pathogens. *Asian Pacific J. Tropic. Biomed.*, **3**(12), 942-946. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60183-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60183-5).
- Kaiser, T. D.; Pereira, E. M.; Dos Santos, K. R.; Maciel, E. L.; Schuenck, R. P.; Nunes, A. P. (2013). Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn. Microb. Infect. Dis.*, **75**(3), 235-239. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.014>
- Kaur, S.; Kaur, S. (2015). Bacteriocins as potential Anticancer Agents. *Front. Pharm.*, **10**(6), 272. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272>
- Khudhur, I.M. (2012). Investigating the ability of some bacterial species to produce slime layer. *Raf. J. Sci.*, **24**(1), 36-49. <https://doi.org/10.33899/RJS.2013.67471>
- Kovács, Á. T.; Stanley-Wall, N. R. (2021). Biofilm dispersal for spore release in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **203**(14), e00192-21. <https://doi.org/10.1128/jb.00192-21>.
- Lajis, A. F. B. (2020). Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from Bacillaceae family. *Biores. Biopr.*, **7**(8), 1-26. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-0295-z>.
- MacFaddin (2000). "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria". Williams and Wilkins. Philadelphia, PA, 113 p.
- Makled, A. F.; Salem, E. H.; Elbrolosy, A. M. (2017). Biofilm *E.coli*: Comparison of phenotypic and molecular methods. *Egyptian J. Med. Microb.*, **26**(2), 37-45.
- Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D. J.; Fatma, T.; Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J. Med. Microb.*, **24**(1), 25-29. [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02466-X](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02466-X).
- Motiwala, T.; Mthethwa, Q.; Achilonu, I.; Khoza, T. (2022). ESKAPE pathogens: looking at ClpN ATPases as potential drug targets. *J. Antibiot.*, **11**(9), 1218. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091218>.
- Procop, G.W.; Church, D.L.; Hall, G.S.; Janda W.M.; Koneman, E.W.; Scherckenberger, P.C.; Woods, G.L. (2020). "Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Color". 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- Riedel, S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A.; Miller, S. (2019). "Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology". 28<sup>th</sup> ed. McGraw Hill Professional, New Yourk.
- Rodrigues, G.; Silva, G.G.O.; Buccini, D.F.; Duaue, H. M.; Dias, S.C.; Franco, O. L. (2019). Bacterial proteinaceous compounds with multiple activities toward cancers and microbial infection. *Front. Microb.*, **6**(10), 1690. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01690>.
- Saginur, R.; Denis, M.S.; Ferris, W.; Aron, S.D.; Chan, F.; Lee, C.; Ramotar, K. (2006). Multiple combination bactericidal testing of Staphylococcal biofilms from

- implant-associated infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**(1), 55-61. <https://doi.org/10.1128/aac.50.1.55-61.2006>.
- Saharman, Y. R.; Karuniawati, A.; Sedono, R.; Aditjaningsih, D.; Sudarmono, P.; Goessens, W. H.; Severin, J. A. (2018). Endemic carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex in intensive care units of the national referral hospital in Jakarta, Indonesia. *Antim. Resist. Inf. Contr.*, **7**(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0296-7>.
- Salman, J. A.S.; Abdullah, D.A. (2014). Antimicrobial and antiadhesive properties a biosurfactant isolated from *Lactobacillus rhamnosus* agansit some bacteria causing UTI in Iraq women. *Int. Curr. Res.*, **6**(3), 5368- 5374.
- Santhi and A Ranganathan (2021). Bio-profiling of a potential antimycobacterial bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* (mk733983) of ethnomedicinal origin. *J. Microb. Biot. Food Sci.*, **11**(1), e3259-e3259. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.3259>.
- Seif El-Din, S.S.; El-Rehewy, M.S.; Ghazaly, M.M.; Abd-Elhamid, M.H. (2011). Biofilm formation by blood stream Staphylococcal isolates from febrile pediatric cancer patients at South Egypt Cancer Institute. *American J. Sci.*, **7**(1), 674-686.
- Shubhrasekhar, C.; Supriya, M.; Karthik, L.; Gauvar, K.; Bhaskara Rao, K.V. (2013). Isolation, characterization and application of biosurfactant produced by marine actinobacteria isolated from Saltpan soil from costal area of Andhra Pradesh, India. *Res. J. Biot.*, **8**(1), 18-24.
- Simons, A.; Alhanout, K.; Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Micro.*, **8**(5), 639. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>.
- Tamura, K.; Nie, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide sunstitions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molec. Biol. Eval.*, **10**(3), 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Teng, Y.; Zhao, W.; Qian, C.; Li, O.; Zhu, L.; Wu, X. (2012). Gene cluster analysis for the biosynthesis of elgicins, novel lantibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69. *BMC Microb.*, **12**(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-45>.
- Tille, P.M. (2017). "Baily and Scott's Diagnostic Microbiology".14<sup>th</sup> ed. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Umar, A.; Zafar, A.; Wali, H.; Siddique, M. P.; Qazi, M. A.; Naeem, A. H.; Ahmed, S. (2021). Sustainable low-cost surfactin production and optimization by *Bacillus subtilis* SNW3, product characterization, and its suitability for plant growth promotion and bioremediation of Crude Oil. *Res. Sq.*, 1-37. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-847285/v1>.
- World Health Organization. (2019). Trends in maternal mortality 2000 to 2017: estimates by WHO, UNICEF, UNFPA, World Bank Group and the United Nations Population Division.
- Wu, B.; Garcia De Gonzalo. (2018). Investigations into the mechanism of action of sub lancin. *ACS Inf. Dis.*, **5**(3), 454-459. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00320>.
- Younus, D.G.; Essa, M.A. (2022). Detection of bacteria causing skin infections in Mosul City and studying its resistance to antibiotics. *Raf. J. Sci.*, **31**(4), 20-31. <https://doi.org/10.33899/rjs.2022.176074>.
- Yousef, A. M. (2011). Model predictive control approach based load frequency controller. *WSEAS Trans. Sys. Control*, **6**(7), 265-275.
-

## **Antibiofilm Activity of Mersacidin produced by *Bacillus* sp.-AE Against *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter junii* isolated from Clinical Specimens**

**Alaa N. Mahmood Al-Najim**

**Essra Gh. Alsammak**

*Department of Biology / College of Sciences / University of Mosul*

### **ABSTRACT**

One hundred and sixty clinical Specimens were collected, of which 120 isolates belonging to genus *Acinetobacter* spp, for 75%, and the highest percentage of burns was 85.7%, wounds 75.6%, diabetic foot ulcers 75%, tonsil smears 66.6%, urine from cases of urinary tract infection and kidney failure 50%, and bone marrow fluid spiny C.S.F by 25%. from various Mosul hospitals. Thirteen isolates belonging to the two species *Acinetobacter baumannii*-AE and *Acinetobacter junii*-AE were selected based on morphological traits and biochemical tests. The phylogenetic relationship based on 16SrRNA The *Acinetobacter* species clustered in 3 clusters: A: include 8 strains *A. baumannii*-AE at 98.05%, B: include 2 strains *A. junii*-AE at 98.2% and C: include 3 strains *A. junii*-AE at 98.75% were obtained using (Mega7) program and method Clustering depended on (UPGMA). The results showed that the genus *Acinetobacter* produced a biofilm at 53.8% strongly, while the average production on CRA medium was 46.1%, while the results on MTP 53.8% strong production of the mucous layer in abundance with dark colonies and 46.1% medium producing biofilm with brown colonies, the minimum inhibitory concentration of Mersacidin extracted from strain *Bacillus* sp.-AE against pathogenic isolates *A.baumannii* and *A.junii* ranged between (625-2500) µg/ml, while minimum sub MIC ranged between (312.5-1250) µg/mL, and the strain *Bacillus* sp.-AE Mersacidin-producing bacteriocins have the highest anti-biofilm effect than *A.baumannii* and *A.junii* strains. is a strong biofilm-forming.

**Keywords:** *Acinetobacter*, Mersacidin, *Biofilm*, *Bacillus* sp.