



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الزراعة

قسم علوم الأغذية

دراسة الفعالية الحيوية لعزلات محلية من بكتريا ستربتومايسيس

A study on bioactivity of local isolates of *Streptomyces*

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في علوم الأغذية

إعداد:

المهندسة سهى حبيب

إشراف:

د. محمد عبد القادر ابراهيم

د. صباح اليازجي

1430هـ - 2009م

المحتويات

الصفحة

الموضوع

ملخص البحث باللغة العربية

ملخص البحث باللغة الإنكليزية

الفصل الأول المقدمة والدراسة المرجعية

2	1- المقدمة
4	2- الدراسة المرجعية
4	1- مجموعة الفطور الشعاعية <i>Actinomycetes</i>
5	2- جنس ستربتومايسيس <i>Streptomyces</i>
6	1-2- موطن ستربتومايسيس
7	2-2- دورة حياة ستربتومايسيس
8	2-3- أهمية ستربتومايسيس
9	3- العوامل المؤثرة في إنتاج المضادات الحيوية
9	1-3- الوسط الزراعي
9	2-3- الرقم الهيدروجيني
9	3-3- درجة حرارة الحضانة
9	3-4- مدة الحضانة
10	3-5- حجم اللقاح
10	4- النظام الوراثي لستربتومايسيس
10	1-4- الصبغي
11	2-4- البلازميدات
11	1-2-4- دور وأهمية البلازميدات
13	2-2-4- نشوء وتطور البلازميدات

- 13 استخدام البلازميدات 3-2-4
- 14 plasmids curing تحييد البلازميدات 4-2-4
- 14 1-4-2-4 تحييد البلازميدات باستخدام عوامل كيميائية
- 15 2-4-2-4 تحييد البلازميدات باستعمال عوامل فيزيائية

الفصل الثاني

المواد وطرق العمل

المواد

- 17 1- الأجهزة والأدوات المستخدمة
- 18 2- البيئات والمواد الكيميائية المستخدمة
- 18 1-2- الأوساط الزرعية (culture media)
- 18 1-1-2- الأوساط الزرعية الجاهزة
- 19 2-1-2- الأوساط الزرعية التركيبية
- 20 3- المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة
- 20 1-3- المواد الكيميائية
- 21 2-3- المحاليل المستخدمة لاستخلاص DNA البلازميدي
- 23 4- المضادات الحيوية المستخدمة
- 23 1-4- أقراص المضادات الحيوية الجاهزة
- 23 2-4- مسحوق المضادات الحيوية
- 24 5- الكائنات المختبرة
- 25 6- العينات

طرق العمل

- 25 1- جمع عينات التربة
- 25 2- تحضير و تجهيز العينات
- 26 3- إغناء التربة
- 26 4- العزل من التربة

27	4-1- العزل الأولي للأكتينومايسيتيات
27	4-2- العزل الثاني للأكتينومايسيتيات
28	5- اختبار تشخيص العزلات
28	5-1- التشخيص المورفولوجي
28	5-2- التشخيص الفيزيولوجي
30	6- اختبار حساسية العزلات تجاه أقراص المضادات الحيوية
30	7- اختبار حساسية الكائنات المختبرة تجاه أقراص المضادات الحيوية
	8- اختبار فعالية بكتريا <i>Streptomyces</i> ضد الكائنات الدقيقة
31	المختبرة
31	9- تجربة تحييد البلازميدات
32	10 - اختبار الفعالية ضد البكتيرية للسلالات المعاملة بصبغة OA.....
32	11- عزل DNA البلازميدي
34	12- الرحلان الكهربائي
34	13- حفظ و إدامة العزلات
34	13-1- الحفظ قصير الأمد (أسبوعين)
35	13-2- الحفظ متوسط الأمد (ثلاثة أشهر)
35	13-3- الحفظ طويل الأمد
35	14 - التحليل الإحصائي

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

38	1- إغناء التربة
39	2- العزل الأولي للفطور الشعاعية
41	3- عزل الفطور الشعاعية في الآغار المائل (Slants)
44	4- نتائج اختبار تشخيص العزلات
44	4-1- نتائج التشخيص المورفولوجي

45	2-4- نتائج اختبار تمثيل السكريات
	5- نتائج اختبار حساسية سلالات بكتريا <i>Streptomyces</i> لأقراص المضادات
47	الحيوية
56	6- نتائج اختبار حساسية الكائنات المختبرة لأقراص المضادات الحيوية
59	7- نتائج اختبار الفعالية ضد البكتيرية لستربتومايسيس تجاه الكائنات المختبرة.....
63	8- تجربة تحييد البلازميدات
	9- اختبار فعالية بكتريا ستربتومايسيس ضد الكائنات المختبرة بعد معاملتها بصبغة
66	الأكردين البرنقالية OA
66	9-1- الفعالية ضد بكتيرية للسلالات M1 ← M7
66	9-2- الفعالية ضد بكتيرية للسلالات H1 ← H10
67	9-3- الفعالية ضد بكتيرية للسلالات Z1 ← Z12
67	10- نتائج الرحلان الكهربائي Electrophoresis

الفصل الرابع

الاستنتاجات و التوصيات

72	الاستنتاجات
74	التوصيات

الفصل الخامس

المراجع

76	المراجع العربية
77	المراجع الأجنبية

قائمة الجداول

رقم الجدول وعنوانه	الصفحة
1- الأجهزة و الأدوات المستخدمة في البحث	17
2- المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة والشركات المصنعة	21
3- المضادات الحيوية المستخدمة و تركيزها	23
4- الكائنات الدقيقة المختبرة	24
5- تحضير التخفيفات من التربة	26
6- السكريات المستخدمة في التشخيص الفيزيولوجي	29
7- عدد مستعمرات الأحياء الدقيقة في 1 g تربة	39
8- النماذج المختلفة لنمو العزلات المدروسة عند تنميتها في Slants	41
9- قابلية العزلات المدروسة على استخدام وتمثيل السكريات المدروسة	45
10- حساسية عزلات بكتريا <i>Streptomyces</i> للمضادات الحيوية المستخدمة	48
11- حساسية الكائنات المختبرة تجاه المضادات الحيوية	57
12- الفعالية ضد البكتيرية لسلاسلات <i>Streptomyces</i> تجاه الكائنات المختبرة.....	59
13- نتائج إضافة صبغة OA على نمو مستعمرات <i>S. fluorescens</i> ، <i>S. cyanoglomerus</i> , <i>S. lazareus</i> النامية على وسط الغاوزا	64
14- نتائج الفعالية ضد البكتيرية لسلاسلات النوع <i>S. fluorescens</i> بعد معاملة بصبغة OA لتحديد بلازميداته	65
15- نتائج الفعالية ضد البكتيرية لسلاسلات النوع <i>S. lazareus</i> بعد معاملة بصبغة OA لتحديد بلازميداته	66
16- نتائج الفعالية ضد البكتيرية لسلاسلات النوع <i>S. cyanoglomerus</i> بعد معاملة بصبغة OA لتحديد بلازميداته	66

قائمة الأشكال

الصفحة	رقم الشكل وعنوانه
8	1- مراحل دورة حياة بكتريا <i>Streptomyces</i>
34	2- الحفظ قصير الأمد لسلاسل <i>Streptomyces</i>
35	3- الحفظ متوسط الأمد لسلاسل <i>Streptomyces</i>
36	4- الحفظ طويل الأمد لسلاسل <i>Streptomyces</i>
38	5- المعاملات المختلفة لإغناء التربة
45	6- شكل سلاسل الأبواغ في بكتريا <i>Streptomyces</i>
	7- حساسية الأنواع <i>Streptomyces fluorescens</i> ، <i>Streptomyces</i>
52	<i>Streptomyces cyanoglomerus</i> , <i>lazureus</i> للمضادات الحيوية
53	8- حساسية أنواع ستربتومايسيس المعزولة تجاه أقراص المضادات الحيوية....
58	9- حساسية الكائنات الدقيقة المختبرة تجاه أقراص المضادات الحيوية
	10 - الفعالية ضد البكتيرية لبعض أنواع بكتريا ستربتومايسيس المعزولة
62	تجاه الكائنات المختبرة
65	11- تأثير إضافة صبغة OA على عدد مستعمرات ستربتومايسيس
	12- الرحلان الكهربائي للسلاسل البكتيرية (المعزولة DNA بطريقة
67	الآزوت السائل وكلوريد الليثيوم)
بطريقة	13- الرحلان الكهربائي للسلاسل البكتيرية قيد الدراسة (المعزولة DNA
68	(SDS)

قائمة المختصرات

الرمز	المعنى
DNA	Deoxy Ribo Nucleic Acid
EDTA	Ethelen diamin tetra acetic acid
bp	base pair
Kb	Kilo base pair
Tris	Hydroxymethylaminomethane
Tris-HCl	Hydroxymethylaminomethane - HCl
L	Linear
ISP	International Streptomyces project
G	Guanin
C	Cytocin
YEME	Yeast extract-Malt extract
M.H.A	Muler Hinton Agar
OA	Orange Acridine
SDS	Sodium dodecyl sulfat
EtBr	Ethidium Bromid
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris- Borate- EDTA
SET	Sodiumchloride – EDTA – Tris
LETS	LiCl – EDTA – Tris-HCl - SDS

ملخص البحث

تم جمع و تشخيص وتصنيف 34 عزلة من بكتريا *Streptomyces* من أنحاء متفرقة من سورية، استطاعت جميعها النمو على وسط الغاوزا في درجة pH معتدلة تتراوح بين 7-8 لإنجاز النمو، بالإضافة إلى درجة حرارة حضانة 28°C .

درست العزلات على ثلاث مراحل ، شملت المرحلة الأولى التشخيص المورفولوجي والفيزيولوجي: شخّصت العزلات بشكل مورفولوجي اعتماداً على الصفات التالية: شكل ولون كل من المشيجة الهوائية والأرضية، وشكل سلاسل الأبواغ و توزيعها، و قدرتها أو عدم قدرتها على إنتاج الصبغات. أما التشخيص الفيزيولوجي فتضمن مقدرة هذه العزلات على استخدام السكريات وتمثيلها. بينت نتائج التشخيص أن تربة تدمر تحتوي على كل من الأنواع التالية : *S.*

S. mitakaensis ، *S. coeliatus* ، *S. griseomycini* ، *cyanoalbus* ، *S. fluorescens* ، *S. piedadensis* ، *S. spheroids* , *hirsutus* .

في حين احتوت تربة دير الزور على كل من: *S. rubrolavendulae* ، *S. caracoi* ، *S. lazureus* ، *S. indigocolor* ، *S. microflavus* ، *S. albochromagenes* ، *S. ogaensis* ، *S. castaneoglobisporus* ، *S. janthinu* و *S. pseudovenezuelae* أما تربة دمشق فقد تميزت بتواجد الأنواع التالية فيها : *S. acrimycini* ، *S. canarius* ، *S. cyanoglomerus* ، *S. albovirids* ، *S. cellulosa* ، *S. flaveolus* ، *S. roseiscleroticus* ، *S. coerulatus* ، *S. daghestanicus* ، *S. syringae* .

تم في المرحلة الثانية اختبار قابلية العزلات لإنتاج مركبات مضادة للبكتريا وبعض الخمائر ، و ذلك من خلال اختبار حساسية هذه العزلات لأقراص المضادات الحيوية (كما جرى اختبار حساسية الكائنات المختبرة تجاه المضادات الحيوية) ، وكذلك اختبار الفعالية ضد الميكروبية لهذه العزلات تجاه الكائنات الدقيقة المختبرة ، بينت النتائج أن جميع العزلات لم تمتلك أية فعالية ضد بكتريا *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* ، حيث استطاعتا النمو

بشكل جيد دون أن تتأثراً بوجود بكتريا *Streptomyces*. بينما امتلكت هذه العزلات فعالية جيدة تجاه الكائنات الدقيقة المختبرة الأخرى .

اختيرت ثلاثة أنواع *Streptomyces fluorescens* ، *Streptomyces lazareus* ، *Streptomyces cyanoglomerus* لإكمال الاختبارات عليها كونها ذات مقاومة جيدة للمضادات الحيوية و فعالية جيدة تجاه الكائنات المختبرة.

تضمنت المرحلة الثالثة تحديد علاقة البلازميدات الموجودة في بكتريا *Streptomyces* بهذه الفعالية الحيوية، فأجري تحييد لها باستخدام صبغة الأكردين البرتقالية (OA) ، حيث أشارت تجربة تحييد البلازميدات للأنواع الثلاثة المختارة إلى دور البلازميدات فيها في إنتاج المضادات الحيوية ومقاومتها، و وجد أنه بعد معاملة هذه السلالات بصبغة OA فقدت فعاليتها تجاه الكائنات الدقيقة المختبرة و مقاومتها لأقراص المضادات الحيوية. وأكدت نتائج الرحلان الكهربائي وجود البلازميدات في الأنواع الثلاث المذكورة وفقدانها في السلالات المحيدة.

كانت نتائج الرحلان الكهربائي واضحة باتباع طريقة كلوريد الليثيوم الأزوت السائل في عزل DNA البلازميدي ، بينما لم تكن واضحة كفاية عند استخدام طريقة SDS في عزل DNA فكانت الطريقة الأولى أفضل من الثانية .

الكلمات المفتاح: الأكتينومايسيتات، ستربتومايسيس، المضادات الحيوية، الفعالية ضد الميكروبية، تحييد البلازميدات.

Abstract

In this study, 34 local *Streptomyces* isolates were characterized and classified. These local isolates were collected from different regions of Syria, and were found being able to grow well on Gauza's media, at 28° C. The isolates were found to prefer moderate pH for growth, the pH values ranging from 7 – 8.

The study also investigated the morphological and biochemical characteristics of the isolates. Morphological characterization was carried out depending on the growth and the color of aerial and substrate mycelia, the Sporophores shape, and their ability to produce pigments.

Biochemical characterization included *Streptomyces* ability to utilize various types of sugars.

The obtained results revealed the following species of *Streptomyces* obtained from Palmyra's soil :

S. cyanoalbus , *S. griseomycini* , *S. coeliatus* , *S. mitakaensis* , *S. mitakaensis*, *S. hirsutus* , *S. spheroids* , *S. piedadensis* , *S. fluorescens*.

from Der Alzoor's soil: *S. caracoi* , *S. rubrolavendulae* , *S. lazareus* *S. indigocolor* , *S. microflavus* , *S. albochromagenes* , *S. ogaensis*, *S. janthinu* , *S. castaneoglobisporus* , *S. pseudovenezuelae* .

and from Damascus's soil: *S. acrimycini* , *S. cyanoglomerus* , *S. albobiridis* , *S. coerulatus* , *S. roseiscleroticus*, *S. flaveolus*, *S. canaries*, *S. cellulosa*, *S. daghestanicus*, *S. Syringae*.

The antibiotic sensitivity and antimicrobial activities of the *Streptomyces* isolates were tested. All *Streptomyces* isolates didn't show any antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* , on the other hand, *Streptomyces* isolates showed good activity against the other tested microorganisms.

A molecular study was carried out also to determine the relation between the plasmids contents in *Streptomyces* and their bioactivity. Curing of plasmid(s) from three species *Streptomyces fluorescens* ,

Streptomyces lazareus , and *Streptomyces cyanoglomerus* was done using Acridine Orange pigment. The results indicated the role of plasmid(s) in conferring antibiotic resistance and antibacterial activity. This test has shown that the plasmid(s) are controlling the antibiotic resistance and antibiotic production , this is because the three species have lost their antibiotic resistance and their antibacterial activities against tested microorganisms after OA treatment .

Lithium chloride and liquid nitrogen method was found superior for extraction of plasmid DNA as compared with SDS method . The agarose gel electrophoresis has confirmed the existence of plasmids in the three species, but were absent in the acridine orange cured colonies obtained from three species.

keywords: *Actinomycetes* , *Streptomyces*, antibiotics, Anti-microbial activity, plasmid curing .

الفصل الأول

المقدمة والدراسة المرجعية

INTRODUCTION
&
LITERATURE REVIEW

1- المقدمة

Introduction

عرفت أنواع عديدة من أجناس عائلة *Streptomycetaceae* بأهميتها البيئية والتطبيقية، وهي تشكل عنصراً هاماً جداً من الغطاء الميكروبي للتربة (Watve et al., 2001) ، إضافة إلى تميز هذه الأنواع بأهميتها الكبيرة من حيث إنتاجها لأكثر من 6000 مضاد حيوي . يستخدم حالياً ما يزيد عن مائة مضاد حيوي من منتجات هذه البكتيريا في المجال الطبي ، تستعمل لعلاج الأمراض البكتيرية و الفطرية و الطفيلية، كذلك يستخدم بعضها كمواد مضادة للأمراض السرطانية، إضافة لاستخدام عدد آخر في الطب البيطري ، كذلك لها استخدامات في الزراعة كمحفزات نمو أو لمكافحة الأمراض النباتية، وغيرها من التطبيقات (Champness, 2000) (Berdy, 2005).

تضم المضادات الحيوية المنتجة من هذه البكتيريا مركبات عديدة، منها: aminoglycosides , tetracyclines , polyethers , polyenes , peptides, β -lactams , macrolides, وغيرها (Hwang et al., 1994) ، (Sutcliffe and Leclercq, 2002).

يعد جنس *Streptomyces* الأكثر أهمية ضمن هذه العائلة، حيث ينتج حوالي 70% من المضادات الحيوية المعروفة (Demain, 1999). إضافة لذلك أكدت البحوث المنشورة إلى دور وأهمية البلازميدات في هذه البكتيريا يكمن في إنتاج المضادات الحيوية، حيث أشارت الدراسات إلى سيطرة البلازميدات الموجودة في بكتيريا *Streptomyces* على العديد من الصفات كإنتاج صبغة الميلانين و المشيجة الهوائية ، كما أن لبعضها دور كبير في إنتاج المضادات الحيوية (Swaadoun et al., 1999) .

واجه قطاع الصحة مشكلة زيادة مقاومة الكائنات الدقيقة الممرضة للمضادات الحيوية بسبب تكرار استخدامها لفترات طويلة أو بسبب الاستخدام الخاطئ، لذا كان لا بد من البحث و اكتشاف مضادات حيوية جديدة (Ekwenye and Kazi, 2007) ، وكمثال على ذلك ارتفعت النسبة المئوية لمقاومة بكتيريا *Staphylococcus aureus* لمضاد Methicillin

من 3% في الثمانينات إلى أكثر من 40 % بعد عشر سنوات، مما أدى إلى زيادة الإصابات والأمراض الناتجة عن هذه البكتريا (Kloos and Bannermann , 1994). قادت هذه المشاكل إلى ضرورة اكتشاف وتطوير مضادات حيوية جديدة فعالة، وأظهرت الدراسات الحالية أن جنس *Streptomyces* مازال يحتل المكانة الأكبر في اكتشاف و استبيان مواد ضد ميكروبية جديدة (Vasavada et al., 2006).

نظراً لأهمية بكتريا *Streptomyces* في هذا المجال و بسبب مشاركة البلازميدات الموجودة فيها في إنتاج المضادات الحيوية، اتجهت الدراسة نحو إيجاد عزلات محلية منها ذات فعالية ضد ميكروبية و محاولة معرفة تأثير البلازميدات في هذه الفعالية ، متجهة هذه الدراسة نحو تحقيق الأهداف التالية:

- 1) عزل وتشخيص بكتريا *Streptomyces* من تربة محلية عائدة لمناطق مختلفة من القطر العربي السوري.
- 2) دراسة الفعالية الحيوية لبكتريا *Streptomyces* المعزولة ضد أنواع مختلفة من البكتريا و بعض الخمائر.
- 3) دراسة دور البلازميدات في الفعالية الحيوية لبكتريا *Streptomyces*.

2- الدراسة المرجعية Literature Review

1- مجموعة الفطور الشعاعية (*Actinomycetes*):

الفطور الشعاعية مجموعة من الأحياء الدقيقة موجبة غرام، تتميز بتشكيلها للمشيجة الهوائية، كما أن لبعضها القدرة على تشكيل المشيجة السطحية أو تعطي الاثنتين معاً. تعود تسمية *Actinomycetes* إلى الاسم الإغريقي (*aktis*) أي شعاع و (*mykes*) وتعني فطور، أي الفطور الشعاعية، وقد أعطي لها هذا الاسم بناء على الملاحظة الأولية لشكلها المورفولوجي (Kuster, 1976)، وقد نظر إليها سابقاً على أنها مجموعة منفصلة من الأحياء الدقيقة لأنها تشكل حالة وسط بين الفطريات الحقيقية والبكتيريا الحقيقية (Hopwood and Chater, 1989)، إلا أن الاكتشافات الجديدة حول تركيب الجدار الخلوي فيها تصنفها على أنها بكتيريا وليست فطر فهي كائنات دقيقة بدائية النواة Prokaryotic (Bentley et al., 2002). تعيد الفطور الشعاعية إنتاج نفسها عن طريق الانشطار أو عن طريق أبواغ خاصة، و تتواجد هذه المجموعة غالباً في جميع الأماكن الطبيعية: كالتربة و الحبوب و الأعشاب و مسابح المياه العذبة و الأغذية و في الهواء، تتراوح درجة حرارة النمو المثلى لها بين 20-30°C. (Waksman, 1961)، (Rhee et al., 2001).

تتبع الفطور الشعاعية عموماً إلى رتبة (*Actinomycetales*) وتنقسم إلى تحت مجموعتين:

1. الأشكال المؤكسدة والتي تتواجد غالباً في التربة.
2. الأشكال المخمرة و التي تعيش في جوف الإنسان و الحيوانات (Lechevalier et al., 1971).

تتبع لرتبة *Actinomycetales* ثماني عائلات هي كما يلي:

1. *Actinomycetaceae*
2. *Nocardiaceae*
3. *Actinoplanacea*
4. *Streptomycetaceae*
5. *Micromonosporaceae*
6. *Mycobacteriaceae*
7. *Frankiaceae*
8. *Dermatophilaceae*

(Stackebrandh et al., 1997)

والفطور الشعاعية هي بدون شك المنتج الأكبر للمواد الاستقلابية البكتيرية الثانوية، حيث أظهر المسح الذي أجري على الأبحاث التي تمت بين عامي (1988-1992) أنها تنتج أكثر من

1000 منتج استقلابي ثانوي ، تستخدم في المعالجة ، كالمضادات الحيوية. بالإضافة إلى الإنزيمات و الصبغات (Champness, 2000) ، إلا أن أهم ما تتميز به هذه الرتبة أنها تحتوي عائلة *Streptomycetaceae* المعروفة بإنتاجها لعدد كبير من المضادات الحيوية المعروفة ، فالطور الشعاعية تبقى في المقدمة من بين الكائنات الدقيقة بإنتاجها لأكثر من 60 % للمضادات الحيوية المعروفة (Agrawal, 2002) .

ولقد جرى إنتاج مضاد Streptomycin من بكتريا *Streptomyces griseus* ، وهو أول المضادات المكتشفة و التابعة لمجموعة الأمينوغليكوزيدات و كان أول مضاد جرى استخدامه لعلاج مرض السل (Singh and Mitchison, 1954).

2- جنس ستربتومايسيس (*Streptomyces*):

اكتشف *Streptomyces* في عام 1943 من قبل Albert Schatz الذي كان يعمل في مخبر Selman Abraham Waksman في جامعة Rutgers ، الذي اكتشف أيضاً في مخبره العديد من المضادات الحيوية التابعة لجنس *Streptomyces* أهمها:

Neomycin من <i>S. fradiae</i>	Erythromycin من <i>S. erythraeus</i>
Tetracycline من <i>S. rimosus</i>	Puromycin من <i>S. alboniger</i>
Daptomycin من <i>S. roseosporus</i>	Vancomycin من <i>S. orientalis</i>
Chloramphenicol من <i>S. venezuelae</i>	Rifamycin من <i>S. mediterranei</i>
	Lincomycin من <i>S. lincolnensis</i>

.(Watve et al., 2001)

يصنف جنس ستربتومايسيس كما يلي:

- مملكة: Procaryotae
- شعبة: The Bacteria
- رتبة: Actionmycetales
- عائلة: Streptomycetaceae
- جنس: Streptomyces

وتصل أنواعه إلى نحو 500 نوع (Madigan and Martinko, 2005). *Streptomyces* بكتريا موجبة غرام ،هوائية ، تنتشر بشكل كبير في الطبيعة و خاصة في التربة مكونة المشيجة السطحية و الهوائية كثيرة التفرع، تتحول الهوائية منها إلى سلاسل من

الأبواغ و تعد هذه الصفة المظهرية ذات أهمية كبيرة في تشخيص و تمييز هذه العائلة عن بقية الأجناس الخيطية الأخرى و كذلك الأنواع التابعة لنفس الجنس. (Goodfellow and Cross , 1984) ، (Bibb, 1996).

المشيجة السطحية لهذه البكتريا عبارة عن امتدادات خيطية متفرعة غير مقسمة ، و غير مشكلة للأبواغ إلا في أنواع قليلة تحمل فيها المشيجة السطحية سلاسل قصيرة من الأبواغ ، و تختلف ألوان هذه المشيجة من نوع إلى آخر فمنها الأبيض ، الأحمر ، البرتقالي ، البني ، الأخضر و الرمادي ، تنتج المشيجة السطحية صبغات ذائبة في الماء أو غير ذائبة، و هذا يختلف تبعاً لطبيعة الكائن و تركيب الوسط الزراعي و مدة الحضانة و غيرها من الظروف الأخرى. (Kutzner , 1981, Williams et al; 1990).

تنشأ المشيجة الهوائية بشكل تفرعات بسيطة من المشيجة السطحية وتكون أقل تفرعاً منها. تتباين المشيجة الهوائية من حيث اللون فمنها الأخضر ، الأبيض ، الأصفر ، الأزرق ، الرمادي ، البنفسجي و الأحمر، وهذا عائد لاختلاف النوع البكتيري و الوسط الزراعي و درجة حرارة الحضانة ومدتها. و تعد صفة اللون هذه صفة تشخيصية مهمة على مستوى النوع (Kieser et al., 2000) ، (Waksman, 1967).

يتميز جنس ستربتومايسيس بالأبواغ المنتجة في نهاية خيوط المشيجة الهوائية وتتباين أعدادها (3-50 بوغاً) ، تحاط هذه الأبواغ بغلاف ليفي يعطي سطحها مظهراً مميزاً فمنها السطح الناعم أو الأملس أو الشوكي أو الوشمي... وتساعد هذه الصفة في تمييز الأنواع عن بعضها باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (Williams et al., 1981).

2-1- موطن ستربتومايسيس:

تعد التربة الموطن الطبيعي لمعظم أعضاء عائلة ستربتومايسيس، حيث تجد في التربة الظروف المناسبة للنمو و إنتاج المواد الفعالة ، وربما لا تكون هذه الظروف هي المثالية لكنها تسمح لها بالتنافس الناجح مع الكائنات الدقيقة الأخرى، إذ أن ستربتومايسيس قادرة على إفساد و تحليل بقايا مكونات النباتات و الحيوانات، كما أنه من السهل إشباع حاجتها بالمصادر النتروجينية غير العضوية، وهي لا تتطلب من أجل نموها فيتامينات أو محفزات نمو (Kutzner, 1981). تجد بكتريا *Streptomyces* في التربة الكثير من الركائز لدعم نمو مشيجتها، وهي قادرة على التكيف مع الشروط الفيزيائية لمواطنها مثل الرطوبة و التهوية ، وغيرها من الشروط التي تخضع لتبدلات تدريجية خلال وقت قصير تبعاً للوقت و الفصل (Hodgson, 2000).

تعد أبواغ ستربتومايسيس مقاومة للظروف البيئية غير الملائمة ، و تساهم في المحافظة على بقاء ستربتومايسيس لفترة أطول ضد عوامل التجفيف و التجميد و الظروف اللاهوائية الناجمة عن الإشباع بالماء (Davis and Chater , 1990).

تعد هذه البكتريا غير ضارة، إلا ان أنواع قليلة منها تسبب أمراض مثل *S. scabies* التي تصيب البطاطا وبعض النباتات الأخرى ، و من الممكن أن تحتوي الأعلاف والحبوب على بكتريا ستربتومايسيس بسبب تلوثها بجزيئات التربة والغبار وظروف التخزين إلا أنها نادراً ما تسبب الفساد للأعلاف والحبوب (Brawner et al ., 1991) ، بالإضافة إلى ذلك قد تساهم في تلوث مياه الأنهار والجداول وتنتج روائح كريهة، مما يؤدي إلى عدم صلاحيتها للشرب (Kutzner, 1975) .

2-2- دورة حياة ستربتومايسيس:

وهي تتضمن: الإنبات- نمو المشيجة السطحية- نمو المشيجة الهوائية - إنتاج الأبواغ

كما هو واضح في الشكل (1) ، تبدأ دورة حياة ستربتومايسيس بإنبات بويغة واحدة ، تنتج هذه البويغة العديد من النقرعات (Chater , 1993) ، تزداد هذه النقرعات طولاً وتمتد على سطح الوسط و في داخله لتشكل المشيجة السطحية ، تستمر هذه الشبكة المعقدة بالانتشار في الوسط مستعملة الجزيئات العضوية المتاحة لها، بعدها تقوم المشيجة السطحية باختراق سطح الوسط مشكلة المشيجة الهوائية ، يتزامن نمو المشيجة الهوائية مع ظهور أول ناتج استقلابي ثانوي في الوسط الصلب (Schwedock et al. 1997).

تعتمد استمرارية وبقاء المشيجة الهوائية على استخدام المشيجة السطحية ، من ثم تتشكل الأبواغ ، وتحمل الأبواغ الناضجة مع بعضها في سلاسل (حوالي 50 بوغ) ، وتعطي صبغة رمادية اللون لها دور في تشخيص ستربتومايسيس (Davis.and Chater, 1990) .



الشكل 1 : مراحل دورة حياة بكتريا *Streptomyces* .

2-3- أهمية ستربتومايسيس:

يعد جنس ستربتومايسيس أحد أهم الأحياء الدقيقة على الصعيد الاقتصادي ، فهو من أكثر الأحياء الدقيقة إنتاجاً للمضادات الحيوية، حيث ينتج حوالي 70% من المضادات الحيوية المعروفة ضمن مجموعة الفطور الشعاعية ، و منها النتراسيكلين والأريثرومايسين والكلورامفينيكول والفانكوميسين وغيرها من المضادات الحيوية الهامة (Hopwood *et al.*, 1985) ، (Nurettin and Aysel, 2002). والمضادات الحيوية هي عبارة عن منتجات أيضية ثانوية ذات وزن جزيئي منخفض، تنتج من قبل الكائن الحي بعد اكتمال نموه الخلوي أو بعد أن يصل إلى طور الثبات (Hesketh *et al.*, 2002)، هذه المضادات تثبط نمو أحياء دقيقة أخرى ، ولها تطبيقاتها العديدة (Wietzorrek and Bibb, 1997) .

تعد ستربتومايسيس مصدراً للعديد من المركبات الحيوية الأخرى كالإنزيمات الخارجية والمثبطات الإنزيمية و الصبغات والفيتامينات والفرمونات البكتيرية (مواد كيميائية تستخدم لتنظيم العمليات الخلوية)، كما وجد أن لهذه البكتريا دور فعال في حل مشكلات التلوث البيئي بسبب قدرتها على تحليل المركبات الكربوهيدراتية (السكريات) و المطاط والبلاستيك. (Lacey, 1975) ، (Bibb, 1996) .

تمتلك ستربتومايسيس آلية خاصة لمقاومة المضادات الحيوية التي تنتجها ، وهذه الآلية مشابهة لتلك الموجودة في البكتريا الممرضة (Webb *et al.*, 1997) .

3- العوامل المؤثرة في إنتاج المضادات الحيوية:

3-1- الوسط الزراعي:

تلعب مكونات الوسط الزراعي دوراً كبيراً في إنتاج المضادات الحيوية، حيث يمكن زيادة إنتاج المضاد بتبديل مكونات الوسط ، كالمصدر الكربوني والمصدر النتروجيني والأملاح اللاعضوية وغيرها (Iwai and Omura , 1982).

1. المصدر الكربوني: يعد عنصر الكربون من العناصر الرئيسية في إنتاج المضادات ، كما أن السكريات المتعددة والثنائية هي مصادر كربونية أفضل من الجلوكوز (Shimizu and Tamura , 1981).

2. المصدر النتروجيني: يعد النتروجين من المكونات الرئيسية التي لا بد من وجودها في الوسط الزراعي ، إلا أن إضافة المصدر النتروجيني من نوع أيونات الأمونيوم والأحماض الأمينية النتروجينية يؤدي إلى تثبيط إنتاج بعض المضادات الحيوية مثل التتراسيكلين والستربتومايسين وغيرها (Chater and Bibb 1997).

3. الأملاح المعدنية: تعمل الأملاح المعدنية على تحفيز نمو بكتريا ستربتومايسيس، إلا أن التراكيز العالية منها تحفز نمو البكتريا وتثبط إنتاج المضاد الحيوي ، كما تؤدي إضافة تراكيز معينة من ملح كلوريد الصوديوم إلى زيادة إنتاج المضادات الحيوية ، لكن الكميات الكبيرة منه تسبب تثبيط الإنتاج (Hopwood *et al.* , 1989).

3-2- الرقم الهيدروجيني :

يلعب pH الوسط دوراً مهماً في نمو البكتريا وإنتاجها للمواد الأيضية الثانوية ، يتراوح pH المستخدم في إنتاج معظم المضادات الحيوية بين 6-8 (Shomura *et al.*, 1980).

3-3- درجة حرارة الحضانة:

تنتج بكتريا ستربتومايسيس عادة المضادات الحيوية في درجات حرارة قريبة من 27°C و يفضل أن تكون درجة الحرارة هذه ثابتة خلال عملية التخمير لإنتاج المضاد الحيوي. (Iwai and Omura, 1982).

3-4- مدة الحضانة:

إن اصطناع المنتجات الأيضية الثانوية لا يتم في طور النمو السريع، و إنما في طور النمو غير المتوازن (Egorov, 1983) ، (الخفاجي، 1990) ، كما تختلف الفترة الزمنية اللازمة للحصول على أقصى إنتاجية من المضادات الحيوية ، فمثلاً جرى إنتاج مضاد الرابامايسين من *S.hygroscopicus* بعد مرور أربعة أيام من الحضانة ، في حين إنتاج مضاد

ماكروديوليد Macrodilide من بكتريا *Sterptomyces Sp* ظهر بعد مرور ستة أيام من الحضانة (Jones et al., 1984) .

3-5- حجم اللقاح:

يجب أن تكون الخلايا جيدة و فعالة و أن تكون بكميات تكفي حجم الوسط الغذائي المعد للتخمر كما يجب أن تكون نقية خالية من التلوث ، ويتعلق حجم اللقاح بنوع الأحياء الدقيقة المستخدمة ، فعند استخدام المشيجة كلقاح تضاف بنسبة 5-10 % أما معلق الأبواغ فيضاف بحدود $1-2 \times 10^5$ بوغ/ليتر من الوسط الغذائي (الخفاجي ،1990).

4- النظام الوراثي في ستربتومايسيس:

بدأ الاهتمام بالنظام الوراثي لبكتريا ستربتومايسيس منذ عام 1950 ، إذ بدأت أول دراسة وراثية في ستربتومايسيس بتجربة تأشيب Recombination و ذلك لدراسة مواقع الجينات على الصبغي ، و من ثم جرى الكشف عن دور البلازميدات في السيطرة على الإخصاب و التمايز والأبيض الأولي ومسار البناء الحيوي للمضادات الحيوية (Kieser et al., 2000) ، (Bentley, 2004).

و توالت بعدها الدراسات الوراثية الجزيئية مثل استئصال الجين وتبادل الجينات بطريقة تأشيب الخلايا منزوعة الجدار والتي أدت بدورها إلى إعطاء ستربتومايسيس دوراً هاماً في مجال التقنيات الحياتية الجزيئية (Goodfellow et al ., 1983) ، (Barrell et al ., 2002).

4-1- الصبغي:

الصبغي في بكتريا ستربتومايسيس غير اعتيادي مقارنة مع صبغيات البكتريا الأخرى ، إذ أن حجم الصبغي عندها 8×10^6 bp ، و هو بذلك يعادل 1.5-3 أضعاف حجم الصبغي في بكتريا *Bacillus subtilis* (Kunst et al., 1997) و *Escherichia coli* (Blattner et al., 1997) ، كما يتميز بمحتواه العالي من قواعد السائتوزين والغوانين (G+C) حيث تصل نسبتها إلى 73% (Redenbach et al., 1996) ، (Ikeda et al., 2003) .

وقد أشارت بعض الدراسات إلى إمكانية أن يكون للصبغيات في بكتريا ستربتومايسيس نفس التابع للجينات على الخريطة الوراثية. وفي مطلع التسعينات أكدت الدراسات المنشورة امتلاك هذه البكتريا صبغياً خطياً (L) بعد أن كان الاعتقاد السائد حتى بداية 1993 أن صبغي بكتريا ستربتومايسيس حلقياً.

كما وجد أن هذه البكتيريا تختلف في محتواها من البلازميدات و العناصر الوراثية المتحركة (Lin et al., 1993) ، (Chen et al., 1994) .

4-2- البلازميدات:

تعرف البلازميدات على أنها تكرارات من DNA ، توجد في الهيمولي وتتضاعف بصورة مستقلة عن تضاعف صبغي المضيف، كما أنها تتوارث بثبات من جيل إلى آخر على شكل قطع منفصلة عن صبغي المضيف، تنتشر البلازميدات بشكل واسع في خلايا البكتيريا وتوجد دراسات تؤكد وجودها في الخمائر و الفطريات (العاني، 1992) ، (عماش ، 1994) .

ويمكن أن توجد البلازميدات بأشكال مختلفة، دائرية مغلقة أو دائرية مفتوحة، أو قد تكون خطية (Bentley et al., 2004). تحتوي بكتيريا ستربتومايسيس على بلازميدات خطية بعضها صغيرة الحجم و ذات نهايات متكورة مقلوبة و بحجم عدة مئات من الأزواج القاعدية، وبعضها الآخر كبيرة الحجم و بحجم عدة مئات من Kb (Chater, 1993)، كما تحتوي بكتيريا ستربتومايسيس على بلازميدات لها القابلية على الانتقال الذاتي والتكرار (Hoopwood et al., 1985) ، (Saadoun and Blevins, 1997).

تختلف البلازميدات في أحجامها حيث تتراوح في بكتيريا ستربتومايسيس ما بين 4-170 Kb، كما أن عددها يتراوح من نسخة واحدة إلى عدة مئات في الخلية الواحدة (Chater and Bibb , 1997).

4-2-1 دور وأهمية البلازميدات:

تعد البلازميدات غير ضرورية لحياة المضيف إلا أن وجودها قد يعطيه صفات إضافية مظهرية أو فيزيولوجية تمكنه من العيش تحت ظروف استثنائية ، مثل صفة المقاومة للمضادات الحيوية، و إنتاج الإنزيم الحال للدم وتخمير السكريات و مقاومة المعادن الثقيلة وتكوين الأورام في النباتات وغيرها من الصفات، علماً أن هناك الكثير من البلازميدات التي لا يعرف لها صفات مظهرية حتى الآن، ولهذا يطلق عليها البلازميدات الخفية (Atlas et al., 1995) ، (Woodford and Johnson , 1998) .

تسيطر البلازميدات على العديد من الصفات المظهرية مثل إنتاج صبغة الميلانين و المشيجة الهوائية، كما تحمل أيضاً عامل الإخصاب (Tauch et al, 2000).

هناك الكثير من الاهتمام بشأن احتمال تدخل البلازميدات في إنتاج المضادات الحيوية في بكتيريا *Streptomyces* ، فقد لوحظ ارتفاع وتيرة الخسائر في إنتاج المضادات الحيوية خلال المعالجة الكيميائية. يوجد DNA البلازميدي في عدة أنواع من هذه البكتيريا بصورة طبيعية ، كما أن دعم

إمكانية التحكم الجيني لتكوين المضادات الحيوية قد تكون موجودة على الحمض النووي البلازميدي في بعض الحالات (Yi – Guang et al., 1980) ، وللتحري عن مشاركة البلازميدات في إنتاج المضادات الحيوية في مختلف أنواع مجموعة *streptomycetes* فقد اقترح إجراء تجارب التحييد Curing experiments ، وفي بعض الحالات تم إثبات ذلك عن طريق تجارب التأشيب (Okanishi and Manome, 1979) .

تعتمد الكثير من طرق التشخيص في بدائيات النوى على المقاومة للمضادات الحيوية وغيرها من العوامل التي تحددها البلازميدات (Pares et al., 1974) ، وفي مجموعة ستربتومايسيس هناك أدلة تقيد في أن DNA البلازميدي هو المسؤول عن إنتاج مضادات حيوية محددة مثل Kasugamycin و Aureothricin من قبل *S. hygroscopicus* (Boronin et al., 1974). كما وجد أنه بعد المعالجة لإزالة أو تحييد البلازميدات لعدد من سلالات بكتريا ستربتومايسيس المنتجة للمضادات الحيوية ، فقدت إنتاجيتها لهذه المضادات ، فبعد أن كانت هذه السلالات منتجة أصبحت غير منتجة للمضاد الحيوي، و تبين أن سبب ذلك هو فقدانها لبلازميداتها. وبهذا الشأن أكدت الدراسات في *S. rimosus* أن مورثات غير صبغية تشارك في إنتاج المضادات الحيوية (Noack et al., 1974).

إن المسؤول عن إنتاج المضاد الحيوي Methylenomycin A في *Streptomyces coelicolor* A3 (2) هي المورثات المحمولة على البلازميد (SCP1) الذي حدد وراثياً لأول مرة من قبل (Vivian, 1971) ، و الدليل على أن إنتاج Methylenomycin يقوم به SCP1 ينبع من القدرة على انتقال SCP1 بين الأنواع الأخرى. وهكذا فإن *Streptomyces parvulus* التي تنتج عادة المضادات الحيوية Actinomycin-D جميعها تصبح منتجة لـ Methylenomycin عندما يكون SCP1 مزوج عليها (Kibry et al., 1975)، (Chater and Bibb, 1997) .

أجريت عملية مسح على 34 عزلة من ستربتومايسيس المنتجة للمضادات الحيوية، من أجل كشف مشاركة البلازميدات في هذه العملية. وأظهرت النتائج أن للبلازميدات الخطية دوراً، كما الحمض النووي في إنتاج Lankacidin (Hirochi and Sakaguchi, 1982) .

وأجريت دراسات على *Streptomyces lasaliensis* التي تنتج Echinomycin و Laslocid ، فتم التوصل إلى مشاركة البلازميد الخطي الكبير pKSL في إنتاج المضادات الحيوية، لا سيما عند إجراء تجارب الاندماج النووي ، ولقد جرى عزل هذا البلازميد الضخم بنجاح (1987) ، (Kinashi and Shimaji) . كما مكن تطبيق عملية الرحلان الكهربائي في هلام الأغاروز من اكتشاف البلازميدات الخطية العملاقة 90-590Kb من سلالات ستربتومايسيس المنتجة للمضادات الحيوية مثل *Streptomyces violaceoruber*، *Streptomyces lasaliensis* ،

Streptomyces rochei و *Streptomyces parvulus* كشفت هذه الطريقة أيضاً أن البلازميد SCP1 في *Streptomyces coelicolor* (الذي كان قد عرف لفترة طويلة على أنه العنصر الجيني الذي يحدد التصنيع الحيوي لـ Methylenomycin) لا يقتصر دوره على ذلك فقط، ولكن أيضاً هو المسؤول عن مقاومة Methylenomycin (Chater and Bruton, 1985) كما أظهرت الدراسات الكثيرة التي أجريت على *Streptomyces violaceoruber* أن هذه السلالة تتضمن سلسلة من البلازميدات (410-590 Kb) ، وأشير إلى مشاركة هذه البلازميدات في إنتاج المضادات الحيوية (Kinashi and Murayama , 1991) .

4-2-2- نشوء وتطور البلازميدات:

هنالك عدة دلائل تشير إلى أن البلازميدات انحدرت غالباً من مواد وراثية غريبة عن الخلية البكتيرية المضيفة لها ، كما أن هنالك اعتقادات بأن هذه البلازميدات هي فيروسات منحلة ، يتم تضاعفها بصورة ذاتية و مستقلة بدون الاعتماد على صبغي البكتريا المضيفة، علماً أن هنالك اختلافات كبيرة بين أساسيات تضاعف البلازميد و تضاعف صبغي البكتريا، يضاف إلى ذلك الاختلاف الملحوظ بينهما من حيث تركيب القواعد ووظائف الجينات المحمولة على البلازميدات والمختلفة عن وظائف الجينات في الصبغي (العاني ، 1992) ، (Jawetz and Adelberg , 1998)

4-2-3- استخدام البلازميدات :

توجهت الأنظار لاستخدام البلازميدات كنواقل استتسال بسبب قابليتها للتكرار المستقل عن صبغي البكتريا لاحتوائها على منشأ تكرار خاص بها (عماش ، 1987) ، (Chopra and Nasim , 1996) . كذلك يمكن الاستفادة من النسق البلازميدي كأحد الطرق المستخدمة للتمييز لتحديد السلالات المتماثلة من النوع الواحد من البكتريا، حيث تتضمن الأنظمة : التمييز المصلي (serotype) والتمييز الكيموحيوي (Biochemical typing) والتمييز التغذوي (Auxotyping) واختبارات الحساسية للمضادات الحيوية والتمييز بواسطة العاثيات البكتيرية، حيث ساعدت هذه الطرق التصنيفية الدراسات والاستنتاجات الوبائية في حالات التسمم الغذائي وفي حالات الإسهال

(Old and Primrose , 1989) ، (Pettis et al, 2001).

ويعد النسق البلازميدي (plasmid profile) من المؤشرات الحديثة المهمة في اتجاه طبي معروف بالوبائية الجزيئية (molecular epidemiology)، ويعرف النسق البلازميدي بأنه توصيف البلازميدات المستخلصة من العزلات المرضية، حيث يمكن تأشير علاقة وبائية في حال

تماثل صفات البلازميدات تركيبياً ووظيفياً، ويوصف أحياناً باسم البصمة البلازميدية (plasmid fingerprinting) إذا ما استخدمت الإنزيمات القاطعة بشكل موسع للتهجين مع مؤشرات أو معلمات جينية أو سلاسل معينة من DNA للكشف عن سلاسل متماثلة في بلازميدات معزولة من بكتريا مختلفة ومن مواقع جغرافية قد تكون متباعدة تماماً، حيث يمكن اقتفاء أثر ومعرفة مصدر الوباء الساري (Gori et al. , 1996).

كما أن للبلازميدات في ستربتومايسيس دوراً كبيراً في إنتاج المضادات الحيوية ، وفي بعض الأحيان تحمل البلازميدات الجينات التركيبية للإنزيمات التي تشترك في تنظيم بناء المضادات الحيوية (Butler et al., 2002).

4-2-4 - تحييد البلازميدات (plasmids curing):

تعرف عملية تحييد البلازميدات بأنها عملية طرد و فقدان البلازميدات (أو جزء منها) أو العناصر الأخرى غير الصبغية خارج الخلية البكتيرية باستعمال معاملات فيزيائية أو كيميائية (Bleakey and Crawford, 1989).

تتعرض البلازميدات إلى عملية انعزال وحذف تلقائي في بعض الخلايا البكتيرية (spontaneous segregation) ، وعلى الرغم من تميزها بثبات توارثها ، فأنها يمكن أن تفقد من بعض البكتريا عند حفظها لفترة طويلة (Soussy et al., 1975). تستخدم طرق مختلفة في المختبر لتحييد البلازميدات أهمها :

4-2-4-1 - تحييد البلازميدات باستخدام عوامل كيميائية :

العوامل الكيميائية المستخدمة في تحييد البلازميدات، والتي تتداخل في تضاعف الـ DNA عديدة منها: المواد الكيميائية والمضادات الحيوية.

حيث استخدم الأكردين البرتقالي (Acridin orange) وبروميد الإيثديوم و التي تستخدم أيضاً في تحييد البلازميدات (Rubin and Rosenbium, 1971). كما أشار Trevors في عام 1986 بأن كلاً من بروميد الإيثديوم و الأكردين البرتقالي والمائتومايسين C والأكريفيلافين لها القابلية على تحييد البلازميدات ولكن بدرجات متفاوتة، وتؤثر هذه المواد فقط على عملية تضاعف البلازميدات دون التأثير على تضاعف الصبغي البكتيري ككل (Hahn and Ciak, 1996).

ومن جهة أخرى وجد أن مركب SDS (Sodium dodecyl sulfate) يستطيع تحييد بعض البلازميدات ، كما لوحظ أن بعض الخلايا الحاوية على بلازميد أو أكثر تكون حساسة بدرجة كبيرة لـ SDS في بعض البكتريا (Meinhardt *et al.*, 1997).

ولوحظ أن للمضادات الحيوية، مثل مضادي الريفامبيسين والنوفوبايسين تأثير على تضاعف DNA البلازميدي، مما يسهل فقدان تلك البلازميدات (Johnston and Richmond, 1970).

وأشار باحثون آخرون إلى أن مركبات الكوينولون Quinolone وخصوصاً حامض النالديكسيك لها دور في تحييد البلازميدات من خلال تأثيرها في إنزيم الـ gyrase (Topoisomerase II) (Sarker and Raichomdhuri, 1980).

كما وجد أن استعمال الأنزيم الحال (الليزوزيم) يؤدي إلى فقدان البلازميدات الذي ترافق مع فقدان البكتريا لجدارها . (Millar, 1987).

4-2-4-2- تحييد البلازميدات باستعمال عوامل فيزيائية:

تعد المعاملات الفيزيائية عموماً أقل كفاءة من المعاملات الكيميائية في تحييد البلازميدات، وبهذا الشأن أشار May وزملاؤه في عام 1964 إلى أن استعمال الزرع المتكرر في درجات حرارة مرتفعة لغرض تحييد البلازميدات يكون ذا كفاءة أقل من المعاملات الكيميائية، وإن تحييدها يعد جزئياً، حيث وجد أن نمو البكتريا في درجة حرارة عالية (42-44°C) يمنع انتساخ DNA البلازميدي (Phuchareon *et al.*, 1999).

كما وجد أن للتشعيع تأثيراً مهماً في عملية التحييد (Kozak *et al.*, 1974)، (Bennett and Grinsted, 1986) ، وتلعب عوامل كثيرة دوراً كبيراً في كفاءة عملية فقدان البلازميدات ، مثل نوع العزلة البكتيرية وكمية ونوع العامل الفيزيائي المستخدم للتحييد وفترة المعاملة والحالة الفيزيولوجية للخلايا وغيرها.....

(Picardeau and Vincent, 1997) ، علماً أن عملية التحييد تحصل كنتيجة للتأثير في عملية الاصطناع الحيوي للأحماض النووية أو في نفاذية الغشاء الخلوي (Trevors and Oddie, 1986).

الفصل الثاني

المواد وطرق العمل

MATERIALS & METHODS

المواد:

1- الأجهزة والأدوات المستخدمة:

يبين الجدول (1) الأجهزة التي استخدمت خلال هذه الدراسة وكذلك الشركات المصنعة وبلد المنشأ.

جدول (1) الأجهزة المستخدمة خلال الدراسة:

الأجهزة	الشركة / بلد الصنع
حاضنة Incubator	Labtech / الهند
معقم Autoclave	—
مسخن مع محرك مغناطيسي Magnetic Stirrer	ألمانيا / BOECO
غرفة زرع ميكروبي Laminar flow Hood	سوريا / BIOAIR
ميزان عادي Balance	تايلاند / Mettler Toledo
ميزان حساس Sensitive balance	تايلاند / Mettler TOLEDO
حمام مائي Water bath	ألمانيا / Julabo
ميكرويف	الأردن / DAEWOO
مثقلة تبريد Centrifuge	ألمانيا / Kendro
فرن تجفيف Oven	JRAd
مازج (خلاط منضدي) Vortex	
ثلاجة	سوريا / الحافظ
جهاز رحلان كهربائي Electrophoresis	Genel/-
مقياس pH	رومانيا / HANNA
pH meter	

الفليبين / Olympus	مجهر ضوئي Microscope
New Brunswick Scientific -	حاضنة هزاة Incubator shaker
الفليبين / Olympus	آلة تصوير camera
-	جهاز عد المستعمرات
-	مجهر فولطية Power Supply
Cleaver/-	جهاز باعث الأمواج فوق البنفسجية UV Transilluminator

أما الأدوات المستخدمة فهي:

- ماصات ميلي مترية - أطباق بتري - أنابيب اختبار معقمة ومحكمة الإغلاق
 - مصافي معدنية - دوارق زجاجية بسعات مختلفة - إبر حقن
 - مرشحات ذات ثقوب دقيقة - ماصات ميكرومترية
 - رؤوس ماصات بأحجام مختلفة - إبرة تلقح
 - أقمار زجاجية - مجفف Desiccator.
- عقمت الأدوات المعدنية والزجاجية داخل فرن عند درجة حرارة 180°C لمدة ثلاث ساعات وتركزت إلى حين الاستخدام .

2- البيئات والمواد الكيميائية المستخدمة :

2-1- الأوساط الزرعية culture media :

2-1-1- الأوساط الزرعية الجاهزة :

- 1 -الآغار المغذي Nutrient Agar: الذي يحتوي على (3 غ مستخلص اللحم البقري ، 5غ ببتون و 15غ آغار) ، أخذ 23 غ منه وأضيف إليه 1 لتر من الماء المقطر ، أذيب المعلق بواسطة السخان المغناطيسي بعد ضبط pH عند 6.8 ، ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°C وضغط 1 كغ/سم² لمدة 20 دقيقة ، ثم حضن هذا الوسط بدرجة حرارة 37°C مدة 24 ساعة، للتأكد من عدم تلوثه قبل الاستخدام.

2- المرق المغذي Nutrient Broth: يتكون من (3 غ مستخلص اللحم البقري و 5 غ ببتون) , أخذ 8 غ منه وأذيب في 1 لتر من الماء المقطر، وضبط pH عند 6.8 ، ثم عقم بالمؤسدة بدرجة حرارة 121°C وضغط 1 كغ/سم² لمدة 20 دقيقة.

3- آغار مولر هنتون (M.H.A): ويتألف من (300 غ مسحوق اللحم البقري ، 175 غ كازئين ، 1.5 غ نشاء و 17 غ آغار) ، أخذ 38 غ منه وأضيف إليه 1 لتر من الماء المقطر، وضبط pH عند 7.3 ، أذيب المعلق بواسطة السخان المغناطيسي، ثم عقم بالمؤسدة بدرجة حرارة 121°C وضغط 1 كغ/سم² لمدة 20 دقيقة ، ثم حضن بدرجة حرارة 37°C مدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثه قبل الاستخدام.

2-1-2- الأوساط الزرعية التركيبية:

1- وسط غاوزا المعدل Gausa agar (Komagata, 1986)

حضر بإذابة المواد التالية :

20 g	نشاء ذواب
1 g	KNO ₃
0.5 g	NaCl
0.5 g	MgSO ₄ . 7H ₂ O
0.5 g	K ₂ HPO ₄
15 mg	FeSO ₄ . 7H ₂ O
20 g	Agar

في كمية من الماء المقطر وضبط pH إلى 7.3 ، ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر وعقم بالمؤسدة على درجة حرارة 121°C لمدة 20 دقيقة.
وللزرع الأولي للتربة، أضيف الأكتيديون إلى الوسط وذلك بتركيز 100µg/ml لمنع نمو الفطريات.

2- وسط آغار مستخلص الخميرة - مستخلص المالت المحور (YEME)

حضر بإذابة المكونات التالية :

4 g	مستخلص الخميرة
10 g	مستخلص المالت
4 g	غلوكوز

في كمية من الماء المقطر وضبط pH عند 7.3 ، ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر وعقم بالمؤسدة على درجة حرارة 121°C لمدة 20 دقيقة (Hopwood, 1999).

3 - وسط لوريا السائل (Luria-Bertani broth):

حضر بإذابة:

10 g	تربتون
5 g	مستخلص الخميرة
5 g	NaCl

في 900 ml من الماء المقطر ، وعدل pH إلى 7 ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر وعقم بالمؤسدة على حرارة 121°C لمدة 20 دقيقة (Sambrook *et al.*, 1989) .

3- المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة :

3-1- المواد الكيميائية:

يبين الجدول (2) المواد الكيميائية التي استخدمت خلال الدراسة و اسم الشركة والبلد المصنع

جدول (2) المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة:

الشركة المصنعة	اسم المادة الكيميائية
----------------	-----------------------

أبيدين - الأكتيديون Cycloheximide - بنسلين G - سلفات الأمونيوم - هيدروكسيد الصوديوم - كبريتات المغنيزيوم المائية - كلوريد الكالسيوم	Applichem ألمانيا
نشاء ذواب - كلوريد الليثيوم - كربونات الكالسيوم - كبريتات الزنك المائية - كلوريد الأمونيوم - فوسفات أحادية البوتاسيوم - K_2HPO_4 - كلورالبوتاسيوم - كربونات الصوديوم المائية - كبريتات الحديد المائية - كبريتات النحاس المائية - المرق المغذي .	Scharlau E.U
EDTA - كلور المغنيزيوم المائي - أسيتات الصوديوم - أسيتات الأمونيوم - SDS - مستخلص الخميرة YE.	u.s.b نيزرلاند Netherlands
الأكريدين البرتقالي (OA) - كلوريد المنغنيز	molekula EEC/Prolabo

3-2- المحاليل المستخدمة لاستخلاص DNA البلازميدي:

استخدمت المحاليل التالية للاستخلاص:

1- TE Buffer : حضر بإذابة M (0.01) من Tris-acid و M (0.001) من

مادة EDTA- Na_2 في كمية من الماء المقطر و عدل pH إلى 8 ، ثم أكمل الحجم

إلى 1 لتر، بعدها عقم بالمؤصدة على حرارة $121^{\circ}C$ لمدة 20 دقيقة و حفظ في

درجة حرارة $4^{\circ}C$.

2- LiCl : حضر بإذابة 21.2 g من كلوريد الليثيوم في 100 ml من الماء المقطر

ثم عقم بالمؤصدة على درجة حرارة $121^{\circ}C$ لمدة 20 دقيقة ، خزن هذا المحلول عند

درجة حرارة $4^{\circ}C$.

3- Tris-HCl (M1): حضر بإذابة 121.1 g من Tris-base في 800 ml من

الماء المقطر ، أضيف إليه 42 ml من حمض كلور الماء المركز ، ترك ليبرد بدرجة

حرارة الغرفة، وأكمل الحجم إلى 1 لتر، ومن ثم عقم بالمؤصدة على درجة حرارة

$121^{\circ}C$ لمدة 20 دقيقة.

4- SDS (20% w/v) : حضر بإذابة 200 g من SDS في 900 ml من الماء المقطر، سخن إلى درجة حرارة 68°C وحرك حتى الذوبان ، ضبط pH عند 7.2 بإضافة بعض قطرات من حمض كلور الماء ، ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر وخن بدرجة حرارة الغرفة.

5- SET buffer: أذيب 20 mM Tris + 25 mM EDTA + 75 mM NaCl في كمية من الماء المقطر ثم ضبط pH عند 7.5 .

6- دائرة التحميل Loading Buffer : أذيب 40 % سكروز + 0.25 % صبغة البروموفينول الأزرق في الماء المقطر المعقم وحفظ في زجاجة عاتمة في درجة حرارة 4°C (Sambrook et al., 1989).

7- محلول صبغة بروميد الايثديوم EtBr: أذيب 0.05 g من EtBr في 10 ml من الماء المقطر ، ثم أضيفت الصبغة إلى هلام الأغاروز بتركيز 0.5 µg/ml مع التحريك لإتمام المزج بشكل جيد.

8- 0.5 M EDTA : أذيب 186.1 g من EDTA في 800 ml من الماء المقطر ، حرك بقوة بواسطة السخان ، ثم ضبط pH عند 8 بواسطة NaOH ، ومن ثم عقم بالمؤصدة على درجة حرارة 121°C لمدة 20 دقيقة.

9- هلام الاغاروز:

حضر الهلام بتركيز 1 % و ذلك بإذابة 0.8 g من الأغاروز في 80 ml من 1 X Tris – borate في فرن كهربائي، ثم برد الهلام إلى 50°C و أضيفت صبغة EtBr بتركيز 0.5 µg/ml. ثم بعد ذلك صب الهلام في القالب الخاص به و ثبت المشط قرب إحدى نهايتي القالب لعمل الحفر و ترك الهلام ليتصلب مدة 40 دقيقة ثم رفع المشط برفق ووضع القالب برفق في مكانه المخصص في حوض جهاز الرحلان الكهربائي الحاوي على 1X TBE إذ يغمر هذا المحلول سطح القالب بمستوى لا يقل عن 1 mm (Maniatis et al., 1982).

4- المضادات الحيوية المستخدمة:

4-1- أقراص المضادات الحيوية: استخدمت أقراص المضادات الحيوية التالية:

جدول (3) أقراص المضادات الحيوية المستخدمة:

الشركة المصنعة	Concentration/mg	الرمز	Antibiotics
Sigma	15	cla	Clarithromycin
=	5	cip	Ciprofloxacin
=	30	rif	Rifampicin
=	30	tet	Tetracyclin
=	30	cfz	Ceftazidim
=	30	cfx	Cefotaxim
=	10	amp	Ampicillin
=	10	pen	Penicillin - G

4-2- مسحوق المضادات الحيوية: تم الحصول على مسحوق المضادات من شركة تاميكو

الطبية و تحضيرها مخبرياً كما ورد في (National Committee for Clinical Laboratory Standards ,1997) باتباع الخطوات التالية:

أ- تحضير أقراص ورق النشاف:

استخدم ورق نشاف الحبر، و عمل منها أقراص دائرية بواسطة ثاقبة الورق ، وضعت في طبق بتري و عقت بالمؤصدة، ثم جففت في الفرن على درجة حرارة 80-90°C لمدة ساعتين مع تكرار الوزن حتى ثبات وزنها .

ب-حضرت المضادات الحيوية بطريقة معقمة باستخدام أنابيب معقمة و ماء معقم ، وضع في أبرة الحقن المضاد ذو التركيز 50 mg باستخدام الفلتر (0.22 Millex . Gp) ثم وضعت في زجاجة ساعة معقمة في غرفة الزرع ، وضعت أقراص ورق النشاف في محلول المضاد و تركت مدة 10-15 دقيقة ثم سحبت إلى حواف الزجاجة و باستخدام الملقط المعقم إلى أن تجف وتصبح جاهزة للاستخدام. و هذه المضادات هي كما هو مبين في الجدول (3) :

جدول (4) مسحوق المضادات الحيوية المستخدمة:

الشركة المصنعة	Concentration/mg	الرمز	Antibiotics
تاميكو الطبية	50	cla	oxytetracycline
=	50	cip	chloramphenicol
=	50	rif	colistin
=	50	tet	tylosin
=	50	cfz	neomycin
=	50	cfx	streptomycin
=	50	amp	chlortetracycline
=	50	amo	amoxicillin

5- الكائنات المختبرة :

استخدمت الكائنات الدقيقة التالية في اختبار الفعالية ضد البكتيرية لستربتومايسيس تجاهها وكانت كما هو موضح في الجدول (4):

جدول (5) أنواع الكائنات الدقيقة المختبرة.

مصدرها	الكائنات المختبرة
مختبر الخدمات الطبية / دمشق	<i>Vibrio fluvialis</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
معمل الخميرة / دمشق	<i>Saccharomyces servisiae</i>

6- العينات:

أخذت العينات من ثلاث مناطق من القطر العربي السوري ، وهي:

1- دير الزور : مخفر مركز الحراجي - حويجة صقر

2- دمشق : كلية الزراعة.

3- تدمر.

طرق العمل:

1- جمع عينات التربة:

جمعت عينات التربة من مناطق مختلفة من سورية كما ورد في الفقرة (6) وفي فصل الربيع حيث يكون الغطاء العشبي بصورة جيدة ، اختيرت العينات بشكل عشوائي من أماكن مختلفة ، و يمكن تلخيص طريقة جمع عينات التربة بالخطوات التالية:

1- اختيار الموقع المناسب لجمع العينات حيث يفضل المكان الذي يحوي غطاء عشبي جيد و ذلك لزيادة احتمالية وجود أكبر قدر ممكن من الكائنات الدقيقة.

2- أزيلت الطبقة العشبية بالفأس و كذلك الطبقة العليا من التربة على عمق 3-4 cm ، بعد ذلك أخذت التربة حتى عمق 6-8 cm و بهذه الطريقة نتجنب وجود الفطور إلى حد ما من الطبقة السطحية المعرضة للهواء ، ثم أخذت عينات التربة من ثلاث مواقع متباعدة من الحفرة ووضعت في الطبق الزجاجي المعقم.

3- أخذت مكررات من المكان نفسه (حوالي أربعة مكررات) من مناطق تبعد عن بعضها 10-20 متر لتمثيل المكان بشكل جيد (Mayfield et al.,1972).

2- تحضير و تجهيز العينات:

1- جففت التربة و ذلك بدرجة حرارة المخبر و التي تتراوح بين 20-25°C و تركت على هذه الحرارة لمدة 4-5 أيام .

2- بعد جفاف التربة سحقت وطحنت بشكل جيد باستخدام الهاون.

3- غربلت التربة المطحونة بمنخل ، و بهذا تصبح التربة جاهزة للاختبارات اللاحقة.

3- إغناء التربة:

تهدف عملية إغناء التربة إلى زيادة عدد مستعمرات الفطور الشعاعية بشكل عام، و بكتريا سترپتومايسس بشكل خاص، و ذلك بإتباع ما يلي:

1- حضرت المواد المراد إغناء التربة بها و هي (بذور القطن - بذور الفول السوداني)

حيث جففت بدرجة حرارة المختبر للمحافظة على خصائصها قدر الإمكان، ثم بعد

التجفيف نزعت عنها القشور و سحقت باستخدام الهاون ثم نخل المسحوق الناتج.

2- إغناء التربة: أخذ 1 g من كل نوع من أنواع التربة ثم أضيفت إليها المركبات التالية:

* 1g تربة + 0.1g CaCO_3 ، حيث أن كربونات الكالسيوم تقلل pH التربة مما

يحسن نمو الفطور الشعاعية و يثبط نمو معظم الفطور.

* 1g تربة + 15mg مسحوق بذور القطن.

* 1g تربة + 15mg مسحوق بذور الفول السوداني.

* 1g تربة بدون أي إضافة (تربة شاهد).

3- مزجت التربة مع المواد المذكورة سابقاً كل على حده ، ثم حضنت بدرجة حرارة 28°C لمدة

سبعة أيام في جو مشبع بالرطوبة، تم تأمين هذه الظروف بوضع أطباق تحتوي ماء في

الحاضنة (Kutzner, 1981).

4- العزل من التربة:

حضرت التخفيفات العشرية و ذلك بإضافة 1g من التربة المغناة إلى 9 ml من الماء المعقم و

ذلك ضمن أنابيب معقمة محكمة الإغلاق و باستخدام ماصات معقمة ضمن جو معقم، أجريت

عدة تخفيفات متسلسلة كما هو موضح في الجدول (5):

جدول (6) تحضير التخفيفات من معلق التربة:

التخفيفات				نوع المعاملة
10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0	شاهد (تربة بدون إغناء)
10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0	تربة + CaCO_3
10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0	تربة + بذور القطن
10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0	تربة + بذور الفول السوداني

4-1- العزل الأولي للفطور الشعاعية:

بعد تحضير بيئة الغاوزا كما سبق شرحها ، وضعت بعد التعقيم في حمام مائي ريشما يتم

تحضير الأكتيديون (Cycloheximide) والذي حضر كما يلي:

1- أجري وزن الأكتيديون و ذلك بمعدل (100µg/ml من البيئة) وتم الوزن بطرف معقمة بالقرب من مصباح البنزن و باستخدام الميزان الحساس.

2- وضع الأكتيديون الموزون في أنبوب معقم و أذيب في 1ml من الإيثانول المطلق (نقاوته 99.98%).

3- أضيف إلى الحجم حوالي 5ml من الماء المعقم، ثم حرك باستخدام الخلاط المنضدي Vortex، وأضيف الأكتيديون المحضر إلى البيئة بحرارة 50°C و يراعى عدم تعقيم البيئة بعد إضافة الأكتيديون لأن الحرارة العالية تقطعه فعاليته.

4- صبت البيئة الحاوية على الأكتيديون في أطباق بتري في ظروف معقمة ثم تركت هذه الأطباق في الحاضنة على حرارة 28°C لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم وجود التلوث.

5- أخذت قطرة من كل تخفيف من كل من أنواع التربة المغناة (بحدود 0.1ml) ووضعت في مركز الطبق و نشرت.

6- حضنت في درجة حرارة 28°C لمدة ثلاثة إلى خمسة أيام (Calam, 1987).

4-2- العزل الثاني للفطور الشعاعية:

نقبت العزلات ثلاث مرات على بيئة الغاوزا المضاف إليها الأكتيديون ، ومن ثم نميت على أوساط خالية من الأكتيديون، لذا حضر وسط الغاوزا من دون الأكتيديون و زرعت العزلات عليه ، ثم زرعت في أنابيب اختبار و حضنت على درجة حرارة 28°C لمدة 14 يوماً.

5- اختبار تشخيص العزلات:

شخصت العزلات تبعاً للطرق المتبعة في المشروع الدولي للستربتومايسيس ISP (International Streptomyces Project) ، وذلك باستخدام الطرق المورفولوجية والفيزيولوجية .

5-1- التشخيص المورفولوجي:

تضمن التشخيص المورفولوجي استخدام الفحص المجهرى و بالعين المجردة وفقاً لطريقة cover slip culture (Kawato and Shinobu, 1979)، وذلك للتحري عن الصفات المظهرية التالية:

- 1- لون المشيجة الهوائية المتبوعة: والتي قد تكون ذات لون أبيض ، رمادي إلى بني ، أحمر (أحمر وردي)، أصفر ، أصفر مخضر ، أزرق (رمادي مزرق) ، تدرجات الأزرق ، أخضر و بنفسجي.
- 2- لون المشيجة الأرضية: إما أن تكون لا لون لها أو أصفر ، بني ، أسود ، برتقالي ، وردي ، أحمر ، أزرق و بنفسجي.
- 3- صبغات الميلانين: قدرة على إنتاج اللون البني وتدرجاته ، البني الغامق ، أو الأسود حيث تلون البيئة بهذه الصبغات.
- 4- شكل سلسلة الأبواغ: فقد تكون سلاسل الأبواغ مستقيمة أو ملتوية، حلزونية أو بشكل خطافات.
- 5- القابلية أو عدم القابلية لإنتاج المواد المضادة (Bergey, 2000) .

5-2- التشخيص الفيزيولوجي:

- تضمن التحري عن قدرة العزلات على تمثيل و استخدام السكريات:
- استخدم شاهد (بدون مصدر كربوني)
 - استخدم مصدر كربوني نقي وعقيم ، وهذه السكريات كما هو موضح في الجدول (7) هي:

جدول (7) السكريات المستخدمة في التشخيص الفيزيولوجي.

D-Glucose	D - غلوكوز
Sucrose	سكروز
I-Inositol	I - إينوسيتول
D-Fructose	D - فركتوز
Raffinose	رافينوز
L-Arabinose	L - أرابينوز
D-Xylose	D - كزايلاوز
D-Mannitol	D - مانيتول
Rhamnose	رامنوز

تعقم السكريات بدون استخدام الحرارة بطريقة الفلترة باستخدام مرشح بكتريولوجي Millipore ذو قطر ثقب $0.2\mu\text{m}$.
يتألف الوسط الذي استخدم من :

A. السكر المعقم الذي يضاف إلى وسط آغار الأملاح المعدنية الأساسي ليعطي التركيز النهائي 1%.

B. Pridham and Gottlieb trace salts: استخدم من هذا المحلول 1

ml فقط للوصول إلى الوسط النهائي، وحضر كما يلي:

0.64 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0.11 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.79 g	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0.15 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
100 ml	ماء مقطر

خزن عند حرارة $3-5^\circ\text{C}$ إلى حين الاستخدام، قبل الاستخدام ترك بدرجة حرارة الغرفة لكن يجدد كل شهر.

C. Basal minerals Salts agar وسط آغار الأملاح المعدنية

الأساسي:

2.64 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
2.38 g	KH ₂ PO ₄ . Anhydrous
5.65 g	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O
1 g	MgSO ₄ .7H ₂ O
1 ml	(B) trace salts
1000 ml	ماء مقطر

حلت المكونات و ضبط pH عند 6.8-7 باستخدام (1N) NaOH أو (1N) HCl ثم أضيف 15 غ آغار.

الوسط الكامل:

عقم وسط (C) basal agar ثم برد حتى 60°C وأضيف المصدر الكربوني المعقم (A) ليعطي التركيز حوالي 1% حرك المزيج ثم استخدم. (Shirling and Gottlieb, 1968)

6- اختبار حساسية العزلات تجاه أقراص المضادات الحيوية:

أجري اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار باستعمال أقراص المضادات الحيوية ، يوضح الجدول (3) تراكيز أقراص المضادات الحيوية المستعملة في التجربة. فقد جرى زرع عزلات الفطور الشعاعية على أطباق من وسط الغاوزا ، وذلك بنشر 0.1 مليلتر من عالق البكتريا بالتركيز الملائم و وزعت الأقراص على سطح الطبق ، ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة 28°C لمدة 24 ساعة ، و بعدها سجلت النتائج وفقاً لقطر منطقة التثبيط (إن وجدت) المتكونة حول كل قرص (Baron and Finegold , 1990) ، اعتماداً على المسافات القياسية لقطر منطقة التثبيط الواردة في المصدر (Branger *et al.*, 1998).

7- اختبار حساسية الكائنات المختبرة لأقراص المضادات:

أجري اختبار حساسية الكائنات المختبرة للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار باستعمال أقراص المضادات الحيوية ، فقد زرعت الكائنات المختبرة على أطباق من وسط M.H.A ، وذلك بنشر 0.1 مليلتر من عالقها بالتركيز الملائم و وزعت الأقراص على سطح الطبق ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة ، وبعدها سجلت النتائج وفقاً لقطر منطقة التثبيط (إن وجدت) المتكونة حول كل قرص (Baron and Finegold , 1990)

، اعتماداً على المسافات القياسية لقطر منطقة التثبيط الواردة في المصدر (Branger et al., 1998).

8- اختبار الفعالية ضد البكتيرية لبكتريا *Streptomyces* ضد الكائنات الدقيقة المختبرة:

استخدمت في هذا الاختبار طبقتين من الآغار:

1- الأولى هي وسط الغاوزا التي نمت عليها بكتريا *Streptomyces* بطريقة

الخطوط وحضنت لمدة ستة ايام في درجة حرارة 28°C.

2- الطبقة الثانية هي وسط M.H.A الخاص لتنمية الكائنات المختبرة الذي صب

فوق الطبقة الأولى الحاوية على بكتريا *Streptomyces* المنماة ثم زرعت عليها

الكائنات المختبرة بشكل معامد لخطوط *Streptomyces* ثم حضنت عند درجة

حرارة 37°C لمدة 24 ساعة (Ali et al., 1998).

9- تجربة تحييد البلازميدات:

اتبعت طريقة محورة عن طريقة (Crameri et al., 1986) والتي تتلخص بمايلي:

1- عملت تخفيفات من عالق الأبواغ الذي حضر كما جاء في (Hoopwood et al., 1985).

بحيث جرى الحصول على تخافيف 10^{-2} – 10^{-5} .

2- نشر المعلق البوغي على الوسط الحاوي على وسط الغاوزا مع صبغة الأكردين

البرتقالي OA بالتراكيز (4-8-16-32-64 mcg/ml).

3- حضنت الأطباق في درجة حرارة 28°C حتى ظهور المستعمرات عليها، ثم أجريت

اختبارات الفعالية ضد الميكروبية على المستعمرات الناتجة.

1- اختبار الفعالية ضد البكتيرية للسلاطات المعاملة بصبغة OA :

3- زرعت المستعمرات على وسط غاوزا بطريقة الخطوط وحضنت لثلاثة ايام على درجة حرارة 28°C .

4- بعد نموها صب فوقها وسط M.H.A ثم زرعت عليها الكائنات المختبرة بشكل معامد لخطوط *Streptomyces* كما ورد في الفقرة (8) , ثم حضنت عند درجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة.

11- استخلاص DNA البلازميدي:

استخدمت طريقتان لاستخلاص DNA البلازميدي:

الطريقة الأولى:

باستخدام الآزوت السائل و كلوريد الليثيوم وذلك باتباع الخطوات التالية:

- 1- كشطت المشيعة الهوائية ثم سحقت باستخدام النتروجين السائل.
 - 2- أضيف 800µl من LETS (0.1M كلوريد الليثيوم ، EDTA 10 mM ، 10 mM Tris-HCl ، 0.5% SDS).
 - 3- مزج الخليط السابق جيداً وحضن لمدة عشر دقائق عند 65°C في حمام مائي.
 - 4- أضيف إليه 500µl من الكلوروفورم.
 - 5- أجريت عملية تنفيل لمدة عشر دقائق عند سرعة 10000 دورة/دقيقة.
 - 6- أخذت الطبقة العلوية ووضعت في أنبوب ايبندورف.
 - 7- أضيف 1000µl من الإيثانول 100% المحفوظ عند درجة حرارة 20°C .
 - 8- أجريت عملية تنفيل لمدة عشر دقائق عند سرعة 12000 دورة /دقيقة.
 - 9- أزيح السائل وجفف.
 - 10- غسل DNA بـ 1 مل من الإيثانول 70% .
 - 11- أجريت عملية تنفيل لمدة خمس دقائق بسرعة 12000 دورة/دقيقة.
 - 12- أزيح السائل وجفف لمدة عشر دقائق في مخلية الهواء بدرجة حرارة الغرفة 25°C.
 - 13- حل DNA في 50-75µl من TE-buffer وحفظ عند درجة حرارة 4°C.
- (Doyle , 1987).

الطريقة الثانية:

طريقة الترسيب بالملح أو تدعى SDS Lysis وذلك باتتباع الخطوات التالية :

- 1- نمتت مستعمرة مفردة من كل من السلالات المختارة المراد عزل DNA البلازميدي منها في 5 ml من وسط LB السائل المزود بالمضاد الحيوي المناسب وحضنت بدرجة حرارة 28°C في الحاضنة الهزاة، وبسرعة 60 دورة / دقيقة مدة 24 ساعة .
- 2- نقل المزروع البكتيري إلى أنبوب معقم سعة 10 ml ، وبعد الموازنة أجريت عملية تثقيف بسرعة 6000 دورة / دقيقة مدة 5 دقائق.
- 3- بعد الحصول على راسب الخلايا أضيف 5 ml من محلول SET ، 100 µl من محلول الليزوزيم (50 mg / ml) .
- 4- أضيف 140 µl من بروتيناز K ، 500µl SDS (10%) ثم حضن المزيج في حمام مائي على درجة حرارة 55°C لمدة ساعتين ، مع التحريك المتواصل.
- 5- أضيف 2 ml من 5 M NaCl خلط المزيج بواسطة تحريك الأنبوب عدة مرات.
- 6- أضيف 5 ml Chloroform ومزج بواسطة التحريك مدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة .
- 7- أجريت عملية تثقيف بسرعة 4500 دورة / دقيقة مدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 20°C .
- 8- سحبت الطبقة المائية بعناية ونقلت إلى أنبوب Eppendorf معقم و أضيف كحول Isopropanol بمقدار 0.6 من حجم الرائق، وترك المزيج مدة ثلاث دقائق بالتقليب البطيء ثم أجريت عملية تثقيف بسرعة 12000 دورة / دقيقة مدة 15 دقيقة .
- 9- تم التخلص من الرائق وترك الراسب ليحفظ ثم أضيف 2 ml من محلول 70 Ethanol % ثم ترك ليحفظ.
- 10- أذيب DNA المترسب في 50 µl من TE buffer ، ثم حفظ بدرجة حرارة 10°C إلى حين الاستعمال في عملية الرحلان الكهربائي (Pospiech and Neuman ,1995).

12- الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز Agarose Gel Electrophoresis :

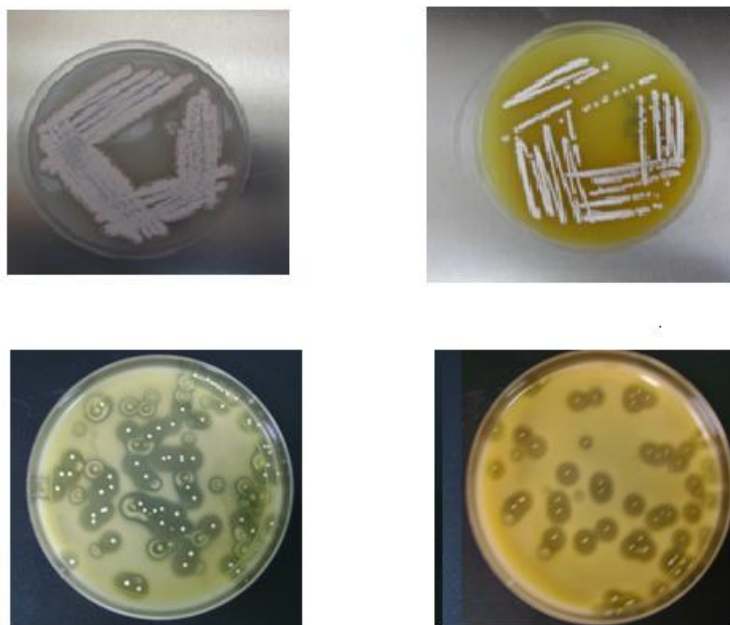
خضع DNA الذي تم عزله لعملية رحلان في قالب الأغاروز باتتباع الخطوات التالية:

- 1- حضر هلام الأغاروز بتركيز 0.8% (0.8 غ أغاروز في 100ml TBE) .
 - 2- مزج 0.01 ml من محلول DNA البلازميدي المستخلص (1µg) مع 3µl من محلول التحميل في أنبوب إيبندورف.
 - 3- حمل DNA داخل الحفر المتكونة في هلام الأغاروز المحضر.
 - 4- رحلت العينة باستخدام فرق كمون 100 فولط .
 - 5- رفع الهلام عن القالب بعد انتهاء عملية الرحلان الكهربائي.
- فحص الهلام بالأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز الفحص بالأشعة فوق البنفسجية V – Transilluminater و على طول موجة 254 nm (Maniatis *et al.*, 1982)

13- حفظ وإدامة العزلات:

13-1- الحفظ قصير الأمد (أسبوعين):

نميت العزلات على أطباق من وسط الغاوزا بدرجة حرارة 28° C لثلاثة أيام ثم حفظت في الثلاجة عند 4° C الشكل (2) .



شكل (2) الحفظ قصير الأمد لسلاسلات *Streptomyce*

13-2- الحفظ متوسط الأمد (ثلاثة أشهر) :

نميت العزلات على الوسط المغذي الصلب المائل Slants لمدة أسبوعين في درجة حرارة 28°C ، ثم حفظت في الثلاجة عند حرارة 4°C و جرت عملية التجديد لهذه العزلات دورياً كل ثلاثة أشهر، و ذلك بتنشيطها ثم إعادة زرعها على وسط زرع مائل جيد الشكل (3) .



شكل (3) الحفظ متوسط الأمد لسلاطات *Streptomyces*

3-13- الحفظ طويل الأمد:

جرى ذلك باتتباع الخطوات التالية:

- 1- أخذت تربة نظيفة و مجففة و منخولة ثم وضعت في أنابيب زجاجية و عقت في المؤسدة على درجة حرارة 121°C لمدة 20 دقيقة ، أعيد التعقيم ثلاثة مرات على التوالي ثم وضعت في المجفف في درجة حرارة 106°C لمدة ساعتين، ثم تم التأكد من خلو التربة من التلوث بزرع التربة المعقمة في وسط غاوزا الصلب مدة ثلاثة أيام في درجة حرارة 28°C .
- 2- لقت التربة المعقمة بأخذ 1 ml من معلق الأبواغ ثم حفظت بدرجة حرارة الغرفة في Desiccators حتى تمام الجفاف بعد ذلك حفظت في البراد عند درجة حرارة 4°C ، كما هو مبين في الشكل (4) الذي يوضح طريقة الحفظ في التربة.

ويمكن أن تحفظ التربة لمدة طويلة بطريقة أخرى، حيث يضاف 5ml من المعلق البوغي السابق إلى 5ml من الغليسول المعقم 40 % في أنابيب ثم يحرك المعلق بالخلاط و يخزن في حرارة -20°C إلى حين الاستخدام (Karch *et al.*,1995).



شكل (4) الحفظ طويل الأمد لسلالات *Streptomyces*

14 - التحليل الإحصائي:

أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS ، كما جرى تحليل الفروق بين المتوسطات باستخدام اختبار دونكان (Duncan, 1955).

الفصل الثالث

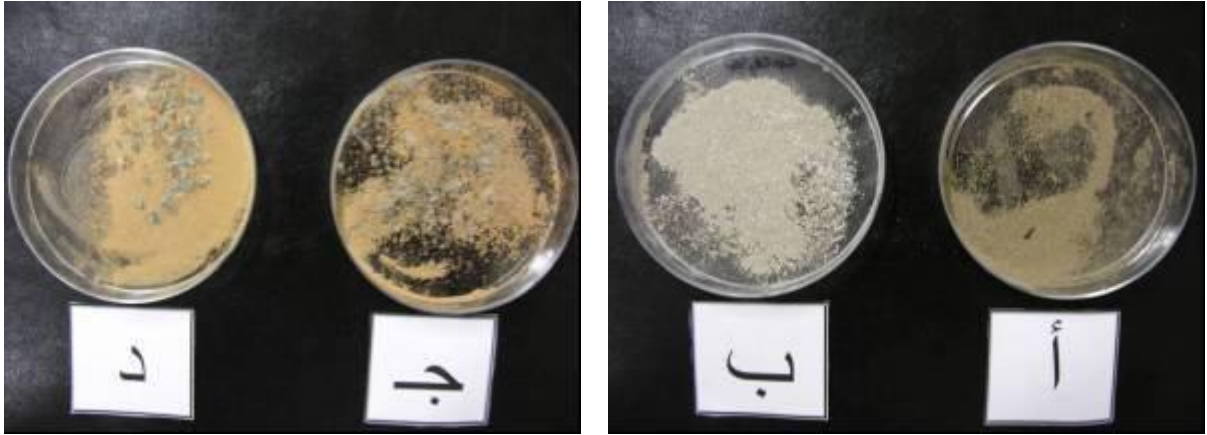
النتائج و المناقشة

RESULTS & DISCUSSION

1- إغناء التربة بالفطور الشعاعية :

يبين الشكل (5) المعاملات المختلفة لإغناء نماذج التربة ، وقد أوضحت نتائج الكشف عن الأطباق المزروعة بالترب المغناة بمعاملات الإغناء المختلفة ، ظهور النمو على الأطباق المغناة بإضافة مسحوق بذور القطن و بذور الفول السوداني بعد ثلاثة أيام من الحضانة ، بينما تأخر ظهور النمو على الأطباق المزروعة بتربة شاهد وكذلك بالترب المغناة بإضافة كربونات الكالسيوم CaCO_3 حتى اليوم الخامس من الحضانة في درجة حرارة 28°C ، و كان النمو جيداً بعد أسبوع من الحضانة في جميع الأطباق.

يعود ظهور النمو بشكل مبكر في الأطباق المزروعة بترب مغناة بمسحوق بذور القطن و مسحوق بذور الفول السوداني ربما يعود إلى أن هذه المواد المضافة أدت إلى زيادة عدد مستعمرات الفطور الشعاعية، كونها زودت الوسط بمواد محفزة لنموها ، والنتيجة هي تشجيع ظهور النمو بشكل مباشر. وهذا يتوافق مع ما ذكره Kutzner عام 1981، بأن إضافة مثل هذه المواد إلى التربة يقلل نمو الفطور إلى أدنى ما يمكن ، و في الوقت نفسه يزيد عدد أنواع *Actinomyces* في هذه التربة المعاملة.



الشكل (5) المعاملات المختلفة لإغناء التربة ، حيث:

- أ- تربة شاهد (من دون إغناء).
- ب- تربة + كربونات الكالسيوم CaCO_3 .
- ج- تربة + مسحوق بذور الفول السوداني.
- د - تربة + مسحوق بذور القطن.

2- العزل الأولي للفطور الشعاعية:

أخذ 1 g من كل نوع من أنواع الترب المذكورة في الفقرة (6) من الفصل الثاني، وأجريت التخفيفات كما ورد في الفقرة (4) من الفصل الثاني، وكانت لدينا النتائج الواردة في الجدول (8) الذي يبين عدد مستعمرات الأحياء الدقيقة (فطور و بكتريا) و تأثير طرق الإغناء المختلفة على عدد المستعمرات.

جدول (8) عدد مستعمرات الأحياء الدقيقة في 1 g تربة لنماذج استحصل عليها من مناطق مختلفة

المعاملة	التخفيف	العدد الكلي	عدد الفطور	عدد البكتريا	الشعاعية عدد الفطور %	الفطور
تربة تلمر	الشاهد	10^{-3}	74	13	61	12
	تربة+CaCO ₃	10^{-3}	18	8	10	7
	تربة+ بذور القطن	10^{-3}	30	7	23	17
	تربة+ بذور الفول السوداني	10^{-3}	28	5	23	16
تربة لير الزور	الشاهد	10^{-3}	74	11	63	9
	تربة+CaCO ₃	10^{-3}	67	0	67	36
	تربة+ بذور القطن	10^{-3}	33	2	31	23
	تربة+ بذور الفول السوداني	10^{-3}	27	1	26	12
تربة دمشق	الشاهد	10^{-3}	37	9	28	7
	تربة+CaCO ₃	10^{-3}	18	0	18	12
	تربة+ بذور القطن	10^{-3}	35	4	31	18
	تربة+ بذور الفول السوداني	10^{-3}	62	1	61	54

كما هو واضح من الجدول السابق تقارب التعداد العام للأحياء الدقيقة إلى حد ما، في جميع أنواع الترب من المناطق المختلفة ، لكن بعد النظر إلى كل نوع من أنواع الترب نجد الاختلاف كبيراً في نسبة الفطور الشعاعية تبعاً للمعاملات المختلفة ، ففي تربة تدمر كانت نسبتها في التربة الشاهد منخفضة 19% ، بينما كانت هذه النسبة 70% بإضافة CaCO_3 ، 74% بإضافة مسحوق بذور القطن و 69% عند إضافة مسحوق بذور الفول السوداني.

كذلك الأمر بالنسبة لتربة دير الزور فقد كانت النسب 14% في التربة الشاهد ، 54% بإضافة CaCO_3 ، 74% بإضافة مسحوق بذور القطن و 46% لدى إضافة مسحوق بذور الفول السوداني.

ينطبق الأمر أيضاً على تربة دمشق حيث كانت نسبة الفطور الشعاعية 25% في التربة الشاهد ، 67% بإضافة CaCO_3 ، 58% بإضافة مسحوق بذور القطن ، و 88% عند إضافة مسحوق بذور الفول السوداني.

ولدى النظر إلى عدد الفطور تبعاً لكل معاملة نجد أنه لجميع أنواع الترب كان هذا العدد مرتفع نسبياً في الترب التي لم يضاف إليها أي إغناء فكان عدد مستعمرات الفطور 13 ، 11 ، 9 في كل من تربة تدمر، دير الزور ودمشق على الترتيب وهذا العدد مرتفع نسبياً مقارنة مع عمليات الإغناء التي أدت إلى خفض أعداد هذه الفطور، وبالتالي فإن عمليات الإغناء كان لها الأثر الإيجابي من حيث زيادة نسبة الفطور الشعاعية وتخفيض عدد الفطور ، و هذا يتفق مع ما ذكره Kutzner عام 1981.

كما جرت تنقية مستعمرات الفطور الشعاعية التي اختيرت على وسط آغار الغاوزا ثلاث مرات. وكانت الفروق بين أنواع الترب من حيث أعداد الفطور و كذلك النسبة المئوية للفطور الشعاعية معنوية عند مستوى ثقة 5% ، بينما كانت الفروق ظاهرية بين هذه الترب من حيث عدد البكتريا وعدد الفطور الشعاعية عند مستوى ثقة 5% كما هو موضح في الجدول (1) من الملحق.

3- عزل الفطور الشعاعية في الآغار المائل Slants:

زرعت العزلات المنتقاة في أنابيب الآغار المائل Slants ، وجرى الكشف عن نتائج النمو للعزلات المزروعة على الآغار المائل بعد 14 يوماً من الحضانة على درجة حرارة 28°C ، وقد أظهر هذا الوسط تبايناً بين العزلات سواء من حيث النمو، لون المشيجة الهوائية والأرضية، و كذلك من حيث إنتاج الصبغات أو عدمه كما هو موضح في الجدول (9).

جدول (9) النماذج المختلفة لنمو العزلات المدروسة عند تنميتها في الآغار المائل لوسط الغاوازا (Slants)

العزلة	النمو بشكل عام	المشيجة الهوائية		المشيجة السطحية		الصبغة
		اللون	النمو	اللون	النمو	
SR ₁	جيد	وردي	جيد	كريمي	جيد	بني
SR ₂	متوسط	رمادي قاتم	جيد	كريمي	جيد	وردي
SR ₃	جيد مثالي	رمادي	جيد	رمادي	ضعيف	عسلي
SR ₄	جيد	أخضر	جيد	كريمي	جيد	-
SR ₅	جيد	وردي	جيد	بني فاتح	ضعيف	بني
SR ₆	جيد مثالي	وردي	جيد	كريمي	ضعيف	-
SR ₇	ضعيف	رمادي قاتم	جيد	كريمي	ضعيف جداً	-
SR ₈	جيد	وردي متداخل مع الأبيض	جيد	كريمي	جيد	-
SR ₉	جيد	رمادي قاتم	جيد	كريمي	جيد	بني فاتح
العزلة	النمو بشكل عام	المشيجة الهوائية		المشيجة السطحية		الصبغة
		اللون	النمو	اللون	النمو	
DZ ₁	جيد مثالي	أحمر	جيد	كريمي	وسط	-
DZ ₂	جيد	رمادي قاتم	جيد	بني فاتح	وسط	عسلي
DZ ₃	جيد مثالي	رمادي قاتم	جيد	كريمي	وسط	-
DZ ₄	جيد	رمادي	جيد	كريمي	ضعيف	عسلي
DZ ₅	جيد مثالي	رمادي مبيض	جيد	وردي	وسط	-
DZ ₆	جيد مثالي	رمادي مبيض	جيد	كريمي	جيد	-

DZ ₇	جيد	أبيض	جيد	كريمي	جيد	بني
DZ ₈	جيد	وردي	جيد	كريمي	جيد	بني
DZ ₉	جيد	أبيض	جيد	كريمي	وسط	-
DZ ₁₀	وسط	رمادي	وسط	كريمي	ضعيف	أحمر
DZ ₁₁	جيد مثالي	رمادي قاتم	جيد	أصفر	وسط	عسلي
العزلة	النمو بشكل عام	المشيجة الهوائية		المشيجة السطحية		الصبغة
		اللون	النمو	اللون	النمو	
Au ₁	وسط	أصفر ليموني	وسط	كريمي	ضعيف	-
Au ₂	جيد	رمادي مبيض	جيد	كريمي	وسط	-
Au ₃	جيد	أبيض	جيد	كريمي	ضعيف	بني فاتح
Au ₄	جيد مثالي	رمادي	جيد	كريمي	وسط	أحمر
Au ₅	جيد	رمادي	جيد	كريمي	وسط	-
Au ₆	ضعيف	أصفر	ضعيف	أصفر	ضعيف	بني
Au ₇	جيد	رمادي قاتم	جيد	كريمي	وسط	-
Au ₈	جيد	رمادي	جيد	وردي	وسط	أحمر
Au ₉	جيد	أخضر	جيد	كريمي	وسط	-
Au ₁₀	جيد	أخضر	جيد	كريمي	وسط	-
Au ₁₁	جيد	أخضر	جيد	أصفر	جيد	-
Au ₁₂	جيد مثالي	وردي	جيد	كريمي	جيد	-
Au ₁₃	جيد	وردي	جيد	كريمي	وسط	بني
Au ₁₄	جيد	رمادي	جيد	كريمي	ضعيف	أحمر

SR9←SR1 : عزلات تربة تدمر .

DZ11← DZ1 : عزلات تربة دير الزور .

AU14← AU1 : عزلات تربة دمشق .

وكان هناك تبايناً للعزلات من حيث نمو المشيجة الهوائية والأرضية وكذلك من حيث إنتاج الصبغات، فالعزلات المأخوذة من تربة تدمر وعددها تسع عزلات SR1←SR9 تميزت جميعها بالنمو الجيد باستثناء العزلتين SR2 , SR7 اللتان كان نموها متوسطاً إلى أقل من متوسط على الرغم من احتواء الوسط على مصدر كربوني وآخر آزوتي وكذلك على أملاح معدنية وربما يعود ذلك إلى حاجة هذه العزلات إلى مواد محفزة لنموها، أما العزلات الباقية فكان نموها جيداً إلى مثالياً.

كما تميزت جميع العزلات بوجود المشيجة الهوائية ذات الألوان المتعددة، التي تباينت بين الوردي و الرمادي و الأبيض، كما ظهرت في العزلات المشيجة السطحية ذات الألوان المختلفة بين البني و الكريمي، أما بالنسبة لإنتاج الصبغات فقد أنتجت العزلتان SR3, SR5 الصبغة ذات اللون العسلي ، والعزلتان SR4 , SR9 الصبغة بنية اللون ، بينما العزلات الباقية SR7, SR8, SR1 , SR2 , SR6 , لم يظهر عليها إنتاج أي صبغات.

بالنسبة لتربة دير الزور تميزت جميع العزلات المأخوذة وعددها أحد عشرة عزلة DZ1←DZ11 بإنتاج المشيجة الهوائية و السطحية حيث كان نمو المشيجة الهوائية جيداً في جميع العزلات باستثناء العزلة DZ10 أما المشيجة السطحية فكانت متوسطة النمو إلى غير موجودة تقريباً في أغلب العزلات باستثناء العزلات DZ7 , DZ8 حيث كان نمو المشيجة السطحية فيها جيداً ، كما تباينت ألوان المشيجة الهوائية بين الأبيض و الرمادي و الأحمر بينما المشيجة السطحية كانت ذات لون كريمي أو بني ، ولم تبد العزلات DZ9 , DZ5 , DZ6 DZ2 , DZ3 , DZ4 أي إنتاج للصبغات ، بينما أنتجت العزلتان DZ1 , DZ11 صبغة عسلية اللون ، والعزلتان DZ7 , DZ8 فقد أنتجتا صبغة ذات لون بني ، أما العزلة DZ10 فأعطت صبغة حمراء اللون.

بالنسبة لتربة دمشق فقد تميزت جميع العزلات المأخوذة وعددها أربعة عشر عزلة AU1←AU14 بأنها ذات نمو جيد حيث أنتجت المشيجة الهوائية و السطحية باستثناء العزلتين AU6 , AU1 تميزتا بضعف نمو المشيجتين الهوائية و السطحية معاً ، وكانت ألوان المشيجة الهوائية في جميع العزلات ذات ألون متعددة بين الرمادي و الأبيض و الأصفر و

الوردي ، كما ظهرت المشيجة السطحية بألوان مختلفة بين الكريمي و الوردي و الأصفر، أما العزلات فكانت AU2, AU5, AU7, AU9, AU10, AU11, AU12 غير منتجة للصبغات، بينما أعطت العزلة AU1 صبغة ذات لون عسلي والعزلات AU3, AU6, AU13 أعطت صبغات ذات لون بني بينما العزلات AU4, AU8, AU14 أعطت صبغات ذات لون أحمر.

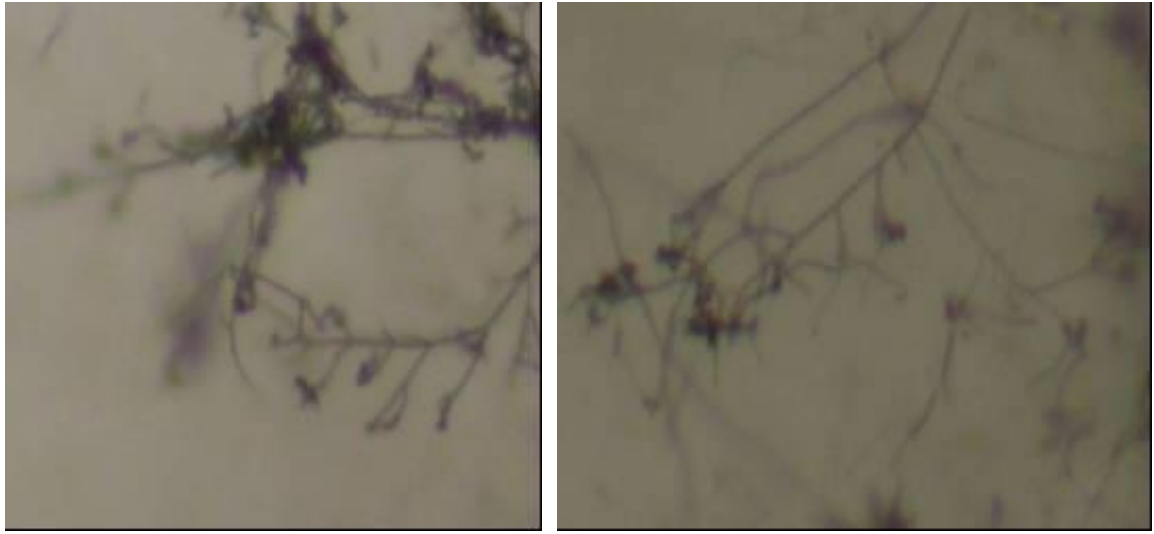
بالنظر إلى الصفات المورفولوجية السابقة، سواء إنتاج المشيجة الهوائية أو السطحية بألوان مختلفة، وإنتاج الصبغات أو عدمه، نجد أنها جميعها من الصفات المميزة لبكتريا *Streptomyces* ، وهذا يتوافق مع ما ورد في تصنيف Bergey (2000).

4- اختبار تشخيص العزلات:

4-1- التشخيص المورفولوجي:

بالنظر إلى نتائج الجدول (9) الذي يبين نمو العزلات وتشكيل المشيجة سواء الهوائية منها أو السطحية، وكذلك تعدد الألوان لهاتين المشيجتين التي تتدرج بين الأبيض والرمادي و الكريمي ... بالإضافة إلى مقدرة هذه العزلات على إنتاج الصبغات أو عدمها، حيث غاب وجود هذه الصبغات في العديد من هذه العزلات، وهي جميعها من الصفات المورفولوجية الهامة في تشخيص بكتريا *Streptomyces*.

ولدى فحص سلاسل الأبواغ تحت المجهر الضوئي، وجد أنها على شكل سلاسل مستقيمة قصيرة أو سلاسل ملتوية كما هو موضح بالشكل (6) ، وبالمطابقة مع تصنيف (Bergey, 2000) الذي يوضح الصفات الشكلية الهامة التي تميز جنس ستربتومايسيس. وجد أن العزلات السابقة عائدة لجنس ستربتومايسيس .



الشكل (6) شكل سلاسل الأبواغ في بكتريا *Streptomyces*

4-2- تمثيل السكريات:

لدى تنمية العزلات المدروسة على وسط (C) Basal minerals Salts agar والمضاف له السكريات المذكورة في الفقرة (2-5) من الفصل الثاني ، تبين لدينا النتائج الموضحة في الجدول (10).

جدول (10) قابلية العزلات المدروسة على استخدام وتمثيل السكريات سابقة الذكر.

SR									العزلة السكر
9	8	7	6	5	4	3	2	1	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	شاهد (control)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Glucose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Xylose
—	+	—	+	—	+	—	+	+	L-Arabinose
—	+	+	+	+	+	+	+	+	Rhamnose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Fructose
+	+	—	—	+	+	+	—	+	D-Galactose
—	+	—	+	—	+	+	—	+	Raffinose
+	—	+	+	+	+	+	+	+	D-Mannitol
—	—	+	+	+	+	+	+	—	I-Inositol
—	+	—	+	+	—	+	—	+	Sucrose

DZ											العزلة السكر
11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	شاهد (control)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Glucose
+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Xylose
—	—	—	+	—	+	—	—	—	+	+	L-Arabinose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Rhamnose
—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Fructose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Galactose
—	+	—	+	+	+	—	+	—	—	+	Raffinose
—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Mannitol
+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	I-Inositol
—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	+	Sucrose

AU														العزلة السكر
14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	شاهد (control)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Glucose
+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xylose
+	—	+	—	+	+	—	+	+	+	—	+	—	—	Arabinose
+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Rhamnose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Fructose
+	—	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	Galactose
—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	—	—	Raffinose
+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Mannitol
+	—	—	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	Inositol
—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	Sucrose

وبمقارنة النتائج المذكورة في الجدول (10) مع تصنيف Bergey يمكن القول بأن العزلات هي تابعة لجنس *Streptomyces* وعائدة للأنواع التالية:

<i>Streptomyces spp</i>	DZ9	<i>Streptomyces cyanoalbus</i>	SR1
<i>Streptomyces ogaensis</i>	DZ10	<i>Streptomyces griseomycini</i>	SR2
<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	DZ11	<i>Streptomyces coeliatus</i>	SR3
<i>acrimycini Streptomyces</i>	AU1	<i>Streptomyces mitakaensis</i>	SR4
<i>Streptomyces spp</i>	AU2	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	SR5
<i>Streptomyces cyanoglomerus</i>	AU3	<i>Streptomyces hirsutus</i>	SR6
<i>Streptomyces albobiridis</i>	AU4	<i>Streptomyces spheroides</i>	SR7
<i>Streptomyces canarius</i>	AU5	<i>Streptomyces piedadensis</i>	SR8
<i>Streptomyces cellulosa</i>	AU6	<i>Streptomyces fluorescens</i>	SR9
<i>Streptomyces flaveolus</i>	AU7	<i>Streptomyces caracoii</i>	DZ1
<i>coerulatus Streptomyces</i>	AU8	<i>Streptomyces rubrolavendulae</i>	DZ2
<i>Streptomyces spp</i>	AU9	<i>Streptomyces lazareus</i>	DZ3
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	AU10	<i>Streptomyces indigocolor</i>	DZ4
<i>Streptomyces coerulatus</i>	AU11	<i>Streptomyces microflavus</i>	DZ5
<i>Streptomyces daghestanicus</i>	AU12	<i>Streptomyces albochromogenes</i>	DZ6
<i>Streptomyces syringae</i>	AU13	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	DZ7
<i>Streptomyces spp</i>	AU14	<i>Streptomyces janthinus</i>	DZ8

5- حساسية سلالات بكتريا *Streptomyces* لأقراص المضادات الحيوية :

زرعت أنواع بكتريا *Streptomyces* على وسط الغاوزا، ووضعت فوقها أقراص المضادات

الحيوية حسب ما ورد في الفقرة (6) من الفصل الثاني، و ظهرت لدينا النتائج المدونة في

الجدول(11):

جدول (11) حساسية عزلات بكتريا *Streptomyces* للمضادات الحيوية المستخدمة وفق قطر

مطقة التثبيط مقدرة ب mm:

قطر منطقة التثبيط / mm									
SR									العزلة
9	8	7	6	5	4	3	2	1	المضاد
12	14	34	28	30	30	34	26	16	Cla
19	26	28	26	28	28	20	28	23	Cip
20	34	18	32	30	24	16	16	32	Rif
18	22	18	34	32	30	12	10	16	Tet
R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cfz
R	16	R	R	R	R	R	8	12	Cfx
R	R	R	R	R	8	R	R	R	Amp
R	R	R	R	R	10	R	10	R	Pen
R	9	12	R	R	8	12	8	8	Oxt
R	R	R	R	R	R	R	R	R	Clm
R	R	10	14	9	11	9	11	R	Col
R	15	R	R	R	R	R	R	10	Tyl
12	12	12	R	14	13	13	14	10	Neo
20	28	24	R	28	27	28	27	32	Str
R	26	32	22	30	28	30	32	34	Clt
23	R	23	R	R	32	R	R	R	Amo

R: مقاومة للمضاد

قطر منطقة التثبيت / mm											
DZ											العزلة المضاد
11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
13	18	16	32	32	30	26	18	13	19	24	Cla
30	27	28	30	21	29	34	28	24	15	26	Cip
16	12	16	39	28	13	9	11	13	16	25	Rif
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Tet
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cfz
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cfx
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Amp
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Pen
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Oxt
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Clm
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Col
17	16	16	15	17	14	14	14	13	16	20	Tyl
10	8	R	10	9	R	8	9	10	12	12	Neo
20	18	21	17	16	20	17	17	16	18	15	Str
28	30	34	40	21	40	21	36	34	34	28	Clf
14	15	8	20	R	22	R	R	R	R	12	Amo

قطر منطقة التثبيت / mm														
AU														العزلة المضاد
14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
21	26	26	23	23	17	27	36	26	36	26	8	32	1	Cla
13	21	18	24	20	26	25	30	24	28	24	12	28	23	Cip
22	30	14	12	23	14	18	26	26	24	15	26	26	11	Rif
28	24	18	17	18	16	22	28	30	26	16	25	34	12	Tet
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cfz
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cfx
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Amp
12	11	R	R	R	R	R	14	R	R	R	R	R	R	Pen
12	R	R	8	R	13	R	16	11	10	8	10	13	9	Oxt
16	8	R	R	R	R	R	18	R	R	R	R	R	R	Clm
R	R	11	8	R	8	R	10	R	8	8	10	10	10	Col
R	8	R	9	R	R	R	9	R	9	R	R	R	R	Tyl
16	19	15	11	14	12	14	10	10	13	13	9	17	11	Neo
20	17	16	14	18	10	16	22	28	12	16	14	22	28	Str
14	22	24	22	24	26	25	22	18	24	22	18	24	23	Clf
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Amo

تبين النتائج المذكورة في هذا الجدول اختلافا في أنماط المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة وكانت لأنواع تربة تدمر SR1-SR9 جميعها حساسة لمضادات Clarithromycin , Ciprofloxacin , Rifampicin , Tetracyclin و Chlortetracycline ، حيث استطاعت هذه المضادات منع ستربتومايسيس من النمو حولها وبمسافات مختلفة . كما أظهرت جميع الأنواع مقاومة لمضادي Ceftazidim و Chloramphenicol حيث استطاعت جميعها النمو بوجودهما. أما بالنسبة للمضادات المتبقية وهي Oxytetracycline , Streptomycin و Neomycin , Colistin فقد كانت بعض الأنواع مقاومة لها وبعضها الآخر كان حساساً تجاه هذه المضادات.

في حين أظهرت هذه الأنواع مقاومة متباينة وعالية نسبياً لمضادات Cefotaxim , Ampicillin , Penicillin – G , Tylocin و Amoxicillin . كذلك اختلفت بكتريا ستربتومايسيس المأخوذة من تربة دير الزور في نمط مقاومتها لهذه المضادات المستخدمة كما هو موضح بالجدول (11) أيضاً ، حيث كانت جميع الأنواع حساسة لمضادات Clarithromycin , Ciprofloxacin , Rifampicin , Tylocin ، Streptomycin و Chlortetracycline حيث منعتها من النمو وبهالة قطرها تثبيط محددة. وتوضح النتائج أيضاً بأن جميع الأنواع قاومت مضادات Tetracyclin , Ceftazidim ، Cefotaxim , Ampicillin ، Oxytetracycline ، Chloramphenicol و Colistin حيث تمكنت جميعا من النمو بوجود المضادات المذكورة. أما بالنسبة لمضادي Neomycin و Amoxicillin فقد كانت بعض الأنواع مقاومة لهما، وبعضها الآخر كان حساساً تجاههما. ينطبق الأمر على الأنواع التي تم الحصول عليها من تربة دمشق، حيث أظهرت جميعها حساسية لمضادات Clarithromycin , Ciprofloxacin , Rifampicin ، Streptomycin , Neomycin , Tetracyclin و Chlortetracycline ، Amoxicillin حيث منعتها من النمو وبهالة قطرها تثبيط مبينة في هذا الجدول . في حين كانت هذه السلالات مقاومة لمضادات Ceftazidim ، Cefotaxim ، Ampicillin و Amoxicillin حيث تمكنت من النمو بوجود هذه المضادات.

بينما بقية المضادات Colistin , chloramphenicol , Oxytetracycline , Penicillin

و Tylocin فقد كانت بعض الأنواع مقاومة لها، وبعضها الآخر كان حساساً تجاهها.

ولم تكن الفروق معنوية بين أنواع المضادات الحيوية بالنسبة لكل نوع من أنواع بكتريا

Streptomyces المعزولة أي كانت الفروق ظاهرية عند مستوى ثقة 5%.

لوحظ اختلاف في أنواع بكتريا ستربتومايسيس حسب نوعية الترب المأخوذة منها، وهذا عائد

لاختلاف المناخ وظروف التربة و الحرارة المحيطة ، مما يؤثر بشكل كبير في تطور الكائن

الدقيق وإظهار صفاته كالمقاومة للمضادات الحيوية، وكذلك في إنتاج هذه المضادات وهذا يتفق

مع ما ذكره Iwai and Omura عام 1982 ، كما أن هذه النماذج المختلفة من المقاومة

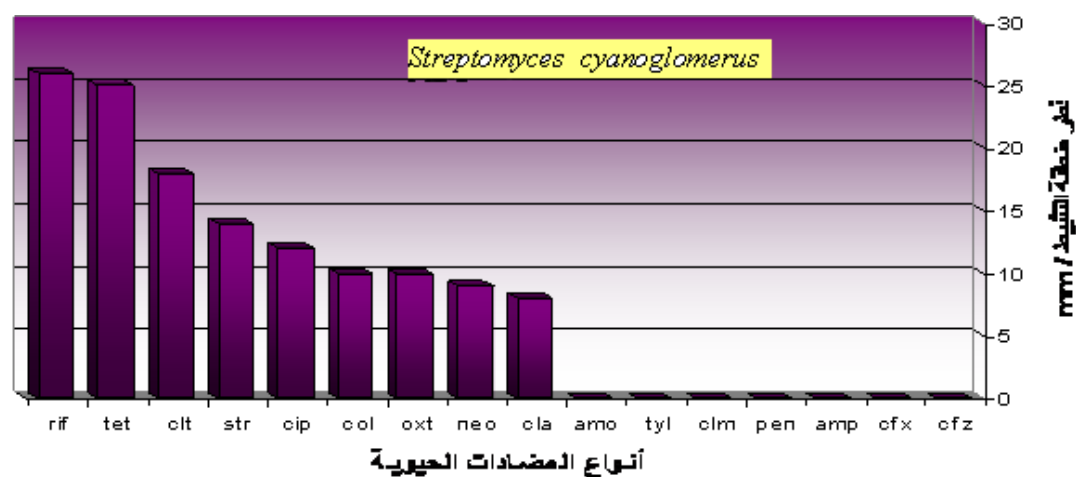
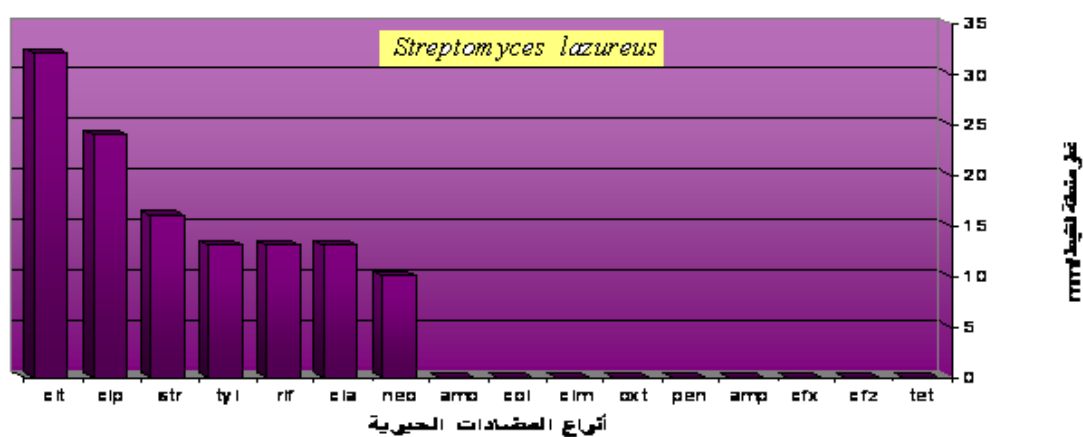
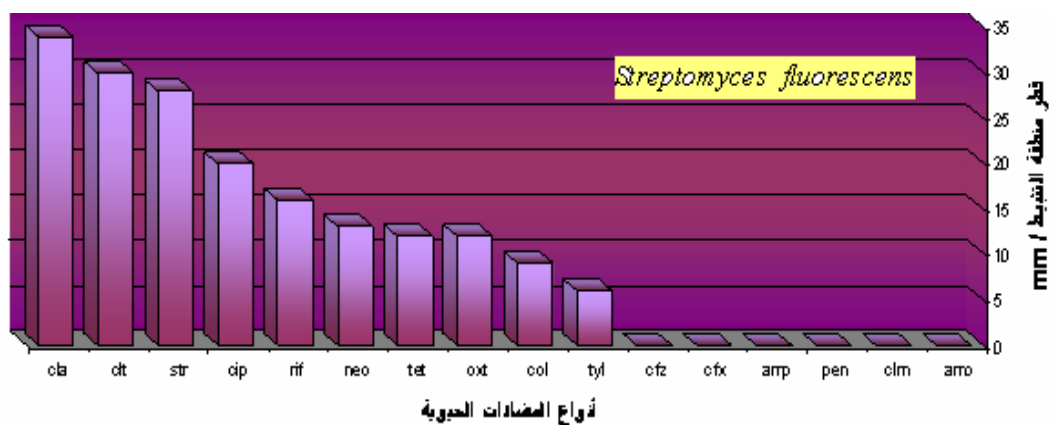
تعتمد على عدة عوامل ، منها ما يعود للأنواع البكتيرية من حيث طبيعة الجدر الخلوية فيها

وقدرتها على منع دخول المضاد الحيوي إلى داخلها أو قد تكون عائدة للسلالة البكتيرية المنتجة

للمضاد نفسه الذي تقاومه وهذا يعني أنها تملك القابلية لإنتاج الإنزيمات التي تنتج المقاومة لهذا

النوع من المضادات أو ذاك، وهذا يتفق مع ما ذكره (Webb et al., 1997) بكون

ستربتومايسيس مصدراً للمضادات الحيوية، فهي تمتلك أيضاً آلية لمقاومتها، الشكل (7).



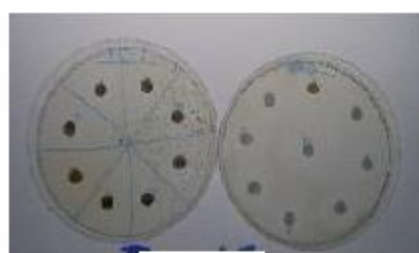
الشكل (7) حساسية الأنواع *Streptomyces fluorescens* ، *Streptomyces cyanoglomerus* ، *Streptomyces lazureus* لأقراص المضادات الحيوية

و يبين الشكل (8) حساسية عزلات بكتريا سترپتومايسيس تجاه أقراص المضادات الحيوية ، وكما هو موضح في الشكل حيث أظهرت هذه العزلات حساسية متفاوتة تبعاً لكل نوع من أنواع المضادات الحيوية المستخدمة.





Streptomyces rubrolavendulae



Streptomyces caracoii



Streptomyces indigocolor



Streptomyces lazareus



Streptomyces albochromagenes



Streptomyces microflavus



Streptomyces janthinu



Streptomyces castaneoglobisporus



Streptomyces ogaensis



Streptomyces spp



Streptomyces spp



Streptomyces acrimycin



Streptomyces albobivids



Streptomyces cyanoglomerus



Streptomyces cellulosa



Streptomyces canarius



Streptomyces coeruleus



Streptomyces flaveolus



الشكل (8) حساسية أنواع ستربتومايسيس المعزولة تجاه أقراص المضادات الحيوية.

6- نتائج اختبار حساسية الكائنات المختبرة لأقراص المضادات الحيوية :

يوضح الجدول (12) نتائج اختبار الحساسية لدى زراعة الكائنات المختبرة على وسط M.H.A

ثم فحص حساسيتها باستخدام أقراص المضادات الحيوية

جدول (12) حساسية الكائنات المختبرة تجاه أقراص المضادات الحيوية

قطر منطقة التثبيط /mm/							الكائنات المختبرة
<i>V.fluvialis</i> <i>b</i>	<i>P.eruginosa</i> <i>c</i>	<i>S.servesiae</i> <i>a</i>	<i>K.pneumonia</i> <i>b</i>	<i>E.colii</i> <i>b</i>	<i>S.aureus</i> <i>c</i>	<i>B.subtilis</i> <i>a</i>	المضاد
10	10	19	R	12	R	28	Cla
12	24	12	17	20	R	36	Cip
30	10	18	13	11	35	24	Rif
15	R	22	R	15	26	22	Tet
11	21	29	20	20	R	26	Cfz
15	R	20	21	21	10	24	Cfx
R	R	11	17	11	11	10	Amp
R	R	R	R	R	R	R	Pen
14	R	30	18	R	17	25	Oxt
11	R	11	14	8	R	12	Clm
R	12	10	10	11	R	12	Col
10	R	12	R	R	R	10	Tyl
13	10	14	13	12	R	11	Neo
15	R	10	11	13	12	10	Str
16	R	21	10	11	17	18	Clt
R	R	R	R	R	R	R	Amo

بالعودة إلى الجدول (12) ، وجد أن الكائنات المختبرة جميعها حساسة لمضاد Rifampicin حيث سبب تثبيط نموها بدرجات متفاوتة وكان أكثرها حساسية تجاهه بكتريا *S.aureus* حيث منعها من النمو بقطر 33mm بينما كان أقلها حساسية *P.eruginosa* حيث تثبتت نموه بقطر 10mm فقط.

بينما كانت جميعها مقاومة لمضادي Penicillin و Amoxicillin.

أما بقية المضادات Ceftazidim , Tetracyclin , Ciprofloxacin , Clarithromycin , Colistin , chloramphenicol , Oxytetracycline , Ampicillin , Cefotaxim , TylocinNeomycin , Streptomycin و Chlortetracycline فكانت بعض الكائنات المختبرة حساسة تجاهها وبعضها الآخر مقاومة لها.

كما كانت الفروق بين المعاملات معنوية عند مستوى ثقة 5% كما هو مبين في الجدول (2)

من الملحق . وبمقارنة هذه النتائج مع نتائج اختبار حساسية أنواع *Streptomyces* للمضادات الحيوية نجد اختلافاً واضحاً بينهما، فأغلب المضادات التي قاومتها أنواع

Streptomyces كانت الكائنات المختبرة حساسة لها وكذلك فالمضادات التي تثبتت نمو *Streptomyces* قاومتها الكائنات المختبرة .

يظهر الشكل (9) حساسية الكائنات الدقيقة المختبرة تجاه أقراص المضادات الحيوية، وكما هو مبين في الشكل أظهرت هذه الكائنات الدقيقة حساسية متفاوتة تبعاً لكل نوع من أنواع المضادات الحيوية المستخدمة.



Staphylococcus aureus



Bacillus subtilis



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



Klebsiella pneumoniae



Saccharomyces servesiaie



Vibrio fluvialis

شكل (9) حساسية الكائنات الدقيقة المختبرة تجاه أقراص المضادات الحيوية

7- نتائج اختبار الفعالية ضد البكتيرية لستربتومايسيس تجاه الكائنات المختبرة:

بعد زراعة بكتريا *Streptomyces* على وسط الغاوزا و نموها بشكل جيد بطريقة الخطوط ، صبت طبقة ثانية من وسط M.H.A فوقها وزرعت الكائنات المختبرة كما ورد في الفقرة (8) من الفصل الثاني، وكانت النتائج كما هو واضح في الجدول (13) :

جدول (13) الفعالية ضد البكتيرية لأنواع بكتريا *Streptomyces* المعزولة تجاه الكائنات المختبرة.

قطر منطقة التثبيط /mm									العزلات الكائنات المختبرة
SR									
9 c	8 d	7 d	6 d	5 d	4 d	3 d	2 d	1 d	
47	17	27	R	18	23	R	14	9	<i>B.subtilis</i>
R	3	R	R	5	14	13	R	R	<i>S.aureus</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>E.coli</i>
32	14	21	10	12	15	18	25	22	<i>K.pneumonia</i>
50	39	34	38	37	52	43	42	47	<i>S.servesiae</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>P.eruginosa</i>
24	R	R	R	R	7	R	R	R	<i>V.fluvialis</i>

قطر منطقة التثبيط /mm											العزلات الكائنات المختبرة
DZ											
11 d	10 d	9 d	8 d	7 d	6 d	5 d	4 d	3 c	2 d	1 d	
12	22	13	18	32	28	20	39	26	25	46	<i>B.subtilis</i>
18	R	22	15	27	36	12	R	20	R	18	<i>S.aureus</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>E.coli</i>
23	18	21	18	20	17	R	26	35	18	R	<i>K.pneumonia</i>
58	R	48	52	36	23	16	17	23	12	R	<i>S.servesiae</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>P.eruginosa</i>
22	17	12	25	32	32	31	32	51	23	35	<i>V.fluvialis</i>

قطر منطقة التثبيت /mm														العزلات الكائنات المختبرة
AU														
14 d	13 d	12 d	11 d	10 d	9 d	8 a	7 d	6 c	5 c	4 d	3 b	2 d	1 d	
27	R	R	R	21	22	R	R	32	52	R	25	10	32	<i>B.subtilis</i>
25	R	R	R	33	32	R	R	22	14	12	43	R	17	<i>S.aureus</i>
R	R	18	R	R	R	R	R	20	R	R	R	R	R	<i>E.coli</i>
48	R	35	22	28	62	R	14	18	37	36	40	18	16	<i>K.pneumonia</i>
R	R	20	4	24	43	R	R	26	21	12	27	14	R	<i>S.servesiae</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>P.eruginosa</i>
36	R	27	18	32	38	R	R	32	32	48	56	R	37	<i>V.fluvialis</i>

R : مقاومة

يتضح من الجدول السابق أن جميع الأنواع ضمن سلسلة (SR1-SR9) لم تمتلك أية فعالية ضد بكتريا *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* ، حيث استطاعتا النمو بشكل جيد دون أن تظهر أي حالات تثبيط فيهما، و أوضحت النتائج أن جميع أنواع *Streptomyces* المأخوذة من تربة تدمر كانت ذات فعالية جيدة تجاه بكتريا *Klebsiella pneumoniae* وخميرة *Saccharomyes servesiae* ، حيث استطاعت تثبيط نموها بشكل واضح وبهالات تثبيط مختلفة، وكان أكثرها *Streptomyces fluorescens* بالنسبة لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *Streptomyces piedadensis* بالنسبة لخميرة *Saccharomyes servesiae* .

بينما كانت بقية البكتريا *Bacillus subtilis* , *Staphylococcus aureus* و *Vibrio fluvialis* كانت متفاوتة، فبعضها كان مقاوماً و بعضها الآخر كان حساساً تجاه أنواع *Streptomyces*، إلا أن النوع *Streptomyces fluorescens* كان أكثرها فاعلية تجاه *Bacillus subtilis* حيث استطاع تثبيط نموها بهالة قطرها (47 mm) وكذلك تجاه *Vibrio fluvialis* حيث تثبط نموها بهالة قطرها (24 mm) كما استطاع تثبيط نمو خميرة *S.servesiae* بهالة قطرها (50mm)

ولم تمتلك أنواع *Streptomyces* (DZ1 - DZ11) أية فعالية تجاه بكتريا *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* حيث نمت هذه البكتريا بشكل جيد دون أن تتأثرا بوجود بكتريا ستربتومايسيس .

أما أنواع *Streptomyces* المأخوذة من تربة دير الزور فقد كانت فعالة بشكل جيد تجاه بكتريا *Bacillus subtilis* و *Vibrio fluvialis* حيث استطاعت تثبيط نموها بشكل جيد و بهالات تثبيط مختلفة وكانت *Streptomyces caracoii* أكثرها فاعلية تجاه *Bacillus subtilis* , و *Streptomyces lazareus* أكثرها فاعلية تجاه *Vibrio fluvialis* حيث سببت تثبيط نموها بهالة قطرها (51mm).

كما تفاوت تأثير أنواع ستربتومايسيس تجاه بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Pneumonia Klebsiella* و خميرة *Saccharomyes servisiae* بين فعالة إلى عديمة الفعالية تجاههم.

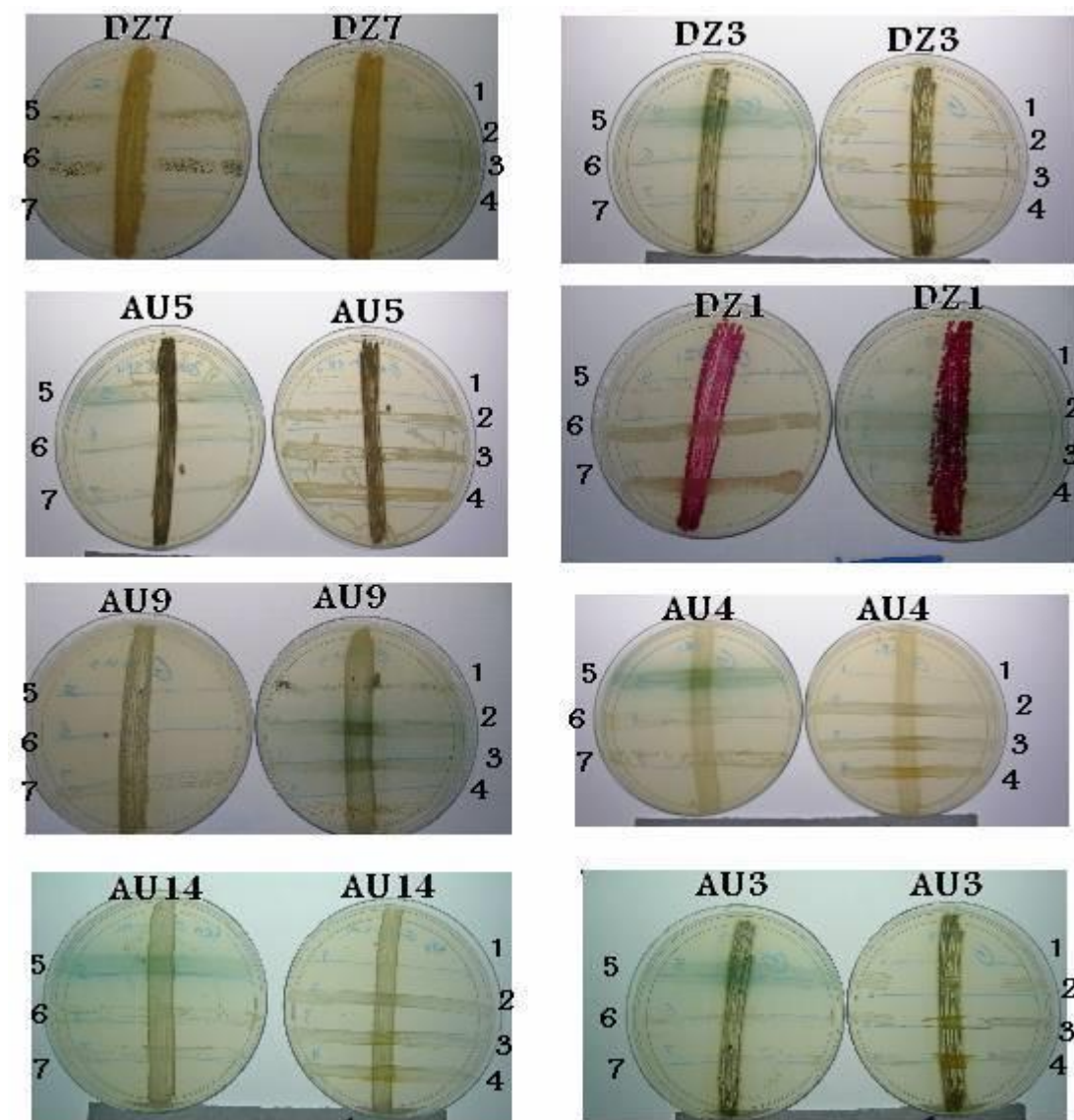
وكانت جميع أنواع *Streptomyces* (AU1-AU14) عديمة الفعالية تجاه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فقط. أما بالنسبة لبكتريا *Escherichia coli* فقد امتلك النوعان *Streptomyces cellulosa* , *Streptomyces daghestanicus* فعالية تجاهها , بينما كانت بقية الأنواع عديمة الفاعلية تجاهها.

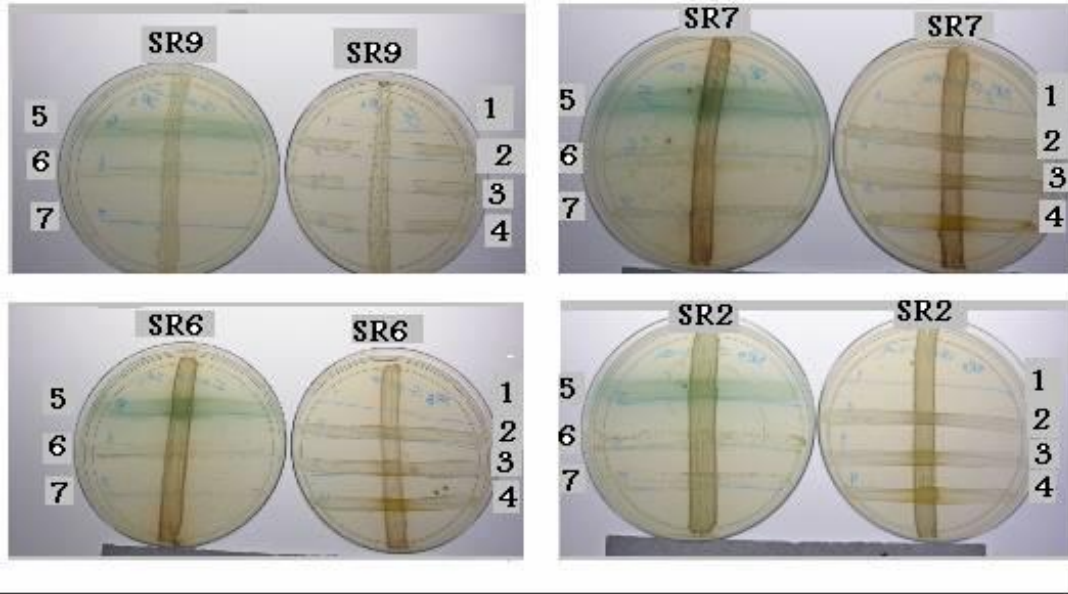
وبالنسبة لتربة دمشق فقد أظهرت جميع الأنواع المأخوذة من هذه التربة فعالية جيدة تجاه بقية الكائنات المختبرة *Bacillus subtilis* , *Staphylococcus aureus* , و *Klebsiella pneumoniae* , *Vibrio fluvialis* و خميرة *Saccharomyes servisiae* حيث أعطت مناطق تثبيط جيدة تجاهها ومنعت نموها بشكل ملحوظ , وتميز النوع *Streptomyces cyanoglomerus* بقدرته على تثبيط نمو بكتريا *S.aureus* , *K.pneumonia* و *V.fluvialis* بمسافات 43-40-56mm على التوالي.

عموماً كانت أنواع بكتريا ستربتومايسيس جميعها عديمة الفعالية تجاه *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* بينما امتلكت هذه الأنواع فعالية جيدة تجاه بقية الكائنات المختبرة.

و بمقارنة نتائج الجدول (11) مع نتائج الجدول (13) نلاحظ أن الأنواع *Streptomyces cyanoglomerus* , *Streptomyces lazureus* , *fluorescens* امتلكت فعالية جيدة تجاه الكائنات المختبرة وكذلك كانت مقاومتها جيدة تجاه أقراص المضادات الحيوية , لذا اختيرت هذه السلالات لإجراء اختبارات تحييد البلازميدات عليها.

ويظهر الشكل (10) يظهر الفعالية ضد البكتيرية لبعض أنواع بكتريا ستربتومايسيس المعزولة تجاه الكائنات المختبرة .





شكل (10) الفعالية ضد البكتيرية لبعض أنواع ستربتومايسيس المعزولة تجاه الكائنات المختبرة

1. *Bacillus subtilis*
2. *Vibrio fluvialis*
3. *Escherichia coli*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Pseudomonas aeruginosa*
6. *Klebsiella pneumoniae*
7. *Saccharomyces servesiae*

8- تجربة تحييد البلازميدات :

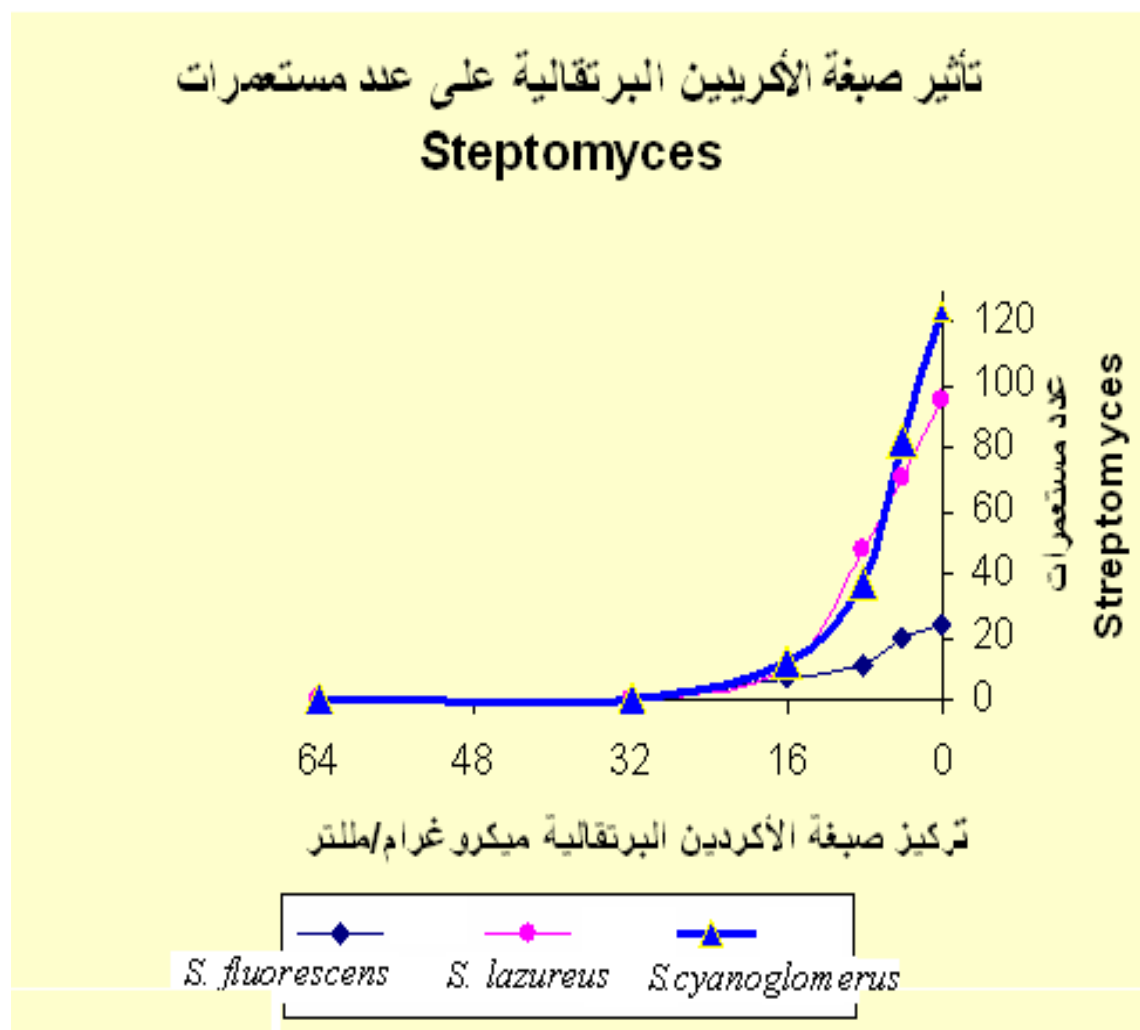
بناءً على نتائج الاختبارات السابقة فقد تم انتقاء الأنواع *Streptomyces* *fluorescens* من تربة تدمر ، *Streptomyces lazareus* من تربة دير الزور ، و *Streptomyces cyanoglomerus* من تربة دمشق لإكمال التجارب عليها حيث أضيف إلى وسط الغاوزا صبغة الأكرديين البرتقالية بالتركيز (0-4-8-26-32-64 $\mu\text{g/ml}$ وبتخفيفات 10^0 - 10^{-5} فكانت لدينا النتائج الموضحة في الجدول (13).

جدول (14) نتائج إضافة صبغة OA على نمو مستعمرات *S. fluorescens* ،
S. lazareus و *S. cyanoglomerus* النامية على وسط الغاوزا.

التركيز	0	4	8	16	32	64
التخفيف (µg/ml)						
10^{-4}	<i>Streptomyces fluorescens</i>					
	24	19	11	7	—	—
	<i>Streptomyces lazareus</i>					
	95	70	48	10	—	—
	<i>Streptomyces cyanoglomerus</i>					
	124	82	37	12	—	—
10^{-5}	—	—	—	—	—	—

كما هو واضح من الجدول (13) فإن التركيز (32 µg/ml) عند التخفيف 10^{-4} كان قاتلاً للأنواع الثلاثة و لم يسمح بنمو أي منها, لذا تم اختيار التركيز الذي يسبقه و هو (16µg/ml) لإكمال العمل عليه و الذي يحوي (7) مستعمرات في *Streptomyces fluorescens* رمزت بالحرف M و رقمت $M_7 \leftarrow M_1$, أما في *Streptomyces lazareus* فكان يحوي (10) مستعمرات رمزت بالحرف H و رقمت $H_{10} \leftarrow H_1$, والنوع *Streptomyces cyanoglomerus* نمت فيه (12) مستعمرة رمزت بالحرف Z و رقمت Z_{12} ← لإكمال العمل عليها، أما التخفيف 10^{-5} لم يلاحظ فيه أي نمو للأنواع الثلاثة.

ويبين الشكل (11) يبين انخفاض عدد مستعمرات ستربتومايسيس مع زيادة تركيز صبغة الأكردين البرتقالية إلى الحد الذي يؤدي إلى منع نمو أي مستعمرة من *Streptomyces*.



شكل (11) تأثير إضافة صبغة OA على عدد مستعمرات ستربتومايسيس

9- اختبار الفعالية ضد البكتيرية لستربتومايسيس بعد معاملتها بصبغة OA:

9-1- للسلالات $M_1 \leftarrow M_7$

جدول (15) نتائج الفعالية ضد البكتيرية لسلالات النوع *S. fluorescens* بعد معاملتها بصبغة OA لتحديد بلازميداتها .

مسافة منطقة التثبيط /mm/							السلالة الكائنات المختبرة
M7	M6	M5	M4	M3	M2	M1	
R	8	16	15	18	R	R	<i>B.subtilis</i>
R	R	R	R	R	R	R	<i>S.aureus</i>
R	R	14	R	R	R	R	<i>E.coli</i>
R	R	13	16	R	R	R	<i>K.pneumonia</i>
11	4	7	13	12	R	R	<i>S.servesiae</i>
R	R	R	R	R	R	R	<i>P.eruginosa</i>
R	10	18	10	16	R	R	<i>V.fluvialis</i>

كما هو واضح في الجدول (15) فإن السلالتين M_1 , M_2 فقدتا فعاليتهما بالكامل تجاه الكائنات المختبرة، لذا تم اختيار إحداها و لتكن M_1 لإجراء عملية الرحلان الكهربائي عليها.

9-2- للسلالات $H_1 \leftarrow H_{10}$

جدول (16) نتائج الفعالية ضد البكتيرية لسلالات النوع *S. lazureus* بعد معاملتها بصبغة OA لتحديد بلازميداتها .

مسافة منطقة التثبيط / mm										السلالة الكائنات المختبرة
H10	H9	H8	H7	H6	H5	H4	H3	H2	H1	
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>B.subtilis</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>S.aureus</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>E.coli</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>K.pneumonia</i>
25	R	R	R	R	R	14	18	R	22	<i>S.servesiae</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>P.eruginosa</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>V.fluvialis</i>

كما هو موضح في الجدول (16) فإن السلالات $H_9, H_8, H_7, H_6, H_5, H_4, H_3, H_2$ لم تمتلك أي فعالية تجاه الكائنات المختبرة لذا تم اختيار أحدها ولتكن H_2 .

9-3- للسلالات $Z_1 \leftarrow Z_{12}$:

جدول (17) نتائج الفعالية ضد البكتيرية لسلالات النوع *S. cyanoglomerus* بعد معاملتها بصبغة OA لتحديد بلازميداتها .

مسافة منطقة التشيط /mm/												السلالة الكائنات المختبرة
Z12	Z11	Z10	Z9	Z8	Z7	Z6	Z5	Z4	Z3	Z2	Z1	
22	R	14	23	12	R	27	29	34	12	R	R	<i>B.subtilis</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>S.aureus</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>E.coli</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>K.pneumonia</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>S.servesiae</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>P.eruginosa</i>
R	R	R	R	R	R	13	11	R	R	R	R	<i>V.fluvialis</i>

كما يتضح من الجدول (17) لم تبد السلالات Z_1, Z_2, Z_7, Z_{11} أي فعالية تجاه الكائنات المختبرة ، لذا تم اختيار أحدها و لتكن Z_{11} .

10- نتائج الرحلان الكهربائي Agarose Gel Electrophoresis:

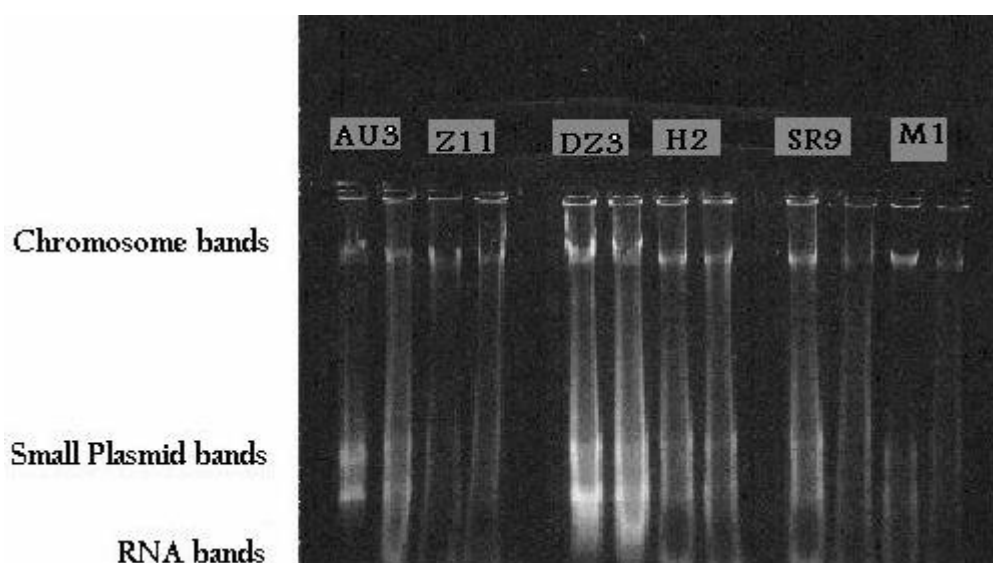
تم تطبيق عملية الرحلان الكهربائي على:

- النوع *Streptomyces fluorescens* والسلالة M1 الناتجة عنه بعد معاملته بصبغة الأكردين البرتقالي OA .

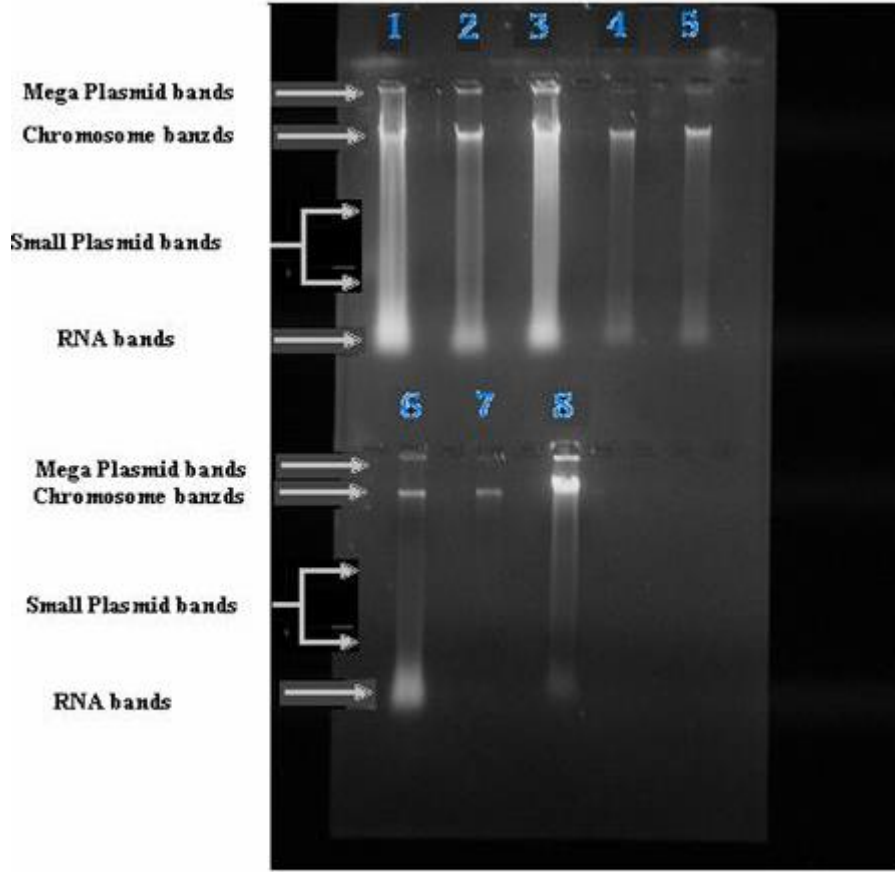
- النوع *Streptomyces lazareus* والسلالة H2 الناتجة عنه بعد معاملته بصبغة الأكردين البرتقالي OA.

- النوع *Streptomyces cyanoglomerus* والسلالة Z11 الناتجة عنه بعد معاملته بصبغة الأكردين البرتقالي OA.

ظهرت لدينا النتائج الموضحة في الشكل (12) بعد انتهاء عملية الرحلان الكهربائي، حيث ظهرت حزم البلازميدات في الأنواع *Streptomyces fluorescens* ، *Streptomyces* ، *Streptomyces cyanoglomerus* ، *lazureus* بينما لم تظهر هذه الحزم في السلالات التابعة لكل منها على الترتيب و المحيدة البلازميد M1 , H2 , Z11.



شكل (12) الرحلان الكهربائي للسلالات البكتيرية
(DNA المعزول بطريقة الآزوت السائل وكلوريد الليثيوم)



الشكل (13) الرحلان الكهربائي للسلاطات البكتيرية قيد الدراسة
(DNA المعزول بطريقة SDS)

حيث:

- 1- المحتوى الوراثي للنوع *Streptomyces cyanoglomerus*
- 2- المحتوى الوراثي للسلاطة Z11
- 3- المحتوى الوراثي للنوع *Streptomyces lazareus*
- 4-5- المحتوى الوراثي للسلاطة H2
- 6- المحتوى الوراثي للنوع *Streptomyces fluorescens*
- 7-8- المحتوى الوراثي للسلاطة M1

و لدى مقارنة الطريقتين المتبعتين في عزل DNA نستنتج أن طريقة كلوريد الليثيوم و الآزوت السائل أفضل من طريقة SDS ، حيث ظهرت في الطريقة الأولى حزم البلازميد بشكل أوضح مما هو في الطريقة الثانية.

تشير هذه النتائج أيضاً إلى دور البلازميدات في إنتاج المضادات الحيوية من قبل الأنواع الثلاث و كذلك مقاومتها للكائنات الدقيقة المختبرة ، كما توضح هذه النتائج أيضاً أهمية اختيار التركيز المناسب لمادة الأكردين البرتقالي ، حيث تؤكد النتائج تباين تأثير هذه المادة باختلاف السلالات، وبناء على ذلك يتطلب إيجاد التركيز المناسب من الأكردين البرتقالي لكي يستخدم في تحييد البلازميدات . و تؤكد هذه النتائج ما ورد في دراسات عن دور الأكردين البرتقالي في تحييد بلازميدات البكتريا. (Rubin and Rosenbium, 1971)

الاستنتاجات و التوصيات

CONCLUSIONS & RECOMMENDATIONS

الاستنتاجات:

- 1- تباين انتشار و تواجد بكتريا الفطور الشعاعية في نماذج الترب السورية المختلفة.
- 2- شجعت الترب المغناة بمسحوق بذور القطن وبذور الفول السوداني وكذلك كربونات الكالسيوم على نمو الفطور الشعاعية وخفضت من نمو الفطريات، وبالتالي فمن الممكن استخدام مواد محلية (مثال فول الصويا) لإغناء الترب بهذه البكتريا .
- 3- غنى التربة السورية بأنواع مختلفة من بكتريا الفطور الشعاعية وعلى وجه الخصوص بكتريا ستربتومايسيس حيث تم الكشف على أكثر من ثلاثون نوعاً من ستربتومايسيس.
- 4- اختلاف أنواع ستربتومايسيس حسب المناطق ولم يكن مشتركاً بين تربة تدمر وتربة دير الزور إلا النوع *Streptomyces castaneoglobisporus*
- 5- أظهرت بكتريا ستربتومايسيس فعاليات حيوية متباينة تجاه الكائنات المختبرة وكذلك تجاه المضادات الحيوية المستخدمة.
- 6- عدم تأثر بكتريا *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* بأنواع ستربتومايسيس المعزولة باستثناء النوعين *Streptomyces cellulosa* و *Streptomyces daghestanicus* الذين تميزا بفعاليتهما تجاههما.
- 7- تميزت الأنواع التالية *Streptomyces fluorescens* ، *Streptomyces lazareus* ، *Streptomyces cyanoglomerus* ، بفعاليتها تجاه الكائنات المرضية المختبرة ، وكذلك بمقاومتها لأقراص المضادات الحيوية وبناء على ذلك اختيرت لإجراء تجارب تحييد البلازميد عليها.
- 8- كان التركيز 32 µl/ ml من صبغة الأكريدين البرتقالية قاتلاً بينما كان التركيز 16 µl/ ml هو التركيز الأعظمي الذي تحملته الأنواع الثلاث السابقة.
- 9- كشفت تجارب تحييد البلازميد بصبغة الأكريدين البرتقالي أن الفعالية الحيوية للأنواع الثلاث مرتبطة بوجود البلازميد فيها.

- 10- أكدت تجارب الرحلان الكهربائي وجود البلازميدات في *Streptomyces* ، *Streptomyces lazareus* ، *fluorescens* ، *cyanoglomerus* ، وفقدانها في السلالات M1 ، H7 ، Z11 المحيدة البلازميد.
- 11- كانت طريقة كلوريد الليثيوم والـآزوت السائل في عزل DNA البلازميدي أفضل من طريقة SDS بسبب ظهور حزم البلازميدات في الهلام بشكل أفضل.

التوصيات:

- 1- نظراً لغنى التربة السورية بالبكتريا المنتجة للمضادات الحيوية يوصى بإجراء مسح موسع، يشمل كافة أنواع الترب وبمختلف المناطق بهدف الكشف عن الأنواع المتميزة بفعاليتها الحيوية.

- 2- محاولة التعرف على المضادات الحيوية المنتجة من قبل الأنواع المعزولة بهذه الدراسة وخصوصاً تلك التي أظهرت فعالية تجاه البكتريا المرضية المقاومة للمضادات الحيوية.
- 3- تنقية المضادات الحيوية الناتجة وتحديدها وتشجيع إنتاجها محلياً بهدف الحد من استيرادها لتوفير القطع الأجنبي.
- 4- إجراء دراسات وراثية جزيئية لدراسة دور البلازميدات في إنتاج المضادات الحيوية وإمكانية استخدامها كنواقل في تجارب الهندسة الوراثية.

المراجع

REFERENCES

المراجع العربية:

- [1] الخفاجي , زهرة محمود . (1990) التقنية الحيوية , وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ,
جامعة بغداد , مطبعة الحكمة .

- [2] العاني , فاروق ياس . (1992) وراثة الأحياء المجهرية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد . دار الحكمة للطباعة والنشر .
- [3] عماش . هدى صالح مهدي . (1987) . الهندسة الوراثية تقنية جديدة أم خطر كوني . موسوعة علوم ، سلسلة كتاب الثقافة العلمية . وزارة الثقافة والأعلام . دائرة الإعلام الداخلي .
- [4] عماش , هدى صالح مهدي . (1994) . مبادئ علم الحياة الجزيئي . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد . كلية العلوم . دار الكتب للطباعة والنشر . بغداد .

References:

- 1- Agrawal , V.P.; (2002) . Biodiversity of Khumbu region: population study of actinomycetes, submitted to Royal Nepal *Academy for Science and Technology*.

- 2- Ali ,N .A.; Naji Z.M.; and Ibrahim, M.A.K. (1998) . Role of plasmids in antibiotic production from local isolate of *Streptomyces*. ***Iraqi J. Sci.***, 39 :25-33.
- 3- Atlas , R.M ; Parks , L.C.; and Brown , A.E. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology . ***Mosby*** . London .
- 4- Baron,E.J.; and Finegold, S.M. (1990). Handling clinical specimens for microbiological studies. In “Diagnostic Microbiology”. ***Mosby Company***,Toronto.
- 5- Barrell, B. G.; parkhill, J.; and Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). ***Nature***, 417: 141-147.
- 6- Bennett, P.M.; and Grinsted, J. (1986) Methods in Microbiology. ***Academic Press***. London.
- 7- Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeno, A. M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A.; Kieser, H. M.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Gobel, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C. H.; Kieser, T.; Larke, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; Oniel, S.; Rabinowitsch, E.; Rajandream, M. A.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squires, S.; Tylor, K.; Warren, T.; Wietzorreck, A.; Woodward, J.; Barrell, B. G.; parkhill, J.; and Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). ***Nature***, 417: 141-147.
- 8- Bentley, S.D. (2004). SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). ***Mol. Microbiol.*** 51: 1615-1628.
- 9- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites.***J. Antibiot.***, 58:1-2.
- 10- Bergey, N.R ; Holt, J.G (2000) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th ed .
- 11- Bibb, M. J. (1996) . The regulation of antibiotic production in *Streptomyces Coelicolor*. ***Microbiology***. 142:1335-1344.
- 12- Blattner, F.R.; Plunkett, G.; Bloch, C.A.; Perna, N.T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado, V. J.; Glasner, J.D.; Rode, C.K.; Mayhew, G.F.; Gregor, J.; Davis, N.W.; Kirkpatrick, H.A.; Goeden, M.A.; Rose, D.J.;

- Mau, B.; and Shao, Y. (1997) . The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, 5; 277(5331): 1453-1474.
- 13- Bleakey, B. H.; and Crawford, D. L. (1989). The effects of varying moisture and nutrient levels on the transfer of a conjugative plasmid between *Streptomyces* species in soil. **Microbiol.** 35:544–549.
 - 14- Boronin, A. M.; Borisoglebskaya, A. N.; and Sadovnikova, L. G. (1974). Abstracts of the Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, **Academic**, New York and London.
 - 15- Branger , C.; Lesimple, A.L.; Bruneau , B.; Berry,P. and Lambert, Z.N. (1998) . Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended spectrum β -lactamases in a University Hospital .**J.Med .Microbiol.** 47:201-209.
 - 16- Brawner, M.; Poste, G.; Rosenberg, M.; Westpheling, J. (1991) . "Streptomyces: a host for heterologous gene expression". **Curr. Opin. Biotechnol .** 5 : 674–681.
 - 17- Butler, M.J.; Bruheim, P.; Jovetic, S.; Marinelli, F.; Postma, P.; and Bibb, M .J . (2002). Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. **Appl. Env.Microbiol .** 68:4731–4739.
 - 18- Calam, C.T. (1987). Process development in antibiotic fermentations. **Cambridge university**.
 - 19- Champness,W. (2000). Actinomycete development, antibiotic production and phylogeny: questions and challenges. **American society for microbiology**, Washington. DC, 11-31.
 - 20- Chater, K. F.; and Bruton, C. J. (1985). Resistance, regulatory, and production genes for antibiotic methylenomycin are clustered. **EMBO J.** 4: 1893-1901.
 - 21- Chater, K. F. (1993) . Genetic differentiation in *Streptomyces*. **Ann. Rev. Microbiol.** 47: 685-689.
 - 22- Chater, K. F.; and Bibb, M. J. (1997) . Regulation of bacterial antibiotic production. In: **Biotechnology**. V.C.H. **Publishing Co.**, Germany.
 - 23- Chen, C. W.; Yu, T.W.; Lin, Y. S.; Kieser, H. M.; and Hopwood, D. A. (1994) . The conjugative plasmid SLP2 pf *Streptomyces lividans* is a 50 KB linear molecule. **Mol. Microbiol.** 7: 925-931.

- 24- Chopra , V . L . ; Nasim , A . (1996) Genetic engineering and Biotechnology concepts, methods and Application . *Nepal Academy for Science*, New Delhi .
- 25- Crameri, R.; Julian, E. D.; and Hultner , R. (1986) . Plasmid curing and generation of mutations induced with ethidium bromide in *Streptomyces*. *J.Gen.Microbial*. 2 : 819-824.
- 26- Davis, N.K.; and Chater, K.F. (1990). Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol. Microbiol.*; 4 : 1679-1691.
- 27- Demain A.L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms *Appl. Microbial. Biot.*, 52: 455-463.
- 28- Doyle, J.J. (1987) . A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem.Bull.* 19:11-15.
- 29- Duncan, D.R.; (1955). Multiple range and multiple F-test. *J. Biometrics*, 11:1-42.
- 30- Egorov, N.S. (1983) . Antibiotic a Scientific approach .*Mir publisher* Moscow.
- 31- Ekwenye, U., Kazi, E.(2007). Investigation of plasmid DNA and antimicrobial resistance in some pathogenic organisms. *African J. Biotechnology*., 6: 877-888.
- 32- Goodfellow, M.; Williams, S.T.; and Modarski, M. (1983) . Introduction to importance of actinomycetes. In: biology of the actinomycetes. *Academic Press*. London.
- 33- Goodfellow, M.; and Cross, T. (1984). Classification in the biology of Actinomycetes. *Academic Press*. London.
- 34- Gori , A. ; Espinassa , F. ; Deplano , A . ; Nonhaff , C. ; Nicolas , M.H.; and Struelens , M . J . (1996) . Comparison of pulsed – field gel electrophoresis and randomly amplified DNA Polymorphism analysis For typing extended -Spectrum B- Lactamas Producing *Klebsiella pneumoniae* *J. clin. Microbiol.* . , 34: 2448 –2453
- 35- Hahn,F.E.; and Ciak, J. (1996) . Elimination of resistance determinants R factor by intercalative compounds. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 9:77-80.
- 36- Hesketh, A.R.; Chandra, G.; Shaw, A.D.; Rowland, J.J.; Kell, D.B.; Bibb, M.J.; and Chater, K.F. (2002) Primary and secondary

- metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. **Mol. Microbiol.** 46: 917-932.
- 37- Hirochi, K. H.; and Sakaguchi, K. (1982). Analysis of linear plasmids isolated from *Streptomyces*: association of protein with the ends of the plasmid DNA. **John Innes Inc**, 7: 59-64.
 - 38- Hodgson, D. A. (2000) . Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most unusual group of bacteria. Adv. **Microb. Phys.** 238: 42-47.
 - 39- Hopwood, D.A.; Bibb, M. J.; Chater, K. F.; Kieser, T.; Bruton, C. J.; Kieser, H. M.; Lydiate, D. J.; Smith, C. P.; and Ward, J. M. (1985) . Genetic manipulation of *Streptomyces* : a Laboratory Manual., Norwich, England.
 - 40- Hopwood, D. A.; and Chater, K. F. (1989). Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. In: genetics of bacterial diversity. **Academic Press**, London..
 - 41- Hopwood, D. A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. **Microbiol.** 154: 2183-2188.
 - 42- Hwang, BK.; Ann, S.J.; Moon, S.S. (1994). Production , purification and anti-fungal activity of the antibiotic nucleoside, tubercidin, produced by *streptomyces violaceonig*, **Can. J. Bot** ; 72: 480-485.
 - 43- Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; and Omura, S.(2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nat. Biotechnol.** ; 21(5) 526-31.
 - 44- Iwai, Y.; and Omura, S. (1982). Culture conditions for screening of new antibiotics. **Journal of antibiotics** 35: 123-141.
 - 45- Jawetz, M.; and Adelberg, S . (1998) . Medical Microbiology. 2nd edition . **Middle East Edition** . Lebanon .
 - 46- Johnston, J.N.; and Richmond, M.H. (1970) . The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presense of rifampicin.**J. Gen.Microbiol.**60:137-139.
 - 47- Jones , R.N.; Barry , A.L.; Gavan , T.L.; Hackell , J . L. ; Lane , A.L.; mollering , R.C.; Norton , R.A.; Preston , D.A.; Reller, L.B;

- Thornsberry ,C.; Thrupp,L.D. and Waitz , J.A . (1984) . performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests . Third ed. The National committee's for clinical laboratory standards, (NCCLS).
- 48- Kawato, M.; Shinobu, R. (1979). A simple technique for the microscopical observation, memoirs of the Osaka University Liberal Arts and Education, 114.
 - 49- Kirby, R.; Wright , L.F.; and Hopwood, D.A.; (1975). Plasmid-determined antibiotic synthesis and resistance in *Streptomyces coelicolor*. **Nature.**, 254: 265 – 267.
 - 50- Kieser, T.; Bibb, MJ.; Buttner, M.J.; Chater, K.F.; and Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. **Microbiology.**, 148:1777–1783.
 - 51- Kinashi, H.; and Shimaji, M. (1987). Detection of giant linear plasmids in antibiotic producing strains of *Streptomyces* by the OFAGE techniques. **J. Antibiot.** 40: 91-94.
 - 52- Kinashi, K.; and Murayama, M. S. (1991). Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. **J. Bacteriol.** 173: 1523-1529.
 - 53- Kloos, W.E.; and Bannermann, T.L.(1994). Update on the clinical significance of coagulase negative *Staphylococcus*. **J Clin. Microbiol.**, 33:1060-1063.
 - 54- Komagata, K. (1986) . JMC catalogue of strains. (3rd) edition, Tokyo, Japan Scientific Societies Press.
 - 55- Kozak, W.;Trzpil, M.R.; and Dobrzanski, W.T. (1974) . Effect of riboflavin, ethidium bromide and an elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones innisin- producing strains of *Stretococcus lactis*. **J.Gen. Microbiol.** 83:295-302.
 - 56- Krach, H.; Russmann, H.; Schmidt, H.; Schworzkof, A.; and Heesmann, J. (1995) . Long-term shedding and clonal turnover of EHEC 0157 indiarrheal disease.**J.Clin.Microbiol.**33:1602-1605.
 - 57- Kunst, F.; Ogasawara, N.; Moszer, I.; Albertini, A.M.; Alloni, G.; Azevedo, V.; Bertero, M.G.; Bessi, S. P.; Bolotin, A.; Borchert, S.; Borriss, R.; Boursier, L.; Brans, A.; Braun, M.; Brignell, S.C.; Bron, S.; Brouillet, S.; Bruschi, C.V.; Caldwell, B.; Capuano, V.; Carter, N.M.; Choi, S.K.; Codani, J.J;Connerton, I.F.; and Danchin, A.(1997)

- The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature** Nov. 20; 390: 249-256.
- 58- Kuster, B. (1976) . Chromogenicity of actinomycetes. In: *Actinomycetes the Boundary Microorganisms*. **Arai, T.** Toppan.
 - 59- Kutzner, H. J. (1975). The family *streptomycetaceae*. In: *The Actinomycetes*. **Springer verlag**, Berlin.
 - 60- Kutzner, H.J. (1981) . The family *stretomycetaceae* . In: (The Procaryotes: hand book on habital ,isolation and identification of bacteria **Springer verlag**, Berlin.
 - 61- Lacey.R.W. (1975) . Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance, **Bacteriol. Rev.**39:1-32.
 - 62- Lechevalier, H. A.; Lechvalier, M. P.; and gerber, N. N. (1971). Chemical composition as a criterion in the classification of *actinomycetes*. **Adv. Appl. Microbiol.** 14: 42-47.
 - 63- Lin, Y. S.; Kieser, H. M.; Hopwood, D. A.; and Carton, W. C. (1993) . The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. **Microbiol. Rev.** 10: 917- 923.
 - 64- Madigan, M.; Martinko, J. (2005) . Brock Biology of Microorganisms. **Prentice Hall**. ISBN 0-13-144329-1.
 - 65- Maniatis, T.; Fritch, E.; and Sambrook, J. (1982) . Molecular cloning : a Laboratory manual. **Cold spring Harbour Laborstory** .New York .
 - 66- May, J.; Houghton, R.; and Perret, C. (1964) . The effect of growth at elevated temperature on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*.**J.Gen. Microbiol.** 37:157-169.
 - 67- Mayfield, C. I.; Williams, S .T.; Ruddick, S. M.; and Hatfield, H. L.(1972) Studies on the ecology of *actinomycetes* in soil. IV. Observations on the form and growth of *streptomycetes* in soil. **Soil Biol. Biochem.** ; 4: 79–91.
 - 68- Meinhardt, F.; Schaffrath, R; Larsen, M.(1997) Microbial linear plasmids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**; 47: 329–336.
 - 69- Millar, K .; (1987) . The susceptibility to lysozyme of lactomase producing and non-producing derivatives of *Staphylococcus aureus* strain 1030.**J.Med. Microbiol.** 23:127-132.

- 70- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A3. NCCLS, Villanova, Pa.
- 71- Noack, D.; Kaeler, R.; Beck, M.; and Geuther, R.(1974) Abstracts of the Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, *Academic Press*, New York and London.
- 72- Nurettin, S .; Aysel, U.G . (2002) . Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates, *Turk. J. Biol.* 27 : 79-84.
- 73- Okanishi, M.; and Manome, T. (1979). Isolation and characterization of plasmid DNA in actinomycetes. *J. Antibiot.* 33: 88-95.
- 74- Old , R.; and Primrose , S . (1989) . Principles of gene manipulation. *Black well Scientific publication* Oxford .
- 75- Pares, R.; Guinea, J.; Hernandez, S.; Valoix, J.; and Jofre, J. (1974). Bacterial Plasmids. *J. Bact.*, 119: 2- 9.
- 76- Pettis, G. S.; Ward, N.; and Schully, K. (2001) . Expression characteristics of the transfer – related kil B gene product of *Streptomyces* plasmid pIJ 101: Implications for the plasmid spread function. *J. Bacteriol.* 183: 1339-1345.
- 77- Picardeau, M; Vincent, V.(1997) Characterization of large linear plasmids in mycobacteria. *J. Bacteriol.*;179:2753–2756.
- 78- Phuchareon , J.; Pongpattankitshote, S.; and Eurwilaichitr , L. (1999) DNA cloning and restriction analysis in molecular Genetics and Genetic Engineering Technique . course at institute of molecular Biology and Genetics , *Mahidol university* , Thailand .
- 79- Pospiech ,A.; and Neuman,L. (1995) . Salting out procedure for the isolation of genomic DNA . cited by kieser , *T . Norwitch*, UK.
- 80- Redenbach, M.; Kieser, H. M.; Denapaite, D.; Eichner, A.; Cullum, J.; Kinashi, H.; and Hopwood, D. A. (1996) . A set of ordered cosmids and detailed genetic and physical map for the 8 MB *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Mol. Microbiol.* 21: 77-79.
- 81- Rhee, K.H.; Choi, K. H.; Kim, C. J.; and Kim, C. H. (2001)

- Identification of *Streptomyces* sp. AMLK-335 producing antibiotic substance inhibitory to VRE (vancomycin-resistant enterococci). *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11:469–474.
- 82- Rubin , S.; and Rosenbium, E. (1971) . Effects of ethidium-bromide on growth and on loss of penicillinase of *Staphylococcus aureus* . *J. Bacteriol* . 108 :1200-1204.
 - 83- Saadoun, I .A.; Blevins, W. T. (1997) Detection of giant linear plasmids in off-flavor compound-producing strains of *Streptomyces* by PFGE; *Actinomyces.*, *Microbiol. Biotechnol.* 8 :58-65
 - 84- Sambrook , J .; Fritsh , F.E. and Maniatis, T. (1989) . Molecular cloning : A laboratory manual . 2nd edition . *cold spring* NewYork.
 - 85- Sarker , R.; and Raichomdhuri , A.N. (1980) . R-factors in enteropathologic *Escherichia coli* . Associated with diarrhoeal disease in children . Ind . *J. Med . Res* . 72 : 174-178.
 - 86- Schremph, H.; Bujard, H.; and Hopwood, D. A. (1975) . Isolation of cccDNA from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.* 121: 4166-4173.
 - 87- Shimizu, K . I.; and Tamura, G. (1981) . Reductinomycin, a new antibiotic I. Taxonomy, fermentation, isolation, characterization and biological activities. *Journal of antibiotics* 34: 649-653.
 - 88- Shirling, E. B.; and Gottlieb, D. (1968) . Comparative description of type cultures of *Streptomyces* III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18: 279-281.
 - 89- Shomura, T.; Kojima, M.; Yoshida, J.; Ito, M.; Amano, S.; otsugawa, K.; Niwa, T.; Inouye, S.; Ito, T.; and Niida, T. (1980) Studies on a new aminoglycoside antibiotic, dactimicin. I. Producing organism and fermentation. *Journal of antibiotics* 33:924-930.
 - 90- Schwedock, J.; McCormick, J.R.; Angert, E.R.; Nodwell, J.R.; and Losick, R.(1997) Assembly of the cell division protein FtsZ into ladder-like structures in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 25: 847-58.
 - 91- Singh B., Mitchison, D.A. (1954) . "Bactericidal activity of streptomycin and isoniazid against tubercle bacilli". *British Medical Journal.*, 1 (4854): 130-132.

- 92- Soussy , C.J.; Bouchaud , D.H.; Fouace , J.; Dublanchet , A., and Duval , J. (1975) . A gentamicin resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* . **Ann . Microbiol .** (Paris) . 126: 91-94.
- 93- Stackebrandh, E.; Rainey, F.A.; and Ward Rainey, N.L.; (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **Int. J. Syst Bacteriol .**, 47:479-491.
- 94- Sutcliffe, J. A.; and Leclercq, R. (2002) in Milestones in Drug Therapy: **Macrolide Antibiotics.**, pp. 281–317.
- 95- Swaadoun, I.; Hameed, K.M.; Moussauui, A.(1999) Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. **Microbios.**, 99: 173-179
- 96- Tauch, A.; Puhler, A.; Kalinowski, J.; and Thierbach, G. (2000) **Plasmid .**,44: 285–291.
- 97- Trevors , J. (1986) . Plasmid curing in bacteria . FEMS . **Microbiol . Rev .**, 32 : 149-157.
- 98- Trevors , J.T.; and Oddie, S. (1986). Resistant plasmid transference in soil and winter . **J. Can. Microbiol .**, 32: 610-613.
- 99- Vasavada, S.H.; Thumar, J.T.; Singh, S.P.(2006) Secretion of potent antibiotic by salt tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RT-1. **Cnm.Sci. India**; 91:1393-1397.
- 100- Vivian, A. C. (1971). Genetic control of fertility in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): plasmid involvement in interconversion of UF and IF strains. **J. Gen. Microbiol.** 69: 353-357.
- 101- Waksman, S. A. (1961) . The *Actinomycetes*. Vol. II, Classification, Identification, and Description of genera and species. Baltimore: Williams and Wilkins. **The Poland Press**. New York.
- 102- Waksman, S.A. (1967) . *The actinomycetes*:a summary of current knowledge. **The Poland Press** Co. New York 7.
- 103- Watve, M.G.; Tickoo, R.; Jog, M.M.; Bhole, B.D.(2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Arch. Microbiol.** 176: 386-390.
- 104- Webb, C. D.; Teleman, A.; Gordon, S.; Straight, A.; Belmont, A.; Lin, D. C.; Grossman, A. D.; Wright, A.; and Losick, R. (1997) . Bipolar localization of the replication regions of the chromosomes in vegetative and sporulating cells. **Cell**, 88: 667-672.

- 105- Wietzorreck, A.; and Bibb, M. J. (1997) . A novel family of proteins that regulates antibiotic production in *streptomyces* appears to contain an OmpR – like DNA binding fold. ***Mol. Microbiol.*** 25: 1177-1194.
- 106- Williams, S. T.; Willington, E. M.; Goodfellow, M.; Alderson, G.; Sackin, M.; and Sneath, P. H. A (1981) . The genus *Streptomyces* : A taxonomic enigma. Zentralblatt fur bakteriologie, ***Mikrobiologie und Hygiene*** (Abteilung Supplement II), pp: 47.
- 107- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; and Tingey, S. V. (1990) . DNA polymorphisms amplified by arbitrary primes are useful as genetic markers. ***Nuc. Acid. Res.*** 18: 6531-6542.
- 108- Woodford , N; and Johnson , A.P. (1998) . Molecular Bacteriology : Protocols and Clinical Applications. ***Central Public Health Laboratory*** , London , U.K.
- 109- Yi – Guang, W.; Davis, J. E.; and Hutchinson, R. (1980). Plasmid DNA in the erythromycin producing microorganism *Streptomyces erythrae* NRRL 2338. ***J. Antibiot.*** 35: 335-341.

الملحق

التحليل الإحصائي:

1- تأثير معاملات الإغناء المختلفة للتربة على عدد مستعمرات الكائنات الدقيقة فيها:

Report

AC	CAN	BN	FN	TN	Mean	T
19.3333	9.3333	50.6667	11.0000	61.6667	N	1.00
3	3	3	3	3	Std.	
5.5076	2.5166	19.6554	2.0000	21.3620	Deviation	
63.6667	18.3333	31.6667	2.6667	34.3333	Mean	2.00
3	3	3	3	3	N	
8.5049	15.5027	30.8599	4.6188	28.2902	Std.	
68.6667	19.3333	28.3333	4.3333	32.6667	Deviation	
3	3	3	3	3	Mean	3.00
9.2376	3.2146	4.6188	2.5166	2.5166	N	
67.6667	27.3333	36.6667	2.3333	39.0000	Std.	
3	3	3	3	3	Deviation	
21.0317	23.1805	21.1266	2.3094	19.9249	Mean	4.00
54.8333	18.5833	36.8333	5.0833	41.9167	N	
12	12	12	12	12	Std.	Total
24.0145	13.7408	20.1893	4.4814	21.2023	Deviation	

ANOVA Table

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares			
.338	1.305	541.639	3	1624.917	(Combined Between Groups)	TN * T	
.026	5.294	48.972	3	146.917	(Combined Between Groups)	FN * T	
.609	.643	290.333	3	871.000	(Combined Between Groups)	BN * T	
.519	.820	162.750	3	488.250	(Combined Between Groups)	CAN * T	
.004	10.752	1694.333	3	5083.000	(Combined Between Groups)	AC * T	

2- تأثير أفراس المضادات الحيوية على بكتريا *Streptomyces* المعزولة:

Report
ANBI

Std. Deviation	N	Mean	SM\$
10.2956	16	9.5000	AU1
10.4976	16	8.7500	AU10
8.8657	16	9.2500	AU11
9.7903	16	8.8750	AU12
10.9962	16	11.6250	AU13
9.5977	16	10.8750	AU14
13.1802	16	12.8750	AU2
9.0222	16	8.2500	AU3
9.6644	16	9.2500	AU4
12.1374	16	11.8750	AU5
12.3462	16	10.8125	AU6

11.6931	16	15.0625	AU7
11.2203	16	9.1875	AU8
9.3443	16	8.8750	AU9
11.3541	16	10.1250	DZ1
10.5515	16	9.0000	DZ10
10.7238	16	9.2500	DZ11
12.1311	16	8.6875	DZ2
10.1585	16	7.5625	DZ3
11.5049	16	8.3125	DZ4
12.8115	16	9.0000	DZ5
13.7259	16	10.5000	DZ6
11.6046	16	9.0000	DZ7
15.2391	16	12.6875	DZ8
11.5627	16	8.6875	DZ9
12.4497	16	12.0625	SR1
11.1288	16	11.8750	SR2
11.9492	16	10.8750	SR3
12.0746	16	15.9375	SR4
14.2453	16	12.5625	SR5
13.6602	16	9.7500	SR6
12.4430	16	13.1875	SR7
11.9101	16	12.6250	SR8
9.4269	16	8.7500	SR9
11.3708	544	10.4559	Total

3- تأثير أقراص المضادات الحيوية على الكائنات الدقيقة المختبرة:

Descriptive Statistics

Dependent Variable: ANBI

N	Std. Deviation	Mean	TO\$
16	10.2013	16.7500	B.sub
16	7.1621	10.3125	E.coli
16	7.7843	10.0625	K.pneu
16	8.1156	5.4375	p.aerg
16	11.0151	8.0000	S.aur
16	8.5905	14.9375	S.cerv
16	7.8867	10.7500	v.fluv
112	9.2633	10.8929	Total

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ANBI

Observed Power	Noncent. Parameter	Eta Squared	Sig.	F	Mean Square	df	Type III Sum of Squares	Source
.903	18.663	.151	.008	3.111	239.577	6	1437.464	Corrected Model
1.000	172.540	.622	.000	172.540	13289.286	1	13289.286	Intercept
.903	18.663	.151	.008	3.111	239.577	6	1437.464	TO\$
					77.021	105	8087.250	Error
						112	22814.000	Total
						111	9524.714	Corrected Total

a. Computed using alpha = .05

b. R Squared = .151 (Adjusted R Squared = .102)

ANBI

Subset	N	TO\$
2	1	

	5.4375	16	p.aerg	Duncan
	8.0000	16	S.aur	
10.0625	10.0625	16	K.pneu	
10.3125	10.3125	16	E.coli	
10.7500	10.7500	16	v.fluv	
14.9375		16	S.cerv	
16.7500		16	B.sub	
.056	.132		Sig.	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 77.021.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 16.000.

4- تأثير بكتريا *Streptomyces* المعزولة على الكائنات المختبرة:

TU

4	3	2	Subset 1	N	SM\$	
			.00	7	AU13	Duncan
			.00	7	AU8	
		2.00	2.00	7	AU7	
	6.00	6.00	6.00	7	AU2	
	6.29	6.29	6.29	7	AU11	
	6.86	6.86	6.86	7	SR6	
8.14	8.14	8.14	8.14	7	DZ10	
10.29	10.29	10.29	10.29	7	SR5	
10.57	10.57	10.57	10.57	7	SR3	
11.14	11.14	11.14	11.14	7	DZ2	
11.14	11.14	11.14	11.14	7	SR1	
11.29	11.29	11.29	11.29	7	DZ5	
11.57	11.57	11.57	11.57	7	SR2	
11.71	11.71	11.71	11.71	7	SR7	
13.43	13.43	13.43	13.43	7	SR8	
14.14	14.14	14.14	14.14	7	DZ1	
14.29	14.29	14.29	14.29	7	AU12	
14.57	14.57	14.57	14.57	7	AU1	
15.43	15.43	15.43	15.43	7	AU4	
15.86	15.86	15.86	15.86	7	SR4	
16.29	16.29	16.29	16.29	7	DZ4	
16.57	16.57	16.57	16.57	7	DZ9	
18.29	18.29	18.29	18.29	7	DZ8	
19.00	19.00	19.00	19.00	7	DZ11	
19.43	19.43	19.43	19.43	7	AU14	
19.43	19.43	19.43	19.43	7	DZ6	
19.71	19.71	19.71	19.71	7	AU10	
21.00	21.00	21.00	21.00	7	DZ7	
21.43	21.43	21.43		7	AU6	
21.86	21.86	21.86		7	SR9	
22.14	22.14	22.14		7	DZ3	
22.29	22.29	22.29		7	AU5	
27.29	27.29			7	AU3	
28.14				7	AU9	
.066	.050	.063	.053		Sig.	

Descriptive Statistics
Dependent Variable: TU

N	Std. Deviation	Mean	SM\$
---	-------------------	------	------

7	15.55	14.57	AU1
7	14.10	19.71	AU10
7	9.55	6.29	AU11
7	14.43	14.29	AU12
7	.00	.00	AU13
7	19.63	19.43	AU14
7	7.83	6.00	AU2
7	21.32	27.29	AU3
7	19.24	15.43	AU4
7	19.40	22.29	AU5
7	10.94	21.43	AU6
7	5.29	2.00	AU7
7	.00	.00	AU8
7	22.73	28.14	AU9
7	19.43	14.14	DZ1
7	10.27	8.14	DZ10
7	19.66	19.00	DZ11
7	11.20	11.14	DZ2
7	18.25	22.14	DZ3
7	16.60	16.29	DZ4
7	12.04	11.29	DZ5
7	14.60	19.43	DZ6
7	15.20	21.00	DZ7
7	17.61	18.29	DZ8
7	16.43	16.57	DZ9
7	17.82	11.14	SR1
7	16.57	11.57	SR2
7	16.12	10.57	SR3
7	17.99	15.86	SR4
7	13.67	10.29	SR5
7	14.23	6.86	SR6
7	15.09	11.71	SR7
7	21.72	13.43	SR8
7	22.23	21.86	SR9
238	16.29	14.34	Total

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: TU

Sig.	F	Mean Square	df	Type III Sum of Squares	Source
.098	1.371	346.121	33	11422.004	Corrected Model
.000	193.853	48943.567	1	48943.567	Intercept
.098	1.371	346.121	33	11422.004	SM\$
		252.478	204	51505.429	Error
			238	111871.000	Total
			237	62927.433	Corrected Total

a. R Squared = .182 (Adjusted R Squared = .049)