

Polymyxin is isolated from marine *Bacillus polymyxa* bacteria and its effect in pathogenic bacteria

Dr. Badr Al Ali ^{*}
Dr. Ahmed Qara Ali ^{**}
Rami Hammoud ^{***}

(Received 15 / 5 / 2019. Accepted 16 / 3 / 2020)

□ ABSTRACT □

The organic extract of supernatant of marine bacteria isolate (*Bacillus polymyxa*) was obtained . This bacteria was isolated from the coastal water from Afami site - Lattakia. The polymyxin antibiotic extract was isolated in a pale greasy and powder form after crystallization and purification processes. The inhibitory activity of polymyxin antibiotic was tested against four bathogenic bacteria, Gram-positive bacteria (*Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*) and Gram- negativ bacteria (*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*), which were isolated from hospital laboratory of Tishreen University in Lattakia, by the well diffusion method. The results showed higher inhibitory effect towards Gram-negative bacteria than Gram-positive bacteria.

Depending on these results, we can say that the extracts of *marine Bacillus polymyxa* were expected to be potential resources of natural antibiotic products against pathogenic bacteria in the future.

Keywords: Bacillus polymyxa, Bathogenic bacteria, Antibiotic, polymyxin

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

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

*** Master Student , Dept of Marine biology at HIMR, Tishreen University , Lattakia, Syria..

عزل المضاد الحيوي Polymyxin من بكتيريا *Bacillus polymyxa* البحرية وتأثيره على البكتيريا الممرضة

* الدكتور بدر العلي

** الدكتور أحمد قره علي

*** رامي حمود

(تاريخ الإيداع 15 / 5 / 2019. قبل للنشر في 16 / 3 / 2020)

□ ملخص □

تم الحصول على المستخلص العضوي لرشاحة مزرعة بكتيريا *Bacillus polymyxa* المعزولة من المياه الشاطئية لمنطقة أفاميا - اللاذقية وتمت عملية عزل المضاد الحيوي Polymyxin والحصول عليه بشكله النقي على شكل مسحوق دهني باهت اللون وذلك بعد إجراء عملية بلورته وتنقيته وتم الكشف عن أهم المجاميع الكيميائية فيه. تم دراسة فعاليته التثبيطية تجاه بعض البكتيريا الممرضة (*Streptococcus pneumoniae* و *Staphylococcus aureus*) موجبة صبغة الغرام وبكتيريا (*Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae*) سالبة صبغة الغرام المعزولة من الجروح والحروق ومن عينات البول وذلك باستعمال طريقة الانتشار بالحفر. بينت النتائج بأن المضاد الحيوي Polymyxin المعزول من بكتيريا *Bacillus polymyxa* قد أبدى فعالية تثبيطية عالية تجاه أنواع البكتيريا سالبة صبغة الغرام مقارنة مع موجبة صبغة الغرام وهذا ما يعطي أهمية طبية لهذا المضاد المستخلص من بكتيريا الـ *Bacillus polymyxa* البحرية.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus polymyxa*، pathogenic bacteria، antibiotic، polymyxin

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

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

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

مقدمة:

اشتق مصطلح المضاد الحيوي (Antibiotic) من مصطلح التضاد الحيوي الذي استعمله لأول مرة العالم Vuillemin في عام 1889 (Arnold, 1982). تنتشر الأحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية بصورة واسعة في الطبيعة حيث وجدت في التربة والماء وبقايا النباتات والحيوانات المتفسخة وتعتبر البحار المصدر الرئيسي لعزل الكثير منها لذلك اتجه الكثير من الباحثين إلى البحار لغرض الحصول على سلالات من الأحياء الدقيقة المنتجة لمضادات حيوية جديدة (Egorov, 1985). وقد ظهرت أدلة علمية على كفاءة الأحياء العلاجية في التأثير وإنها شملت أنواع عديدة من جنس العصيات وأنواع من البكتيريا الأخرى (Khafaghi, 2008).

من هذه الأحياء الدقيقة وخاصة البكتيريا نذكر جنس *Bacillus*، حيث تنتج بكتيريا *Bacillus sp* العديد من المضادات الحيوية الببتيدية التي تمتاز بالقضاء على طيف واسع من البكتيريا إذ تعمل على زيادة نفوذ الغشاء الخلوي للبكتيريا من خلال ارتباطه بالمركبات الفوسفوليبيدية (Vaara, 1981). إن بعض أنواع جنس *Bacillus sp* قادرة على إنتاج الأنزيمات الصناعية والمضادات الحيوية المهمة وإن أهم ما يميز هذه المضادات إنها مضادات ببتيدية (Peptid antibiotics) تكون خطية ومعظمها بشكل حلقي (Todar, 2003). تعد بكتيريا جنس *Bacillus sp* من الأحياء المجهرية المهمة في المجالات الطبية، الصناعية والزراعية إذ تنتج حوالي 167 مضاداً حيوياً فضلاً عن إنتاجها للعديد من الانزيمات المهمة (Norries, 1981).

من أهم أنواع جنس *Bacillus sp* المنتجة للمضادات الحيوية هو النوع *Bacillus circulans* الذي ينتج Circulin والنوع *Bacillus brevis* الذي ينتج Gramcidin, Tyrocidin والنوع *Bacillus cereus* الذي ينتج Cerexin والنوع *Bacillus polymyxa* الذي ينتج Polymyxin, Colistin (Katz and Demain, 1977).

إن طيف عمل المضادات الحيوية المنتجة من قبل هذا الجنس يكون واسعاً إذ أن بعض المضادات الحيوية Gramcidin, Tyrocidin تؤثر على البكتيريا موجبة صبغة الغرام في حين يؤثر الـ Colistin على البكتيريا سالبة صبغة الغرام أما Difficidin و Polymyxin فيؤثران على البكتيريا سالبة وموجبة صبغة الغرام (Todar, 2003).

تمتاز *Bacillus polymyxa* بإنتاج العديد من الأنزيمات (Painbeni et al., 1992). استعملت كأحياء علاجية (Probiotics) (Piuri et al., 1998)، لكن لم يعد استخدام النوع *Bacillus polymyxa* في الإنتاج الصناعي مقتصرًا على إنتاج بعض المركبات الصناعية بل تعداه ليشمل إنتاج المركبات الدوائية والكيميائية وأهمها المضادات الحيوية والهرمونات والفيتامينات والمبيدات والأسمدة الحيوية (Al-Ashour, 2009).

يعد الـ Polymyxin عبارة عن مضاد حيوي عديد الببتيد الذي يخلق بطرق حيوية تختلف عن تلك التي تنتج بها البروتينات وينتج من البكتيريا *B. circulans* و *B. polymyxa*. يوجد هذا المضاد بصيغ كيميائية مختلفة وهي توجد في عدة أنواع منها (A-B-C-D-E)، ويكون هذا المضاد سام للعصب والنفرون (nephrotoxic و neurotoxic) (Jeffrey et al., 2005). كما يستخدم هذا المضاد بشكل واسع لعلاج البكتيريا سالبة صبغة الغرام ويكون عمله من خلال ارتباطه بغشاء الخلية في موقع phosphotidylethanolamine وبذلك يعطل وظيفة الغشاء والمتضمنة النقل الفعال والنفوذية وبذلك تعطل مضخات ايونات الكالسيوم والمغنيزيوم. ولأهمية هذا المضاد كان الهدف من هذا البحث الحصول على عزلة محلية قادرة على إنتاج المضاد الحيوي ودراسة فعاليته تجاه بعض البكتيريا الممرضة.

أهمية البحث وأهدافه:

نظراً لأهمية الـ *Bacillus polymyxa* في مجال إنتاج المضادات الحيوية وقلّة الدراسات الموجودة على بعض المضادات المنتجة من هذه البكتريا وخاصة المضاد الحيوي Polymyxin لذا كان الهدف من الدراسة هو فصل وتنقية المضاد Polymyxin المستخلص من بكتريا *Bacillus polymyxa* البحرية التي تم عزلها من المياه الشاطئية من منطقة أفاميا لمدينة اللاذقية ودراسة بعض خواصها الكيميائية والفيزيائية والبيولوجية. يمكن أن يكون هذا المضاد الحيوي الجديد فعالاً حيوياً وليس له أضرار جانبية ويعد مصدراً لتطوير العديد من العقاقير الطبية، مقارنة مع الصادات الحيوية الفعالة الأخرى.

طرائق البحث و مواده:**1- العزلات البكتيرية المنتجة للمضاد الحيوي Polymyxin:**

تم اختيار السلالة الـ *Bacillus polymyxa* البحرية المعزولة من شاطئ مدينة اللاذقية من منطقة أفاميا ذو الإحداثيات (35°76'19.1"N; 35°54'19.3"E): يبعد 300م عن مرفأ الصيد والنزهة في أفاميا كموقع معرّض للتلوث بمياه الصرف الصحي وذلك خلال الطلعة البحرية في شهر تشرين الأول لعام 2018 م.

2- العزلات البكتيرية الممرضة المستخدمة في هذه الدراسة:

تم الحصول على العزلات البكتيرية الممرضة من عينات مرضية مختلفة من مشفى تشرين الجامعي في محافظة اللاذقية (الجدول 1). شخّصت هذه العزلات الممرضة وأجريت الفحوصات المجهرية والبيوكيميائية اعتماداً على المراجع العلمية العالمية المتبعة لتشخيص البكتريا (Holt and Krieg, 1994).

الجدول(1) البكتريا الممرضة البشرية ومصادرها

مصدر العينة	البكتريا الممرضة
بول	<i>Staphylococcus aureus</i>
مفرزات جرح	<i>Streptococcus pneumonia</i>
بول	<i>Escherichia coli</i>
مفرزات جرح	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

3- الأوساط الزرعية:

Nutrient agar (شركة Merck الألمانية).

Muller Hinton agar (شركة Merck الألمانية).

وسط ماء بيببتون (شركة Merck الألمانية).

استعملت الأوساط الزرعية المناسبة السابقة، وحضرت هذه الأوساط اعتماداً على تعليمات الشركة المصنعة، وعقمت بالأتوكلاف عند درجة حرارة 121 م° وضغط جوي 15 باوند/إنش² ولمدة 15 دقيقة.

4- طريقة العمل:

❖ عزل المضاد الحيوي من بكتيريا *Bacillus polymyxa*:

زرع *Bacillus polymyxa* في دورق تحتوي 100 مل من وسط ماء بيببتون ثم حضنت بدرجة حرارة 30 م° لمدة 72 ساعة. بعد عملية الحضانة تم فصل الرشاحة عن الرسابة المكونة من الخلايا البكتيرية حسب طريقة Kataz and Demain (1977). باستخدام جهاز الطرد المركزي (5000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق). أخذت الطبقة العليا (الرشاحة) التي تحتوي على جميع النواتج الثانوية والمضادات الحيوية التي تنتجها هذه العزلة البكتيرية. تم إهمال الراسب الذي يمثل الخلايا البكتيرية النامية، ثم ضبطت درجة الحموضة عند قيمة (3) باستخدام محلول حمض HCl تركيز 1N ثم أضيف إلى الرشاحة ما يعادلها حجماً من الكحول الإيثيلي المطلق (95%) بنسبة 50% (V/V)، ثم مزجت جيداً وتم حفظها في درجة حرارة 4 م° لمدة 24 ساعة.

فصل الطور المائي عن المحل باستخدام قمع فصل وتم التخلص من المذيب باستخدام المبخر الدوار، لإزالة ما أمكن من المذيب (الكحول الإيثيلي)، وتم حفظ المزيج بدرجة حرارة 4 م° لمدة 24 ساعة لغرض ترسيب المضاد الحيوي ثم أجريت عملية الطرد المركزي مرة ثانية للحصول على راسب المضاد الحيوي ثم غسل الراسب بالإيثانول ثم بالماء المقطر ثم جفف للحصول على مسحوق المضاد الحيوي عن طريق المبخر الدوار.

❖ التحري والكشف عن المضاد الحيوي:

أجريت تفاعلات لونية للتعرف على المجاميع الكيميائية الداخلة بتركيب المضاد الحيوي (Saadall, 1980).

- كشف مولش:

أضيف 1مل من محلول ألفا نفتول الكحولي α -naphthol إلى 1مل من محلول المضاد ثم تم عملية الرج بقوة ثم أضيفت قطرات من حمض الكبريت المركز H_2SO_4 على جدران أنبوب التفاعل دون تحريك. إن ظهور الحلقة البنفسجية دليل وجود مجموعة كربوهيدراتية.

- كشف الأمين:

تم تسخين 1مل من المضاد الحيوي وأضيف إليه 1مل من كاشف الننهايدرين، ثم سخن المزيج لمدة 3 دقائق بدرجة حرارة 120 م° لتحديد وجود مجموعة الأمين الحرة. إن ظهور اللون البنفسجي دليل على وجود الأمين.

- كشف عن أصرة الأمايد:

تم بإذابة 0.005غ من المضاد الحيوي المستخلص مع 2 مل من محلول NaOH (20%). ثم سخن المزيج بدرجة حرارة 70 م° لمدة دقيقة واحدة وإن تغير لون ورقة عباد الشمس دليل على وجود أصرة الأمايد.

النتائج والمناقشة:

● استخلاص وتنقية المضاد الحيوي:

تم في هذا البحث دراسة فعالية بكتريا الـ *Bacillus polymyxa* في إنتاج المضاد الحيوي Polymyxin وذلك حسب طريقة Kataz and Demain (1977). عزل المضاد الحيوي Polymyxin بشكله النقي على شكل مسحوق دهني باهت اللون وذلك بعد إجراء عملية بلورته وتنقيته من الشوائب العالقة.

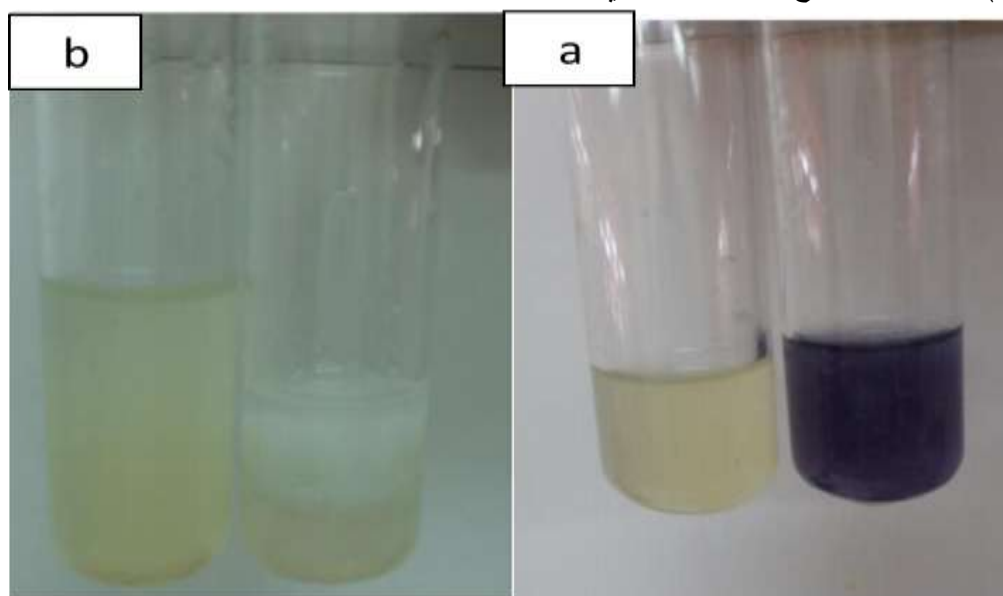
● المجاميع الكيميائية الفعالة الداخلة في تركيب المضاد الحيوي:

تم تحديد المجاميع الكيميائية الداخلة بتركيب المضاد الحيوي الذي تم الحصول عليه بعد إجراء التفاعلات اللونية المذكورة في الجدول (2).

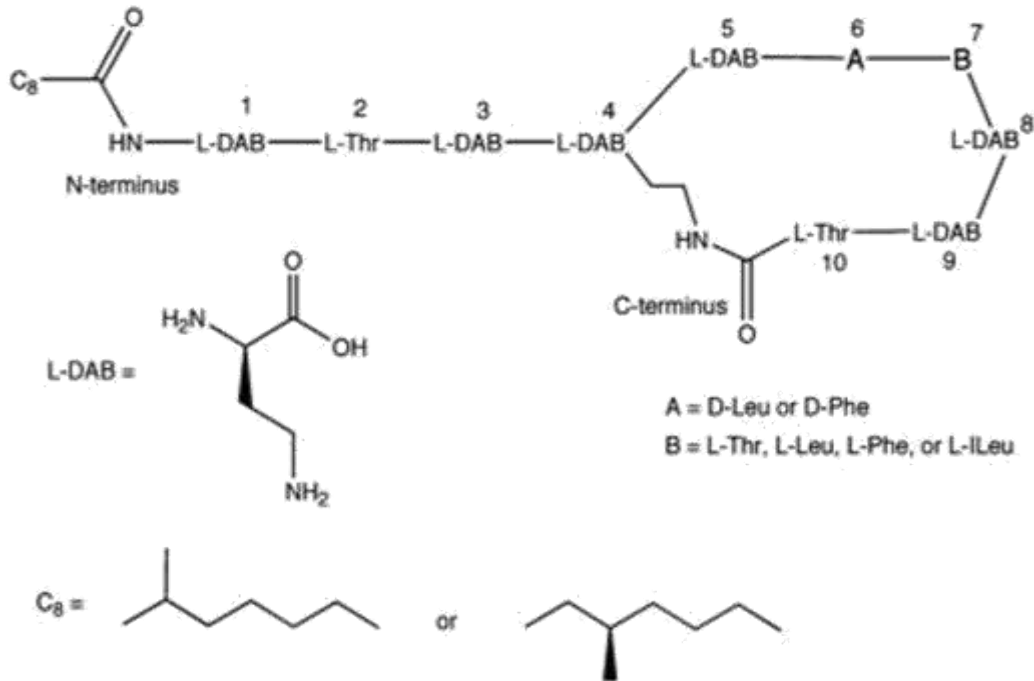
الجدول (2) أهم الإختبارات اللونية العائدة للمضاد الحيوي المستخلص من بكتريا *B. polymyxa*.

ملاحظات	مضاد حيوي قياسي للـ Polymyxin	مضاد حيوي مستخلص من <i>B. polymyxa</i>	نوع الإختبار
عدم وجود مجموعة كربوهيدراتية	(-) عدم تكوين حلقة بنفسجية	(-) عدم تكوين حلقة بنفسجية	كشف الكربوهيدرات (كشف مولش)
وجود مجموعة أمينية	(+) محلول بنفسجي	(+) محلول بنفسجي	كشف الأمين
وجود أصرة الأمايد	(+) تلون ورقة عباد الشمس	(+) تلون ورقة عباد الشمس	كشف أصرة الأمايد

أثبتت نتائج الاختبارات اللونية التي أجريت على المضاد الحيوي المستخلص وجود المجاميع الكيميائية الفعالة والمميزة لتركيب المضاد الحيوي البولي ميكسين (الجدول 2). لوحظ من خلال الاختبارات أن هذا المضاد الحيوي المستخلص من بكتريا *Bacillus polymyxa* يحتوي على زمرة أمينية وأصرة أمايد ولايحتوي زمرة كربوهيدراتية كما هو مبين بالشكل (2)، وتؤكد هذه النتائج أن المضاد الحيوي هو الـ Polymyxin.

الشكل (2) اختبار كشف الأمين (a) وكشف مولش (b) للمضاد الحيوي المستخلص من بكتريا *B. polymyxa*

فقد تم التعرف حتى الآن على خمسة أنواع من البولي ميكسين (A-B-C-D-E) ويعد النوع B أقلهاسمية. كما أن البنية الكيميائية للبوليميكسينات هي متعددة البيبتيدات، وتتكون من بقايا 10 أحماض أمينية، ستة منها تتكون من-L-α (الشكل 3).



الشكل (3): البنية الكيميائية للمضاد الحيوي Polymyxin المرجع
(<http://www.britannica.com/cb/article?tocId=9060706>)

• الفعالية التثبيطية للمضاد الحيوي المعزول من بكتيريا *Bacillus polymyxa* تجاه البكتيريا الممرضة : أظهر المضاد الحيوي Polymyxin فعالية تثبيطية متباينة بالنسبة لبكتيريا سالبة وموجبة صبغة الغرام، وكانت الفعالية التثبيطية تجاه البكتيريا الممرضة سالبة صبغة الغرام (*Klebsiella pneumoniae* ، *Escherichia coli*) أعلى مما هي عليه تجاه البكتيريا الممرضة موجبة صبغة الغرام (*Streptococcus pneumoniae* ، *Staphylococcus aureus*).

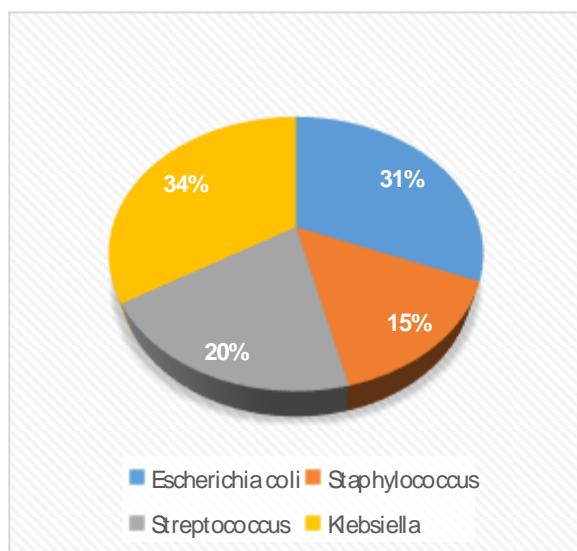
بينت نتائج الدراسة أنّ فعالية المضاد الحيوي المنتج من قبل بكتيريا *Bacillus polymyxa* تجاه البكتيريا سالبة وموجبة صبغة الغرام كانت متباينة وتراوح قطر هالة تثبيط نموها بين (12-27 ملم). مما يثبت قدرة المضاد الحيوي المنتج من عزلة *Bacillus polymyxa* على تثبيط البكتيريا الممرضة (الجدول 3). لوحظ أيضاً أن قطر هالة التثبيط بالنسبة للبكتيريا سالبة صبغة الغرام كان بحدود 27 ملم بالنسبة لـ *Klebsiella pneumoniae* و 25 ملم بالنسبة لـ *Escherichia coli*. أما بالنسبة للبكتيريا موجبة صبغة الغرام فكان قطر هالة التثبيط بحدود 16 ملم لـ *Streptococcus pneumoniae* و 12 ملم لـ *Staphylococcus aureus* وهذه النتائج قريبة إلى ما توصل إليه MUHAISEN (2011) حيث كان قطر هالة التثبيط بالنسبة للبكتيريا سالبة صبغة الغرام كان بحدود 25 ملم بالنسبة

لا *Klebsiella pneumoniae* و 23 ملم بالنسبة لـ *Escherichia coli*. أما بالنسبة للبكتريا موجبة صبغة الغرام فكان قطر هالة التثبيط بحدود 17 ملم لـ *Streptococcus pneumoniae* و 11 ملم لـ *Staphylococcus aureus*

الجدول (3) الفعالية التثبيطية للمضاد الحيوي تجاه البكتريا الممرضة مقدره بقياس قطر هالة التثبيط (mm).

<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	قطر التثبيط المضاد الحيوي <i>Polymyxin</i>
27	25	16	12	

يقوم المضاد الحيوي *Polymyxin* المنتج من قبل بكتريا *Bacillus polymyxa* بقتل وتثبيط نمو البكتريا الممرضة سالبة وموجبة صبغة الغرام من خلال ارتباطه بالأغشية الخلوية الغنية بالمركبات الفوسفوليبيدية (Katz and Demain, 1977) ويؤدي ذلك إلى فقدان الغشاء وظيفته النفوذية (Jeffrey et al., 2005). بينت نتائج التحاليل الاحصائية لفعالية المضاد الحيوي المستخلص من جنس *Bacillus polymyxa* تجاه البكتريا الممرضة المدروسة، أن الفعالية التثبيطية كانت بنسبة 34% لـ *Staphylococcus aureus* وبنسبة 20% لبكتريا *Streptococcus pneumoniae* وكانت بنسبة 31% لبكتريا *Escherichia coli* و 15% لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* (الشكل 3). كانت فعالية المضاد الحيوي تجاه البكتريا سالبة صبغة الغرام أعلى مقارنة بالبكتريا موجبة صبغة الغرام وقد يعزى السبب إلى طبيعة وتركيب الجدار الخلوي للبكتريا، وهذا ما يتوافق مع عدد من الدراسات (Katz and Demain, 1977) و



الشكل (3) النسبة المئوية لتأثير المضاد الحيوي *Polymyxin* المستخلص من بكتريا *Bacillus polymyxa* البحرية على بعض البكتريا الممرضة.

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

تم الحصول على المضاد الحيوي Polymyxin المستخلص من بكتيريا *Bacillus polymyxa* البحرية على شكل مسحوق دهني باهت اللون بعد بلورته وتنقيته من الشوائب العالقة. يحتوي هذا المضاد الحيوي المستخلص، كيميائياً، على زمرة أمينية وآصرة أمايد وعدم احتوائه على زمرة كاربوهيدراتية. أظهر المضاد الحيوي المستخلص من *Bacillus polymyxa* البحرية فعالية تثبيطية عالية تجاه البكتيريا سالبة صبغة الغرام مقارنة بالبكتيريا موجبة صبغة الغرام. تبين هذه الدراسة الأهمية الطبية لهذا المضاد الحيوي المستخلص من أحد عزلات بكتيريا *Bacillus polymyxa* البحرية وضرورة استثمار الموارد البحرية لما لها من أهمية على كافة المجالات التي تخدم الإنسان.

التوصيات:

- ضرورة إجراء دراسات معمقة على المستوى الوراثي للتعرف على عزلات النوع *Bacillus polymyxa* البحرية لما لها من أهمية في المجالات الطبية والصيدلانية والصناعية.
- إجراء دراسات للتعرف على أهمية كل مركب من المركبات الكيميائية الموجودة في الخلاصات العضوية لعزلات *Bacillus polymyxa* البحرية وخاصة تلك الموجودة بنسب مرتفعة واستثمارها.
- دعوة الجهات البحثية والطبية والصيدلانية للمشاركة الفعالة في هذه الأبحاث التطبيقية وتطوير التقانات التي تخدم هذه الأبحاث.
- انطلاقاً من هذه النتائج لا بد من القيام بإجراء دراسة أوسع حول المستخلصات البكتيرية وتحديد طبيعة المركبات الكيميائية فيها بهدف إمكانية الحصول على مواد حيوية فعالة لمعالجة الأمراض البكتيرية مستقبلاً.

Reference:

- ARNOLD, R. M. ANTIBIOTICS. IN; R. F. DOERGE (ed.) *Wilson and Gisvolds, Textbook of organic medical and pharmaceutical chemistry*. J. B. Lippincott Co. U.S.A. 1982, 225 – 289.
- EGOROV, N.S. *Antibiotics a scientific approach*. Mir publishers, Moscow .Hopwood, D. A. (1988). Extracromosomally determined antibiotic production. Ann. Rev .Microbiol. Vol. 32, 1985, 373 – 392
- HOLT, J.G. & KRIEG, N.R.S. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Ed.*, Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A. 1994, 942.
- JEFFREY, B.; QUINN, F.B. AND W. MATTHEW RYAN, M.W.. *Antibiotics*. Grand Rounds Presentation, UTMB, Dept. of Otolaryngology, 2005.
- KATZ, E. and DEMAINE, A.L. *The peptide antibiotics of Bacillus: Chemistry, Biogenesis, and possible functions*. Bacteriology Reviews, Vol. 41, No. 2, 1977, 449-474.
- NORRIES, R.J.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A. and O'DONNELL, A.G. *The genera Bacillus and sporolactobacillus*. In: *The prokaryotes : a Handbook on Habitats, isolation and identification of Bacteria* (eds. M. P. Starr; H. Stolp; H. G. Truper; A. Balows and H.G. Schegel) Vol. 2, 1981, 1711-1742. Springer, Verlag, Berlin.

- PAINBENI, E.; VALLES, S.; POLAINA J. and FLORS, A. *Purification and characterization of a Bacillus polymyxa B-glucoisidase expressed in Escherichia coli*. J. Bacteriology, 1992.
- PIURI, M.; RIVAS, S.C. and RUZAL, S. M. *A noval antimicrobial activity of a Peanibacillus polymyxa strain isolated from regional fermented sausages*. Letters in Applied Microbiology, Vol. 27, 1998, 9-13.
- SAADALLA, R.A. *Biochemistry Practical manual Basrah University Press*. Basrah. Iraq. 1980, 111.
- TODAR, KENNTH. *Todar's on line Textbook of Bacteriology University of Wisconsin-Madison*, Department of Bacteriology, 2003.
- VAARA, M. *Effect of ionic strength on Polymyxin resistance of pmrA mutants of Salmonella*. FEMS Microbiology Letters, Vol. 11, No. 4, 1981, 321-326.
- AL-ASHOUR, ALI JABER JASIM. *The effectiveness of some Bacillus genus isolates was controlled to control some pathogenic fungi of wheat and okra*. PhD thesis, Department of Life Sciences, College of Science, University of Kufa 2009.
- KHAFAGHI, ZHRAT MAHMOUD. *Microorganisms*. University of Baghdad, Ministry of Higher Education and Scientific Research, Iraq, 2008, 7.
- AL-MUHAISEN, AWATEF; YOUSSEF, YASSIN AND SALEH, APHRODITE. *Polymyxin B Antibiotic Production from Bacillus sp.*, Journal of Kufa University for Life Sciences, Volume (3), Issue (2), 2011.