LABORATORY STUDY FOR THE EVALUATION OF *Azotobacter chroococcum* EFFCIENCY IN CHITINASE PRODUCTION AND IT'S ABILITY IN CELL WALL DEGRIDATION OF *Rhizoctonia solani* THAT CAUSES BLACK ROOT ROT DISEASE OF STRAWBERRY PLANTS

دراسة مختبرية لتقييم كفاءة البكتريا *Azotobacter chroococcum* في انتاج انزيم الكايتنيز وقابليته في تحليل جدران خلايا الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض التعفن الأسود لجذور نباتات الشليك

ا.م.ابراهيم خليل حسون
الكلية التقنية- المسيب
مقاومة احيائية /أمراض نبات

حوراء نعمة الكعبي
الكلية التقنية- المسيب
e-mailwww.nasr.allah88@yahoo.com

المستخلص

هدف البحث الى تقييم كفاءة البكتريا *Azotobacter chroococcum* في انتاج انزيم الكايتنيز وقابليته في تحليل جدران خلايا الفطر *Rhizoctonia solani* المعزول من جذور نباتات الشليك و المسبب لمرض التعفن الاسود لجذور نباتات الشليك ، ويعد هذا اول تسجيل للفطر*R.solani* على الشليك في العراق . وأوضحت الدراسة قابلية بكتريا *A.chroococcum*على انتاج إنزيم الكايتنيز بظهور منطقة تحلل للكايتين الغروي أسفل المستعمرات البكتيرية بعمق 0.5 سم وكانت أعلى فعالية للإنزيم في اليوم الرابع من الحضانة عند الرقم الهيدروجيني 8 وبدرجة حرارة 25 مْ على وسط الانتاج الانزيمي عندما كان تركيز اللقاح 10^{-5} . درست العلاقة التضادية بين إنزيم الكايتنيز والفطر *R.solani* ، وقد استطاع الإنزيم تثبيط نمو العزلة الفطرية على وسط PDA بنسبة تثبيط 85.14% قياساً بمعاملة المقارنة .

Abstract

The objective of this research is to assess the efficiency of the bacteria *Azotobacter chroococcum* production of chitinase enzyme and its ability to analyze the cell walls of the fungus *Rhizoctonia solani* isolated from the roots of strawberry plants that causes black root rot disease of strawberry plants , this is consider as the first records of the fungus *R. solani* on strawberry in Iraq . The study showed the ability of the *A. chroococcum* to produce chitinase enzyme through of decomposition zone the colloidal chitin beneath bacterial colonies depth of 0.5 cm and were higher effectiveness of the enzyme in the fourth days of incubation at pH 8 and temperature 25 ˚C on the enzymatic production center when the concentration of the inoculum was^{5-}10 . Studied the antagonism relationship between chitinase and *R.solani* which shows that the enzyme was able to inhibit the fungus on PDA with the rate of 85.14% compared to the treatment control .

المقدمة

أكدت دراسات عدة على أهمية الانزيمات في السيطرة الاحيائية كونها أحد أهم المركبات المفرزة من العوامل المسيطرة في تثبيط نمو المسببات المرضية وتشير البحوث الى إن أنزيمات الـ chitinase و glucanase المفرزة من قبل عوامل السيطرة الحيوية ضرورية لتثبيط نمو الفطريات المرضية إذ تعمل هذه الانزيمات على تحطيم مركبات الكايتين (Chitin) و الكلوكان (β-glucan) (2,1) . تنتج بكتريا *Azotobacter* عدداً من الانزيمات التي من أهمها Hydrolytic enzymes التي لها القدرة على تحليل جدران خلايا الفطر الممرض ولا تؤثر في جدران خلايا النبات ومن هذه الانزيمات انزيم chitinase , laminarinase وبعضها ينتج انزيم glucanase (1⟵ 3) β وتقوم أيضاً بعض أنواع هذه البكتريا بتحلل مائي لبعض السموم المنتجة من قبل بعض الفطريات الممرضة بحيث يصبح أقل سمية على النبات (5,4,3) . كما أظهر إنزيم الـ chitinase المفرز من قبل الفطر *T. harzianum* القدرة على تحليل جدران الفطر *R. solani* والمعزول من نباتات قطن مصابة بالفطر الممرض و من تثبيط نمو الفطر الممرض تحت الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم والتي كانت بدرجة حرارة 20 مْ والرقم الهيدروجيني (pH) 4 (6) . بين

(7) أنه من بين 25 عزلة من *A . chroococcum* عزلت من منطقة الرايزوسفير من التربة ومن مختلف مناطق مقاطعة Sangli الهندية أثبتت سبع عزلات من هذه البكتريا انها قد اظهرت مقدرة عالية للتضاد مع الفطريات الممرضة مثل *Rhizoctonia , Fusarium , Aspergillus* ، بينما وجد (8) أن عزلات بكتيريا *A. chroococcum* تمتلك مقدرة تضادية عالية ضد عزلات الفطر الممرض *R. solani* المسبب لمرض سقوط البادرات على الباذنجان كما وفرت حماية للنبات وزيادة في معدل إنبات البذور تحت ظروف البيت البلاستيكي . أكدت نتائج (9) ان بكتريا *A. chroococcum* قد قللت من التأثيرات السلبية للفطريات الممرضة وبشكل واضح ووفرت حماية جيدة لنباتات الفاصوليا من الإصابة بمسببات مرض تعفن الجذور وقواعد السيقان وبفروق معنوية قياساً بمعاملات الفطريات الممرضة *R. solani* و *F.solani* و *F. sulphureum* و *Macrophomina phaseolina* بمفردها التي كانت نسبة الإصابة في معاملاتها 100% وشدة اصابة عالية تراوحت بين 76.67-70.00%. اذ حققت بكتيريا *A. chroococcum* كفاءة عالية في خفض نسبة إصابة النباتات بالفطريات المستهدفة وشدتها كانت 33.33 % و41.67% و 21.67 % و 28.33 % على التوالي وبدون فروق معنوية إذ كان تأثيرها متقارباً في جميع الفطريات الممرضة .

المواد وطرائق العمل

عزل الفطر وتشخيصه

أخذت عينات من جذور نباتات الشليك المزروعة داخل البيوت البلاستيكية في ثلاث مناطق من محافظتي بابل وكربلاء للمدة من 2011/5/3 لغاية 2011/5/16 غسلت الجذور المصابة بتعفن الجذور وقطّعت إلى قطع صغيرة بطول 5-10 ملم ، نقلت الجذور(المعقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1 % ولمدة 3 دقائق والمغسولة بالماء المعقم والمجففة بورق الترشيح المعقم) الى أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي PDA بواقع 4 قطع لكل طبق وحضنت الاطباق تحت درجة 25 ± 2 مْ بعد نمو المستعمرات الفطرية على الوسط نقيت على الوسط الزرعي PDA والمضاف اليه المضاد الحيوي Tetracycline شخصت الى مستوى النوع اعتماداً على الصفات المزرعية على الوسط PDA والصفات المظهرية للابواغ اللاجنسية والخلايا المولدة للابواغ باستخدام المفاتيح التصنيفية (12,11,10) .

تشخيص بكتريا *A. chroococcum*

عزلت البكتريا *A. chroococcum* من التربة وجرى إكثارها على الوسط Sucrose Mineral Salts وأعتمد في تشخيص هذه البكتريا دراسة الصفات المظهرية تضمنت وصف سطح المستعمرة من حيث كثافة وشكل النمو وشفافية المستعمرات ولونها، والمجهرية بدراسة تفاعلها مع صبغة گرام وكذلك تحديد شكل الخلايا البكتيرية ، كما اجري اختبار الحركة باستعمال طريقة القطرة المعلقة و الاختبارات الكيموحيوية والتي تضمنت اختبار النمو في وسط بيرك و النمو في درجة حرارة 37 مْ و النمو في 1% كلوريد الصوديوم و استهلاك المصادر الكاربونية المختلفة و اختبار كفاءة العزلات على تثبيت النتروجين الجوي **(**15,14,13**).**

تحديد التركيز الفعال من العالق البكتيري *A. chroococcum* المثبط لنمو الفطر الممرض *R.solani*

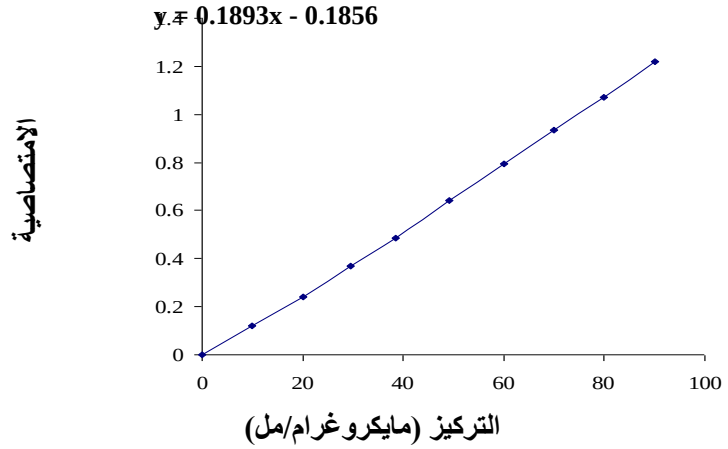
تم تحضير سلسلة تخفيفات من عالق البكتريا وذلك باخذ 1 مل من الوسط السائل النامية فيه البكتريا بواسطة ماصة معقمة واضيف الى انبوبة اختبار تحتوي على 9 مل ماء مقطر معقم وتم تلقيح كل الانابيب وذلك بأخذ 1 مل من الأنبوبة الأولى واضافتها الى الانبوبة الثانية بوساطة ماصة معقمة كررت العملية على باقي الأنابيب للحصول على سلسلة من التخافيف 10^{-1}....10^{-10} بعدها جرى تلقيح الأطباق الحاوية على الوسط الزرعي PDA بأخذ1مل / طبق من كل تخفيف من العالق البكتيري على شكل بقع دائرية وضع في مركزها قرص بقطر0.5 سم أخذ من قرب حواف مستعمرة الفطر *R.solani* والمنماة على الوسط PDA بعمر7 أيام وتركت أربعة أطباق لكل فطر للمقارنة من دون تلقيح بالبكتريا أضيف لها 1 مل ماء مقطر معقم (16) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 25±2 مْ لمدة 3 أيام بعد ذلك تم حساب مقدار التثبيط وذلك بحساب قطر مستعمرة الفطر النامي في معاملة البكتريا ومقارنتها بقطر مستعمرة الفطر النامي في معاملة المقارنة ، حسبت النسبة المئوية لتثبيط النمو الفطري وفق معادلة (17) .

الكشف عن انتاج البكتريا *A. chroococcum* لانزيم الكايتنيز

اتبعت طريقة (18) في تحضير الكايتين الغروي ، كما اتبعت طريقة (19) في الكشف عن انتاج انزيم الكايتنيز باستخدام وسط الكشف الموصوف من قبل (20) تم قياس تحلل الكايتين على أساس عمق منطقة التحلل بواسطة شريط القياس .

تقدير السكريات المختزلة والمنحنى القياسي لسكر الـــ D-glucose

اتبعت طريقة (21) في قياس السكريات المختزلة Reducing sugars المتحررة من تحلل الكايتين في المحلول الزرعي البكتيري ، تم استخدام السكر D-glucos كمادة قياسية لعمل المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز المختزل شكل (1) .



شكل(1) المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز

قياس الفعالية الإنزيمية للكايتنيز

يعتمد مبدأ قياس الفعالية الانزيمية للكايتنيز على مقدار سكر N-acetyl-D-glucosamin وباقي السكريات المختزلة الناتجة من التحلل الانزيمي للكايتين وعبر عن الفعالية الإنزيمية للكايتنيز بأنها كمية الإنزيم التي تحرر مايكرومولاً واحداً من السكريات المختزلة بالساعة الواحدة تحت ظروف القياس في 1 مل من الراشح الانزيمي (22) ، ولتحديد الفعالية الانزيمية للكايتنيز اتبعت الطريقة المعتمدة من قبل (23) .

تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم الكايتنيز المنتج من قبل *A. chroococcum*

أجري إختبار لبعض العوامل البيئية المثلى لانتاج انزيم الكايتنيز في وسط الانتاج عند درجات الحرارة 20،25،30ْم ورقم هيدروجيني 6،7،8،9 لمدة 24،48،72،96 ،120،144ساعة وحسب طريقة(21) ، إذ ثبتت بقية العوامل بإستثناء العامل المدروس ، وقدرت الانتاجية بدلالة الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل) وفق معادلة (24) .

تأثير الراشح الإنزيمي الخام للبكتريا *A. chroococcum* في نمو الفطر الممرض *R. solani*

المعاملة الاولى: فصل الإنزيم عن المضاد الحياتي وذلك عن طريق ترسيب بروتين الانزيم بإضافة الأسيتون المبرد بدرجة حرارة 20- الى الراشح الخام للإنزيم بنسبة حجم واحد من الراشح الى حجمين من الأسيتون بصورة تدريجية ، نبذ المحلول بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة ، أذيب الراسب في حجم معين من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ يعادل نصف حجم الراشح وبرقم هيدروجيني 6 بعدها مرر الإنزيم خلال أوراق ترشيح نوع Milipore filter 0.22 لغرض التعقيم والتخلص من ابواغ البكتريا.

المعاملة الثانية: مسخ الإنزيم وذلك بغليه بدرجة حرارة 100 مْ لمدة عشر دقائق ، بعدها مرر الإنزيم خلال أوراق ترشيح نوع Milipore filter 0.22 لغرض التعقيم والتخلص من ابواغ البكتريا.

المعاملة الثالثة: إمرار الراشح الخام للإنزيم خلال أوراق ترشيح نوع Milipore filter 0.22 لغرض التعقيم والتخلص من ابواغ البكتريا (25) .

أضيفت المعاملات السابقة للراشح الخام للإنزيم الى الوسط PDA قبل تصلبه بنسبة 10% وبرقم هيدروجيني 6 وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة ، ترك الوسط لكي يتصلب بعدها لقحت الأطباق الحاوية على الوسط بمستعمرة الفطر *R.solani* وضع في مركزها قرص بقطر0.5 سم وتركت 3 أطباق للمقارنة بدون معاملة أضيف لها ماء مقطر فقط ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 35 مْ و لمدة 3 أيام ، حسبت النسبة المئوية لتثبيط النمو الفطري وفق معادلة (17) .

النتائج والمناقشة

عزل الفطريات وتشخيصها

أظهرت نتائج العزل من جذور نباتات الشليك التي ظهرت عليها اعراض المرض ومن جميع البيوت البلاستيكية التي تم العزل منها ، وجود الجنس *Rhizoctonia* ويعد هذا أول تسجيل لهذا الفطر على نباتات الشليك في العراق ، تم تشخيص الجنس الى مستوى النوع *R. solani* ، وتمثلت صفات هذا الفطر في مستعمراته التي عزلت من جميع المناطق بتكوين غزل فطري متفرع بشكل زاوية قائمة ويحتوي على تخصرات عند منطقة نشوء التفرع و تكوين حواجز في الفروع قرب منطقة النشوء ، المستعمرة ذات لون شاحب الى بني ، عدم تكوينه للسبورات اللاجنسية والكونيديات . بعض عزلاته تكون أجساماً حجرية بنية داكنة مستديرة وصغيرة . يكوّن خلايا برملية الشكل بهيئة سلاسل أو تجمعات عند مرحلة تكوين الجسم الحجري (15,14,13) .

تشخيص بكتريا *A. chroococcum*

تم الحصول على 3 عزلات من بكتريا *Azotobacter* عزلت من تربة حول الجذور لنباتات الحنطة وبينت النتائج ان المستعمرات النامية على الوسط SMSA الصلب كانت لماعة و ناعمة و محدبة و لزجة و متوسطة الى كبيرة الحجم غير شفافة ، كما ان الصبغة البنية كانت واضحة بمرور الوقت (صورة1) و أوضحت نتائج الفحص المجهري للشرائح الزجاجية الحاوية على الغشاء البكتيري المثبت المصبغ بصبغة كرام أن أشكال الخلايا البكتيرية كانت بيضوية الى عصوية ومتحركة بأسواط محيطية و سالبة لصبغة كرام وغالباً ما تكون على شكل أزواج وهذه الصفات تتطابق مع الصفات المزرعية والمجهرية للجـــنس *Azotobacter* (27,26) (جدول 1). ويلاحظ من الجدول (2) بعض الصفات الكيموحيوية المستعملة للتفريق بين الأنواع التابعة للجنس *Azotobacter* (28,27) . أثبتت العزلة كفاءتها في تثبيت النتروجين الجوي و لها القدرة على استغلال المصادر الكربونية المختلفة (المانيتول و الراميتول و السكروز و النشأ) والوسط الحاوي على1% كلوريد الصوديوم وعدم قدرتها على النمو في وسط بيرك، كما نمت العزلات في حرارة 37˚ م وبينت نتائج اختبار الحركة ان البكتيريا متحركة حركة انتقالية حقيقية نشطة. ويتضح من النتائج ان جميع العزلات كانت تابعة للنوع *A. chroococcum* وتتفق هذه النتائج مع ما اشار اليه (31,30,29,9) .

صورة (1) نمو بكتريا *A. chroococcum* على وسط SMSA

جدول(1) الصفات المظهرية والمجهرية لتشخيص بكتريا *A. chroococcum*

رمز العزلة	منطقة الجمع/ النبات	الصفات المظهرية للمستعمرة			الصفات المجهرية للخلايا		
		كثافة النمو	شكل النمو	اللون	شكل الخلايا	تجمع الخلايا	صبغة كرام
A1	ناحية القاسم/الحنطة	+++	لزجة	بني غامق	عصوية وبيضوية	مفردة وثنائية	سالبة
A2	ناحية القاسم /الشعير	++	لزجة	بني فاتح	عصوية قصيرة	ثنائية	سالبة
A3	ناحية القاسم /الذرة الصفراء	++	لزجة	بني فاتح	بيضوية	ثنائية	سالبة

إذ إن: (++) متوسطة النمو، (+++) نمو كثيف.

جدول (2) الصفات الكيموحيوية والتفريقية لتشخيص بكتريا *A. chroococcum*

رمز العزلة	وسط بيرك	النمو في درجة حرارة 37˚م	النمو في 1 % كلوريد الصوديوم	استهلاك مصادر الكاربون				كمية النتروجين المثبتة %
				مانيتول	رامينوز	سكروز	نشأ	
A1	-	++	++	+++	-	++	+	0.06
A2	-	+	+++	++	-	++	+	0.07
A3	-	++	++	+++	-	++	++	0.06

إذ إن: (-) لا يوجد نمو، (+) ضعيفة النمو ، (++) متوسطة النمو، (+++) نمو كثيف .

اختبار المقدرة التضادية للبكتريا *A. chroococcum* ضد الفطر الممرض *R. solani*

أشارت نتائج الجدول (3) الى ان استخدام البكتريا *A. chroococcum* بتركيز 7×10^6 وحدة تكوين مستعمرة / مل أدى الى تثبيط نمو عزلة الفطر الممرض *R.solani* على الوسط الزرعي PDA ، إذ بلغت نسبة التثبيط 83.24 % قياساً بمعاملة المقارنة وهذه النتائج تتفق مع ماحصل عليه (8) فقد اثبت مقدرة بكتريا *A. chroococcum* على تثبيط نمو الفطر الممرض

R.solani والمعزول من جذور وسيقان نبات الباذنجان . قد يعزى التأثير الذي يسببه استعمال هذه البكتيريا في تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات الى مقدرة هذه البكتيريا على انتاج عدد من الانزيمات التي لها القدرة على تحليل جدران خلايا الفطر الممرض ومن هذه الانزيمات انزيم chitinase و laminarinase و glucanase وانتاج مضادات حيوية مثل pyoluteorin , herbicolin , phenazin فضلا عن انتاجها مركبات ذات أوزان جزيئية منخفضة تعمل على مقاومة الفطريات الممرضة ومن بينها مركب سيانيد الهيدروجين (HCN) حيث إن وجود هذا المركب بتراكيز عالية يعمل على تثبيط نمو الفطريات الممرضة (32,5,4,3) .

جدول (3) تقييم كفاءة عزلة البكتريا *A. chroococcum* في تثبيط نمو عزلة الفطر *R. solani* الممرضة على الوسط الزرعي PDA

المعاملة	معدل النمو القطري (سم) للفطر *R.solani*	نسبة التثبيط %
بكتريا *A. chroococcum*	*2.15	83.24
قارنة	9.00	0.00
L.S.D عند مستوى 0.05	0.117	1.035

*كل رقم في الجدول يمثل معدلاً لأربعة مكررات

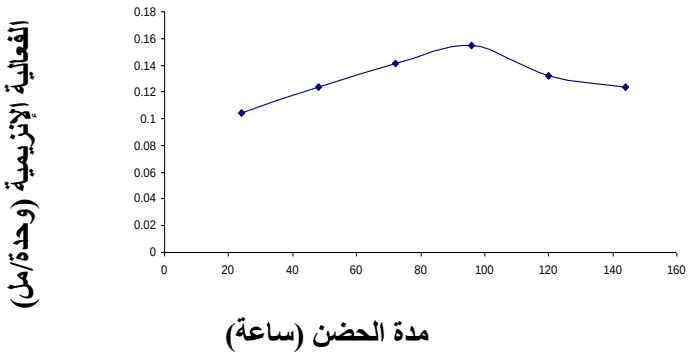
الكشف عن انتاج انزيم الكايتنيز

أظهرت نتائج الكشف عن إنتاج إنزيم الكايتنيز ظهور منطقة إراقة (تحلل) أسفل المستعمرات البكتيرية بعمق 0.5 سم بعد مرور 3 أيام من الحضن بدرجة حرارة 37 مْ في وسط الكايتين الغروي (تكون عزلات البكتريا موجبة لاختبار الـ Chitinase اذا أعطت تحلل لأكثر من 4.5 ملم على وسط الكايتين الصلب (33) .

تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز

1- مدة الحضن

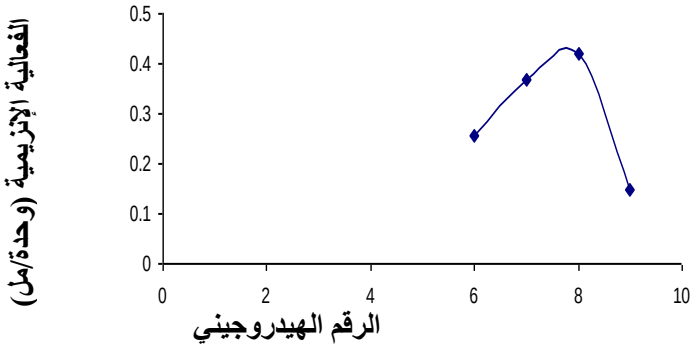
أظهرت النتائج (شكل2) تباين مدة الحضن المثلى لانتاج إنزيم الكايتينيز من قبل بكتريا *A. chroococcum* فقد سجل أعلى مستوى لانتاج الانزيم بعد مرور 96 ساعة من الحضن في وسط الانتاج بدرجة حرارة 25ْم عند الرقم الهيدروجيني 7 إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 0.1548 وحدة/مل ، ثم أخذ مستواه بالانخفاض بعد مرور 120 ساعة اذ بلغت الفعالية الانزيمية 0.1320 وحدة/مل . إن هذا الانخفاض قد يعود الى سببين مهمين أحدهما هو ان انزيم الكايتنيز يعد من الانزيمات التي تنتج بصورة مبكرة اذ يتم انتاجه في المراحل الاولى من التطفل (34,1) أما السبب الاخر فيعود الى ان انتاج الانزيم يقل عن زيادة مدة الحضن نتيجة لعوامل منها حصول تغيرات بيئية غير مرغوبة في وسط الانتاج تؤثر في مستوى انتاج الانزيم وفعاليته ومنها ان انزيم الكايتنيز يعد من الإنزيمات المستحثة لذا فإن معدل انتاجه يقل او يتوقف عند تجمع النواتج النهائية لعمل الانزيم (35) .



شكل (2) تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم الكايتنيز

2-الرقم الهيدروجيني

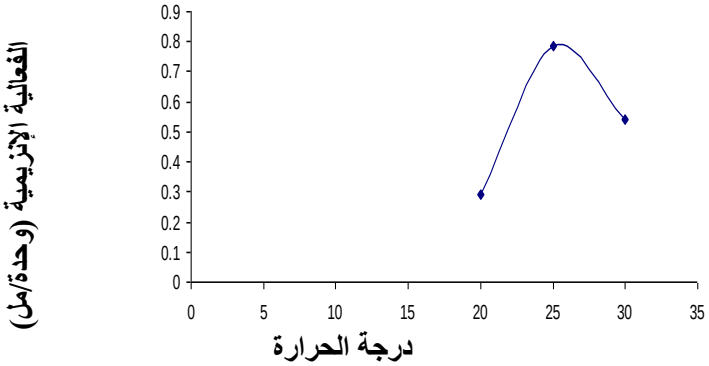
أظهرت النتائج (شكل3) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتينيز من قبل بكتريا *A. chroococcum* فقد سجل أعلى مستوى لانتاج الانزيم عند الرقم الهيدروجيني 8 بعد مرور 96 ساعة من الحضن في وسط الانتاج بدرجة حرارة 25ْم إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 0.4220 وحدة/مل ، وقد يعزى تأثير الرقم الهيدروجيني في وسط انتاج الإنزيم الى تأثيره الكبير في صفات الوسط كتأين العناصر المعدنية فيه وقابلية ذوبانها الذي ينعكس على مستوى نمو البكتريا ونشاطها وقدرتها على انتاج العديد من الإنزيمات التي من بينها إنزيم الكايتنيز (36) .



شكل (3) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتنيز

3- درجة الحرارة

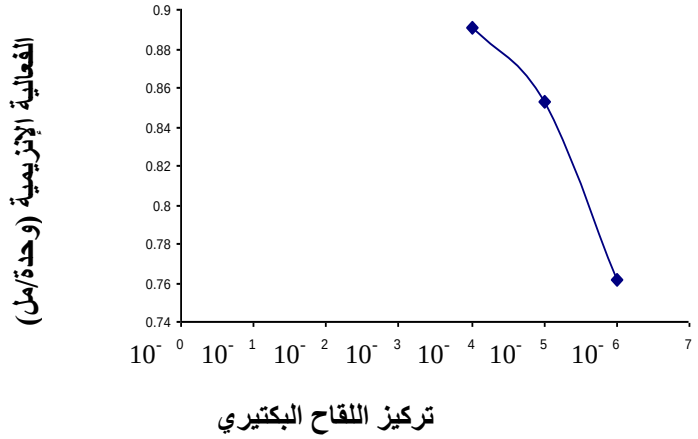
أظهرت النتائج (شكل4) تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الكايتينيز من قبل بكتريا *A. chroococcum* فقد سجل أعلى مستوى لانتاج الانزيم بدرجة حرارة 25ْم عند الرقم الهيدروجيني 8 بعد مرور 96 ساعة من الحضن في وسط الانتاج إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 0.6431 وحدة/مل ، أن درجة الحرارة تؤثر بصورة كبيرة في إنتاج الإنزيمات كما ان الحد الحراري الأقصى للنمو يعتمد ويتحدد بنوع الإنزيمات أو مدى تأثير البروتينات داخل الخلية بالحرارة إذ إن الانخفاض السريع في معدل النمو عند رفع الحرارة أكثر من المثلى يأتي نتيجة لفقدان الإنزيم المسيطر على سرعة النمو لطبيعته بفعل الدنتره (Denaturation) .



شكل (4) تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الكايتنيز

4- تركيز اللقاح البكتيري

أظهرت النتائج (شكل5) أن تركيز إنزيم الكايتينيز 10^{-4} المنتج من قبل بكتريا *A. chroococcum* قد سجل أعلى مستوى لانتاج الانزيم بدرجة حرارة 25ْم عند الرقم الهيدروجيني 8 بعد مرور 96 ساعة من الحضن في وسط الانتاج إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 0.8641 وحدة/مل ، أما بالنسبة للتركيز 10^{-5} فقد بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 0.7492 وحدة/مل بعدها انخفضت الفعالية الإنزيمية عند التركيز 10^{-6} والبالغة 0.358 وحدة/مل ويعزى ذلك الى انخفاض الفعالية الإنزيمية للكايتنيز و يعود سبب الانخفاض الى انه كلما قلّ تركيز العالق البكتيري قلّ تركيز الانزيم وبما ان سرعة التفاعل تتناسب بشكل طردي مع تركيز الانزيم بوجود كمية كافية من المادة الاساس لذلك انخفضت الفعالية الانزيمية (37) .



شكل (5) تأثير تركيز اللقاح البكتيري في إنتاج إنزيم الكايتنيز

تأثير معاملات الراشح الإنزيمي الخام للبكتريا *A. chroococcum* في تثبيط نمو عزلة الفطر الممرض *R. solani* على الوسط الزرعي PDA

بينت نتائج تأثير المعدلات للراشح الإنزيمي الخام للبكتريا *A. chroococcum* في نمو الفطر *R.solani* وعند الرقم الهيدروجيني 8 ولفترة حضانة 96 ساعة بدرجة حرارة 25ْم عندما كان تركيز اللقاح البكتيري 10^{-5} انحفاضاً كبيراً في معدلات نمو الفطر الممرض بعد المعاملة بالراشح الإنزيمي المفصول والمركز بالأستون بنسبة 10% مقارنة ببقية المعاملات (جدول4) اذ بلغت نسبة التثبيط 85.14 % قياساً الى معاملة المقارنة ، فقد أشار (25) الى انه يمكن التخلص من الكثير من المركبات الموجودة مع الانزيمات في الراشح الانزيمي بواسطة فصلها بالاستون الذي استعمل ايضاً في تركيز الانزيم وذلك بترسيب البروتينات (الإنزيمات) بالمذيبات العضوية التي من ضمنها الأسيتون . في حين انخفضت نسبة التثبيط بإستعمال الراشح الإنزيمي الخام الى 53.48 % قياساً الى معاملة الأستون ربما يعود سبب هذا الانخفاض الى ماذكره (38) من أن الإنزيم يفقد جزء من فعاليته عند إضافته مع المركبات الأيضية الأخرى كما أشار الى ان الإنزيم يجب أن يضاف بتراكيز أعلى مما هو عليه في الراشح الإنزيمي الخام لكي نحصل على نسبة تثبيط عالية لنمو الفطر أو إنبات أبواغه ، كما سجلت المعاملة بالراشح الإنزيمي المقتول حرارياً أقل نسبة في تثبيط نمو الفطر الممرض إذ بلغت 21.73 % وهذه النتيجة تتفق مع ماوجده (39) عند إستعمال إنزيم الكايتنيز المقتول حرارياً والمنتج من قبل الفطر *T. harzianum* ضد الفطر *S. rolfsii* فقد وصلت نسبة التثبيط الى 27.5% كما بين الباحث نفسه حصول نسبة تثبيط بالرغم من قتل الإنزيم حرارياً الى وجود مركبات أيضية أخرى في الراشح الأنزيمي التي من الممكن أن تعطي نسبة تثبيط ضد الفطر الممرض كما بين العديد من الباحثين أن بكتريا *A. chroococcum* تستطيع أن تنتج عدداً من المضادات الحيوية والتي تعد من الاليات الأكثر قبولاً في السيطرة على المسببات المرضية حيث لها لقدرة على إنتاج أنواع عديدة من المركبات ومنها : Agrocin 84 ، Agrocin 434 , 2-4 diacetyl phoroglucinol , herbicolin , phenazin , pyrrolnitrin , pyoluteorin , oomycin ، وأمكن إنتاج المضاد الحيوي Agrocin 84 بشكل تجاري (40,32,5).

جدول(4) تأثير معاملات الراشح الإنزيمي الخام للبكتريا *A. chroococcum* في تثبيط نمو عزلة الفطر الممرض *R. solani* على الوسط الزرعي PDA

المعاملة	معدل النمو القطري (سم) للفطر *R.solani*	نسبة التثبيط %
معاملة الأستون	*1.20	85.14
معاملة قتل الإنزيم	4.73	21.73
معاملة الراشح الانزيمي الخام فقط	2.50	53.48
المقارنة	8.50	0.00
L.S.D عند مستوى احتمال 0.05	0.51	2.829

*كل رقم في الجدول يمثل معدلاً لأربعة مكررات

المصادر

1-Kubicek, C.P. ; R.L. Mach ; C.K. Prter baner and M. Lorito .2001. *Trichoderma* from genes to biocontrol . J . of Plant Pathol. 8:11- 23.

2-Lorito,M. ; N. Frakas ; S. Robuffat ; B. Bado ; and C.P. Kubicek . 1996.Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum* .J. Bacreriol. 178:6382-6385 .

3-Chet, I. ; A. Ordentlich ; R. Shapira and A. Oppenheim. 1990. Mechanism of biocontrol of soilborne plant pathogen by rhizobactera . Plant and Soil 129 : 85 - 92.

4-Glick, B. R. and Y. Bashan .1997. Genetic manipulation of plant growth- promoting bacteria to enhance biocontrol of Phytopathogens. Biotechnol. Advances. 15:353-378.

5-Hillel, D. 2005. Plant Growth Promoting Bacteria. Elsevier, Oxford, U. K.,:103-115

6- عبيد ، زينة هادي . 2006. دراسة مختبرية لتأثير إنزيم الكايتنيز في عملية التضاد بين الفطرين *Trichoderma harzianum* Rifai و *Rhizoctonia solani* Kuhn.رسالة ماجستير . كلية العلوم - علوم الحياة / أمراض نبات. جامعة بابل .

7-Mali, G. V. and M. G. Bodhankar. 2009. Antifungal and phytohormone production potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from groundnut (Arachis hypogea L.). Asian J. Exp. Sci. 23: 293-297.

8-العيساوي ، جاسم محمود عبد فراس . 2010 . المكافحة المتكاملة لمرض سقوط البادرات على الباذنجان المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn . رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة بغداد

9-مطلوب ، عهد عبد علي هادي . 2012 . تحديد مسببات تعفن جذور وقواعد سيقان الفاصوليا وتقويم فعالية بعض عوامل المكافحة الأحيائية في مـقاومتها . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

10-Anderson,N.A.1982. The genetics and Pathology of *Rhizoctonig solani* . Ann. Rev. Phytopathol . 20 : 329 – 347 .

11-Blazier , S. R. ; and Conway , K. E. 2004 . Characterization of *Rhizoctonia solani* Insolates Associated with Patch Diseases on Turfgrass . Proc. Okla. Acad. Sci. 84 : 41 – 51 .

12-Parmeter , J. R. 1970. *Rhizoctonia solani* : Biology and pathology.Berkeley,Univ. of California Press . 255 pp .

13-Allen, O. N. 1959. Experiments in soil bacteriology. J. Bacteriology. 27: 325-339.

14-Tchan, Y. T. and N. B. Peter .1984. Genus *Azotobacter*. In : Bergeys' manual of systematic bacteriology.Sneath, P.H.,Mair,N.S.Sharpe, M.E. and Holt, J.G 1. William and Wilkins : p.219-229.

15-Thompson,J.P.andV.B.D.Skerman.1979.Azotobacteraceae the taxonomy and ecology of aerobic nitrogen-fixing bacteria.Academia Press, London. 419 pp.

16-حسون ، ابراهيم خليل . 2005 . المكافحة البايلوجية والكيميائية لمسبب تقرح ساق البطاطا *Rhizoctonia solani* kuhn . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

17-Montealegre,J.R. ; R.Rodrigo ; P.M.Luz ; H.Rodrigo ; S.Polyana and B. Ximena.2003. Selection of bioantagonstic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato.J. Biotec.6:115-127.

18-Robert, W.K. and C.P. Selitrennikoff .1988. Plant and bacterial chitinase differ in antifungal activity . J. Microbial. 34:169-176.

19-Baath, E. and B. Soderstrom. 1980. Degradation of macromoles by microfungi isolated from different podzoic soil htorizons . Canadian Journal of Botany 58(4):422-425.

20-Khadum-Hindi, A.1991.Etudes ultrastructurales de lassociation endomycorhizienne a vesicules et arbuscules *Glomus mosseae* Aves les racines du soja (Glycin max (L.) merrill) et intervention des micro organismes dans les residus racinaries . Univ. de nancy ,these docteur Sciences Naturelles.

21-Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalcylic acid reagent for determination of reducing sugar . Anal. Chem. 31(3):426-428.

22-Tweddell, R.J. ; S.H. Jabaji-Hare and P.M. Charest .1994. Production of chitinase and β-1,3-glucanase by Stachybotrys elegans, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani* . Appl. and . Environ . Microbiol . 60(2):489-495.

23-Chen, J. P. and M. A. Lee .1995 . Enhanced production of *Serrtia marcesscens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems. Enzyme Microb. Technol. 17: 1021-1027

24-Whitaker, J.R. 1972. Principles of enzymology for the food science . Marcel Dekker. Inc . New York. USA.

25-Pohl, T. 1990. Concentration of proteins and removal of solutes, Method in Enzymology . Academic press, 182:78.

26-Holt,J.;N.R.Krieg.1984.Bergey's manual of systematic bacteriology.1st Ed. Williams and Wilkins in Baltimore, London.

27-Holt, J.; N.R. Krieg ; P.H.A. Sneath ; J. T. Staley and S. T. Williams .1994. Berge's manual determinative bacteriology. 9th Ed . Williams and Wilkins, USA.

28-Schirmbock, M. ; M. Lorito ; Y.L. Wang ; C.K. Hayes ; I. Arisan- Atac; F. Scala ; G.E. Harman and C.P. Kubicek .1994. Parallel formation and synergism of hydrolttic enzymes and peptaiber antibiotic : Molecular mechanisms involved in the antagonists action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic of fungi . Appl. and Environ. Microbiol. 60: 4364-4370.

29-التميمي ، فارس محمد سهيل. 2005.تاثير التداخلات بين المبيدات الحيوية والكيميائية و التسميد الحيوي على نباتات الحنطة (*Triticum aestevium*) . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

30- الشيباني، جواد عبد الكاظم كمال. 2005. تأثير التسميد الكيمياوي والعضوي الإحيائي(الفطري و البكتيري) في نمو وحاصل نبات الطماطة . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

31-Khider, A. and A. M., Khidher. 2011. Chromosomal *nif* genes transfer by conjugation in nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum* to *Lactobacillus planetarium*. Current Res. J. of Biol. Sci. 3:155-164.

32-Singh, T. 1977. Studies on interaction between *Azotobacter chroococcum* and some plant pathogens. IAP, Ph. D. Thesis . Cited from Can. J. Microb. , New Delhi).

33-Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera. In: Bergey's manual of systematic bacteriology . 4:2451-2508 . Williams, S.T.; Sharpe, M.E. ; Holt, J.G. (eds.). Williams and Willkins co. Baltimore .

34-Donzelli, B.G.G. and G.E. Harman .2001. Introduction of ammonium ,glucose and chitin regulates the expression of cell wall degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain . Applied and Environment. Microbiol . 67:5643-5647.

35-Mach, R.L.; C.K. Peter bauer; K. Payer ; S. Jaksits ; S.L. Woo; S. Zeilinger ; C.M. Kullnig; M. Lorito and C.P. Kubicek .1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T.harzianum*P1) is triggered by different regulatory signals . Appl. and Environ . Microbiol. 65(5):1858-1863.

36-Kredics, L.; Z. Antal ; L. Manczinger; A. Szekeres ; F. Kevei; and E. Nagy. 2003. Influence environmental parameters on *Trichoderma* strain with biocontrol potential.Food Technol. Biotechnol. 41: 37- 42.

37-الخفاجي ، زهرة محمود .1987 . الفعاليات الحيوية للبكتريا . دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل . 568 صفحة .

38-Shankarappa,T.H.and A.R. Madhav Rao .1998 .Characterization and Identification of *Azotobacter* strains Isolated. from Mulberry rhizosphere soil. In : Biofertilizers and Biopesticiders. Deshmukh , A.M.. India. 1: 1-3.

39-El-Katatny, M.H. ; W. Somitsch ; K.H. Robra ; M.S. El-Katatny and G.M. Gubiz . 2000. Production of chitinase and B-1,3 glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii* . Food Tecnol. Biotecnol . 38:173-180.

40-Agrawall, N. and H. P. Singh . 2002. Antibiotic resistance and inhibitory effect of *Azotobacter* on soil borne plant pathogens. Indian Journal of Microbiology 42: 245-246.