دراسة تأثير بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* على نمو مجموعة من الفطريات

محمد ابراهيم الطائي[١] ، زكريا سامي المولى[٢]

[١] *كلية علوم البيئة وتقاناتها ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق*

[٢] *قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق*

(تاريخ الاستلام: ٣ / ٣ /٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ١٥ / ١٢ / ٢٠٠٨)

الملخص

تم في هذا البحث دراسة تأثير بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* على نمو (٨) انواع من الفطريات بطريقة التضاد الحياتي . اظهرت البكتريا تأثيرا تثبيطيا بنسبة ١٠٠ % لـ(٦) أنواع من الفطريات المدروسة وهي *Alternaria alternata , Penicillium sp. , Fusarium sp. Helminthosporium sp. , Nigrospora sp.* و *Cladosporium sp.* وبنسبة تثبيط ٨٤,٩ % بالنسبة لنمو فطر *Aspergillus fumigatus* في حين ابدى الفطر *Stemphylium sp.* مقاومة لتاثير البكتريا حيث بلغت نسبة التثبيط ٢٢,٧ % فقط . ان التأثير التثبيطي لبكتريا *R . leguminosarum bv. Viciae* قد يعود الى قدرتها على مقاومة العديد من المضادات الحيوية لاحتوائها على انزيمات البيتا لاكتاميز وايضا افرازها لمواد سامة لها تاثير تثبيطي على نمو الاحياء المجهرية .

المقدمة

ان الاحياء المجهرية التي تنمو في منطقة الرايزوسفير Rhizosphere ممكن ان يكون لها دور كبير في عمليات التضاد الحياتي حيث توفر منطقة الرايزوسفير خط الدفاع الاولي للجذور ضد تاثيرات الاحياء المجهرية الممرضة (١) .

من بين الاحياء المجهرية التي تعيش في منطقة الرايزوسفير والتي تعد من الاحياء المهمة جدا في حياة النبات هي بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* حيث تقوم هذه البكتريا بعملية تثبيت النتروجين الجوي في التربة وتعد هذه العملية اساسا في توفير النتروجين في التربة وللنبات (٢) .

ان منطقة الرايزوسفير عبارة عن منطقة غنية جدا بالمواد العضوية وتكون مفعمة بالنشاط البكتيري نظرا لوجود الجذور النباتية التي بدورها تقوم بعمليات الامتصاص والخزن في بعض النباتات حيث توفر بيئة ملائمة لنمو وتواجد العديد من الاحياء المجهرية النافعة والممرضة ، ان هذا التواجد يخلق نوعا من التنافس بين هذه الكائنات على المواد الغذائية والتي تحاول بما تمتلك من مواد ايضية وانزيمات ان تثبط أوتقضي على نمو الاحياء الاخرى باليات معينة حسب امكانيات كل كائن مجهري (٣).

تشير العديد من البحوث الى ان بكتريا*R. leguminosarum bv.viciae* لها القدرة على مقاومة العديد من المضادات الحيوية التي هي عبارة عن مواد تنتج من قبل الاحياء المجهرية وهذا يدل على امتلاكها آليات معينة لمقاومة او تحليل هذه المركبات وهذا يمكنها من النمو وعدم التاثر بالمواد المفرزة من قبل هذه الاحياء في منطقة الرايزوسفير وهذا يمثل الوسيلة الاولى من وسائل التنافس (٤).

يهدف البحث الى دراسة تأثير بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* على نمو عدة انواع من الفطريات (والتي تمثل الوسيلة الثانية من وسائل التنافس) والتي قد تتواجد في منطقة الرايزوسفير وخاصة عند جذور النباتات البقولية والتي قد تؤثر سلبا على نمو النبات ونشاطه حيث ان العديد من الفطريات تكون ممرضة للنبات .

المواد وطرق العمل

عزلة *Rhizobium leguminosarum bv.viciae*

تم عزل بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* من جذور نبات الباقلاء باستخدام وسط اكار سكر المانتول ومستخلص الخميرة Manitol Yeast Extract Agar (MYA) حيث تم اختيار عدة عقد جذرية من نبات الباقلاء وتم تعقيمها سطحيا باستخدام الكحول الاثيلي ، بعدها غسلت العقد الجذرية بماء مقطر ومعقم لازالة تأثير الكحول ومن ثم سحقت بواسطة ابرة معقمة نقلت بعدها باستخدام لوب معقم الى وسط (MYA) وزرعت بواسطة التخطيط ، حظنت الاطباق عند درجة حرارة ٢٥ □م لمدة ٣-٥ أيام (٤)

العزلات الفطرية

استخدمت العزلات الفطرية التالية في البحث

Alternaria alternate , Aspergillus fumigatus , penicillium sp., Fusarium sp. , Stemphylium sp. Helminthosporium sp. Nigrospora sp. و *Cladosporium sp.*

تم عزل فطر *A. alternata* من اوراق الباقلاء المصابة حيث اخذت الورقة المصابة وبعد تعقيمها سطحيا بالكحول زرعت على وسط اكار مستخلص البطاطا والسكروز Potato sucrose agar extract (PSA) في اطباق بتري قطر ٨ سم وبعد ٥ ايام من التحضين نقيت العزلة وشخصت بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية التالية (٥ ، ٦) .

تم عزل كل من الفطريات *Fusarium sp.* و *Helminthosporium sp* . و *Nigrospora* من التربة بطريقة التخافيف حيث اخذ وزن معين من التربة (١٠)غم واضيف الى ٩٠ مل ماء مقطر ومعقم مع الرج ثم اخذ ١ مل من التخفيف واضيف الى ٩ مل ماء مقطر ومعقم مع الرج بعدها تم زراعة ١ مل من هذا التخفيف في طبق بتري ثم صب في طبق بتري بعدها سكب وسط (PSA) فوق التخفيف مع التحريك على شكل رقم 8 وبمعدل(٣) مكررات حضنت الاطباق عند درجة حرارة ٢٨ □م لمدة ٥-٧ ايام ثم اختيرت الاجناس الاكثر شيوعا في الاطباق (٧).اما بقية العزلات الفطرية فتم الحصول عليها من مختتبرالفطريات في قسم علوم الحياة كلية العلوم جامعة الموصل .

تاثير بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* على نمو الفطريات :

تم عمل معلق بكتيري لبكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* وذلك بتحضير المرق المغذي Nutrient broth في قنينة زجاجية وبعد تعقيمها لقحت ببكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* وحضنت عند درجة حرارة ٢٧ م لمدة ٢٤ ساعة حيث ظهر النمو بشكل عكورة داخل القنينة بعدها تم تلقيح اطباق بتري حاوية على وسط PSA تركت لمدة ١٥ دقيقة لغرض تشرب البكتريا داخل الوسط (٨) ، وتم اختبار الاطباق الحاوية على البكتريا بالفطريات وذلك باخذ اقراص من حواف المستعمرة الفطرية النامية بواسطة ثاقبة فلين قطر ٠,٥ سم ووضعت اقراص الفطريات في وسط كل طبق وبمعدل ثلاث مكررات لكل فطر مع تلقيح اطباق اخرى بالاقراص الفطرية تحوي نفس الوسط غير ملقحة بالبكتريا لغرض المقارنة وبنفس عدد المكررات . حضنت الاطباق عند درجة حرارة ٢٥ ± ٣ □م لمدة ٥ ايام ، بعد انتهاء فترة التحضين تم قياس قطر كل مستعمرة فطرية ومقارنتها مع معاملة السيطرة وتسجيل النتائج (١) و(٨).

النتائج والمناقشة

اوضحت نتيجة الاختبار تأثير بكتريا *R. leguminosarum* على الفطريات وكما هو موضح في الجدول:

الجدول (١) يوضح اقطار المستعرات الفطرية النامية مع بكتريا *R. leguminosarum*

الفطر	معدل قطر المستعمرة الفطرية النامية مع البكتريا سم	معدل قطر المستعمرة الفطرية النامية بدون بكتريا سم (معاملة السيطرة)
Aspergillus fumigatus	1.1	7.6
Fusarium sp.	0	7.6
Alternaria alternate	0	5.8
Cladosporium sp.	0	6.6
Stemphyilum sp.	1.7	2.2
Helimenthosporium sp.	٠	٥,٦
Nigrospora sp.	٠	٦,٣

Penicillium sp.	٠,٢	٧,٣

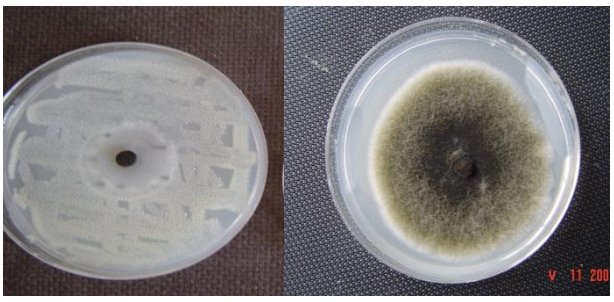
ان هذه النتائج تشير الى ان بكتريا *R. leguminosarum* عملت على تثبيط نمو معظم الفطريات قيد الدراسة وبشكل كبيرة مقارنة بمعاملة السيطرة. حيث عملت البكتريا على تثبيط نمو فطر *Aspergillus fumigatus* وبنسبة 100% مقارنة بمعدل نمو معاملة السيطرة كما هو موضح بالشكل (1)

معاملة السيطرة **نمو الفطر مع البكتريا**

الشكل (1) توضح تاثير بكتريا *R. leguminosarum* على نمو فطر *Aspergillus fumigatus*

حيث توضح الشكل تأثير بكتريا *R. leguminosarum* الواضح على نمو فطر *A. fumigatus* اذ بلغ معدل قطر مستعمرة الفطر في معاملة السيطرة ٧,٣ سم بينما كان معدل نمو قطر مستعمرة الفطر تحت تاثير البكتريا ١,١ سم حيث بلغت نسبة التثبيط ٨٤,٩ %.

اما بالنسبة لفطر *A. alternata* فان معدل قطر مستعمرة الفطر النامية في معاملة السيطرة كانت ٥,٨ سم في حين بلغ معدل نمو الفطر تحت تاثير البكتريا ٠ سم بنسبة تثبيط ١٠٠ % وكما هو موضح في الشكل (٢).



معاملة السيطرة **نمو الفطر مع البكتريا**

الشكل (٢) توضح تأثير بكتريا *R. leguminosarum* على نمو الفطر *A. alternata*

كذلك اظهر الفطر *Cladosporium sp.* حساسية كبيرة تجاه بكتريا *R. leguminosarum* حيث بلغ معدل نمو الفطر في الطبق المعد للمقارنة ٦,٦ سم في حين بلغ معدل النمو تحت تاثير البكتريا ٠ سم بنسبة تثبيط ١٠٠ % وكما موضح في الشكل (٣) .

نمو الفطر مع البكتريا

الشكل (٣) توضح تاثير بكتريا *R. leguminosarum* على نمو فطر *Cladosporium sp.*

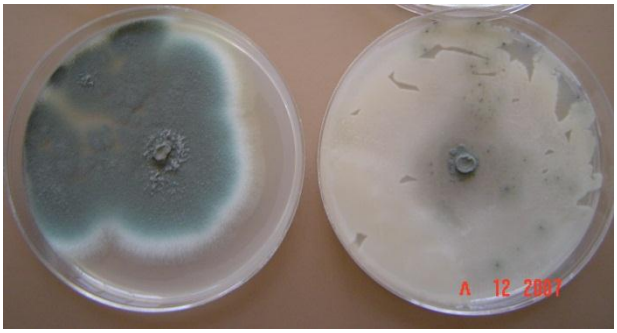
تميز الفطر *Stemphelum sp.* بالقدرة على النمو وعدم التاثر بنمو بكتريا *R. leguminosarum* نسبيا حيث بلغ معدل نمو الفطر في معاملة السيطرة ٢,٢ سم في حين بلغ معدل النمو تحث تاثير البكتريا ١,٧ سم بنسبة تثبيط ٢٢,٧ % فقط وهذا يعطي احتمال قدرة هذا الفطر على مقاومة الانزيمات المحللة التي تفرزها هذه البكتريا بالاضافة الى اليات فسلجية اخرى .وكما هو موضح في الشكل (٤).

معاملة السيطرة **نمو الفطر مع البكتريا**

الشكل (٤) توضح تاثير بكتريا *R. leguminosarum* على نمو فطر *Stemphylium sp.* مقارنة بمعاملة السيطرة.

اما بالنسبة لفطر *Penicillium sp.* فقد اظهر تاثرا كبيرا بالبكتريا اذ عملت البكتريا على تثبيط نموه بالكامل تقريبا حيث بلغ معدل نمو الفطر

في معاملة السيطرة ٧,٣ سم في حين بلغ معدل نمو الفطر مع البكتريا ٠,٢ سم بنسبة تثبيط ٩٧,٣ % وكما هو موضح في الشكل (٥).



معاملة السيطرة نمو الفطر مع البكتريا

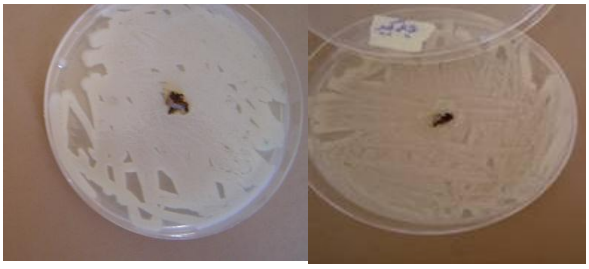
الشكل (٥) توضح تاثير بكتريا *R. leguminosarum* على نمو فطر *Penecillum sp.*

ابدى الفطر *Fusarium sp.* حساسية كبيرة تجاه البكتريا حيث عملت على اختزال نمو بالكامل حيث بلغ معدل نمو الفطر في معاملة السطرة ٧,٦ سم في حين بلغ معدل نمو الفطر مع البكتريا ٠ سم بنسبة تثبيط ١٠٠ % وكما هو موضح في الشكل (٦).

معاملة السيطرة نمو الفطر مع البكتريا

الشكل (٦) تاثير بكتريا *R. leguminosarum* على نمو الفطر *Fuzarium sp.*

كذلك عملت البكتريا على تثبيط نمو كل من الفطرين *Nigrospora sp.* و *Helimenthosporium sp.* وبنسبة ١٠٠ % وبغت معملة السيطرة لكل منهما ٥,٦ سم و ٦,٣ سم على التوالي وكما موضح بالصور (٦) .



معاملة السيطرة نمو الفطر مع البكتريا

الشكل (٧) توضح تأثير البكتريا على نمو كل من الفطرين *Helimethosporium sp.* و الفطر *Nigrospora sp.*

ان بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* هي احدى الاحياء المجهرية النامية في منطقة الـ Rhizosphere والتي تكون ذات فعالية حيوية نشطة نظرا لما تحتويه من مواد عضوية ونواتج ايضية وافرازات حيوية من قبل جذور النباتات .

ان تواجد اعداد هائلة من الاحياء المجهرية في هذه المنطقة يخلق نوعا من التنافس وآليات التضاد بين الاحياء المجهرية للحفاظ على النوع والقدرة على التغذية والاستمرار بالنمو .

تعد بكتريا الرايزوسفير من اكثر الاحياء المجهرية قدرة على المقاومة وتحمل الظروف غير الطبيعية ومن هذه الاحياء بكتريا *R.leguminosarum* حيث اشار الحسو والطائي (٤) الى ان بكتريا *R. leguminosarum* لها القدرة على مقاومة العديد من المضادات الحيوية حيث ذكرا ان هذه البكتريا استطاعت مقاومة (١١) نوع من المضادات الحيوية من اصل ١٤ نوع وهذا يدل على ان هذه البكتريا تمتلك اليات معينةتمكنها من ازالة تاثير هذه المضادات.

وهذا ما اشار اليه (٩) من ان بكتريا *R. leguminosarum* تمتلك انزيمات البيتا لاكتاميز وانها على الاكثر تستخدمها في مقاومة مضادات البيتا لاكتام وايضا تمتلك الانزيمات واسعة الطيف التي تحلل سيفالوسبورينات الجيل الثالث من المضادات المهمة علاجيا .

ان امتلاك هذه البكتريا لانزيمات البيتا لاكتاميز وباكثر من نوع يفسر سبب مقاومتها للعديد من مضادات البيتا لاكتام والتي معضمها هي عبارة عن مواد تفرزها الاحياء المجهرية وبضمنها الفطريات كآليات للدفاع عن نفسها في البيئة التي تعيش فيها(١٠) .

بالاضافة الى ماذكره (١١) من ان بكتريا *R.legminosaruim* تفرز مواد ايضية سامة لها تاثير تثبيطي على الاحياء المجهرية الممرضة للنبات . واشار (١٢) ان بكتريا *R.legminosaruim* تفرز مضادات حيوية لها القدرة على تحليل هايفات الفطريات .كما ذكر (١٣) من ان بكتريا *R.legminosaruim* لها القدرة على تثبيط نمو العديد من الفطريات عن طريق افراز مواد طيارة من ظمنها غاز ال Cyanide السام ، حيث تمتلك بكتريا *R.legminosaruim* عدة اليات تمكنها من السيطرة على الممرضات والتي تتضمن المنافسة على الحديد والمغذيات وافراز المضادات . ان سبب تثبيط نمو الفطريات يعود الى افراز المواد الايضية في الوسط الغذائي والتي قد تتضمن مضادات حيوية وانزيمات محللة للجدار الخلوي.

المصادر

(1) Sharif, Tabssam ; Khalil, Samina and Ahmad, Shahhaz (2003). Effect of *Rhizobium sp.* on Growth of pathogenic Fung under invitro condition . Pakistan Journl of Biolgy Science . 6(18): 1597-1599.

(٢) قاسم ، غياث محمد وعلي ، مضر عبد الستار (1989). علم احياء التربة المجهرية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل.

(3) Ozkoc, Ibrahi and Deliveli, Muhammet (2001). Invitro inhibition of mycelial growth of some root rut Fungi by *Rhizobium leguminosarum Biovar phaseoli* isolates Ondokuzmayis University. faculty of Arts and Science . Department of biology. 55139.kurupelit.Turky.

(٤) الحسو، محمود زكي والطائي ، محمد ابراهيم (2007). تقدير حساسية بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* لبعض مضادات البيتا لاكتام ، مجلة التربية والعلم ، كلية التربية ، جامعة الموصل.

(5) Moubasher, A.H.(1993). Soil fungi in Qatar an other Arab countries . The scientific and Applied research center . University of Qatar.

(6) Pitt , J.T. and hocking , A.D. (1997). Fungi and Food spoilage . Academic Press london , 405pp.

(7) Clark, F.E.(1979). Agar plate method for total microbial count in method in soil analysis. Ayron Pp(1460-1466), Madison, Wisconsin., U.S.A.

(8) Roland , M.A. and Alfred , E.B.(1995). Laboratory Manual of experimental microbiology . moby-year book, Inv., U.S.A.

(٩) الطائي ، محمد ابراهيم والحسو ، محمود زكي (2007). التحري عن بعض انزيمات البيتا لاكتاميز في جرثومة *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* ، مجلة التربية والعلم ، كلية التربية ، جامعة الموصل.

(10) Livermore, D.M. and Brown, D.F.(2001). Detection of β-Lactamase mediated resistance. J. Antimicrob. Chemother., 28(supp.S1): 59-64.

(11) Chakayabotry, U. and Purkayastha, R.P. (1984). Role of Rhizobitoxine in protecting Soyabean roots for Macrophomina Phaseolina infection . Gam. J. microbial., 30: 295-289.

(12) Malajezuk, N.(1983). Microbial antagonism to phytopathora Amer. Phytopha. Soc.st.Paul, Minnesota, U.S.A.

(13) Arfaoui, A.;Sifi, B.; Boudabous, A.; Elhadrami, I. and Cherif, M.(2006). Identification of *Rhizobium isolates Possessing antagonistic activity against Fusarium oxysporum F.S.P. ciceris*, the causal agent of *Fusarium* wilt of chickpea. Journal of plant pathology , 88(1), 67-75.

Effect study of *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* on some fungi group growth

Mohammad I. Altaee[1] , Zak ٢٠ S. Almolla[2]

[1] *Environ. Sci. and technology , Mosul University , Mosul , Iraq*

[2] *Bio. Dep. , College Sci. College , Mosul University , Mosul , Iraq*

(Received 3 / 3 / 2008 , Accepted 15 / 12 / 2008)

Abstract

In this research we studied the effect of *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* on (8) isolates fungi growth by using antagonistic method , the bacteria showed inhibitory effect in ratio 100 % to (6) isolates namely *Alternaria alternata , Penicillium sp. , Fusarium sp. Helminthosporium sp. , Nigrospora sp.* and *Cladosporium sp* . and inhibit the growth of *Aspergillus fumigatus* fungi in ratio 84.9 % . while the isolate *Stemphylium sp.* showed resistance to *R. leguminosarum bv. Viciae* with ratio 22.7 % . The inhibitory effect of *R. leguminosarum bv. Viciae* may be attribute to the ability of this bacteria to resist many antibiotic by releasing β-lactamase enzyme and toxic compound that inhibit fungi growth.