دراسة إمكانية توظيف بكتريا *Bacillus spp.* في السيطرة على إصابة بذور بعض المحاصيل ألاقتصاديه بالفطر *Aspergillus spp.* والتلوث بسمومها في المخزن

* دعاء فايق علي
سموم فطرية
كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

سامي عبد الرضا الجميلي
سموم فطرية
كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء

*بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

الخلاصه

تضمنت الدراسة امكانية انتاج مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *Bacillus subtilis* بهدف استعماله وتداوله تجاريا بشكل اقتصادي من قبل الجهات المستفيده, بعد تحديد الوسط التخمري الاكفأ في تنمية البكتريا واستخدام مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حامله لتصنيع المستحضر الحيوي ,وعند اختبار عدد من مستخلصات البذور (حنطة,شعير,ذرة صفراء)كاوساط تخمريه لتنمية لقاح البكتريا *B.subtilis* اظهر مستخلص الذرة الصفراء كفاءة عاليه مقارنة ببقية المستخلصات اذ بلغ عدد الخلايا البكتيرية $10x2.15^{8}$ وحدة تكوين مستعمرة/مل,وكانت كاربونات الكالسيوم كفوءة كمادة حامله للقاح البكتريا *B.subtilis* إذ وصل عدد الخلايا البكتيرية $10x70^{8}$ وحدة تكوين مستعمرة/غم واعطت نسبة 100مل وسط تخمري/50غم مادة حامله اعلى عدد من الخلايا البكتيريه اذ بلغت $10x88^{8}$ وحدة تكوين مستعمرة/مل,وعند اختبار كفاءة عزلات بكتريا *Bacillus subtilis* في تثبيط النمو الشعاعي لفطري *Aspergilus flavus* و*Aspergillus parasiticus* وجد إن عزلة *B.subtilis* BM_1 هي الاكفأ من بقية العزلات في تثبيط كلا الفطرين وبنسبة تثبيط 100%

وبينت التجربه الخزنيه كفاءة المستحضر الحيوي في حماية حبوب الحنطة من الاصابة بالفطرين *Aspergilus flavus* و*Aspergillus parasiticus* بالاضافه إلى منع حدوث تلوث حبوب الحنطة بالافلاتوكسين B1 للحبوب المعاملة به حيث اختزلت نسبة التلوث من 800مايكروغرام/1كغم حبوب في معاملة السيطرة الى 190و310 في معاملتي *Aspergilus flavus* $+BM_1$ و *Aspergillus parasiticus* $+BM_1$ على التوالي

Summary

These study in cluded the possibility of producing lotion vital vaccine bacteria *Bacillus subtilis* in order to use and trate it commercially economically by the fermentation, after selecting the middle Altkhmra media and the development of bacteria and the use of calcium carbonate as a holder for the manufacture of the product vital, and a number of seed extracts as used (wheat, barley, maize) Kausat Tkhmrah for the development of a vaccine bacteria *B.subtilis* maize extract showed high efficiency compared to the rest as extracts the number of bacterial cells $^{8}10x2.15$ colony formation units / ml, and calcium carbonate were efficient as the bearer of the vaccine bacteria *B.subtilis* as the number of bacterial cells $^{8}10x70$ unit configured colony / and gave 100 per ml center 50gm material bearer the highest number of bacterial cells, amounting to $^{8}10x88$ unit configured colony / ml, and when testing the efficiency of isolation of bacteria *Bacillus subtilis* in the inhibition of growth radiography for fungal *Aspergilus flavus* and *Aspergillus parasiticus* found that isolation *B.subtilis* BM_1 is the most efficint competent than the rest of the isolates in the inhibition of both fungi by inhibition of 100%

Storage experiments showed that the vital extract in protection of weate at grams was efficient for *A.flavus* and *A.parasiticus* in addition to the prevention of the grams from contamination from B_1 .where this treatment uduced the contamintation percent age for 800 mg/kg used the control treatment down to 190 and 310 mg/kg from *Aspergillus flavus*$+BM_1$ and *Aspergillus parasiticus*$+BM_1$ treatment respectively

المقدمة

تعد الفطريات من الكائنات المتلفة للعديد من المواد الغذائية والمحاصيل الزراعية خلال مدة الخزن مما يجعلها غير صالحة للاستهلاك البشري عن طريق تغيير قيمتها الغذائية وفي بعض الأحيان إنتاجها للسموم الفطرية، من أمثلة هذه السموم هي الافلاتوكسينات التي تمثل منتجات ايضية ثانوية للفطر *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* والتي لقيت اهتماما كبيراً في إنحاء مختلفة من العالم منذ اكتشافها في بداية الستينات من القرن الماضي ولغاية الوقت الحاضر بسبب تأثيراتها السامة والمسرطنة للإنسان والحيوان(1). يعد جنس البكتريا *Bacillus* من الأجناس المرشحة إلى إن تكون من بين

الإحياء ألمجهريه التي تتبوأ مركز الصدارة من حيث الاهتمام في مجال المقاومة الحيوية لامتلاك الكثير من الأنواع التابعة له لمواصفات العامل الحيوي الأكفأ بسبب امتلاكها لآليات متميزة جعلت منها عنصر متفوقا في مجال المقاومة الحيوية وتصنيع الاسمده والمبيدات الحيوية وهذا ما تؤشره الكثير من الدراسات العالمية التي أشارت إلى نجاحه في السيطرة على مجموعه من الإمراض المهمة والتي تصيب محاصيل استراتيجيه ومثال على ذلك استخدام سلالة البكتريا GB01 *Bacillus subtilis* بشكل مسحوق تجاري في الولايات المتحدة باسم تجاري Kodiak لمقاومة مرض سقوط البادرات في الحنطة والقطن(2)
ولغرض تحقيق هذا الهدف تم تنفيذ الخطوات التالية:

1. عزل الفطريات المرافقة للحبوب.
2. عزل بعض أنواع البكتريا التابعة لجنس *Bacillus* من الترب المحلية وتشخيصها.
3. اختيار ألعزله البكتيرية الأكثر فعاليه ضد الفطريات المدروسة.
4. تصنيع مستحضر حيوي من ألعزله البكتيرية الأكثر فعاليه في تثبيط أنواع الفطر *Aspergillus* .
5. اجراء تقييم مختبري واخر تحت ظروف الخزن الطبيعي لكفاءة المستحضر الحيوي المصنع على حماية حبوب بعض المحاصيل الستراتيجية من الاصابة بالفطريين*A.flavus ,A.parasiticus* والتلوث بسم الافلاتوكسين B1.

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص البكتريا *Bacillus subtillis*

تم اختيار ثلاثة مناطق في محافظتي كربلاء وبابل إذ أخذت من كل منطقه عينه من التربة وبحجم 250 غم وبأعماق مختلفة (5 سم, 10 سم) ولكل موقع من المواقع المحددة وضعت كل عينة في كيس بلاستيكي وتم ترقيمها ,ثم وضع 50غم من كل عينة في دورق زجاجي وعرضت لدرجة حرارة مقدارها 80 مْ لمدة عشر دقائق لتخلص من الخلايا الخضرية.بعدها اخذت كمية مقدارها 1غم من كل عينة من عينات التربة وعملت منه سلسله تخافيف من(10^{-1}-10^{-12}) سحب 1 مل من التخفيف الأخير ووزع على ثلاثة إطباق بتري حاوية على 20مل من الوسط ألزرعي Nutrient agar(المعقم بدرجة حرارة 121م وضغط 1 جو لمدة 20 دقيقه) ونشر بطريقة التخطيط بواسطة ناشر زجاجي ومن ثم حضنت الإطباق بالحاضنة بدرجة حرارة -+37 م ولمدة 24ساعة كررت هذه العملية لكل عينه من عينات التربة ولكل موقع (3)

دراسة الخصائص المظهرية لبكتريا *Bacillus*

تمت معاينة ودراسة الخصائص المظهريه لمستعمرات بكتريا *Bacillus* وتحديد حجم المستعمرة ولونها ودراسة قوامها بعد التأكد من إن تلك المستعمرات مشابهه لمستعمرات بكتريا *Bacillus*

دراسة الخصائص المجهرية لبكتريا *Bacillus*

تم اختيار عينه من المستعمرات المماثله لصفات بكتريا *Bacillus* وذلك بأخذ مسحه بواسطة لوب الزرع ونشره على شريحة زجاجيه معقمه وتثبيته ومن ثمة تصبيغه بصبغة كرام ومعاينة شكل الخلية البكتيرية وموقع السبور فيها,واخذ الخلايا للصبغه الزرقاءدليل على إن البكتريا المتصبغه بهذا اللون عائده إلى مجموعه البكتريا ألموجبه لصبغة كرام,اما الخلايا البكتريا التي تأخذ الصبغة الحمراءفهي سالبه لصبغة كرام, (3و4)

تشخيص عزلة بكتريا *Bacillus*

بعد غربلة العزلات البكتيريه العائده لجنس *Bacillus* واختيار العزلة الأكفأ من بينها تم تشخيص العزله على وفق الفحوصات التي وردت في كل من (3و5)
مراحل تصنيع المستحضر الحيوي من لقاح بكتريا *B . subtillus*
تحديد الوسط ألتخمري المناسب لتنمية عزلة البكتريا BM_1 *B. subtillus*
تم اختبار كفاءة ثلاث أنواع من مستخلصات حبوب الحنطة و الشعير و الذرة الصفراء لاستخدامها كأوساط تخمريه لتنمية لقاح البكتريا *B.subtillus*

1. أخذ 200 غم حبوب كل من الذرة الصفراء والشعير والحنطه ورطبت بالماء المعقم ثم جرشت في إناء معدني وأضيف أليها لتر من الماء المقطر وتركت24ساعه بدرجة حرارة الغرفه
2. رشح المزيج واخذ الراشح وأضيف اليه (20) غم سكر السكروز وبعدها عقم المزيج بالموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 ° وضغط (1) جو ولمدة 20دقيقة وتركت الاوساط لتبرد .

لقح كل دورق بخمس مستعمرات من البكتريا *B.Subtillus* المنماة على وسط المرق المغذي وبعمر 24 ساعة لكل من هذه الأوساط التخمرية وكلا على حده بعدها حضنت الأوساط التخمرية لمدة 48ساعة وبدرجة حرارة 37م ° . بعدها عملت سلسلة من التخافيف (10^{-1} – 10^{-7}) لكل وسط من هذه الأوساط وأخذ 0.1 مل من التخفيف الأخير لكل وسط تخمري وزرع على وسط Nutrient agar وبواقع ثلاث مكررات لكل وسط ومن ثم حضنها بدرجة حرارة 37مْ لمدة24ساعة . وحسبت معدل أعداد البكتريا في كل طبق ثم استخرج التركيز النهائي للبكتريا في المليلتر الواحد حسب معادلة(6).
عدد خلايا البكتريا (مل) = معدل عدد المستعمرات في كل طبق ×مقلوب التخفيف
تم اختيار الوسط الأكثر كفاءة في زيادة معدل اعداد البكتريا كوسط تخمري لإنتاج المستحضر الحيوي وكان وسط مستخلص الذرة الصفراء.

اختبار كفاءة مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة

تم اختبار كفاءة مادة كاربونات الكالسيوم بوصفها مادة حاملة للقاح البكتريا *B.subtillus* وذلك بوضع 100غم من مادة كاربونات الكالسيوم في اناء نظيف ومعقم ووضع في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 160مْ ولمدة ساعة وتركت لتبرد . ثم أضيف اليها (100) مل من الوسط التخمري السائل لمحصول الذرة الصفراء المحضر مسبقا والمنمى عليه البكتريا *B.s btillus* بعمر48ساعة والذي اثبت كفاءة عالية في تنمية لقاح تلك البكتريا بعدها نقلت الأواني الى مجفف كهربائي بدرجة حرارة40مْ لمدة 5 أيام لحين جفافها جيدا بعدها تم طحن المسحوق المحملة عليه البكتريا في غرفة معقمة (Hood), بعد ذلك حضرت سلسلة تخافيف من العينه المحضرة(10^{-2}-10^{-8})ثم نقل(0.1) مل من التخفيف الأخير للعالق البكتيري الى أطباق معقمة حاوية على وسط Nutrient agar وبواقع ثلاث مكررات وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24ساعة حسب طريقة (7) . بعدها تم تقدير أعداد البكتريا في الغرام الواحد من المادة الحاملة حسب معادلة (6)

تحديد نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة

بعد إن أثبتت مادة كاربونات الكالسيوم كفاءتها كمادة حاملة للقاح البكتريا *B.subtillus* اجري اختبار لتحديد نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة وذلك بأخذ5مل من وسط الذره الصفراء المنماة فيه البكتريا بعمر 24 ساعه واخذ 5مل منه ومزجها مع 5 غم من مادة كاربونات الكالسيوم أي بنسبة 1:1 كمااخذ 5مل من البكتريا ومزجه مع10 غم من كاربونات الكالسيوم أي بنسبة (1_2) واخذ 10مل من البكتريا ومزجها مع 5غم من كاربونات الكالسيوم وبذلك تكون النسبة (1:2), مزجت هذه المعاملات كلا على حده ووضعت بالفرن بدرجة 30 م لحين الجفاف و بعد جفافها اخذ 1غم من كل معامله وعملت منه سلسله من التخافيف (10^{-1}-10^{-12}) واخذ0.1 مل من التخفيف الاخير ونشر على وسط المرق المغذي و المحضر مسبقا وعملت ثلاث مكررات من كل تخفيف وتم حساب عدد المستعمرات الناميه بعدها حسب التركيز باستخدام معادلة (6)

تقيم كفاءة المستحضر الحيوي

للتعرف على كفاءة المستحضر الحيوي في حماية حبوب بعض المحاصيل الستراتيجية نفذت الاختبارات التالية

أ. تقدير أعداد البكتريا *B. subtillus* في الغرام الواحد من المستحضر الحيوي بعد الانتاج مباشرة

تم اخذ (1) غم من المستحضر الحيوي الجاف ووضع في 9 مل ماء مقطر في انابيب اختبار سعة 20 مل وعملت سلسلة من التخافيف العشرية للمستحضر الحيوي10^{-1}-10^{-8} تحت ظروف التعقيم التام مع استعمال ماصة نظيفة معقمة لكل تخفيف على انفراد , نقل 0.1 مل من كل من التخافيف 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} الى أطباق بلاستيكيه معقمة قطرها 9سم حاوية على وسط ألمرق المغذي بثلاث أطباق لكل تخفيف ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة(7و8) .

اختيرت الأطباق الحاوية على مستعمرات تتراوح بين 30و300 مستعمرة بكتيرية ومن ثم طبقت معادلة (6)لحساب أعداد البكتريا .

ب.اختبار فعالية المستحضر في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *A.flavus* و *A.paraciticus*

حضر الوسط الزرعي (PDA) ، ووزع في دورقين سعة 500 مل وبمعدل 250 مل لكل دورق ، عقمت الدوارق في جهازالمؤصدة (Autoclave) بدرجة حراره 121 م وضغط 1 جوولمدة 15 دقيقه ثم تركت قليلا لتبرد ، وبعدها اضيف الى الدورق الاول كمية0.1 غم من المستحضرالحيوي لبكتريا *B. subtilis* ، والدورق الثاني ترك دون اضافه للمقارنه، ثم صبت محتويات كل دوارق في 6 اطباق بتري . وحضنت الاطباق الحاوية على البكتريا بدرجة حرارة 30 ± 2 مْ ولمدة 24 ساعة (9) لقح ثلاثة اطبق بالفطر *A.flavus* المنتج للافلاتوكسين B1 منها حاوية على البكتريا *B.subtilis* والثلاثة الأخرى غير حاوية على البكتريا للمقارنة وكررت العملية نفسهامع/ *A.parasiticus* ، وذلك بوضع قرص واحد قطره 5 ملم ماخوذ من طرف مستعمرة نامية بعمر أسبوع واحد في منتصف كل طبق (حيث تم الحصول على عزلات الفطرين من الاغذية الجافه والحبوب في الاسواق المحلية في محافظة كربلاء) ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة (25 ±2) مْ ولمدة 7 ايام . بعدها تم حساب مقدار التثبيط للنمو الشعاعي لكل عزلة من العزلات المدروسه؛ وذلك باخذ معدل قطرين متعامدين وبتطبيق معادلة Abbott الواردة في كتاب المبيدات (10) .حسبت نسبة التثبيط

$$\text{Inhibition percentage \%} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = اقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر النامي على أطباق لا تحوي على البكتريا (معاملة السيطرة) .

R2 = اقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر النامي على الأطباق الحاوية على البكتريا.

.تقيم كفأة المستحضر الحيوي المصنع في حماية حبوب الحنطه من الاصابه بالفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus*

نفذت هذه التجربة وفقا للخطوات التالية_

تحضير لقاح الفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus* المنتجة للافلاتوكسين B1
تم تنمية الفطريين على وسط BDA المعقم والمضاف اليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول بمعدل 250 ملغم/لتر بعدها تم تحضير لقاح الفطرين كلا على حده وذلك بأضافة 20 مل من الماء المقطر المعقم ومن ثم حصاد الابواغ بواسطة قضيب زجاجي معقم بعدها تم حساب اعداد الابواغ بواسطة Haemocytometer

تهيئة حبوب الحنطه
تم جلب عينات الحبوب من الاسواق المحليه وبواقع 2 كغم بعدها تم اجراء اختبار اولي عن مدى تلوث تلك الحبوب نفذت المعاملات الاتيه

جدول(1) تنفيذ المعاملات

ت	رمز المعامله	توصيف المعامله
1	A.F فقط	حبوب ملوثه بلقاح الفطر(*A.flavus*) دون إضافة المستحضر الحيوي
2	A.P فقط	حبوب ملوثه بلقاح الفطر(*A.paraciticus*) دون إضافة المستحضر الحيوي
3	BM_1+AF	حبوب ملوثه بلقاح الفطر(*A.flavus*) معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز
4	BM_{1+}AP	حبوب ملوثه بلقاح الفطر(*A.paraciticus*) معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز 1 غم/كغم
5	KB_1+AF	حبوب ملوثه بلقاح الفطر(*A.flavus*) معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز1غم/كغم
6	+AP KB_1	حبوب ملوثه بلقاح الفطر(*A.paraciticus*) معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز1غم/كغم
7	BM_1	حبوب معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز2غم/ كغم حبوب
8	KB_1	حبوب معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز2غم/كغم حبوب
9	Control	حبوب بدون تلويث بلقاح الفطروغير معامله بالمستحضر الحيوي

BM_1=عزلة بكتريا معزوله KB_1عزلة بكتريا قياسية

نفذت المعاملات أعلاه وذلك بوضع 100 غم من حبوب الحنطه في كيس نايلون نضيف واضيف اليه 10 مل من لقاح الفطر *A.flavus* مع رج الكيس لتوزيع لقاح الفطر بعدها مباشرة اضيف 0.4 غم من المستحضر الحيوي ورج الكيس جيدا لتوزيع المستحضرعلى اسطح الحبوب ,كررت العمليه ثلاث مرات(ثلاث مكررات) لكل معامله ونفذت نفس الخطوات السابقه في حال استخدام لقاح الفطر*A.parasiticus* في تلويث حبوب الحنطه بدلا من لقلح الفطر *A.flavus* ..بعدها وضعت حبوب كل معامله ب(3) اكياس من البولي فينايل كلورايد وبواقع 100 غم /كيس اعقب ذلك خزن الاكياس تحت ضروف المختبر ولمدة ثلاثة اشهر .وبعد مرور شهر واحد من الخزن حسبت المؤشرات التالية:

1- تقدير اعداد البكتريا في الغرام الواحد من الحبوب:
تم اخذ عينات من الحبوب المخزونه عشوائيا من كل مكرر من مكررات كل معامله عوملت بالمستحضر الحيوي وكلا على حده ثم وضع هذا الوزن (1 غم) من الحبوب في انبوبة اختبار زجاجيه معقمه بحجم 20 مل حاويه على 9 مل ماء مقطر معقم رجت محتويات كل انبوبه جيدا واخذ منها 1مل وأضيف إلى أنبوبة اختبار أخرى حاويه على الكميه نفسها من الماء المقطر المعقم وهكذا تم عمل سلسلة تخفيفات عشريه حتى 10^{-12} تحت ضروف التعقيم التام مع استعمال ماصه نضيفه معقمه لكل تخفيف على انفراد.نقل 1مل من كل تخفيف من التخافيف من التخافيف(10^{-6} , 10^{-8}, 10^{-10} , 10^{-12})الى اطباق بتري معقمه قطرها 9ملم حاويه على الوسط الزرعي (NA) وبثلاثة اطباق لكل تخفيف حظنت الاطباق بدرجة حراره 35م0 لمدة 24 ساعه (7) وبعد فترة التحضين حسبت اعداد المستعمرات في كل طبق وطبقت معادلة (6) لحساب اعداد البكتريا المتواجده على اسطح البذور
عدد خلايا البكتريا/غم = معدل عدد المستعمرات x مقلوب التخفيف

2- حساب نسبة الاصابه بالفطرين *A.flavus* و*A.paraciticus* في الحبوب
أخذت 10غم من حبوب كل مكرر ولكل معامله بصوره عشوائيه وتم تعقيمها بمحلول هايبوكلورايدالصوديوم بتركيز 2% لمدة 2 دقيقه بعدها غسلت بماء مقطر معقم وزرعت على وسط P.D.A وبواقع 5 حبوب لكل طبق وبثلاثة مكررات لكل معامله ,حضنت الاطباق بحرارة 25+-2م0 لمدة اسبوع ,بعدها تم حساب نسب الحبوب المصابه بحسب طريقة (11)وكررت هذه العملية شهريا ولحين انتهاء مدة الخزن البالغه (3) اشهر

3- حساب نسبة الانبات في الحبوب:
تم اخذ 10غم من حبوب كل مكرر ولكل معامله بصوره عشوائيه بعد مرور شهر من خزنها ونقلت الى اطباق معقمه حاويه على اوراق ترشيح مرطبه بماء مقطر معقم وبمعدل 5 حبوب/طبق وبثلاثة مكررات لكل معامله,حظنت الاطباق بحرارة 25-+2 م0 لمدة 10 ايام ,بعدها تم حساب عدد البذور الناميه وفقا للمعادله الاتيه:

$$\text{النسبه المئويه للأنبات} = \frac{\text{عدد البذور النابته}}{\text{العدد الكلي للبذور المزروعه}} \times 100$$

كررت هذه العمليه شهريا ولحين انتهاء مدة الخزن البالغه (3) اشهر

الكشف عن سم الافلاتوكسين

اتبعت طريقة (12) في الكشف وتقدير كمية السم B1 في الحبوب المعامله

النتائج والمناقشه

عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus* من عينات التربة

اعتمد في تشخيص العزلات على:

أ.الصفات المظهرية للعزلات على الوسط الزرعي

ظهرت مستعمرات عزلات البكتريا على وسط المرق المغذي الصلب بشكل مستعمرات دائرية بيضاء اللون معتمه مائله الى البني الضئيل بتقدم عمر المستعمره بعضها دائري منتظم الحواف وقسم غير منتظم وذات بروزات شبه شعاعيه ممتده منتشره بشكل واضح,ذات قوام جاف وسطح املس في بداية نموها ومن ثم تتجعد وهذه الصفات تتطابق مع ما اشار اليه (6 و13)

ب.الصفات المجهريه لخلايا العزلات البكتيرية

بينت نتائج الفحص المجهري لمستعمرات العزلات البكتيرية المثبته على شرائح زجاجيه والمصبغه بصبغة كرام,انها خلايا عصويه قصيره الى متوسطة الطول بعضها سميك منتفخ والأخر عصيات نحيفه نسبيا ذات نهايات متساويه موجبه لصبغة كرام مكونه للسبورات بعضها يكون انتفاخ حول موقع السبور يدعى الحافظه (Sporangia) والقسم الاخر لايكون محفظه وكانت بعض مواقع السبور مركزي (Central) ولاخر شبه طرفي (Sub terminal) تتطابق هذه الصفات مع ما اشار اليه كل من (6 و 13)من صفات مجهريه لاشكال خلايا بكتريا *Bacillus* وطبيعة انتظامها

اختبار الفعاليه التضاديه لعزلات البكتريا اتجاه الفطرين *A.flavus* و *A.paraciticus*

أظهرت نتائج اختبار الفعاليه التضاديه قدرة عزلات البكتريا *Bacillus* M1 و*Bacillus* K2 فعاليه عاليه في تثبيط نمو الفطرين في حين لم تضهر العزلتين *Bacillus* M2 و *Bacillus* K2 أي قدره تضاديه اتجاه الفطرين *A.flavus* و *A.paraciticus*

على ضوء نتائج اختبار القدرة التضاديه تم اختيار عزله واحده والتي ابدت فعاليه اكبر من بقية العزلات اتجاه الفطرين قيد الدراسه وهي BM_1 وتم تشخيصها وفق الاتي:

أ.الصفات المضهريه لمستعمرات عزلة البكتريا *B.subtilis* BM1

من خلال الفحوصات المختبريه لنمو البكتريا على وسط الاكار المغذي N.B ظهرت مستعمراتها بشكل دائري وكبيرة نسبيا,ملساء ذات حافة مستديره سرعان ما تتحول الى حافه مفصصه بتقدم النمو ولونها ابيض الى تبني باهت وتميل الى اللون التبني الادكن بتقادم النمو ويتراوح قطر المستعمرة بين 1.5ملم_3.5ملم وهذا يتطابق مع ما جاء به (13)

ب.الوصف المجهري لخلايا عزلت البكتريا *B.subtilis* BM1

اظهرت نتائج الفحص المجهري للشرائح المثبته والمصبوغه بصبغة كرام لمستعمرات بكتريا *Bacillus* انها بكتريا عصويه قصيرة نسبيا موجبة لصبغة كرام ومكونه للسبورات وتتكون هذه السبورات بشكل واضح بعد مدة تحضين 24ساعه وتكون في وسط الخلايا الخضريه للبكتريا وعند استمرار النمو لفترة 48 ساعه تتحلل معظم الخلايا البكتيرية وتتحرر السبورات وهذه الصفات تتفق مع ما جاء به(6 و13)

ج.الاختبارات الكيموحيويه لعزلة البكتريا *B.subtilis* BM1

بينت نتائج الاختبارات الكيموحيويه لعزلة البكتريا BM1 انها تنطبق على نوع بكتريا *Bacillus subtilis* كما في جدول (3) والتي ذكرها كل من (6 و13)

جدول(3) الاختبارات الكيموحيويه لبكتريا *Bacillus* BM1

	الاختبارات	النتيجة
1	Catalase	+
2	Oxidase	+
3	Hemolysis	Beta hemolysis
4	Lecithinase	—
5	Spore location	Central
6	Spore shape	Ellipsoidal
7	Arabinose	+
8	Xylose	+
9	Sucrose	—
10	Fructose	+
11	Mannitol	+
12	Raffinose	—
13	Glucose	+
14	Galactose	+
15	Motility	+
16	Citrate utilization	+
17	% 3 NaCl	+
18	% 5 NaCl	+
19	% 7 NaCl	+
20	% 10 NaCl	—
21	Starch hydrolysis	+
22	Urease	—
23	MR	+
24	Indol	—

(+) يدل على النتيجة الموجبة
(-) يدل على النتيجة السالبة

تقيم كفاءة مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حامله للقاح البكتريا *Bacillus subtillus*

اوضحت نتائج الاختبار عدم وجود اثار سلبيه لمادة كاربونات الكالسيوم على نمو البكتريا *B.subtillus* وتجلى ذلك من خلال وجود اعداد كبيرة من خلايا البكترية الحية في الغرام الواحد من هذه الماده اذا بلغت $10x3.1^{8}$ وحدة تكوين مستعمرة/غرام وهذه النتيجه تتفق مع ما(8)من ملائمة هذه المادة لحمل خلايا بكتريا *Bacillus cereus*. وتلعب مادة كاربونات الكالسيوم دورا مهما في زيادة فعالية المستحضرات الحيويه الداخله في تصنيعها من خلال قدرتها على تثبيط نمو الفطريات الممرضه بتأثير غير مباشر مثل تغير طبيعة الوسط الغذائي وتغير الاس الهيدروجيني اذ انها تغير الوسط الزرعي نحو القاعديه عند تحللها مائيا بأعطائها ايونات الهيدروكسيل السالبة (14), وبما ان الفطريات عموما تفضل في نموها الوسط المتعادل او قليل الحامضيه (15) فالتغير في قيمه PH للوسط يؤثر في جاهزية العناصر الغذائيه التي تحتاجها الفطريات ومن ثم تثبيط معدلات نموها (16),فضلا عن كونها مادة متوفرة محليا ورخيصة الثمن الامر الذي يقلل من كلفة الانتاج الواسع.

تحديد نسبة الوسط التخمري الى المادة الحامله $CaCO_3$

بين هذا الاختبار ان افضل نسبة اضافة الوسط التخمري الماده الحامله(Caco3)هي 1:2 اذ بلغت اعداد البكتريا في الغرام الواحد $10x88^{8}$ وحدة تكوين مستعمرة/غم في حين تراجعت الاعداد عند النسبة 1:1 وسط تخمري:ماده حامله الى $10x67^{8}$ وحدة تكوين مستعمرة/غم وكذلك الحال عند النسبه 2:1وسط تخمري: ماده حامله

جدول (4) تحديد نسبة الوسط التخمري الى المادة الحامله $CaCO_3$

ت	نسبة وسط التخمر الى الماده الحامله (مل/غم)	معدل اعداد البكتريا
1	1:1	$10x67^{8}$
2	1:2	$10x88^{8}$
3	2:1	$10x45^{8}$

وتعتمد هذه النتائج بعض الدراسات التي اشارت الى مثل هذه النتائج فالباحث(8) ان نسبة 1:2 وسط تخمري:مادة حامله ذات فعالية في زيادة اعداد البكتريا في الغرام مقارنة بالنسب الاخرى كما تماثل ما توصلت اليها(17) والتي اشارت الى ان النسب 1:1و1:2 وسط تخمري:ماده حامله اعطت اعداد فعاله من البكتريا *B.licheniformis* في الغرام الواحد من المادة الحامله ولم يكن بين هاتين النسبتين فارق معنوي في اعداد البكتريا الموجوده في الغرام الواحد.

تقدير اعداد البكتريا في الغرام الواحد من المستحضر الحيوي

اظهرت النتائج ان اعداد خلايا البكتريا في الغرام الواحد بلغت $10X70^{8}$ وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد الانتاج مباشرة في حين انخفضت قليلا بعد مرور ثلاثة اشهر من الانتاج اذ وصلت الى $10X56^{8}$ وحدة تكوين مستعمرة/غم وهذا الانخفاض يعزى الى تأثرها بدرجات الحرارة وانخفاض الرطوبه مما يؤدي الى فقدان عدد من الخلايا الخضريه لحيويتها لان مقاومة الخلايا الخضرية لظروف درجات الحرارة المتطرفه اقل بكثير من مقاومه السبورات الداخليه (6)ونتائج هذه الدراسة تماثل ما توصلت اليها العديد من الدراسات السابقه (7 و8 و13)

تقيم فعالية المستحضر الحيوي المصنع من لقاح البكتريا *Bacillus subtilis* BM1 في حماية بذور الحنطه من الاصابه بالفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* والتلوث بسم الافلاتوكسين B1

نسبة الإصابة في حبوب الحنطة

بينت النتائج لهذه الدراسة امتلاك الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* ضراوة عاليه تمثلت بأحداث نسب عالية من الاصابه في بذور الحنطه اذ وصلت الى 100% على التوالي في حين كانت في معاملة السيطرة (بذور غير ملوثه بالقاح الفطري)20% بعد مرور شهر من الخزن و حدث زيادة في نسب الاصابه بعد مرور ثلاثة اشهر من الخزن وبفارق معنوي بسيط (جدول5)

حيث اشارت الكثير من الدراسات الى قدرة انواع الفطر *Aspergillus* على إصابة الحبوب ومنها الحنطه فقد اشار(18) الى ان بذور الحنطه والشعير والذرة الصفراء المخزونه في شمال ووسط وجنوب العراق مصابه بأنواع الفطرين *Aspergillus* و *penicillium*, كما وجد(19)انواع تابعة لشبه جنس الفطر *Aspergillus* مرافقة لحبوب الحنطة والشعير والذره الصفراء في سايلوات محافظة القادسيه وان نسبة الاصابة تراوحت بين مرافقة لحبوب الحنطة والشعير والذره الصفراء في سايلوات محافظة القادسيه وان نسبة الاصابة تراوحت بين 34-95% ,واشارت(20) الى اصابة بذور الحنطة المحلية بالفطر *A.flavus* وبنسبة تردد وظهور وصلت الى 27.2 %و 71.4% على التوالي, ويعود سبب انخفاض نسب الانبات في بذور الحنطة الى اصابة الحبوب بالفطرين المشار اليهما اعلاه ويرافق الاصابة افراز الانزيمات وسموم قاتلة للاجنه وهذا يؤدي الى اختزال نسب الانبات (21) , واظهر المستحضر الحيوي فعالية عالية في حماية بذور الحنطه من الاصابة بالفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* (الملوثه اصطناعيا) وتمثل بأختزال نسب الاصابة من 100% في البذور المعاملة بالفطرين فقط الى 13% في البذور المعامله بالمستحضر الحيوي BM_1 والملوثه بالقاح الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* بعد مرور شهر من الخزن على التوالي . كما ان المستحضر الحيوي وفر حماية تامة لبذور الحنطه المعامله به من الاصابة الطبيعية بالفطرين في حين كانت نسبة الاصابة الطبيعية في بذور السيطرة (بذور غير معامله بالمستحضر ولم تلوث صناعيا بأنواع الفطرين) 20% (جدول5),من جانب اخر تشير النتائج الى المستحضر المصنع هو اكثر فعاليه في اختزال نسب الاصابة مقارنة بالمستحضر القياسي Bs_1 والمصنع من قبل(13) وخاصة مع الفطر *A.parasiticus* ,وأشارت النتائج ألمبينه في الجدول() الى ارتفاع معدلات الاصابه في البذور المعامله بالمستحضر الحيوي بعد مرور ثلاثة اشهر اذ بلغت في معاملتي BM_1+AF و BM_1+AP 26 % على التوالي. كما حدثت زيادة في معدلات الاصابه في معاملات السيطرة اذ بلغت20 % وفي معاملة المستحضر القياسي KB_1 اذ وصلت النسب في الحبوب المعاملة به والملوثه بالقاح الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* الى 33% على توالي.وتعود فعالية المستحضر الحيوي BM_1 في اختزال نسب الاصابة في بذور الحنطة الى امتلاك البكتريا *B.subtilis* BM_1 لآليات عديدة تمكنها من تثبيط نمو الفطريات الممرضه ومن اهم هذه الاليات انتاج المضادات الحياتيه مثل mycobacillin و Bacillomycin و Fungistatin و subsporin وهذه المضادات تثبط انبات ونمو الابواغ الفطريه مما يؤدي الى تقليل او منع حدوث الاصابات الفطرية للحبوب ومنها الحنطة ولاسيما في المخازن التي لا تتوفر فيها شروط الخزن السليم اذ ان الرطوبة النسبية ترتفع خلال فصول الخريف والشتاء والربيع عن مستوياتها في فصل الصيف وهذا يساعد البكتريا الموجوده على اسطح الحبوب بالنمو نتيجة حصولها على متطلباتها من الغذاء من نواضح الحبوب فتقوم بأنتاج المضادات الفطرية والانزيمات المحلله والتي تقوم بتحليل العديد من المركبات البوليمريه كالمركبات البروتينيه والدهون والمركبات النشويه والكايتينيه ومنها انزيم chitinase المحلل لمادة الكايتين والتي تعد المكون الاساسي لجدران خلايا معظم الفطريات الراقية ومنها الفطريات الناقصه وانزيم lecithinase الفعال في تحليل الدهون الفوسفاتيه. كذلك هذه البكتريا لها القدرة على ايقاف نشاط الفطريات الموجوده على اسطح الحبوب بفعل المضادات الفطريه التي تفرزها للبيئه ومن ابرز هذه المضادات Iturin ذو الفعالية العالية في كبح نمو ونشاط الفطر *A.parasiticus* وشل قدرته على انتاج الافلاتوكسينات (13),كما تلعب الية المنافسة على المكان والغذاء دورا مهما في كبح نشاط الفطريات الممرضه للحبوب فالبكتريا *B.subtilis* ذات قدرة عاليه على منافسة الفطريات كونها اسرع نمو من بقية الكائنات الحية الاخرى والمتواجده معها في نفس البيئة وبذلك تستحوذ على القسط الاكبر من الغذاء والمكان على اسطح الحبوب (22) من جانب اخر تعد مادة كاربونات الكالسيوم المادة الحامله للقاح البكتريا *B.subtilis* BM_1 ولهذه المادة دور ايجابي في زيادة فعالية المستحضر الحيوي في تثبيط نمو الفطريات ومنها الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* من خلال قدرتها على خفض المحتوى الرطوبي للحبوب الى المستوى الذي يمنع انبات وتطور ابواغ الفطريات حيث تعمل هذه الماده على امتصاص الرطوبة من خلال اختلاف السعات الرطوبية بينها وبين الحبوب اذ انها لا تتميأ بسهوله (23), وهناك ملاحضة جديره بالأشارة وهي ان نمو الفطرين

A.flavus و *A.parasiticus* على البذور المصابة والمعاملة بالمستحضر الحيوي عند زراعتها على وسط P.D.A كانت ضعيفة وظهرت بهيئة خيوط مفككة وضعيفة النمو فضلا عن عدم قدرتها على تكوين الابواغ.

ان زيادة معدلات الاصابة في الحبوب بعد مرور ثلاثة اشهر من الخزن يمكن ان يعزى الى فقدان المستحضر الحيوي لبعض فعاليته نتيجة اختزال اعداد البكتريا الفعاليه حيويا في الغرام الواحد من المستحضر الحيوي وما يعزز هذه النتيجة حساب اعداد البكتريا اذ بلغت بعد مرور ثلاثة اشهر $10X56^{8}$ ومع ذلك بقي الفارق كبيربين الحبوب الملوثه بالقاح الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* كلا على حده (100 و100 على التوالي) والحبوب المعامله بالمستحضر الحيوي BM_1

جدول(5) تأثير معاملة حبوب الحنطة بالمستحضر الحيوي لبكتريا BM_1 *Bacillus subtilis* في معدلات نسب اصابة الحبوب بالفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* بعد مرور شهر وثلاثة اشهر من الخزن والتلوث بسم الافلاتوكسين B1 بعد مرور ثلاثة اشهر

المعاملات	نسبة الاصابة بعد مرور شهر	نسبة الاصابة بعد مرور ثلاثة اشهر	كمية السم B1 مايكروغرام / 1كغم حبوب
Control	20	20	لم يتم الكشف عنه
BM_1	0	6	-
KB_1	0	0	-
AF	100	100	800
AP	100	100	800
BM_1+AF	13	26	190
KB_1+AF	13	33	لم يتم الكشف عنه
BM_1+AP	13	26	310
KB_1+AP	26	33	لم يتم الكشف عنه

L.S.D=12.90 L.S.D=18.02

نسبة الإنبات في حبوب الحنطه

اثر الفطران *A.flavus* و *A.parasiticus* سلبا في معدلات انبات حبوب الحنطة اذ انخفضت النسبة من 100% في معاملة السيطرة الى 6% و6 % في الحبوب الملوثه اصطناعيا بأبواغ الفطران على التوالي.

واظهر المستحضر الحيوي فعالية جيدة في حماية حبوب الحنطة من تأثيرات الفطران *A.flavus* و *A.parasiticus* من خلال رفع معدلات الانبات الى 93% و86 % على التوالي في الحبوب الملوثه بابواغ الفطران والمعاملة بالمستحضر الحيوي كلا على حده.وحدث اختزال اكبر في معدلات نسب الانبات للحبوب في البذورالمعامله بالفطران فقط بعد مرور ثلاثة اشهر من الخزن حتى بلغ صفرا لكل منهما كما حدث انخفاض نسبي في معدلات الانبات في معاملتي $AF+BM_1$ و $AP+BM_1$ اذ بلغت 73% و 70% بعدة مدة الخزن البالغة ثلاثة اشهر(جدول6).يمكن تعليل انخفاض معدلات نسب الانبات في الحبوب المعاملة بالفطران كلا على حده فقط الى اصابة هذان الفطران للحبوب وقتل اجنة تلك الحبوب بفعل السموم والانزيمات التي تفرزها في الحبوب اثناء الاصابه وهذا بدوره يؤدي الى اختزال نسب الانبات (21),ويمكن تعليل انخفاض معدلات نسب الانبات في الحبوب الملوثه بأبواغ الفطران والمعاملة بالمستحضر بعد مدة الخزن الممتده لثلاثة اشهر الى انخفاض حيوية المستحضر نسبيا نتيجة فقدان جزء من الخلايا البكتيرية المكونة للمستحضر لفعاليتها الحيوية بفعل الحرارة العاليه وظروف الجفاف كون ان الحبوب مخزونه تحت ظروف المختبر ومع هذا الانخفاض النسبي الا ان فعاليتها في حماية الحبوب ظلت بمستوى جيد (20و22) ان قدرة المستحضر الحيوي المصنع على الاحتفاظ بحيويته تعود اساسا الى قدرة البكتريا BM_1 *B.subtilis* على تكوين الابواغ الداخلية ذات المقاومة العاليه للظروف البيئية المختلفه والتي لها القدرة على استعادة نشاطها الحيوي والفسيولوجي خلال دقائق عند توفر الضروف الملائمة للنمو والتكاثر(24) واشار (25) الى قدرة المستحضرات الحيوية المصنعة من انواع جنس البكتريا *Bacillus* الاحتفاض بحيويتها لفترات زمنية طويل

جدول (6) تاثير معاملة حبوب الحنطة بالمستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* في معدلات انبات البذور

المعاملات	معدل الانبات بعد مرور شهر	معدل الانبات بعد مرور ثلاثة اشهر
Control	100	100
BM_1	100	100
KB_1	100	100
AF	6	0
AP	6	0
BM_1+AF	93	80
KB_1+AF	93	75
BM_1+AP	86	70
KB_1+AP	78	70

L.S.D=12.90 L.S.D=21.34

المصادر

(1) Prescott, L.M.; Harley, J.A. and Klein, D.A. (1996). Microbiology 3 rd edition. WM.C. Brown puplishers U.S.A. 935 PP.

(2)Safiyazov,J.S.,Mannanov,R.N.andSattarova,R.K.(1995).The use of bacterial antagonists for control of cotton disease .Field crops research 43:51-54

(3)Collee,J.G,;Fraser,A.G.;Marmion,B.P.and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology.14th ed .Churchill Livingstone, London.pp.:106-716

(4) الجبوري ,حميد مد الله ((1990) . علم البكتريا الطبية ,مطابع التعليم العالي في الموصل. 351 صفحة .

(5)Macfaddin,J..F.(2000).Biochemical tests for identification of medical bacteria .(3 rd ed)..Williams and Willikins company. USA .,pp.912.

(6) Clark. F.E. (1965). Agar-Pllats method for total microbial (C.F) Black, (1965), methods for soil analysis part 2 publishers madeson, Wisconsin, U.S.A.PP: 1572.

(7) حميد ، سميرة كاظم . (2001). تقنية ماجستير.ي إنتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة *Pseudomonas fluorscens* CHAO . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .

(8) ألعاشور , علي جابر جاسم .(2005) . إمكانية إنتاج مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *Bacillus cereus* للسيطرة على بعض الفطريات المسببة لسقوط البادرات . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .

(9) Leben,S.D.;Wadi,J..A. and Easton ,G.D.(1987).Effect of Pseudomonas fluorescens on potato plant growth and control of V. deliae.Phttopathol.77:1592-1595.

(10) المبيدات.د ونزارمصطفى الملاح (1993).المبيدات .دار الكتب للطباعة والنشر,جامعة الموصل.ص520.

(11) ميخائيل، سمير وتركي بيدر، (1982). إمراض البذور، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

(12)Turcksess, M. W. and Wood, G. E. (1997). Immunochemical methods for mycotoxins in food. Food test. Anal., 3 (4): 24-27.

(13) ألعاشور، علي جابر جاسم . (2009) . تقييم كفاءة بعض العزلات المحلية التابعة للجنس *Bacillus* في السيطرة على بعض الفطريات الممرضة لنباتي الحنطة والباميا . أطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة الكوفة .

(14) عواد,كاظم مشحوت(1986) مبادئ كيمياء التربة.دار الكتب للطباعة والنشر-جامعة الموصل.296 صفحه.

(15) انكولد,س.ت (1980). بايولوجيا الفطريات(ترجمة إسماعيل عبد اللطيف سالم)مطبعة جامعة البصرة.331صفحه.

(16) بلكرامي.ك.س.و.وفيرما.ن.ر(1988).فسلجة الفطريات(ترجمة سرحان,عبد الرضا طه وفياض محمد شريف).دار الكتب لطباعة والنشر مطبعة جامعة البصرة.595 صفحه.

(17) ألعبيدي,أثير باسل عباس (2011).تصنيع مستحضر حيوي من البكتريا *Bacillus licheniformis* لمكافحة بعض الفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسين في علائق الدواجن.أطروحة دكتوراه .قسم علوم الحياة –كلية العلوم –جامعة الكوفة.

(18) Sulaiman,E. D. (1977). Comprehensives survey of fungi associated with in Iriq with a note on pathogenicity and control. M. Sc. Thesis, college of Agriculture and Foresty, Mosul, Iriq

(19) سرحان، عبد الرضا طه. (1995). الفطريات المصاحبة للحبوب المخزونة في سابلو محافظة القادسية، مجلة القادسية، المجلد، العدد 1: 19: 24.

(20) الحدراوي,سعاد وحيد كاضم(2011).توصيف الإحياء ألمجهريه الملوثة لبعض الاغذيه الجافة في الأسواق المحلية ودراسة أثارها السمية وإمكانية السيطرة عليها .أطروحة دكتوراه_كلية العلوم_جامعة الكوفة.

(21) ألجميلي، سامي عبد الرضا (1996). المقاومة المتكاملة ضد الإصابة بالفطر *Aspergillus flavus* والتلوث بالسم افلاتوكسين B1 في حاصل فستق الحقل. أطروحة دكتوراه- كلية الزراعة- جامعة بغداد. صفحة 87.

(22) ألعميدي,رمله احمد محمد(2009).تأثير البكتريا *Bacillus subtilis* في حماية حبوب الذرة الصفراء من الاصابه بالفطرين *Aspergillus niger vantieghem* و *Aspergillus flavus link* ,رسالة ماجستير_كلية العلوم_جامعة الكوفة.

(23) الكبيسي، نوري حمد ارزيك (1989). تأثير كاربونات الكالسيوم على بعض صفات التربة الفيزياوية والمعدنية. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة بغداد. ص94.

(24) Schulz,B.J.E.;Boyle,C.J.C. and Sieber,T.N.(2006).Microboal Root Endophytes. Springer-verlag,Berlin. Germany.

(25) Ara,K.(2007).*Bacillus* minimum genome factory :effective utilization of microbial genome information .Appl .Biotechnol.Biochem.46(3):169-78