مصدر التلوث البكتيري في انسجه نخله التمر *Phoenix dactylifera* L. المزروعه خارج الجسم الحي

منى عبد المطلب يحيى الموسوي
جامعه البصرة – مركز ابحاث النخيل

الخلاصه

استهدفت الدراسة تشخيص الاجناس البكتيرية المسببة للتلوث البكتيرى فى ثلاثة اصناف من عينات الكالس (ساير،قنطار، بريم) ومقارنتها مع تلك المعزولة من القمم الناميـــة لفســـائل نخيل التمر السليمة والعائدة لنفس الاصناف تم تشخيص اربعة اجناس بكتيريـــة مـــن التلـــوث الخارجي و المتمثل بظهور النمو البكتيرى بعد مرور (٢٤- ٤٨) ساعة من انماء العينات وهده الاجناس هى (٣٩%) ***Bacillus***، (٣١%) ***Staphylococcus***(٨. ٢١%) ***Eschertia*** وا خيرا جنس (٨%)***Serratia*** بينما تم عزل جنس ***Bacillus*** فقط من التلوث البكتيري الداخلي والمتمثل بظهور النمو البكتيري بعد مرور (٨ – ٤) اسابيع من انماء العينات وعند تشـــخيص عينات جنس ***Bacillus*** وجد انه يعود للنوع ***B circulans*** في كل مـــن التلـــوث البكتيـــري الداخلي والقمم النامية لفسائل نخيل التمر السليمة اما فى التلوث الخارجى فانه يعود للنـــوع ***B subtillus*** .

اظهر النوع ***B circulans*** المعزول من الكالس و القمم النامية للمسائل الســـليمة حساسـيته للمضاد الحيوي setreptomycin عند التركيز(0.75) اما المضاد الحيـــوي Gentamycin فقد اظهر فعالية تثبيطية ضد النوع ***B circulans*** عند التراكيز (0.50) .

المقدمه

تعد مشكلة التلوث بالاحياء المهجرية من اهم المشاكل التي تواجه الباحث في مجال زراعة الانسجة النباتية واخطرها (leifert & wates,(1992 خاصة إذا كان مصدر التلوث الجزء النباتي المستخدم لإنشاء الزروعات فمن الممكن ظهور التلوث حتى بعد شهرين من إنشاء الزروعات إذا كان الجزء النباتي المستخدم للزراعة ملوثا داخليا ولا يستجيب للتعقيم السطحي (مطر، ١٩٩١) يسبب التلوث بالاحياء المهجرية هلاكات واسعة وقلة في النباتات الناتجة بتقنية زراعة الانسجة النباتية والذي يصيب نسبة (٥٠ – ٢٠ %) من المزارع النسيجية حتى بعد إتباع طرائق التعقيم السطحي المختلفة (leary , *etal* , 1986) يصيب التلوث بالبكتريا حوالي ٣٠ % من المزارع النسيجية خلال الشهرين الاولين من الزراعة النسيجية وهناك نوع من التلوث لا يمكن ملاحظته في فترة الإنشاء الاولي وإنما يعزل من مرحلة الكالس او المراحل الجنينية اللاحقة فيما بعد (Veramendi & Navarro , 1997)يشكل النمو البكتيري حلقة بيضاء اللون الى حليبية تحيط بقطعة الكالس على السطح الاكاري لوسط زراعة الانسجة النباتية (collin & Edwards 1998,) اذ تنمو البكتريا بصورة اسرع من نمو الكالس النباتي مما يؤدي بالنهاية الى قتله (Bohogwani & Razan , 1983) تفضل عادة الاحجام الصغيرة من النسيج المستاصل المزروع بطرائق الاكثار بواسطة الزراعة النسيجية للتقليل من محتواه من المسببات المرضية ولكن هذا يقابله انخفاض في فرص نجاح الجزء اللنباتي المزروع في النمو والتمايز في ما بعد بسبب صغر حجمه (الكناني ١٩٨٧) لذلك فان الخطوة الاولى لمعرفة انجح الطرق للمعالجة للحصول على مزارع نسيجية خالية من التلوث تكمن في معرفة وتحديد الجنس او الاجناس البكتيرية التي تستوطن السطوح الخارجية (الحديثي وجماعته ،٢٠٠٧) وكذالك التي تنمو بعيدا

عنها

(Collin & Edwards ,1998) لذا فان الهدف من الدراسة الحالية يشمل تشخيص الجنس او الاجناس البكتيرية المصاحبة للكالس الناتج من زراعة انسجة نخلة التمر ومقارنتها بالاجناس البكترية المعزولة من القمة النامية للفسائل السليمة و العائدة لنفس الاصناف ودلك لمعرفة مصدر التلوث البكتيري فيما اذا كان تلوث داخلي مصدره قطعة النسيج المستاصلة ام تلوث خارجي مصدره التلوث الذي قد ياتي من البيئة المحيطة بعملية الزرع (ماء ، هواء ، ايدي العملين بالمختبر ، الوسط الزراعي المستخدم .

المواد وطرق العمل

١. جمع العينات

جمعت ٧٠ عينة كالس نخيل التمر لثلاث اصناف (ساير ، بريم ، قنطار) من مختبر زراعة الانسجة – مركز ابحاث النخيل – جامعة البصرة مصابة بتلوث بكتيري للفترة مابين كانون الثاني / ٢٠٠٩ الى حين تشرين الثاني / ٢٠٠٩ وقد توزعت العينات كالاتي :

ا. (٦٠) عينة كالس تميزت بظهورالاصابة البكتيرية بعد مرور (٤٨ – ٧٢) ساعة (اصابة خارجية) ضمت (٢٧ عينة كالس صنف الساير ، ١٩ عينة كالس صنف القطار و ١٤ عينة كالس صنف البريم) (جدول ١).

ب. (١٠) عينة كالس فقط تميزة بظهور الاصابة البكتيرية بعد مرور (٤ – ٨) اسابيع على زرع الكالس (اصابة داخلية) ضمت (٥) عينات كالس صنف الساير و(٣) عينات كالس صنف القطار و (٢) عينة كالس صنف البريم .

جدول (١) عدد عينات الكالس الملوثه خارجيا وداخليا واعداد البكتريا المعزوله من كل منها لاصناف مختلفه من نخيل التمر

صنف الكالس n	التلوث الخارجي		التلوث الداخلي	
	عدد العينات	عدد عزلات البكتريا	عدد العينات	عدد عزلات البكتريا
ساير 30	27	35	5	5
فنطار 22	19	30	3	3
بريم 18	14	22	2	2
70	60	87	10	10

n = عدد عينات

٢. عزل البكتريا

١. العزل من كالس نخيل التمر مصاب بتلوث بكتيري

اخذ ملئ شراج ناقل من النمو البكتيري على قطعة الكالس ومن حولها لثلاث مناطق عشوائية تم زرعت على الوسط الزرعي complete agar (C A) (Hstford 1982) وبواقع مكررين لكل عينه حضنت الاطباق بدرجة (٢٥ م) لمدة (٢٤ – ٤٨) ساعة

ب. العزل من الفسائل السليمه لنخيل التمر

اختيرت (٦) فسائل لنخيل التمر السليمة خالية من الاصابة المرضية (الاصفرار ، الذبول ، التبقع ، التنخر) موزعة على الاصناف التالية (٢ ساير – ٢ بريم – ٢ كنطار) ماخودة من منطقة واحدة (بساتين القرنة) تتراوح اعمارها ما بين (٢ – ٣) سنة شرحت الفسائل تصاعديا وصولا الى طرف الفرع التي تم استاصالها بسمك ٩ ملم وتعقيمها سطحيا بهايبوكلورات الصوديوم ١٠ % لمدة ٢٠ دقيقة ثم قسمت الى اربعة اجزاء وغسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات في ضروف معقمة ووضعت الاجزاء النباتية المستاصلة داخل الصفيحة الزجاجية المنقرة الحاوية على عشر تقعرات ووضع كل جزء من القمة النامية في تقعر لوحده وسحقت الاجزاء بواسطة قضيب زجاجي معقم مع قليل من الماء المقطر المعقم وبعد سحقها جيدا تركت هذه الاجزاء لمدة نصف ساعة داخل كابينة الزرع المعقمة وبعدها اخذ ملئ شراج ناقل من الماء المقطر المعقم الذي سحقت به العينات وزرع على الوسط الزرعي (CA) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٢٥ م لمدة (٤٨ – ٩٦) ساعة (*Leary et al,* 1986)

٣. الاختبارات التشخيصيه الاوليه

فحصت المستعمرات النامية على الوسط الزرعي (CA) وسجلت صفات كل منها واجريت الاختبارات التشخيصية لكل منها وشملت (صبغة كرام ، انتاج الاندول ، كبريتيد الهيدروجين ،الاوكسيديز ، الكاتاليز ، اختبار الاكسدة / التخمر ، اختبار فوكس بروس كاور ، استهلاك السترات ، انتاج انزيم اليوريز) حسب طريقة Collee *et al.,*1996 ;Holt.,*et al* (1994)

٤. اختبارحساسية المضادات الحيويه تجاه البكتريا

تم تحضير ثلاثة تراكيز مختلفة (٠.٠٠ 0.25 -0.50- 0.75) لكلمن المضادين Setreptomycin ، Gentamycin وحضر وسط Muller – Hinton Agar حسب تعليمات الشركة المجهزة بعد تبريده الى درجة ٥٠ م تم اضيفت التراكيز المختلفة من المضادات الحيوية اليه بعدها لقحت الاطباق الحاوية على الوسط الزرعي بالمعلق البكتيري باستخدام ماصة دقيقة Micropipet بحجم ١مايكروليتر على شكل قطرات على سطح الوسط الاكاري تركت الاطباق الى حين امتصاص الالوسط للقاح بصورة كاملة وبعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 م لمدة 48-24 ساعة .

النتائج

١. التلوث البكتيري الخارجي :

اضهرت الاختبارات التشخيصية الاولية لاجناس البكتريا المعزولة من الكالس الملوث خارجيا (صورة ١) وجود اكثر من جنس بكتيري واحد (جدول ٢) حيث سجل جنس العصويات *Bacillus* اعلى نسبة مئوية (٣٩ %) في الاصناف الثلاثة لعينات كالس نخيل التمر يلي ذلك جنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* ونسبة (٣١ %) تم يليه جنس *Eschertia* وبنسبة (٢١.٨ %) اما جنس *Serratia* فقد سجل اوطأ نسبة في الاصابة وقدره (٨ %) فقط واظهرت نتائج الاختبارات التفريقية ظهور نوع واحد لجنس العصويات للعينات الملوثة خارجيا هو *B subtilis*

جدول (٢) الاجناس البكتيريه المعزوله من الكالس الملوث خارجيا ونسبها المئويه

مصدر العزل N	عدد العزلات الكلي	الاجناس البكتيريه المعزوله			
		Bacillus n (%)	*Staphylococcus* n (%)	*Escheretia* n (%)	*Serratia* n (%)
كالس الساير 27	35	16 59.3%	11 40.7%	6 22%	2 7.4%
كالس الكنطار 19	30	10 52.6%	9 47.4%	9 47.4%	2 10.3%
كالس البريم 14	22	8 57.1%	7 50%	4 28.6%	3 21.5%
المجموع	87	34 39%	27 31%	19 21.8%	7 8%

N = عدد عينات الكالس n = عدد العزلات % = النسبه المئويه

٢. التلوث البكتيري الداخلي :

عزل جنس *Bacillus* لوحده من عينات الاصناف الثلاثة للكالس الملوث بالبكتريا داخليا اي التي ظهر فيها التلوث البكتيري بعد مرور (٤ – ٨) اسابيع من التجزئة واعادة الزرع للاصناف (الساير – القنطار – البريم) (صورة رقم ٢) حيث لم يتم ملاحظة اصابة صنف من عينات الكالس دون الاخرى مما يدل على عدم تاثير نوع الصنف في الاصابة بالتلوث البيكتيري . ظهرت الاختبارات التشخيصية لنوعي جنس العصويات المعزولة من العينات الملوثة داخليا انها تعود لنوع واحد هو *B circulans*

٣- البكتريا المعزوله من الفسائل السليمه

عزل الجنس *Bacillus* لوحده ابظا في الانسجة الداخلية للقمة النامية لثلاث فسائل لنخيل التمر السليمة في الحقل من بين ستة فسائل قيد الدراسة اي بنسبة (50%) ولم يتم عـــزل اى نوع بكتيري اخر منها وقد لوحظ زيادة شدة ظهور البكتريا الداخلية في القمم النامية للفســـائل السليمة بزيادة سمك طبقة الجدار المحادية للمرستيم القمي جدول -3-

جدول (٣) شدة النمو البكتيرى حسب سمك الطبقه المحاديه للمرستيم القمي للفسائل السليمه

صنف الفسيله	سمك الطبقه المعزوله منها /ملم	شدة تواجد بكتريا *B. circulans*
بريم	3	+
	6	+
	9	+++
ساير	3	+
	6	++
	9	+++
فنطار	3	+
	6	++
	9	++

+ 10 > مستعمرة على الوسط الزرعي CA (نمو خفيف)

++ 20-10 مستعمرة على الوسط الزرعي CA (نمو متوسط)

+++20 > مستعمرة على الوسط الزرعى CA (نمو كثيف)

***حسب طريقه ماضى (2002)**

٤ حساسيه بكتريا *B. circulans* تجاه المضادات الحيويه

اظهرت النتائج الفعالية التثبيطية للمضاد الحيوي Gentamycin عند التركيـــز (0.50) للبكتريا اعلاه بنسبة 100% بينما اظهر المضاد الحيوي Streptomycin فعالية تثبيطية ضـــد البكتريا عند التركيز 0.75 بنسبة 100% مما يدل على تفوق المضاد الحيوي الاول على الاخير في فعاليته التثبيطية ضد البكتريا اعلاه .

جدول 4 حساسيه بكتريا *B. circulans* تجاه المضادات الحيويه

المضاد الحيوي	التخافيف المستخدامة	حساسيه بكتريا *B.circulans*
Streptomycin	0.25	++
	0.50	+
	0.75	_
Gentamycin	0.25	+
	0.50	_
	0.75	_
عينه سيطرة control		+++

No growth _

Rare growth+

Moderate growth++

Exlent growth +++

صورة رقم (١)عينات كالس نخيل التمر السليمه المزروعه خارج الجسم الحي

صورة رقم (٢)عينات كالس نخيل التمر مصابه بتلوث بكتيري داخلي المزروعه خارج الجسم الحي

صوره رقم(٣)عينات كالس نخيل التمر مصابه بتلوث بكتيري خارجي المزروعه خارج الجسم الحي

المناقشه

استخدم في هذه الدراسة عينات كالس نخيل التمر المزروعة على الوسط الخاص بالزراعه النسيجية بعد ان لوحظ على الكالس اصابته بالتلوث البكتيري الذي ظهر على شكل نمو ابيض اللون على قطعة الكالس وحولها وعلى سطح الوسط الزرعي (Collin & Edwards 1998) . فاق نمو البكتريا على نمو الكالس والسبب يعود الى انه من المعروف بان نمو البكتريا اسرع بكثير من نمو الكالس فضلا عن ان الوسط الزرعي يحتوي تراكيز عاليه من السكروز وهو مصدر كاربوني ممتاز يشجع نمو العديد من الاحياء المجهرية واهمها البكتريا وعندما تصل البكتريا الى الوسط الزرعي سواء من البيئه المحيطة محموله بالهواء او الماء او بفعل تواجدها في قطعة النبات المستاصله المراد زراعتها فانها تنمو وتزدهر على حساب الجزء النباتي المزروع بسبب نموها السريع وبالتالي سرعة تكاثرها اذ ان درجة حرارة حضن الزروعات (٢٨ $\pm$ ١) وهي ملائمة لدرجة الحرارة اللازمة لنمو البكتريا المثالى

(Hartmann & Kester 1993) وبالتالي منافسته على الغذاء ، فضلا عن ذلك فان نواتج العمليات الايضيه للبكتريا قد تكون سامة للجزء النباتي مما يؤدي الى موتــه (الحــديتي وجماعته ٢٠٠٧) سجل في هذه الدراسه اربعة اجناس بكتيرية مسببه التلوث الخارجي لكالس نخيل التمر المزروع خارج الجسم الحي وهذا يتفق مع دراسة (ماضي، ٢٠٠٢) التي عزلت ستة اجناس بكتيرية من كالس نخيل التمر الملوث خارجيا للاصناف (حلاوي – خضــراوي – برحي) . سجل جنس العصويات اعلى نسبة مئوية بين الاجناس المسببه للتلوث الخارجي وهو بعود لنوع واحد فقط هو *B subtilis* وهذا يخالف ماتوصلت اليه (ماضي ٢٠٠٢) في عزل نوعين لجنس العصويات هما *B subtilis*، *B brevic* وقد يعود السبب فــي ذلــك الــى ان التشوب الخارجي يكون مصدره من البيئة المحيطة بظروف الزراعة النسيجية (هواء ، ماء ، ايدي العاملين ، الادوات المستخدمة في الزرع او ربما سطوح الاجزاء النباتيــة المزروعــة) وهذه قد تختلف من شخص لاخر و من وقت لاخر. اما النوع *B circulans* فهو ايضا"الوحيد الذى عزل من التلوث الداخلى لعينات الكالس كما تم عزله من القمة النامية لفسائل نخيل التمــر السليمة وهذا ما تؤكده دراسة (الماضى ،٢٠٠٢). وان السبب فى تردد جنس العصويات فى كل من التلوث الداخلى والتلوث الخارجى والفسائل السليمة المزروعة كونه واســع الانتشــار فــى الطبيعة(التربة،الهواء والماء) ويمتاز بتكوينه للسبورات المقاومة للظروف البيئية غير الملائمــة كالحرارة والتبريد او التسخين او الملوحة العالية مما يعطيه فرصة اكبر للانتشــار كبكتريــا محمولة بالهواء او الماء (Sonenshein *et al ,1993*). تم فى الدراسة الحالية عزل الجــنس *Staphylococcus* من كالس نخيل التمر المزروع خارج الجسم الحى للصناف الثلاثــة قيــد الدراسة كاحد الاجناس البكتيرية المسببة للتلوث الخارجى فهو يمتاز بكونه يتواجد فى امــاكن عدة مثل التربة والمياه العذبة والمالحة وعلى اسطح النباتات او نواتجها ويتواجد فــى الهــواء

والغبار وهذا الجنس لا يحتاج لمتطلبات غذائية معقدة ويقاوم التعقيم بالكلور نوعا ما Kloos . (and schleifer,1981)

المصادر

الموسوى ، منى عبد المطلب يحيى (٢٠٠٦) . الفعالية الضد جرتومية ة لمستخلصات بعض النباتات البرية العراقية، رسالة ماجستير . قسم علوم الحياة / كلية التربية/ جامعة البصرة .

الحديثى ، هديل توفيق، صبيح داود العطبى ، زينب جواد ماضى ،(٢٠٠٧).البكتريا المعزولة من الكالس المشوب ومن فسائل نخيل التمر السليمة ،مجلة البصرة للعلوم الزراعية٣(٢):١٢ ٢٥.

ماضى ، زينب جواد (٢٠٠٠) . معالجة التشوب البكتيرى فى انسجة نخلة التمرالمزروعة خارج الجسم الحى باستخدام المضادات الحيوية، رسالة ماجستير . قسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة البصرة .

مطر ، عبد الامير (١٩٩٠) . زراعة النخيل وإنتاجه – مطبعة دار الحكمة ، جامعة البصرة .ص 149.

الكنانى ، فيصل رشيد ناصر (١٩٨٧) . زراعة الانسجة والخلايا النباتية . مؤسسة دار الكتب للطباعة و النشر – جامعة الموصل – العراق ص ٤٠٨

Bhojwani , S.S& Razdan , M.K (1993) . Plant tissue culture . Theory & Practice . pp: 502 Elsevier pub . The Netherlads .

Collee , J.G.; Fracer , A.J. , Marmion , B. p . & Simmon , A. (1996) Makie & McCarteny Practical Medical Microbiology . 14 ed : 978,Chyrchill living stone . New York .

Collin, H. A. and Edwards ,S. (1998). Plant cell culture .pp :158.bios.Sci.pub .

Hartmann,H.Tand Kester, D.E.(1983).Plant propagation principles and practices . preantice hast International . Inc .London .

Holt ,J.G .;Krieg,N.R; Sneath, P.H .; Staley.JT and Williams , S.T.(1994)Bergeys Manual of determinative bacteriology.

Hostford, R.M .,(1982). White blotch incited in wheat by *B megaterium* cereals phytopathology .

Leary,J.V. Nelson,N,; tisserat,Band Allingham , E.A .(1986) .Isolation of B circulans from callus culture and healthy offsets of date palm.

Leifert , C . and waites ,W.M.(1992). Bacterial groth in plant tissue culture media .J Appl . Back 72: 460 -466 .

Soneshein A.l .; Hoch , J.A .and Losick ,R .(1993) .Bacillus sub tillus and other gram possative bacteria .Biochem .Physio .and Mol .Gene:1-16 .

Kloos ,W .E and schleif,J . (1981) the Genus Staphylococcus spp .

Veramendi, J .and Navarro , L .(1997) .Influence of explant sources of adult palm *Phoenix dactylifera on* emberyogenic callus formation .J. of Hort Sci .,72(5) ;665-671 .

The source of Bacterial Contamination in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Grown *Invitro*

Muna A. Y. Al-Mussawii

Date Palm Research Center . Basra University .

Summery

This study was conducted to determine types of bacteria contaminating three types of callus of date palm cultivars (Al-sayer,Al-kentar, Albream) and comparated with types of bacteria that isolated from shoot tips of healthy offsets of date palm grown in tissue culture media .Four genera of bacteria were identified from contamination detected (24-48h)after grown culture (External contamination)these are ;(*Bacillus* 39% ,*Staphylococcus* 31% ,*Escheritia* 21% , *Serratia* 8%) while Bacillus was the only genus isolated from contamination detected (4-8 weeks)after growing cultures``(internal contamination) . identification of genus Bacillus showed the prevalence of *B subtillus* from External contamination and the species *B circulans* from internal contamination and shoot tips of healthy offsets of date palm . *B* circulans that isolated from internal contamination and shoot tips of healthy offsets of date palm showed sensitivity to antibiotic Setreptomycin at the concentration 0.75 while the antibiotic Gentamycin showed inhibiting activity at the concentration 0.50 agianest the species *B* circulans .