عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus circulans* واختبار قدرتها على حماية بادرات الخيار من الاصابة بالفطر *Rhizoctonia solani*

بسعاد عبد زيد
قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة الكوفة

الخلاصة:-

تضمنت هذه الدراسةعزل البكتريا *Bacillus circulans* من التربة وتشخيصها فضلا عن اختبار قدرتها في حماية بذور وبادرات الخيار من الاصابة بالفطر *Rhizoctonia solani* وكانت النتائج ايجابية اذ رفعت نسبة الإنبات(87%) عند معاملة البذور بلقاح البكتريا فيما كانت النسبة للإنبات في معاملة المقارنة بوجود الفطر*Rhizoctonia solani* (56%), أما نسبة الإنبات في معاملة المقارنة بدون فطر كانت (77%) و انخفظت نسبة موت البادرات إلى (13%)في معاملة البذور بلقاح البكتريا فيما ارتفعت هذه النسبة إلى (44%) في معاملة المقارنة بوجود الفطر الممرض.

المقدمة:-

تؤثر الأمراض النباتية بدرجة لا يمكن تجاهلها أو التغاضي عن أهميتها فالحالات الناجمة عنها تؤدي إلى تدمير المحاصيل الزراعية و تسبب خسائر جسيمة تقدر بمليارات الدولارات سنوياً و كون الزراعة مصدراً لديمومة حياة الإنسان يصبح من الضروري الأهتمام بالأمراض النباتية ففي العقد المنصرم تم حصر المسببات المرضية التي تتسبب في أحداث إمراضي للنباتات بأكثر من 8000 نوع من الفطريات و 175 نوعاً من البكتريا و 300 نوع من الفايروسات و 500 نوع من الديدان الثعبانية التي تتطفل بشكل أو بآخر على النباتات .(Agrios,1978) .

و للحد من تأثير الآفات الزراعية و لا سيما المسببات المرضية استعملت و سائل متعددة منها المبيدات الكيماوية في مكافحة الآفات و أدى التوسع في استعمالها إلى زيادة مشكلات الآفات من خلال ظهور سلالات مقاومة لبعض المبيدات الكيماوية فضلاً عن مخاطر تلك المبيدات على جميع الكائنات الأخرى و تأثيرها على صحة الإنسان أو الحيوان, و قتلها الأسماك و أضراها بالأحياء المجهرية في التربة .(الزبيدي,1992).

و أمام هذه المخاطر الناجمة عن استعمال المبيدات الكيماوية لجأ الإنسان إلى الإستفادة من الكائنات الحية المجهرية ذات القدرة على تثبيط فعل المسببات المرضية عن طريق التطفل Parasitism أو التضاد Antagonism أو المنافسة Competition , الأمر الذي قلل من تواجد المسببات المرضية وأضرارها. و في هذا المجال إستعملت بعض أنواع الأحياء المجهرية و لا سيما البكتريا التي تعد من أهم الكائنات المستعملة في برامج المقاومة الحيوية للمسببات المرضية للنباتات فهي تمتاز بكثرة أنواعها و إعدادها و بسرعة نموها و تكاثرها و قدرتها على استغلال أنواع مختلفة من الأغذية فظروف متباينة مقارنة بالكائنات الحية الأخرى المتواجدة في التربة .(الزبيدي,1992).

و في لاالسنين الأخيرة تم إختيار كفاءة بعض الأنواع التابعة لجنس *Bacillus* التي أثبتت كفاءة عالية في السيطرة على الممرضات الفطرية و البكتيرية ولاسيما مسببات إمراض تعفن الجذوروالذبول الوعائي (Eric & Laura; 2000 ,1998 Robert & Kazmar).

فقد وجد إن الأ نواع *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* و *Bacillus pumilis* ذات قدرة عالية على تثبيط الكثير من المسببات المرضية و كبح نموها و نشاطها و الحد من أضرارها على النباتات , و قد أكدت الأبحاث إن استعمال هذه الأنواع من البكتريا أدى إلى زيادة معنوية في النمو و الحاصل النباتي (Yuming و Xiaomin , 2003 ; Dal – Soo و جماعته , 1997) .

ولغرض التعرف على القدرة التضادية لعزلات البكتريا*Bacillus circulans* المتواجدة في التربة المحلية ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* وامكانية ادخالها في برامج المكافحة الاحيائية تم اجراء هذا البحث والذي يعد الاول من نوعه في القطر.

2-المواد و طرق العمل:-

1- عزل و تشخيص بكتريا *B. circulans* :-

تم عزل هذه البكتريا بأخذ خمسة عينات بحجم (1.5) كغم من خمسة بساتين واقعة في اقضية المسبب والمحاويل/ محافظة بابل و مزجها في وعاء نظيف, ثم أختير من هذا المزيج (10) غم و وزعت هذه العشرة غرامات على (10) أنابيب اختبار معقمة و رقمت بالتسلسل من (1-10) و أجريت سلسلة من التخافيف (10^{-1} إلى10^{-6}) لكل عينة تربة وفي كل انبوبة اختبار و سحب (0.1 مل) من التخفيف الأخيرلكل عينة على حدة واضيف الى أطباق زجاجية حاوية على الوسط Nutrient agar المعقم و حضن بالحاضنة بدرجة حرارة (37 مْ) و لمدة 24 ساعة , و تم دراسة ما يلي.

1- دراسة الخصائص المظهرية:-

تمت معاينة و دراسة الخصائص المظهرية لمستعمرات بكتريا *B. circulans* و تحديد حجم المستعمرة و لونها و دراسة قوامها وتنقية المستعمرات التي تنطبق عليه المواصفات بكتريا *B. circulans* على اطباق تحتوي على وسط Nutrient agar ايضا .

2- دراسة الخصائص المجهرية لخلايا البكتريا *B. circulans* :-

تم اختيار عينة من مستعمرات التي يعتقد انها مستعمرات بكتريا *B. circulans* و تصبيغها بصبغة كرام بعد تثبيتها على الشريحة الزجاجية و معاينة شكل الخلية البكتيرية و موقع السبور فيها.

3- ختبارات الحيوية Biochemical test :-

أ-اختبار الاوكسيديز(Oxidase test) وضعت بضعة قطرات من كاشف الاوكسيديز المحفز على ورقة ترشيح ثم نقلت كمية قليلة من المستعمرة بواسطة سلك بلاتيني فوق ورقة الترشيح ، ان تلون المستعمرات بلون بنفسجي بعد (10) ثوان دليل على النتيجة الموجبة (2000,Macfaddin).

ب- إختبار الكاتليز (Catalase test):- وضعت كمية من مزرعة بكتيرية بعمر (24) ساعة بواسطة Loop في شريحة زجاجية نظيفة و من ثم مزجت ببضع قطرات من محلول H2O2 بتركيز(30%) ,إن تكون فقاعات هوائية على الشريحة الزجاجية يعتبر دليل على النتيجة الموجبة (2000,Macfaddin).

ج-إختبار تحلل الدم (Blood hemolysis test) :- لقح وسط الدم الصلب بالبكتريا ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة(37مْ) و لمدة (24) ساعة, إن ظهور مناطق خضر حول المستعمرات يعني إن التحلل من نوع (ألفا) أي (تحلل جزئي) أما ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات النامية يعني إن التحلل من نوع (بيتا)(Beta hemolysis) أي (تحلل كامل) (Collee و آخرون ,2000) .

د-إختبار إستهلاك السترات(Citrate utilization) :- خُطِّطَ وسط السترات بالبكتريا و حُضِّنَ في درجة حرارة (37)مْ و لمدة (24) ساعة و كانت النتيجة موجبة بتحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق(Collee و آخرون ,1996) .

هـ - إختبار الحركة (Motility test):- لقحت الأنابيب الحاوية وسط الحركة بالبكتريا (بواسطة الطعن) حضنت الأطباق بدرجة حرارة(37مْ) و لمدة (24) ساعة, إن إنتشار النمو البكتيري خارج حدود الطعن دليل على قابلية البكتريا على الحركة (Collee و آخرون ,1996) .

و- إختبار تخمر السكريات (Sugar fermentation test) :- لقحت أنابيب وسط السكريات المختلفة بالمزروع البكتيري و حضنت بدرجة حرارة(37مْ) على مدى (24) ساعة و تعد النتيجة موجبة عند تحول لون الوسط من اللون الأحمر إلى اللون الأصفر بسبب تكون الحامض مما يدل على هبوط قيمة الأس الهيدروجيني PH نحو الحامضية و هي دلالة على تخمر السكر و إنتاج الحامض. أما دلالة النتيجة الموجبة على إنتاج الغاز فهي تكون فقاعات غازية في أنبوبة درهام (2000,Macfaddin).

ي -إختبار القابلية على تحمل الملوحة:- تم تهيئة عشرة دوارق بحجم (100 مل) و أضيف لكل دورق الوسط الزرعي Nutrient agar بمعدل (60 مل) ثم أضيف للدورق الأول ملح كلوريد الصوديوم و بتركيز (1%) و للدورق الثاني (2%) و هكذا إلى بقية الدوارق و بصورة متسلسلة حتى الوصول إلى التركيز (10%) في الدورق الأخير, و بعدها عقمت الدوارق بالمؤصدة بدرجة حرارة (121مْ) و ضغط (1 جو) و لمدة (20) دقيقة, و بعد تبريد الوسط صبت محتويات كل دورق في ثلاثة أطباق زجاجية معقمة(ثلاث مكررات) و تركت لتتصلب, ثم زرع على كل طبق من الأطباق (0.1 مل) من العالق البكتيري لبكتريا *B. circulans* المنماة في وسط المرق المغذي Nutrient agar و لفترة (24) ساعة, ثم نُشِّرَ العالق في الطبق بواسطة ناشر زجاجي معقم (Spreader), و حضنت الأطباق بدرجة حرارة(37مْ) و لمدة (24) ساعة, و بعد التحضين تم ملاحظة نمو البكتريا في كل التراكيز و تعيين أعلى تركيز يمكن لبكتريا *B. circulans* أن تنمو فيه (Collee وجماعته ,1996).

ن -إختبار(Lecithinase) :- تم تحضير (100 مل) من الوسط الورعي المغذي Nutrient agar حسب تعليمات الشركة المصنعة و عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة (121مْ) و ضغط (1 جو) و لمدة (20) دقيقة, (Collee, 1996). بعدها برد

الوسط في حمام مائي إلى درجة (45مْ) ثم سحب (5 مل) من مح بيضة عقمت قشرتها بواسطة كحول أثيلي, باستخدام أبرة معقمة ووضعت مع الوسط الزرعي, و رجت محتوياتها جيداً بعدها صبت في أطباق بتري و تركت لتبرد ثم لقحت بمزرعة بكتريا *B. circulans* عمرها (24) ساعة و حضنت الأطباق بدرجة حرارة(37مْ) و لمدة (24) ساعة, في حال إيجابية الأختبار تتكون مناطق رائقة في الوسط (2000,Macfaddin).

2- التجربة البايلوجية:-

تم تنفيذ التجربة في غرفة النمو باستعمال اصص ذات قطر (10) سم ملئت بتربة معقمة ولوثت تربة (10) اصص بلقاح الفطر الممرض*R. solani* (تم الحصول على عزلة مشخصة من مختبر الدراسات العليا في قسم علوم الحياة /كلية العلوم/جامعة الكوفة) وذلك باضافة (5) اقراص من وسط P.D.A المنمى عليه الفطر بعمر اسبوع وتركت تربة (5) اصص بدون اضافة لقاح الفطر ونفذت المعاملات الاتية:

1- **معاملة المقارنة بدون فطر**:- تم إستعمال خمسة أصص من الأصص البلاستيكية ملئت بتربة معقمة و زرع في كل أصيص من الأصص (10) بذرات من محصول الخيار Petalpha .

2- **معاملة المقارنة بوجود الفطر**:- تم إستعمال خمسة أصص من الأصص البلاستيكية ملئت بتربة معقمة ووضع فيها (5) أقراص من مستعمرة الفطر*R. solani* و زرع في كل أصيص من الأصص (10) بذرات من محصول الخيار.

3- بذور معاملة بلقاح البكتريا :- تم إستعمال خمسة أصص من الأصص البلاستيكية ملئت بتربة معقمةولوثت بالفطر الممرض وزرع في كل اصيص من الاصص (10) بذور من محصول الخيار بعد تنقيعها بلقاح البكتريا *B. circulans* و بواقع (10 مل) لكل (10) بذوروقد وضعت الاصص في المختبر بدرجة حرارة 30 مْ.

3- **القراءات و القياسات المستعملة في التقييم التجربة :-**

1- **النسبة المئوية للإنبات**:- حسبت هذه النسبة بعد (10) يوم من زراعة بذور الخيار و ذلك بحساب عدد البادرات النابتة, و أستخرجت النسبة المئوية للإنبات على وفق المعادلة التالية:-

$$\text{النسبة المئوية للإنبات} = \frac{\text{عدد البادرات النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور المزروعة}} \times 100$$

2-**النسبة المئوية لموت البادرات**:- حسبت هذه النسبة بعد (10) يوم من الإنبات لنبات الخيار و ذلك بحساب عدد البادرات الميتة و أستخرجت النسبة المئوية لموت البادرات وفق المعادلة التالية:-

$$\text{النسبة المئوية لموت البادرات} = \frac{\text{عدد البادرات الميتة}}{\text{العدد الكلي للبادرات النابتة}} \times 100$$

3-**النحليل إحصائي**:-حللت جميع التجارب المختبرية بحسب التصميم العشوائي الكامل(C.R.D), وحيدة العامل و تم تحويل النسب المئوية تحويلاً زاوياً و تمت مقارنة المتوسطات حسب أقل فرق معنوي L.S.D على مستوى إحتمال (5%) (الراوي و خلف الله, 1980).

3-النتائج و المناقشة:-

1-**تشخيص بكتريا *B. circulans* :-**

1-الوصف المزرعي لمستعمرة بكتريا *B. circulans* :-

ظهرت مستعمرات بكتريا *B. circulans* المنمات على الوسط المغذي Nutrient agar بشكل مستعمرات دائرية كبيرة ملساء ناعمة ذات حافة مستديرة و لون أبيض تبني و مائلة إلى التبني الداكن بتقادم عمر المستعمرة أي بعد(48-72)ساعة و تراوح قطر المستعمرة بين(2-5 ملم), و هذا يتطابق مع ما جاء به (Collee وجماعته ,1996) و(2000,Macfaddin).

2-الوصف المجهري لبكتريا*B. circulans* :-

أظهرت نتائج الفحص المجهري للشرائح المثبتة و المصبوغة بصبغة كرام لمستعمرة بكتريا *B. circulans* أنها بكتريا موجبة لصبغة كرام عصوية الشكل و تمتلك سبوراً بيضوياً مركزي الموقع, و هي عصيات مفردة لا تتجمع إلا نادراً بشكل سلاسل و هذه الصفات متطابقة تماماً مع ما وردهCollee وجماعته (1996) و Macfaddin,(2000).

3-الإختبارات البايوكيماحيوية:- فيما يلي نتائج الإختبارات البايوكيماحيوية لهذه العزلة:-

ت	الإختبارات	النتيجة
1	Catalase	+posative
2	Oxidase	Variable
3	Hemolysis	Beta Hemolysis
4	Lecithinase	-
5	Spore location	Central
6	Spore shape	Ellipsoidal
7	Arabinose	-
8	Glucose	+
9	Maltose	+
10	Sucrose	+
11	Xylose	-
12	Mannitol	-
13	Mannose	-
14	Sorbitol	-
15	Citrate utilization	+
16	Motility	+
17	5% NaCL	+
18	7%NaCL	-

جدول (1) الفحوصات البايوكيميائية التشخيصية لبكتريا *B. circulans*

2- اختبار كفاءة لقاح البكتريا *B. circulans* في حماية بذور وبادرات الخيار من الاصابة بالفطر*R. solani* :-

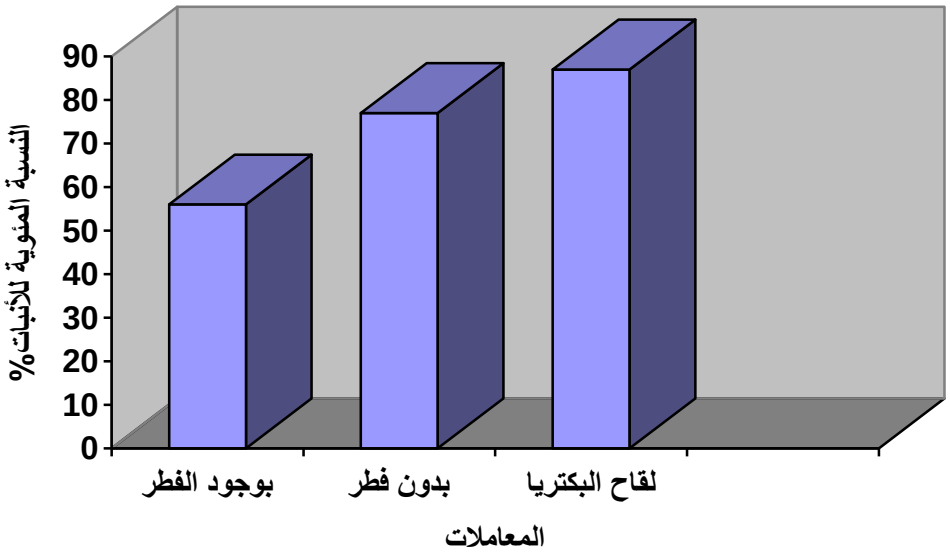
1- النسبة المئوية للانبات :-

إن أعلى معدل إنبات لبذور الخيار(87%) بتفوق معنوي عن معاملة المقارنة بوجود الفطر التي بلغت (56%) أما نسبة الإنبات في معاملة المقارنة (بدون وجود الفطر) فقد كانت (77%) (شكل1)و قد يعود سبب التفوق إلى قدرة البكتريا على حماية البذور من التأثيرات السلبية للفطريات المسببة لتعفن البذور من خلال إنتاجها المضادات الحيوية التي تكبح نمو الفطريات الممرضة المتواجدة في التربة و منها الفطر *R. solani*, و هذا ما أشار إليه (Robert , Kazmer , 2000) و Handelsman و جماعته (1990) و Georg و جماعته (1998) ,الى قدرة البكتريا *B. circulans* على توفير حماية لبادرات النباتات سواء أكان ذلك قبل البزوغ(Pre emergence) أم بعده (Post emergence), من الإصابة بالفطريات الممرضة و المتوطنة في التربة و من ثم زيادة نسبة إنباتها.

2-النسبة المئوية لموت البادرات:-

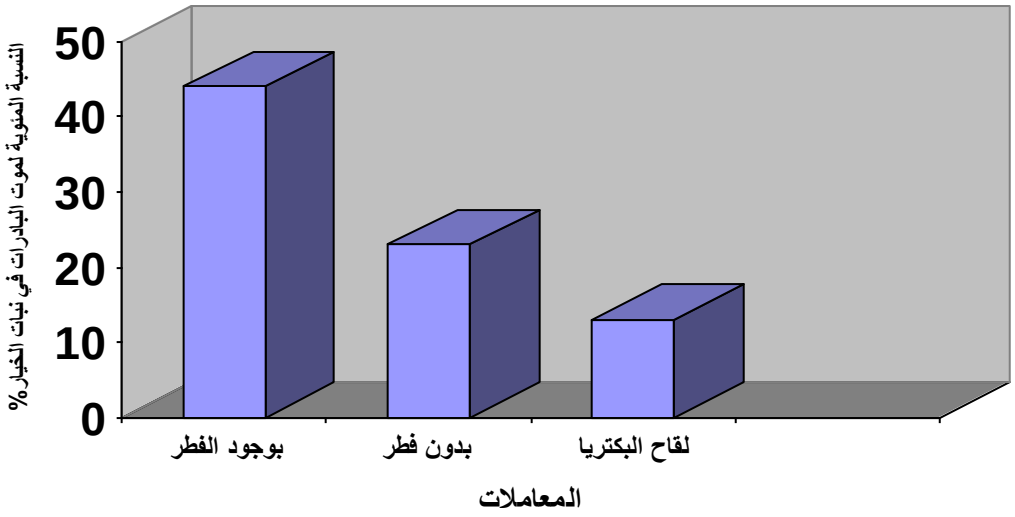
أعطى لقاح البكتريا نتائج جيدة في خفض معدل نسب موت البادرات وهذا ماأشارت اليه نتائج هذا الاختبا والمبينة في الشكل (2), و يعود سبب تفوق خفض موت البادرات إلى إنتاج بكتريا *B. circulans* مواد و أنزيمات مثبطة لتأثير الفطريات في المحيط الجذري للنبات وتحليل المكونات العضوية للفطريات و إستفادة النبات من المواد العضوية و بالتالي توفيرها حماية أفضل, فقد ذكر العاشور(2005) إن الإصابة بالفطر *R. solani* تتناسب عكسياً مع تركيز لقاح البكتريا *B. ceruse* حيث كلما زادت كمية لقاح البكتريا كلما قلت نسبة الإصابة, فزيادة إستعمال كميات اللقاح البكتيري تعني زيادة في كثافة البكتريا في منطقة الجذور المتأثرة Rhizosphere و أشارت الكثير من الدراسات و البحوث إلى إن القدرة التثبيطية لهذه البكتريا تأتي من قدرتها على إنتاج المضاد الحيوي Zwittermicin A إذ إن هذا المضاد له القدرة العالية على تثبيط الفطريات المرضية كفطر *R. solani* و *P. Aphanidermatum* كما إنها تمتلك القدرة على إنتاج بعض الأنزيمات كأنزيم Chitinase و Chitosanase و اللذين يسببان تحطيم مادة Chitin الموجودة في خلايا جدران الفطريات الراقية فضلاً عن إنتاجها لإنزيم Cellulase الفعال في تحطيم مادة الـ Cellulose و المتواجدة في جدران الفطريات البيضية (Shoji و جماعته 1975) , و النتائج التي تم الحصول عليها تماثل ما ذكره (Robert , Kazmer , 2000) و اللذين أكدو على كفاءة البكتريا *B. cereus* في مكافحة سقوط البادرات و تعفن جذور نبات فول الصويا المتسببة عن الفطر *Microphomina phoseolina*, كما تماثل ما ذكره Laura و Eric (1998), من قدرة هذه البكتريا في حمايةلبادرات الخيار و الجت المتسببة عن الفطريات *R. solani* و *Verticillium dahlia* .

L.S.D.(0.05)=0.28



شكل (1) تأثير لقاح البكتريا *B.circulans* في النسبة المئوية للانبات في نبات الخيار

L.S.D. (0.05)=0.94



شكل (2) تأثير لقاح البكتريا *B.circulans* في النسبة المئوية لموت البادرات في نبات الخيار

المصادر العربية

-الراوي, خاشع محمود و عبد العزيز خلف الله(1980) تصميم و تحليل التجارب الزراعية. دار تاكتب للطباعة و النشر- جامعة الموصل.488 صفحة.
-الزبيدي, حمزة كاظم (1992) المقاومة الحيوية للآفات,دار الكتب للطباعة و النشر. جامعة الموصل.220 صفحة.
-العاشور, علي جابر جاسم(2005). إمكانية تصنيع مستحضر من لقاح البكتريا *Bacillus cereus* للسيطرة على بعض الفطريات المسببة لسقوط البادرات. رسالة ماجستير-كلية العلوم-جامعة الكوفة.78 صفحة.
-اليونس, عبد الحميد أحمد(1993) إنتاج و تحسين المحاصيل الحقلية. مطبعة جامعة بغداد. 470 صفحة.
-حميد, سمير كاظم(2001).تنقية مستحدثة في إنتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة بكتريا CHAO *Pseudomonas flourescens*
رسالة ماجستير-كلية العلوم-جامعة الكوفة.
-شعبان, عواد و نزار مصطفى الملاح.(1993). المبيدات. دار تاكتب للطباعة و النشر- جامعة الموصل.520 صفحة.

Reference

-Abbott, W.S.(1952).A method of computing the effective ness of an insecticides.J.Ec.Ent.,18:265-267.
-Agrios, G.N.(1978).Plant Pathology. Academic press. New York 2end edition.,:703.
-Clark, F.E.(1965). Agar- Plats method for total Microbial(C.F:Black, 1965; Methods of soil analysis part 2 publisher Madison, Wisconsin, U.S.A.,:1572.
=Collee, J.G.;Fraser, A.G. and Marmion, B.P.(1996). Practical medical Microbiology. 14th edition. Churchill Livingston. U.S.A.,:937.

-Dal-Soo Kim; James, R.C. and David, M.W. (1997). Biological control of three root diseases of Wheat grown with reduced Tillage. Agricultural research service, American phytopathology.,:87, 5 : 551-558.
-Georg, S. ; Joseph, R. and Kloepper, W.(1998). Mixtures of plant growth-promoting Rhizabacteria Enhance biological control of multiple cucumber pathogens. American phytopathology society.,88:1158-1164.
-Kazmar, R.E. ; Robert, M.G.(2000). Regression Analysis for evaluating the influence of *Bacillus cereus* on Alfaalfa Yield under Variable disease intensity. The American Journal of plant pathology. ,90:657-665.
-Laura, A.S. ; Eric, V.S.(1998). Target range of Zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus* .Current microbiology.,37:6-11.
-Macfaddin, J.F.(2000). Biochemical tests for Identification of Medical bacteria. Third edition. Williams and willkins compony. U.S.A. : 912.
-Muhamed, S.A. ; Amussa, J.L.(2003) Biological control of some pathogenic plants (Fungi and bacteria) African jornual of Biotechnology. , 2: 161-164.
-Piza, F.A. Siloto, A.P. and Carvalho, C.V.(1999). Production of chitosanase from *Bacillus cereus* . Brazilian Jornual of chemical engineering. , Sao Paulo. Brazil. VOL:16.N:2.
-Weller, D.M. ,James, C.R. (1988). Biological control of soil borne plant pathogens in the Rhizosphere with bacteria. Annue4 rev . phytopathology., 26: 397-407.
-Yuming Bai. Xiaomin, Z. and Donald, L.S.(2003). Enhanced soy bean plant growth resulting from conclusion of *Bacillus strains* with *Bradyrhizobium joponicum* .Journal crop sciences Quebec, Canada. , 43:2-13.

Isolation and Identification of the bacteria *Bacillus circulans* and testing ability of bacteria in protection the Cucumber crop from the infection by *Rhizoctonia solani*

Basaad Abedzaid Abood
College of Science / Kufa University

The study include Isolation of bacteria *Bacillus circulans* from the soil and Identification rather than testing its ability in protection seeds and seedling of Cucumber from the infection by *Rhizoctonia solani* and results to the plantation rat about (87%) when the seeds treated with bacteria inoculum while the same percentage of plantation in control treatment (in presence of the mold R. solani)was (56%) while the plantation percentage in control treatment (without mold)was (77%) .The rat of seedlings death was decreased to (13%) in seeds treated with bacteria inoculum while the same rat was increased to (44%) in control treatment (in presence of the mold).