تأثير المضادات الحياتية والسماد الكيمياوي في نمو البكتريا *Azospirillum irakense*

سامي عبد الرضا علي   سعاد وحيد كاظم

كلية العلوم – جامعة الكوفة

الخلاصة

بينت هذه الدراسة ان بكتريا *Azospirillum irakense* حساسة لمعظم المضادات الحيوية المختبرة باستثناء البنسلين والستريتومايسين ، اذ اظهرت البكتريا مقاومة لهما . وقد كان لنوع السماد الكيمياوي تأثير سلبي على كثافة البكتريا ، وتجلى ذلك بانخفاض معنوي في كثافة البكتريا عند اضافة السماد الكيمياوي اليوريا الى وسط النمو حيث بلغ $13.46x10^9$ وحدة تكوين مستعمرة/غم ، في حين بلغت كثافة البكتريا عند اضافة السماد الكيمياوي خامس اوكسيد الفسفور (P_2O5) $12.07x10^8$ في حين بلغت في معاملة المقارنة $1.8x10^{12}$ وحدة تكوين مستعمرة/مل .

1. المقدمة :

ترتبط العديد من الاحياء الدقيقة غير ذاتية التغذية المثبتة للنتروجين في التربة مع جذور العديد من النباتات الراقية ومنها البكتريا التابعة لجنس *Azospirillum* والتي عرفت قدرتها على تثبيت النتروجين الجوي ومشاع استخدامها كلقاح بكتيري للنباتات النجيلية (Day و Doberiner , 1976 ; Jacoud وجماعته 1997) .

وذكر ظاهر (2001) ان تلقيح نباتات الذرة لقاح البكتريا *Azospirillum* ادى الى زيادة نمو الجذور وكذلك الوزن الجاف للمجموع الخضري فضلاً عن زيادة امتصاص النتروجين ويحسن الحاصل .

وفي دراسة اخرى بين محمود وجماعته (1997) ان بكتريا *Azospirillum* تثبت النتروجين الجوي بمعدل (48) كغم N /هكتار/سنة .

وبالنظر للاهتمام المتزايد لهذه البكتريا في القطر وتواصلاً مع البحوث والدراسات حول هذا الموضوع ارتأينا دراسة تاثير الاسمدة النتروجينية والفوسفاتية على نمو هذه البكتريا كونها تشكل عنصر اساسي في الانتاج الزراعي وامكانية مزج هذه البكتريا مع الاسمدة الكيمياوية لتعطي نتائج افضل في مجال الانتاج الزراعي وكذلك التعرف على مدى حساسية هذه البكتريا للمضادات الحياتية كون عدد من المضادات تستخدم في مجال السيطرة على بعض الامراض البكتيرية التي تصيب النباتات ومدى تاثير ذلك على نمو بكتريا *Azospirillum* .

2. المواد وطرائق العمل :

1-2 : تم استعمال المضادات الحيوية في الدراسة :

جدول (1) المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة

ت	المضاد الحيوي		الرمز العالمي	التركيز بالمايكروغرام /قرص
١-	جنتاميسين	Gentamycin	Gm	10
٢-	كلوكساسلين	Cloxacillin	Ob	5
٣-	ريفامبين	Rifampicin	Rf	30
٤-	تتراسايكلين	Tetracyclin	Tc	30
٥-	امبسلين	Ampicillin	Amp	10
٦-	فيورادنتين	Furadantin	F	30
٧-	ترايميثوبريم	Trimethoprime	W	1.23
٨-	توبرومايسين	Tobramycin	Tob	10

واستخدمت عدة اوساط زرعية للبكتريا وهي :

1- وسط Nutrient Agar

استعمل الوسط لغرض اكثار عزلة البكتريا وتنقيتها (حضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة).

2- وسط Nutrient broth

3- وسط Muller – Hinton agar (Mast)

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة واستعمل لتحديد فعالية بعض العوامل المضادة للجراثيم بطريقة الانتشار من القرص (Bauer وجماعته , 1966) ، واستعمل ايضاً لبيان امكانية حدوث تداخل بعض مضادات الجراثيم بالطريقة المحورة للانتشار من القرص (Reeves وجماعته , 1978) .

2-2 التجارب المختبرية

نفذت التجارب المختبرية في مختبر الدراسات العليا التابع لقسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة الكوفة لعام 2001-2002 م .

1-2-2 تحضير لقاح البكتريا *A. irakense*

تم الحصول على عزلة مشخصة من البكتريا *A. irakense* من مختبر الاحياء المجهرية لقسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الكوفة واجري عليها التالي :

أ- نميت العزلة على وسط Nutrient Agar بعد تحضيره وتعقيمه وصب في اطباق بتري معقمة قطرها 9 سم ، بعدها لقحت الاطباق بطريقة التخطيط (Streak method) ثم حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 35مْ (الزيدي , 1987) .

ب- تم اكثار عزلة البكتريا *A. irakense* نميت العزلة على وسط Nutrient broth بأخذ 13غم منه واضافته الى لتر ماء معقم ، بعدها عقم الوسط الزرعي المحضر في دوارق زجاجية نظيفة سعة لتر بجهاز

الموصـــدة (Autoclave) وبدرجـــة حـــرارة 121مْ وضـــغط 15 باونـــد /انـــج٢ لمـــدة 20 دقيقـــة (العنسي , 1992) .

وبعد تبريده لقحت الدوارق بمعدل 10 مستعمرات /لتـر مـن البكتريـا المنمـاة علـى وسـط Nutrient Agar ، ثـــم حضـــنت بدرجـــة حـــرارة 35مْ لمـــدة 48 ســـاعة (Baker وجماعته 1986 ;Leben وجماعته 1987 ؛ وجاسم ,1999) .

ثم ضبطت عكورة العالق البكتيري مع عكورة انبوبة ماكفرلاند (Macforland 0.5) القياسـية ، اذ قدرت كثافة البكتريا بـ(10^{8}x1.5) خلية / سم٣ . بعدها حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال فـي التجـارب اللاحقة .

ولمعرفة تاثير المضادات الحياتية والسماد الكيمياوي على نمو البكتريا *A. Irakense* فقد اجريت التجربتين التاليتين :

التجربة الاولى : تاثير عدد من المضادات الحياتية في نمو البكتريا *A. irakense*

اجري هذا الفحص بحسب طريقة (Bauer وجماعته , 1966) ، اذ استعملت الاقـراص الورقية القياسية من شركة (Oxoid) لعشرة انواع من المضادات الحياتية الشائعة الاستعمال والمبينة في الجدول (2).

وذلك باستخدام وسط (Mueller Hinton agar) حيث تم تلقيح 250 مل من وسـط (Nutrient broth) بـ 1 مل من لقاح البكتريا *A. irakenes* ، بعدها حضن الوسط بدرجة حرارة 35مْ لمدة 48 ساعة، ثم نقل (0.1) مل من هذا العالق ، ونشر على سطوح ثلاثة اطباق حاوية على وسـط (Mueller Hinton Agar بشكل متجانس ، وبعد ذلك وضعت اقراص من المضادات الحيوية المشار اليها اعـلاه . وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 35مْ لمدة 24 ساعة ، وبعد مدة الحضن تم قياس قطر مناطق التثبـيط (Inhibition zone) وهي تمثل (منطقة عدم نمو البكتريا المحيطة بقرص المضاد الحيوي) وقورنت النتائج مـع منـاطق التثبيط القياسية المثبتة من قبل (NCCLS , 1992) .

التجربة الثانية : تاثير اليوريا وخامس اوكسيد الفسفور على نمو البكتريا *A. irakense*

لغرض دراسة تاثير سماد اليوريا (Urea) وخامس اوكسيد الفسفور (P_2O_5) على نمـو البكتريـا حضر وسط زرعي من (Nutrient Agar) ، ووزع على دوارق زجاجية سـعة 250 مـل وبواقـع 200 مـل/ دورق ، بعـدها عقمـت الـدوارق فـي جهـاز الموصـدة (Autoclave) بدرجـة حـرارة 121مْ وضغط 15 باوند/انج٢ لمدة 20 دقيقة . وبردت ثم اضيف التراكيز المحددة مـن كـل سـماد وهي (0 , 10 , 2 , 30 , 40) على حدة ثم صبت في اطباق بتري معقمة وبواقع ثلاثة اطباق / تركيز ولكل نـوع سماد مع ترك ثلاثة اطباق دون اضافة سماد باعتبارها معاملة سيطرة .

ولقحت جميع الاطباق بلقاح البكتريا بتخفيف (10^{-7}) وبمعدل (0.1) مل /طبق ، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 35 مْ لمدة 24 ساعة وحسبت كثافة البكتريا بحسب طريقة Clark (1965) .

- التحليل الاحصائي :

حللـــت التجـــارب المختبريـــة علـــى وفـــق التصـــميم العشـــوائي الكامـــل التعشـ Factorial experiment with completely Randomisid Design (C.R.D) وتم مقارنة المتوسطات حسب احتمال اقل فرق معنوي (L.S.D) وعند مستوى احتمال (5%) (الراوي وخلف الله ، 1980) .

3- النتائج والمناقشة :

التجربة الاولى : تاثير المضادات الحياتية في نمو البكتريا *A. irakense* .

اظهرت نتائج التجربة ان البكتريا *A. irakense* حساسة لمعظم المضادات المختبرة وقد اختلفت درجة الحساسية باختلاف انواع المضادات ، اذ اظهرت البكتريا حساسية عالية لكل من مضادات الحياتية الجنتامسين (Gentamycin) ، كلوكساسلين (Cloxacillin) ، ريفامبيسين (Rifampicen) ، التتراسايكلين (Tetracyclin) والامبيسلين (Ampicillin) ، فقد بلغت معدلات مناطق التثبيط (Inhibition zone) ، (40 , 30 , 2 , 19 , 15) ملم على التوالي (جدول 2) وشكل (1) . في حين اظهرت حساسية متوسطة لكل من فيوادنتين (Furadantin) ، ترايميثوبريم (Trimethoprime) وتوبرومايسين (Tobramycin) ، فقد تراوحت معدلات مناطق التثبيط (14 , 12.5 , 10) ملم .

ومن جانب اخر اظهرت البكتريا مقاومة لكل من المضادات البنسلين (Pencillin) والستربتومايسين (Streptomycin) (جدول 2) .

وقد يعود سبب مقاومتها لبنسلين والستربتومايسين الى امتلاكها غشاءً خارجياً يتمثل بمتعدد السكر الشحمي (Lipopolysaccharide) الذي يشترك مع بروتينات معقدة التركيب تمنع مرور الكثير من المضادات الحيوية الى داخل الخلية (Labischinski وجماعته , 1985 و Moor وجماعته , 1986) .

جدول (2) : قطر مناطق التثبيط (inhibition zone) بالملم للمضادات الحيوية الحساسة لها البكتريا *A. irakense*

ت	المضاد الحيوي		معدل قطر مناطق التثبيط (بالملم)	الشركة المصنعة
١-	جنتاميسين	Gentamycin	40	Oxoid
٢-	كلوكساسلين	Cloxacillin	30	Oxoid
٣-	ريفامبسين	Rifampicin	26	Oxoid
٤-	تتراسايكلين	Tetracyclin	19	Oxoid
٥-	امبيسلين	Ampicillin	15	Oxoid
٦-	فيورادنتين	Furadantin	14	Oxoid
٧-	ترايميثوبريم	Trimethoprine	12.5	Oxoid
٨-	توبرومايسين	Tobramycin	10	Oxoid
٩-	بنسلين	Pencillin	0	Oxoid
١٠-	ستربتومايسين	Streptomycin	0	Oxoid

A- جنتاميسين(Gm)[1] كلوكساسلين (OB) [2] ، ستربتومايسين(S t)[3] ، بنسلين (P)[٤]

B- امبسلين(Amp)[6] ، فيورادنتين (F)[5] ، ترايمثيوبريم(W)[10] ، توبروماسين(Tob)[8]

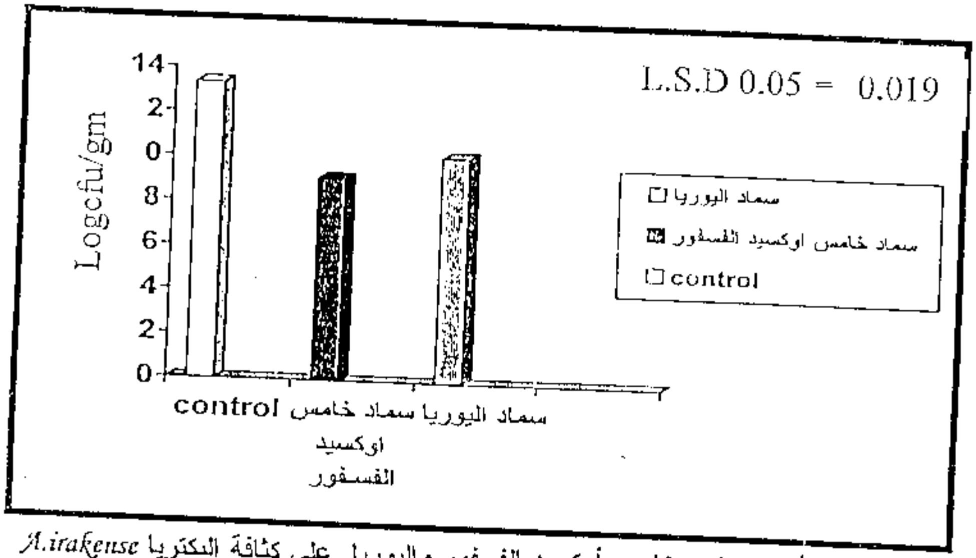
C- ريفامبين(RF)[9] ، تتراسايكلين (TC)[10] ، ستربتومايسين(St)[١١] ، بنسلين(P)[١٢]

شكل (1) حساسية البكتريا *A. irakense* لبعض انواع المضادات الحيوية

التجربة الثانية: تاثير نوع السماد الكيمياوي وتراكيزه على كثافة البكتريا *A. irakense*

كانت لنوع السماد الكيمياوي تاثيرات سلبية في كثافة البكتريا *A. irakense* وتجلى ذلك بانخفاض معنوي في كثافة البكتريا عند اضافة الاسمدة الكيمياوية ، فسماد خامس اوكسيد الفسفور ادى الى انخفاض الكثافة الى 10^{8}x12.07 وحدة تكوين مستعمرة/مل في حين كان تاثير سماد اليوريا في خفض الكثافة اقل من سابقة اذ بلغت 10^{9}x13.46 وحدة تكوين مستعمرة/مل اما في معاملة السيطرة فبلغت الكثافة 10^{12}x1.8 وحدة تكوين مستعمرة/مل شكل (2) .

ومن خلال استعراض النتائج السابقة يتبين ان الاسمدة الكيمياوية اثرت بشكل طفيف في كثافة البكتريا . وقد يعود سبب ذلك الى ان الاسمدة احدثت تغيرات في طبيعة الوسط الزرعي المنمى فيه البكتريا ، وخاصة تغير درجة حموضة الوسط اذ ان اليوريا (Urea) تحرف الوسط باتجاه القاعدة في حين (P_2O_5) يحرفه باتجاه الحموضة ، وقد يكون لهذا الانحراف اثر سلبي في نمو البكتريا .



شكل (2) : تأثير سمادي خامس أوكسيد الفسفور واليوريا على كثافة البكتريا *A.irakense*

- **تاثير التداخل بين نوع السماد الكيمياوي وتراكيزه في كثافة البكتريا في الوسط الزرعي Nutrient broth**

كان لنوع السماد الكيمياوي وتراكيزه تاثيرات سلبية في معدل كثافة البكتريا وتمثل ذلك بانخفاض معنوي في كثافة البكتريا ، اذ بلغت في تركيزي (10 , 20) غم من سماد اليوريا 10^{10}x1.1 و 10^{10}x9.2 وحدة تكوين مستعمرة/مل من الوسط الزرعي في حين كان معدل كثافة البكتريا عند اضافة سماد (P_2O_5) بنفس التراكيز السابقة هي 10^{10}x1.16 و 10^{9}x9 وحدة تكوين مستعمرة/مل من الوسط الزرعي ، اما في معاملة السيطرة فكانت الكثافة مرتفعة مقارنة مع المعاملات السابقة ، اذ تراوحت بين 10^{12}x1.9 الى 10^{12}x1.8 وحدة تكوين مستعمرة/مل من الوسط الزرعي .

وتشير هذه النتائج الى وجود علاقة عكسية ما بين تراكيز السماد الكيمياوي وكثافة البكتريا ، اذ انه كلما ازداد التركيز قلت معدلات كثافة البكتريا (جدول 3) .

جدول (3) تاثير التداخل بين نوع السماد الكيمياوي وتراكيزه في كثافة البكتريا *A. irakense* في الوسط الزرعي

نوع السماد الكيمياوي	التراكيز	معدل كثافة البكتريا في cfu/ مل
سماد اليوريا	0	10^{12}x1.8
	10	10^{10}x1.1
	20	10^{10}x9.2
	30	10^{8}x78
	40	76.33
سماد P_2O_5	0	10^{12}x1.9
	10	10^{10}x1.16
	20	10^{9}x9
	30	10^{8}x80
	40	10^{8}x66

المصادر العربية

1- الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله (1980) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . دار الكتب للطباعة والنشر – جامعة الموصل . (488) صفحة .

2- الزيدي ، حامد والهام سعيد عبد الكريم وضمياء محمود ابراهيم . (1987) . علم الاحياء المجهرية العملي . دار الكتب للطباعة والنشر – جامعة الموصل . (302) صفحة .

3- العنسي ، عادل عبد الغني لطف . (1999) . المقاومة المتكاملة لمرض الذبول الفيوزارمي في الطماطة المتسبب عن الفطر Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici (Sacc) snyder &Hansen . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة البصرة . (97) صفحة .

4- جاسم ، ناجي سالم. (1999) . المقاومة الحيوية والكيمياوية للفطر Fusarium graminearum (Schwab) الفيوزاريوم في الحنطة . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة البصرة . (78) صفحة .

٥- ناهر، عبد الزهرة طه . (2001) . استجابة نباتات الذرة الصفراء .Zea mays L للتلقيح ببعض انواع بكتريا *Azospirillum* المعزولة محلياً . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة/جامعة بغداد . ١١٩ صفحة .

٦– محمود، سعد علي زكي وعبد الوهاب محمد عبد الحافظ ومحمد الصادق محمد مبارك . (1997) . ميكروبيولوجيا الاراضي. الطبعة الثانية. القاهرة.

7- Baker , R.; Elad , Y. and Sneh , B. (1986) . Physical , Biological and host factors oniron competition in soils. In: Swinburnes , T.R.(Ed), Iron siderophores and plant disease . Plenum press . New York . P. 77-84 .

8-Bauer , A.W. ; Kirby, W.W.M.; Sherris, J.C. and Turck , M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by astanderized single disc method . Am. J. Clin. Pathol. 45 : 493-496 .

9- Clark , F.E. (1965). Agar-plats method for total microbial (C.F :Black , (1965) methods of soil analysis part 2 publisher madeson , wisconsin , USA. PP. 1572) .

10- Dobereiner , J. and Day, J. (1976). Associative symbiosis in tropical grasses. Characterization microorganisms and dinitrogen–fixing sites. In: Newton, W.E. and Nymans, C.J. (eds.). Proceeding of the Ist international symposium on nitrogen– fixation. Washington state University press pulluman. Vol. 2 . pp. 518-538 .

11- Jacoud C., Wadoux, P. and Pally , R. (1997). *Azospirillum lipoferum* CRTI/Maize association: promoting effect begins from the very early plant development stage. In : Elmerich, C. , Kondorosi, A. and Newton, W.E. (eds.). proceedings of the 11^{th}. international congress on nitrogen– fixation. Kluwer Academic publisher. Dodrecht, Boston, London. pp. 398.

12- Labischinski, H.; Barnickel , G.; Bkadaczek.; Naumann , D.; Rietschel , E. T. and Gresbrecht, P.(1985). High state of order isolated bacteria lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier of the outer memberane , J. Bacteriol. 162 (1) : 9-20 .

13- Leben, S.D.; Wadi , J.A. and Easton, G.D. (1987). Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillum dahliae*. phy to pathology. 77 : 1592-1595 .

14- Moor, R.A.; Bates, N.C. and Hancock, R.E.W. (1986). Interaction of poly cationic antibiotics with *Pseudomonas areuginosa* Lipopolysaccharide and astudies by using dansyl- polymyxin. Antimicrob. Agents chemother. 29 (3) : 496-500 .

15- NCCLS, Subcommittee on Antimicrobial susceptibility testing: performance standards for antimicrobial disc susceptibility test. Approved standard: ASM-2, January., (1992). The National committee for clinical Laboratory standards .

16- Reeves, D.S. ; Phillips, I.; Williams, J.D. & Wise, R. (1978) . *Laboratory methods in Antimicrobial chemotherapy*. First published, Churchill livingstone, Edinburgh London and New York .

Abstract

The Study of *A. irakense* showed that it was sensitive to most antibiotics that used except the antibiotic pencillin and strepotomycin antibiotics which showed that the bacteria was resistant to them.

The type of chemical fertilizer had negative influence on bacterial intensity, it showed as significant decline of bacterial intensity , as the chemical fertilizer (Urea) increaseor adding to growth medium , it reached to $13.46x10^9$ colony forming unit ml, where as the bacteria , while it reached to $12.07x10^8$ colony forming unit /ml when (p_2O_5) was added to growth medium .