تقييم الفعالية ضد الفطرية لعزلات محلية من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* المنتجة للـــسايدروفور

حسن علي عبدالرضا
كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

المستخلص

نفذت هذه الدراسة لتقييم الفعالية ضد الفطرية لعزلات محلية من بكتريـــا *Pseudomonas fluorescens* تجـــاه فطريـــات *Alternaria alternate* و *Rhizoctonia solani* واختبار قدرتها على انتاج مركبات Siderophores ومحاولة عزل هذه المركبات ومعرفـــة الاحمـــاض الامينيـــة الداخلة فى تركيبها. تم اعتماد المواصفات المجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية لغرض عزل وتشخيص هذه البكتريا من نماذج تربـــة اخذت من مواقع زراعية مختلفة فى محافظة الانبار. أظهرت النتائج ان 29 عزلة من مجموع 45 عزلة حملت صفـــات النـــوع *Pseudomonas fluorescens* وان 21 عزلة منها قادرة على انتاج مركبات Siderophore امتلكت معظم العزلات قدرة عالية على كبح نمو فطـــرى *Alternaria alternate* و *Rhizoctonia solani* وقد تفوقت عزلتين منها فى منع نمو هذين الفطرين بصورة تامة على وسطى KB و PDA وقد بينـــت نتـــائج كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة ان الـــ Siderophore المنتج من هاتين العزلتين يتكون من ثلاث احماض امينيـــة هـــى الميثيونيـــن والتايروســـين واللايسين.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(4) : 21-24, 2005 Abdul Rath

EVALUTATION THE ANTI-FUNGAL ACTIVITY OF LOCAL SIDEROPHORES PRODUCING *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ISOLATES

H. A. Abdul-Rath
College of Veterinary Medicine - University of Baghdad

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the antifungal efficiency of different local isolates of *Pseudomonas fluorescens* against *Rhizoctonia solani* and *Alternaria alternate* and their ability to produce siderophores and attempt to isolate these compounds and identifies its amino acids content. The morphological,cultural and biochemical properties were dependable to isolate and identifie these bacteria from fourty-five soil samples which were collected from various sites in Al-Anbar governorate. According to the diagnostic features the results showed that 29 of the isolates were Pseudomonas isolates which were obtained from these soil samples were belong to *Pseudomonas fluorescens* (three of them regarded as biovar1,three isolates as biovar11,seven isolates as biovar111, two isolates as biovar1V and fourteen as biovar V).Twenty-one of these isolates showed the ability to produce siderophore compounds. Most of the *Pseudomonas fluorescens* isolates inhibited the growth of *Rhizoctonia solani* and *Alternaria alternate* with the superiority of two of these isolates to completely inhibit the growth of these two fungai isolates on Kings B and PDA media.

المقدمة

ازداد الاهتمام فى العالم بـــبرامج المكافحـــة الاحيائية سواء البكتيرية او الفطرية او حتى الحشـــرية لما لهذه المسارات مـــن اهميـــة بالغـــة فـــى المجـــال التخصصى للمسبب المرضى المطلوب مكافحته فضـــلا عن رخص هذه الطريقة وما تسببه الطـــرق التقليديـــة للمكافحة بالمبيدات الكيمياوية من مخاطر تلوث البيئة.

تعد بكتريـــا الزوائـــف وخاصـــة الزوائـــف الومضائيـــة(Fluorescent pseudomonad) مـــن الاحياء المجهرية البالغة الاهميـــة لمـــا تملكـــه مـــن خصائص عديدة فهى بالاضافة لكونها من اهم مجـــاميع البكتريا المتواجدة فى محيط الجذور والمحفـــزة لنمـــو النبات (Plant growth promoting (4 ; 7) فانـــها تمتاز ايضا بتحملها للظروف الفسلجية والبيئية المختلفة وقدرتها التثبيطية تجاه بعـــض الفطريـــات الممرضـــة للنبات (2 ; 14) . لذلك اتجـــهت بعـــض الشـــركات لاستغلالها فى انتاج مبيدات حيويـــة(Biopesticide) لاغراض تجارية كما فى مبيد(Blight Ban) .مـــن هنا فقد استهدفت الدراسة الحالية عزل وتشخيص هـــذه البكتريا من ترب زراعية مختلفة فى محافظة الانبـــار واختبار قابليتها على انتاج مركبـــات Siderophore كما استهدفت الدراسة ايضا التعرف على قـــدرة هـــذه العزلات المحلية فى كبـــح نمـــو بعـــض الفطريـــات المرضية المنتشـــرة فـــى العـــراق ومحاولـــة تحديـــد الاحمـــاض الامينيـــة الداخلـــة فـــى تركيـــب الـــSiderophore المنتج من قبلها.

*تاريخ استلام البحث 2005/3/29 تاريخ قبول البحث 2005/6/29

المواد وطرائق العمل

-العزل والتشخيص

تم جمع 45 عينة تربة من تسعة مناطق زراعية في محافظة الانبار شملت القائم وراوة وعنة وحديثة وهيت والرمادي والخالدية والجزيرة والفلوجة وبواقع خمسة عينات لكل منطقة.وبعد تخفيف العينات بالماء المعقم لحد التخفيف الخامس زرعت هذه العينات في اطباق معقمة حاوية على وسط King B وحضنت بدرجة حرارة 28 م^0 لمدة 24-18ساعة . اعيدت زراعة المستعمرات ذات اللون الاخضر- المصفر على نفس الوسط ثم اجريت عليها فحوصات مجهرية وسلسلة من الاختبارات الكيموحيوية واعتمدت المصادر العلمية المختلفة في تشخيص العزلات تلك (1 ; 6 ; 13).

-اختبار انتاج واستخلاص المركبات الخالبة للحديد الـ Siderophores

استخدمت الطريقة التي اوردها Schwyn و Neiland (11) في اختبار انتاج مركبات السايدروفور في حين اعتمدت طريقةDemange واخرون(3) في عزل واستخلاص هذه المركبات بينما اعتمدت المعادلة الواردة في Gowenkock واخرون (5) في ايجاد قيمة ثابت الجريان Rf .

-اختبار الفعالية التثبيطية ضد الفطرية

اختبرت العزلات البكتيرية المنتجة للـSiderophore للتعرف على قابليتها التثبيطية ضد الفطريات الممرضة للنبات *Alternaria alternate* و*Rhizoctonia solani* والتي تم الحصول عليها من كلية العلوم- جامعة النهرين . زرعت هذه العزلات البكتيرية على وسطي King B و PDA في اطباق بطريقتين تم في الاولى نشر 0.1 مل من عالق البكتريا على سطح هذين الوسطين باستخدام الناشر وفي الثانية زرعت البكتريا بطريقة التخطيط باستخدام Swab وحضنت على 28 م لمدة 24 ساعة ثم زرعت اقراص (قطرها 4 ملم) من هذين الفطرين في مركز الوسط الزرعي في الطبق وحضنت على 28 م لمدة 4 ايام وفحصت قابلية هذه الفطريات على النمو.

النتائج والمناقشة

-العزل والتشخيص

اظهرت نتائج الفحوصات الزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية ان 29 عزلة تحمل صفات بكتريا *Pseudomonas fluorescens* واعتمادا على ما اورده Stainer واخرون (12) فقد ظهر ان ثلاث عزلات تعود للطراز الحيوي Biovar 1 وثلاث اخرى للـ Biovar 11 وسبعة لـBiovar 111وعزلتين للـBiovar 1V واربع عشرة عزلة تتبع للـ Biovar V وقد وجد ان ثمانية من هذه العزلات التسعة والعشرون قد حصل عليها من مدينة راوة في حين لم تعزل هذه البكتريا من مناطق الخالدية والقائم والفلوجة والجدول (1) يوضح نتائج الاختبارات التشخيصية لهذه العزلات البكتيرية.

جدول 1. نتائج بعض الاختبارات التشخيصية لبكتريا *P. fluorescens*

الاختبار	النتيجة	الاختبار	النتيجة	الاختبار	النتيجة
صبغة كرام	-	الومضائية على وسط السترمايد	+	انتاج الاندول	-
الومضائية	+	تحليل التوين	+	استهلاك واكسدة السكريات	
الاوكسيديز	+	انتاج البايوسيانين	-	Arabinose	+
الكاتليز	+	النمو بدرجة 4 م	+	Glucose	+
اسالة الجيلاتين	+	النمو بدرجة 41 م	-	Lactose	+
تحليل النشا	-	انتاج الليفان	-	Maltose	-
اختزال النترات	-	اليوريز	+	Mannitol	+
انتاج H2S	+	استهلاك السترات	+	Mannose	+
				Xylose	-
الحركة	+	فوكس بروسكاور	-	Meso-inositol	+
انتاج البرولاسين	-	احمر المثيل	-	Sorbitol	+

-انتاج مركبات الـ Siderophore

اظهرت معظم عزلات *Pseudomonas fluorescens* قدرة على انتاج مركبات الـ Siderophore اذ استطاعت 21 عزلة انتاج هذه المركبات.

ان هذه النتائج تتفق مع ما اشار له Nudelman واخرون (10) وLeong و Expert (8) و Neiland و Leong (9) من قدرة هذه البكتريا على انتاج هذه المركبات والتى يطلق عليها احيانا Pyoverdine والتى تعمل على خلب الحديد من الوسط وبالتالي تقلل من فرص نمو الاحياء المجهرية الموجودة فى نفس البيئة.

-الفعالية التثبيطية ضد الفطرية

اوضحت النتائج مقدرة اغلب عزلات *P fluorescens* علىتثبيط نمو الفطريين *Alternaria alternate* و *Rhizoctonia solani* على وسط KB الذي يعد مناسبا لانتاج Siderophore اذ استطاعت 20 عزلة من اصل 21 عزلة كبح نمو فطر *Rhizoctonia solani* تماما اذ بلغ معدل قطر الفطر 4 ملم (وهو نفس قطر الفطر المزروع) مقارنة بمعاملة المقارنة والذى بلغ 17 ملم ورغم ان هذه العزلات كانت مثبطة لنمو الفطريات حتى على وسط PDA الا ان هذه الفطريات استطاعت النمو قليلا على هذا الوسط رغم وجود البكتريا وهذا يلاحظ من معدل قطر هذا الفطر فى تلك المعاملات فضلا عن معاملة المقارنة والتى بلغ فيها 25 ملم وهذا قد يعود لان هذا الوسط هو من الاوساط الملائمة لنمو الفطريات. بصورة عامة اظهرت النتائج اتجاها مماثلا لتاثير هذه العزلات على نمو الفطر *Alternaria alternate* ولكلا الوسطين. ان هذا التأثير التثبيطي قد يعود لاليات مختلفة منها انتاج بعض مضادات الحياة او قدرتها على الاستحواذ على مصادر الحديد(خلب الحديد) فى بيئة الاحياء الدقيقة مما يمكنها من منع وصول الفطر المتواجد مع البكتريا الى مصدر الحديد او المغذيات الاخرى مما يؤدى الى ايقاف نموه وموته ومن خلال نتائج هذا الاختبار ابدت العزلتين اللتين اعطيت الرمز والرقم المحلى MA 41 و MA82 اعلى قدرة تثبيطية لنمو هذين الفطرين بصورة كاملة على كلا الوسطين (جدول 2).

جدول 2. تاثير عزلات *Pseudomonas fluorescens* المنتجة للسايدروفور فى اقطار نمو الفطريات *R. solani* و *A. alternate* (ملم) على وسطى KB وPDA

Alternaria alternata		*Rhizoctonia solani*		اسم الفطر
PDA	King B	PDA	King B	الوسط الزرعى / رقم العزلة
5	4	4	4	MA12
9	4	6	4	MA20
6	4	5	4	MA21
5	4	4	4	MA22
5	4	5	4	MA23
5	4	5	4	MA26
5	5	7	4	MA27
4	4	5	4	MA28
6	5	5	4	MA31
4	4	6	4	MA33
8	4	5	4	MA34
5	4	5	4	MA37
6	4	5	4	MA39
4	4	6	4	MA40
4	4	4	4	MA41
5	4	5	4	MA44
5	4	6	4	MA64
15	10	6	5	MA69
8	9	10	8	MA70
4	4	5	4	MA77
4	4	4	4	MA82
40	40	25	17	Control

-كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC

اوضحت النتائج التي تمت على الـ Siderophore المنتج من العزلتين MA41 و MA82 واستنادا الى البقع Spots الناتجة على الصفيحة بعد عملية الترحيل الكهربائي للعينات المهضومة بواسطة 6N HCl وبعد حساب ثابت الجريان Rf لهذه البقع والاستعانة بجدول خاص لحساب Rf للاحماض الامينية Course work Bank ان الاحماض الامينية المكونة للـ Siderophore المنتج هي الميثونين والتايروسين واللايسين وهذا يتماثل مع ما اشار له Demange واخرون (3).

نستنتج من الدراسة الحالية انتشار *Pseudomonas fluorescens* في التربة الزراعية في محافظة الانبار وان تلك البكتريا التي تم عزلها لاول مرة من هذه التربة تمتلك فعالية ضد فطرية عالية بحيث استطاعت بعض هذه العزلات منع نمو الفطريات تماما مما يؤشر فرصة ادخالها في برامج المكافحة الاحيائية بعد تحميلهاعلى حامل مناسب كما بينت هذه الدراسة ان هذه العزلات منتجة لمركبات Siderophore وقد تم معرفة طبيعة الاحماض الامينية الداخلة في تركيبها والتي تسجل لاول مرة على المستوى البحثي في العراق ايضا.

المصادر

1-Baron, E. J. and J. M. Finegold. 1990. Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology, C. V. Mosby Company. Baltimoro.

2-DE La, L. Fuente, N. Bajsa, P. Bagnasco, L. Quagliotto, L. Thomashow and A. Arias. 2001. Antibiotic production by biocontrol *pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere. E.mail: leo@ iibce.edu.uy.

3-Demange P., S. Wendenbaum, A. Bateman, A. Dell and M. A. Abdallah. 1987. Bacterial siderophores: structure and physiochemical properties of pyoverdines and related compounds. In Winklemann, G., VanderHelm, D., Neilands, J. B. (Editors). Iron Transport in Microbes, plants and Animals, VCH verlags gesellshaft Mbh, weinheim, Germany. p.p167-187.

4-Deweger, L. A., B. Schippers and B. Lugtenberg. 1987. Plants growth stimulation by biological interference in iron metabolism in the rhizospher.In: Winklemann, G., V ander Helm, D., Neilands, J. B. (Editors). Iron Transport in microbes,Plants and Animals VCH verlagsgesellshaft mbh, weinheim, Germany. p.p.387-400.

5-Gowenlock, A. H, J. R. McMurray and D. M. Mclauchlan. 1988, Parctical Chemical Biochemistry, 6th edition. Heinmann Medical Books, London, U. K. p.p.1050.

6-Holt ,J. G., N. R. Krieg, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 9 edition Williams and wilkins, Baltimore, U.S.A.

7-Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teinzem and M. N. Schroth.1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature 286:885-886.

8-Leong, S. A. and D. Expert. 1989. Siderophores in plant pathogen interactions. In. Kosuge, T. & Nester, E. W. (Editors). Plant-Microbe interactions: molecular and gentic perspectives. volume 3. McGraw-Hill. Com. U.S.A. p.p:62-83.

9-Neilands, J. B., S. A. Leong. 1986. Siderophres in relation to plant growth and disease. Ann. Rev. Plant Physio. 37:187-208.

10-Nudelman, R., O. Ardon, Y. Hadar, Y. Chen, J. Libman and A. Shanzer. 1998. Modular fluorescent-labeled siderophore analogues. J. Medi. Chemistry. 4(10): 1671-1678 (Abstract).

11-Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the determination of siderophores. Analy Biochem. 160:47-56

12-Stainer, Y., N. J. Palleroni and M. Dowdoroft. 1966. The aerobic pseudomonas: Taxonomic study, J. Gen. Microbio. 43:159-271.

13-Starr, M. P., H. Stop, H. G. Truper and Schlegel. 1981. The Prokaryotes. vol 1, Springer-Verlage,Berlin,Germany.

14-Thrane C., S. Olsson, T. H. Nielsen and J. Sorensen. 1999. Vital fluorescent strains for detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* challenged with viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens* DR 54. FEMS Microbiol.30:11-23.