Mesopotamia J. of Agric. ISSN:2224-9796(Online) مـــجـلة زراعـــة الـرافــدين
Vol. (41) No. (4) 2013 ISSN: 1815-316x (Print) المجلد (41) العدد (4) 2013

عزل أكتينومايسيتات التربة المنتجة للمضادات الحيوية للفطريات الممرضة للنبات

نديم احمد رمضان فرح خالد الفيل
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم وزارة الصناعة والمعادن/ الشركة العامة لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية نينوى

E-mail: nadeemramadan@yahoo.com

الخلاصة

تم الحصول على 109 عزلة من الاكتينوماسيتات Actinomycetes من 140 عينة تربة جمعت من مناطق مختلفة من محافظة نينوى ودهوك واربيل وكركوك وتكريت وبغداد والنجف وكربلاء. اظهرت نتائج التشخيص بتقنية الشريحة الزجاجية والتشخيص بواسطة الاختبارات الكيموحيوية و الانزيمية وجود العزلات والاجناس التالية (69) عزلة تابعة لجنس *Streptomyces* و27 عزلة تابعة لجنس *Streptoverticillum* و7عزلات تابعة لجنس *Nocardia* وعزلة واحدة تابعة للجنس *Rhodococcus* و5 عزلات لم تشخص لصعوبة نموها على الاوساط التشخيصية و الكيموحيوية.وان العزلة المنتجة التي ثبطت اكبر عدد من فطريات الاختبار شخصت الى مستوى النوع و كانت تعود الى النوع *Streptomyces purpureus*.

الكلمات الداله: الفطريات الممرضة للنبات، الاكتينوميسيتات.

تاريخ تسلم البحث: 2012/3/29 وقبوله: 2012/6/18

المقدمة

نظرا للارتفاع السريع في مستويات الاصابة بالامراض الفطرية التي تصيب الانسان والنبات، ومع تزايد مقاومة الفطريات للمبيدات بمعدل ينذر بالخطر، فقد حدث تطور في مجال تصنيع المبيدات للفطريات، الا ان هذه المبيدات قد تكون غالية الكلفة، وان الاستعمال العشوائي والمستمر لها يؤدي الى العديد من التأثيرات الجانبية فضلا عن ازدياد عدد العزلات الفطرية المقاومة لتلك المبيدات ولمحاولة تقليل الاعتماد على المبيدات الكيميائية المنتجة صناعيا، فإن الطلب متزايد لايجاد مضادات حيوية جديدة وآمنة مع اعراض جانبية أقل، لذا فان البديل الافضل لتلبية هذه الحاجة المتزايدة المضاد الفطرية القليلة الكلفة، كذلك المنتجات المستخلصة طبيعيا والتي ينتجها عدد من انواع الاحياء المجهرية بكميات ضئيلة من خلال مسارات ايضية محددة تتضمن سلسلة من التفاعلات بوجود انزيمات متخصصة يطلق عليها عمليات الايض الثانوي Secondary Metabolism (مصطفى، 2009). ان العديد من الاكتينوميسيتات ولاسيما التي تعود الى الجنس *Streptomyces* لها القدرة على انتاج مركبات المكافحة البيولوجية ومنها الانزيمات المحللة للجدر الخلوية مثال Chitinase وâ-1.3-glucanase التي تمنع نمو العديد من الفطريات ومنها الممرضة للنباتات (Fguira واخرون، 2005 وJoo، 2005 وTaechowisan واخرون،2005). منها التي تاثر على الجدر الخلوية لفطريات *Fusarium oxysporum*،*Sclerotinia minor*، and *Sclerotium rolfsii* (Atta واخرون، 2011). تعد الفطريات احد اهم مسببات امراض النبات وتسبب خسائر تفوق كلا من البكتريا والفيروسات وتلعب دورا سلبيا في تدهور الانتاج الزراعي كماونوعاوتسبب خسائربالغة للمحاصيل الزراعية ولاسيما في الدول النامية لتصل احياناً الى مايقارب 12%. تنتشر الاحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية بصورة واسعة في الطبيعة، وتعد التربة المصدر الرئيس لعزل الكثير منها، ويتم عادة اختبار قدرة الاحياء المجهرية المعزولة من مصادرها المختلفة على انتاج مضادات حيوية من خلال معرفة تأثيرها التضاديعل ى أحياء مجهرية أخرى تعرف بأحياء الاختبار Test Organisms (العراقي ورمضان، 2010). أوجب التقدم الهائل في مجالات العلوم المختلفة البحث عن مصادر رخيصة ووفيرة لسد الحاجات المتجددة للمزيد من السكان، و لما كانت الاحياء المجهرية قادرة على انتاج مواد ذات قيمة اقتصادية عالية البحث عن الكثير في هذا المجال، ومنها المضادات الحيوية وهي احدى المنتجات الميكروبية التي لها اهمية كبيرة في حياتنا اليومية من النواحي الصحية للانسان والحيوان وفي السيطرة على امراض النبات المختلفة، تنتشر الاحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية بصورة واسعة في الطبيعة، وتعد التربة المصدر الرئيس لعزل الكثير منها، ويتم عادة اختبار قدرة الاحياء المجهرية المعزولة من مصادرها المختلفة على انتاج مضادات حيوية من خلال معرفة تأثيرها التضادي على أحياء مجهرية أخرى تعرف بأحياء الاختبار (ايليا، 2008). تهدف الدراسة الحالية الى

البحث مستل من اطروحة الدكتوراه للباحث الثاني.

عزل الاكتينومايسيتات من التربة وتشخيصها وتحديد المنتج منها للمضادات الحيوية لاستخدامها في مكافحة الفطريات الممرضة للنبات.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات Samples Collection: جمعت 140 عينة تربة (نصف كغم/عينة) وعلى مدى 3 اشهر وخلال عام 2010 لعزل الاكتينومايسيتات من أنحاء ومناطق مختلفة من محافظة نينوى ودهوك واربيل وكركوك وتكريت والنجف وكربلاء وبغداد، وتضمنت هذه العينات ترب لحدائق منازل ومدارس وجامعات ومستشفيات وكذلك ترب حقول لتربية الاغنام والابقار وحقول دواجن ومزارع تابعة لأقضية ونواحي وقرى مختلفة تعود اغلبها لمحافظة نينوى وأطراف بحيرة سد الموصل وحواف نهر دجلة.أخذت عينات التربه بعد ازالة الطبقة السطحية من التربه وعلى عمق5 -15سم بعد ازالة 5 سم من سطح التربة ووضعت في أكياس من البولي اثيلين وأُغلقت بإحكام ثم وضعت في الثلاجة لحين الإستعمال (ايليا، 2008).

العزل من التربة: عوملت التربة مسبقا بمادة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ بنسبة 10: 1 وزن/ وزن. وحضنت بالحاضنة في درجة حرارة 37°م لمدة 4 أيام لغرض التجفيف، وبعد انتهاء فترة التحضين تم عمل معلق من التربة بإستعمال محلول رنكر المعقم وذلك بإضافة 1 غم من التربة إلى 9 مل من المحلول في انبوبة اختبار نظيفة ومعقمة فتم الحصول على التخفيف 10^{-1} والذي نقل منه 1 مل إلى أنبوبة اختبار ثانية تحتوي ايضاً على 9 مل من المحلول المذكور، كررت العملية إلى حد التخفيفة 10^{-4} اخذ 0.5 مل من التخفيف 10^{-3} و10^{-4}، ووضع في أطباق بتري معقمة ثم أضيف لكل طبق20 مل تقريبا من وسط العزل الاولي Glycerol Yeast Extract Agar (GYEA) الذائب في درجة40°م ودورت الأطباق بهدوء لمزج المكونات(3 اطباق لكل عينة تربه) وحضنت بالحاضنة في درجة حرارة 28°م لمدة 7-14 يوم لحين ظهور نمو مستعمرات الاكتينومايسيتات. بعدها نقلت المستعمرات المنتخبة والتي كانت ذات مظهر اما تباشيري أو شمعي أو جلدي من المجموع الزرعي إلى أطباق حاوية على الوسط نفسه (GYEA) ثم حضنت في درجة 28°م ولمدة 7 أيام وبعد الحصول على عزلات نقية تم تحويلها إلى أنابيب حاوية على الوسط المائل نفسه وايضاً حُضِنَتْ لمدة 7 أيام في درجة حرارة 28°م، وبعدها حفظت بالثلاجة في درجة 4°م لحين إجراء الاختبارات التشخيصية واختبارات انتاج المضادات الحيوية عليها (Sahin و Ugur، 2003؛ Oskay وآخرون، 2004).

التشخيص Identification:شخصت عزلات الاكتينومايسيتات اعتمادا على الطرق التالية:

1- تقانة الزرع على الشريحة الزجاجية Slide Culture Technique: استعملت هذه التقنية لملاحظة الغزل الهوائي Aerial mycelium والغزل الارضي Substrate mycelium وترتيب سلاسل السبورات للعزلات بإستعمال المجهر الضوئي، وقد تم اجراء هذه الطريقة التي اتبعها الاسعيد (2009).

2- الاختبارات الكيموحيوية والإنزيمية والشكلية: اجريت العديد من الطرق لغرض تشخيص الاكتينومايسيتات المعزولة ومنها استهلاك المصادر الكاربونية (Williams وآخرون، 1983) و اختبار تميع الجلاتين (Prescott و اخرون، 2005) و اختبار تحلل النشا (Lennette وآخرون، 1985) اختزال النترات (Finegold وآخرون، 1978) و اختبار انتاج إنزيم اليوريز (Cruickshank وآخرون، 1975) واختبار انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين (Harley و Prescott، 1996) و اختبار انتاج إنزيم الكتاليز(Koneman وآخرون، 1997) **و**اختبارتحلل الاسكولينواختبار تحلل الدم (Stukus،1997) واختبار إنتاج إنزيم اللسثنيز وتحمل الاكتينومايسيتات للتركيز 5 % و7% من ملح الطعام وتأثير إستعمال أزايد الصوديوم والفينول (Chaphalkar وDey، 1996 و الفيل، 2012).

3- شكل النمو في الوسط السائل: لُقِحَ وسط Nutrient Broth Medium (NBM) بجزء من مزرعة نقية للاكتينومايسيتات، وحضن في درجة حرارة 28°م لمدة 7 أيام. لوحظت التغيرات الحاصلة في شكل النمو وقدرة الاكتينومايسيتات على إنتاج الصبغات الخارجية الذائبة في الماء (ايليا، 2008).

اختبار قابلية عزلات الأكتينومايسيتات على انتاج المضادات الحيوية: لغرض اختبار قابلية عزلات الأكتينومايسيتات على إنتاج المضادات الحيوية وبيان فعالياتها تجاه عدد من الفطريات الممرضة للنبات.

أ - وسط انتاج المضادات:حُضِّر وسط إنتاج المضادات الحيوية باذابة (غم/ لتر): 0.8 NaCl و1 NH4Cl و 0.1 KCl و0.1 $K2HPO_4$ و 0.2 $MgSO_4$ و0.04 CaCl و10 كلوكوز و3 مستخلص الخميرة في 1 لترماء مقطر وباس هيدروجيني7.3 ووزع في دوارق زجاجية بمقدار50 مل لكل دورق سدت الدوارق بإحكام بسدادات قطنية،وغلفت برقائق الالمنيوم، ثم عقمت بجهاز المعقام. تركت الدوارق لتبرد ثم لُقِحَت بلقاح الاكتينومايسيتات المحضر بعمر3أيام وبنسبة2% (حجم/حجم) ووضعت الدوارق بالحاضنة الهزازة في

درجة حرارة 28°م وبسرعة رج 140 دورة/ دقيقة ولمدة 7 أيام.

ب - تحضير لقاح عزلات الأكتينومايسيتات: حُضِّر وسط اللقاح من مكونات وسط الانتاج والمذكور في الفقرة (أ) ووزِّع في دوارق زجاجية وبواقع 50 مل لكل دورق، عُقِمَ الوسط بجهاز المعقام في درجة حرارة 121°م وتحت ضغط 1.5 كغم / سم2 لمدة 15 دقيقة. بعد ذلك لُقِحَ الوسط بنقل جزء من مزرعة الاكتينومايسيتات النقية والنامية على وسط (GYEA) أو النامية على وسط Glycerol (GAA) Asparagine Agar ثم وضعت الدوارق بالحاضنة الهزازة Incubated shaker موديل SI-600R المصنعة في Korea من قبل شركة Medline في درجة حرارة 28°م وبسرعة رج 140 دورة/دقيقة ولمدة 3 أيام (ايليا، 2008).

الفطريات الممرضة و النباتات المعزولة منها: تم الحصول على الفطريات التالية من بنك السلالات في قسم علوم الحياة – كلية العلوم–جامعة الموصل و المعروفة بقدرتها على اصابة النباتات المعزولة منها *Alternaria alternate* الباقلاء و *Aspergillus niger Aspergillus flavous* من بذور الحمص و*Cunninghamella* sp. القرعيات و *Drechslere* sp الباقلاء و*Fusarium oxysporum* شعر البنات و *F. oxysporum* الداؤدي و*F. oxysporum* الرقي و*F. oxysporum* الحمص و *F. oxysporum* الفرولة و*Macrophomina phasiolina* السمسم و *Rhizoctonia solani* الفرولة و*Trichoderma harzianum* الفراولة و*Ulocladium botrytis* الباقلاء .

تحضير العالق البوغي الفطري: بعد ان تم تنمية الفطريات المستعملة في الاختبار على أطباق بتري حاوية على وسط Potato Dextrose Agar (PDA) المعقم والمحضر باس هيدروجيني 5.6، أخذ بوساطة ثاقبة الفلين قرص من الفطر 4 ملم، ووضع في قنينة زجاجية صغيرة حاوية على 5 مل من الماء المقطر المعقم (مررت من خلال الشاش لاستبعاد الغزل الفطري) ورجت القنينة للحصول على توزيع متجانس من الابواغ).

التاثير التثبيطي المضاد الحيوي على الفطريات الممرضة المستعملة في الاختبار: لُقِحَتْ قناني زجاجية حاوية على 25 مل من وسط السابرويد أكار(SA) المعقم والمحضر باس هيدروجيني 5.6 بـ 0.1 مل من العالق البوغي لكل فطر من الفطريات المستعملة في الاختبار بوساطة ماصة دقيقة معقمة مع الرج الجيد لضمان التوزيع المتجانس للابواغ مع الوسط ثم صبت في أطباق بتري معقمة وبعد أن بردت الأطباق استعملت طريقة الانتشار بحفر الأكار Well diffusion method إذ تم عمل حفر بوساطة ثاقبة الفلين المعقمة في الطبق الملقح بالعالق البوغي الفطري ووضع في كل حفرة 100 مايكرو ليتر من المزرعة السائلة للاكتينومايسيتات.بعد ان تم تنميتها على وسط إنتاج المضادات الحيوية بالحاضنة الهزازة ولمدة7أيام في درجة حرارة 28°م.استعمل الماء المقطر المعقم لغرض المقارنة ثم وضعت الأطباق بهدوء في الحاضنة الاعتيادية في درجة حرارة 28°م ولمدة3 أيام،وبعد انتهاء فترة التحضين تم قياس مناطق تثبيط النمو(قطر التثبيط)حول الحفر في الطبق الملقح بالفطريات (Augustine وآخرون،2005؛ Annonymous، 2010).

تم اختيار العزلة رقم MUAc3 والتي شُخصت على أنها *S. purpureus* (الفيل، 2012) لكونها ذات تأثير مثبط لأكبر عدد من الفطريات. لقحت دوارق زجاجية حاوية على وسط انتاج المضادات الحيوية **(AP)** Antibiotics Production المعقم و المحضر باس هيدروجيني 7.3 بلقاح العزلة MUAc3 وبنسبة 2% (حجم/ حجم) ووضعت الدوارق بالحاضنة الهزازة في درجة حرارة 28°م وبسرعة رج 140 دورة/ دقيقة ولمدة 7 أيام.

النتائج و المناقشة

العزل: اختيرت العزلات اعتمادا على الصفات الشكلية ومظهر المستعمرات الذي يكون اما تباشيري أوشمعي أوجلدي وعلى التصاق المستعمرة على وسط (GYEA)إذ تكون غائرة في الوسط الزرعي،وهذه كانت صفة اساسية عند العزل الأولي كما ذكرHolt وآخرون(1994) وايليا (2008). تمتاز الاجناس التابعة لمجموعة الاكتينومايسيتات بصعوبة العزل الأولي وصعوبة التشخيص وهذا ما تم ملاحظته من خلال دراستنا خلال فترة البحث، وهذا ما أشار إليه الباحث Holt وآخرون (1994) وكذلك السماك (2006)، والسبب في ذلك يعود إلى ان أغلب أفرادها يمتاز بظاهرة تعدد الاشكال إذ يتغير شكل ولون المستعمرة مما يؤدي إلى الشك والارباك في معرفة النوع المعزول، هذا فضلاً عن بطء نموها إذ تحتاج من 4-14 يوما للنمو، وبطء نموها يؤدي إلى انتشار الانواع البكتيرية سريعة النمو المتواجدة بشكل طبيعي في التربة مثل النوع *Bacillus* الذي يطغى على مستعمراتها، وبالتالي يصعب عزلها وتنقيتها وهذا يتفق مع ما أشار إليه السماك 2006 والاسعيد 2009. كان لمعاملة التربة بمادة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ بنسبة (1:10) وتجفيفها في درجة حرارة 37

مْ دور كبير في العزل الأولي، وذلك لان تجفيف التربة أدى إلى اختزال أعداد البكتريا الخضرية المتواجدة بشكل طبيعي في التربة من جهة،والى رفع قيمة الاس الهيدروجيني لتحديد نمو معظم الفطريات من جهة اخرى(نهر وآخرون،1997). تعد التربة بيئة طبيعية لتواجد الاكتينومايسيتات، وغالبا ما تكون أعلى نسبة للعزل من التربة، ولاحظنا تواجدها بشكل كثيف في مناطق تربية الحيوانات كالأغنام والابقار كونها غنية بالمواد العضوية وهذا ما ذكره ايضا (Prescottوآخرون، 2005).
يوضح الجدول (1) تواجد الاكتينومايسيتات في تربة المناطق القرى وبالأخص التابعة لمحافظة نينوى وهذا يتفق مع ما توصل إليه ايليا (2008) بان التربة العراقية تعد مصدراً غنياً لأنواع مختلفة من الاكتينومايسيتات وبالأخص الجنس *Streptomyces*. إن التغيرات الشكلية التي لاحظناها أثناء عزل وتشخيص العزلات لا سيما التابعة لجنس *Streptomyces* قد يعود ربما إلى عوامل عديدة اهمها كبر حجم المادة النووية والتغيرات الطبيعية التي تحصل عليها، إذ تبلغ بحدود 10.5×10^{-3} Kbp. ونسبة السيتوسين الى الكوانين عالية والبالغة 69-78% وعليه يلاقي المصنفون صعوبة في وضع خطوط رئيسية واضحة لتشخيص الانواع وهذا ما أشار إليه الباحث (Williams، 1995) و (Madigan وآخرون، 2003). لوحظ ان عدد من العزلات تنمو على أوساط، في حين أنها لاتنمو على أوساط اخرى على سبيل المثال العزلة رقم MUAc1 تنمو على وسط (GYEA) عند العزل الأولي، وعند اعادة زراعتها لاتنمو على الوسط نفسه، وإنما تحتاج إلى أوساط اخرى وكان نموها جيداً على وسط GAA.
العزلة MUAc4 لاتنمو على وسط GAA وتنمو فقط على وسط GYEA وهو وسط العزل الأولي في حين ان العزلة 74A تنمو على كلا الوسطين السابقين. يختلف شكل المستعمرات من بيئة غذائية إلى اخرى وكذلك نوع الصبغات المنتجة فالعزلة MUAc3 على وسط GAA تنمو بشكل مستعمرات تباشيرية صغيرة ملتصقة أو غائرة في الاكار في حين انها على وسط العزل الأولي مستعمراتها تكون بحجم أكبر بيضاء تباشيرية فيها ثقب مستعرض في الوسط. العزلة MUAc3 تنتج على وسط GYEA صبغة الميلانين (الشكل،1)، في حين انها تنتج صبغة بنفسجية اللون على وسط GAA، وهذا يتطابق مع ما ذكره (Waksman، 1967). العزلة MUAc1 و MUAc2 تنمو بشكل جيد وخلال 3 أيام فقط على وسط SA في حين أنها تحتاج من 4-7 أيام للنمو على أوساط اخرى مثل وسط GYEA.
إنتاج الصبغات: يوضح الجدول رقم (1) قدرة معظم عزلات الاكتينومايسيتات على إنتاج الصبغات الخارجية الذائبة في الماء لا سيما صبغة الميلانين ونتفق مع السماك (2006) بأنه من غير الضروري إستعمال وسط الميلانين لإنتاج الصبغة وان إستعمال اي وسط غذائي يحوي تركيز عالي من البيبتون يؤدي إلى إظهار الصبغات سواء كانت الرمادية أو البنية أو القهوائية أو القهوائية المسودة، وهذا ما لاحظناه من خلال قدرة العزلات على إنتاج الصبغة حتى على الوسط الذي استعملناه في العزل الأولي والحاوي على 25 غرام من البيبتون في اللتر الوأحد. وإن نوعية الوسط وفترة التحضين تؤثر في نوعية وكمية الصبغة المنتجة من قبل العزلات،أظهرت معظم العزلات صبغات صفراء أو برتقالية أو بنية في الوسط السائل وقد تكون هذه الصبغات ناتجة من تحلل الخلايا وذوبان الصبغة الداخلية في الوسط لا سيما عندما تكون الصبغة ذائبة في الماء وهذا يتفق مع (Waksman، 1967).
إنتاج المضادات الحيوية: درست قدرة كل عزلة من 109 عزلة التابعة للاكتينومايسيتات على إنتاج المضاد الحيوي ضد 28 فطر.اظهرت 6 عزلات منها قابليتها على إنتاج المضاد الحيوي ضد الفطريات المستعملة في الاختبار وهذه العزلات هي MUAc1، MUAc2، MUAc3، MUAc4، MUAc5، MUAc6 وتعود للجنس *Streptomyces* والجدول (2) يوضح مواقع عينات التربة المعزولة منها، وعدد الفطريات التي تم تثبيط نموها من قبل كل عزلة من العزلات المنتجة ونوع الصبغة المنتجة من قبل العزلة.

التشخيص

تقانة الشريحة الزجاجية: شخصت العزلات التابعة للاكتينوماسيتات بإستعمال تقانة الشريحة الزجاجية كما ذكر سابقا في مواد وطرائق العمل، إذ تعد من افضل الطرائق المستعملة في التشخيص على مستوى الجنس لما لها من دور في اظهار شكل الغَزْلْ الارضي والغَزْلْ الهوائي الذي يميز الاجناس التابعة للاكتينوماسيتات عن بعضها البعض، لا سيما العزلات التابعة لجنس *Streptomyces* (Holt وآخرون، 1994). الغَزْلْ الارضي متفرع ولا يحمل ابواغ والغَزْلْ الهوائي اقل تفرعا واكثر سمكا ويظهر بشكل خيوط غامقة ويحمل سلسلة من الابواغ محاطة بغمد ليفي يدعى Sporophore وتأخذ اشكالا مختلفة حسب ترتيب الابواغ فيها فقد يكون الغَزْلْ الهوائي مستقيما أو حلزونيا أو مستقيما ذات نهاية معقوفة أو متعرجا كما في معظم انواع جنس *Streptomyces* (الجدول، 3). في حين يكون الغَزْلْ الهوائي بشكل حزم متجمعة في أفراد جنس *Streptoverticillum*. اظهرت نتائج التشخيص بتقانة الشريحة الزجاجية والتشخيص بوسطة الاختبارات

الجـدول (1): منـاطق الحصـول علـى العـزلات النقيـة مـن الأكتينومايسـيتات المعزولـة مـن التربـة وإنتاجهـا للصبغات.

Table (1) :Regions of soil for isolating actionmycetes and poroducing pigments.

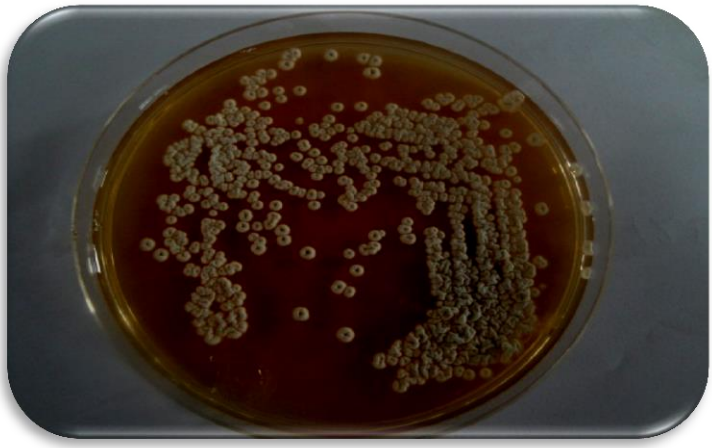
الملاحظات Notices	عدد العزلات المتحصل عليها No. of isolate	عدد العزلات المنتجة للصبغة No. Isolate	رقم العزلة No. of isolate	مصدر عينة التربة Soruces of soil sample	ت
-	1	-	1	Hay alandalosحي الاندلس	1
-	1	-	6B	Abnalather مستشـفى ابـن الاثيـر Hospital	2
-	3	-	8	Mosul Univ.جامعة الموصل	3
-	2	-	10 A	Hay alnajarحي النجار	4
-	4	2 ميلانينMelanin	12	Hamamalaleel حمام العليل	5
-	3	-	15	Hay alarabi حي العربي	6
-	1	-	17	Karkok محافظـــة كركـــوك Governorate	7
-	1	1 بنفسجيViolate	20	Nenava Drag F.مصنع أدوية نينوى	8
-	1	1 ميلانينMelanin	21	Nenava Drag F.مصنع أدوية نينوى	9
-	3	1 ميلانينMelanin	23	Kramlas قرية كرمليس	10
-	1	-	25	Hay almohandseen حي المهندسين	11
-	6	-	27	Hay adan حي عدن	12
-	2	1 ميلانينMelanin	29	Hay alsdeeq حي الصديق	13
-	2	-	32	Mosul Univ. جامعة الموصل	14
-	5	2 ميلانينMelanin ،2 بنفسجيViolate	33	Hay almaleia حي المالية	15
-	8	1 بنفسجيViolate	34	Karblaa G. محافظة كربلاء	16
نمو كثيف جدا V.bushy growth	5	1 ميلانينMelanin	37	.Aldrawesh V. قرية الدراويش	17
نمو كثيف جدا V.bushy rowth	2	1 أصفرYellow	39	Rabeaa ناحية ربيعة	18
نمو كثيف Bushygrowth	3	-	42	Hay domeze حي دوميز	19
-	2	2 برتقاليOrange	44	Hay althqafa حي الثقافة	20
-	2	2 ميلانينMelanin	48	Mosul dam lakeبحيرة الموصل	21
نمو كثيف جدا V.bushy rowth	6	4 ميلانينMelanin و1 أصفرYellow	49	Mosul dam lake بحيرة الموصل	22
-	2	-	51	Mosul dam lake بحيرة الموصل	23
-	2	1أصفرYellow،1 برتقاليOrange	54	Tikrat G. محافظة تكريت	24
-	3	1 ميلانينMelanin	56	Tikrat G. محافظة تكريت	25
نمو كثيف Bushygrowth	4	1 ميلانينMelanin ،2 برتقالي	58	Sinjar - منطقـة كـارة فـي سـنجار Kara	26
-	1	-	59	Talafer منطقة تلعفر	27
-	3	1 ميلانينMelanin	60	Aljamhoria H.مستشفى الجمهوري	28
-	1	-	62	Tal Smier تل سمير (ربيعة)	29
-	2	2 ميلانين Melanin	63	Alhazrera ري الجزيرة (ربيعة)	30
-	4	2 ميلانينMelanin	65	Mosul Univجامعة الموصل	31
نمو كثيف جدا V.bushy growth	7	4 ميلانين Melanin،1 برتقالي Orange	66	Alrashidiaمنطقة الرشيدية	32
-	1	-	67	Alkhthrawiaقرية الخضرانية	33
-	4	3 ميلانينMelanin	68	Alshakraقرية شكرا	34
-	2	1 ميلانينMelanin	72	Algoaanaقرية جوعانة	35
-	2	1 ميلانينMelanin	73	Jamsaقرية جمسة	36
-	2	-	74	Aljernafقرية الجرناف	37
-	1	-	75	Alrashidiaمنطقة الرشيدية	38
-	4	1 ميلانـينMelanin،1 أصـفر Yellow	77	Wadi-Gojaقرية وادي قوجا	39

الجدول(2): عزلات الاكتينومايسيتات المنتجة للمضاد الحيوي ضد الفطريات.
Table (2): Isolates of actinomycetes producing antifungi.

الاكتينومايسيتات Atinomycetes	إنتاج الصبغة Pigment Producing	عدد الفطريات المثبط نموه No.of inhibite fungi	موقع عينة التربة المعزولة منها العزلات المنتجة Soruces of soil sample	رقم العزلة Number of Isolate
Streptomyces	غير منتجة Un-Produced	21	حي المهندسين Hay almohandseen	MUAc1
Streptomyces	غير منتجة Un-Produced	15	حي الصديق Hay alsdeeq	MUAc2
S. purpureus	صبغة الميلانين Melanin	27	حي المالية Hay almaleia	MUAc3
Streptomyces	برتقالي Orange	12	كارة في سنجار Sinjar -Kara	MUAc4
Streptomyces	صبغة الميلانين Melanin	19	منطقة الرشيدية Alrashidia	MUAc5
Streptomyces	غير منتجة Un-Produced	12	قرية الجرناف/الشرقاط Alshrkaat-Algernaf	MUAc6

الجدول (3): تشخيص اجناس الاكتينومايسيتات المعزولة من التربة بتقانة الشريحة الزجاجية.
Table (3) :Identification of actinomycetes genera from soil by sild technique.

No. of isolates عدد العزلات	Genera الاجناس
7	*Nocardia*
1	*Rhodococcus*
69	*Streptomyces*
27	*Streptoverticillum*
5	Unidentified لم تشخص
109	Total المجموع



الشكل (1): يوضح شكل مستعمرة العزلة MUAc3 المنتجة للمضاد الحيوي على وسط العزل الأولي (GYEA).
Figure (1): Colony of isolate MUAc1 producing antibiotic on GYEA.

الجدول (4): قدرة عزلات الاكتينومايسيتات على تثبيط نمو عدد من انواع الفطريات الممرضة اللنبات.

Table (4): Actinomycetes inhibiting some species of fungal plant pathogens

Aspergillus niger	*Drechslere* sp.	*Alternaria alternata*	*Aspergillus flavous*	*Macrophomina phasioline*	*Rhizoctonia solani*	*Fusarium oxysporum 1*	*Fusarium oxysporum2*	*Fusarium oxysporum3*	*Fusarium oxysporum*	*Ulocladium botrytis*	*Trichoderma harzianum*	*Cunninghamella*	*Fusarium oxysporum*	الفطريات Fungi / العزلات المنتجة للمضاد الحيوي Isolates producing antibiotic
18	12	0	12	11	0	17	21	12	13	30	19	18	*21	MUAc1
0	0	0	10	11	0	0	15	0	0	18	0	13	12	MUAc2
12	15	20	0	9	27	10	20	12	21	33	34	11	29	MUAc3
0	0	17	0	0	0	0	25	0	0	17	0	15	10	MUAc4
0	20	32	0	0	18	13	20	0	20	23	32	12	15	MUAc5
0	0	0	0	0	0	0	0	15	16	25	19	18	22	MUAc6

* قطر التثبيط (ملم) . النتائج لثلاثة مكررات.

الجدول (5): تاثير العزلة MUAc3 في تثبيط الفطريات الممرضة للنبات.

Table (5): Effect of of MUAc3 in inhibiting fungal plant pathogens.

قطر التثبيط ملم * Dimeters of inhibition	الفطريات الممرضة للنبات Fungal plant pathogens
23	*Alternaria alternata*
0	*Aspergillus flavous*
17	*Aspergillus niger*
15	*Cunninghamella* sp.
16	*Drechslere* sp.
33	*Fusarium oxysporum*
27	*Fusarium oxysporum* (1)**
18	*Fusarium oxysporum* (2)
21	*Fusarium oxysporum* (3)
16	*Fusarium oxysporum* (4)
12	*Microphomina phasiolina*
20	*Rhizoctonia solani*
29	*Trichoderma harzianum*
34	*Ulocladum botrytis*

* قطر مستعمرة المقارنة 9 ملم،** (1) معزول من نبات الداؤدي،(2) معزول من نبات الفرولة(3 .) معزول من نبات جذور شعر البنات ، (4) معزول من نبات الرقي.

الكيموحيوية و الإنزيمية كما هو موضح في (الجدول، 3) وجود الاجناس التالية: 69 عزلة تابعة لجنس *Streptomyces* و27 عزلة تابعة لجنس *Streptoverticillum* و7 عزلات تابعة لجنس *Nocardia* وعزلة واحدة تابعة للجنس *Rhodococcus* و5 عزلات لم تشخص لصعوبة نموها على الأوساط التشخيصية والكيموحيوية. ويدل هذا على ان أغلب العزلات تعود إلى جنس *Streptomyces* وقد ذكر (Lee و Hwang، 2002) ان افراد جنس *Streptomyces* تشكل 80% من مجموع الاكتينوماسيتات المعزولة من التربة، ذكر (Prabavathy وآخرون، 2006) أن جنس *Streptomyces* يمثل حوالي 50% من اكتينومايسيتات التربة، وفي دراستنا هذه يشكل جنس *Streptomyces* حوالي 63% من اكتينومايسيتات التربة. يعود الاختلاف في طبيعة تكوين كل من الغَزْلْ الارضي والغَزْلْ الهوائي إلى الاختلاف في الصفات

الوراثية و الشكلية والتركيبية و الفسلجية وهذا ما ذكره (Prescott وآخرون، 2005). وتباينت الوان الغَزْلْ الهوائي ما بين الأبيض والأصفر والبيج والرصاصي و كان اللون الرصاصي سائداً في كثير من العزلات، إذ ظهر في 32 عزلة وهذا يتفق مع ما أشار إليه (Saadoun وآخرون، 1999) و (ايليا، 2008). لاحظنا الجدول (4) يوضح اقطار التثبيط لنمو الفطريات وقدرة عزلات الاكتينومايسيتات على إنتاج المضادات الحيوية ضد عدد من انواع الفطريات الممرضة للنباتات إذ كان للعزلة MUAc3 القدرة على تثبيط اكبرعدد من الفطريات إذ ثبطت نمو 13 فطرممرض للنبات يليها العزلةMUAc1 التي ثبطت نمو12فطرممرض للنبات ثم العزلة MUAc5 التي ثبطت نمو 10 فطريات ممرضة للنبات والعزلة MUAc2 ثبطت نمو 6 فطريات مرضة للنبات والعزلة MUAc4 ثبطت نمو 5 فطريات ممرضة للنبات واخيرا العزلة MUAc6 ثبطت نمو6 فطريات ممرضة للنبات. العزلة MUAc3 أثرت على فطريات الاختبار جميعها باستثناء الفطر *A. flavus* (الجدول، 5) وفي دراسة للباحث السماك (2006) وجد ان عدد من عزلات الـ *Streptomyces* لم تثبط نمو هذا الفطر، بل لوحظ ان الفطر كان ينمو فوقها تاركا الوسط الغذائي مما يدل على قدرة العزلة على إنتاج مركبات تساعد في نمو الفطر، وبالتالي توجد حالة من التعاون والتآزر وهذه المواد المنتجة قد تكون فيتامينات. من خلال الدراسة أن الانواع التي تعود لجنس *Nocardia* تمتاز بعدم قدرتها على تكوين الغَزْلْ الهوائي عند تنميتها على مزرعة الشريحة الزجاجية وذكر السماك 2006 ان الغَزْلْ الارضي الذي يمثل المستعمرات البكتيرية تميزت معظمها بانها برتقالية اللون أو صفراء اللون واحيانا بيضاء وغالبا ما تكون شمعية القوام ومجعدة.

ISOLATION OF SOLI ACTINOMYCETES PRODUCING ANTIBIOTIC FOR PATHOGENIC PLANT FUNGI

N.A,Ramadan Farah K. Y. Alfeel
Bio.Dept-Coll.of Sci Menistry of Industrey-Neniva Drug Co.
E-mail: nadeemramadan@yahoo.com

ABSTRACT

109 isolates of actinomycetes were obtained from 140 soil samples, collected from different regions of the provinces : Nineveh, Dohok, Irbil, Kirkuk, Tikrit, Bahgdad, Najaf and Karbala. Results of diagnosis by slide culture technique and by biochemical and enzymatic test showed the existence of the following isolates and races (69 isolates belong to the genus of *Streptomyces*, 27 isolates belong to the genus of *Streptoverticillum*, 7 isolates belong to the genus of *Nocardia*, one isolates belong to the genus *Rhodococcus* and 5 isolates are un diagnosed because of the difficulty of growth on the diagnostic and biochemical media). The productive isolate which inhibited the largest number of fungi diagnosed to the level of species was *Streptomyces purpureus.*

Key words: Plant pathogenic fungi
Received: 29/3/2012 Accepted: 18/6/2012

المصادر

الاسعيد، رنا صلال حسن (2009). عزل بعض انواع البكتريا الخيطية من الاشخاص المعرضين لفرط التحسس الرئوي وبيئتهم في الموصل، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل/العراق.

ايليا، سهى سليمان(2008). عزل وتشخيص النوع *Streptomyces lavendulae* من التربة ودراسة الظروف المثلى لانتاج المضادات الحيوية. رسالة ماجستير، كلية التربية،جامعة الموصل. العراق.

السماك، اسراء غانم (2006). دراسة تصنيفية لمجموعة البكتريا الخيطية. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق.

العراقي، رياض احمد و نديم احمد رمضان (2010). المرشد التطبيقي في مكافحة الآفات الزراعية. دار اليازوري العلمية للنشر والتوزيع، عمان/ الاردن.

الفيل، فرح خالد.(2012).عزل وتشخيص عزلات من الاكتينومايسيتات المنتجة للمضادات الحيوية ودراسة تاثيرهاعلى بعض لفطريات. اطروحة دكتوراه- كلية العلوم –جامهة الموصل.

مصطفى، بري لطيف محمد (2009). دراسة وبائية وتشخيصية للفطريات الجلدية في مدينة كركوك ومعالجتها. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة تكريت.

نهر، حبيب صاحب و بهاء الدين معروف و علي محسن نعمة (1997). عزل وتشخيص البكتريا المنتجة للمضادات الحيوية من مصادر مختلفة، *مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة، 2: 201-208.*

Anonymous (2010). United States Pharmacopeia(USP), *33-NF28*, USP 33–NF 28 Recall, Second Public Notice.USA.

Atta 1, El-Sehrawi M. H.and A.S.Bahobail,(2011). Antifungal macrodiode production by *Streptomyces albidoflavus*-143: fermentation, purification and biological activities. *Journal of American Science, 2011; 7(3)13-22.*

S.K. Augustine, S.P. Bhavsar and B.P. Kapadnis,(2005). Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK. 39. *Indian Journal of Medical Research, 121: 164-170.*

Chaphalkar, S. R. and S. Dey (1996).Computer assisted identification of Streptomyces species with high extracellular protease activity. *Actinomycetes, 7:47-54.*

Cruickshank,R.,Duguid,J.P. Marmion, B. P. and R. H. A. Swain, (1975). Medical microbiology: The Practice of Microbiology. 12th ed., Vol. 2, Churchill Living Stone, Edinburgh, UK.

Fguira L.F.; Fotso, S.; Ameur-Mehdi, R.B.; Mellouli, L. and H Laatsch (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Research In Microbiology, 156: 341 –7.*

Finegold, S. M., Martin, W. J. and E. G. Scott, (1978). Bailey and Sott's Diagnostic Microbiology. 5th. ed., C. V. Mosby Company, Henry Kimpoton, London, UK.

Harley, J. P. and L. M.Prescott, (1996). Laboratory Exercises In Microbiology. 3rd ed., WCB/McGraw-Hill Company, New York, USA.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and S.T.Williams, (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9thed., Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Joo,G.J.(2005).Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in redpeppers by *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*.; *27: 201-205.*

Koneman,EW,Allen,S.D.Dowell,V.R., Janda,W.M., Sommer,H.M. and W.C. Winn, (1997).Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.4th ed.,J.B. Lippinaott Comp.,Philadelphia, USA.

Lee, J. Y. and B. K. Hwang, (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal Of Microbiology,* 48:407-417.

Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J. and H. J. Shadomy,(1985). Manual of Clinical Microbiology. 4thed., American Society for Microbiology, Washington, USA.

Madigan, M. T. Martinko, J. M. and J. Parker, (2003). Brock Biology of Microorganisms. 9th ed. Prentice Hall, New Jersey, pp. 502-503.

Oskay, M. Tamer, A. U. and C.Azeri,(2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soil of Turkey. *African Journal Biotechnology, 3:411-446.*

Prabavathy V. R., N. Mathivanan, K. Murugesan (2006). Control of blast and Sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. *Biological Control 39:313-319.*

Prescott, L. M., Harley, J. P. and D. A. Klein,(2005). Microbiology. 6th ed., McGraw-Hill companies, U.S.A pp. 992.

Saadoun,I.,Al-Momani,F.Malkawi,H.I.and M.J Mohammad,(1999).Isolation, Identification and analysis of antibacterial activity of soil Streptomycetes isolates from north Jordan.*Microbios.100:(395):41-46*.

Sahin, N. and A. Ugar,(2003). Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turkish Journal Of Biology, 79-84.*

*S*tukus,P.E.(1997).Investigation Microbiology: A Laboratory Manual for General Microbiology. Harcourt Brace and Company,New York, USA.

Taechowisan, T.; Lu, C.; Shen, Y. and S. Lumyong,(2005). Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology*. *151: 1691-5.*

Waksman, S. A. (1967). The Actinomycetes. A Summary of current knowledge. Ronald Press Company, New York, USA.

Williams,S.T.(1995).The impact of numerical methods on the identification of *Streptomyces* spp. *Binary*., 7:49-53.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Wellington, E. M. H., Vickers, J. C., Alderson, G., Sneath,P.H. A., Sackin, M.J. and A.M. Mortimer,(1983). A probability matrix for identification of some *Streptomyces. Journal of General Microbiology, 129:1815-1830.*