عزل وتشخيص انواع البكتريا المسببه لتلوث كالس نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L ودراسه فعاليه التثبيطيه لبعض المستخلصات النباتيه والمضادات الحيويه.

ناصر حميد الدوسري   منى عبد المطلب الموسوي   هدى عبد الكريم الطه

مركز ابحاث النخيل   كليه الزراعه

جامعه البصره، البصره   العراق

الخلاصه

اجري هذا البحث في مركز ابحاث النخيل جامعة البصرة لعزل وتشخيص انواع البكتريا المرافقة للزراعة النسيجية لنخيل التمر ودراسة التاثير التثبيطي لثلاث انواع من المستخلصات النباتية وهي ثمار نبات السماق *Rhus coriaria* وقلف نبات القرفة(الدارسين) *Cinnamomum zeylanicum* والافرازات الصمغية لنبات العلك المر *Bswellia sp* باستعمال اربعة انواع من المذيبات وهي الماء والكحول المثيلي والهكسان وخلات الاثيل وبثلاث تراكيز (٠، ٠.٥، ١) كما درس التاثير التثبيطي لثلاث انواع من المضادات الحيوية هي الاموكسلين(Amoxillin) وجنتامايسين(Gentamycin) وكلورام فينيكول(Chloramphenicol) وبثلاث تراكيز (٠، ٠.٥، ١)%، واظهرت نتائج العزل والتشخيص وجود ثلاث انواع من البكتريا وهي *Staphylloccus aurwus* و *Bacillus subtillus* و *Proteus spp* ملوثة لكالس نخيل التمر، وبينت نتائج التاثير التثبيطي للمستخلصات النباتية تفوق مستخلص خلات الاثيل نباتي السماق والعلك المر بتركيز ١% في تحقيق اعلى قطر تثبيط لبكتريا *S. aurwus* وبلغ(٢٤.٣٣، ٢٣.٠٠)ملم على التوالي في حين سجل مستخلص خلات الاثيل لنبات العلك المر وبتركيز ١% اعلى قطر تثبيط لبكتريا *B. subtillus* إذ بلغ ١٨.٣٣ملم كما اوضحت النتائج تفوق المستخلص الكحولي وخلات الاثيل لنبات السماق وبتركيز ١% في تحقيق اعلى قطر للتثبيط لبكتريا *Proteus spp* وكان (١٦.٣٣، ١٦.٦٧) على التوالي، كما بينت نتائج التاثير التثبيطي للمضادات الحيوية تفوق المضاد الحيوي كلورام فينيكول(Chloramphenicol) وبتركيز ١% في اعطاء اعلى قطر تثبيط بلغ(٢٨.٦٧، ٣٠.٣٣، ٢٩.٠٠)ملم لبكتريا *Proteus spp* و *S. aurwus* و *B. subtillus* على التوالي كما حقق المضاد الحيوي جنتامايسين(Gentamycin) وبتركيز ١% اعلى قطر تثبيط لبكتريا *Proteus spp* وبلغ ٢٩.٣٣ملم بفارق معنوي عن المعاملات الاخرى.

المقدمه

تعود نخلة التمر .*Phoenix dactylifera* L إلى العائلة النخيلية Arecaceae وإلى الرتبة Arecales وهي من اشجار ذوات الفلقة الواحدة (غالب،١٩٨٠)، تتكاثر هذه الاشجار من خلال زراعة الفسائل بعد فصلها من الشجرة الام او من خلال زراعة نوى ثمار نخيل التمر لذا تنتج اشجار قد لا تشابه نبات الام ، كما يمكن اكثارها عن طريق الزراعة النسيجية(مطر،١٩٩١)، تعد الزراعة النسيجية من التقانات الحديثة لاكثار انواع مختلفة من النباتات، إذ اثبتت هذه الطريقة كفاءتها من حيث وفرة النباتات التي يمكن إنتاجها من اصل واحد ومطابقة النباتات الناتجة لاصولها من ناحية الثبات الوراثي، يتم اكثار نخيل التمر نسيجيا اما بواسطة تكشف الاعضاء من القمة النامية والبراعم الابطية او بواسطة تكوين الاجنة الجسمية عن طريق المرور بمرحلة الكالس والذي منه الاجنة الخضرية(Sudhersan, *etal.*1993 ؛ Al-Ghamidi, 1993؛ ابحمان واخرون،٢٠٠١)، تتطلب الزراعة النسيجية للنباتات ومنها نخلة التمر توفر ظروف معقمة للوسط الزراعي ولعملية الزرع ابتداء من زراعة اول نسيج مستاصل إلى اخر مرحلة وهي نقل النبيتات إلى تربة الاصص(Ammar & Benbadis, 1996 وماضي،٢٠٠٢)، يتعرض النسيج النباتي في جميع مراحل الزراعة النسيجية إلى الإصابة بالاحياء المجهرية سواء الداخلية منها(تصيب داخل النسيج) او الخارجية(تصيب خارج النسيج) وتسبب خسارة في النسيج النباتي مؤدية اما إلى ضعف نمو النسيج النباتي او تشوهه او موته بالكامل نتيجة لتنافس هذه الملوثات مع النسيج النبات في الحصول على المغذيات او إفرازها بعض المواد السامة للنسيج النباتي (Reed & Tanprasert, 1995)،وتعد مشاكل التلوث المايكروبي من المعوقات التي تواجه هذه التقانة والتي يصعب حلها، وان تلوث النسيج النباتي يحدث اما بسبب عدم تعقيمه بصورة صحيحة او تلوثه اثناء عمليات الزراعة او تلوث المعدات والادوات والاشخاص العاملين في هذه التقانة ويعد التلوث الخارج من اكثر الانواع شيوعا وضررا في زراعة الانسجة النباتية(George, 1993) ويعتبر الوسط الزرعي المستخدم في هذه التقانة محفز لانتشار وتكاثر التلوث المايكروبي بسبب احتوائه على العناصر المغذية لهذه المايكروبات(Odutayo *et al.* 2007).

تعد عملية تعقيم الاجزاء النباتية والادوات والمستلزمات المستخدمة في الزراعة النسيجة احد الطرق الفعالة في الحد من التلوث المايكروبي، كما ان إضافة بعض انواع المبيدات الفطرية والمضادات الحيوية ضد انواع مختلفة من البكتريا تلعب دورا مهم في القضاء من التلوث المايكروبي(Guri, *et al.* 1998).

ونظر لانتشار التلوث البكتيري في الزراعة النسيجة لنخيل التمر جاءت هذه الدراسة لمعرفة انواع البكتريا المسببة للتلوث واستخدام بعض المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية في تثبيطها.

٢ المواد وطرائق العمل

٢ ١ عزل وتشخيص البكتريا المرافقه لكالس نخيل التمر

جمع عدد من انابيب كالس نخيل التمر مصابة بالتلوث البكتيري من مختبر الزراعة النسيجية لمركز ابحاث النخيل إذ اخذ مليء شراج ناقل من النمو البكتيري للكالس الملوث ومن حولها لثلاث مناطق عشوائية وزرعت على وسط زرعي نوع (Compete – Agar (C.A) (Hostford, 1982) وحضنت في حاضنة على بدرجة حرارة ٢٥ ±٢ مْ ولمدة(٢٤ ٤٨)ساعة.

فحصت المستعمرات النامية على الوسط الزرعي وسجلت الصفات واجريت الاختبارات التشخيصية لكل منها وشملت(صبغة كارم، إنتاج الاندول، كبرتيد الهايدروجين، الاوكسديز، الكاتاليز، اختبار الاكسدة، التخمر، اختبار فوكس بروس كاور، اختزال السترات، اختبار إنزيم اليوريز) (Holt, *et al.*1994; Colle, *et al.*1996).

٢ ٢ تحضير المستخلصات النباتيه

جلبت النباتات المراد عمل المستخلصات منها هي ثمار نبات السماق *Rhus coriaria* وقلف نبات القرفة(الدارسين) *Cinnamomum zeylanicum* والافرازات الصمغية لنبات العلك المر *Bswellia sp* من الاسواق المحلية، جففت هذه العينات باستخدام فرن حراري على درجة حرارة ٤٠ مْ لمدة ٢٤ ساعة وطحنت بعدها واخذ ١٠٠غم من المادة المجففة ووضعت كلا على حدة في اوعية استخلاص في جهاز Soxhlet extractor باستخدام ٢٠٠مل من الماء والايثانول والهكسان وكلا على حده واستخلصت بدرجة حرارة ٤٠مْ ولمدة ٢٤ساعة وجففت المستخلصات بواسطة المبخر الدوار للحصول على الثمالة(Harborne,1984). بعدها حضر المحلول المركز Stock solution لكل مستخلص من المستخلصات النباتية ولكل مذيب على حده وذلك بإذابة ١غم من الثمالة الجافة في ٢مل من المذيبات المستخدمة واكمل الحجم إلى ١٠ مل من المذيب المستخدم ليصبح المحلول بتركيز ١٠% وعقم باستخدام ورق ترشيح (Millipore filter paper)ثم حضرت تراكيز(٠، ٠.٥، ١)% لكل مستخلص ولجميع المذيبات المستخدمة.

٢ ٣ تحضير المضادات الحيويه

جلبت ثلاث انواع من المضادات الحيوية(جدول١) من الاسواق المحلية واذيبت في ١٠٠مل من الماء المقطر المعقم وحضرت ثلاث تراكيز منها وهي(٠، ٠.٥، ١)%.

نوع المضاد	تركيزه(ملغم)	الشركه المصنعة
الاموكسلين(Amoxillin)	٥٠٠	شركه سامراء للمستلزمات الطبيه
جنتامايسين(Gentamycin)	٥٠٠	شركه سامراء للمستلزمات الطبيه
كلورام فينيكول(Chloramphenicol)	٥٠٠	شركه سامراء للمستلزمات الطبيه

٢ ٤ دراسه تاثير الفعاليه التثبيطيه للمستخلصات النباتيه والمضادات الحيوية.

اتبعت طريقة Agar-Weel-Diffuson (Perez *et al.*1990) لاختبار فعالية المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية إذ صب ٢٠مل من الوسط (MHA) (Muller Hinton-Agar) لكل طبق زجاجي ونقع الوسط بعد تصلبه بـ٠.١مل من العالق الجرثومي ذي كثافة ضوئية ٠.١ على طول موجي ٥٤٠نانومتر باستخدام المطياف الضوئي وذلك باستخدام ناشر زجاجي(Spreader) معقم تركت الاطباق لمدة ١٥-٣٠دقيقة لحين الجفاف بعدها عملت ستة حفر قطر كلا منها ٨ملم وباستخدام ثاقب معدني معقم لكل طبق واضيف ١٠٠مايكروليتر من المستخلص النباتي والمضاد الحيوي لكل حفرة وباستخدام ماصة دقيقة ذات اغطية محكمة.

حضنت الاطباق في حاضنة على بدرجة حرارة ٢٥ ±٢ مْ ولمدة ٢٤ساعة بعدها قيس قطر التثبيط لكل من المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية المستخدمة بوساطة شريط قياس ولكل نوع بكتيري وبواقع ستة اطباق لكل نوع.

٢ 5 التحليل الاحصائي.

حللت النتائج وفق تصميم القطاعات العشـــوائية الكاملـــة Complete Randomized Block C.R.B.D. Design كتجارب متعددة العوامل، قورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فـــرق معنـــوي المعـــدل R.L.S.D وبمستوى احتمالية ٠.٠١ (الراوي وخلف الله،١٩٩٨).

٣ النتائج والمناقشه

بينت نتائج عزل البكتريا من كالس نخيل التمر الملوث وجود ثلاث انواع من البكتريا الملوثة **وهي** *Staphylloccus aurwus* و *Bacillus subtillus* و *Proteus spp*، وهذا يتفق مع Reed & Tranprasert(1995) و Guri *et al.*(1998) و ماضي(٢٠٠٢) و Odutayo *et al.*(2007) إذ عزلوا هذه الانواع من البكتريا من كالس نخيل التمر وكالس نباتي الموز *Musa paradisiaca* واللوبياء *Vigna unguiclata* المكثرة بتقانة الزراعة النسيجية.

اما ما يخص التاثير التثبيطي للمستخلصات النباتية ضد انواع البكتريا المعزولة والمسببة للتلوث البكتيري لكالس نخيل التمر فتظهر نتائج الجدول(١) وجود فروقات معنوية بين جميع المعاملات المستخدمة والتداخل فيما بينهم في قطر التثبيط لبكتريا *S. aurwus.* إذ تفوق مستخلص نباتي السماق ثلاه العلك المر في اعطاء اعلى قطر تثبيط بلغ (٧.٣٦، ٦.٠٣)ملم على التوالي وبفارق معنوي عن مستخلص نبات الدارسين الذي حقق اقل قطر تثبيط كان ٤.٦٤ ملم، كما دلت النتائج وجود فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة إذ تفوق تركيز ١% في اعطاء اعلى قطر تثبيط بلغ ١٠.٧٨ملم عن بقية التراكيز في حين سجل تركيز ٠% اقل قطر تثبيط بلغ ٠.٠٠ملم، ونجد من نفس الجدول وجود فروق معنوية بين انواع المذيبات المستخدمة في الاستخلاص إذ حقق مذيب خلات الاثيل اعلى قطر تثبيط بلغ ١١.١١ملم وبفارق معنوي عن بقية المذيبات في حين سجل المستخلص المائي اقل قط تثبيط بلغ ١.٥٦ملم.

واظهر التداخل بين نوع النبات والمذيب فقد علاقة معنوية إذ سجل مستخلص خلات الاثيل لنباتي السماق والعلك المر اعلى قطر تثبيط بلغا(١٣.٤٤، ١٢.٥٦)ملم على التوالي في حين سجل المستخلص المائي لنبات السماق اقل قطر تثبيط وكان ١.٣٣ملم. كما تفوق نبات السماق بتركيز ١% عن بقية المعاملات في اعطاء اعلى قطر تثبيط وكان١٣.٩٢ملم بينما لم سجل تركيز ٠% اي تاثير تثبيطي ولجميع المستخلصات النباتية المستخدمة، وتبين النتائج وجود فروق معنوية في قطر التثبيط للتداخل بين نوع المذيبات والتركيز إذ تفوق مستخلص خلات الاثيل بتركيز ١% في تحقيق اكبر قطر تثبيط بلغ ١٩.٦٧ملم بينما لم يسجل اي تاثير تثبيطي للمستخلص المائي والكحولي وخلات الاثيل والهكساني ولتركيز٠%،اما ما يخص التداخل الثلاثي فقد كان معنويا إذ تفوق المستخلص خلات الاثل لنباتي السماق والعلك المر وبتركيز ١% في تحقيق اكبر قطر تثبيط بلغ (٢٤.٣٣، ٢٣.٠٠)ملم لمستخلص النباتين على التوالي وبفارق معنوي عن جميع المعاملات المستعملة الاخرى.

جدول(١) تأثير المستخلصات النباتيه في القطر التثبيطي لبكتريا S. aurwus

نوع المستخلص النباتي	نوع المذيب	معدل قطر التثبيط للبكتريا *S. aurwus* (ملم)			معدل تأثير نوع النبات ونوع المذيب
		التراكيز المستخدمة(%)			
		٠	٠.٥	١	
السماق	المائي	٠.٠٠	١.٦٧	٢.٣٣	١.٣٣
	كحولي	٠.٠٠	٥.٦٧	١٤.٣٣	٦.٦٧
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٦	٢٤.٣٣	١٣.٤٤
	هكساني	٠.٠٠	٩.٣٣	١٤.٦٧	٨.٠٠
الدارسين	المائي	٠.٠٠	٢.٣٣	٢.٠٠	١.٤٤
	كحولي	٠.٠٠	٦.٣٣	١٣.٦٧	٦.٦٧
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٠.٣٣	١١.٦٧	٧.٣٣
	هكساني	٠.٠٠	٣.٦٧	٥.٦٧	٣.١١
العلك المر	المائي	٠.٠٠	٢.٦٧	٣.٠٠	١.٨٩
	كحولي	٠.٠٠	١٢.٠٠	١٢.٣٣	٨.١١
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٤.٦٧	٢٣.٠٠	١٢.٥٦
	هكساني	٠.٠٠	٢.٣٣	٢.٣٣	١.٥٦
معدل تأثير التركيز		٠.٠٠	٧.٢٥	١٠.٧٨	معدل تأثير نوع النبات
تأثير التداخل بين نوع النبات والتركيز	السماق	٠.٠٠	٨.١٧	١٣.٩٢	٧.٣٦
	الدارسين	٠.٠٠	٥.٦٧	٨.٢٥	٤.٦٤
	العلك المر	٠.٠٠	٧.٩٢	١٠.١٧	٦.٠٣
					معدل تأثير نوع مذيب
تأثير التداخل بين نوع المذيب والتركيز	المائي	٠.٠٠	٢.٢٢	٢.٤٤	١.٥٦
	كحولي	٠.٠٠	٨.٠٠	١٣.٤٤	٧.١٥
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٣.٦٧	١٩.٦٧	١١.١١
	هكساني	٠.٠٠	٥.١١	٧.٥٦	٤.٢٢

R.L.S.D $_{0.01}$

نوع النبات	نوع المذيب	التركيز	تأثير التداخل بين نوع النبات ونوع المذيب	تأثير التداخل بين نوع النبات والتركيز	تأثير التداخل بين نوع المذيب والتركيز	التداخل الثلاثي
٠.٨٤	٠.٩٧	٠.٨٤	١.٦٨	١.٤٥	١.٦٨	٢.٩١

ومن نتائج جدول(٢) نلاحظ وجود فروقات معنوية بين انواع النباتات والمذيبات والتراكيز المستعملة والتداخل فيما بينهم في قطر التثبيط لبكتريا *B. subtillus* إذ تفوق مستخلص نبات السماق ونبات العلك المر في تحقيق اكبر قطر للتثبيط بلغ (٤.٣٣ و٣.٤٧)ملم على التوالي فيما لم يحقق مستخلص نبات الدارسين اي تاثير تثبيطي لبكتريا *B. subtillus* كما وجد فروق معنوية بين انواع المذيبات المستخدمة في الاستخلاص في تثبيط النمو البكتيري إذ سجل اعلى معدل لقطر التثبيط لمذيب خلات الاثيل وبلغ ٦.٧٠ملم وبفارق معنوي عن بقية المذيبات في حين سجل الماء ومذيب الهكسان اقل قطر للتثبيط كان (٠.٤١ و٠.٣٣)ملم على التوالي، وكان لتاثير اختلاف التراكيز معنويا في قطر التثبيط إذ سجل اكبر قطر تثبيط في تركيز ١% بلغ ٤.٤٢ملم بينما لم يسجل اي تاثير تثبيطي لتركيز ٠%.

كما دلت النتائج وجود تداخلا معنويا بين نوع النباتات والمذيبات المستعملة إذ سجل اعلى معدل لقطر التثبيط لنبات العلك المر وللمذيب خلات الاثيل بلغ ١١.٢٢ملم متفوقا على جميع المعاملات الاخرى، كما كان لتاثير التداخل بين نوع النباتات والتراكيز المستعملة معنويا إذ تفوق نباتي السماق والعلك المر في تركيز ١% في تسجيلهما اكبر معدل للقطر التثبيط بلغ (٧.١٧ و٦.٠٨)ملم على التوالي بينما سجل نبات السماق والعلك المر لتركيز ٠% ونبات الدارسين ولجميع التراكيز اقل قطر للتثبيط بلغ ٠.٠٠% على التوالي، كما سجل مذيب خلات الاثيل اكبر قطر للتبيط في تركيزي (٠.٥ و١)% بلغ (٩.٢٢ و١٠.٨٩)ملم على التوالي متفوقا على جميع المعاملات الاخرى، في حين لم تحقق جميع المذيبات المستعملة ولتركيز ٠% اي تاثير تثبيطي للبكتريا. وتظهر النتائج وجود تداخلا معنويا بين نوع النباتات والمذيبات والتراكيز المستعملة للقطر التثبيط لبكتريا *B. subtillus* إذ تفوق معاملة نبات العلك المر ولمذيب خلات الاثيل ولتركيز ١% في تحقيق اكبر قطر للتثبيط بلغ ١٨.٣٣% وعلى جميع المعاملات الاخرى.

جدول(٢) تاثير المستخلصات النباتيه في القطر التتبيطي لبكتريا B. subtillus

نوع المستخلص النباتي	نوع المذيب	معدل قطر التثبيط للبكتريا B. subtillus (ملم)			معدل تأثير نوع النبات ونوع المذيب
		التراكيز المستخدمة(%)			
		٠	٠.٥	١	
السماق	المائي	٠.٠٠	١.٦٧	٢.٠٠	١.٢٢
	كحولي	٠.٠٠	٩.٣٣	١١.٣٣	٦.٨٩
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٢.٣٣	١٤.٣٣	٨.٨٩
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	١.٠٠	٠.٣٣
الدارسين	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	خلات الأثيل	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
العلك المر	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	٢.٠٠	٤.٠٠	٢.٠٠
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٥.٣٣	١٨.٣٣	١١.٢٢
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	٢.٠٠	٠.٦٧
معدل تأثير التركيز		٠.٠٠	٣.٣٩	٤.٤٢	معدل تأثير نوع النبات
تأثير التداخل بين نوع النبات والتركيز	السماق	٠.٠٠	٥.٨٣	٧.١٧	٤.٣٣
	الدارسين	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	العلك المر	٠.٠٠	٤.٣٣	٦.٠٨	٣.٤٧
					معدل تأثير نوع مذيب
تأثير التداخل بين نوع المذيب والتركيز	المائي	٠.٠٠	٠.٥٦	٠.٦٧	٠.٤١
	كحولي	٠.٠٠	٣.٧٨	٥.١١	٢.٩٦
	خلات الأثيل	٠.٠٠	٩.٢٢	١٠.٨٩	٦.٧٠
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	١.٠٠	٠.٣٣

R.L.S.D $_{0.01}$

نوع النبات	نوع المذيب	التركيز	تأثير التداخل بين نوع النبات ونوع المذيب	تأثير التداخل بين نوع النبات والتركيز	تأثير التداخل بين نوع المذيب والتركيز	التداخل الثلاثي
٠.٨٤	٠.٩٧	٠.٨٤	١.٦٨	١.٤٥	١.٦٨	٢.٩٠

وبينت نتائج جدول (٣) فروق معنوية تحت مستوى احتمالية ١% في القطر التتبيط لبكتريا *Proteus spp.* لجميع المعاملات المستعملة والتداخل فيما بينهم، إذ دلت النتائج تفوق مستخلص نبات السماق

في احداث اعلى معدل قطر تثبيط لبكتريا *Proteus spp.* وبلغ ٥.٢٨ملم وبفارق معنوي عن مستخلصي نباتي الدارسين والعلك المر اللذان لم يكن هناك اي فرق معنوي فيما بينهم وبلغا (٢.١٧ ، ١.٨٦)ملم على التوالي، كما سجل اعلى قطر تثبيط بتركيز ١% وبلغ ٥.٥٣ملم وتلاه التركيز ٠.٥% وبلغ ٣.٧٣ملم وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة (تركيز ٠%) إذ كانت ٠.٠٠ملم، كما تظهر النتائج وجود فروق معنوية بين انواع المذيبات المستعملة في قطر التثبيط لبكتريا *Proteus spp.* إذ تفوق مستخلص خلات الاثيل ومستخلص الكحولي في احداث اعلى قطر تثبيط وبلغا(٧.٣٣، ٥.٠٧)ملم على التوالي وبفارق معنوي عن مستخلصي الهكساني والمائي الذي بلغ نسبة التثبيط ٠.٠٠ملم لكلاهما على التوالي.

كما دلت النتائج وجود فروق معنوية في التداخل بين نوع النبات ونوع المذيب في معدل قطر التثبيط لبكتريا *Proteus spp.* إذ سجل اعلى معدل قطر تثبيط لمستخلص نبات السماق لمذيبي الكحول وخلات الاثيل وبلغ(١٠.٤٤، ١٠.٦٧)ملم على التوالي وبفارق معنوي عن بقية المعاملات في حين لم يسجل المستخلص المائي والهكساني لنباتات السماق والدارسين والعلك المر اي قطر تثبيط لبكتريا *Proteus spp.* ولوحظ من نتائج نفس الجدول وجود دخلا معنويا بين نوع النبات والتركيز المستعملة إذ اعطى مستخلص السماق بتركيزي (٠.٥، ١)% اعلى قطر تثبيط للبكتريا (٧.٥٨، ٨.٢٥)ملم في حين لم يلاحظ اي تاثير تثبيطي لجميع المستخلصات النباتية لتركيز ٠%، ونجد من نتائج التحليل الاحصائي وجود تداخلا معنويا بين نوع المذيب والتركيزالمستخدمة فقد تفوق مذيب خلات الاثيل بتركيزي (٠.٥، ١)% في إحداث اعلى قطر تثبيط لبكتريا وكان (١٠.١١، ١١.٨٩)ملم وتلاه المستخلص الكحولي بتركيز ١% إذ سجل ١٠.٢٢ملم وبفارق معنوي عن بقية المذيبات والتراكيز المستخدمة في حين لم تحدث جميع المذيبات المستعملة اي تاثير تثبيطي لتركيز ٠% والمستخلص المائي والهكساني لتركيزي (٠.٥، ١)% على التوالي.

وبينت نتائج التحليل الاحصائي وجود تداخلا معنويا بين نوع النبات ونوع المذيب والتراكيز المستعملة إذ اعطى نبات السماق لمذيبي الكحولي والاثل استيت وبتركيزي (٠.٥، ١)% اعلى قطر تثبيط وبلغ (١٥.٠٠، ١٦.٣٣)ملم للمستخلص الكحولي و(١٥.٣٣، ١٦.٦٧)ملم للمستخلص خلات الاثيل ولتركيزي (٠.٥، ١)% على التوالي، في حين لم يسجل اي تاثير تثبيطي لجميع المستخلصات النباتية والمذيبات المستخدمة بتركيز ٠% والمستخلص المائي والهكساني لجميع النباتات والتراكيز المستعملة.

جدول(3) تأثير المستخلصات النباتية في القطر التثبيطي لبكتريا P. sppteus

نوع المستخلص النباتي	نوع المذيب	معدل قطر التثبيط للبكتريا *P. sppteus* (ملم)			معدل تأثير نوع النبات ونوع المذيب
		التراكيز المستخدمة(%)			
		٠	٠.٥	١	
السماق	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	١٥.٠٠	١٦.٣٣	١٠.٤٤
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٥.٣٣	١٦.٦٧	١٠.٦٧
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
الدارسين	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	٠.٠٠	٨.٦٧	٢.٨٩
	خلات الأثيل	٠.٠٠	٦.٣٣	١١.٠٠	٥.٧٨
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
العلك المر	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	٠.٠٠	٥.٦٧	١.٨٩
	خلات الأثيل	٠.٠٠	٨.٦٧	٨.٠٠	٥.٥٦
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
معدل تأثير التركيز		٠.٠٠	٣.٧٨	٥.٥٣	معدل تأثير نوع النبات
تأثير التداخل بين نوع النبات والتركيز	السماق	٠.٠٠	٧.٥٨	٨.٢٥	٥.٢٨
	الدارسين	٠.٠٠	١.٥٨	٤.٩٢	٢.١٧
	العلك المر	٠.٠٠	٢.١٧	٣.٤٢	١.٨٦
					معدل تأثير نوع مذيب
تأثير التداخل بين نوع المذيب والتركيز	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	٥.٠٠	١٠.٢٢	٥.٠٧
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٠.١١	١١.٨٩	٧.٣٣
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠

R.L.S.D $_{0.01}$

نوع النبات	نوع المذيب	التركيز	تأثير التداخل بين نوع النبات ونوع المذيب	تأثير التداخل بين نوع النبات والتركيز	تأثير التداخل بين نوع المذيب والتركيز	التداخل الثلاثي
١.٤٤	١.٦٧	١.٤٤	٢.٨٩	٢.٥١	٢.٨٩	٥.٠١

قد يعود سبب التباين الحاصل في التاثير التثبيطي لانواع المذيبات المستخدمة في الاستخلاص إلى اختلاف المواد الفعالة المستخلصة بواسطة المذيب إذ ان المستخلص المائي يقوم باستخلاص كمية ومجاميع

قليلة من المواد الفعالة مقارنة بالمذيبات الاخرى وهذا يمكن ارجاعه إلى قطبية المذيبات التي تلعب دورا هاما في استخلاص بعض المركبات الفعالة دون اخرى (Abu-Shanab *et al.* 2005؛Kelmanson, *et al.* 2000؛ الموسوي،٢٠٠٦)، كما قد يعود سبب تباين التاثير التثبيطي في انواع البكتريا إلى مقاومة بعض انواع البكتريا للتاثير التثبيطي للمستخلصات المستعملة إذ ان فعالية المستخلصات النباتية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام *S. aurens* و *B. Subtillus* تكون اعلى من فعاليتها ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام *Proteus spp*، اي ان حساسية البكتريا الموجبة لصبغة كرام تجاه المستخلصات النباتية تكون عالية مقارن بالبكتريا السالبة لصبغة اكرام التي تكون ذات حساسية منخفضة ومقاومة عالية ضد التاثير التثبيطي للمستخلصات النباتية وقد ترجع هذه الاختلافات إلى تباين تركيب ومظهر الجدار الخلوي لكل نوع من انواع البكتريا(Grosenvor *et al.*1995).

ويعزى التاثير التثبيطي للمستخلصات نبات السماق إلى احتواء هذه المستخلصات على مركبات تانينية ومواد كيمائية اخرى لها تاثير تثبيطي لنمو البكتري السالبة لصبغة كرام مقارنة بانواع البكترية الموجبة لهذه الصبغة(Amin *et al.* 2005; Adwan *et al.* 2006;Robinson, 1983)، وربما تعود فعالية مستخلص العلك المر إلى احتوائه على مواد فينولية وتانينية وقلويدية وهذه المركبات لها تاثير تثبيطي لانواع مختلفة من البكتريا (Abdallah *et al.*, 2009; Nwinyi *et al.* 2004)، كما يعد نبات الدارسين من النباتات الفعالة ضد انواع مختلفة من البكتريا السالبة لصبغة كرام مقارنة بانواع البكتريا الموجبة لصبغة كرام وذلك لاحتوائه على مركبي Cinnamldehye وEugenol وهي من المركبات الفينولية التي تعمل على تثبيط البكتريا من خلال التاثير على نشاط الجدار الخلوي وترسيب بروتوبلازم الخلية البكتيريا وبالتالي موتها (Gende *et al.* 2008; Trajano *et al.* 2010)، إذ اشار Burt (2004) ان نبات الدارسين يحتوي على مركبات فينولية تعمل على دنترة(Denaturation) وتحطيم المركبات البروتينية الموجودة في الخلية البكتيرية وتثبيط العمل الإنزيمي فيها.

تظهر نتائج جدول(٤) وجود فروق معنوية بين انواع المضادات الحيوية في تثبيط انواع البكتريا المختلفة المعزولة من كالس نخيل التمر إذ تفوق مضاد Cloramphenicol في احداث اكبر معدل في قطر التبيط ولجميع انواع البكتريا وبلغ ١٧.٩٦ملم في حين سجل المضاد الحيوي Amoxicillin اقل معدل لقطر التثبيط بلغ ٨.٥٦ملم كما سجل تركيز ١% للمضادات الحيوية اكبر معدل لقطر التثبيط للبكتريا بلغ ٢٤.٢٦ملم في حين لم تسجل معاملة المقارنة (تركيز ٠%) اي تاثير تثبيطي للبكتريا. وكان تاثير نوع البكتريا معنويا في قطر التثبيط اذ سجل اكبر قطر تثبيط ولجميع انواع المضادات الحيوية في بكتريا *S. aurens* وكان ١٥.٨٢ملم بينما سجل اقل قطر تثبيط في نوعي البكتريا *Proteus spp.* و *B. subtillus* وبلغا (١٣.٣٧ و١٣.٧٨)ملم على التوالي.

كما بينت النتائج وجود فروق معنوية في التداخل بين نوع البكتريا ونوع المضاد المستعمل إذ بلغ اكبر قطر تثبيط ١٨.٢٢ملم لنوع بكتريا *S. aurens* وللمضاد الحيوي Cloramphenicol بينما سجل اصغر قطر تثبيط في التداخل بين المضاد الحيوي Amoxicillin ونوعي البكتريا *Proteus spp.* و *B. subtillu* وبلغ ٧.١١ملم لكلاهما. كما لوحظ وجود تداخلا معنويا بين تاثير نوع البكتريا وتركيز المضادات الحيوية إذ بلغ اكبر قطر تثبيط في التداخل بين نوع بكتريا *S. aurens* وبتركيز ١% للمضادات الحيوية وكان ٢٦.٤٤ملم كما سجل تركيز ٠% ولجميع انواع البكتريا اصغر قطر تثبيط بلغ ٠.٠٠%، اما التداخل بين نوع المضاد الحيوي وتركيزه فقد كان معنويا ايضا إذ سجل اكبر قطر تثبيط للمضادين الحيويين Cloramphenicol و Gentamycin وبلغا (٢٨.٠٠ و٢٩.٣٣)ملم ولتركيز ١% وعلى التوالي بينما سجلت جميع انواع المضادات الحيوية اصغر قطر تثبيط بلغ ٠.٠٠ملم لتركيز ٠%، اما التداخل الثلاثي بين نوع البكتريا ونوع المضاد الحيوي وتركيزه فكان معنويا إذ سجل اكبر قطر تثبيط في بكتريا *S. aurens* وللمضاد الحيوي Cloramphenicol ولتركيز ١% وكان ٣٠.٣٣ملم في حين لم يسجل تركيز ٠% (المقارنة) ولجميع انواع البكتريا وانواع المضاد الحيوية المستعملة اي قطر تثبيطي على انوع البكتريا المدروسة.

اظهرت النتائج اختلافا في التاثير التثبيطي لانواع المضادات الحيوية المستعملة ضد انواع من البكتريا المعزولة من كالس نخيل التمر إذ وجد مقاومة انواع البكتريا للمضاد الحيوي Amoxicillin وقد ترجع ان المضاد الحوي قد يكون غير قادر على اختراق جدار خلية البكتريا او لانة تركيب ومسار نشاطاتها الحيوية على المستوى الكيميائي لا يفسح محالا للتداخل جزيئات المضاد الحيوي وقد يكون سبب مقاومة البكتريا للمضادات الحياتة إلى فقدانها المستقبلات على الرايبوسومات اي فقدانها لمواقع الهدف في خلية البكتريا (Jawetz *et al.* 1998) واحيانا تكون المقاومة بسبب حدوث طفرة ، اما حساسية البكتريا المعزولة للمضاد الحيوي Gentamycin قد تعود إلى لقدرة هذا المضاد على تثبيط تخليق البروتين في الخلية بالتصاقه بالمجاميع الفعالة مع الوحدة(30 S) للرايبوسوم البكتيري وتثبيط عملها اما مضاد Clorophenichol فهو ايضا يثبط تصنيع البروتين البكتيري من خلال تثبيط إنزيم Peptidyltrouferase ويعوق اتصال الاحماض الامينية في سلسلة الببتيد على وحدة الرايبوسوم (50 S) (ماضي، ٢٠٠٢)

جدول(٤) تأثير المضادات الحيوية في القطر التثبيطي لانواع مختلفه من البكتريا المعزوله من كالس نخيل التمر

نوع البكتريا	نوع المضاد	قطر التثبيط(ملم)			
		التركيز(%)			معدل تاثير التداخل بين نوع البكتريا ونوع المضاد
		0	0.5	1	
Proteus spp	Amoxicillin	0.00	8.67	12.67	7.11
	Gentamycin	0.00	19.00	27.33	15.44
	Cloramphenicol	0.00	24.00	28.67	17.56
S. aurens	Amoxicillin	0.00	19.67	19.67	11.44
	Gentamycin	0.00	24.00	29.33	17.78
	Cloramphenicol	0.00	24.33	30.33	18.22
B. subtillu	Amoxicillin	0.00	7.33	14.00	7.11
	Gentamycin	0.00	21.00	24.33	16.11
	Cloramphenicol	0.00	25.33	29.00	18.11
معدل تاثير التركيز		0.00	18.70	24.26	معدل تاثير نوع المضاد
معدل تاثير التداخل بين نوع المضاد والتركيز	Amoxicillin	0.00	10.00	15.44	8.56
	Gentamycin	0.00	21.33	28.00	16.44
	Cloramphenicol	0.00	24.56	29.33	17.96
	نوع البكتريا				معدل تاثير نوع البكتريا
معدل تاثير التداخل بين نوع البكتريا والتركيز	*Proteus spp*	0.00	17.22	22.89	13.37
	S. aurens	0.00	21.00	26.44	15.82
	B. subtillu	0.00	17.89	23.44	13.78

R.L.S.D $_{0.01}$

نوع البكتريا	نوع المضاد	التركيز	التداخل بين نوع البكتريا والمضاد	التداخل بين نوع البكتريا التركيز	التداخل بين نوع المضاد والتركيز	التداخل الثلاثي
٠.٥٥	٠.٥٥	٠.٥٥	٠.٩٦	٠.٩٦	٠.٩٦	١.٦٧

المصادر

ابحمان ،العربي وانجاران ، محمد والبوجرفاوي، محمد (٢٠٠١). تكنولوجيا الزراعة النسيجية واهميتها في إكثار نخيل التمر .*Phoenix dactylifera* L. المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والاراضي القاحلة شبكة بحوث وتطوير النخيل، دمشق. نشرة إرشادية العدد(٣).

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله(١٩٨٠). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. ٤٨٨ صفحة.

غالب، حسام حسين علي(١٩٨٠). النخيل العملي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة البصرة، كلية الزراعة، مطابع دار السياسة، الكويت. ٤٠٩صفحة.

ماضي، زينب جواد.(٢٠٠٢). معالجة التشوب البكتيري في انسجة نخلة التمر .*Phoenix dactylifera* L المزروعة خارج الجسم الحي باستخدام المضادات الحيوية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة البصرة.

مطر، عبد الامير مهدي(١٩٩١). زراعة وإنتاج النخيل مطبعة جامعة البصرة ٤٢٠ ص .

الموسوي ،منى عبد المطلب يحيى (٢٠٠٦) الفعالية الضد مايكروبية لمستخلصات بعض النباتات البرية العراقية ، رسالة ماجستير – كلية التربية – جامعة البصرة –العراق .

Abdallah EM, Khalid AS, Ibrahim N (2009) Antibacterial activityof oleo-gum resins of Commiphora molmol and Boswellia papyrifera against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA), Sci. Res. Essay. 4 (4): 351-356.

Abu-Shanab B, Adwan G, Abu-Safiya E. T.(2005). Antibacterial activity of Rhus coriaria. L extracts growing in Palestine. J Islamic Univ Gaza (Natural Sciences series) 13: 147-153,

Adwan, G., Abu-Shanab, B., Adwan, K., & Abu-Shanab, F.(2006) Antibacterial Effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on Pseudomonas aeruginosa. Turk J Biol , (30) 239-242.

Al-Ghamidi, A.S. (1993).True to type date palm *Phoenix dactylifera* L. production through tissue culture techniques, cv. Safry.3rd .Symp. Date Palm, KFU. Saudi Arabia, (1):1-13.

Amin G., Ahmadian – Attari, M., Fazeli, M., Jamalifar, H., Ashtiani, H., Ghobadi, A., Shakiba, R., Khanlarbeik, M. (2008) The Effects of Autoclaving, Salt and Protein on Antimicrobial Activities of Iranian Sumac. Journal of Medicinal Plans, 7(4):212-225.

Ammar, S & Benbadis, A.(1983) Vegetative propagation of date palm *Phoenix dactylifera* L. by *in vitro* culture. In proceeding of the first symposium on date palm. K.F.U., 158-166.

Burt, S.(2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, v. 94, p. 223-253,.

Collee, J.G.; Fraser, A.J., marmion, B.P. & Simmon, A.(1996).Makie and McCarteny Practical Medical Microbiology. 14th ed. P: 978. Churchill Living stone. New York.

George E.F. (1993) Plant propagation by tissue culture. Exergetics Ltd., Edington, England. p. 574

Gende, L. B., Floris, L., Fritz, R., & Ecuaras, M. J.(2008). Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine *Bulletin of Insectology 61 (1): 1-4*

Grosnover, P. W., Supriono, A., & Gray, D. O.(1995). Medicinal plant from Riau province Sumatra. Indonesia. Part2, antibacterial and antifungal activity. G. Ethnopharm., 45:97-111.

Guri; Assaf Z. (Cherry Hill, NJ); Patel; Kishor N. (Dobbs Ferry, NY)(1998) Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. Assignee: Plant Cell Technology, Inc. Washington, DC.

Harborne, J.B.(1984). Phytochemical methods, Chapman & Hall. New York 2nd .288pp.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; Staley, J.T. & Williams, S.T.(1994).Bergey`s nanual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins Baltimore.

Hostford, R.M.(1982). White blotch incited in wheat by *B. megaterium* cereals, Phytopathology, 72:1453-1459.

Jawets, E., Melnicl, K. L. & Adelbergs, E. A.(1998)Medical microbiology 2hded-pp:740. Appleton and Lange. California.

Kelmanson , J. E. Jager, A .K and Staden , J. R. (2000) Zulu medicinal plants with antibacterial activity J. ETHNOPHARM, 69: 241-246.

Nwinyi, F. C., Binda, L., Ajoku, G. A., Aniagu, S. O., Enwerem, N. M., Orisadipe, A., Kubarawa, D., & Gamaniel, K. S.(2004).Evaluation of the aqueous extract of Boswellia dalzielii stem bark for antimicrobial activities and gastrointestinal effects African Journal of Biotechnology Vol. 3 (5), pp. 284-288.

Odutayo, O. I.1, Amusa, N. A.2, Okutade, O. O. 1 and Ogunsanwo Y.R.1(2007) Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria, African Journal of Agricultural Research Vol. 2(3), pp. 067-072, March 2007

Reed, B.M. & Tanprasert, P.(1995) Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. Plant Tissue Culture & Biotechnology No.3 p137-142.

Perez,C,;Pauli , M and Bazergue , P .(1990) . An antibiotic Assay by the Agar- Well difution method .J.Acta Biologiae et medicine Expermental is ., 15:113:115 .

Robinson T. The organic constituents of higher plants. 5th ed. Cordus Press. North Amherst. 1983, p: 72.

Sudhersan,C. , Abo El-Nil,M.M. and Al-Baize, A.(1993). Occurrencence of direct somatic embryogenesis on the sword leaf in *in vitro* plantlets of (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Barhee .Curr . Sci., 65:887-888.

Trajano, V. N., Lina, E. O., Travassos, A. E., & Souza, E. L. (2010) Inhibitory effect of the essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on some food-related bacteria. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 30(3): 771-775, jul.-set.

Isolation And Identification of Bacterial Types That Causes Contamination of Date Palm ***Phoenix dactylifera*** L Callus and studding Inhibitory activates of some plant extracts And Antibiotic

Nasser H. Al-Dosary Mona A. AL-Mosaui Huda A. Al-Taha

Date Palm Research Center, **College of Agriculture**

Basrah Uni. Basrah - Iraq

Abstract

This research was conducted in Date palm research center, Basrah university- for isolation and identification of bacterial types that contaminated date palm tissue culture., and studied the inhibiting activities of three types of plant extracts on fruit of *Rhus coriaria* , bark of *Cinnamomum zeylanicum* and gummy extraction of *Bswellia sp*., using four types of solvent water, methyl alcohol, normal hexane and ethyl acetate, in three concentrations(0, 0.5, 1)% and studied the inhibitory activities of three types of antibiotics Gentamycin, Chloramphenicol and Amoxillin. The results of isolation and identification of bacteria appeared contanmination of callus tissue of date palm tissue culture by three genera of bacteria *Staphylloccus aurwus* , *Bacillus subtillus* and *Proteus spp*. The results showed that ethyl acetate extracts 1% of each *Rhus coriaria* and *Bswellia sp.* appeared the highest inhibition zone of about (23.00, 24.00)mm respectively against *S. aurwus* while the inhibition zone of ethyl acetate extract 1% of *Bswellia sp.* against *B. subtillus* was18.33mm, the results showed that alcohol and ethyl for acetate *Rhus coriaria* extract were the best extracts that gave the highest inhibition zone(16.76, 16.33)mm respectively against *Proteus spp*.

The results of antibiotic inhibiting activates against bacteria genera appeared preeminence of Chloramphenicol 1% of about (28.67, 30.33. 29.00)mm of in habitation zone against *Proteus spp*. *S. aurwus* and *B. subtillus* respectively while Gentamycin 1% gave the higher inhibition zone of about 29.33 mmagianest *Proteus spp* in significant difference among other treatments.