

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

ناصر حميد الدوسري منى عبد المطلب الموسوي هدى عبد الكريم الطه

مركز ابحاث النخيل كلية الزراعة

جامعة البصرة، البصرة العراق

الخلاصه

اجري هذا البحث في مركز ابحاث النخيل جامعة البصرة لعزل وتشخيص انواع البكتريا المرافقة للزراعة النسيجية لنخيل التمر ودراسة التأثير التنبيطي لثلاث انواع من المستخلصات النباتية وهي ثمار نبات السماق *Rhus coriaria* وقلف نبات القرفة (الدارسين) *Cinnamomum zeylanicum* والافرازات الصمغية لنبات العلك المر *Bswellia sp* اربعة انواع من المذيبات وهي الماء والكحول الميثيلي والهكسان وخلات الاثيل وبثلاث تراكيز (0.1 %، 1 %، 10 %) كما درس التأثير التنبيطي لثلاث انواع من المضادات الحيوية 0.1 % الاموكسلين (Amoxillin) وجنتاميسين (Gentamycin) وكلورام فينيكول (Chloramphenicol) وبثلاث تراكيز (0.1 %، 1 %، 10 %)، وظهرت نتائج العزل والتشخيص وجود ثلاث انواع من البكتريا وهي *Staphylococcus aurwus* و *Bacillus subtilus* و *Proteus spp* ملوثة لكالس نخيل التمر، وبينت نتائج التأثير التنبيطي للمستخلصات النباتية تفوق مستخلص خلات الاثيل نباتي السماق والعلك المر بتركيز 10 % في تحقيق اعلى قطر تثبيط لبكتريا *S. aurwus* وبلغ (10.00 مم، 10.00 مم) ملم على التوالي في حين سجل مستخلص خلات الاثيل لنبات العلك المر وبتركيز 10 % اعلى قطر تثبيط لبكتريا *B. subtilus* إذ (10.00 مم، 10.00 مم) ملم كما اوضحت النتائج تفوق المستخلص الكحولي وخلات الاثيل لنبات السماق وبتركيز 10 % في تحقيق اعلى قطر للتثبيط لبكتريا *Proteus spp* وكان (10.00 مم، 10.00 مم) على التوالي كما بينت نتائج التأثير التنبيطي للمضادات الحيوية تفوق المضاد الحيوي كلورام فينيكول (Chloramphenicol) وبتركيز 10 % في اعطاء اعلى قطر تثبيط (10.00 مم، 10.00 مم، 10.00 مم) ملم لبكتريا *Proteus spp* و *S. aurwus* و *B. subtilus* على التوالي كما حقق المضاد الحيوي جنتاميسين (Gentamycin) وبتركيز 10 % اعلى قطر تثبيط لبكتريا *Proteus spp* وبلغ (10.00 مم، 10.00 مم، 10.00 مم) ملم بفارق معنوي عن المعاملات الاخرى.

تعود نخلة التمر *Phoenix dactylifera* L. إلى العائلة النخيلية Arecaceae وإلى الرتبة Arecales وهي من اشجار ذوات الفلقة الواحدة (غالب، ٢٠٠٠) 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، ٢٠٠٠) تعد الزراعة النسيجية من التقانات الحديثة لأكثار 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 نسيجياً اما بواسطة تكشف الاعضاء من القمة النامية والبراعم الابضية او بواسطة تكوين الاجنة الجسمية عن طريق المرور بمرحلة الكالس والذي منه الاجنة الخضرية (Al-Ghamidi, 1993 Sudhersan, et al. 1993) ابمان واخرون، ٢٠٠٠) 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) يتعرض النسيج النباتي في جميع مراحل الزراعة النسيجية إلى الإصابة بالاحياء المجهرية سواء الداخلية منها (تصيب داخل النخلة) او الخارجية (تصيب خارج النسيج) وتسبب خسارة في النسيج النباتي مؤدية اما إلى ضعف نمو النسيج النباتي او نشووه 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 التقنية والتي يصعب حلها، وان تلوث النسيج النباتي يحدث اما بسبب عدم تعقيمه بصورة صحيحة او [لوث] أثناء عمليات الزراعة او تلوث المعدات والادوات والاشخاص العاملين في هذه التقانة ويعد التلوث الخارج من اكثر الانواع شيوعاً وضرراً في زراعة الانسجة النباتية (George, 1993) ويعتبر الوسط الزراعي المستخدم في هذه التقنية 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 النسيجية احد الطرق الفعالة في الحد من التلوث المايكروبي كما ان إضافة بعض انواع المبيدات الفطرية والمضادات الحيوية ضد انواع مختلفة من البكتريا تلعب دوراً مهماً في القضاء من التلوث المايكروبي (Guri, et al. 1998).

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

المواد وطرائق العمل

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 من النمو البكتيري للكالس الملوث ومن حولها لثلاث مناطق عشوائية وزرعت على وسط زرعى نوع (Compete – Agar (C.A) (Hostford, 1982) وحضنت في درجة حرارة $\pm 25^\circ\text{C}$ ولمدة (24 ساعة).

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

تحضير المستخلصات النباتية

جلبت النباتات المراد عمل المستخلصات منها ثمار نبات السماق *Rhus coriaria* وقلق نبات القرفة (الدارسين) *Cinnamomum zeylanicum* والافرازات الصمغية لنبات العلك المر *Bswellia sp* من الاسواق المحلية. جففت هذه العينات باستخدام فرن حراري على درجة حرارة 60°C لمدة 24 ساعة وطحنت بعدها واخذت من المادة المجففة ووضعت كلا على حدة في اوعية استخلاص في جهاز Soxhlet extractor باستخدام كل من الماء والايثانول والهكسان وكلا على حدة واستخلصت بدرجة حرارة 60°C ولمدة 24 ساعة وجففت المستخلصات بواسطة المبخر الدوار للحصول على التماله (Harborne,1984). بعد ذلك حضر المحلول المركز Stock solution لكل مستخلص من المستخلصات النباتية ولكل مذيب على حدة وذلك بإذابة غم من التماله الجافة في كل من المذيبات المستخدمة واكمل الحجم إلى 100 مل من المذيب المستخدم في المحلول بتركيز 1% وعقم باستخدام ورق ترشيح (Millipore filter paper) ثم حضرت تراكيز (10، 20، 30%) لكل مستخلص ولجميع المذيبات المستخدمة.

تحضير المضادات الحيوية

جلبت ثلاث انواع من المضادات الحيوية (جدول 1) من الاسواق المحلية واذيبت في كل من الماء المقطر المعقم وحضرت ثلاث تراكيز وهي (10، 20، 30%).

نوع المضاد	تركيزه (ملغم)	الشركة المصنعة
الاموكسلين (Amoxillin)	100	شركة سامراء للمستلزمات الطبية
جنتاميسين (Gentamycin)	100	شركة سامراء للمستلزمات الطبية
كلورام فينيكول (Chloramphenicol)	100	شركة سامراء للمستلزمات الطبية

٥ ٥ دراسة تأثير الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية والمضادات الحيوية.

اتبعت طريقة Agar-Weel-Diffuson (Perez *et al.*1990) لاختبار فعالية المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية إذ صب ٥ مل من الوسط (MHA) (Muller Hinton-Agar) لكل طبق زجاجي ونقع الوسط بعد ٥ دقائق ٥ مل من العالق الجرثومي ذي كثافة ضوئية ٥.٥ على طول موجي ٥٥٥ نانومتر باستخدام المطياف الضوئي وذلك باستخدام ناشر زجاجي (Spreader) معقم تركت الاطباق لمدة ٥ دقائق لحين الجفاف بعدها عملت ستة حفر قطر كلا منها ٥ ملم وباستخدام ناقب معدني معقم لكل طبق واضيف ٥ مايكروليتر من المستخلص النباتي والمضاد الحيوي لكل حفرة وباستخدام ماصة دقيقة ذات اغطية ٥٥٥٥٥.

حضنت الاطباق في حاضنة ٥٥٥ بدرجة حرارة ٥٥ ± ٥ م ولمدة ٥ ساعة بعدها قيس قطر التثبيط لكل من المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية المستخدمة بوساطة شريط قياس ولكل نوع بكتيري وبواقع ٥٥٥٥٥ اطباق لكل نوع.

٥ ٥ التحليل الاحصائي.

حللت النتائج وفق تصميم القطاعات العشوائية الكامل Complete Randomized Block C.R.B.D. Design كتجارب متعددة العوامل، قورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي المعدل R.L.S.D وبمستوى احتمالية ٥٥٥٥ (الراوي وخلف الله، ٥٥٥٥٥).

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

اما ما يخص التأثير التثبيطي للمستخلصات النباتية ضد انواع البكتريا المعزولة والمسببة للتلوث البكتيري لكالس نخيل التمر فتظهر نتائج الجدول (1) وجود فروقات معنوية بين جميع المعاملات المستخدمة والتدخل فيما بينهم في قطر التثبيط لبكتريا *S. aureus*. إذ تفوق مستخلص الساق ثلاث العلك المر في اعطاء اعلى قطر تثبيط بلغ (0.00 0.00) ملم على التوالي وبفارق معنوي عن مستخلص نبات الدارسين الذي حقق اقل قطر تثبيط كان 0.00 ملم، كما دلت النتائج وجود فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة إذ تفوق تركيز 1% في اعطاء اعلى قطر تثبيط بلغ 0.00 ملم عن بقية التراكيز في حين سجل تركيز 0% اقل قطر تثبيط بلغ 0.00 ملم، ونجد من نفس الجدول وجود فروق معنوية بين انواع المذيبات المستخدمة في الاستخلاص إذ حقق مذيب خلات الايثيل اعلى قطر تثبيط بلغ 0.00 ملم وبفارق معنوي عن بقية المذيبات في حين سجل المستخلص المائي اقل قطر تثبيط بلغ 0.00 ملم.

واظهر التدخل بين نوع النبات والمذيب فقد علاقة معنوية إذ سجل مستخلص خلات الايثيل 0.00 0.00 الساق والعلك المر اعلى قطر تثبيط بلغ (0.00 0.00) ملم على التوالي في حين سجل المستخلص المائي لنبات الساق اقل قطر تثبيط وكان 0.00 ملم. كما تفوق نبات الساق بتركيز 1% عن بقية المعاملات في اعطاء اعلى قطر تثبيط وكان 0.00 ملم بينما لم سجل تركيز 0% اي تأثير تثبيطي ولجميع المستخلصات النباتية المستخدمة وتبين النتائج وجود فروق معنوية في قطر التثبيط للتدخل بين نوع المذيبات والتركيز إذ تفوق مستخلص خلات الايثيل بتركيز 1% تحقيق اكبر قطر تثبيط بلغ 0.00 ملم بينما لم يسجل اي تأثير تثبيطي للمستخلص المائي والكحولي وخلات الايثيل والهكساني وتركيز 0%، اما في يخص التدخل الثلاثي فقد كان معنوياً إذ تفوق المستخلص خلات الايثيل الساق والعلك المر وبتراكيز 1% في تحقيق اكبر قطر تثبيط بلغ (0.00 0.00) ملم لمستخلص النباتين على التوالي وبفارق معنوي عن جميع المعاملات المستعملة الاخرى.

جدول (٥) اثر المستخلصات النباتية في الفطر التتبيطي لبكتريا *S. aurwus*

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

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 (١) نلاحظ وجود فروقات معنوية بين انواع النباتات والمذيبات والتراكيز المستعملة والتدخل فيما بينهم في قطر التثبيت لبكتريا *B. subtilis* إذ تفوق مستخلص نبات السماق ونبات العلك المر في تحقيق اكبر قطر للتثبيت بلغ (١.١١ و ١.١١) ملم على التوالي فيما لم يحقق مستخلص نبات الدارسين اي تأثير تثبيطي لبكتريا *B. subtilis* كما وجد فروق معنوية بين انواع المذيبات المستخدمة في الاستخلاص في تثبيت النمو البكتيري إذ سجل اعلى معدل لقطر التثبيت لمذيب خلات الايثل وبلغ ١.١١ ملم وبفارق معنوي عن بقية المذيبات في حين سجل الماء ومذيب الهكسان اقل قطر للتثبيت كان (١.١١ و ١.١١) ملم على التوالي، وكان لتاثير اختلاف التراكيز معنويا في قطر التثبيت إذ سجل اكبر قطر تثبيت في تركيز ١ % ١١١ ملم بينما لم يسجل اي تأثير تثبيطي لتركيز ١ %.

دلت النتائج وجود تدخلا معنويا بين نوع النباتات والمذيبات المستعملة إذ سجل اعلى معدل لقطر التثبيت لنبات العلك المر وللمذيب خلات الايثل ١.١١ ملم متفوقا على جميع المعاملات الاخرى، كما كان لتاثير التدخل بين نوع النباتات والتراكيز المستعملة معنويا إذ تفوق نباتي السماق والعلك المر في تركيز ١ % في تسجيلهما اكبر معدل للقطر التثبيت بلغ (١.١١ و ١.١١) ملم على التوالي بينما سجل نبات السماق والعلك المر لتركيز ١ % ونبات الدارسين ولجميع التراكيز اقل قطر للتثبيت بلغ ١.١١ % على التوالي، كما سجل مذيب خلات الايثل اكبر قطر للتثبيت في تركيزي (١.١١ و ١.١١) % (١.١١ و ١.١١) ملم على التوالي متفوقا على جميع المعاملات الاخرى، في حين لم يحقق جميع المذيبات المستعملة ولتركيز ١ % اي تأثير تثبيطي للبكتريا. وتظهر النتائج وجود تدخلا معنويا بين نوع النباتات والمذيبات والتراكيز المستعملة للقطر التثبيت لبكتريا *B. subtilis* إذ تفوق معاملة نبات العلك المر ولمذيب خلات الايثل ولتركيز ١ % في تحقيق اكبر قطر للتثبيت بلغ ١.١١ % وعلى جميع المعاملات الاخرى.

جدول (١١) تأثير المستخلصات النباتية في القطر التثبيطي لبكتريا *B. subtilis*

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

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

وبلغت نتائج جدول (١١) فروق معنوية تحت مستوى احتمالية ١% في القطر التثبيط لبكتريا *Proteus spp.* لجميع المعاملات المستعملة والتداخل فيما بينهم، إذ دلت النتائج تفوق مستخلص نبات السماق

في احدث اعلى معدل قطر تثبيط لبكتريا *Proteus spp.* وبلغ ١٠٠.٠٠ ملم وبفارق معنوي عن مستخلصي نباتي الدارسين والعلك المر اللدان لم يكن هناك اي فرق معنوي فيما بينهم وبلغا (١٠٠.٠٠ ١٠٠.٠٠) ملم على التوالي، ١٠٠.٠٠ اعلى قطر تثبيط بتركيز ١% وبلغ ١٠٠.٠٠ ملم وتلاه التركيز ١٠% وبلغ ١٠٠.٠٠ ملم وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة (تركيز ١%) إذ كانت ١٠٠.٠٠ ملم، كما تظهر النتائج وجود فروق معنوية بين انواع المذيبات المستعملة في قطر التثبيط لبكتريا *Proteus spp.* إذ تفوق مستخلص خلاص الاثيل ومستخلص الكحولي في احدث اعلى قطر تثبيط وبلغا (١٠٠.٠٠ ١٠٠.٠٠) ملم على التوالي وبفارق معنوي عن مستخلصي الهكساني والمائي الذي بلغ نسبة التثبيط ١٠٠.٠٠ ملم 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 لمذيب الكحول وخلاص الاثيل وبلغ (١٠٠.٠٠ ١٠٠.٠٠) 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 تركيزي (١٠ ١٠٠.٠٠) % اعلى قطر تثبيط للبكتريا (١٠٠.٠٠ ١٠٠.٠٠) ملم في حين لم يلاحظ اي تأثير تثبيطي لجميع المستخلصات النباتية لتركيز ١% ونجد من نتائج التحليل الاحصائي وجود دخلا معنويا بين نوع المذيب والتركيز المستخدمة فقد تفوق مذيب خلاص الاثيل بتركيزي (١٠ ١٠٠.٠٠) % احدث اعلى قطر تثبيط لبكتريا وكان (١٠٠.٠٠ ١٠٠.٠٠) ملم وتلاه المستخلص الكحولي بتركيز ١% إذ سجل ١٠٠.٠٠ ملم وبفارق معنوي عن بقية المذيبات والتركيز المستخدمة في حين لم تحدث ١٠٠.٠٠ المذيبات المستعملة اي تأثير تثبيطي لتركيز ١% والمستخلص المائي والهكساني لتركيزي (١٠ ١٠٠.٠٠) % على التوالي.

وبينت نتائج التحليل الاحصائي وجود دخلا معنويا بين نوع النبات ونوع المذيب والتركيز المستعملة إذ اعطى نبات السماق لمذيب الكحولي والائل استيت وبتركيزي (١٠ ١٠٠.٠٠) % اعلى قطر تثبيط وبلغ (١٠٠.٠٠ ١٠٠.٠٠) ملم للمستخلص الكحولي و(١٠٠.٠٠ ١٠٠.٠٠) ملم للمستخلص خلاص الاثيل ولتركيزي (١٠ ١٠٠.٠٠) % على التوالي، في حين لم يسجل اي تأثير تثبيطي لجميع المستخلصات النباتية والمذيبات المستخدمة بتركيز ١% والمستخلص المائي والهكساني لجميع النباتات والتركيز المستخدمة.

نوع المستخلص النباتي	معدل قطر التثبيط للبكتريا <i>P. sppteus</i> (مم)			
	نوع المذيب	التراكيز المستخدمة(%)		
		٠	٠.٥	١
السماق	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	١٥.٠٠	١٦.٣٣
	خلات الاثيل	٠.٠٠	١٥.٣٣	١٦.٦٧
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
الدارسين	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	٠.٠٠	٨.٦٧
	خلات الاثيل	٠.٠٠	٦.٣٣	١١.٠٠
	هكساني	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
العلك المر	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	٠.٠٠	٥.٦٧
	خلات الاثيل	٠.٠٠	٨.٦٧	٨.٠٠
	هكساني	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
	الدارسين	٠.٠٠	١.٥٨	٤.٩٢
	العلك المر	٠.٠٠	٢.١٧	٣.٤٢
	معدل تأثير نوع مذيب			
تأثير التداخل بين نوع المذيب والتركيز	المائي	٠.٠٠	٠.٠٠	٠.٠٠
	كحولي	٠.٠٠	٥.٠٠	١٠.٢٢
	خلات الأثيل	٠.٠٠	١٠.١١	١١.٨٩
	هكساني	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 التأثير التثبيطي لأنواع المذيبات المستخدمة في الاستخلاص إلى اختلاف المواد الفعالة المستخلصة بواسطة المذيب إذ إن المستخلص المائي يقوم باستخلاص كمية ومجاميع

قليلة من المواد الفعالة مقارنة بالمذيبات الأخرى وهذا يمكن إرجاعه إلى قطبية المذيبات التي تلعب دوراً هاماً في استخلاص بعض المركبات الفعالة دون أخرى (Kelmanson, et al. 2000؛ Abu-Shanab et al. 2005؛ الموسوي، ٢٠٠٥)، كما قد يعود سبب تباين التأثير التثبيطي في أنواع البكتيريا إلى مقاومة بعض أنواع البكتيريا للتأثير التثبيطي للمستخلصات المستعملة إذ إن فعالية المستخلصات النباتية ضد البكتيريا الموجبة لصبغة كرام *S. aureus* و *B. Subtilus* تكون أعلى من فعاليتها ضد البكتيريا السالبة لصبغة كرام *Proteus spp* أي إن حساسية البكتيريا الموجبة لصبغة كرام تجاه المستخلصات النباتية تكون عالية مقارنة بالبكتيريا السالبة لصبغة كرام التي تكون ذات حساسية منخفضة ومقاومة عالية ضد التأثير التثبيطي للمستخلصات النباتية وقد ترجع هذه الاختلافات إلى تباين تركيب ومظهر الجدار الخلوي لكل نوع من أنواع البكتيريا (Grosenvor et al. 1995).

ويعزى التأثير التثبيطي للمستخلصات نبات السماق إلى احتواء هذه المستخلصات على مركبات ثانوية ومواد كيميائية أخرى لها تأثير تثبيطي لنمو البكتيريا السالبة لصبغة كرام مقارنة بأنواع البكتيريا الموجبة لهذه الصبغة (Amin et al. 2005; Adwan et al. 2006; Robinson, 1983) وربما تعود فعالية مستخلص العلك المر إلى احتوائه على مواد فينولية وثانوية وقلويدية وهذه المركبات لها تأثير تثبيطي لأنواع مختلفة من البكتيريا (Abdallah et al., 2009; Nwinyi et al. 2004) كما يعد نبات الدارسين من النباتات الفعالة ضد أنواع مختلفة من البكتيريا السالبة لصبغة كرام مقارنة بأنواع البكتيريا الموجبة لصبغة كرام وذلك لاحتوائه على مركبي Cinnamaldehye و Eugenol وهي من المركبات الفينولية التي تعمل على تثبيط البكتيريا من خلال التأثير على نشاط الجدار الخلوي وترسيب بروتوبلازم الخلية البكتيرية وبالتالي موتها (Gende et al. 2008; Trajano et al. 2010) إذ أشار Burt (2004) أن نبات الدارسين يحتوي على مركبات فينولية على دنتر (Denaturation) وتحطيم المركبات البروتينية الموجودة في الخلية البكتيرية وتثبيط العمل الإنزيمي فيها.

تظهر نتائج جدول (١) وجود فروق معنوية بين أنواع المضادات الحيوية في تثبيط أنواع البكتيريا المختلفة المعزولة من كالس نخيل النمر إذ تفوق مضاد Cloramphenicol في أحداث أكبر معدل في قطر التثبيط ولجميع أنواع البكتيريا وبلغ ١٠.٠٠ ملم في حين سجل المضاد الحيوي Amoxicillin أقل معدل لقطر التثبيط بلغ ١٠.٠٠ ملم كما سجل تركيز ٥٠% للمضادات الحيوية أكبر معدل لقطر التثبيط للبكتيريا بلغ ١٠.٠٠ ملم في حين لم تسجل معاملة المقارنة (تركيز ١٠%) أي تأثير تثبيطي للبكتيريا. وكان تأثير نوع البكتيريا معنوياً في قطر التثبيط إذ سجل أكبر قطر تثبيط ولجميع أنواع المضادات الحيوية في بكتيريا *S. aureus* وكان ١٠.٠٠ ملم بينما سجل أقل قطر تثبيط في نوعي البكتيريا *Proteus spp.* و *B. subtilus* وبلغا (١٠.٠٠ و ١٠.٠٠) ملم على التوالي.

كما بينت النتائج وجود فروق معنوية في التداخل بين نوع البكتريا ونوع المضاد المستعمل إذ بلغ أكبر قطر تثبيط ١٠.٠٠ ملم لنوع بكتريا *S. aureus* وللمضاد الحيوي Cloramphenicol بينما سجل اصغر قطر تثبيط في التداخل بين المضاد الحيوي Amoxicillin ونوعي البكتريا *Proteus spp.* و *B. subtilis* وبلغ ١.٠٠ ملم. كما لوحظ وجود تداخلا معنويا بين تأثير نوع البكتريا وتركيز المضادات الحيوية إذ بلغ أكبر قطر تثبيط في التداخل بين نوع بكتريا *S. aureus* وتركيز ١٠% للمضادات الحيوية وكان ١٠.٠٠ ملم كما سجل تركيز ١٠% ولجميع انواع البكتريا اصغر قطر تثبيط بلغ ١.٠٠%، اما التداخل بين نوع المضاد الحيوي وتركيزه فقد كان معنويا ايضا إذ سجل أكبر قطر تثبيط للمضادين الحيويين Cloramphenicol و Gentamycin وبلغا (١٠.٠٠ و ١٠.٠٠) ملم وتركيز ١٠% وعلى التوالي بينما سجلت جميع انواع المضادات الحيوية اصغر قطر تثبيط بلغ ١.٠٠ ملم وتركيز ١٠%، اما التداخل الثلاثي بين نوع البكتريا ونوع المضاد الحيوي وتركيزه فكان معنويا إذ سجل أكبر قطر تثبيط في بكتريا *S. aureus* وللمضاد الحيوي Cloramphenicol وتركيز ١٠% وكان ١٠.٠٠ ملم في حين لم يسجل تركيز ١٠% (المقارنة) ولجميع انواع البكتريا وانواع المضاد الحيوية المستعملة اي قطر تثبيط على انواع البكتريا المدروسة.

اظهرت النتائج اختلافا في التأثير 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 الحيوي قد يكون غير قادر على اختراق جدار خلية البكتريا او لانه تركيب ومسار نشاطاتها الحيوية على المستوى الكيميائي لا يفسح محالا للتداخل جزيئات المضاد الحيوي وقد يكون سبب مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية 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 Peptidyltransferase ويعوق اتصال الاحماض الامينية في ساسلة الببتيد على وحدة الرايبوسوم (50 S) (١٠.٠٠ و ١٠.٠٠)

جدول (٤) تأثير المضادات الحيوية في القطر التثبيطي لأنواع مختلفة من البكتيريا المعزولة من كاس نخيل التمر

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

R.L.S.D_{0.01}

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

المصادر

ابحمان ،العربي وانجاران ، محمد والبوجرفاوي، محمد (٢٠٠٠). 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(١).

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله(٢٠٠٠). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. ٢٠٠٠.

غالب، حسام حسين علي(٢٠٠٠). النخيل العملى. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة البصرة، كلية الزراعة، مطابع دار السياسة، الكويت. ٢٠٠٠.

ماضي، زينب جواد(٢٠٠٠). معالجة الشوب 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(٢٠٠٠). زراعة وإنتاج النخيل: مطبعة جامعة البصرة - ٢٠٠٠ ص .

الموسوي [منى عبد المطلب يحيى (٢٠٠٠) الفعالية ضد مايكروبية لمستخلصات بعض النباتات البرية العراقية] رسالة ماجستير - كلية التربية - جامعة البصرة -العراق .

Abdallah EM, Khalid AS, Ibrahim N (2009) Antibacterial activity of 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 Argentina *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 manual 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., Melnick, K. L. & Adelbergs, E. A.(1998)Medical microbiology 2nded-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 diffusion method .J.Acta Biologicae et medicine Experimental is., 15:113:115.
- Robinson T. The organic constituents of higher plants. 5th ed. Cordus Press. North Amherst. 1983, p: 72.
- Sudharsan,C., Abo El-Nil,M.M. and Al-Baize, A.(1993). Occurrence 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-Mosau

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 substillus* 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. substillus* 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. substillus* respectively while Gentamycin 1% gave the higher inhibition zone of about 29.33 mmagianest *Proteus spp* in significant difference among other treatments.