

وزارة التعليم والبحث العلمي

جامعة سبها

كلية العلوم

قسم النبات

دراسة تأثير المستخلصات السامة علي بكتيريا الروزبيه

عمل الطالبان

مريم مادي عبدالسلام

حنان عبدالقادر عويدات

اشراف

أ. أبوبكر قرين

يرفع الله الذين آمنوا منكم والذين
أوتوا العلم درجاتٍ

صدق الله العظيم

سورة المجادلة الآية (11)

الإهداء

إلى كل من زر عوا التفاؤل في دربنا وقدموا لنا المساعدات والتسهيلات والافكار والمعلومات فلهم منا كل الشكر
واخص منهم

(امي وابي)

إلى من سطرت معهم على جدران الزمن اجمل الذكريات إلى من عشت معهم احلى اللحظات إلى اهل الوفاء ومنبع
الإخاء إلى اللذين اسعدني وجودهم بقربي إلى من لهم مكانة بقلبي إلى كل افراد الأسرة الكريمة وكافة احبابي
وصديقاتي وزميلاتي في الدراسة.

نهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع..

كلمة الشكر

نتقدم بجزيل الشكر إلى كل من مدوا لنا يد العون والمساعدة في اخراج هذا البحث على اكمل وجه واخص بالذكر

الأستاذ الفاضل: (ابوبكر اقرين)

ولا ننسى أن نتقدم بجزيل الشكر للأستاذ: (شمسي عبد الله) الذي قام بتوجيهنا ومساعدتنا طيلة هذا البحث

وصاحب الفضل في توجيهنا ومساعدتنا فجزاه الله كل الخير ...

معدتا البحث

الفصل الاول

المقدمة والدراسات السابقة

1-1 المقدمة

تلعب التربة دوراً هاماً في نمو النباتات وحياتها ، وتعد الأساس الذي تقوم عليه عمليات الإنتاج الزراعي والحياة الحيوانية ، كما تحوي التربة على كثير من الكائنات الحية الدقيقة ، والديدان ، والحشرات . وتكمن أهمية التربة في كونها وسطاً استنادياً للنباتات تنمو فيها الجذور ، وعن طريقها تمتص النباتات الماء والأملاح المنحلة التي تحتاجها . ويتوافر في التربة الشروط البيئية المختلفة من الجفاف والرطوبة والتهوية والحرارة والملوحة وغيرها . وتعد كذلك أحد المكونات الرئيسية لدورات العناصر الأساسية الطبيعية وذلك لأن مكونات التربة تعتمد على مكونات الهواء والماء وتركيب الهواء يعتمد على التربة والماء وهكذا(سلوم ونضال، 2010).

كما تعد التربة من أعقد الأنظمة الطبيعية ، لأنها تؤلف نظاماً خاصاً متعدد الأطوار وغير متجانس فهي تتكون من طور صلب ، وطور سائل ، وطور غازي . وتعرف التربة بأنها الطبقة السطحية من الأرض ، وقد تكونت خلال سلسلة من العمليات المعقدة خلال ملايين السنين (المؤسسة العامة للتعليم الفني والتدريب ، 2010) وتلوث التربة يعني دخول مواد غريبة في التربة أو زيادة في تركيز إحدى مكوناتها الطبيعية ، الأمر الذي يؤدي إلى تغير في التركيب الكيميائي والفيزيائي للتربة ، وهذه المواد يطلق عليها ملوثات التربة وقد تكون مبيدات أو أسمدة كيميائية أو أمطار حمضية أو نفايات (صناعية - منزلية - مشعة وغيرها).

(المؤسسة العامة للتعليم الفني والتدريب، 2010) تعتبر التربة ملوثة باحتوائها على مادة أو مواد بكميات أو تركيزات على غير العادة سواء بالزيادة أو النقصان فتسبب خطر على صحة

الإنسان والحيوان والنبات أو المنشآت الهندسية على حساب الأراضي الزراعية أو المياه السطحية والجوفية وتعتبر من أبرز مشكلات البيئة وأكثرها تعقيداً وأصعبها حلاً . ويؤدي تلوث التربة إلى تلوث المحاصيل الزراعية ، الأمر الذي يؤدي إلى الإضرار بصحة الإنسان الذي يتغذى عليها مباشرة، وعن طريق انتقال الملوثات إلى المنتجات الحيوانية كالحليب والبيض واللحم. ومصادر تلوث التربة عديدة منها الغلاف الجوي والغلاف المائي والغلاف الحيوي بما في ذلك الإنسان وأنشطته.

وكما ذكر سالفا حول الملوثات فان العديد من الدراسات اشارت الى اليات والعمليات التي تفرز بها النبات (بالأخص النباتات السامة) العديد من المواد التي تعمل بها على حماية نفسها ومنطقتها ، ولا يزال غير المفهوم بصورة جيدة كيف تعمل هذه المواد وقد اشارت دراسات في المانيا وفرنسا حول ان العديد من النباتات تفرز مواد تقاوم بها النباتات الاخرى باليات التنافس وعرفت العديد من اليات المقاومة مثل التنافس وقدرة النبات على تحمل ظروف معينة ، وقد عرف ان بعض النباتات تفرز ما يعرف بـ *allelochemicals* وهي سموم تعمل على تثبيط نمو النباتات الاخرى وتعرف هذه الظاهرة بالتأثير الاليلوباثي *allelopathy* ، وقد تنتج بعض النباتات هذه المواد التي قد تعتبر ملوثات حيوية للتربة وللنباتات المحيطة وبالأخص النباتات ذات الاهمية الاقتصادية والمحتوى الميكروبي من البكتيريا النافعة مثل *Rhizobia* والاكثينوميستات وغيرها التي تساهم في عمليات تثبيت النيتروجين ومن امثلة هذه النباتات العشار *Calotropis procera* (Planck 2015)

شجرة العشر هي شجرة معمرة ودائمة الخضرة، تنمو في منطقة الجزيرة العربية، وتندرج تحت الفصيلة *Asciepiadoideae*، أو العشارية، أو الصقلابية، وارتفاعها يصل لخمسـة أمتار، أوراقها كبيرة، ولونها أخضر مزرقّ دون عنق، أفرعها هشة خشبية، وذات لحاء إسفنجي، وبالرغم من أنها نبتة سامة، ولها العديد من المخاطر على صحة الإنسان، إلا أنّ لحاءها يستخدم في العلاجات الطبية، ويتنشر بكثرة في الجزيرة العربية (موسى، 2012)

بكتيريا العقد الجذرية

تلعب بكتيريا العقد الجذرية دوراً حيوياً في الزراعة عن طريق حثها لتكوين العقد الجذرية على جذور البقوليات مثل الفول، والبرسيم وتستطيع هذه العقد ان تقلل كمية المخصبات النيتروجينية المضافة خلال نمو هذه المحاصيل.(م.ز عصام عزيز هيكل خريج قسم وقاية النبات شعبة المبيدات كلية الزراعة جامعة الازهر بالقاهرة.)

2-1 الهدف من البحث

اختبار قدرة بكتيريا الرايزوبيا *Rhizobia* المعزولة من نبات الحندقوق *Melilotus.Officianalis* على النمو وتحمل تراكيز مستخلص نبات العشار



صورة (1) توضح نبات العشار *Calotropis proera*

(مكشآت, 2009)

3-1 الدراسات السابقة

اجريت دراسة حول تثبيط مستخلص لسموم التربة ضد نمو بكتيريا Rhizobia المكونة للعقد في نبات البرسيم ، واطهرت النتائج ان المستخلص لم يظهر اي نتيجة ضد *Rhizobium trifolii* ، ولم يثبط نفس المستخلص بكتيريا *R. lupini* وكان هذا المستخلص قد جمع خلال موسم النمو وليس موسم الامطار لاستبعاد احتمال وجود نسبة من الاحماض في الامطار ، اجريت جميع الاختبارات في اوساط سائلة (Chatel and parke, 1972)

واجريت دراسة اخري لمعرفة التأثير المثبط لمستخلصات اوراق نبات العشار الكحولية والمائية واللبن النباتي (اللاتكس) لنمو اربع عزلات بكتيرية مسببة للأمراض هي *Ecsherichia coli; Staphlococcus aureus, Salmonella specis, Pseudomonas* sp.

باستخدام طريقة انتشار القرص وتخفيف المرق المغذي بأن المذيب العضوي (الإيثانول) هو افضل المذيبات لاستخلاص المواد الكيميائية النباتية الفعالة كمضادات للبكتيريا وكان الحد الأدنى للتركيز المثبط (MIC) للنمو البكتيري للمستخلص الكحولي (الإيثانول) لأوراق نبات العشار 2000-1000 ميكروجرام امل اما المستخلص المائي لأوراق نبات العشار واللبن

النباتي بصفة عامة يظهر أي نشاط مثبت للنمو البكتيري للسلاطين البكتيريتين *Salmonella*

species and Pseudomonas species وهذا ما اتضح من نتائج الدراسة الحالية .

الفصل الثاني

مواد وطرق العمل

مواد وطرق العمل

1-2 الاوساط الغذائية المستخدمة في هذه الدراسة :-

1- وسط مستخلص الخميرة و المانيتول

2 - وسط جنسن Jensen

:Yeast Extract Mannitol Agar(YEM)

الكمية (g/L)	المركب
10	Mannitol
1	Yeast extract
0.1	Nacl
0.2	Mg so ₄ .7H ₂ O
0.46	K ₂ HPO.3H ₂ O
0.12	K ₂ HPO
15	Agar
7.2	PH

وسط جنسن Jensen يتكون من: Macroelements

KH ₂ PO ₄ (solution a 20 g/ 1000 ml)	10 ml
MgSO ₄ .7 HO ₂ (solution a 20 g/ 1000 ml)	10 ml
NaCl (solution a 20g/ 1000ml)	10ml

CaHPO ₄ (solution a 50 g/ 1000 ml)	20 ml
FeCl ₃ . 6H ₂ O (solution a 20 g/ 1000 ml)	10 ml
Micro- elements *	1.0ml
pH	6.8
Agar	20.0g

*العناصر الصُّغرى (mg/ L) Microelements

MnSO ₄ .7H ₂ O	120.4
MnSO ₄ .H ₂ O	19.1
CaCl ₂ .6H ₂ O	4.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5.4
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.0
NaMoO ₄ .2H ₂ O	1.2
H ₃ BO ₃	35.6

2-2 البكتيريا المستخدمة :-

عزلت البكتيريا من العقد الجذرية كما وصف من قبل (Vincent,1970) حيث غسلت العقد جيدا بماء الحنفية للإزالة الاتربة والطين ثم غمرت ف الكحول الأيثيلي (97%) بعدها طهرت بمحلول كلوريد الزئبق الحامضي (0.1%) لمدة تتراوح من 3-5 دقائق تم غسلت العقد بالماء المقطر والمعقم عدة , ثم وضعت في اطباق بتري معقمة حاوية علي 1مل ماء مقطر ومعقم

وسحقت بساق زجاجي معقم ,بإبرة تلقيح معقمة اخذ ملء عبوتها من عصير العقدة و وضعت في اطباق بتري معقمة ومزجت بالوسط المغذي المنصهر والمبرد ,تركت الاطباق حتي تصلب الوسط تم حضنت علي درجة حرارة 28م لمدة سبعة ايام بعد مرور فترة التحضين فحصت الاطباق واختيرت المستعمرات التي اعطت صفات الريزوبيا والمتمثلة في انتاج مواد مخاطية او صمغ والحواف المستقيمة .ثم خطت علي اطباق بتري حاوية علي الوسط المغذي مستخلص الخميرة والمانيثول ولعدة مرات بقصد الحصول علي مزارع نقية .

3-2 العزلات الريزوبية :-

خمسة عزلات ريزوبية تم عزلها من نبات الحندقوق *Melilotus.officianalis* . اعطيت الرموز R18, R1,R10,R12,RIMY واختبرت العزلات علي نبات البرسيم الحجازي *sativa L. Medicago* وذلك بقصد التحقق من انها عزلات لبعض اجناس الريزوبيا بعد ان عقت البذور المتحصل عليها من منطقة تساواة بوادي عتبة وهي بذور محلية بكلوريد الزئبق الحامضي (0.2%Hgcl₂) بعدها تم انبات البذور في الظلام علي طبقة من الاجار الرطب (agar Watar) على درجة حرارة 28م وبعد الانبات وضعت البادرات في انابيب اختبار محتوية علي وسط جنسن (Jensen) المعقم وضعت جميع الانابيب المحتوية علي البادرات في درجة حرارة الغرفة لمدة سبعة ايام حيث تم حقن كل عزلة ريزوبية في ثلاثة انابيب (ثلاثة مكررات لكل عزلة) وتركت ثلاثة انابيب اخري محتوية علي بادرات بدون تلقيح لاستخدامها

كشاهد (Control) وضعت الانابيب في صناديق خشبية في غرفة الإنبات مع تقاسم فترات اليوم نصفها إضاءة والنصف الاخر ظلام ولمدة 4أسابيع.

2-4 تجميع وتجفيف العينات وطحنها:-

جمعت اوراق نبات العشار من حديقة كلية العلوم بجامعة سبها, بعد تنظيف الاوراق من الاتربة العالقة بها بماء الحنفية وضعت في الشمس لتجف تم سحقت بواسطة المطحنة الكهربائية للحصول علي مسحوق الاوراق ثم وضع المسحوق في اكياس نايلون نظيفة جافة لاستعمالها في الدراسات الميكروبية.

2-5 تحضير المستخلص المائي لنبات العشار :-

اخذ(20) غرام من المسحوق الجاف لأوراق العشار ومزج مع (400)مل من الماء المقطر والمعقم باستعمال الخلاط الكهربائي وترك لمدة (24)ساعة بدرجة حرارة الغرفة بعدها رشح الخليط باستخدام عدة طبقات من الشاش الطبي المعقم للتخلص من العوالق بعد ذلك طرد مركزيا بسرعة (3000) دورة في الدقيقة ولمدة (10)دقائق ثم رشح المستخلص باستخدام ورق الترشيح نوع NO.0.1 Whatman للحصول علي محلول رائق ثم حفظ في انابيب معتمة وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام . (Hernandez etel;1994)

2-6 تحضير تراكيز المستخلصات النباتية :-

لغرض تحضير المحلول المستخدم اعتبر المستخلص المحضر من 20 غرام مسحوق في 400 مل هو تركيز 100% وحضر منه التراكيز التالية:-

اخذ 75 مل من المستخلص واكمل الحجم إلى 10 مل بالماء المقطر واعتبر هذا تركيز 75%

واخذ 50 مل من المستخلص واكمل الحجم إلى 10 مل ماء مقطر واعتبر هذا تركيز 50%

واخذ 25 مل من المستخلص واكمل الحجم إلى 10 مل ماء مقطر واعتبر هذا تركيز 25%

واستخدم الماء المقطر فقط كشاهد Control.

7-2 - تحضير المعلق البكتيري للاختبار:-

بواسطة ابرة معقمة اخذ قليلا من المستعمرة البكتيرية النامية بعد 24 ساعة وضعت في انبوبة معقمة محتوية على 5 مل من الماء المقطر المعقم ورجت المحتويات في الانبوبة باستخدام الرجاج الكهربائي وتم الحصول على معلق بكتيري متجانس جاهز للاستخدام ومن ثم خطت 5 اطباق محتوية على وسط الخميرة والمانيثول بواسطة Swipe ولعدة مرات ومن ثم وضعت عليها اقراص من اوراق الترشيح المشبعة بالمستخلص المائي لنبات العشار بتراكيز

(W.H.O 1977)

(%0_%25-%50_%75-%100)

وتركت الاطباق في الحضانة على درجة حرارة 28م ولمدة اسبوع او لحين الحصول علي

النتائج .

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

نتائج مقاومة العزلات الريزوبية لتراكيز مستخلص العشار :

جدول 1 يبين استجابة العزلات الريزوبية لمستخلص نبات العشار

النتيجة (+ / -)	تراكيز المستخلص				العزلات البكتيرية
+	%100	%75	%50	%25	R18
+	%100	%75	%50	%25	R1
+	%100	%75	%50	%25	R10
+	%100	%75	%50	%25	R12

+	%100	%75	%50	%25	Rimy
---	------	-----	-----	-----	------



صورة (2) توضح نمو *Rhizobia* في وجود تراكيز من مستخلص نبات العشار

المناقشة

في هذه الدراسة تم عزل سلالات من بكتيريا العقد الجذرية من اجناس *Rhizobium sp* من جذور نبات الحندقوق *Melilotus.Officianalis* ، واطهرت نتائج العزل بالطرق الميكروبية القياسية وجود تكافل لهذه العزلات في العقد الجذرية للنبات ، وكما اظهرت نتائج اختبار تحمل

البكتيريا المعزولة لمستخلص نبات العشار السام عند جميع التراكيز ، حيث لم يظهر المستخلص اي نتيجة ايجابية اتجاه البكتيريا المعزولة بطريقة اقراص اوراق الترشيح المشبعة بتراكيز المستخلص النباتي ، وقد يعود تحمل البكتيريا الى تراكيز المستخلص الى عدة عوامل وألية عمل معينة تعمل بها *Rhizobium sp* على مقاومة المستخلص .

الفصل الرابع

الخلاصة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة قدرة تحمل بكتيريا الرايزوبيا لمستخلصات النباتات السامة (العشار) باستخدام مذيب الماء المقطر ضد بعض اجناس بكتيريا *Rhizobium sp* حيث تبين من هذه الدراسة انه مستخلص نبات العشار لم يظهر اي فعالية اتجاه البكتيريا المختبرة

وهذا يعني انه بكتيريا الرايزوبيا , لها القدرة على النمو وتحمل التراكيز المختلفة لنبات العشار
ويعود تحمل البكتيريا الى عدة عوامل وألية عمل معينة تعمل بها على مقاومة المستخلص.

المراجع:

حمد غسان سلوم ، الدكتور عدنان نظام ، البيئة التطبيقية والتلوث (الجزء النظري) منشورات

جامعة دمشق كلية العلوم ، 2010 صفحة 345

كيمياء التلوث ، المؤسسة العامة للتعليم الفني والتدريب المهني ، 2010 ، المملكة العربية

السعودية صفحة 82

(مكشآت،2009)

اريج موسى ، فوائد شجرة العشار ، تم الاسترجاع (2012) ، موضوع كوم

<http://mawdoo3.com/%D9%81%D9%88%D8%A7%D8%A6%D8%AF%D8%A7%D9%84%D8%B9%D8%B4%D8%AC%D8%B1%D8%A9%D8%A7%D9%84%D8%B9%D8%B4%D8%B1>

[8%B4%D8%AC%D8%B1%D8%A9%D8%A7%D9%84%D8%B9%D8%B4%D8%B1](http://mawdoo3.com/%D9%81%D9%88%D8%A7%D8%A6%D8%AF%D8%A7%D9%84%D8%B9%D8%B4%D8%AC%D8%B1%D8%A9%D8%A7%D9%84%D8%B9%D8%B4%D8%B1)

[D8%B1](http://mawdoo3.com/%D9%81%D9%88%D8%A7%D8%A6%D8%AF%D8%A7%D9%84%D8%B9%D8%B4%D8%AC%D8%B1%D8%A9%D8%A7%D9%84%D8%B9%D8%B4%D8%B1)

Max Planck ، Plants defend their territory with toxic substances .

Retrieved on (2015) [https://phys.org/news/2015-11-defend-territory-](https://phys.org/news/2015-11-defend-territory-toxic-substances.html)

[toxic-substances.html](https://phys.org/news/2015-11-defend-territory-toxic-substances.html)

Hernandez et al ; 1994

D.L.Chatel*C.A.Parker. Inhibition of rhizobia by toxic soil-water extracts

Soil Biology and Biochemistry

Volume 4, Issue 3, August (1972), Pages 289-290, IN3-IN4, 291-294