عزل وتشخيص البكتريا الهلامية *Myxococcus fulvus* من الحقول الزراعية ودراسة التأثير التثبيطي لخلاياها ورواشحها على الفطريات الممرضة

*هالة عبد الحافظ عبد الرزاق**

استلام البحث 18، شباط، 2010
قبول النشر 23، تشرين الاول، 2010

الخلاصة:

اجريت هذه الدراسة لعزل وتشخيص البكتريا الهلامية *Myxococcus fulvus* من (100) عينة تربة جمعت من الحقول الزراعية المسمدة عضويا واستخدمت ظروف نمو خاصة لتشجيع نموها وتثبيط نمو الاحياء المجهرية الاخرى وشملت هذه الظروف (التجفيف ،درجات حرارة عالية، تراكيز عالية من المضادات الحياتية ،اوساط نمو خاصة) وأخضعت العزلات للفحوصات المظهرية والزرعية والكيمو حيويه اللازمة لتشخيصها فضلا عن اختبار الفعالية التثبيطية لخلايا ورواشح هذه العزلات تجاه الفطريات الممرضة :-
Trichophyton mentagrophytes, Microsporum gypseum,Aspergillus niger,Fusarium oxyporum
بثلاثة طرائق : اقراص الاكار والانتشار بالحفر والخلط مع الوسط الزرعي ويمكن تلخيص النتائج التي امكن الحصول عليها كالاتي:

1. تم الحصول على (20) عزلة كجسما ثمريا تعود للنوع *M.fulvus* باستخدام تقنية الاصطياد بالطعم البكتيري.
2. يعد الوسط الزرعي الكاستون – خلاصة الخميرة الصلب ملائما لتنمية الحشد الخضري للعزلات كمزروع نقي.
3. اظهرت (8) عزلات محلية فقط فعالية تثبيطية تجاه عزلات الاختبار الفطرية في الوسط الصلب.
4. تميزت الرواشح المركزة لـ (3) عزلات محلية بفعالية تثبيطية عالية تجاه العزلات الفطرية الممرضة مقارنة بالرواشح الغير مركزة في الوسط السائل .

الكلمات المفتاحية:البكتريا الهلامية، *Myxococcus fulvus*

المقدمة:

عرفت البكتريا *Myxococcus fulvus* كبديل مكروبي منتج وبغزارة لمركبات كيميائية جديدة . سميت ولاول مرة من قبل العالم Roland thaxter عام 1892 ووصفها كتراكيب مخاطية بالوان زاهية نامية على الأخشاب المتفسخة [1]ثم صنفت فيما بعد ضمن مجموعة البكتريا الانزلاقية الثمريةfruiting gliding bacteria اعتمادا على الصفات المظهرية (شكل وتركيب وحجم كل من الاجسام الثمرية fruiting bodies والحشد swarm والخلايا الخضرية والابواغ الهلامية myxospores) فضلا عن الصفات الكيمو حيوية (كإنتاج صبغة الكاروتينويد وفحص التفاعل لصبغة الكونغو الحمراء ونوع الاحماض الشحمية المؤلفة لطبقة عديد السكرايد الشحمي والنسبة المئوية G+C) [2]هذه المجموعة واسعة الانتشار في الطبيعة وهي عبارة عن مجموعة كبيرة من العصيات السالبة والمتحركة بحركة انزلاقيةgliding او زاحفة creeping فوق السطوح الصلبة وعلى الاوساط الزرعية بما يعرف بالحشد او العج مصحوبة بانتاج مادة هلامية لذا تدعى احيانا بالبكتريا الهلامية myxobacteriaولها دورة حياة معقدة يتخللها تمايزا مظهريا يبلغ ذروته بتكوين الاجسام الثمرية المجهرية وبالوان مختلفة وبراقة عند ظروف التجويع والتي تهيئ فرصة البقاء لهذه المجموعة لاحتواءها على الابواغ الهلامية المقاومة للظروف القاسية لفترة طويلة[3].وفق التحليل العرقي للحمض النووي الرايبي منقوص الاوكسجين تحت الوحدة 16S DNA اصبحت هذه المجموعة تتبع الى عائلة myxococcaceae والى الرتبة الوحيدة myxococcalesالتي تتبع الى الفرع dalta من صنف proteobacteriaوفق التحليل للحمض النووي الرنوي الرايبوسومي تحت الوحدة 16 من الرايبوسوم 16S rRNA [4] [4] .

يتزامن التمايز المظهري لهذه المجموعة لاسيما النوع *M. fulvus* مع انتاج لطيف واسع من نواتج الايض الثانوي (بولي كيتايدات والمكروليدات وناقلات الحديد والبولينات

قسم علوم الحياة / كلية العلوم/الجامعة المستنصرية

والبكتريوسينات) وبفعالية تثبيطية عالية بمثابة الحماية اثناء عملية تكوين الجسم الثمري من مهاجمة الاحياء المجهرية الاخرى [5] .

حظيت البكتريا *M. fulvus* في الاونة الاخيرة باهتمام بالغ من قبل الباحثين في مجال احياء مجهرية التربة من ناحيتين :- الاولى تنفرد سلالة واحدة بانتاج عددا مختلفا من المركبات الفعالة او انتاج مركب اساسي مع مشتقاته كسلالة *M.fulvus* Mxf16 التي تنتج (35) نوعا مختلفا من المضاد الفطري الفعال myxothiazol وبذلك يتعدى الانتاج حاجز العائلة والجنس والنوع[6].

والناحية الثانية : سلوك التغذية الذي اكسبها اهمية في تنظيف بيئتها فهي اما مفترسات صغيرة microپredatorsلقدرتها على قتل او تحليل انواع واسعة من الخلايا المكروبية سواء الحية ام الميتة، او كانسات scavengersلقدرتها على تجزئة المركبات ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة[7] فبالامكان توظيف هذه البكتريا ونواتجها الايضية الفعالة في العديد من المجالات التطبيقية كالطبية والزراعية والاقتصادية كعلاج للاخماج سواء البكتيرية او الفطرية ومضادات الاورام وفي المكافحة البايولوجية تجاه الممرضات النباتية وكمعالجات بايولوجية bioremediation للتخلص من ملوثات البيئة كالمبيدات[8].

جاءت هذه الدراسة تهدف لعزل وتشخيص النوع *M. fulvus* من الترب الزراعية ومعرفة التأثير التثبيطي للعزلات المحلية تجاه عدد من الاعفان الممرضة سواء للانسان او النبات .

المواد وطرائق العمل:

1- جمع العينات :-

جمعت (100) عينة تربة – وزن الواحدة بحدود (150) غراما ومن عمق (10-15) سم تحت سطح التربة من المناطق الزراعية المختلفة والمسمدة بأسمدة عضوية والمنتشرة في مدينة بغداد وللفترة من أول شباط ونهاية مايس 2009 ووضعت العينات داخل أكياس نايلون معقمة وغير مستعملة لغرض نقلها الى المختبر جففت العينات هوائيا وبسرعة ليوم واحد ثم خزنت بدرجة حرارة الغرفة [9].

2- عزل البكتريا الهلامية :-

تضمنت خطوات العزل مرحلتين وفق الطريقة المشار إليها من قبل الباحث(**Karwowski واخرون 1996)[10]**المحورة بإضافة الطريقة المشار إليها من قبل الباحث(**Shean,2005)[11]**وكالاتي:

أ- مرحلة عزل الاجسام الثمرية

1- حضر الوسط الزرعي water ager (wcx) cycloheximide الصلب من المكونات الاتية: (0.05)غرام كبريتات المغنسيوم المائية$MgSo_4.7H_2O$، (0.05) غرام كلوريد الكالسيوم المائي$CaCl_2.6H_2O$، (2. 0) غرام وسط المرق المغذي ، اذيبت في (1) لتر من الماء المقطر عدل الرقم الهيدروجيني الى (2. 7) و اضيف (20) غرام اكار و (1) مليلتر من محلول صبغة البلورات البنفسجية (14. 0) % عقم الوسط بالموصدة وزود بمحلول المضاد السايكلوهكسمايد cycloheximide بتركيز 50 ملي غرام /لتر، لقح الوسط الزرعي wcx بطريقة التخطيط بثلاثة اتجاهات (فرش الحصير) بعالق السلالة البكتيرية القياسية *Escherichia coli* ATCC 25922 (مختبر الصحة المركزي/العراق)بتركيز (5. 1 x 10^8) خلية/ مليلتر وبوساطة قطيلة معقمة (swabs) كطعم لاصطياد البكتريا الهلامية المحللة للبكتريا تركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5) دقائق.

2- تم التحري عن وجود البكتريا الهلامية في عينات التربة باضافة (10)غرام من كل عينة ترابية الى (90) مليلتر من الماء المقطر المعقم واجريت سلسلة التخافيف العشرية بالماء المقطر الى التخفيف (10^{-4}) الذي مزج جيدا بجهاز المازج ووضع في حمام مائي بدرجة حرارة (58-60) م ولمدة (10) دقائق، نشرت (1. 0) مليلتر بهيئة قطرات من تخافيف العينات كل على حدة على الوسط الزرعي wcx والملقح ببكتريا الطعم، حضنت الاطباق بدرجة حرارة (28) م ولمدة (5-7) يوم في جو مشبع بالرطوبة بوضع اناء حاوي على الماء المقطر المعقم في الحاضنة طيلة فترة الحضانة.

ب- مرحلة عزل الحشد الخضري

حصدت الأجسام الثمرية النامية بوساطة عروة معدنية معقمة وعلقت في (3) مليلتر من الماء المقطرالمعقم، نقل (1) مليلتر من العالق الى الوسط الزرعي الصلب Casitone-yeast extract ager (CY–C10) المحضر من المكونات الاتية: (3. 0) % كاستون (1. 0) % خلاصة خميرة (1. 0) % كلوريد الكالسيوم المائي عدل الرقم الهيدروجيني لحد (2. 7) واضيف (5. 1) % اكار عقم الوسط بالموصدة وزود بمحلول المضاد الفانكومايسين vancomycin بتركيز (40 مايكروغرام/مليلتر) ومحلول المضاد السايكلوهكسمايد (50ملي غرام/لتر)حضنت الأطباق بدرجة حرارة (28)م ولمدة (2-3) يوم لاجل الحصول على مستعمرات نقية للخلايا

الخضرية وباستخدام عروة معدنية معقمة اجريت عدة نقلات من حواف المستعمرات الحشدية Swarm colonies الى الوسط الزرعي CY-C10 وبظروف التنمية نفسها.

3- تشخيص البكتريا الهلامية :

تمت عملية التشخيص وفقا لما ورد في[12] وكما يلي:

أ- فحصت الأطباق الخاصة بعزل الاجسام الثمرية ابتداء من اليوم الثالث للحضن بوساطة المجهر التشريحي بقوتي تكبير 20x و 40x لمشاهدة تكون الأجسام الثمرية.

ب- فحصت الأطباق الخاصة بتنمية الحشد الخضري ابتداء من اليوم الثاني للحضن لمشاهدة الصفات الزرعية الخاصة بالمستعمرات.

جـ - أخضعت العزلات البكتيرية المخاطية لعدد من الفحوصات الكيموحيوية شملت انتاج انزيم الكاتاليز والاوكسديز وادمصاص صبغة الكونغو الحمراء وتحلل النشا والكازائين والجيلاتين واليوريا والدم والدهون (توين 80) والتايروسين واستهلاك الاسكولين وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين والنمو في درجة حرارة (40) م واختبار حساسيتها لمضاد الكانامايسين kanamycin (10 مايكروغرام/قرص) بطريقة الاقراص فضلا عن اجراء الفحص المجهري المباشر .

4- عزلات الاختبار الفطرية :

تم الحصول على عزلتين فطريتين ممرضة لثمار النباتات تعود الاولى للنوع *Fusarium oxyporum* والثانية للنوع *Aspergillus niger* من مختبرات الدراسات العليا لكلية الزراعة / جامعة بغداد في حين تم الحصول على عزلتين فطرية ممرضة للانسان من مختبر الصحة المركزي/ العراق تعود الاولى للنوع *Trichophyton mentagrophytes* والثانية للنوع *Microsporum gypseum* شخصت العزلات من خلال الفحوصات المجهرية والزرعية حسب ما ورد في[13]ثم حضرت العوالق البوغية الخاصة بكل نوع بمعدل (10^4 بوغ/مليلتر) وفقا للطريقة المشار اليها في[14].

5- اختبار الفعالية التثبيطية لعزلات البكتريا الهلامية:

1- طريقة اقراص الاكار : زرعت عزلات البكتريا الهلامية على وسط اكار CY-C10 وحضنت الاطباق بدرجة حرارة (28) م ولمدة (7-10) يوم ثم اخذت اقراص بقطر (5) ملمتير ووضعت على سطح وسط اكار السابروبد دكستروز المنشور عليه بالناشر (0.1) مليلتر من العالق البوغي لكل عزلة من عزلات الاختبار الفطرية،حضنت الاطباق بدرجة حرارة(25)م ولمدة (2-7) يوم .قرأت النتائج بحساب اقطار مناطق التثبيط (ملم) وقورنت مع فئة السيطرة قرص اكار بدون نمو وتعد هذه الخطوة بمثابة الغربلة للعزلات الهلامية اذ انتخبت افضل العزلات في اظهار فعاليتها التثبيطية لاكمال بقية الاختبارات[15].

2- طريقة الانتشار بالحفر والخلط مع الوسط الزرعي:

حضرت رواشح المزارع السائلة بتنمية العزلات البكتيرية الهلامية في دوارق مخروطية سعة (50) مليلتر حاوية على الوسط الزرعي CY-C10 السائل ذو الرقم الهيدروجيني (7.2) وبنسبة لقاح (2)% حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة (200) دورة / دقيقة بدرجة حرارة (28)م ولمدة (7) يوم نبذ الوسط الزرعي بجهاز الطرد المركزي وبسرعة (6000) دورة / دقيقة ولمدة (10) دقائق وتم الحصول على سائل الخلايا الحرة للمزروع والذي رشح من خلال مرشحات غشائية بقطر (0.22)مايكرون استخدمت طريقة الانتشار بالحفر [15] والخلط مع الوسط الزرعي [16] للكشف عن الفعالية التثبيطية لراشح البكتريا الهلامية*M.fulvus* اذ زرعت الاطباق الحاوية على وسط اكار السابروبد دكستروز بـ(1. 0) مليلتر من العالق البوغي لكل عزلة اختبار فطرية بطريقة النشر واستعمال الثاقب الفليني لعمل ثقوب قطرها (5) مليمتر في الأوساط الصلبة وملئت الحفر بـ(100) مايكرولتر من الراشح الزرعي السائل لعزلات البكتريا الهلامية وتركت الأطباق بدرجة حرارة المختبر لمدة ساعة واحدة ثم حضنت بدرجة حرارة (25)م ولمدة (2- 7) يوم.

قرأت النتائج بحساب اقطار مناطق التثبيط (ملم) وقورنت مع فئة السيطرة الحاوية على وسط CY-C10 السائل بدون لقاح بكتيري وبذات الوقت اضيفت الرواشح البكتيرية للعزلات المنتجة بنسبة (10) % الى وسط السابروبد دكستروز المذاب بدرجة حرارة(45)م في قناني صغيرة vials بعد تعقيمه وتبريده ووسط CY-C10 بدون راشح بكتيري (كفئة سيطرة) تمت الاضافة بكل لطف وهدوء على الجدران الـvial لمنع تكون الفقاعات وبعد ان مزجت جيدا معه بالمازج صب الوسط في أطباق معقمة وتركت حتى تتصلب ثم تم تلقيح كل طبق بقرص فطري قطره (9) ملميتر (تم استعمال فوهة انبوبه معقمة لهذا الغرض من مزارع فتية للعزلات الفطرية وبعمر (5-7) يوم حضنت الأطباق بدرجة حرارة (25)م ولمدة (5-7) يوم حسبت أقطار المستعمرات الفطرية النامية وفق المعادلة الاتية:

$$\text{نسبة التثبيط \%} = \frac{\text{معدل قطرالمستعمرات في أطباق السيطرة} - \text{معدل قطر المستعمرات في أطباق المعاملة}}{\text{معدل قطر المستعمرات في أطباق السيطرة}}$$

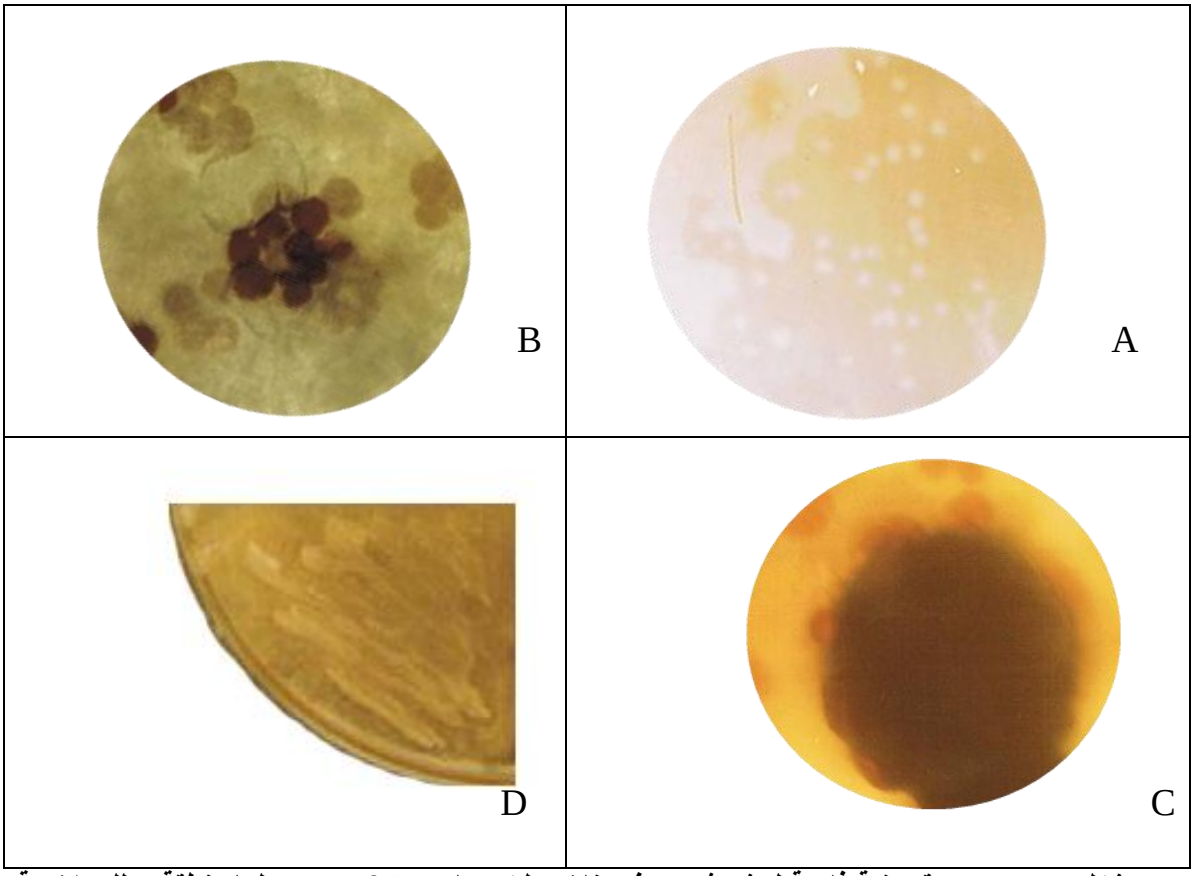
وللحصول على فعالية تثبيطية افضل تم تركيز الرواشح في جهاز التجفيف Freeze–dryer اذ ركز (10) مليلتر من الراشح البكتيري الى حد (5) مليلتر و (5. 2) مليلتر للحصول على راشح مركز مرة واحدة وراشح مركز لمرتين وأجريت الطريقتين اعلاه .

النتائج والمناقشة:

تم الحصول على (20) عزلة بكتيرية تعود للنوع *M.fulvus* من أصل (100) عينة تربة من الحقول الزراعية المسمدة فقد اثبت الطريقة المشار اليها في [10] بعد تحويرها ،كفاءتها في انجاح عملية العزل والتشخيص اعتمادا على التوصيف المظهري للاجسام الثمرية والحشد الخضري العائديين لذات النوع واستنادا الى الصفات المذكورة في المراجع العلمية [5، 13] اذ كان لتجفيف عينات التربة قيد الدراسة هوائيا ليوم واحد وخزنها في درجة حرارة الغرفة ثم تعريض التخفيف العشري (10^{-4}) الى الدرجات الحرارية العالية (58- 60) م في الحمام المائي لمدة (10) دقائق قبل البدء بعملية العزل الاثر الواضح في التخلص من الملوثات المكروبية وبقاء الأبواغ الهلامية بداخل الحويصلات الدقيقة microcysts حية فهي مقاومة .

كما واستثمرت الصفة الفسيولوجية للبكتريا الهلامية المتمثلة بقدرتها على تحليل أنواع اخرى من الاحياء المجهرية لا سيما البكتريا لغرض النمو على الوسط الزرعي الصلب wcx بعد إضافة المرق المغذي بكمية محدودة لكي تتمكن السلالة البكتيرية القياسية *E.coil* ATCC 25922 من النمو على الوسط الزرعي نفسه.فبعد مرور (3) يوم من بدء الحضانة ظهرت الاجسام الثمرية الغير ناضجة على هيئة بقع بنية فاتحة بقوام جيلاتيني وحولها منطقة تحلل واضحة للطعم البكتيري لاحظ شكل (1) صورة (A) وبعد مرور (5) يوم من بدء الحضانة تغير لون البقع الى البني الغامق دلالة على نضوج الأجسام الثمرية وبدت كروية ومرتفعة قليلا عن سطح الاكار تحت المجهر التشريحي بقوتي تكبير 20X و 40X وهي صفة مظهرية تشخيصية تأكيدية للنوع *M.fulvus* صورة (B) وبعد مرور (4-7) يوم من بدء الحضانة اخذ الجسم الثمري بالتشقق استهلالا لانبثاق الحويصلات الدقيقة و بداخلها الأبواغ الهلامية الى الخارج صورة(C).

يعد الوسط الزرعي الصلب CY-C10 وسط انتقائي لتنمية العزلات البكتيرية الهلامية فقد بدت المستعمرات النامية بهيئة الحشد او العج بلون البرتقالي – الاصفر او الاصفر متلاصقة ومشكلة طبقة مخاطية متحركة باتجاهات بعيدة عن منطقة الزرع مما يصعب تمييزها الى مستعمرات منفصلة قياسا ببقية المستعمرات البكتيرية بسبب انتاجها لمادة الهلام Slime صورة (D)، وهي صفة مظهرية تشخيصية تاكيدية للنوع *M.fulvus* فضلا عن تفرد العزلات البكتيرية لهذا النوع بمقاومتها لمضاد الفانكومايسين كصفة تشخيصية تاكيدية تميزها عن باقي افراد مجموعة الانزلاقيات الثمرية المحللة للبكتريا اذ ان إضافة هذا المضاد الى الوسط الزرعي CY-C10 بتركيز (40 مايكروغرام / مليلتر) كان على درجة من الاهمية كخطوة تنقية اذ ادى الى تقليص اكبر عدد ممكن من البكتريا المنافسة والملوثة التي رافقت نمو الاجسام الثمرية لا سيما البكتريا المكونة للأبواغ Bacillus، Streptomyces في الوسط الزرعي wcx كما ابدى الفحص المجهري المباشر كونها عصيات سالبة مستدقة النهايات منفردة او متجمعة.



شكل (1): A – بقع بنية فاتحة لحشد ثمري غير ناضج لبكتيريا *M. fulvus* حولها منطقة تحلل واضحة للطعم البكتيريا على وسط WCX الصلب بعد حضانة (3) يوم.B – أجسام ثمرية كروية بنيةغامقة ناضجة لبكتيريا *M.fulvus* على وسط wcx الصلب بعد حضانة (5) يوم قوة تكبير C.100x-جسم ثمري كروي متمزق لبكتيريا *M.fulvus* استهلالا لانبثاق الحويصلات الدقيقة بعد حضانة (7) يوم منظر جانبي قوة تكبير 400 x . D - حشد خضري لزج بلون برتقالي – اصفر لبكتريا *M.fulvus* على وسط CY-C10 الصلب بعد حضانة (3) يوم .

تبين من نتائج الاختبارات الكيموحيوية التاكيدية لتشخيص العزلات البكتيرية الهلامية بانها تعود للنوع *M.fulvus* بكونها سالبة لاختبار الاوكسيديز وموجبة لاختبار الكاتاليز وقد ابدت جميع العزلات قابليتها على ادمصاص صبغة الكونغو الحمراء على سطح المستعمرات النامية وتحليل النشا بعد مرور (10) يوم والكازائين والجيلاتين والدهون (توين 80) والتايروسين في حين كانت جميع العزلات البكتيرية غير قادرة على تحليل الدم واليوريا وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين واختزال النترات واستهلاك الاسكولين والنمو في درجة حرارة (40)م وكانت جميع العزلات حساسة لمضاد الكانامايسين.

يمثل الجسم الثمري ضمانات لبدء دورة حياة جديدة للبكتريا الهلامية *M.fulvus* بواسطة الاتصال الخلوي الذي يحقق انتاج مستويات عالية من الانزيمات تفرز خارج الخلية يحافظ هذا الاتصال على تجمع الخلايا مع بعضها البعض ويؤدي فقدان التحسس بين الخلايا الى انعدام انتشار هذه الانزيمات عندما تكون الخلية بمفردها فعند نفاذ المغذيات يقدح الاتصال الخلوي عن طريق تبادل اشارات كيميائية ذات طبيعة بروتينية او بواسطة الاتصال الفيزيائي عن طريق الشعيرات pili فتاخذ الخلايا بالتراص لتكوين تجمعات تعرف بالحويصلات الدقيقة التي تبقى مترابطة بواسطة جدرانها الهلامية وتتجمع معظمها داخل تركيب يعرف بالجسم الثمري يمكن مشاهدته بالعين المجردة بهيئة بقع بنية فاتحة منتشرة على سطح الاكار وفي مراحل متقدمة من نضوجه يتغير لون البقع الى البني الغامق عندئذ تتكون بداخل الحويصلات الدقيقة خلايا كروية انكسارية للضوء تعرف بالأبواغ الهلامية [18,17].

تمتاز عزلات بكتريا*M.fulvus* بقابليتها على انتاج مختلف الانزيمات وفي قدرتها لتحليل مختلف المواد الذي يفسر ظاهرة وجود البكتريا الهلامية بكميات كبيرة في الترب المسمدة والمزروعة ذات التهوية الجيدة وقدرتها على النمو بصورة جيدة في اوساط تضم انواع اخرى من الاحياء المجهرية سواء الحية ام الميتة، او النمو في اوساط تحوي البروتينات كالكازائين او مزيج الاحماض الامينية

كـــالميثونين methionine واللوســـين leucine والايزلوســـين isoleucine كمصـــادر كـــاربون ونتروجين و تتحمل تراكيز عالية نسبيا من املاح الكالسيوم والمغنسيوم هـذا مـا اكدتـه العديـد مـن البحوث [19، 20، 21، 22] .

جاءت هذه النتائج متفقة مع [23] في دراسته التي اجراها لاجل الحصول على عزلات نقية للجنس Myxococcus الى ملائمة المجموعة القولونية سواء الحية ام المقتولة بالحرارة Autoclaved *E.coli* بتقنية الاصطياد بالطعم البكتيري في عزل انواع مختلفة من البكتريا الهلامية المحللة للبكتريا حيث تمكن من عزل وتنقية (38) عزلة تعود للنوع*M.fulvus* من اصل (50) عينة تربة جمعت من حقول زراعية مسمدة عضويا وأعد هذه الطريقة بمثابة برنامج غربلة سهلة لامكانية اجراء عمليتي العزل والتنقية أذ يعد الوسط wcx مصدر تغذوي واقتصادي يحفز على تكوين الاجسام الثمرية المميزة مما يسهل عملية التشخيص،وهذا مشابه الى بيئة البكتريا المخاطية الا وهي التربة وما تحويه من من خليط غني من الاحياء المجهرية الحية والميتة فضلا عن ما توفره من مواد عضوية متحللة عند كل المستويات .

أشار [24] الى وجود فعالية أنزيمية لأنواع مختلفة مـن الانزيمـات كمحلـلات الـدهون lipases ومحللات الحوامض النووية nucleases ومحللات البروتينـات proteases والأنـزيم الحـال lysozyme التي تقوم بتكسير اواصر بعض الجزيئات المكونة للجدار الخلوي كالبيتيدات السكرية،في الأوساط الزرعية السائلة المضاف اليها الطعم البكتيري Cyanobacteria بعد تلقيحها بالبكتريا الهلامية ولاحظ أزدياد تلك الفعالية بأستمرار التحلل.

اظهرت (8) عزلات بكتيرية من اصل (20) عزلة تعود للنوع *M.fulvus* فعالية تثبيطية تجاه عزلات الاختبار الفطرية بطريقة اقراص الاكار ومن خلال ملاحظة مناطق التثبيط الواضحة في جدول (1) تباينت العزلات البكتيرية الهلامية في اظهار فعاليتها التثبيطية فقد تراوحت ما بين جيدة ومتوسطة وضعيفة للعزلات (3 ، 10، 16، 11،7، 14، 18،4) اذ كانت معدلات اقطار التثبيط كالاتي: (6،6،16،9،12،23،26،32) مليمتر كحد اعلى على التوالي وحد ادنى كانت معدلات اقطار التثبيط (24 ، 20، 20،10، 7،14 ، 3، 4) مليمتر على التوالي.

جدول (1) الفعالية التثبيطية لعزلات البكتريا الهلامية تجاه الفطريات الممرضة بطريقة اقراص الاكار (ملم)

العزلات البكتيرية	العزلات الفطرية الممرضة			
	Trichophyton mentagrophytes	*Microsporum gypseum*	*Aspergillus niger*	*Fusarium oxyporum*
	اقطار مناطق التثبيط (ملم)			
1	—	—	—	—
2	—	—	—	—
3	32	27	24	28
4	5	6	5	3
5	—	—	—	—
6	—	—	—	—
7	12	11	12	10
8	—	—	—	—
9	—	—	—	—
10	26	22	20	23
11	7	9	8	7
12	—	—	—	—
13	—	—	—	—
14	15	14	15	16
15	—	—	—	—
16	22	20	23	21
17	—	—	—	—
18	4	5	5	6
19	—	—	—	—
20	—	—	—	—

يمثل كل رقم ثلاث مكررات

واستنادا لهذه النتائج تم انتخاب العزلات البكتيرية الثلاثة (16،10،3) اعلاه لاختبار فعاليتها التثبيطية في الوسط السائل بطريقتي الانتشار بالحفر والخلط مع الوسط الزرعي اذ اظهرت رواشحها فعالية تثبيطية ملحوظة تجاه عزلات الاختبار الفطرية ،ولكنها اقل من تلك الفعالية التي اعطتها في الوسط الصلب وذلك عندما تراوحت معدلات اقطار مناطق التثبيط ما بين (17 ، 13، 13) مليمتر على التوالي كحد اعلى وكحد ادنى (14، 10 ، 11) مليمتر على التوالي وكأعلى معدل لنسبة التثبيط (1. 59 ،10. 42،01. 41) % على التوالي وادنى معدل النسبة التثبيط (5. 52 ، 56. 30 ، 04. 33) % على التوالي وبغية تحسين الفعالية التثبيطية لرواشح عزلات البكتريا المخاطية فقد تم تركيز الرواشح مرة واحدة ومرتين عندئذ امكن الحصول على نتائج افضل اذ انخفض معدل نمو الفطر في الاطباق المعاملة الذي انعكس من خلال الزيادة الملحوظة في الفعالية التثبيطية لتلك الرواشح فقد بلغت معدلات مناطق التثبيط بالراشح المركز لمرة واحدة وكحد اعلى (30 ، 25، 22) مليمتر على التوالي وكحد ادنى (23 ، 18، 18) مليمتر على التوالي

واعلى معدل لنسبة التثبيط (5. 95 ، 12. 77 ، 18. 63)% على التوالي وكحد ادنى (92. 86 ، 35. 55 ،05. 42)% على التوالي ، كما بلغت معدلات اعلى منطقة تثبيط بالراشح المركز لمرتين (28،39، 25) مليمتر على التوالي وكحد ادنى (34 ،22،22) مليمتر على التوالي وكانت معدلات اعلى نسبة تثبيط (100، 13. 89 ، 11. 86)% وكحد ادنى (100، 03. 70 ، 51. 76)% جدول(2).

جدول (2) الفعالية التثبيطية لرواح عزل البكتريا الهلامية الغير مركزة والمركزة لمرة واحدة ولمرتين تجاه العازلات الفطرية الممرضة بطريقتي الانتشار بالحفر (معدل اقطار التثبيط ملم) والخلط مع الوسط الزرعي (نسبة التثبيط %)

العزلات البكتيرية	التركيز	*Trichophyton mentagrophytes*	*Microsporum gypseum*	*Aspergillus niger*	*Fusarium oxyporum*
عزلة رقم 3	راشح غير مركز	17 (1. 59)	14 (5. 52)	15 (7. 55)	16 (6. 56)
	راشح مركز لمرة واحدة	30 (5. 95)	25 (5. 92)	23 (5. 93)	27 (2. 86)
	راشح مركز لمرتين	39 (100)	37(100)	35(100)	34(100)
عزلة رقم 10	راشح غير مركز	10(06. 30)	13(10. 42)	13(20. 40)	12(41. 36)
	راشح مركز لمرة واحدة	25(12. 77)	20(22. 60)	18(35. 55)	20(19. 70)
	راشح مركز مرتين	28(13. 89)	23(30. 70)	22(12. 75)	25(22. 76)
عزلة رقم 16	راشح غير مركز	13(03. 40)	11(04. 33)	12(22. 37)	13(01. 41)
	راشح مركز لمرة واحدة	21(55. 60)	18(19. 59)	20(05. 42)	22(18. 63)
	راشح مركز لمرتين	25(01. 85)	23(31. 77)	22(51. 76)	25(11. 86)

يمثل كل رقم معدل ثلاث مكررات
معدل قطر فنة السيطرة 100 مليمتر

لدى مقارنة النتائج هذه مع تلك التي وجدها الباحثون الاخرون يلاحظ ان اغلبها قد اتفق على زيادة الفعالية التثبيطية لرواشح عزلات بكتريا *M.fulvus* لدى تركيزها مقارنة بفعالية رواشح تلك العزلات قبل التركيز وقد يعزى سبب زيادة الفعالية الى تراكم المواد المثبطة وتجمعها عند تركيزها وبالمقابل تكون مقاومة الفطر ضعيفة باستخدام الراشح غير المركز مؤديا بالنتيجة الى تثبيط نموه. تعد طريقة الخلط مع الوسط الزرعي احدى افضل الطرائق المستخدمة للكشف عن الفعالية التثبيطية والتي تقود الى نتائج واضحة وملموسة وقد يعزى الى التماس المباشر بين الرواشح البكتيرية المضادة مع وسط النمو ان تعيق نمو الفطر بصورة اسرع او انها لا تسمح بنموه اصلا عند كثافة المواد المثبطة لذا يكون نمو الفطر اقل كثيرا عندما يزداد تركيز الرواشح [25].

تباينت الاراء حول طبيعة المواد المثبطة لنمو الفطريات والتي تنتجها البكتريا *M.fulvus* فقد اكد [26] بان تثبيط نمو الفطر قد يعزى الى المضاد Myxothiazol ومشتقاته الذي يتداخل في عملية تفاعل اكسدة – اختزال Redox–reaction محررة بذلك جذور حرة تعود للجهد التأكسدي ومنها جذور فوق الاكسيد Superoxoide radical ($O2^-$) الذي يؤدي تراكمه في خلايا الممرضات الى موتها ويعتقد ان هذا المضاد له القدرة على اكتساب الكترونات مكونا جذر ايوني مستقر نسبيا ومستعدا للتورط في التفاعل الدائري اختزال – اكسدة مما يترتب على ذلك فرط في انتاج جذر فوق الاكسيد ومن المحتمل ان تأتي فعالية التضاد الحيوي للمضاد من الفعل السام للجذور الحرة وبيروكسيد الهيدروجين وفوق الاكسيد.

اشار [27] الى وجود فعالية تثبيطية لرواشح بكتريا *M.fulvus* تجاه فطر *Aspergillus flavus* وقد يرجع التثبيط البكتيري الى انتاج نوعا من البكتريوسينات fulvocin وهي بروتينات لها فعل قاتل من خلال احداث خلل في نفاذية الغشاء الخلوي مسببا تدفقا للايونات وتحطم الغشاء وبالتالي موت الخلايا الحساسة له .

المصادر:

1.Coucke,P. 2003.Morphology and morphogenesis of Myxobacteriaceae. J.Appl. Bact. 18:506-610.

2.Starr,MP.; Stolp. H.; Truper,HG.; Ballows,A. and Schlegel,H.1981. The prokaryotes:A hand book on Habits,Isolation and Identification of bacteria. Springer – Verlag, 2th ed., Berlin,pp587 .

3.Stanier , R.Y.; Inraham, J.L.;Wheelis , M.L.and Painter ,P.R.1986.The microbial world, Printice – Hall, 5th ed . , USA,pp312 .

4.Sproer, C.;Reichenbach, H. and Stachebrandt, E. 1999. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria . Int.J.Syst.Bacteriol. 49:1255-1262 .

5.Nester, E.W.; Anderson, D.G.; Roberts , C.E.; Pearsall, N.N. and Nester,M.T.2001. Microbiology a human Perspective,. McGraw – Hill,3rd ed,Germany,pp711 .

6.Gerth,K.; Irschik,H.; Reichenbach, H.and Trowitzsch, W. 1980. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales) .I.Cultivation , isolation , physico-chemical and biological properties .The J. of Anti. .(6) 12:1474 – 1479.

7.Reichenbach,H.2000. Biology and chemistry of microbial compounds, Scientific Annual Report , 1st ed., Braunschweig,pp1559 .

8.Reichenbach, H.2001. Myxobacteria ,producers of novel bioactive substances .J.Ind. Microbiol. Biotechnol.27:149-156.

9.Atlas , R.M.1995. Principles of microbiology, Mosby – year Book, Inc ,1st ed.,USA, pp336.

10.Karwowski , Jp.; Sunga,GN.; Kadam, S. and Mcalpine, JB.1996. Amethod for the selective isolation of Myxococcus directly from soil . J.of Ind. Microbiol.16:230 – 236.

11.Shean,J.M. 2005. Isolation and diagnosis of Myxobacteria as pure culture.Can J Microbial 32:1-4.

12.Reichenbach,H.and Dworkin, M.1992. The myxobacteria. In: The prokaryotes, ,(Balows,A., Truper, H.G.;Dworkin,M.;Harder,W.and KH Schleifer , K.H.,eds.)Springer Verlag, 2nded., Vol.IV ,New York,pp885.

13.Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and eissfeld,A.S.2002. Bailyand Scott's Diagnostic Microbiology, Mosby Co:Baltimore, 1thed.,Philadelphia, pp753 .

14.National Committee for Clinical Laboratory Standards . Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard,2000. Mz-A7, NCCLS,7th ed. , Pennsylvania,pp119 .

15.Rees,T.L.1997. The development of a novel antifungal silage inoculant . Ph.D.Thesis, Cranfield University Biotcehnology Center,U.K.

16.Betina, V.1983. The chemistry and biology of antibiotics In: "Pharmaco chemistry Library" Nauta , W.Th. and Rekker , R.F.(eds) Elsevier Scientific Pub. Co., Vol.5 ,Amsterdam,pp732 .

17.Chao,S.C.;Young,D.G.and Oberg,C.J. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria , fungi and viruses . J. Esseuent . oil.Res., 12:639-649.

18.Kaiser , D.and Welch,R.2004. Dynamic of fruiting body morphogenesis. J.Bacteriol. 186(4):919-927.

19. McDonald,J.2000.Studies on the genus Myxococcus(Myxococcales). Nature57:737-747.

20. Dworkin , M. 2002. Recent advance in the social and developmental biology of themyxobacteria. Microbiol. Rev.. 70(1):90-123.

21.Dawid,W.2000.Biology and global distribution of myxobacteia in soils . FEMS Microbiol Rev.24:403-427 .

22.Lawrence,J.S.;Dworkin,M. and Reichenbach, H.2006. The myxobacteria .In:The prokaryotes, (Balows A.; Truper , H.G.; Dworkin,M.; Harder, W.and KHschleifer , K.H.,eds.), Springer Verlag, 5th ed. Vol. V I I , New York,pp711 .

23.White , D.;Clutter, D.;Bacon,K. and kottel,R.H.2004. Coliform bacteria as food organisms in purification of myxobacteria . Prod. Natl.Acad . Sci ., (USA) 76(11):2952 – 2956.

24.Burnham, J.C.; Collart, S.A. and Daft,M.J. 2007. Myxococcal predation of the caynobacteria *Phormidium luridum* in aqueous environment. Arch. Microbiol. 137:220-225.
25.Reichenbach, H. And Hofle, G. 1993. Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. Biotechnol.Adv.11:219-277.
26.Thierbach,G.and Reichenbach, H.1981. Myxothiazol,a new antibiotic interfering with respiration. Antimicrob. Agents chemother.19(4):504-506.
27.Hirsch , H.J. 2008. Bacteriocins from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales) . Arch . Microbiol . 120:54 – 59.

Isolation and identification of the Myxobacterium *Myxococcus fulvus* from the Farms and study the inhibitory effect of cells and filtrates against pathogenic fungi

Halah A.H. Abdul Razzaq*

*Al-Mustansiryah University\ College of Science \Department of Biology

Abstract:

The study was performed to isolate and identify the *Myxococcus fulvus* from the one hundred samples of soils of farms. Special growth conditions had been used to support the growth of *M.fulvus* local isolates and suppressed the growth of other microorganisms like

(Drying , High Temperature , High concentration of antibiotics and specific growth media) *M.fulvus* isolates had been subjected to the morphological, cultural , biochemical examination for identification , as well as , study the inhibitory activites of cells and filtrates of localized isolates against some pathogenic fungi include *(Trichophyton mentagrophytes , Microsporum gypseum , Aspergillus niger and Fusarium oxyporum*) by using three methods :- Cup assay , well diffusion and mixed culture , Results obtaind could be summarized as follows :-

1. (20) out of (100) soil samples , *M.fulvus* isolated as fruiting bodies depending on baiting technique by bacterial bait.
2. The media casiton – yeast extract agar was suitable for obtaind the best growth of vegetative swarms as pure culture .
3. (8) local isolates were showed inhibitory effect against all of the tested pathogenic fungi .
4. The concentrated filtrates of (3) local isolates were showed highly inhibitory effect than their unconcentrated filtrates against all of the tested pathogenic fungi .