تأثير المستخلص المائي لاوراق نبات *Eucalyptus camaldulensis* في نمو وكفاءة بكتريا *Azotobacter vinlndii* وطافراتها في تثبيت النتروجين

سناء سعود الكبيسي

جامعة بغداد، كلية العلوم، قسم علوم الحياة.

الخـــلاصة

شملت الدراسة عزل وتشخيص 30 عزلة بكتريا *Azotobacter vinlndii* من ترب زراعية مختلفـــة لمحافظـــة بغـــداد، واختيار افضل عزلة من خلال بعض الصفات المجهرية للخلايا والمظهرية للمستعمرات وسرعة النمو.تـــم انتخـــاب طفـــرات للعزلة المختارة مقاومة للمضاد الحياتي الستربيتومايسين والبنسلين واختيار اكفأ الطفرات من خـــلال قيـــاس النـــسبة المئويـــة للنتروجين المثبت في الخلايا الطـــافرة مقارنـــة بالعزلـــة الام درســـت فعاليـــة المـــستخلص المـــائي لاوراق اليوكـــالبتوس بتركيز(10,5%) في الوسط الزرعي السائل الخالي من النايتروجين على العدد الحي والمحتوى النايتروجيني لكل مـــن العزلـــة الام والطفرات أظهرت نتيجة الدراسة ان لليوكالبتوس فعالية تثبيطية في اعداد البكتريا والمحتوى النـــايتروجيني للعزلـــة الام، والعزلات الطافرة اكثر تحسسا وتأثيرا للتراكيز المستخدمة مقارنة بالعزلة الام.كما أظهرت الدراسة ارتفاع الفعاليـــة التثبيطيـــة لمستخلص اوراق اليوكالبتوس بمضاعفة التركيز حيث بلغت 69.4 ،% 93.4 لاعداد بكتريا العزلـــة الام والعزلـــة المقاومـــة للستربومايسين و 90.2 ، % 97.9 للمحتوى النايتروجيني لكل منها على التوالي. بينما لم تستطع الطافرة المقاومـــة للبنـــسيلين من النمو على اي من التركيزين.

المقدمة

أولت الكثير من دول العالم اهتماما كبيرا للنباتات البرية والمستزرعة باعتبارها المصدر الطبيعي لكثير من المستحضـــرات الدوائيـــة والصناعيـــة. يعـــود نبـــات *Eucalyptus* للعائلة *Myrtaceae* والجنس *Eucalyptus* الذي يضم 8 انواع منتشرة في العراق نال أهتماما متزايدا من الدراسة التصنيفية والكيميائية والطبية. أظهرت الكثير من البحوث احتواء اجزاءه على مواد قابضة كما يحوي *Tannins* ، *Pyrocatechin*،*Catechin*، ويحوي زيت اليوكالبتوس على المركبات *Camphene*، *Myrtenal*، Phellandene، 1,8–*Cineole* ومن المركبات الفينولية على *Eugenol*، *Geranyl acetal*، *Hexamal*، وجميع المواد المذكورة تعتبر مضادة للحياء المجهرية [1]. أثبت[2] ان لمستخلصات اليوكالبتوس تأثير مضاد للبكتريا الموجبة بصيغة كرام مثل *Staphylococeus*، *Bacillus* ويعود ذلك لفعالية مادة *A,B sideroxylon*. وجد ايضا ان لزيت اليوكالبتوس المستخلص من الاوراق فعالية مضادة ل12 نوع من البكتريا و7 انواع من الفطريات وان تركيز 0.25 الى 10 مايكروليتر/مل منه تمنع نمو 11 سلالة من الفطريات[3]. الفلافويتدات من المنتجات الطبيعية عزلت من اليوكالبتوس وكان لها مدى واسع من الفعالية البايولوجية المضادة حيويا للبكتريا والفيروسات كفايروس موزائيك التبغ (*TMV*)،[4]. أظهرت الدراسات ايضا ان لزيت اليوكالبتوس ومواده العطرية تأثير طارد لحشرتي الذباب المنزلي والبعوض [5].

أشارت دراسات اخرى ان لمخلفات شجرة اليوكالبتوس ومستخلصاتها المائية تأثير على التوازن البيئي لمايكروبات التربة فأثرت سلبيا على كل من البكتريا و *Actinomycetes* وايجابيا على الفطريات [6]. حديثا تشير الدراسات الى امكانية استخدام مركبات الاليوكيميائية *Allelochemicals* التي تتحرر من النبات في تثبيط عمليات مهمة للتربة كعملية النترجة، حيث اظهرت مخلفات اليوكالبتوس الورقية تثبيط واضح لعملية النترجة بنسبة 11.5 % واختزلت اعداد كل من البكتريا المؤكسدة للأمونيا والنتريت في التربة [7]. لذا رأينا من الضروري دراسة تأثير مستخلص اليوكالبتوس (الاوراق) على بكتريا الازوتوبكتر لأهمية هذه البكتريا في عملية التثبيت الحيوي

للنتروجين والتي تعد من العمليات المهمة من الناحية الاساسية والتطبيقية.

(طرائق العمل)

1. جمع النماذج: جمعت 50 عينة تربة من مواقع زراعية مختلفة لمنطقة (الجادرية والدورة وأبوغريب) بمعدل 1 غرام بعد قشط 1 سنتمتر من سطحها ووضعت في عبوة معقمة ونقلت الى المختبر مباشرة.
2. عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter vinlndii*: أعتمدت المشاهدات المزرعية على وسط بيرك الخالي من النتروجين [8] والفحوصات المختبرية والكيميوحياتية الواردة من المصادر العلمية المتبعة عالميا [9].
3. الأختبارات العامة لأختيار العزلة البكترية المناسبة:أخذت في الاعتبار سرعة نمو العزلة في الوسط السائل، تكتل الخلايا عند نموها في الوسط الزرعي السائل بأستعمال مجهر تباين الطور، تجانس المستعمرات النامية.
4. الحصول على العزلات المقاومة: أستخدمت طريقة تدرج التراكيز *Gradient concentration* لعزل الطفرات [10] حيث تم تحضير مزروع بعمر 18-24 ساعة للعزلة الام في وسط بيرك الخالي من النايتروجين السائل ونشر 0.2 مللتر منه على الوسط الحاوي على المضادات وتم ايضا تحديد العدد الحي لكل مزرعة وبعد المسح الاولي تمت زيادة التراكيز او تقليلها وفق النتائج الاولية.

المضادات المستخدمة

Streptomycin = U.S.A

Penicillin = SDI (الشركة العامة للأدوية في سامراء)

5. عينة النبات: أخذت العينة (أوراق) شجرة اليوكالبتوس Eucalyptus camaldulensis صنف Dicot من منطقة الجادرية/ بغداد. وأعدت لتحضير المستخلص المائي والتراكيز (10,5%). في الوسط الزرعي السائل كما ورد في [6].
6. تقدير وحساب اعداد البكتريا: تم تقدير وحساب اعداد البكتريا بعد انتهاء التجربة بطريقة (MPN) Most probable number وفق طريقة وجداول [11].
7. تقدير كمية النتروجين الكلي: تم تقدير كمية النايتروجين الكلي بطريقة المايكروكلدال كما ورد في [12].

تم حساب نسب التثبيط المئوية وفق المعادلة:

$$\text{التثبيط \%} = \frac{\text{معدل المقارنة} - \text{معدل المعاملة}}{\text{معدل المقارنة}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

1. أظهرت نتائج العزل والتشخيص انتشار البكتريا المثبتة للنايتروجين في جميع عينات التربة المدروسة والبالغ عددها 50 نموذجا من مناطق (الجادرية و الدورة وابو غريب) في بغداد.تم الحصول على 30 عزلة من مجموع العينات قيد الدراسة وتم تشخيص هذه العزلات والتأكد من خلال الصفات المظهرية والكيميوحياتية لها على امكانية اعتبارها بكتريا *Azotobacter vinlndii* اعتمادا على [9]. لأختيار العزلة المناسبة ومن خلال فحص خلاياها بمجهر التباين اتضح ان البعض منها يعاني من تكتلات في الوسط الزرعي السائل كما ان حجم مستعمراتها غير متجانس ويرى حجم البعض منها صغيرا جدا. لذلك أختيرت العزلة ذات حجم المستعمرات متوسطة ومتجانسة والتي أعطت عددا حيا عاليا مقارنة ببقية العزلات عند الزرع في الوسط الزرعي السائل وعليه فقد تم أختيار العزلة المناسبة وأعتبارها العزلة الام في هذا البحث. أن اسباب أختلاف العزلات في الترب المدروسة وتباين صفاتها المهمة من خلال المجهر والنمو يعود الى تباين البكتريا على مقاومة الظروف البيئية المختلفة ومحتوى الترب من المادة العضوية وقيمة الرقم الهايدروجيني (P^H)، فضلا عن طبيعة الاستغلال الزراعي للترب المدروسة [13].
2. أن استخدام صفة المقاومة للمضادات الحيوية من قبل الباحثين لزيادة كفاءة الأزوتوبكتر على تثبيت النايتروجين ولكون *Streptomyces* النوع الرئيس لمجموعة *Actinomycetes* والمصدر الأساسي لأشتقاق

45-85% من المضادات الحياتية المكتشفة بالأضافة الى 15-20 مركب مشتق منها يستعمل في المعاملات الزراعية له علاقة مباشرة أو غير مباشرة بألتربة [14] ولكون البنسلين منتج فطري، تم انتخاب طفرات للعزلة المختارة مقاومة لنسب تراكيز معينة من مضاد الـ *Streptomycin* و *Penicillin* وكما موضح في جدول (1) أن العزلة الام تختلف في مدى الاستجابة فقد أعطت حساسية للستربتومايسين في التركيز الاكثر من 10 مايكرو غرام/سم^3 وللبنسلين في التركيز الاعلى من 200 مايكرو غرام/ سم^3. وبذلك تم الحصول على طفرتين لكل من المضادين الحياتيين والتأكد من كونها طفرات حقيقية من خلال تردد وجودها الطبيعي في جدول (2) الذي يوضح ان التردد الطبيعي للطفرات يقل بزيادة تركيز المضاد، يعزى التباين في المقاومة الى التركيب الوراثي او الى اليه عمل المضاد الحيوي المعني في تغيير تسلسل القواعد النايتروجينية لحامض *DNA* الخلايا التي قد يؤثر في المسارات الايضية للعمليا ت الحيوية للخلية البكترية ومنها تثبيت النايتروجين حيث يؤدي الى الزيادة او النقصان [15]. تم أختيار العزلات الطافرة وتسميتها وأختيار الاكفأ منها في تثبيت النايتروجين من خلال قياس نسبة النايتروجين المئوية لخلاياها كما هو موضح في الجدول(3). أن الطافرة S-10 و P-200 لم تعط زيادة في النسبة المئوية لمحتوى خلاياها من النايتروجين.بينما اعطت كل من الطافرة S-5 و P-100 زيادة واضحة قدرت ب10.66، 10.11 % على التوالي موازنة بالعزلة الام التي قدرت نسبتها بـ8.56% لذلك السبب تم اختيار هذه الطفرات لغرض الدراسة اللاحقة.

جدول (1)

مدى مقاومة *Azotobacter vinalandii* لتراكيز معينة لاثنين من المضادات الحيوية ونموها على تراكيز مختلفة لهذين المضادين.

المضادات الحيوية	مقاومة العزلات للمضادات الحيوية					نمو العزلات على تراكيز مختلفة للمضادات الحيوية				
	تركيز المضاد الحيوي مايكروغرام/سم^3									
	1	5	10	100	500	10	50	100	200	300
ستربتومايسين	++		+	−		+	−	−		
بنسلين			++	+	−			−	+	−

(++) نمو كثيف لايمكن تعداد المستعمرات منه.

(+) نمو متميز بمستعمرات منفردة يمكن عدها.

(−) عدم حدوث النمو.

(الفراغ) لم يستعمل التركيز.

جدول(2)

تردد وتسمية الطفرات التلقائية المعزولة من *Azotobacter vinalandii* والمقاومة لأثنين من المضادات الحياتية بتراكيز مختلفة.

التركيز مايكروغرام/سم^3	التردد الطبيعي	التسمية	التسلسل
المضاد الحيوي ستربتومايسين			
1	0.8×10^8	S-5	1
10	1.9×10^7	S-10	2
المضاد الحيوي بنسلين			
100	0.3×10^7	P-100	3
200	0.5×10^6	P-200	4

*** التردد الطبيعي (طفرة لكل100 عدد حي).**

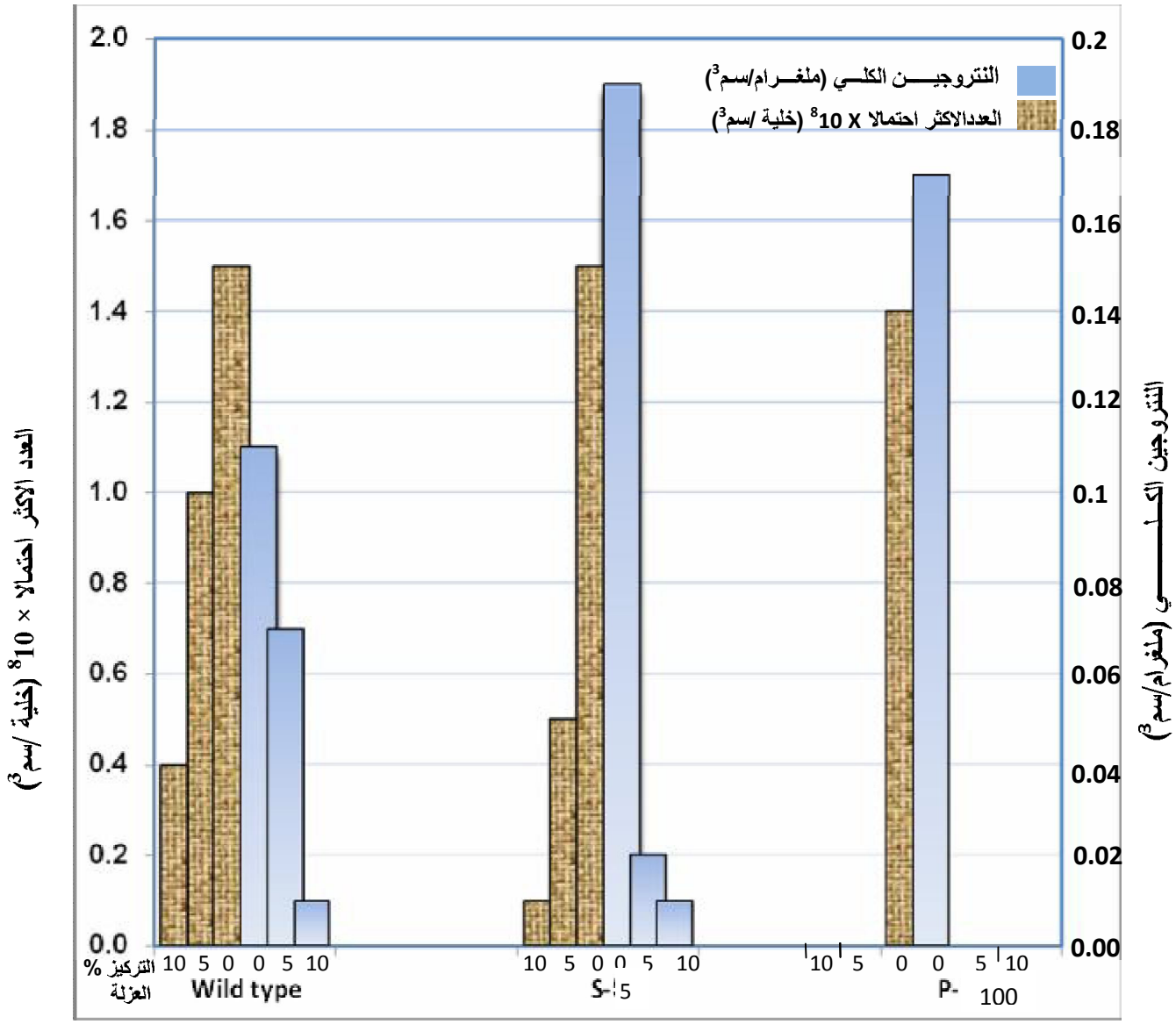
3.أن دراسة تأثير مستخلص أوراق اليوكالبتوس المضافة الى الوسط الزرعي السائل للسلالة الام وطافراتها ذات الكفاءة العالية بتثبيت النايتروجين تتضح بالشكل (4) بالجدول(5) تبين النتائج ان معاملة مخلفات اليوكالبتوس الورقية بمستوى5% على العزلة الام ادى الى أختزال أعدادها ومحتواها النايتروجيني بمعدل تثبيطي بلغ 30.56 و 31.4 % على التوالي.

جدول (3)

النسبة المئوية للنيتروجين الكلي في خلايا الطفرات المختلفة والسلالة الام للازوتوبكتر.

عزلات الازوتوبكتر	النسبة المئوية للنيتروجين (%N)
العزلة الام	8.56
S-5	10.66
S-10	8.21
P-100	10.11
P-200	8.34

* القراءات هي متوسط لثلاث نماذج.



الشكل(4) العدد الاحتمالي الاعظم (*MPN*) والمحتوى النيتروجيني للعزلة الام والعزلة S-5 وP-100 عند نهاية مدة الحضن البالغة 48 ساعة في الوسط الزرعي وتحت ظروف معاملة مستخلص اوراق اليوكالبتوس (10,5,0%) لكل منهم.

يرجع ذلك الى زيت اليوكالبتوس الذي يعزل من الاوراق عادة ومادة الـ *Tannins* والمواد الفينولية والتربينية و *Sidero xylon* A,b-بالاضافة الى المركب *Macrocarplas* حيث تم اثبات فعالية هذه المواد بتراكيز من 0.16 الى 20 مايكروليتير/مل من قبل [16] على تثبيط نمو 22 سلالة بكتريا مختبريا.

كما أكد الباحث[17] ان لنبات اليوكالبتوس تأثير البلوباثي واضح ومعنوي على بكتريا العقد الجذرية على نبات البازلاء*Pisum satirums* وان شدة التاثر تزداد بأزدياد التركيز. أن ذلك يفسر زيادة تثبيط العزلة الام بزيادة مستوى التركيز الى 15% حيث تضاعفت النسبة المئوية للتثبيط بأعداد البكتريا مرتين وثلاث مرات بالمحتوى النايتروجيني عما كانت عليه بمعاملة التركيز 5%.

أظهرت العزلة الطافرة S-5 تحسسا أكثر من العزلة الام لمستخلص اليوكالبتوس اذا بلغت قيمة التأثير التثبيطي لكل من اعداد البكتريا والمحتوى النايتروجيني 66.7 و89.48% بمعاملة التركيز5% في الوقت الذي لم تستطع الطافرة P-100 من النمو.

أن الاختلاف في استجابة ونمو الطفرات مقارنة بالعزلة الام يشير الى حدوث تغايرات مختلفة في الستيرولايت حيث ان معظم المقاومة للمضادات الحيوية تكون مرهونة بنوعية وكمية الستيرولايت في الاغشية الخلوية للبكتريا وخاصة *Ergosterds* وأن هذه التغايرات قد تؤدي الى تغير في نضوحية الاغشية [18] وبذلك يفسر زيادة نفوذ المواد المتحررة من اوراق اليوكالبتوس المضافة الى الوسط الزرعي الى داخل الخلية وهذا يفسر تفوق معاملة تركيز 10% يوكالبتوس على معاملة 5% في المعطيات التثبيطية. حيث أظهرت الزيادة في التركيز زيادة نسبة التثبيط لاعداد البكتريا والمحتوى النايتروجيني للعزلة الام الى 69.4، 90.2% وللطافرة S-5 بلغ ب 93.4، 97.9% وبلغ 100% للعزلة الطافرة P-100.

جدول (5)

النسب المئوية لتثبيط اعداد البكتريا والمحتوى النايتروجيني لعزلة الازوتوبكتر الام والطفرات المشتقة منها تحت ظروف معاملة اليوكالبتوس (10,5%) في الوسط الزرعي السائل عند نهاية التحضين البالغة (48) ساعة.

نوع العزلة	العزلة الام		S-5		P-100	
التركيز %	5	10	5	10	5	10
تثبيط اعداد البكتريا %	30.56	69.44	66.7	93.39	100	100
تثبيط المحتوى النايتروجيني %	31.4	90.2	89.48	97.89	100	100

مما يشير الى وجود علاقة ايجابية بين كمية مستخلص اوراق اليوكالبتوس المضافة الى الوسط الزرعي السائل وبين شدة التأثير السلبي يعزى ذلك الى زيادة المواد الفعالة وزيادة تأثيرها بزيادة التركيز المستخدم في الوسط الزرعي كما اشار لذلك [18] و [19] بأزدياد نسبة التثبيط للنمو كلما أزداد تركيز المادة المؤثرة في الوسط الزرعي.

من النتائج اعلاه يمكن ان نستنتج بأن المستخلص المائي لأوراق اليوكالبتوس المضافة الى الوسط الزرعي السائل الخالي من النايتروجين ادى الى تثبيط واضح في اعداد الازوتوبكتر وفي كفائتها في تثبيت النايتروجين وان الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية منها تكون اكثر حساسية وتأثرا من العزلة الام. مما يشير الى ان امكانية أستغلال نبات اليوكالبتوس أو ظاهرة الاليوبائية لهذا النبات كبديل عن أي من المركبات والمثبطات الصناعية كما أشار كل من [6] و[7] والحاجة الى بحوث ودراسات للتعرف على طبيعة المواد الفعالة الموجودة في النبات والقادرة على تثبيط بكتريا الازوبكتريا المثبتة للنايتروجين وغيرها من الاحياء المجهرية المفيدة للتربة والنبات.

analysis" part 2. Chemical and Microbiological properties, Edied by Blank, C.A. etal .1965, p:1477-1488.

[12] A.O.A.C. "Official mehtods of analysis, 11th Ed. Association of official chemistry washington D.C.,1970 .

[13] B. Santck and V. Maric, "Temperature and dissolved Oxygen concenteration as parameter of *Azotobacter chroococcum* foruse inbiofertilizers" bioechnol. Lett. London, UK: chopman and Hall, VOL.17, No.4,1995,PP.453-458.

[14] R. Okamoto, M. Tsuchiza, H. Nomura, H. Iguchi K. Kujoshima, S. Hori and T. Inui, "characteristics of soil actinomycetes from antarctica", J.Antibiotics, VOL.33, No.1, 1980, PP.1309-1315.

[15] Y.A.El-Zawahry,,"Studies on the effect of gamma radiation on growth and activity of riziobium"Ph.D. thesis, Botany department, Faculty of Science, University of Cairo, Egypt.

[16] I. P. Singh and H. Etoh, "New Macrocarpalam 1 from *Eucalyptus amplifolia*", Biosic. Biochem. Vol.59, No.12, 1995 PP.2330-2332.

[17] F.B. Malik and B.S. Shah,"Allelopathic effect of *Eucalyptus* specieson legume vegetables"Pakistan J. of forestry, VOL.45, No.2, 1995, PP.65-72.

[18] A.A.Al-saady, "Effect of Henna on candida albicans and their mutants resistant to nystatin", J.Biotechnology research. VOL.6, No. 1, 2004, PP.5-17.

[19] B.Z. Bassad, W.Adnan and M.Soaid, "Inhibition activity of the cloves extract on the *pseudomonas aeruginosa* growth in vivo and vitro", J.Al-Nahrain University, Science, VOL.11, No.3, 2008, PP.57-64.

Abstract

The study was included isolation and idenfication of 30 bactrial isolates for Azotobacter vinlandii from agricultural soils in Baghdad governorate .On the base of microscobical, morphological characteristics of cell and colonies also the best growth , strain was choosen, The Mutants that developed resistant to the antibiotics (streptomycin, pencillin) was selected. The mutant showed best Nitrogen fixation was choosen. The aqueous extract of Eucalyptus

References

[1] J. C. Chalchat, J. L. Chabard, M. S. Gorunovic, V. Djermanovic and V.Bulatovic "Chemical composition of *Eucalyptus globulus* oils from the Monteneger coast and east coast of spain", J. Essential oil research, Vol.7, No.2, 1995, pp.147-152 .

[2] I. P. Singh, R. Hayakawa, H. Etoh, Ki-Toskas and T. Konoshima, "Grandial a new phlorglucinol dimer from *Eucalyptus*, "Biosic. Biochem.Vol.16, No.5, 1997, pp.921-923.

[3] M. Gundidza, F. Chinyanganya and S.mavi, "Antimicrobial activity against bactria and fangi of the essential oil from *Eucalyptus*".planta medica, Vol.59, No.7, 1993, pp.705-710.

[4] الجنابي-عبدالباسط "تأثير مستخلصات نباتية على فايروس موزائيك التبغ(TMV). رسالة ماجستير 1984، جامعة بغداد-كلية الزراعة. بغداد-العراق.

[5] Z.Osmani, M.B.Nada and I-Anees,"Effect of different temperatures on the repellency of certain oils against house filles and mosquitouse" Pesticides. Vol.8, No.1, 1974, pp.45-47.

[6] S.S. Alkou "Effect of *Eucalyptus camaldulensis* on soil microbial community (bacteria , fungi and actinomycetes)",plant . Iraq.J.Agri.Sci, Vol.34, No.6, 2003, pp.18-28.

[7] H.F.Al-Muffty, M.M. Maflti and R.K. Rashadie, "Biological inhibition of nitrification in soil by extracts and residues of *Eucalyptos camaldulensis* leaves" Plant. Iraqi J.Agr.Sc. VOL.32, No.4 2001, pp 71-76.

[8] O.N. Allen, "Experiments in soil bacteriaology", publishing Co., Minneaplis, Minnesota 1959.

[9] J.G.Holt, N.R.Krieg, P.H.snelath, J.staley and S.T. Williams," Bergeys' Manual of deteminative Bactorialogy" 9th ed .U.S.A. 1994.

[10] M.A. Ather & H.I.Winner," Development of resistance by candida species to polyenc antibiotics in vitro" J: Med. Microbiol VOL.4, 1971, pp. 505.

[11] M. Alxander & E. C. Francis," C.I, Nitrifying becteria in methods of soil

leaves with (5-10%) cocentartion activity (in culture medium) on total count and total nitrogen cocentartion for wild type and mutants was stuidied.

Results of present study showed that the leaves extract inhibited the numbers of nitrifying bactria and its total nitrogen of wild type and mutants. Mutants strains were more sesitive to the used concetration. The inhibition value was increased when the concetration of extract was increased from 5 to 10%. The inhibtion values were (69.4, 93.4%) to bactrial count of wild type and streptomycin mutant resistant resepectively. And (90.2, 97.9%) to total nitrogen for both of them respectively. Wherease resistant to penicillin mutant was unable to grow on any concentration for Eucalyptus extractes.