تقييم كفاءة البكتريا *Bacillus subtilis* في حماية حبوب الذرة الصفراء من الاصابة بالفطرين *A.niger* و *A.flavus* في المخزن

أ.د. سامي عبد الرضا علي — معاذ عبد الوهاب الفهد

كلية العلوم / جامعة الكوفة — كلية الزراعة / جامعة تكريت

الخلاصة:-

تناولت هذه الدراسة تقييم كفاءة المستحضر الحيوي لبكتريا ***Bacillus subtilis*** في حماية حبوب الذرة الصفراء ***Zea mays L.*** في المخزن من الاصابة بالفطرين ***Aspergillus niger*** و ***Aspergillus flavus*** ومدى قدرته في تحسين انبات البذور المعاملة ونمو النباتات الناتجة عنها . وأثبتت النتائج ان للمستحضر الحيوي تأثيراً معنوياً في تثبيط نمو الفطرين كليهما على وسط P.D.A وبنسب تراوحت بين 94.4% و99.8% بطريقة البقع (Spotting)، و كان للمستحضر الحيوي القابلية على توفير حماية كاملة للحبوب من الاصابة بالفطرين تحت ظروف الخزن الطبيعي وبنسبة تراوحت بين 85- 95 % بعد مرور مدة خزن6 أشهر. ومن جانب آخر بينت نتائج حساب أعداد تواجد خلايا بكتريا ***B. subtilis*** على سطوح الحبوب وبحيوية عالية بالرغم من مرور مدة خزن طويلة استمرت لستة أشهر إذ وصلت أعدادها على الحبوب المعفرة بالمستحضر الحيوي بتركيز 20غم/كغم والملوثة بلقاح الفطرين ***A . niger*** و ***A. flavus*** الى 2.33×10^{12} و2.37×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة /غم حبوب على التوالي .

المقدمة Introduction :-

يواجه حاصل الذرة الصفراء مشاكل كثيرة في اثناء الحصاد وبعد تخزينه ، ومن أهم تلك المشاكل الاصابات الفطرية ، فالذرة الصفراء تنضج وتحصد في ظروف بيئية ملائمة لنمو وانتشار العديد من فطريات تعفن الحبوب،مما يجعلها عرضة للأصابة بهذه الفطريات0 وتعد الفطريات التابعة لجنس ***Aspergillus spp***من أهم المجاميع الفطرية التي تصيب الذرة الصفراء في أثناء الحصاد والخزن ،لقدرتها العالية على إنتاج كميات هائلة من الابواغ المحمولة في الهواء التي بإمكانها الوصول الى الحاصل في الحقل أو المخزن ، ويأتي الفطر***A.flavus*** في مقدمه الأنواع ألتي تصيب حاصل الذرة الصفراء ، مماتسبب في انخفاض نسب إنبات الحبوب وقيمتها الغذائية فضلا عن تغيير نوعيتها من حيث اللون والطعم والنكهة (Cocker وجماعته ،1984). وللحد من إصابة حاصل الذرة الصفراء استعملت وسائل وطرق متعددة لخزن الحبوب بظروف تمنع حدوث وتطور الإصابة بالفطريات داخل المخزن منها استعمال الطرق الفيزيائية كالتهوية والتعريض للأشعة فوق البنفسجية ، والكيميائية كالمعاملة بالامونيا او بيروكسيد الهيدروجين أو غاز الكلورين اوالكبريتات وغيرها ، او باستعمال طرائق حياتية كالمقاومة الحيوية بالفطريات والبكتريا والمضادات الحيوية (Doyle وجماعته ،1982). وفي السنين الأخيرة تم اختبار كفاءة بعض الأنواع التابعة لجنس ***Bacillus*** التي أثبتت كفاءة عالية في السيطرة على الممرضات الفطرية والبكتيرية (Laura وEric ،1998 ؛ kazmar و Robert، 2000) فقد وجد أن الأنواع ***Bacillus subtilis*** و***Bacillus pumilis*** و***Bacillus cereus*** ذات قدرة عالية على تثبيط الكثير من المسببات المرضية وكبح نموها ونشاطها والحد من أضرارها على النباتات، وقد أكدت الأبحاث أن استعمال هذه الأنواع من البكتريا أدى الى زيادة معنوية في النمو والحاصل النباتي (Dal- Soo وجماعته ،1997 ؛ Yuming و جماعته ،2003).

المواد وطرق العمل Materials and Methods:-

وسط أكار مستخلص البطاطا و الدكستروز Potato dextrose agar:

حضر حسب طريقة Collee وجماعته (1996) وذلك بأخذ 200غم من البطاطا بعد غسلها وتقطيعها إلى قطع صغيرة وضعت في إناء معدني ثم أضيف إليها لتر ماء مقطر ،وغليت لمدة 20 دقيقة وبعدها رشحت بوساطة قطعة شاش نظيفة ثم أضيف إلى الراشح 20غم من سكر الدكستروز و15غم أكار وعقم بجهاز الموصدة لمدة 20 دقيقة بحرارة 121مْ تحت ضغط 1 جو، واستعمل الوسط في عزل الفطرين *A.niger* و *A.flavus* وتشخيصهما .

وسط مستخلص البطاطا والدكستروز Potato dextrose broth:

حضر بنفس الطريقة الواردة في الفقرة 3-1-3-1 لكن دون اضافة مادة الاكار إلى الراشح واستعمل هذا الوسط لغرض إكثار لقاح الفطرين *A.niger* و *A.flavus* . (Collee وجماعته ،1996).

حبوب الذرة الصفراء (Yellow Corn seeds)

جلبت حبوب الذرة الصفـراء من الاسواق المحلية لمدينة النجف حيث استعمل محصول العروة الخريفية لعام 2007 لغرض عزل الفطريات الملوثة ، أما التجارب الخزنية فقد طبقت على محصول العروة الخريفية لعام 2008 .

المادة الحيوية:-

استعمل مستحضـــر حيوي من لقاح البكتريا *B. subtilis* محمـــلة على مادة كاربونات الكالسيوم **$CaCo_3$** تم الحصول عليه من مختبر بحوث الفطريات في قسم علوم الحياة /كلية العلوم.

طرائق العمل :-

عزل الفطرين *A.niger* و *A.flavus* وتشخيصهما من حبـوب الذرة الصفراء:

جلبت حبوب الذرة الصفراء من مناطق مختلفة (النجف ،الكوفة ،أبوصخير والعباسية) ، عقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 3% لمدة 5 دقائق ، غسلت بعدها بماء معقم ، ثم جففت وزرعت في أطباق بتري حاوية على أكار مستخلص البطاطا والدكستروز (P.D.A) مع اضافة 48 ملغرام /لتر كلورامفينيكول لمنع نمـو البكتريا ،وضعت خمس حبات في كل طبق أربع منها محيطية ، والخامسة في منتصف الطبق ،حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 مْ ±2 لمدة 7 أيام (ميخائيل وبيدر،1982). بعد انتهاء مدة الحضن تم حساب النسبة المئوية لظهور الفطر من خلال المعادلة التالية:-

$$\text{النسبة المئوية لظهور الفطر} = \frac{\text{عدد عينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$$

(Krebs،1978) ثم تم تنقية عزلتي الفطرين *A.niger* و *A.flavus* بنقل قرص من كل مستعمرة وزرعه على طبق حاوي على وسط P.D.A جديد ، كررت العملية عدة مرات ،شخصــت العزلتان اعتمـادا على الصفـات التصنيفية التي وضعها Rapper وFennel (1965).

حفظ عزلتـــي الفطـــرين *A.niger* و *A.flavus*:-

نميت العزلتان في أنبوبتي اختبار تحوي كل منهما على وسط P.D.A بصورة مائـلة وحضنتا بحرارة 25 مْ ± 2 ولمدة 7أيام ، حفظت في الثلاجـة لحيـن استعمـــالها في التجارب المختبرية اللاحقة .

تحضير لقـــاح الفطـــرين *A.niger* و *A.flavus*:-

حضر الوسط الغذائي السائل P.D.B ووزع في دوارق سعة 500 مل وبمعدل 250 مل لكل دورق ، عقمت الدوارق في جهـــاز الموصدة ولقحـت بأقراص من مستعـمرة الفطر *A.niger* المنماة مسبقـا على وسط P.D.A بعمر 7أيام ، وأجريت نفس العملية للفطـر *A.flavus* وحضنت جميع الدوارق بحرارة 25 مْ ±2 لمدة 7 أيام لغرض استعمال اللقاح في التجارب المختبرية والخزنية اللاحقة .

اختبار كفاءة المستـحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *A.niger* و *A.flavus* بطريقة البقع spotting على الوســـط الزرعي:-

حضر وسط المرق المغذي (Nutrient broth) في ثلاثة دوارق سعة 250مل بواقع 200مل لكل دورق ، بعدها عقم الوسط في جهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121مْ تحت ضغط 1جو ولمدة 20دقيقة،وترك الوسط ليبرد قليلا ثم اضيف للدورق الاول 0.5 غم \لتر من المستحضر الحيوي لبكتريا

B.subtilis واضيف للدورق الثاني 1غم\لتر من المستحضر الحيوي واضيف للدورق الثالث 2غم\لتر من المستحضر، ثم حضنت الدوارق لمدة 24 ساعة وبدرجة 35±2 م°. وبعدها تم تهيئة 32 طبق حاوية على وسط PDA معقمة وقسّمت على اربعة مجاميع ،كل مجموعة تضم ثمانية اطباق ، لقحت الاطباق الثمان الاولى بوسط المرق المغذي والحاوي على تركيز 0.5 غم ِ/لتر من المستحضر الحيوي وذلك بوساطة انابيب شعيرية (capillary tube) حيث تم سحب مامقدار o.1 مل ووضع بشكل بقعة وبمسافة 2.5 سم عن حافة الطبق وبوا قع خمس بقع لكل طبق وبشكل دائري وكـــررت هذه العمـــلية ثمان مرات (مكررات) للتركيز o.5غم/لتر . واعيد العمل نفسه بالنسبة الى مجاميـــع الاطباق الثانيــة والثالثــة لكن باستثناء معاملتها بالتراكيز1،2غم/لتر من المستحضر الحيوي على التوالي ،بعدها حضنت المجاميع الاولى والثانية والثالثة من الاطباق بدرجة حرارة 30±2م° لمدة 24 ساعة. ثم قسمت أطباق كل مجموعة من المجاميع الثلاثة على مجاميع ثانوية تضم كل منها اربعة اطباق وعوملت على وفق الاتي :-

A. المجموعة الثانوية الاولى :- وتتمثل بالاطباق المعاملة بالمستحضر الحيوي وبتركيز 0.5غم/لتر لقحت باقراص قطر 5 ملم منمى عليها الفطر *A. flavus* ووضعت الاقراص في مركز الطبق.

B. المجموعة الثانوية الثانية :- وتتمثل بالاطباق المعاملة بتركيز المستحضر الوارد في الفقرة (A)نفسها لكنها لقحت بالفطر *A.niger* وبالاسلوب نفسه الوارد في الفقرة (A).

C. المجموعة الثانوية الثالثة :- وتتمثل بالاطباق المعاملة بالمستحضر الحيوي وبتركيز 1غم/لتر لقحت باقراص من الفطر *A. flavus* و بالاسلوب الوارد في الفقرة (A)نفسه .

D. المجموعة الثانوية الرابعة :- وتتمثل بالاطباق المعاملة بتركيز المستحضر والوارد في الفقرة (C) ولكنها لقحت بالفطر *A.niger* وبالاسلوب الوارد في الفقرة (A) نفسه.

E. المجموعة الثانوية الخامسة :- وتتمثل بالاطباق المعاملة بالمستحضر الحيوي وبتركيز 2 غم/لترلقحت باقراص من الفطر *A. flavus* و بالاسلوب الوارد في الفقرة (A)نفسه.

F. المجموعة الثانوية السادسة :- وتتمثل بالاطباق المعاملة بنفس تركيز المستحضر والوارد في الفقرة (E) ولكنها لقحت بالفطر *A.niger* و بالاسلوب الوارد في الفقرة (A)نفسه.

اما مجموعة السيطرة فتتضمن ثمانية اطباق وقسمت هي الاخرى على مجموعتين وكل مجموعة تضم اربعة اطباق ، لقحت الاربعة الاولى منها بالفطر *A. flavus* والاربعة الثانية بالفطر *A.niger* وبالاسلوب الوارد في الفقرة (A)نفسه . بعدها حضنت جميع الاطباق الواردة في هذا الاختبار بدرجة حرارة 25±2م° لمدة اسبوع .(Gamilel و katan،1992) وبعدها تم حساب نسبة التثبيط بأخذ معدل قطرين متعامدين للمستعمرات النامية بعد انتهاء مدة الحضن (الجميلي وجماعته ،2007a) وبتطبيق على وفق معادلة Abbott (1925) الواردة في شعبان والملاح (1993) وهي كالأتي :

$$\text{Inhibition} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر الممرض (معاملة المقارنة) .

R2 أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر الممرض في الأطباق الحاوية اللقاح البكتيري.

اختبار كفاءة تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* في حماية حبوب الذرة الصفراء من الإصابة بالفطرين *A.niger* و *A.flavus* في المخزن:-

تم تهيئة 13.5 كغم من حبوب الذرة الصفراء انتاج العروة الخريفية لموسم 2008 حيث قسمت الحبوب على ثلاثة أقسام أساسية القسمين الاول والثاني يحتوي كل منهما على 6 كغم من الحبوب لوثت حبوب القسم الاول بلقاح الفطر *A.flavus* (3 x 10^5 بوغ / مل) وذلك بوضعها في كيس نايلون نظيف وأضيف اليها 25مل /كغم حبوب من معلق الفطر ثم رجت الاكياس لعدة مرات لغرض توزيع لقاح الفطر على اسطح الحبوب أما القسم الثاني فتم تلويثه بالاسلوب السابق نفسه باستثناء أضافة لقاح الفطر *A.niger*(3 x 10^5 بوغ / مل) بعد الانتهاء مباشرة من تلويث الحبوب بلقاح الفطرين كلّ على حده عوملت الحبوب بتراكيز المستحضر الحيوي حيث قسمت كمية الحبوب (6)كغم والملوثة بلقاح الفطر*A.flavus* على أربعة اقسام ثانوية وضع كل منها (1.5كغم) في كيس نايلون نظيف ومعقم حيث أضيفت تراكيز المستحضر الحيوي (5 و10و20) غم/كغم وكلّ على حده الى حبوب كل كيس من الاكياس الثلاثة ثم رجت جيدا لتوزيع المستحضر الحيوي على أسطح الحبوب،

بعد ذلك وزعت محتويات كل كيس من الحبوب الملوثة بلقاح الفطر والمعاملة بتركيز المستحضر الحيوي على ثلاث عبوات من البولي فاينيل كلورايد(poly vinyl chloride) (p.v.c) وبكمية 500غم /عبوة وبواقع ثلاث مكررات.أما القسم الثانوي الرابع من الحبوب فلم يتم معاملته بالمستحضر الحيوي وهو الاخر وزع على ثلاث عبوات وبنفس الكمية المذكوره سابقا نفسها.نفذت الخطوات السابقة نفسها على الحبوب الملوثة بلقاح الفطر *A.niger*اما القسم الرابع من الاقسام الاساسية غير معاملة لا بلقاح الفطر ولا بالمستحضر الحيوي (محسن،2006) وبذلك تكون المعاملات المستعملة في التجربة كالاتي:-

ت	رمز المعاملات	التوصيف
1-	B0+A.N	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* دون أضافة المستحضر الحيوي
2-	B5+A.N	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 5 غم /كغم حبوب
3-	B10+A.N	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 10 غم /كغم حبوب
4-	B20+A.N	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 20 غم /كغم حبوب
5-	B0+A.F	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* دون أضافة المستحضر الحيوي
6-	B5+A.F	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 5 غم /كغم حبوب
7-	B10+A.F	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 10 غم /كغم حبوب
8-	B20+A.F	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 20 غم /كغم حبوب
9-	Control	حبوب بدون تلويث بلقاح الفطر وغير معاملة بالمستحضر الحيوي

وبعد مرور ثلاثة أشهر من خزن الحبوب تم حساب وتقدير مايلي :-

تقدير أعداد البكتريا في الغرام الواحد من حبوب الذرة الصفراء:

تم أخذ عينات من حبوب الذرة الصفراء المخزنة مقدارها 1غم عشوائيا من كل مكرر من مكررات كل معاملة عوملت بالمستحضر الحيوي وبجميع التراكيز المستعملة (5 و10و20) غم/كغم وكلا على حدة ثم وضع هذا الوزن (1غم) من الحبوب في انبوبة اختبار زجاجية معقمة بحجم 20مل حاوية على 9 مل ماء مقطر معقم رجت محتويات كل أنبوبة جيدا وأخذ منها 1 مل وأضيف الى انبوبة اختبار أخرى حاوية على الكمية نفسها من الماء المقطر و المعقم وهكذا تم عمل سلسلة تخفيفات عشرية حتى 10^{-12}تحت ظروف التعقيم التام مع استعمال ماصة نظيفة معقمة لكل تخفيف على انفراد ، نقل 1 مل من كل تخفيف من التخافيف 10^{-10} و10^{-11} و 10^{-12} الى اطباق زجاجية معقمة قطرها 9 سم حاوية على الوسط الزرعي nutrient agar وباربعة اطباق لكل تخفيف ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 35م° لمدة 24 ساعة الواردة في (حميد ،2001).اختيرت الاطباق الحاوية على عدد مستعمرات تتراوح بين 30 و300 مستعمرة بكتري ومن ثم طبقت معادلة clark (1965) لحساب أعداد البكتريا ، وكررت هذه العملية بعد مرور ستة اشهر من فترة الخزن.

عدد خلايا البكتريا /غم = معدل عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف

حساب نسبة الاصابة بالفطرين *A.niger*و *A.flavus* في حبوب الذرة الصفراء :-

أخذت 20 غم من حبوب كل مكرر ولكل معاملة بصورة عشوائية وعقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% بعدها غسلت بماء مقطر معقم ، ثم جففت الحبوب ونقلت إلى أطباق بتري حاوية على وسط P.D.A بمعدل 5 حبوب/طبق وبأربعة مكررات لكل معاملة ، حضنت الأطباق بحرارة 25 مْ ± 2 لمدة أسبوع ، بعدها تم حساب نسب الحبوب المصابة بحسب طريقة ميخائيل وبيدر (1982).

$$\text{نسبة الاصابة }(\%)= \frac{\text{عدد الحبوب المصابة}}{\text{العدد الكلي للحبوب المزروعة على الوسط الزرعي}} \times 100$$

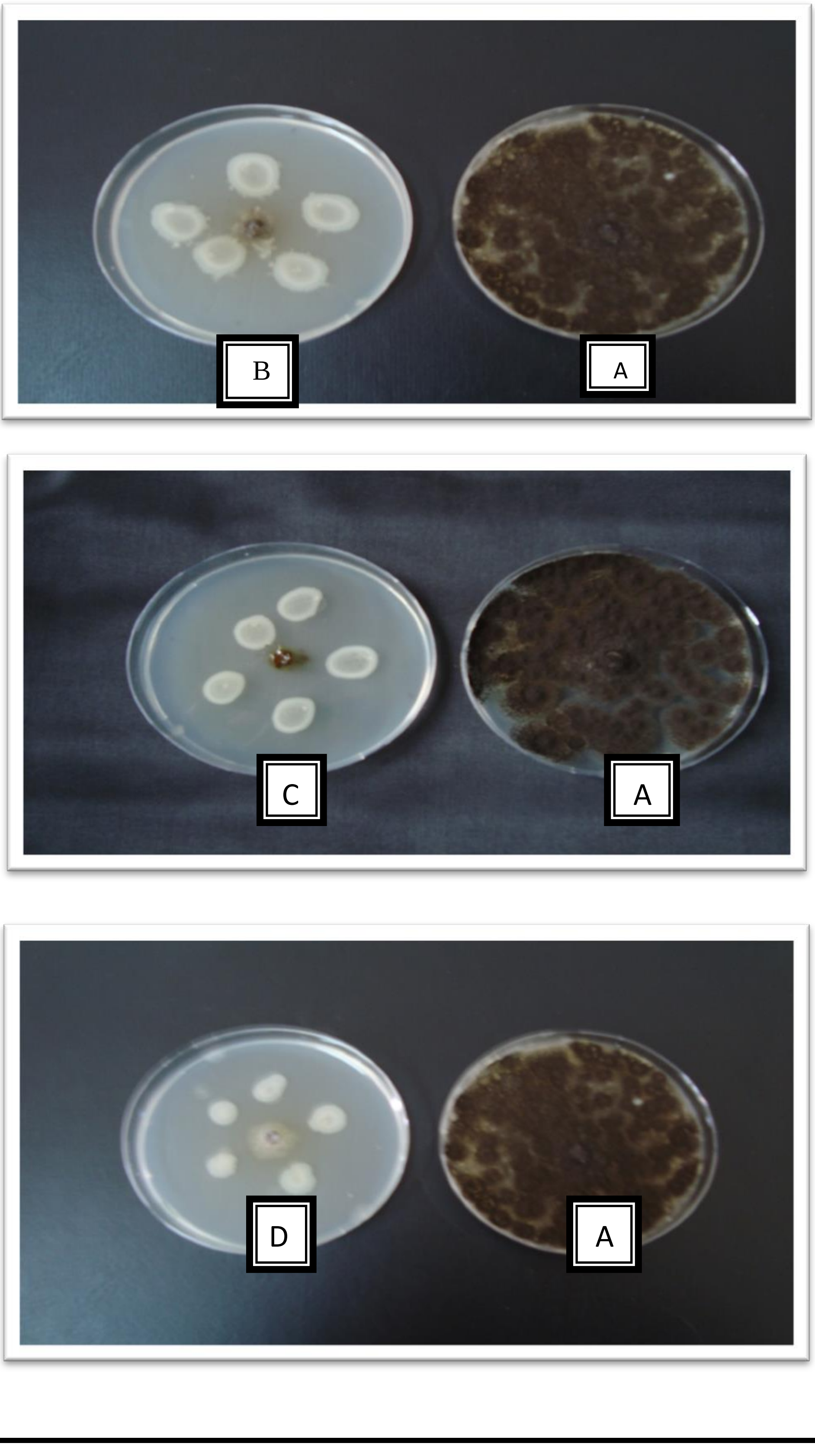
النتائج والمناقشة :-

أختبار كفاءة المستحضرالحيوي لبكتريا *B.subtilis* بتراكيز مختلفة في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *A. niger* و *A.flavus* بطريقة البقع Spotting في الوسط الزرعي:

أظهر الفطرين كلاهما حساسية لجميع تراكيز المستحضر الحيوي المختبرة و بمعدلات تباينت فيما بينها معنوياً حسب تركيز المستحضر الحيوي المستعمل ، فقد بلغت أعلى نسبة تثبيط للفطر *A.niger* مع التركيز 2غم/لتر (99.8 %) و للفطر *A.flavus* مع التركيز نفســــــــه (94.4%) ، أما بقية التراكيز فكان تأثيرها على الفطر *A.niger* أشد مقارنة مع التأثير الذي أحدثة للفطر *A.flavus* إذ بلغت نسبة التثبيط (93%) للتركيز (1غم/لتر) مع الفطر *A.niger* على حين انخفضت النسبة و بفارق معنوي إلى (89.5%) لنفس التركيز مع الفطر *A.flavus* ، و كذلك مع التركيز 0.5غم/لتر إذ بلغت نسبة التثبيط مع الفطر *A.niger* (84.7 %) بينما انخفضت بفـــــــارق معنوي إلى 83.3% للتركيز نفسه مع الفطر *A.flavus* (جدول1،صورة 1 و2). ان القدرة التثبيطية لبكتريا *B.subtilis* تعود اساساً الى قدرتها على انتاج العديد من المضادات الفطرية(Antifungal) التي تقوم بتثبيط نمو الفطريات منها المضاد الحيوي Bacillomycin D الذي له فعالية عالية في تثبيط نمو الفطر *A.flavus* المنتج لسموم Aflatoxin التي تُعدُّ من أخطر انواع السموم الفطرية (Moyne وجماعته ، 2001)، و المضاد الحيوي Bacillysoin وهو حديث الاكتشاف مكون من الدهون الفوسفاتية حيث ظهرت فعاليته التثبيطية تجاه بعض السلالات الفطرية ومنها *A. niger* و *Cryptococcus neoformans* و *Candida pseudotropicalis* و *Sacchromyces cerevisiae* وتجلت فعاليته من خلال تثبيطه للنمو الشعاعي لهذه الفطريات (Tamehiro وجماعته، 2002) و Surfactin حيث وجد ان النباتات المحتوية في جذورها على كثافة عالية من بكتريا *B. subtilis* المنتجة لهذا المضاد توفر حماية لهذه النباتات من المسببات المرضية (Kinsingerوجماعته ، 2003). و اكد Kazmar وRobert (2000) ان البكتريا *B. subtilis* قادرة على تثبيط نمو العديد من الفطريات الاقتصادية وخاصة *Fusarium spp* و *Aspergillus spp* و *Rhizoctonia spp* واكد الباحث Charles وجماعته (2001) هذه الفعالية ايضا .ووجد Yuming وجماعته (2003) ان بكتريا *B. subtilis* قــــادرة على كبح نشاط ونمو الفطر *Pythium ultimun*. ووجد أن لهذه البكتريا القدرة على التنافس على الغذاء والمكان من خلال قدرتها العالية على استغلال مكونات الوسط الغذائي التي تنمو عليها وسرعة تكاثرها مقارنة ببقية الكائنات الحية الاخرى كالفطريات (الجميلي و مزهر ، 2008) .

جدول(1) تأثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي في النمو الشعاعي للفطرين *A.niger* و *A.flavus* بطريقة البقع .

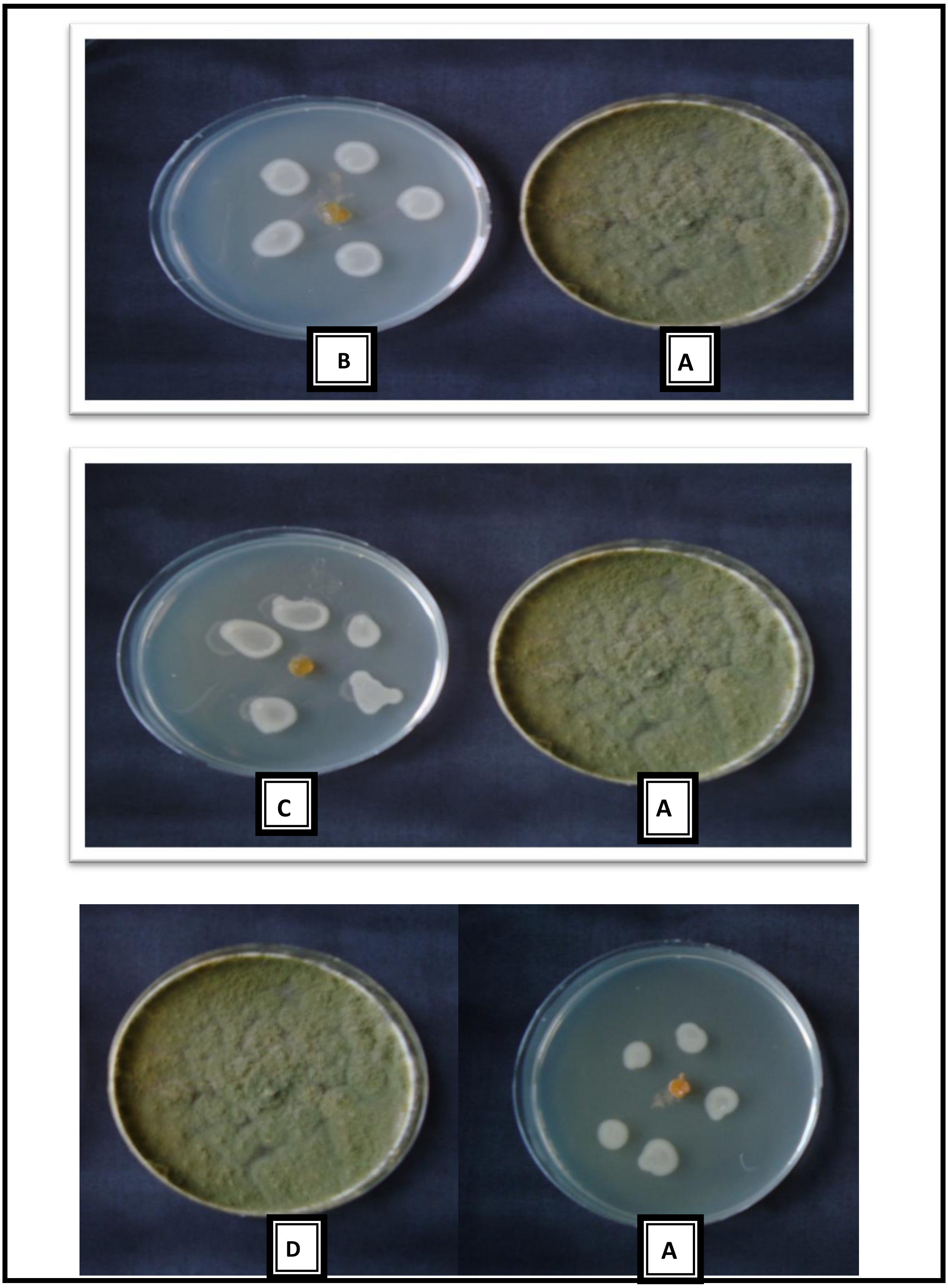
تركيز (غم /لتر)	*A.niger* معدل قطر المستعمرة(سم)	*A.niger* نسبة التثبيط(%)	A.flavus معدل قطر المستعمرة(سم)	A.flavus نسبة التثبيط(%)
0	9	0	9	0
0.5	1.37	84.7	1.5	83.3
1	0.62	93	0.93	89.5
2	0.019	99.8	0.5	94.4
$L.S.D_{(0.05)}$ لتداخل نسبة التثبيط				5.3



صور(1): تاثير تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي في نمو الفطر *A.niger* بطريقة البقع.

A- المقارنة　　B- تركيز(0.5 غم /لتر)　　C- تركيز(1 غم /لتر)

D- تركيز(2 غم /لتر).



صور(2): تاثيرالمستحضر الحيوي بتراكيز مختلفة في نمو الفطر *A.flavus.* بطريقة البقع.

A - المقارنة   B- تركيز(0.5 غم /لتر)

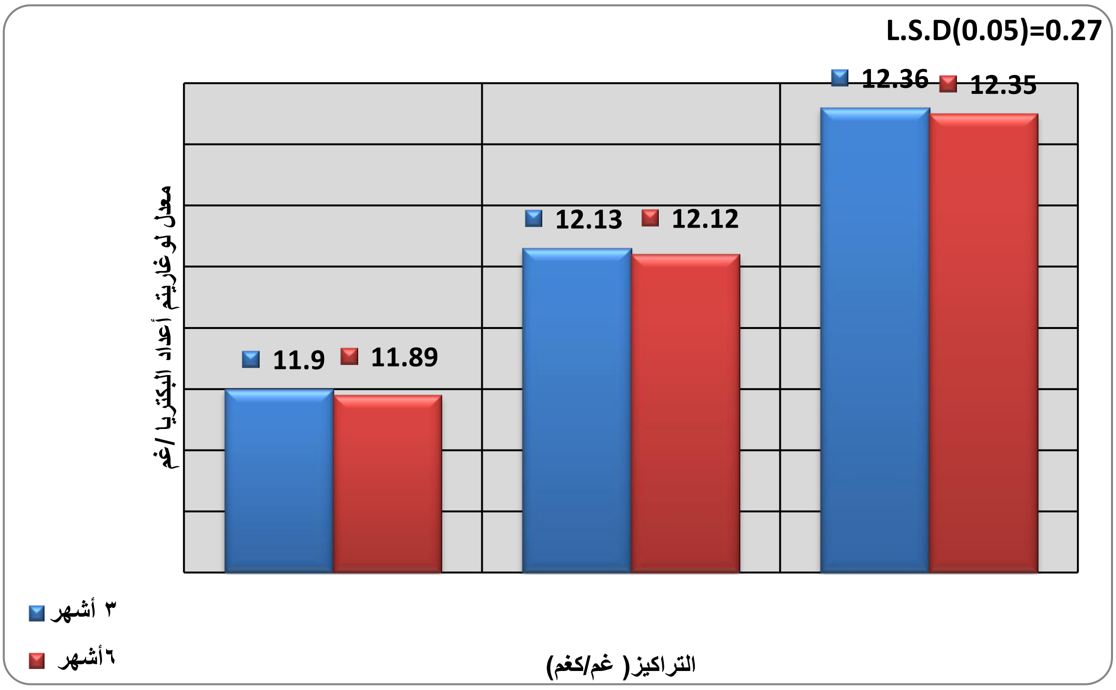
C- تركيز(1 غم /لتر)   D- تركيز(2 غم /لتر).

تقديرأعداد البكتريا *B. subtilis* على حبوب الذرة الصفراء المعاملة بالمستحضر بعد مرور ثلاثة و ستة أشهر على خزنها :

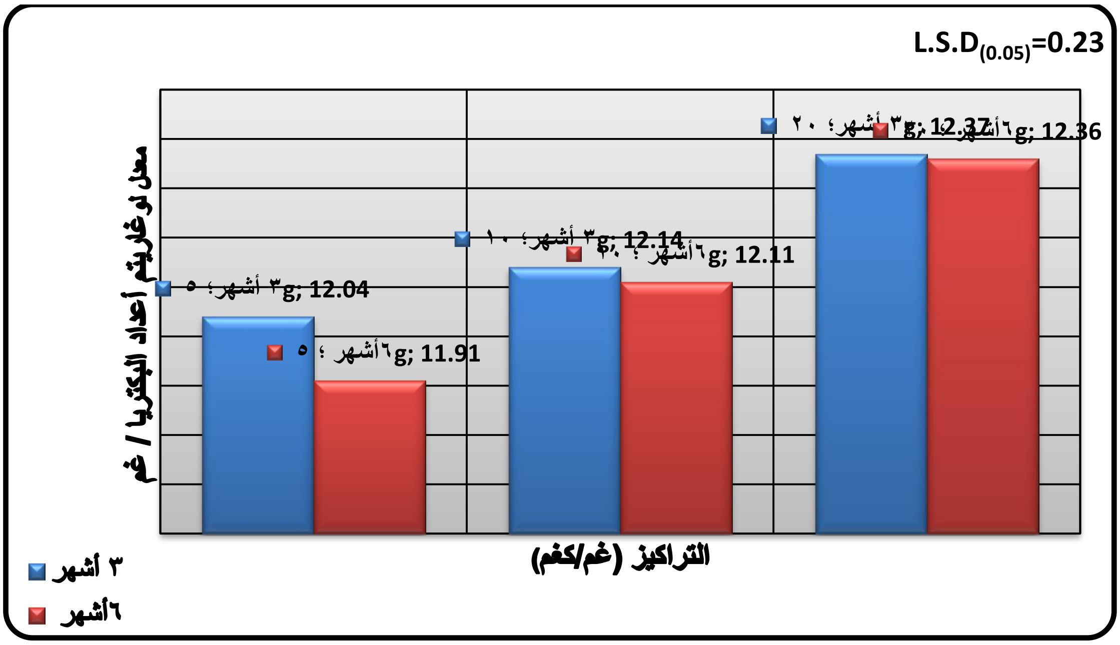
اظهرت نتائج التحليل الاحصائي في الشكلين (1 و 2) ،عدم وجود فرق معنوي في أعداد البكتريا بعد مرور 3 و6 أشهر من تأريخ خزن الحبوب ، أذ وجد بعد مرور ثلاثة أشهر من تأريخ الخزن تفوق معاملة المستحضر الحيوي بتركيز 20غم/كغم حبوب والملوثة بالفطرين *A.niger* و*A.flavus* كلٌ على حدة معنوياً على المعاملات الأخرى في أعداد البكتريا، اذ بلغت2.33×10^{12} و 2.37×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة /غم للحبوب الملوثة بلقاح الفطرين *A.niger* و*A.flavus* على التوالي ، في حين تراجعت اعدادها في التركيز5 و10 غم/كغم حبوب الى0.8×10^{12} و 1.37×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة /غم من الحبوب على التوالي للحبوب الملوثة بالفطر *A.niger* و 1.12×10^{12} و 1.39×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة /غم من الحبوب على التوالي الملوثة بالفطر *A.flavus* ، وكانت هنالك فروق معنوية في أعداد البكتريا بين هذين التركيزين وهذا يدل على أن زيادة تركيز المستحضر المستعمل يؤدي الى زيادة أعداد البكتريا على الحبوب. ومن خلال نتائج تقدير أعداد البكتريا على حبوب الذرة بعد مرور ستة أشهر من تأريخ الخزن ظهر عدم وجود تغير في أعداد البكتريا وحيويتها مما يعطي انطباع أن المستحضر الحيوي يستطيع تحمل الخزن لمدة لاتقل عن ستة أشهر .

هذه النتائج متوافقة مع عدد من الدراسات التي أكدت على قدرة المستحضرات الحيوية المصنعة من جنس البكتريا *Bacillus* على تحمل ظروف الخزن الطبيعي ومحافظتها على فعاليتها البايولوجيه لفترة زمنية طويلة قد تصل الى اكثر من سنتان وهذا يعود الى قدرة هذا الجنس على تكوين ابواغ داخلية Endospores مقاومة للظروف البيئية القاسية في اثناء عملية الخزن (عبود،2005؛ الجميلي وجماعته، 2007 b) و تمتلك هذه البكتريا القدرة على مقاومة الظروف البيئية الاخرى مثل الحموضة والقاعدية و الازموزية والاكسدة والحرارة وتكون هذه المقاومة منظمة بالعامل سكما sigma الذي يتحفز عندما تتعرض البكتريا لمثل هذه الظروف (Bandow وجماعته،2002).

أن المادة الحاملة لها القدرة على المحافظة على خلايا البكتريا الخضرية وذلك من خلال توفيرها ظروفاً ملائمة من حيث خفض درجة الحرارة وخفض نسبة الرطوبة وذلك لتواجد البكتريا على سطوح حبيبات كاربونات الكالسيوم التي تقوم بذورها بامتصاص الرطوبة الموجودة في الهواء فضلاً عن قلة امتصاصها الحرارة من المحيط مما يوفر حرارة ملائمة للخلايا الخضرية وتمنع جفافها (قاسم ،1998 ؛ حميد ،2001).



الشكل (1): تأثير تراكيز المستحضر الحيوي في أعداد البكتريا المتواجدة على اسطح حبوب الذرة الصفراء المعاملة بالمستحضر الحيوي و الملوثة بالفطر *A.niger* المخزنة لمدة3 و 6 أشهر .



الشكل(2): تأثير تراكيز المستحضر الحيوي في أعداد البكتريا المتواجدة على اسطح حبوب الذرة الصفراء المعاملة بالمستحضر الحيوي و الملوثة بالفطر *A.flavus* المخزنة لمدة 3 و 6أشهر.

تأثير التراكيز المختلفة للمستحضر الحيوي في نسب إصابة حبوب الذرة الصفراء بالفطرين *A.niger* و *A.flavus* بعد مرور (3و 6) أشهر من الخزن:

بينت النتائج الموضحة في الجدول (2) كفاءة التراكيز المختلفة للمستحضر الحيوي في خفض نسبة الاصابة بالفطرين *A.flavus* و *A.niger* في الحبوب المعاملة بعد انتهاء مدة التخزين الممتدة لثلاثة أشهر ، إذ بلغت نسب الاصابة بالفطر *A.niger* 50% و 0% و 0% للتراكيز 5 و 10 و 20 غم /كغم على التتالي، و اختلفت معنويا عن معاملة السيطرة التي كانت نسبة الاصابة فيها 80 % . اما الفطر *A.flavus* فقد بلغت نسبة الاصـــــابة 35 % و 0% و0% للتراكيز 5 و 10 و 20 غم /كغم على التوالي ، و كان الاختلاف معنوياً عن معاملة المقارنة التي كانت نسبة الاصابة فيها 70%.

وبعد مرور 6 أشهر من خزن الحبوب حدثت زيادة في نسبة الاصابة في الحبوب المعفرة بالمستحضر الحيوي والملوثة بلقاح الفطرين *A.flavus* و*A.niger* حيث ارتفعت النسبة من 0% الى 5 و15% على التوالي في الحبوب المعاملة بالمستحضر وبتركيز 20غم/كغم حبوب ومع ذلك تُعدُّ هذه النسبة منخفضة كثيراً عن 95% والملوثة بلقـــــاح الفطرين *A.niger* و*A.flavus* على التوالي (جدول 4).وبالرغم من حدوث أرتفاع في نسب الاصابة للحبوب لكن المظهر الخارجي للحبوب يوحي أنها سليمة وهذا ماأثبتته الصور (3و4) .ويبدو أن الاصابة موجودة ولكنها مكبوحة بحيث لم تؤثر كبيراً على صفات الحبوب.

ان قدرة المستحضر الحيوي بتراكيـــــزه المختلفـــة وخاصة 10 و20غم/كغم علـــى توفير حماية قد تعود اساســـــا الى قدرة البكتريا على افراز مضـــــادات فطرية Antifungal تعمل على تثبيـــــــــــط انبات ونمو الابواغ للفطـــــــرين *A.flavus* و *A.niger* مما يؤدي الى تقليـــــــل او منع حدوث الاصابات الفطرية للبذور وخاصـــــة عند ارتفاع الرطوبة النسبيـــــة في المخازن التي لاتتوفـــــر فيها شروط الخـــزن السليـم في اثناء فصل الشتاء حيث تنمو هذه البكتريا على اسطح الحبوب وتحصل على غذائها من نواضح الحبوب فتقوم بأنتـــــاج المضادات الفطريـــــة والانزيمات المختلفة (Garcia وAngeles،1994)،فالبكتريا *B. subtilis* لها القدرة على انتاج العديد من الانزيمـــــــات الحالة Lytic enzymes التي تقوم بتحليـــــل العديد من المركبات البوليمريـــة كالمركبات البروتينيـــــة والدهون والمركبات النشوية والكايتينيـــة ومنها انزيم chitinase المحللة لمادة الكايتين التي تُعدُّ المكون الاساسي لجـــــدران خلايا معظم الفطريـــــات الراقية ومنها الفطريات الناقصـــــة (Prakash و Podil ،1996) وانزيم Lecithinase الفعـــال في تحليل الدهون الفوسفاتية (Gill ،1982) كذلك هذه البكتريا لها القـــــدرة على ايقاف نشاط الفطريات المتواجدة على سطح الحبوب بفعل المضــــــــــادات

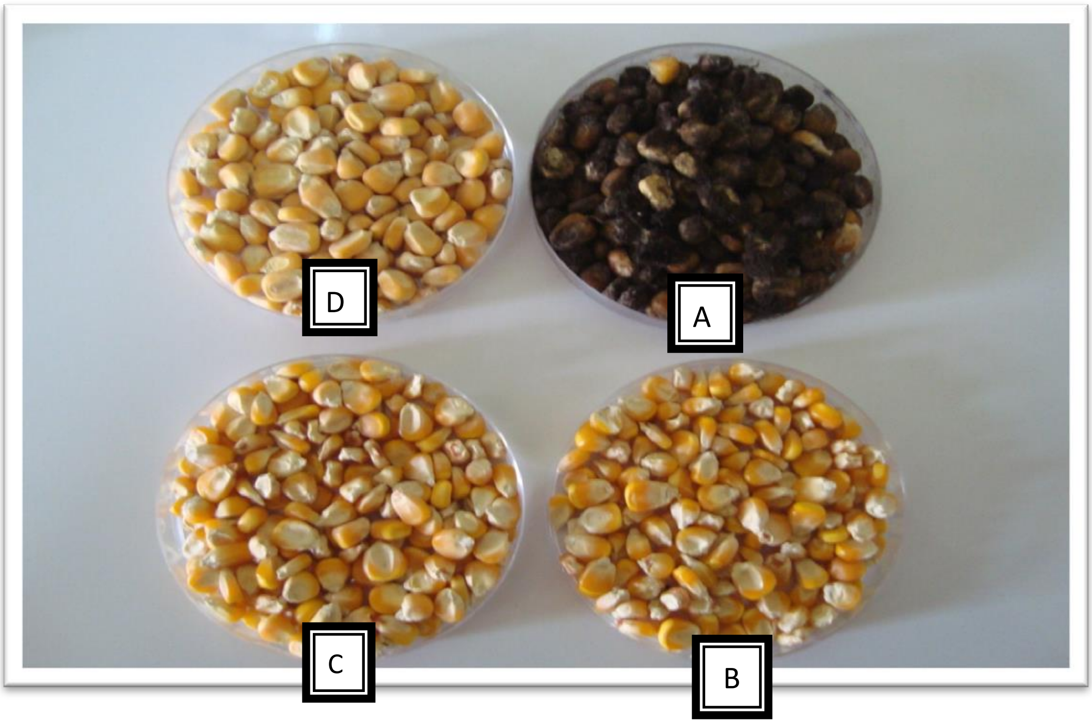
الفطرية التي تفرزها للبيئـــة ومن ابرز هذه المضادات (Iturin A) ذوالفعالية العاليـــــة في كبح نمـــــــــو ونشـــاط الفطر *A . parasitica*

وشل قدرته على انتاج الافلاتوكسينــــــات (Ono و Kimura،1991). و وجد Kararah وجماعته (1985) ان بكتريا *B.subtilis* فعالية في تثبيـــط نمو العديد من الفطريات الاقتصاديـــــة وخاصة *Aspergillus spp*. فضــــلا عن قدرة هذه البكتريا على منافســـــة الكائنات الاخرى على الغـــذاء والمكـــان من خلال قدرتها العالية على استغلال مكونات وســـط الغذاء التي تنمـــو عليــه وسرعة تكاثرها (الجميلي ومزهـــــــــر ،2008)

لمادة كاربونات الكالسيــــوم اثر في تثبيط نمو الفطريات المخزنيــة ومنها *A.flavus* و *A.niger* من خلال قدرتها على خفض المحتـــوى الرطوبي للبذور الى المستوى الذي يمنع انبات وتطـــــور ابواغ الفطريات (Siriacha وجماعته ،1989) اذ أن لهذه المادة القدرة على امتصاص الرطوبة من خلال أختلاف السعات الرطوبية بينها وبين الحبوب . حيث انها لاتتميأ بسهولة (الكبيسي ،1989) . و أن النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة تتماشى مع النتائج التي ذكرها Calori-Dmingues و Fonseca (1995) بأنه كلما كانت المادة المضافة كفـــــوءة في خفض المحتوى الرطوبي للحبوب المخزونة فأنها تكون فعالـــــة في حمايتها من الاصابات الفطـــرية .

الجدول (2):تأثير تراكيز المستحضر الحيوي في نسب إصابة حبوب الذرة الصفراء بالفطرين A.niger و A.flavusبعد مرور(3و 6) أشهر من الخزن .

نوع الفطر	تركيز المستحضرالحيوي (غم/كغم)	نسبة الاصابة (%) بعد مدة خزن	
		(3) أشهر	(6) أشهر
A.niger	0	80	100
	5	50	60
	10	0	15
	20	0	15
A.flavus	0	70	95
	5	35	40
	10	0	10
	20	0	5
$L.S.D_{(0.05)}$		12.8	25.8



صور(3): تاثيرالمستحضر الحيوي بتراكيز مختلفة في اصابة الحبوب بالفطر *A.niger* بعد مرور (6) أشهر من الخزن . A - المقارنة B- تركيز(5 غم /كغم)
C- تركيز(10 غم /كغم) D- تركيز(20 غم /كغم).

صور(4): تاثير المستحضر الحيوي بتراكيز مختلفة في أصابة الحبوب بالفطر *A.flavus.* بعد مرور (6) أشهر من الخزن .

A - المقارنة B- تركيز(5 غم /كغم)
C- تركيز(10 غم /كغم) D- تركيز(20 غم /كغم).

المصادر :-

الجميلي ، سامي عبد الرضا ، ثامر خضير مرزة و الاء عبد علي الخفاف (a2007). تقييم كفاءة المبيدين الحيويين فلوراميل والباسلين على مرض نقص وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Pythium aphandermatum* لنبات الخيار في الحقل . مجلة جامعة كربلاء العلمية . المجلد (5) العدد (الاول).

الجميلي ، سامي عبد الرضا وعلي جابر عاشور وسناء غالي جبر (b2007). أمكانية أنتاج مستحضر حيوي من لقاح بكتريا *Bacillus cereus* للسيطرة على مرض سقوط البادرات المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* . مجلة جامعة كربلاء . المجلد الخامس . العدد الثالث.

الجميلي ، سامي عبد الرضا وموسى نعمة مزهر (2008). تأثير عنصري البورون والمنغنيز في نمو البكتريا *Bacillus cereus* وقدرتها على انتاج الهرمونات .المؤتمر العلمي الاول للعلوم الصرفة والتطبيقية لجامعة الكوفة . 13-14.

حميد، سميرة كاظم ،(2001). تقنية مستحدثة في إنتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة البكتريا *Pseudomonas fluorescens* CHAO . رسالة ماجستير. كلية العلوم-جامعة الكوفة. 66 صفحة.

شعبان، عواد و نزار مصطفى الملاح(1993). المبيدات. دار الكتب للطباعة و النشر-جامعة الموصل. 520صفحة.

عبود، بسعاد عبد زيد (2005). دراسة امكانية تصنيع مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *Bacillus thuringiensis* لمقاومة حشرة من الخوخ الاخضر (Myzus persicae (sulzer. رسالة ماجستير. كلية العلوم-جامعة الكوفة. 76 صفحة.

قاسم ، منال محمود(1998). دراسة كفاءة كاربونات الكالسيوم و مستخلص سلالة البكتريا *Pseudomonas fluorescens pf5* في حماية حاصل الذرة الصفراء من الإصابة بالفطر *Aspergillus flavus* L. و التلوث بسموم الافلاتوكسينات B1 ، B2 في المخزن. رسالة ماجستير. كلية الزراعة- جامعة البصرة. 58صفحة.

الكبيسي ، نوري حمد ارزيك (1986) . تأثير كاربونات الكالسيوم على بعض صفات التربة الفيزيا وية والمعدنية . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة- جامعة بغداد .94 صفحة.

محسن ،عذراء حرجان(2006).دراسة التأثيرات السمية لبذور الحنطة الملوثة بالفطرين *flavus* و *A.niger* في الجهاز التناسلي لاناث الجرذ الابيض و امكانية السيطرة عليها في المخزن .68 صفحة.

ميخائيل، سمير و تركي بيدر(1982). أمراض البذور. دار الكتب للطباعة و النشر- جامعة الموصل. 190صفحة.

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology**.** 18: 265-267.

Bandow, J.E. ; Br-tz, H. and Hecker, M. (2002).*Bacillus subtilis* Tolerance of Moderate Concentrations of Rifampin Involves the B-Dependent General and Multiple Stress Response. Journal of bacteriology. 184(2): 459-467.

Calori-Domingues , M.A. and Fonseca, H . (1995). Laboratory evaluation of chemical control of aflatoxin production in unselled peanuts (*Arachis hypogarca* L.) .Food additives and contaminating .12:334-350 .

Clark , F. E.(1965). Ager-plants methods for microbial (C.F:Black ,1965 methods of soil snslysis .part 2 publisher madeson ,wisconsing UAS .Pp1572).

Charles ,W.B ; Yates , I.E. ; Hinton ,D.M. and Meredith ,F.(2001).the potential impacts of climate variability and change on air pollution related health effects in the United States .Enviromnental Health perspectives supplements .109(2).

Cocker ,R.D. ; Jones,B.D. ; Nagler ,M.J. ; Gillman ,G.A. ; Walbridge ,G.A. and Pangrahi ,A.J.(1984). Mycotoxin training manual. Tropical development and research institute overseas development administration. pp.35.

Collee , J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology. Mackie & MaCarthey, Pearson professional limited. 14^{th} ed.

Dal- Soo, K. ; James , R.C. and David, M. W. (1997) . Biological control of three root diseases of Wheat grown with reduced Tillage .agricultural research service. Journal of the American Society phytopathology .87(5): 551-558.

Doyle , M.P. ; Applebaum, R.S. ; Brackett, R.E. and Marth, E.H. .(1982) . Physical , Chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities . Journal of food prot . 45(10) : 954-971.

Garcia, R.P. and Angeles, O.R. (1994). Potential use of microbial isolates against *Aspergillus* growth and aflatoxin formation in corn feed stuff. Journal of biotechnology, (Philippines). 5:158-161.

Gamliel,A. and Katan ,J.M.(1992). Chemotaxis of fluorescent pseudomonads towards seed exudates and germination seed in solarized soil .phytopathology .82:328-332.

Gill, D.M. (1982). Bacterial toxins: A table of lethal amounts. Microbiol. Rev. 46:86-94.

Kazmar , R.E ; Robert , M.G. (2000). Regression Analyses for evaluating the influence of *Bacillus cereus* on Alfalfa Yield under variable disease intensity . American Journal of plant pathology . 90 : 657-665.

Kinsinger, R.F.; Shirk, M.C.; and Fall, R. (2003). Rapid surface Motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. Journal of Bacteriology. 185: 5627–5631.

Krebs ,C.J.(1978). Ecology : The experimental analysis of distribution and abundance Harper and Row publisher ,New York.

Laura , A.S and Eric , V.S. (1998) . Target range of Zwittermicin A , an amino polyol antibiotic from *Bacillus cereus* .Current Microbiology . 37: 6-11.

Leben ,S.D.;Wadi,J.A. and E Aston ,G.D.(1987). Effect of Pseudomonas floouresns on ptotato plant growth and control of Verticillium dahlia phytopathology.77:1592-1595.

Moyne , A.L; Shellby ;Cleveland ,T.E. and Tuzun ,S.(2001). Bacillomycin D : an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus* .Journal Microbiology .90:622-629.

Ono, M. and Kimura ,N.(1991). Antifungal peptides produced by *Bacillus subtilis* fot the biological control of aflatoxin contamination .Japan Association of mycotoxicology .34:23-28 .

Prakash,A.P. and Podil ,A.R.(1996). Lysis and Biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1,candin Journal of Microbiology .42(6):533-8.

Raper , K.B. and Fennel ,D.I.(1965). The genus *Aspergillus* Williams and Wilkins company . Baltimore .pp :686.

Siriacha, P. ; Kawashima, K. ;Kawasngi, S. ; Saito, M. and Tonboon-EK, P.(1989). Post harvest contamination of Thai corn with *Aspergillus flavus* **.** Journal of Cereal chemistry. 66(6):445-448.

Tamehiro, **N.; Okamoto-Hosoya, Y.; Okamoto, S.; Ubukata, M. ; Hamada, M.; Naganawa, H. and Ochi, K. (2002)** Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrob Agents Chemother. 46**:** 315–320.

Yuming, B. ; Xiaomin , Z. and Donald , L. S . (2003) . Enhanced soy bean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum* . Candin Journal of crop science. 43 :2-13 .

Abstract

This study aim at to evaluation of the efficiency of (Bio- formulation of bacteria ***Bacillus subtilis*** in protection of ***Zea mays L***. seeds from the infection of ***Aspergillus niger*** and ***Aspergillus flavus*** during stroing and effect of this (Bio- formulation) to improving the germination of treated seeds and the result plant .

The Bio- formulation shows singnificant effect in inhibition of the growth of both fungi on PDA media at the percentages of 94.4% and 99.8% in spotting method, The results showed that the Bio- formulation have higher protection agant infection of both fungi (***A.niger*** & ***A.flavus***) under natural storage condition for six months at the percentages of 85-95% respectily.

On the other hand the study shows the presence of ***B. subtilis*** cell in high vital state on the seeds surface treated with incuolum of the two fungi in spite of long storing priod that last for six month and their number up 2.33×10^{12} and 2.37×10^{12} colony forming unit/gm of seeds constantly at the concentration of 20 gm/kg .