مجلة جامعة بنغازي العلمية

http://journals.uob.edu.ly/sjuob

دراسة سيرولوجية باستخدام البكتيروفاج في الكشف عن البكتيريا *Pectobacterium carotovorum* في أنسجة البصل المصابة والتربة المحيطة بها

نجاة ادريس عمر [1] * أمال عاشور محمد [1]

1 مركز البحوث الزراعية والحيوانية -ليبيا

تاريخ الاستلام: 08 / 04 / 2022 تاريخ القبول: 04 / 06 / 2022

الملخص:

أجريت هذه الدراسة لمكافحة البكتيريا المسببة لمرض العفن الطري على البصل*Pectobacterium carotovorum* وذلك باستخدام البكتيريوفاج حيث عُزِلت البكتيريا من البصل المصاب وعُزِل البكتيريوفاج من التربة الرطبة المحيطة بالبصل المصاب واخْتُبِرَت فعاليته ضد هذه البكتيريا وعُمِلَ اختبار سيرولوجي للبكتيريوفاج وذلك بحقنه في أرنب أبيض نيوزيلندي وكذلك كُشِفَ عن البكتيريوفاج في الأنسجة النباتية المصابة وأيضا أمكن تمييز هذا الفاج من بين مجموعة من الفيروسات من خلال اختبار الإليزا. وأوضحت النتائج أن الفاج المعزول والمصاحب للبكتيريا *Pectobacterium carotovorum* أعطى فعالية ضد البكتيريا على البيئات الغذائية في المعمل ومن خلال الاختبارات السيرولوجية تبين أنه يمكن إنتاج أجسام مضادة بعد حقن الفاج في جسم الأرنب مع إمكانية الكشف عن الفاج المصاحب للبكتيريا في الأنسجة النباتية المصابة والتربة المحيطة بالبصل المصاب.

الكلمات المفتاحية: البصل، العفن الفطري، البكتريوفاج، اختبار الاليزا.

Abstract

The study was done to detect the bacteria that cause soft rot on onions which called (*Pectobacterium carotovorum*) This was done by using bacteriophage, where the bacteria were isolated from the infected onion and the bacteriophage was isolated from the moist soil surrounding the infected onion to test the efficacy of Bacteriophage against these bacteria. A syrological test was done for bacteriophage by inject it on NewZealander white rabbit. Bacteriophage was detected in the infected tissues of onions, and it was also possible to distinguish it from a group of viruses by ELISA test. It was found that the associated bacteriophage with *Pectobacterium carotovorum* was effective against these bacteria in the laboratory food environment. And it was found that its possible to product antibiotics in the rabbit's body after inject it with bacteriophage through serological tests. It is also possible to detect bacteriophage associated with bacteria in onion tissues, as well as in the surrounding moist soil.

Keywords: onions, soft mold, bacteriophage, elisa test.

1. المقدمة:

يعد مرض التعفن الطري من أهم الأمراض التي تصيب العديد من النباتات بما في ذلك محصول البصل والعديد من المحاصيل الأخرى إذ يوجد المرض في المناطق الاستوائية والمعتدلة وهو من الأمراض التي تصيب النباتات في الحقل وفي أثناء التخزين مما يتسبب عنه خسائر كبيرة [1] ويُعَدّ هذا المرض أحد أكثر العوامل المحددة لإنتاج الخضروات وينتشر في جميع أنحاء العالم ويسبب فقداً كلياً للإنتاج إذا توافرت الظروف البيئة الملائمة كما في خسائر الإنتاج الناتجة عن الإصابة بمرض التعفن الطري البكتيري المتسببة عن *pectobacterium carotovorum* قد تصل إلى مستويات عالية في مجموعة متنوعة من الأنواع النباتية [2] وللبكتيريا *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorium* مدى عائلي واسع إذ يصيب نباتات كثيرة مثل البصل، الجزر، الطماطم، الفلفل ، البطاطس، البطاطا الحلوة، الخيار، الموز، الذرة، القهوة، القطن، الفاصوليا، الكرفس [3]. كما أشار [4] إلى أن البكتيريا *Pectobacterium carotovorium* تصيب نبات الملفوف في الصين ويسبب خسائر كبيرة كما وجد أن هذا النوع يهاجم نبات الفلفل الحلو في الحقول التجارية في جنوب جورجيا في الولايات المتحدة كما أن هذا النوع من البكتيريا يصيب أشجار الكمثرى وتسبب خسائر في الإنتاج في البرازيل كما أن هذا النوع من البكتيريا يصيب أشجار الكمثرى وتسبب خسائر في الإنتاج في البرازيل[5].

* للمراسلات إلى: نجاة ادريس عمر
البريد الإلكتروني:
Njatalbrsy88@gmail.com

إن طرق سلامة الأغذية التقليدية فعال جزئياً فقط ويتم في حالات استخدام طرق قوية ومبالغ فيها لتدمير البكتيريا مسببات الأمراض[6] ومن ضمن الطرق الجديدة نجد أن البكتيروفاجات تُعَدّ من مضادات الكيكروبات الطبيعية التي يمكن استخدامها في السيطرة على مسببات الأمراض البكتيرية في الأطعمة [7] ويمكن استخدام البكتيروفاجات للسيطرة على مسببات الأمراض في الغذاء وفي مكافحة ما قبل الحصاد للفواكه والخضروات واستخدام هذه التقنية للوقاية والحد من الاستعمار والأمراض.

كما أن حقن بروتين فيروسي أو أي بروتين غريب آخر (هذا البروتين يسمى أنتجين) في الحيوانات الثدية مثل الأرنب هذا الأنتجين يؤدي إلى ظهور مواد في سيرم الدم هذه المواد تسمى أجساماً مضادة التي تتفاعل تخصصياً نوعياً مع الأنتجين المحقون .إن الفيروس والجسم المضاد الذي كونه تتفاعل مع بعضها بعضاً بعدة طرق والطريقة الأكثر شيوعاً هي تفاعل الترسيب[8] والأضداد Antibody هي بروتينات ينتجها جسم الكائنات الفقارية ردَّ فعل لدخول مركبات غريبة إليه تدعى مولدات الأضداد أن تتفاعل بشكل نوعي مع مولدات الأضداد التي حرضت على تكوينها. تتكون الأضداد في النسيج الليمفاوي. وتعد الكريات البيضاء أهم مضاد للأضداد كما تقوم البالعات الكبيرة [9] وفي هذه الدراسة حُوّرت الطريقة بحقن البكتيروفاج المحللة للبكتيريا المسببة للعفن الطري على البصل ***Pectobacterium carotovorum*** في أرنب أبيض اللون.

2. المواد وطرق البحث

عزل البكتيريا المسببة للعفن الطري على البصل Pectobacterium carotovorum

جمعت عينات من البصل التي تظهر عليها أعراض الإصابة بالعفن الطري (soft rot) من الأسواق بمدينة البيضاء وأجريت عمليات العزل من

©2022 جامعة بنغازي. جميع الحقوق محفوظة. الرقم الدولي/ الإلكتروني: 2790-1637، الورقي: 2790-1629. رقم الإيداع القانوني: 2018/154 دار الكتب الوطنية

العينات عند وصولها للمعمل مباشرة ، حيث غسلت العينات بالماء لإزالة الأتربة العالقة بواسطة مشرط معقم أخذت قطعة من المنطقة الواقعة بين النسيج السليم والمصاب ووضعت في طبق بتري(Petri dish) معقم يحتوي على 3 ملي ماء مقطر معقم ثم تركت لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة الغرفة ، وأُخِذَ جزء من المعلق الناتج بواسطة الإبرة ذات العقدة (Inoculating Loop) وخُطِّطَ على بيئة الأجار المغذي(Nutrient agar) ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة°28 لمدة 48 ساعة [10].

النمو على البيئة King B :

لقحت البيئة (King B) التي وصفها [11].بمزرعة بكتيرية حديثة ، ثم حضنت على درجة حرارة 28 ْم لمدة يومين ، ووصفت بعدها المستعمرات النامية مع ملاحظة تكون الصبغات من عدمها لتمييزها عن عزلات البكتيريا *Pseudomonas* التي تفرز صبغات متوهجة على هذه البيئة

3. الصفات العامة والشكلية:

شكل الخلايا وترتيبها وصبغ جرام:

أجرى هذا الاختبار وفقاً للطريقة التي أشار إليها [9] لتحديد إيجابية البكتيريا أو سلبيتها لصبغة جرام من خلال تحضير غشاء بكتيري (bacterial smear) للعزلة البكتيرية على سطح شريحة جافة نظيفة وتجفيفه وتثبيته ثم الصبغ، بصبغة جرام، ظهور الخلايا باللون الأحمر يدل على سالبيه الاختبار، والبنفسجي يدل على إيجابيته، مع وصف شكل الخلايا وترتيبها.

دراسة حركة الخلايا:

استخدمت طريقة القطرة المعلقة (hanging drop) لفحص حركة الخلايا وتحديدها، وذلك بوضع ملء الإبرة ذات العقدة من المعلق البكتيري في مركز غطاء الشريحة ووضع نقاط من كندا بلسم (canda balsam) على كل زوايا الغطاء ، ثم ثبتت الشريحة على الغطاء للحصول على قطرة من المعلق البكتيري معلقة في وسط تجويف الشريحة ، وبعد ذلك فحصت الشرائح تحت الميكروسكوب لتحديد قدرة الخلايا على الحركة .

تحضير اللقاح البكتيري:

نميت البكتيريا على سطح الأجار المغذي بأطباق بتري، وبعد يومين من التحضين على درجة حرارة 28 ْم ، غمرت المستعمرات النامية بالماء المقطر المعقم ، وأزيلت المستعمرات بحذر بواسطة إبرة منحنية معقمة ، وجمع اللقاح في دورق ثم ضبط تركيز اللقاح البكتيري(bacterial inoculum) عند تركيز 10^8 وحدة مكونة للمستعمرة/مل باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer 6300) الذي يعادل (0.2) امتصاصية عند طول موجي 600 نانومتير [12] .

اختبار فرط الحساسية Hypersensitivity Test

أجري هذا الاختبار لمعرفة البكتيريا إذا كانت ممرضة للنبات أو غير ممرضة له حيث حقن اللقاح البكتيري من كل عزلة بواسطة إبرة الحقن(microsyringe) في أوراق التبغ صنف White Burley ووضعت النباتات بعدها تحت ظروف الصوبة الزجاجية، ثم فحصت الأوراق ب عد2 -3 أيام من الحقن لملاحظة ظهور بقع ميتة، مما يدل على حدوث تفاعل فرط الحساسية مع حقن أوراق بالماء المقطر المعقم للمقارنة.

اختبار القدرة الإمراضية على بصلة سليمة:

اسْتُخْدِمَتْ أبصال سليمة بعد تعقيمها سطحياً باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم1%(sodium hypochlorite) لمدة 5 دقائق ، وغسلت بعدها بماء مقطر معقم ، وتركت تجف تحت ظروف المعمل، ثم لقحت بمعلق لمزرعة بكتيرية حديثة (10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل) وذلك بعد إزالة جزء من البصل بواسطة ثاقب فليني ثم وضعت نقطة واحدة من المعلق البكتيري داخل الثقب ،وبعد كل معاملة غُطِّي الثقب بالجزء الذي سبق إزالته ،وأُحْكِمَ الغلق باستخدام شمع البرافين المنصهر ، مع حقن بصلة أخرى بماء مقطر معقم للمقارنة ، وحضنت الأبصال عند درجة حرارة 28 ْم لمدة 5 أيام ثم لوحظ بعد ذلك تطور الأعراض المرضية [13] .

اختبار القدرة الامراضية على شرائح درنات بطاطس:

أخذت درنات بطاطس سليمة وطازجة ، وغسلت جيداً بالماء لإزالة الأتربة العالقة بها وعقمت سطحياً كما سبق ، وبواسطة مشرط معقم تم نزع قشرة الدرنة وقطعت إلى شرائح سمك كل منها من 8 ملم وأحدثت حفراً في وسط الشرائح باستخدام ثاقب الفلين بمعدل حفرة واحدة في كل شريحة ، وأضيف اللقاح البكتيري إلى هذه الحفر، ثم وضعت الشرائح المحقونة بنفس العزلة في طبق بتري منعزل به ورقة ترشيح معقمة ومبللة بماء مقطر معقم بحيث لقحت شرائح، مع وجود شرائح محقونة بالماء المقطر والمعقم شاهداً، ثم حضنت على درجة حرارة 28 ْم لمدة 48 ساعة، لوحظ بعدها تطور الأعراض .

قبل إجراء هذا الاختبارات ولزيادة أعداد الخلايا البكتيرية تم تنمية العزلات البكتيرية على بيئة أجار الجلوكوزNGA [14].

اختبار أنزيم الاوكسيديز Oxidase Test :

لإجراء هذا الاختبار اتبعت الطريقة التي وصفها [15]وذلك بوضع ورقة ترشيح رقم (1) في طبق بتري وأضيف إليها قطرات من المحلول المائي للكاشف Tetra methyl paraphenylene diamine(1% dihydrochloride) المحضر حديثاً وأخذ ملء الإبرة ذات العقدة من مزرعة بكتيرية حديثة ووضع على ورقة الترشيح المشبعة بالكاشف ، عدم تكون لون بنفسجي خلال 10 ثوان دليل إيجابية الاختبار .

اختبار أنزيم الكتاليز Catalase Test :

مزجت كمية من محلول فوق أكسيد الهيدروجين(H_2O_2)بتركيز 3% في أنبوبة اختبار معقمة مع مقدار معين من النمو البكتيري لمزرعة حديثة بواسطة الإبرة ذات العقدة ولوحظ تصاعد فقاعات هوائية الذي يشير إلى قدرة البكتيريا على إنتاج هذا الأنزيم [16] .

استخدام أشرطة Api20 في إجراء الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيميائية :

أمكن إجراء بعض الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيميائية باستخدام أشرطة Api20 (Biomerieux - France) تبعاً لما ذكره الباحثان [17]حيث حضر معلق من العزلة البكتيرية المختلفة في محلول 0.85 % كلوريد صوديوم (Saline) ثم حقن المعلق في شريط Api20 وحضن على درجة حرارة 28ْم لمدة 48 ساعة ثم بعدها الكشف على نتيجة الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيميائية للعزلات المختلفة وقد اشتملت هذه الاختبارات الكشف على نشاط إنزيم بيتا جلاكتوسيديز وإنزيم ديكربوكسيليز وإنزيم اورنيثين ديكربوكسيليز وإنزيم اليوريز و إنزيم الجلاتينيز وإنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين والأندول واختزال النترات. كما اختبرت مقدرة العزلة البكتيرية على استخدام بعض السكريات والمواد الكربوهيدراتية مصدراً للكربون مثل الأرابينوز ، الأنيوسيتول ، الدكسترين ، الأدينيتول ، المانيتول ، التريهالوز ، الرابيوز ، المانوز ، السكروز والجلوكوز وكذلك اختبرت مقدرة العزلة البكتيرية على استخدام السترات وإنتاج الأسيتون .

عزل البكتيريوفاج من التربة المحيطة بالبصل المصاب:

أخذ 20 جم من تربة رطبة تحت نباتات مصابة ووضعت في دورق يحوي 50ملي من المرق المغذي رجت العينة جيداً ثم تركت حتى ترسبت حبيبات التربة.

أخذ المعلق ورشح بورق الترشيح ثم بمرشحة شكل (5) مزج واحد ملي من الراشح مع واحد ملي من معلق بكتيري كثيف ثم نشره على طبق بتري يحتوي بيئة مغذية LPGA أُزيلَت الكمية الزائدة من المعلق بواسطة ماصة باستور، ثم ترك الطبق في مكانه حتى امتصت البيئة ما تبقى من سائل المعلق. حضن الطبق على درجة 28ْم الملائمة لنمو البكتيريا لمدة 24 ساعة

©2022 جامعة بنغازي. جميع الحقوق محفوظة. الرقم الدولي/ الإلكتروني: 1637-2790، الورقي: 1629-2790. رقم الإيداع القانوني: 2018/154 دار الكتب الوطنية

[8]

تحضير مصل مضاد للبكتيريوفاج

سُحِبَ دم من الأرنب قبل حقنه لاستخدامه مصلاً عادياً ثم بعد ذلك حقن الفاج في أرنب نيوزيلاندي بعد أن أخذ تركيزه بقياس الامتصاصية عند امتصاصية 0.4 على الطول الموجي 600 نانوميتر وبعد ذلك مزج المعلق بنفس الكمية من الزيت Adjuvaut حيث حقن الأرنب بفاصل 5 أيام بين الحقنة والأخرى مع زيادة حجم الحقنة من البكتيروفاج (0.5، 1.0، 1.5) بعدها جمع المصل بمقدار 5-10 ملي على فترات بعد يومين من آخر حقنة ثم بعد 5 أيام من السحبة الأولى و5 أيام من السحبة الثانية من الأرنب عن طريق جرح الوريد الحافي للأرنب وعلم كل مصل وتركيب الأمصال في كل مرة تجمع منها في المعمل لمدة 2-3 ساعات على درجة حرارة الغرفة ثم نقلت بعدها إلى الثلاجة على درجة حرارة 4مْ لمدة ليلة كاملة أجري بعدها الطرد المركزي على سرعة 10000دورة لمدة 5 دقائق وأضيف إليها أزيد الصوديوم كونه مادةً حافظة ثم حفظت الأمصال الناتجة لحين الحاجة إليها.

اختبار أليزا غير المباشر لتحديد أفضل سحبة مصل مضاد.

أخذ من نفس المعلق المحتوي على الفاج الذي حقن في الأرنب بتركيز 0.4 عند الطول الموجي 600 نانوميتر.ووضع 100ميكروليتر منه في كل حفرة من الطبقين ليلة كاملة على درجة حرارة 4مْ وفي اليوم الثاني غسل الطبقين 3 مرات حتى الطفؤ لمدة 3 دقائق بين الغسلة والأخرى بحلول (phosphate buffered salina Tween PBST) وحضر بعد ذلك أربعة عشر تخفيفاً من جميع سحبات المصل المضاد للأرنب والمصل العادي (2، 5، 5)أيام كالتالي1: 100، 1: 200، 1: 400، 1: 800، 1: 1600، 1: 3200، 1: 6400، 1: 12800، 1: 22600، 1: 51200، 1: 102400، 1: 204800 ، 1: 409600، 1: 819200. في المحلول المنظم 2% من مادة Polyvinyl pyrolidne و 2% Bovine serum albumin(BSA) أضيف 100 ميكروليتر من كل تخفيف لسحبات المصل العادي والمصل المضاد ثم حضن الطبقين على درجة حرارة 4مْ ليلة كاملة ثم غسل الطبقين بعد ذلك بمحلول PBSTثلاث مرات حتى الطفؤ ثم أضيف 100 ميكروليتر لحفر الطبقين من الأجسام المضادة المتعددة الكلون Lmmuno gamma Globulin(IgG) المنتجة في أجسام الماعز ضد مصل الأرنب المرتبطة بإنزيم الفوسفاتيز القلوي (Sigma No 3937) بعد تخفيفه 1: 20000 في محلول المصل وحضن عند 37مْ لمدة ساعة واحدة ثم غسل الطبقين بمحلول PBST وأضيف بعد ذلك لكل حفرة من الطبقين 100 ميكروليتر من التفاعل لإنزيم Paranitri Phenyl 0.5% mg/ml Phosphate في pH 9.8 10% diethanolamine buffer وحضنت الأطباق على درجة حرارة المعمل لمدة نصف ساعة ثم أخذت القراءة بواسطة جهاز الإليزا (Bio RAD Mode 550) عند طول موجي 450 نانوميتر

اختبار إليزا الغير مباشر للكشف عن وجود الفاج في أنسجة البصل المصاب ببكتيريا Pectobacterium Carotovorum والتربة المحيطة بالبصل المصاب.

جلب بصل مصاب وسليم وتربة محاطة ببصل مصاب ووزن 1 غرام لكل عينة ووضعت كل عينة من البصل في شاش ثم وضعت في أكياس نايلون وعلمت الأكياس. ثم وضع في الكيس 3 ملي من محلول منظم Carbonat beffer pH 9.6 0.05m وسُحقت العينات في الأكياس وأخذت العصارة من كل كيس أما عينة التربة فقد أخذ 1 غرام من التربة ووضعت في المحلول المنظم Carbonat beffer pH 9.6 0.05m رُشِّحَتْ بواسطة ورق ترشيح، ثم وضع 100 ميكروليتر من عصارة البصل السليم 4 حفر من طبق الإليزا ووضعت عصارة البصل المصاب في 4 حفر و راشح التربة في 4 حفر وحضن الطبق على درجة 4مْ ليلة كاملة بعد ذلك غسل الطبق 3 مرات بمحلول الغسيل PBST ووضع المصل بتركيز 1: 500 و 1: 1000 في 2% من مادة Polyvinyl pyrolidne و 2% Bovine serum albumin (BSA) ووضع 100 ميكروليتر في الحفر الأولى لكل منها التركيز الأول و100 ميكروليتر في الحفر الثانية لكل منها التركيز الثاني. وحضن الطبق ليلة كاملة ثم غسل الطبق حتى الطفو ثم أضيف 100 ميكروليتر للحفر من الأجسام المضادة المتعددة الكلون IgG وحضن على درجة حرارة 37مْ بتحوير طريقة [18].

4. النتائج

عزل المسبب المرضي:

من خلال عملية العزل التي أجريت على درنات البطاطس المصابة بأعراض العفن الطري أظهرت النتائج تكرار الحصول على عزلات ذات مستعمرات بيضاء ناعمة مستديرة لامعة على سطح الأجار المغذي (Nutrient agar)

الصفات العامة والشكلية

وقد أوضحت نتائج دراسة الصفات العامة والشكلية للعزلة البكتيرية التي سببت أعراض العفن الطري على البصل أن خلاياها عصوية الشكل سالبة لصبغة جرام متحركة وهذه الصفات العامة والشكلية تميز عدد كبير من البكتيريا الممرضة للنبات [16،19] .

اختبار فرط الحساسية:

أظهرت العزلة التي حقنت في أوراق نباتات التبغ أعراض فرط الحساسية بعد 48 ساعة حيث ظهرت على المناطق المحقونة أعراض الموت الموضعي (Necrosis) بينما لم يظهر على الأوراق المحقونة بالماء أي أعراض شكل (2).

اختبار القدرة الأمراضية:

اتّضح مقدرة هذه البكتيريا على إحداث أعراض العفن الطري فقد تطورت الأعراض خلال 5 أيام بظهور مناطق مشعة داكنة على الأبصال الكاملة، وبمرور الوقت ظهرت أعراض التحلل أو العفن الطري حيث تماثلت هذه الأعراض مع الأعراض النموذجية لمرض العفن الطري البكتيري على الخضراوات (شكل3)، الذي سبق وصفه بواسطة عدد من الباحثين[20،21]

أظهر اختبار القدرة المرضية على شرائح الدرنات إيجابية حيث تمثلت الأعراض بتحلل مائي وحدوث عفن على الشرائح المعداه، بينما لم تظهر أي أعراض على شرائح الشاهد (شكل4).

الخواص الفسيولوجية والبيوكيماوية

وأوضحت نتائج دراسة الخواص الفسيولوجية والبيوكيماوية أن جميع العزلات موجبة لاختبار الكتاليز واختزال النترات واختبار الأكسدة والتخمر وإنتاج غاز H_2S وإنتاج إنزيم بيتا جلاكتوسيدز واستخدام السترات وكانت سالبة لاختبار الأوكسيديز وإنتاج اليوريز وإنتاج الاورثنيين ديكربوكسليز واستطاعت جميع العزلات استخدام عدد من المركبات مصدراً للكربون مثل المانوز ، والجلوكوز ، والارابينوز ، والمالتوز ، واللاكتوز ، والتريهالوز هذه الخصائص تتفق مع ما ذكره [15،17،18].

كانت سالبة للإندول ولإنتاج مواد مختزلة من السكروز ولإنتاج أنزيم الفوسفاتيز واللاكتيز

©2022 جامعة بنغازي. جميع الحقوق محفوظة. الرقم الدولي/ الإلكتروني: 1637-2790، الورقي: 1629-2790. رقم الإيداع القانوني: 2018/154 دار الكتب الوطنية

جدول(1) يوضح الاختبارات الفسيولوجية البيوكيمانية للعزلات البكتيرية

الأختبارات	*Pectobacterium carotovorum*
اختبار الأوكسيديز Oxdase	-
اختبار الكتاليز Catalase	-
إنتاج كبريتيد الهيدروجين	+
انتاج انزيم بيتا جالاكتوسيديز ß- galactosidase	+
انتاج انزيم لوسين ديكربوكسيليز Lysine decarboxylase	-
انتاج انزيم أورنيثين ديكربوكسليز Ornithine decarboxylase	-
إنتاج الأندول	-
إنتاج إنزيم اليوريز	-
إنتاج النترات	+
استخدام السترات	+
اللاكتوز	+
المالتوز	+
السالبيوز	+
التريهالوز	+
الارابينوز	+
الادينيتول	-
الجلوكوز	+
المانوز	+

عزل البكتيريوفاج

جدول (2) يوضح اختبار إليزا غير المباشر لمعرفة أقل تركيز من المصل المضاد يمكن الكشف به عن الفاج

التخفيفات المستخدمة	الامتصاصية عند طول موجي 450 نانومتر		التفاعل
	المصل العادي	المصل المضاد	
100 : 1	0.944	2.0253	+
200 : 1	0.923	1.862	+
400 : 1	0.820	1.826	+
800 : 1	0.734	1.533	+
1600 : 1	0.543	0899	+
3200 : 1	0.453	0.765	+
6400 : 1	0.387	0.750	+
12800 : 1	0.299	0.458	+
25600 : 1	0.281	0.398	+
51200 : 1	0.132	0.366	+
102400 : 1	0.061	0.200	+
204800 : 1	0.025	0.100	+
409600 : 1	0.014	0.013	_
819200 : 1	0.012	0.009	_
1638400 : 1	0.012	0.010	_
3276800 : 1	0.005	0.003	_

لوحظ ظهور مساحات على الطبق المنمى عليه البكتيريا الممزوجة براشح البكتيريوفاج على سطح البيئة لا تغطيها البكتيريا وهي ناتجة عن تحلل البكتيريا بواسطة البكتيريوفاج شكل (6) وهذا يتفق مع ما أشار إليه [2]

اختبار أليزا غير المباشر لمعرفة أقل تركيز من المصل المضاد يمكن الكشف عن الفاج.

أظهرت نتائج اختبار الإليزا غير المباشرة للمصل المضاد في الجدول (2) فعالية في الكشف عن البكتروفاج باستخدام الأمصال المضادة ، مما يشير إلى أن ارتفاع نسبة الأجسام المضادة يزيد مع مرور الوقت حتى فترة معينة ثم يبدأ في التناقص وهذا يتفق مع ما ذكره [7] أن السحبة التي تعطي أعلى قراءات للإليزا هي التي تُعتمد في الكشف عن البكتروفاج أفضل تخفيف (Titer) للمصل المضاد اتضح أن التخفيف1 : 204800 هو أقل تركيزاً من المصل المضاد للبكتيروفاج يمكنه إعطاء تفاعل إيجابي شكل(7). وحيث إن التراكيز الأقل من ذلك أعطت نتائج سالبة فقد اختبرت في هذه الدراسة تخفيفات وصلت إلى 3276800:1، وهذا يؤكد ما أشار إليه كل من [21،22،23] من أهمية تحديد أقل تركيز يمكنه إعطاء تفاعل إيجابي لاختبار إليزا مما يقلل من استهلاك المصل المضاد.

اختبار إليزا غير المباشر للكشف عن وجود الفاج في أنسجة البصل المصاب ببكتيريا Pectobacterium carotovorum والتربة المحيطة بالبصل المصاب.

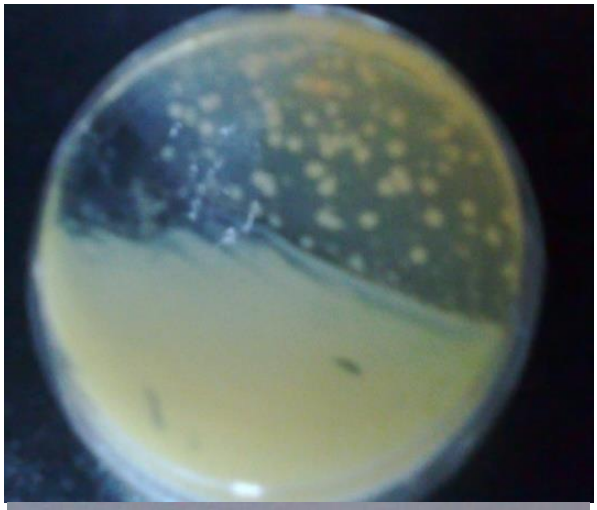
تم أمكانية الكشف عن الفاج المحلل للبكتيريا المسببة للعفن الطري على البصل في الأنسجة التي تظهر عليه أعراض الإصابة باستخدام الطرق السيرولوجية وقد أوضحت النتائج (جدول3) أن قراءة الامتصاصية بجهاز الإليزا في البصل المصاب هي الأعلى حيث سجلت عند التركيز 1: 500 (0.825) وعند التركيز 1: 1000(0.666) يليها قراءة التربة المحيطة بالبصل المصاب عند التركيز 1: 500 (0.650) وعند التركيز 1: 1000 (0.385) وقد كانت القراءات في الأنسجة المصابة والتربة أضعافاً مما في الأنسجة السليمة وهذا يؤكد فعالية المصل المضاد في الكشف عن الفاج في الأنسجة المصابة والتربة المحيطة بالبصل المصاب .شكل (8)

(+) موجبة التفاعل
(-) سالبة التفاعل

جدول (3) يوضح اختبار إليزا غير المباشر للكشف عن وجود الفاج في أنسجة البصل المصاب ببكتيريا *Pectobacterium carotovorum*والتربة المحيطة بالبصل المصاب

الأنسجة	التراكيز	المصل العادي	المصل المضاد
بصل مصاب	500 :1	0.180	0.825
	1000 :1	0.178	0.666
بصل سليم	500 :1	0.245	0.432
	1000 :1	0.235	0.267
تربة محيطة بالبصل المصاب	500 :1	0.254	0.650
	1000 :1	0.235	0.385

©2022 جامعة بنغازي. جميع الحقوق محفوظة. الرقم الدولي/ الإلكتروني: 1637-2790، الورقي: 1629-2790. رقم الإيداع القانوني: 2018/154 دار الكتب الوطنية



شكل (1) يوضح نمو البكتيريا *Pectobacterium carotovorum*

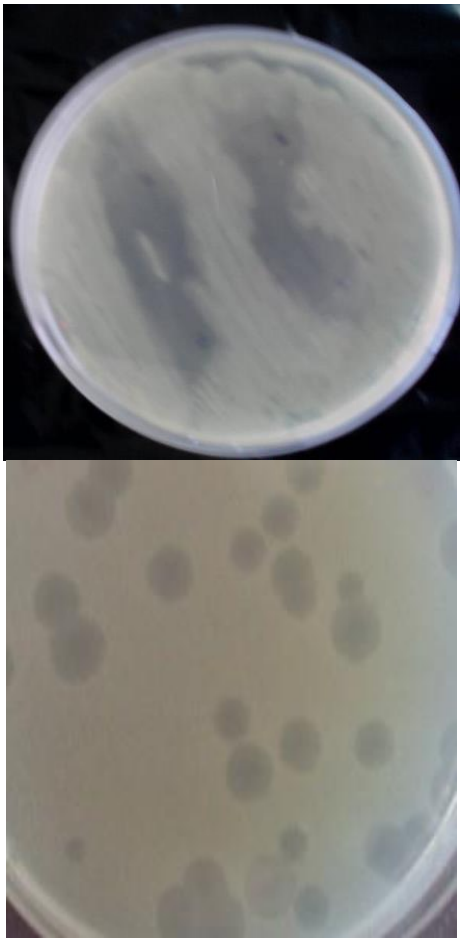
شكل (2) يوضح تفاعل فرط الحساسية على أوراق التبغ

شكل (3) يوضح القدرة المرضية للبكتيريا *Pectobacterium carotovorum*

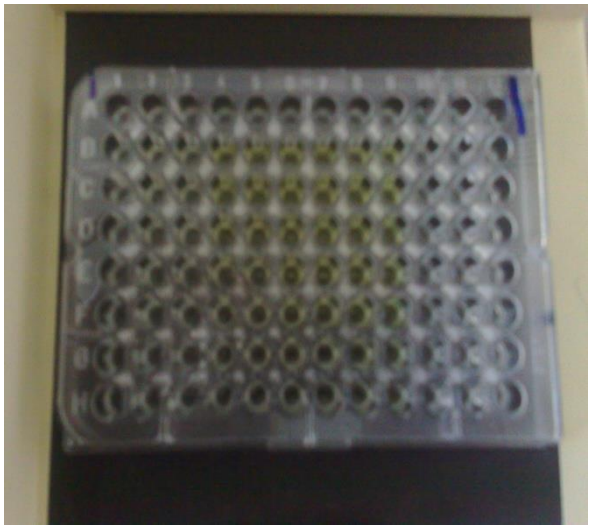
شكل (4) يوضح القدرة المرضية على شرائح البطاطس الملقحة بالبكتيريا *Pectobacterium carotovorum*

شكل(5) يوضح جهاز ترشيح البكتيروفاج

©2022 جامعة بنغازي. جميع الحقوق محفوظة. الرقم الدولي/ الإلكتروني: **2790-1637**، الورقي: **2790-1629**. رقم الإيداع القانوني: **2018/154** دار الكتب الوطنية



شكل(6) يوضح ظهور مساحات خالية من نمو البكتيريا *Pectobacterium carotovorum*



شكل (7) يوضح اختبار الإليزا للفاج المحلل للبكتيريا *Pectobacterium carotovorum*

شكل (8) يوضح الإليزا في الكشف عن البكتيريا *Pectobacterium carotovorum* في الأنسجة النباتية

5. الخلاصة

توجد هذه البكتيريا في جميع أنحاء العالم، وتسبب أمراضاً خطيرة تؤدي إلى خسائر كبيرة في الإنتاج أكثر من أمراض بكتيرية أخرى منها البكتيريا المسببة للعفن الطري المتسببة عن البكتيريا *Pectobacrium carotovorum* ، حيث تسبب خسائر كبيرة سنوياً في محصول البصل والبطاطس وغيرها من الخضراوات والفاكهة المخزنة ويعد مرض العفن الطري من الأمراض المنتشرة في ليبيا وذلك لانعدام الوسائل الحديثة للتخزين وعليه يرجى في البحوث اللاحقة تحقيق الآتي :

- تحديد حساسية بعض أصناف البصل وغيره من الخضراوات المدخلة حديثاً لليبيا للإصابة بالعفن الطري
- دراسة نشاط الإنزيمات البكتينية وإنزيمات الأكسدة والتغيرات في نفاذية الأغشية في الأنسجة المصابة والسليمة للأصناف المختلفة.

6. المصادر

1. Motyka-Pomagruk, A., Zoledowska, S., Sledz, W. and Lojkowska, E. The occurrence of bacteria from different species of Pectobacteriaceae on seed Potato plantations in Poland. European Journal of Plant Pathology, 2021, 159:309–325.
2. Oulghazi, S.; Sarfraz, S.; Zaczek-Moczydlowska, M.; Khayi, S., Ed-Dra, A., Lekbach, Y., Campbell, K., Moleleki, L. N., O'Hanlon, R., and Faure, D. Pectobacterium brasiliense: Genomics, Host Range and Disease Management .Microorganisms , 2021, 9(1):1-26.
3. Oztruk, M., Aksoy, H.M., Potrykus, M., and Lojkowska, E. Genotypic and phenotypic variability of Pectobacterium strains causing blackleg and soft rot on Potato in Turkey. Eur J Plant Pathol, 2018, 152: 143-55.
4. Araujo, L., Cardoza, Y.F., Duarte, V. and de Moraes, M. G. Pectobacterium carotovorum subsp. Actinidiae associated with canker on pear trees in Brazil.European Journal of Plant Pathology, 2021, 159:219-226.
5. Zaczek, M. Weber-Dabrowska, B. and Gorski, A. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118, pp. 537-556

©2022 جامعة بنغازي. جميع الحقوق محفوظة. الرقم الدولي/ الإلكتروني: 1637-2790، الورقي: 1629-2790. رقم الإيداع القانوني: 2018/154 دار الكتب الوطنية

6. Guttman, Y., Joshi, J. R., Chriker, N., Khadka, N., Kleman, M., Reznik, N., Wei, Z., Kerem, Z. and Yedidia, I. Cological adaptations influence the susceptibility of plants in the genus Zantedeschia to soft rot Pectobacterium spp.Horticlture Research, 2021, 8(13):1-12.

7. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J. and Diez-Gonzalez. International Journal of food Microbiologt, 2011, 45,pp. 37-4.

8. Agrios, G. N. Plant pathology .4th ed . Academic press , New York. 1979

9. أبو غرة ، م . أمراض النبات البكتيرية ،.منشورات جامعة دمشق . دمشق 1997. 432

10. Skerman, V. B. Aguide to the identification of the Genera of Bacteria 2nd edition . Baltimore, Maryland : Williams and Wilkins , 1967.

11. King, E. O., Word, M. K. and Raney, D. E. Two simple media for The demonstration of pyocyanin and fluorescein . Journal of Laboratory and Clinial Medicine, 1954, .44, 301.307

12. Van der Wolf, M. J. and Gussenhoven, G. C. Reaction of saprophytic bacterial from potato peed extracts and plant pathogerio bacteria in ELISA with antis acts to Erwinia chyrsanthemi (sero group O1 Ha) European Journal of Plant Pathology, 1992, 98: 33-44 .

13. Bourne, W., McCalmont, D. and Wastiem R. Assessing potato tubers for susceptibility to bacterial soft rot Erwinia carotovora subsp, atrosptcia. potato Research, 1981, 12: 409-15.

14. Parent, J., Lacroix, M., Page, D. and Vezina, L. Ientification of Erwinia carotovora from Soft ROT Diseased plants by Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis. Pant Disease, 1996, 80:494-499.

15. Kovacs, N. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaetion. Nature, London, 1965, 178-703 .

16. Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chan, W. laboratory guide for identification plant pathogenic bacteria . Apspress, 2001.

17. Lelliott, R. A, and Stead, D. E. Methods for diagnosis of plant pathogenic bacteria. Black well . Scientific Publication, London. 1987.

18. عمر، ع . ع. دراسات على اللفحة النارية على التفاح والكمثرى في منطقة الجبل الأخضر، جامعة عمر المختار. البيضاء. 2008،23 صفحة

19. Bradbury, J. F. Guid to plant pathogenic bacteria CAB international Mycological institute , Ferrylon , Kew surrey .England. 1986.

20. DeBoer, S.H, and Kelman, A. Influence of oxygen concentration and storage factors on susceptibility of potato tubers to bacterial soft rot Erwinia carotovora strins.j.Appl.Bacteriol. 1978, 63:487-495.

21. Dowson , W. J. Plant diseases due to bacteria .Combridge university press, 1957.

22. حموية ، ع . مكوك ، خ . دبس ، ب . والأحمد ، أ . إنتاج مصل مضاد مضاد متخصص Pseudomonas .syringae pv.pisi بالبكتيريا المسببة لمرض اللفحة البكتيريةعلى البازلاء في سوريا . مجلة وقاية النبات العربية. 1999، 17 : 26 -30 .

23. كيالي ، م . الأحمد ، أ . دبس ، ب . ومكوك ، خ . الأسعد ، س . قمري ،ص . وعطاء ، ن . إنتاج مصل مضاد متخصص للكشف عن البكتيريا المسببة لمرض التخطيط البكتيري في سوريا مجلة وقاية النبات 2004، 22: 72 - 76

24. أبوبكر ،ع .م .دراسات على مرض التبقع البكتيري على نبات الشماري . رسالة ماجستير ، أكاديمية الدراسات العليا . بنغازي. 2005،صفحة 84.

7. الملاحق

الملحق (1) الأوساط الغذائية

- **وسط الأجار المغذي (Nutrient agar)**

مستخلص لحم	3 جرام
ببتون	5 جرام
أجار	15 جرام
ماء مقطر pH 7.2	1000 ملتر

- **وسط King B**

Magnesium Sulfate	1.5 جرام
Pplipcptona	20 جرام
di-Potasio Hydrogen	1.5 جرام
Agar	14 جرام
ماء مقطر	1000 مللتر
جلسرين	10 مل

- **وسط LPGA**

ببتون	7 جرام
جلوكوز	7جرام
مستخلص الخميرة	7 جرام
أجار	15 جرام
ماء مقطر معقم	1000 مللتر

الملحق (2) المحاليل والصبغات

- **صبغة الجنسيان البنفسجي :**

محلول (أ) : جنسيان بنفسجي	1 جرام
ماء مقطر	100 ملتر
محلول (ب) : بيكربونات الصوديوم	1 جرام
ماء مقطر	20 ملتر

- **محلول اليود :**

يود	2 جرام
هيدروكسيد الصوديوم (1N)	10 ملتر
ماء مقطر	90 ملتر

- **صبغة السفرانين :**

محلول السفرانين	10 ملتر
ماء مقطر	100 ملتر

©2022 جامعة بنغازي. جميع الحقوق محفوظة. الرقم الدولي/ الإلكتروني: 1637-2790، الورقي: 1629-2790. رقم الإيداع القانوني: 2018/154 دار الكتب الوطنية

- **Washing Solution PBS Tween (PH 7.4) :**

NaCl	8 جرام
KH2HPO4	20 جرام
Na2HPO4	1.15 جرام
KCl	0.20 جرام
Tween	0.50 مل
NA azide	0.40 جرام
ماء مقطر	1000 ملتر

- **PBS-Tween-PVP-BSA**

PBS-Tween	200 مل
Soluble polyvinyl pyrolidone 2%	4 جرام
Bovine serum albumin 0.2%	0.4 جرام

©2022 جامعة بنغازي. جميع الحقوق محفوظة. الرقم الدولي/ الإلكتروني: **1637-2790**، الورقي: **1629-2790**. رقم الإيداع القانوني: **2018/154** دار الكتب الوطنية