

دراسة سيروولوجية باستخدام البكتيريوفاج في الكشف عن البكتيريا *Pectobacterium carotovorum* في أنسجة البصل المصابة والتربة المحيطة بها

نجاة ادريس عمر¹ * أمال عاشور محمد¹

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 عُزلت البكتيريا من البصل المصاب وعُزل البكتيريوفاج من التربة الرطبة المحيطة بالبصل المصاب واختُبرت فعاليته ضد هذه البكتيريا وعُمل اختبار سيروولوجي للبكتيريوفاج وذلك بحقه في أرنب أبيض نيوزيلندي وكذلك كُثِفَ عن البكتيريوفاج في الأنسجة النباتية المصابة وأيضاً 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 البينات الغذائية في المعمل ومن خلال الاختبارات السيروولوجية 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 الطري، البكتيريوفاج، اختبار الإليزا.

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 NewZealand 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] ويُعد هذا المرض أحد أكثر العوامل المحددة لإنتاج الخضروات وينتشر في جميع أنحاء العالم ويسبب فقداً كبيراً للإنتاج إذا توافرت الظروف البيئية 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. carotovorum* مدى عائلتي 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 carotovorum* 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 الكثرى وتسبب خسائر في الإنتاج في البرازيل كما أن هذا النوع من البكتيريا يصيب أشجار الكثرى وتسبب خسائر في الإنتاج في البرازيل [5].

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 البكتيريوفاجات تُعدّ من مضادات الكيروبات الطبيعية التي يمكن استخدامها في السيطرة على مسببات الأمراض البكتيرية في الأطعمة [7] ويمكن استخدام البكتيريوفاجات 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 الثديية مثل الأرنب هذا الأنتجين يؤدي إلى ظهور مواد في سیرم 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 رد فعل لدخول مركبات غريبة إليه تدعى مولدات الأضداد أن تتفاعل بشكل نوعي مع مولدات الأضداد التي حُرِضَتْ على تكوينها. تتكون الأضداد في النسيج الليمفاوي. وتعد الكريات البيضاء أهم مضاد للأضداد كما تقوم البالعات الكبيرة [9] وفي هذه الدراسة حُورِتْ الطريقة بحقن البكتيريوفاج 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

* للمراسلات إلى: نجاة ادريس عمر
البريد الإلكتروني:

Njatalbrsy88@gmail.com

وأُخِمْ الغلق باستخدام شمع البرافين المنصهر ، مع حقن بصله أخرى بماء مقطر معقم للمقارنة ، وحضنت الأنبصال 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 مشروط معقم تم نزع قشرة الدرنه 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 الحفرة ، ثم وضعت الشرائح المحقونة بنفس العزلة في طبق بتري منعزل به ورقة ترشيع معقمة ومبللة بماء مقطر معقم بحيث لقت 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 الجلوكوز NGA [14].

اختبار أنزيم الاوكسيديز Oxidase Test :

لإجراء هذا الاختبار اتبعت الطريقة التي وصفها [15] وذلك بوضع ورقة ترشيع 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 الكاتاليز Catalase Test :

مزجت كمية من محلول فوق أكسيد الهيدروجين (H₂O₂) 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 أشربة Api20 في إجراء الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيميائية :

أمكن إجراء بعض الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيميائية باستخدام أشربة 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 28°م لمدة 48 ساعة تم بعدها الكشف على نتيجة الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيميائية للعزلات المختلفة وقد اشتملت هذه الاختبارات الكشف على نشاط إنزيم بيوتا جلاكتوسيديز وإنزيم ديكربوكسيليز وإنزيم أورنيثين ديكربوكسيليز وإنزيم اليوريز وإنزيم الجالكتينيز وإنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين والأنول واختزال النترات. كما اختبرت مقدرة العزلة البكتيرية على استخدام بعض السكريات والمواد الكربوهيدراتية مصدراً للكربون مثل الأرابينوز ، الأنيسيتول ، الدكستري ، 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 بحوي 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 أزيلت الكمية الزائدة من المعلق بواسطة ماصة باستور ، ثم ترك الطبق في مكانه حتى امتصت البيئة ما تبقى من سائل المعلق. حضن الطبق على درجة 28°م الملائمة لنمو البكتيريا لمدة 24 ساعة

العينات عند وصولها للمعمل مباشرة ، حيث غسلت العينات بالماء لإزالة الأتربة العالقة بواسطة مشروط 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 ، وأخذ جزء من المعلق الناتج بواسطة الإبرة ذات العقدة (Inoculating Loop) وخطط على بيئة الأجار المغذي (Nutrient agar) ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 28°م لمدة 48 ساعة [10].

النمو على البيئة King B :

لقت 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 وتثبيتته ثم الصبغ، بصبغة جرام، ظهور الخلايا باللون الأحمر يدل على سالبية الاختبار ، والبنفسجي يدل على إيجابيته، مع وصف شكل الخلايا وترتيبها.

دراسة حركة الخلايا:

استخدمت طريقة القطرة المعلقة (hanging drop) لفحص حركة الخلايا وتحديدتها ، 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 10⁸ وحدة مكونة للمستعمرة/مل باستخدام جهاز

المطياف الضوئي (Spectrophotometer 6300) الذي يعادل (0.2) امتصاصية عند طول موجي 600 نانومتر [12].

اختبار فرط الحساسية Hypersensitivity Test

أجري هذا الاختبار لمعرفة البكتيريا إذا كانت ممرضة للنباتات 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 بعد 2-3 أيام من الحقن لملاحظة ظهور بقع ميتة، مما يدل على حدوث تفاعل فرط الحساسية مع حقن أوراق بالماء المقطر المعقم للمقارنة.

اختبار القدرة الامراضية على بصل سليمة:

استُخدِمت أنبصال سليمة بعد تعقيمها سطحياً باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم 1% (sodium hypochlorite) لمدة 5 دقائق ، وغسلت بعدها بماء مقطر معقم ، وتركت تجف تحت ظروف المعمل، ثم لقت بمعلق لمزرعة بكتيرية حديثة (10⁸ وحدة تكوين مستعمرة/مل) وذلك بعد إزالة جزء من البصل بواسطة ثاقب فليبي ثم وضعت نقطة واحدة من المعلق البكتيري داخل الثقب ،وبعد كل معاملة غُطِّي الثقب بالجزء الذي سبق إزالته

[8]

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 37م بتحويل 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 سلبية لصيغة 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 المرضية:

أوضح مقدرة هذه البكتيريا على إحداث أعراض العفن الطري فقد تطورت الأعراض خلال 5 أيام بظهور مناطق مشعة داكنة على الأوصال الكاملة، وبمرور الوقت ظهرت أعراض التحلل أو العفن الطري حيث تماثلت هذه الأعراض مع الأعراض النموذجية لمرض العفن الطري البكتيري على الخضراوات (شكل 3)، الذي سبق وصفه بواسطة عدد من الباحثين [20، 21]

أظهر اختبار القدرة المرضية على شرائح الدرنات إيجابية حيث تماثلت الأعراض بتحلل مائي وحدوث عفن على الشرائح المعدة، بينما لم تظهر أي أعراض على شرائح الشاهد (شكل 4).

الخواص الفسيولوجية والبيوكيماوية

وأوضحت نتائج دراسة الخواص الفسيولوجية والبيوكيماوية أن جميع العزلات موجبة لاختبار الكتاليز واختزال النترات واختبار الأكسدة والتخمير وإنتاج غاز H_2S وإنتاج إنزيم بيتا جلاكتوسيداز واستخدام السترات وكانت سلبية لاختبار الأوكسيداز وإنتاج اليوريا وإنتاج الأورثيين ديكر بوكسليز 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 سلبية للإنزيم لإنتاج مواد مختزلة من السكر وإنتاج أنزيم الفوسفاتيز واللاكتيز

تحضير مصل مضاد للبكتيريا يوفاج

سُجِبَ 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 نانومتر وبعد ذلك مزج المعلق بنفس الكمية من الزيت Adjuvaut حيث حقن الأرنب بفاصل 5 أيام بين الحقنة والأخرى مع زيادة حجم الحقنة من البكتيريا يوفاج (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 التلاجة على درجة حرارة 4م لمدة ليلة كاملة أجري بعدها الطرد المركزي على سرعة 10000 دورة لمدة 5 دقائق وأضيف إليها أزيد الصوديوم كونه مادة 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 نانومتر ووضع 100 ميكروليتر منه في كل حفرة من الطبقين ليلة كاملة على درجة حرارة 4م وفي اليوم الثاني غسل الطبقين 3 مرات حتى الطفو 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 كالتالي: 1:100، 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 pyrrolidne و 2% Bovine serum albumin (BSA) أضيف 100 ميكروليتر من كل تخفيف لسحبات المصل العادي والمصل المضاد ثم حضن الطبقين على درجة حرارة 4م ليلة كاملة ثم غسل الطبقين بعد ذلك بمحلول PBST ثلاث مرات حتى الطفو 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 37م لمدة ساعة واحدة ثم غسل الطبقين بمحلول PBST وأضيف بعد ذلك لكل حفرة من الطبقين 100 ميكروليتر من التفاعل لإنزيم 0.5% mg/ml Paranitri Phenyl Phosphate في pH 9.8 buffer 10% diethanolamine وحضنت الأطباق على درجة حرارة المعمل لمدة نصف ساعة ثم أخذت القراءة بواسطة جهاز الإليزا (Bio RAD Mode 550) عند طول موجي 450 نانومتر

اختبار أليزا 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 وسحقت 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 رُشِحت بواسطة ورق ترشيح، ثم وضع 100 ميكروليتر من عصارة البصل السليم 4 حفر من طبق الإليزا ووضعت عصارة البصل المصاب في 4 حفر وراشح التربة في 4 حفر وحضن الطبق على درجة 4م ليلة كاملة بعد ذلك غسل الطبق 3 مرات بمحلول الغسيل PBST ووضع المصل بتركيز 1:500 و 1:1000 في 2% من مادة Polyvinyl pyrrolidne و 2% Bovine serum albumin (BSA) ووضع 100 ميكروليتر في الحفر الأولى لكل

لوحظ ظهور مساحات على الطبق المنمى عليه البكتيريا الممزوجة براشح البكتيريوفاج على سطح البيئة لا تغطيها البكتيريا وهي ناتجة عن تحليل 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 البكتيريوفاج 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 البكتيريوفاج أفضل تخفيف (Titer) للمصل المضاد اتضح أن التخفيف 1 : 204800 هو أقل تركيزاً من المصل المضاد للبكتيريوفاج يمكنه إعطاء تفاعل إيجابي شكل (7). وحيث إن التراكيز الأقل من ذلك أعطت نتائج سالبة فقد اختبرت في هذه الدراسة تخفيفات وصلت إلى 1:3276800، وهذا يؤكد ما أشار إليه كل من [21،22،23] من أهمية تحديد أقل تركيز يمكنه إعطاء تفاعل إيجابي لاختبار الإليزا مما يقلل من استهلاك المصل المضاد.

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

تم إمكانية الكشف عن الفاج المحلل للبكتيريا المسببة للعفن الطري على البصل في الأنسجة التي تظهر عليه أعراض الإصابة باستخدام الطرق السيرولوجية وقد أوضحت النتائج (جدول 3) 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 الإليزا 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	1 : 500	0.180	0.825
	1 : 1000	0.178	0.666
بصل سليم	1 : 500	0.245	0.432
	1 : 1000	0.235	0.267
تربة محيطة بالبصل المصاب	1 : 500	0.254	0.650
	1 : 1000	0.235	0.385

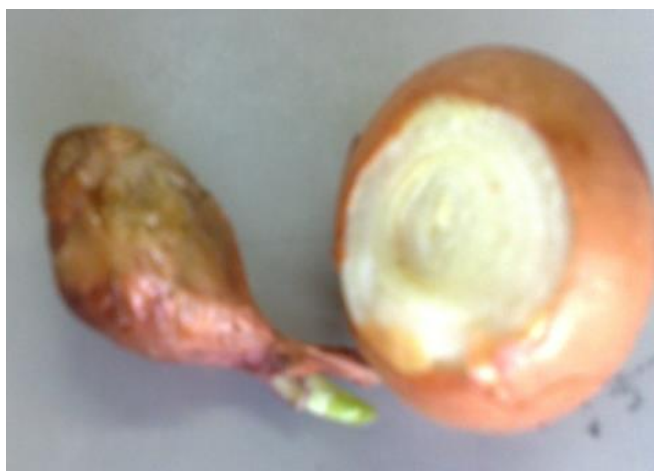
جدول (1) يوضح الاختبارات الفسيولوجية البيوكيميائية للعزلات البكتيرية

الاختبارات	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
اختبار الأوكسيداز Oxdase	-
اختبار الكاتالاز Catalase	-
إنتاج كبريتيد الهيدروجين	+
إنتاج انزيم بيتا جالاکتوسيداز β -galactosidase	+
إنتاج انزيم لوسين ديكربوكسيلاز Lysine decarboxylase	-
إنتاج انزيم أورنيثين ديكربوكسيلاز Ornithine decarboxylase	-
إنتاج الأندول	-
إنتاج انزيم اليوريز	-
إنتاج النترات	+
استخدام السترات	+
اللاكتوز	+
المالتوز	+
الساليوز	+
التريهالوز	+
الارابينوز	+
الادينيتول	-
الجلوكوز	+
المانوز	+

عزل البكتيريوفاج

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

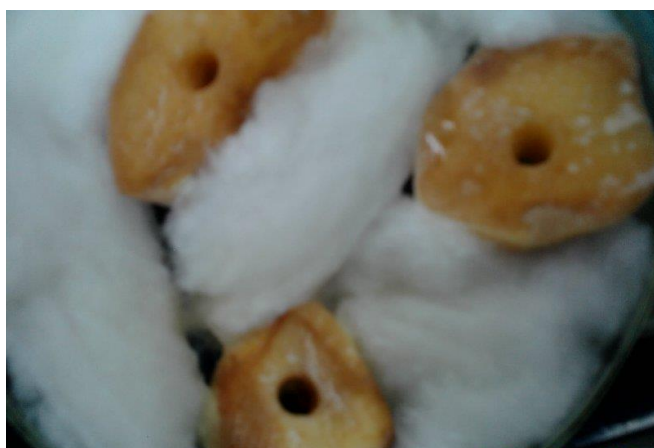
التفاعل	الامتصاصية عند طول موجي 450 نانومتر		التخفيفات المستخدمة
	المصل العادي	المصل المضاد	
+	0.944	2.0253	1 : 100
+	0.923	1.862	1 : 200
+	0.820	1.826	1 : 400
+	0.734	1.533	1 : 800
+	0.543	0899	1 : 1600
+	0.453	0.765	1 : 3200
+	0.387	0.750	1 : 6400
+	0.299	0.458	1 : 12800
+	0.281	0.398	1 : 25600
+	0.132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



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



شكل (1) يوضح نمو البكتيريا *Pectobacterium carotovorum*



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



شكل (2) يوضح تفاعل فرط الحساسية على أوراق التبغ



شكل (5) يوضح جهاز ترشيح البكتيروفاج





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

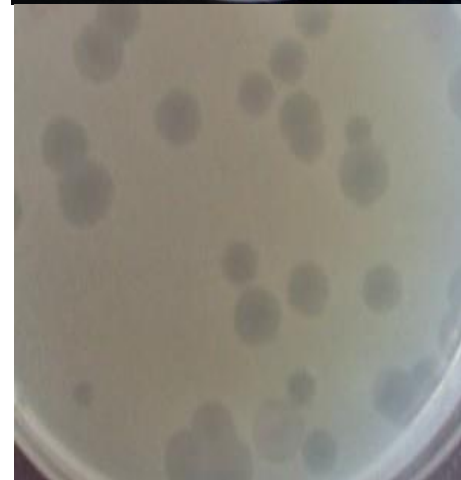
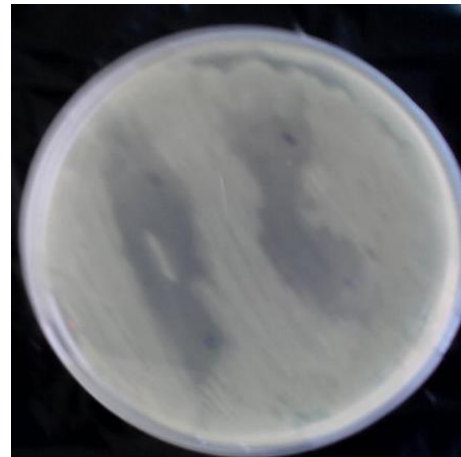
5. الخلاصة

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 *Pectobacterium carotovorum*، حيث تسبب خسائر كبيرة سنوياً في محصول البصل والبطاطس وغيرها من الخضراوات والفاكهة المخزنة وبعد مرض العفن الطري من الأمراض المنتشرة في ليبيا وذلك لانعدام الوسائل الحديثة للتخزين وعليه يرجى في البحوث اللاحقة تحقيق الآتي :

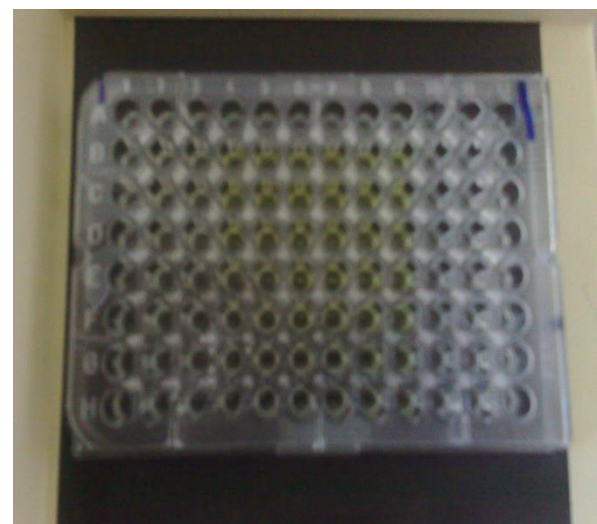
- تحديد حساسية بعض أصناف البصل وغيره من الخضراوات المدخلة حديثاً لليبيا للإصابة بالعفن الطري
- دراسة نشاط الإنزيمات البكتيرية وإنزيمات الأكسدة والتغيرات في نفاذية الأغشية في الأنسجة المصابة والسليمة للأصناف المختلفة.

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.; Khay, 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. Actinidia 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



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



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

22. حموية، ع. مكوك، خ. دبس، ب. والأحمد، أ. إنتاج مصل مضاد مضاد متخصص *Pseudomonas syringae pv. pisi* بالبكتيريا المسببة لمرض اللقحة البكتيرية على البازلاء في سوريا. مجلة وقاية النبات العربية. 1999، 17 : 26 - 30 .
23. كيالي، م. أحمد، 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
بيتون	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 ملتر
جلسرين	10 مل

• وسط LPGA

بيتون	7 جرام
جلوكوز	7 جرام
مستخلص الخميرة	7 جرام
أجار	15 جرام
ماء مقطر معقم	1000 ملتر

الملحق (2) المحاليل والصيغات

• 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

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. Horticulture 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 chrysanthemi* (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. atosptcia. 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 اللقحة 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 , Ferrylyon , 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.

• PBS-Tween-PVP-BSA		• Washing Solution PBS Tween (PH 7.4)	
200 مل	PBS-Tween	8 جرام	NaCl
4 جرام	Soluble polyvinyl pyrolidone 2%	20 جرام	KH ₂ HPO ₄
0.4 جرام	Bovine serum albumin 0.2%	1.15 جرام	Na ₂ HPO ₄
		0.20 جرام	KCl
		0.50 مل	Tween
		0.40 جرام	NA azide
		1000 ملتر	ماء مقطر