المجلة الليبية لوقاية النبات

Libyan Journal of Plant protection

http://www.ljpp.org.ly

تقييم التأثير الإبادي لعدد من رواشح عزلات بكتريا التربة ضد طور الاحداث الثاني لنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne javanica* معملياً.

إيمان حسين التركاوي، محمد علي موسى أدم، عبدالكريم محمد عامر ومحمود أكريم أحويطي

قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة عمر المختار/ البيضاء - ليبيا

Received – August 5, 2018; Revision – September 10, 2018; Accepted – October 10, 2018

Available Online – October 29, 2018

* Corresponding author E-mail: Mohamed.Adam@omu.edu.ly (Mohamed A. M. Adam)

الملخص /

استهدفت هذه الدراسة تقييم الفعل الإبادي لعدد من الرواشح البكتيرية المعزولة من التربة ضد طور الاحداث الثاني(J2) لنيماتودا تعقد الجذور *M. javanica*. حيث جلبت عشيرة النيماتودا من منطقة أوجلة الصحراوية خلال زيارة الجمعية الليبية لعلوم لوقـاية النبات لتلك المنطقة وتم إكثارها والاحتفاظ بها بمعامل قسم وقاية النبات، أما عزلات البكتيريا فقد عزلت من التربة والجذور من مواقع مختلفة لمناطق الوسيطة، الحمامة، الحنية بالجبل الأخضر. حيث تم اختبار التأثير القاتل لعدد 40 عزلة بكتيرية ضد طور الأحداث الثاني (J_2) لنيماتودا تعقد الجذور *M. javanica* معملياً. نتائج الاختبار أظهرت اختلاف في قدرة هذه الرواشح على قتل طور الاحداث الثاني (J_2) وذلك في ازمنة مختلفة من خلال حساب قيمة $\mathbf{LT_{50}}$ لكل راشح. حيث أن أكثر العزلات تأثيرا كانت *Pseudomonas* sp.، واقلها تأثير كانت *Pseudomonas flourscence*. وبعد عملية التقييم تم تعريف خمس عزلات من مجموع العزلات البكتيرية المختبرة وهي :

Bacillus subtiles، *Agrobacterium radiobacter*، *Bacillus megaterium*، *Pseudomonas* sp. و *P. flourscence*.

الكلمات الدالة : بكتريا، نيماتودا، رواشح بكتيرية، التربة.

المقدمة /

تعتبر نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* spp. من أكثر أجناس النيماتودا ضرراً على النبات وهي مسئولة عن جزء كبير من الفقد في الانتاج الزراعي وذلك اما بالتأثير المباشر او ارتباطها مع المسببات المرضية الاخرى لتكوين ما يعرف بالأمراض المركبة وكذلك قدرتها على كسر صفة المقاومة ضد بعض المسببات المرضية مثل مرض الذبول الفيوزاريومي، كما انها تصيب مدى عائلي واسع يصل الى حوالى 5500 نوع و تحت نوع نباتي ويضم هذا الجنس ما يقارب من 100 نوع بعضها متخصص والبعض الاخرى ذات مدى عوائلي واسع، وقدرة العديد من هذه الانواع على التكاثر البكري يزيد من خطورتها. ومما زاد الاهتمام بهذا النوع انتشارها في العديد من دول العالم وكذلك في ليبيا. حيث سجل هذا المرض في كثير من المناطق الزراعية في ليبيا حيث سجل على حوالي 87 نوع وتحت نوع نباتي وجود 7 أنواع لهذا الجنس في ليبيا وهي *M. incognita, M. javanica, M. hapla, M. thamesi, M. graminicola, M. naasi* و *M. arenaria* (7). أما النوع *M. javanica* فقد سجل في المناطق الجنوبية من ليبيا (15) وفي طرابلس (13،22) وفي الجبل الاخضر سجلها (7) حيث سجل (7) وجود هذا النوع في مناطق مختلفة من الجبل الاخضر وذكروا ان نسبة تواجد هذا النوع بلغت (65%). كما انه يعد في الترتيب الثاني بعد النوع *M. incognita* من حيث الانتشار العالمي (28). مما جعلها هدف لكثير من الابحاث. ويعد استخدام المبيدات من أكفاء واسرع الطرق في المكافحة الا ان تأثير المبيدات على الصحة العامة والبيئة ادى الى البحث عن وسائل بديلة أمنة لا تؤثر على الصحة العامة والبيئة متمثلة في طرق المكافحة الحيوية ومن هذه الطرق استخدام بكتريا التربة في مكافحة نيماتودا تعقد الجذور(4).

وفي هذا المجال بينت نتائج الابحاث وجود اختلاف في تأثير الأجناس والأنواع والسلالات البكتيرية المعزولة من التربة على طور الاحداث الثاني (J_2). حيث سجل عدد من الباحثين وجود هذه الاختلافات على نيماتودا تعقد الجذور خصوصا التفاوت في مستوى فاعليتها في قتل طور(J2). حيث وجد (11) خلال دراسته لـ 354 عزلة بكتيرية معزولة من رايزوسفير التربة لعدة نباتات مختلفة مختارة عشوائيا أن (1%) من العزلات المختبرة نتج عنها مركبات تؤثر على حيوية و نشاط طور (J_2) لنيماتودا تعقد الجذور. وفي دراسة أخرى لتأثير رواشح 21 عزلة من *Bacillus* spp. ضد طور (J_2) لنيماتودا *M. javanica* تبين أن لها القدرة علي قتل أطوار الأحداث عند زمن تعريض (24-48 ساعة) حيث أدت رواشح عزلات *Bacillus thuringiensis aizawai, Bacillus thuringiensis morrisoni* و *Bacillus cireulans* إلى قتل أطوار الأحداث بنسبة (95, 99 و 100 %) علي التوالي (12).

وبين (24) عند استعماله لأربع عزلات من الريزوبكتيريا المختارة من 500 عزلة بكتيرية معزولة من أنواع مختلفة من ترب الخضروات في الصين إن لها القدرة في التأثير على *M. javanica* وبعد سلسلة من الاختبارات البيولوجية والجزئية لتعريف هذه العزلات وجد أنها تابعة لـبكتيريا *Brevibacillus brevis* و *B. subtilis* وأظهر راشح العزلات كفاءة عالية في قتل (J_2) وسجلت العزلتين (B7 و B2) أعلي معدلات القتل بنسبة (72 و 70 %) علي التوالي في حين سجلت العزلتين (B8 و B5) نسبة (64 و 62 %) علي التوالي.

في دراسة أخري لاختبار فاعلية عزلات بكتيريا *B. thuringiensis* و *P. fluorescens* ضد نيماتودا *M. incognita* بين (9) أن راشح هذه العزلات قد أحدث نسب موت عالية في طور (J_2) وصلت إلى (100%) عند زمن تعريض 72 ساعة.

وكذلك تحصل (33) خلال عمليات الحصر العشوائي لعشرة مناطق مختلفة في ولاية (تاميـــل نـــادو) في الهند على 19 عزلة بكتيرية من ترب محاصيل مختلفة وبعد عمليات التعريف لهذه العزلات تبين أن ثمان عزلات (EB1 - EB8) تنتمي إلي *Pseudomonas* sp. وعشرة عزلات (EB9 – EB18) تنتمي إلي *Bacillus* sp. في حين كانت العزلة (EB19) تنتمي إلي *Methylobacterium* sp. وبمعاملة (J_2) لنيماتودا تعقد الجذور *M. incognita* برواشح هذه العزلات تبين أن العزلات (EB18, EB16, EB3 وEB19) كانت الأكثر تأثيراً في قتلها لطور (J_2) عند أسرع زمن مقارنة مع باقي العزلات.

أما عند معاملة طور (J_2) لنيماتودا *M . incognita* برواشح عزلات *P. fluorescens* و *Pseudomonas lilacinus* نتج عن ذلك موت (J_2) بنسبة (45 و 30 %) علي التوالـــي بعد 48 ساعة من زمن التعريض (18).

أوضح (6) أن لرواشح سبع عزلات من *Pseudomonas aeruginosa* تأثيراً قاتلاً لطور (J_2) لنيماتودا *M. incognita*. وفي دراسة أخري أكدت فاعلية راشح الخلايا البكتيرية للعزلة (*B. subtitles* cbr24) فى قتلها (J_2) لنيماتودا *M. incognita* (Ruiz *et al*., 2014).

وبين (34) فاعلية رواشح 19 عزلة بكتيرية معزولة من الرايزوسفير كعوامل مكافحة حيوية ضد *M. incognita*وبعد عمليات التعريف تبين أن عزلات *Serratia marcescens, P. flurescens* و (*B. thuringiensis* (BT14 عملت علي قتل طور (J_2) للنيماتودا و أن الخمس عزلات B78, B39, B38 (B91, وB103) حققت أعلي نسب القتل كما وأن العزلة (B38) التابعة لـلنوع *B. thuringiensis* كانت أكثرها تأثيراً بنسبة وصلت إلي (94 %) يليها العزلة (B103) التابعة لـلنوع *P. flurescens* بنسبة (70.3%). ونظراً لخطورة واهمية هذا المرض وصعوبة مكافحتة بالعديد من طرق المكافحة اجريت هذه الدراسة التي تهدف الى عزل بكتريا التربة وتقييم استخدام رواشحها في مكافحة نيماتودا تعقد الجذور *M. javanica* معملياً.

طرائق ومواد البحث /

1. البكتيريا

جمع العينات: جمعت عينات التربة والجذور من اتجاهات مختلفة لمناطق الوسيطة، الحمامة والحنية الواقعة بالجبل الأخضر، حيث تم اختيار ثمان مزارع بواقع خمسة عينات من كل مزرعة كل عينة منها تزن 250 جرام **(جدول 1)**. وتم الجمع من التربة القريبة من جذور نباتات الطماطم (الرايزوسفير) وبعمق من 2 - 25 سم، وذلك بعد إزالة 2 سم من الطبقة السطحية للتربة وتم جمع عينات الجذور لنباتات الطماطم للعزل من منطقة (الريزوبلان) (17). وقد تم وضع العينات في أكياس نايلون مع وضع بطاقة بداخل كل كيس تضمنت كافة البيانات المطلوبة عن العينة, ونقلت العينات إلي المعمل لإجراء عملية العزل والتعريف.

البيئات المستخدمة في العزل : استخدمت بيئة الأجار المغذي Nutrient agar (NA) لعزل البكتيريا من التربة والجذور و بيئة King's B لعزل بعض أنواع البكتيريا مثل *P. flourscence* التي تكون مشعه عليها, و استخدمت بيئة المرق المغذي Nutrient Broth (NB) لتحضير الرواشح والمعلقات البكتيرية.

العزل من عينات التربة (الرايزوسفير) : تم العزل في المعمل حيث تم تجهيز البيئات الغذائية في أطباق بتري قطرها 9 سم وتم خلط التربة في كل كيس لضمان تجانس العينة وتم العزل باستخدام طريقة التخفيفات Dilution method. وقد كان التركيز من 10^{-1} إلي 10^{-4} . و أخذ

1 مل من التركيز 10^{-4} ونشر علي أطباق تحتوى علي بيئة الأجار المغذي (NA).

العزل من عينات الجذور (الريزوبلان): غسلت جذور نباتات الطماطم بواسطة ماء الصنبور أولاً ثم بواسطة الماء المقطر وأخيراً غسلت الجذور بواسطة محلول فوسفيت منظم Phosphate buffer. أخذ 1 مل من محلول الغسيل ونشر على أطباق تحتوي بيئة الأجار المغذي (NA) وحضنت على درجة حرارة 28م° لمدة 24-48 ساعة (30).

أعيدت تنمية العزلات التي تدرج لونها بين الأبيض والكريم والتي عزلت من الجذور والتربة علي بيئة King's B لتحديد ما إذا كانت مشعة تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية طبقا لما وصفه (20) .

جدول (1). مناطق جمع العزلات البكتيرية ومصدرها والرمز المعطي لها.

منطقة الجمع	مصدر العزلة	رمز العزلة	منطقة الجمع	مصدر العزلة	رمز العزلة
شرق الحنية	الريزوبلان	A1	جنوب الحمامة	الريزوبلان	E1
	الرايزوسفير	A2		الرايزوسفير	E2
	الرايزوسفير	A3		الرايزوسفير	E3
	الرايزوسفير	A4		الريزوبلان	E4
	الريزوبلان	A5		الرايزوسفير	E5
جنوب غرب الحنية	الرايزوسفير	B1	شرق الحمامة	الريزوبلان	F1
	الريزوبلان	B2		الرايزوسفير	F2
	الريزوبلان	B3		الريزوبلان	F3
	الرايزوسفير	B4		الرايزوسفير	F4
	الرايزوسفير	B5		الرايزوسفير	F5
جنوب الحنية	الرايزوسفير	C1	جنوب غرب الحمامة	الريزوبلان	G1
	الرايزوسفير	C2		الرايزوسفير	G2
	الريزوبلان	C3		الريزوبلان	G3
	الرايزوسفير	C4		الرايزوسفير	G4
	الريزوبلان	C5		الرايزوسفير	G5
الحمامة	الرايزوسفير	D1	الوسيطة	الريزوبلان	H1
	الريزوبلان	D2		الريزوبلان	H2
	الريزوبلان	D3		الرايزوسفير	H3
	الرايزوسفير	D4		الرايزوسفير	H4
	الرايزوسفير	D5		الرايزوسفير	H5

تنقية العزلات البكتيرية وتعريفها: اختيرت المستعمرات الفردية وتم عزلها وتنقيتها بطريقة التخطيط أكثر من مرة على أطباق بتري تحتوي على البيئات الغذائية وذلك لضمان نقاء المزرعة.

تحضير اللقاح البكتيري: نميت البكتيريا في الاطباق على سطح الأجار المغذي، وبعد يومين من التحضين على درجة حرارة 28 م° غمرت المستعمرات النامية بالماء المقطر المعقم وأزيلت المستعمرات بحذر بواسطة إبرة باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer 6300) الذي يعادل (0.4) امتصاصية عند طول موجي 600 نانوميتر (26).

تعريف العزلات البكتيرية: أجريت سلسلة من الاختبارات لغرض تعريف العزلات البكتيرية المتحصل عليها اعتماداً علي مرجع (19) للتعريف وهذه الاختبارات هي:

الصفات العامة و الشكلية (شكل وترتيب الخلايا وصبغ جرام والحركة) : أجري اختبار صبغة جرام لتحديد إيجابية أو سالبيه البكتيريا واستخدمت طريقة القطرة المعلقة (Hanging drop) لفحص وتحديد حركة الخلايا حسب وصف (32).

اختبار أنزيم الأوكسيديز و أنزيم الكاتليز: أجري الاختبارات للكشف عن نشاط الانزيمين كما وصف (29).

استخدام أشرطة (Himedia) في إجراء الاختبارات الفسيولوجية والبيو كيميائية للعزلات البكتيرية : استخدمت أشرطة (Himedia) بإجراء عدة اختبارات للعزلات البكتيرية حيث شملت هذه الاختبارات مقدرة البكتيريا على إنتاج إنزيم اليورييز, وإنزيم الأرثونين دي كربوكسيليز، إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين, وإنتاج الأندول, واختزال النترات, واستخدام السترات كما اختبرت مقدرة هذه العزلات على استخدام بعض السكريات والمواد الكربوهيدراتيه الأخرى كمصدر للكربون مثل الجلوكوز, اللكتوز, الملتوز, السبلبيوز, المانوز, الأدنتول, الأربينوز والتريهيلوز (23).

منحنية معقمه، وجمع اللقاح في دورق، وضبط تركيز اللقاح البكتيري (Bacterial inoculum) عند تركيز 10^{-6} وحدة مكونة للمستعمرة لكل مل

اختبار فرط الحساسية : تم حقن اللقاح البكتيري بتركيز 10^{-6} وحدة مكونة للمستعمرة من كل عزلة بواسطة إبرة الحقن (microsyringe) في أوراق نبات التبغ صنف White Burleyووضعت النباتات بعدها تحت ظروف الصوبة الزجاجية، ثم فحصت الأوراق بعد 2 – 3 أيام من الحقن لملاحظة ظهور بقع ميتة من عدمها بما يدل على حدوث تفاعل فرط الحساسية كما تم حقن بعض الأوراق بالماء المقطر المعقم للمقارنة (8).

2. النيماتودا:

إكثار نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne javinica*: زرعت نباتات طماطم صنف Rio-grand في أصص تحتوي علي تربة معقمة وبنسبة 1:1 رمل وطين ولقحت بواقع كيس بيض لكل نبات من النيماتودا المتحصل عليها من منطقة أوجلة خلال زيارة الجمعية الليبية لوقاية النبات.

تعريف النيماتودا: وأجري التعريف بواسطة القطاع العجاني وتمت متابعتها للحصول علي اللقاح الكافي لإجراء اختبارات المعمل والصوبة (10).

3. التجارب المعملية:

تحضير الرواشح البكتيرية : نميت العزلات البكتيرية النقية علي بيئة المرق المغذي (NB) داخل أنابيب جهاز الطرد المركزي 50 مل وحضنت في حمام مائي علي درجة 28 م° لمدة 24 ساعة مع الرج, أخذت الأنابيب ووضعت في جهاز الطرد المركزي علي سرعة 2800 دورة لكل دقيقة لمدة 20 دقيقة, و تم التخلص من الطافي وإضافة 1 مل ماء معقم للراسب ضبط التركيز البكتيري

باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer 6300) ليكون التركيز 10^{-6} وحدة مكونة للمستعمرة لكل مل والذي يعادل امتصاصية (0.4) عند طول موجي 600 نانوميتر و ضبط التركيز باستخدام المعادلة التالية ($V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$) (26) .

تم حقن البكتيريا داخل بيئة المرق المغذي (NB) في الأنابيب مره ثانيه ولكن هذه المرة مضبوطة التركيز داخل كل أنبوبه, وحضنت في الحمام المائي علي درجة 28 م° لمدة 24 ساعة مع الرج, أخذت الأنابيب, و وضعت في جهاز الطرد المركزي علي سرعة 2800 دورة /دقيقة لمدة 20 دقيقة, تم ترشيح الطافي بواسطة ورق ترشيح (Whatman-No 1) والتخلص من الراسب, وتم التأكد من خلو الراشح من خلايا البكتريا وذلك بتلقيحه على بيئة NA وحضن علي درجة 28 م° لمدة 24 – 48 ساعة عدم وجود نمو للخلايا البكتيرية على الأطباق دليل على نقاء الراشح من البكتريا (31).

الحصول على طور الأحداث الثاني لنيماتودا *M. javanica*: جمعت أكياس بيض نيماتودا تعقد الجذور *M. javinica* من جذور نباتات الطماطم التي تمت تنميتها في الصوبة (المزرعة النقية) والمشار إليها سابقاً حيث تم وضع كل 20 كيس بيض تقريباً في طبق زجاجي معقم يحتوي علي الماء وتركت الأطباق علي درجة حرارة الغرفة وبعد 5 أيام تم الحصول علي طور (J_2) وتم ضبط أعدادها في الطبق باستخدام شريحة العد وحساب متوسط الأحداث في كل 1 مل من الماء بحيث يحتوي كل مل علي 40 (J_2) تقريباً.

تأثير رواشح البكتيريا علي قتل طور الأحداث الثاني لنيماتودا تعقد الجذور *M. javinica* : في طبق معقم تم إضافة الراشح البكتيري و 40 (J_2) لنيماتودا تعقد الجذور *M. javanica* وقد ضبط الراشح البكتيري داخل الأطباق بتركيز 50 % مع عمل ثلاث مكررات لكل معامله و تم اختبار رواشح 40 عزله بكتيرية مع إضافة معاملتي (البيئة الغذائية و الماء المقطر) للمقارنة, وضعت الأطباق علي درجة حرارة الغرفة وأخذت القراءات علي فترات زمنيه (0.5, 1, 3, 6, 12, 24 و72 ساعة) وعدت النيماتودا الميتة عن طريق اختبار مدى استجابتها للمس برأس الإبرة (21).

تم حساب النسبة المئوية للموت وفقاً للمعادلة التالية : -

$$\% \text{ للموت} = \frac{\text{عدد الأفراد الميتة}}{\text{العدد الكلي}} \times 100$$

وتم تحديد الزمن القاتل لنصف عدد الأفراد **Lt_{50}**.

التحليل الإحصائي : نفذت التجربة بتصميم عشوائي تام في ثلاث مكررات وزعت المعاملات عشوائياً وقد خضعت البيانات قبل التحليل إلي عمليتي تحويلها التحويل الزاوي والتحويل اللوغاريتمي (3) و قد خضعت النتائج المتحصل عليها للتحليل بواسطة برنامج التحليل الإحصائي Genstat لاختبار المعنوية ومقارنة الفروق بين المتوسطات بأقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمال 5% (16). كما تم حساب زمن التعرض القاتل لنصف عدد الأفراد (**LT_{50}**) بواسطة تحليل البروبت Probit (5) .

النتائج والمناقشة /

العزلات البكتيرية وصفاتها الشكلية وصبغ جرام :

تبين من دراسة صبغة الجرام وشكل وترتيب ولون وحركة الخلايا للعزلات البكتيرية **(جدول 2)** أن 16 عزله بكتيرية من أصل 40 عزلة كانت موجبة لصبغة الجرام بينما كانت باقي العزلات سالبة ومن ناحية الشكل فقد كانت 8 عزلات ذات خلايا كروية أما باقي العزلات كانت خلاياها عصوية كما أنها اختلفت في ترتيبها من خلايا مفرده او مزدوجة او موجودة في صورة سلاسل وأتضح من اختبار القطرة المعلقة بأن 14 عزلة فقط كانت غير متحركة في حين كانت باقي العزلات متحركة كما وأن هناك تباين بين العزلات

في لون مستعمراتها حيث تدرجت العزلات في اللون ما بين الأبيض و الكريم وصولاً الى اللون الأصفر.

اختبار التأثير الإبادي لرواشح العزلات البكتيرية ضد طور الأحداث الثاني (J_2) لنيماتودا تعقد الجذور *M. javinica* :

تبين من اختبارات التأثير الإبادي لراشح عدد 40 عزلة بكتيرية ضد الطور (J_2) معملياً أن جميع رواشح العزلات البكتيرية المختبرة كان لها تأثير قاتل ضد هذا الطور مع تفاوت نسب القتل **(جدول 3)** ومن التحليل الإحصائي سجلت فروق معنوية ما بين هذه العزلات حيث أظهر راشح العزلة (E2) أنه الأكثر كفاءة في قتل طور الأحداث الثاني سجل بنسبة (2.50 %) عند ساعة واحده من زمن التعريض وازدادت النسبة مع زيادة زمن التعريض حتى بلغت (100 %) عند 72 ساعة, وبقيمة Lt_{50} (1505.6 دقيقة). يليها في التأثير القاتل راشح العزلة (F5) نسبة موت (0.8 %) عند (10 دقائق) من زمن التعريض وتوالت هذه النسبة في الزيادة مع الزمن حتى (81.67 %) عند 72 ساعة, كما تم حساب الزمن القاتل لنصف عدد الأفراد Lt_{50} لها فكانت (1505.6 دقيقة), كما نتج عن راشح العزلة (B3) نسبة (75.83 %) عند ثلاث ساعات من زمن التعريض, وازدادت النسبة حتى (89.17 %) عند 72 ساعة و بقيمة Lt_{50} (684.6 دقيقة), أما العزلة (A4) بلغت نسب الموت الناتجة عن راشحها (3.33 %) عند 6 ساعات و (65.83 %) عند 72 ساعة وقيمة Lt_{50} لها كانت (3006 دقيقه), في حين كان راشح العزلة (H5) أقلها تأثيراً فسجل نسب موت بلغت (20.83 %) عند 12 ساعة أما عند 72 ساعة من زمن التعريض فقد بلغت نسبة الموت (50.83 %) وقيمة Lt_{50} (3820 دقيقة). وقد تم اختيار هذه العزلات الخمس علي أساس اختلاف الخصائص المدروسة وقدرتها علي التأثير في قتل طور الأحداث الثاني (J_2) بغرض تعريفها.

تعريف العزلات البكتيرية المنتخبة من اختبار كفاءة الرواشح ضد طور الأحداث الثاني (J_2) لنيماتودا *M. javinica* : عرفت العزلات البكتيرية الخمس (A4, B3, E2, F5وH5) باستخدام الصفات المرفولوجية و الفسيولوجية والبيو كيميائية.

اختبار فرط الحساسية: أظهرت العزلات البكتيرية الخمس (A4, B3, E2, F5 وH5) أنها غير ممرضة للنبات حيث أنها لم تعطي أي أعراض للموت الموضعي (Necrosis) علي أوراق نبات التبغ صنف White Burley بعد 48 ساعة من حقن الأوراق والذي يماثل ما حدث عند حقن الأوراق بالماء المعقم.

الاختبارات الفسيولوجية والبيو كيميائية : يتضح من خلال نتائج اختبار أشرطة Himedia للخصائص الفسيولوجية و البيوكميائية للعزلات الخمس المنتخبة و إنزيمي الكاتليز و الأوكسيديز **(جدول 4)** اختلاف العزلات البكتيرية الخمس المنتخبة في إنتاجها للإنزيمات والسكريات المختلفة و إنزيمي الكاتليز و الأوكسيديز.

جدول (2). نتائج دراسة الخواص المورفولوجية والحركة وصبغ جرام لخلايا العزلات البكتيرية المعزولة من ترب بعض المناطق في الجبل الأخضر. **(+)** الخلايا موجبة لصبغة جرام و (–) سالبة لصبغة جرام

رمز العزلة	الشكل	الترتيب	اللون	الحركة	صبغ جرام
A1	عصوية	مفردة	أبيض	متحركة	-
A2	عصوية	في سلاسل	أبيض	متحركة	-
A3	كروية	في أزواج	كريمي	غير متحركة	-
A4	عصوية	في أزواج	أبيض	متحركة	+
A5	عصوية	في سلاسل	أبيض	متحركة	-
B1	كروية	مفردة	أبيض	متحركة	+
B2	عصوية	مفردة	أصفر	متحركة	-
B3	عصوية	مفردة	أبيض	متحركة	-
B4	عصوية	في أزواج	أبيض	متحركة	-
B5	كروية	مفردة	أبيض	غير متحركة	+
C1	عصوية	مفردة	كريمي	متحركة	-
C2	عصوية	مفردة	أصفر	متحركة	-
C3	عصوية	مفردة	أبيض	غير متحركة	+
C4	عصوية	مفردة	أبيض	متحركة	-
C5	عصوية	مفردة	أصفر	متحركة	-
D1	عصوية	مفردة	أصفر	متحركة	-
D2	عصوية	مفردة	كريمي	متحركة	+
D3	كروية	مفردة	أبيض	متحركة	+
D4	كروية	مفردة	أبيض	غير متحركة	+
D5	عصوية	مفردة	كريمي	غير متحركة	+
E1	عصوية	مفردة	أبيض	غير متحركة	-
E2	عصوية	مفردة	أبيض	غير متحركة	+
E3	عصوية	في أزواج	كريمي	متحركة	+
E4	عصوية	مفردة	أبيض	غير متحركة	-
E5	عصوية	مفردة	أبيض	متحركة	-
F1	عصوية	مفردة	كريمي	متحركة	-
F2	عصوية	في سلاسل	كريمي	متحركة	-
F3	كروية	مفردة	كريمي	غير متحركة	+
F4	عصوية	مفردة	أبيض	متحركة	-
F5	عصوية	مفردة	كريمي	غير متحركة	-
G1	عصوية	في أزواج	أصفر	متحركة	-
G2	كروية	مفردة	أبيض	غير متحركة	+
G3	عصوية	مفردة	كريمي	متحركة	-
G4	عصوية	مفردة	أبيض	متحركة	-
G5	عصوية	مفردة	أبيض	غير متحركة	+
H1	عصوية	مفردة	أصفر	متحركة	-
H2	كروية	مفردة	أبيض	غير متحركة	+
H3	عصوية	مفردة	كريمي	متحركة	-
H4	عصوية	مفردة	كريمي	غير متحركة	+
H5	عصوية	في أزواج	أبيض	متحركة	+

جدول (3). النسبة المئوية لموت طور الأحداث الثاني (J_2) لنيماتودا *M. javinica* بعد تعرضه لرواشح العزلات البكتيرية المختلفة وبأزمنة مختلفة وكذلك معيار الزمن النصفي القاتل **LT_{50}**.

LT_{50} بالدقائق	**الزمن**									**المعاملة ورمز العزلة**	
	72h	**24h**	**12h**	**6h**	**3h**	**2h**	**1h**	**30m**	**10**		
1842	94.1	53.3	50.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	A1	**رمز العزلة**
<	15.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	A2	
<	10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	A3	
3006	65.8	31.6	30.0	3.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	A4	
1849.	93.3	38.3	25.0	20.8	11.6	0.00	0.00	0.00	0.0	A5	
<	5.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	B1	
<	18.3	14.1	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	B2	
684.6	89.1	89.1	82.5	75.8	75.8	0.00	0.00	0.00	0.0	B3	
<	5.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	B4	
<	7.50	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0.00	0.0	B5	
<	9.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	C1	
2017	80.0	80.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	C2	
<	53.3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	C3	
<	38.3	25.8	16.6	5.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	C4	
<	1.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	C5	
<	25.8	16.6	10.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	D1	
2843.	72.5	25.8	10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	D2	
2006.	65.0	65.0	65.0	65.0	47.5	9.17	2.50	0.00	0.0	D3	
<	27.5	27.5	3.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	D4	
<	4.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	D5	
1675.	95.8	84.1	22.5	12.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	E1	
1505.	100.	92.5	33.3	19.1	15.0	8.33	2.50	0.00	0.0	E2	
<	38.3	28.3	21.6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	E3	
1840	92.5	77.5	20.8	10.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	E4	
1852	77.5	69.1	38.3	13.3	5.83	4.17	4.17	0.00	0.0	E5	
2181.	66.6	66.6	52.5	35.0	18.3	14.1	9.17	0.00	0.0	F1	
1680.	100.	80.0	4.17	0.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	F2	
<	5.83	5.83	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	F3	
<	14.1	7.50	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	F4	
1505.	81.6	77.5	70.8	55.0	21.6	9.17	5.0	0.8	0.8	F5	
<	1.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	G1	
<	25.0	21.6	19.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	G2	
<	5.83	0.83	0.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	G3	
1842.	100.	60.8	6.67	5.00	4.17	4.17	1.67	0.00	0.0	G4	
<	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	G5	
<	38.3	18.3	8.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	H1	
2511.	90.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	H2	
<	3.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	H3	
1513.	100.	75.8	55.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	H4	
3820	50.8	32.5	20.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	H5	
<	8.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	المرق المغذي	
<	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	**ماء مقطر**	
	8.603									**LSD 0.05**	

(m الزمن بالدقائق و h بالساعات, > أكبر من 4320 دقيقة)

جدول (4). اختبارات الخصائص الفسيولوجية والبيوكيماوية للعزلات الخمس المنتخبة.

الاختبار	رمز العزلة				
	F5	H5	B3	A4	E2
Adonitol	-	-	+	+	-
Arabinose	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	+	+	-	-
Citrate utilization	+	-	-	+	+
Esculin hydrolysis	-	-	+	+	-
Glucose	+	+	+	+	+
H_2S production	-	+	+	-	-
Indole	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	+	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	+
Melibiose	-	+	+	+	-
Methyl red	-	+	-	-	+
Nitrate reduction	-	-	+	+	-
ONPG	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxlase	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	-	+
Phyenylaiamine deaminase	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	+	-
Rhamnose	-	-	-	+	-
Saccharose	-	+	+	+	+
Trehalose	-	+	+	+	+
Urease	-	-	+	-	+
Voges proskauer's	-	+	-	+	-
Xylose	-	-	+	-	+

(+) التفاعل موجب و **(–)** التفاعل سالب

تعريف العزلات البكتيرية:

بناءٍ على النتائج المتحصل عليها من اختبار فرط الحساسية واختبار صبغ جرام وشكل وترتيب ولون وحركة خلايا العزلات البكتيرية **(جدول 2)** وكذلك نتائج اختبارات الخصائص الفسيولوجية والبيو كيميائية في **(جدول 4)** تم تعريف العزلات الخمس المنتخبة كما في **(جدول 5)**. وقد اتضح من خلال سلسلة الاختبارات الفسيولوجية والكيميائية واختبارات الحركة وشكل وترتيب الخلايا وصبغ جرام واختبار فرط الحساسية واختبار إنزيمي الكتاليز والأوكسيديز لتعريف العزلات البكتيرية الخمس المنتخبة من اختبار كفاءة الرواشح في قتل طور الأحداث الثاني (J_2) لنيماتودا تعقد الجذور *M.*

javanica، وبعد عمليات التعريف للعزلات المنتخبة تبين بأنها تنتمي للأنواع الاتية *Bacillus subtitles*, *Agrobacterium radiobacter, Pseudomonas* sp., *Bacillus megaterium* و *Pseudomonas flourscence* .

ومن الدراسات السابقة تبين توافق وجود هذه الأنواع في التربة لمناطق مختلفة من العالم. حيث وجد (30) عند عزلة 32 عزلة بكتيرية من رايزوسفير التربة وبعد عمليات التعريف اثبت أنها تابعة للنوعين *P. aeruginosa* و *B. subtilis*. وسجل (25) عند عزلة 61 عزلة من الرايزوسفير لحقول البطيخ ان 56 عزلة منها تابعة للجنس *Bacillus* spp.. كما ان (33) تحصلوا خلال عمليات الحصر العشوائي لعشر مناطق مختلفة ومحاصيل مختلفة علي 19 عزلة بكتيرية وبعد عمليات التعريف لهذه العزلات من خلال مجموعة من الاختبارات لصفاتها الشكلية والكيميائية وجد أن ثمان منها تنتمي إلي *Pseudomona* ssp. و عشر عزلات تنتمي إلي *Bacillus* sp. بينما كانت عزلة واحده فقط تنتمي إلي *Methylobacterium* sp.. وكذلك مع م ا ورد في دراسة (14) عند تعريفة لـ 52 عزلة من رايزوسفير الترب المصرية أنها تابعة للنوع *P. fluorescens*.

جدول (5). أنواع البكتريا التي تم تعريفها.

رمز العزلة	نوع البكتيريا
A4	*Bacillus subtilis*
B3	*Agrobacterium radiobacter*
E2	*Bacillus megaterium*
F5	*Pseudomonas* sp.
H5	*Pseudomonas flourscence*

كفاءة رواشح العزلات البكتيرية في قتل طور الأحداث الثانـي (J_2) لنيماتودا تعقد الجـذور *M. javanica* :

تبين من اختبار كفاءة رواشح 40 عزلة بكتيرية ضد طور (J_2) للنيماتودا *M. javanica* وجود تفاوت بين هذه العزلات في مقدرتها علي قتل هذا طور وعلي فترات زمنية مختلفة وتبين أن أكثرها كفاءة هو راشح *Pseudomonas* sp. يليها في التأثير القاتل كان راشح *B. megaterium* ومن ثم رواشح *A. radiobacter* و *B. subtilis* في حين كان راشح *P. flourscence* الأقل تأثيراً. وقد اتفق هذا مع ما ورد في الدراسات (9،11،12،18،21،24،25،30،33).

نوصي في هذا البحث بعزل واختبار عزلات بكتريا من محاصيل مختلفة واختبارها في ظروف الصوبة ضد مرض تعقد الجذور على محاصيل مختلفة.

المراجع /

1) **أدم، محمد على موسى. 1999.** دراسة عن النيماتودا المتطفلة على نباتات العائلة الباذنجانية في منطقة الجبل الأخضر، رسالة ماجستير، جامعة عمر المختار، كلية الزراعة، قسم الوقاية، 106 صفحة.
2) **الحويطي، محمود أكريم. 1989.** دراسة نيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne* على بعض محاصيل

الخضر والحشائش في عدة مناطق من الجبل الأخضر. رسالة ماجستير، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعه الفاتح طرابلس، ليبيا.49 صفحه.

3) **الروبي، محمد ممدوح. 1983.** طرق التحليل الإحصائي للتجارب البيولوجية. معارف القاهرة الطبعة الثانية. 419 صفحة.

4) **عتريس, إبراهيم خيري. 2002.** نيماتودا المحاصيل الزراعية الأمراض والمقاومة. معارف الإسكندرية. 339 صفحة.

5) **Amer, A., Mariam, A. Z. and Abdelhamed, H. Al-Mabrouk. 2013.** .Effects of twenty-eight plant Extracts as insecticides against adults of the sweet potato whitefly *Bemisiatabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. International Conference on Applied Life Sciences UAE. September 15-17

6) **Abuzar, S. 2013.** Antagonistic effects of some fluorescenent pseudomonas strain against Root-Rot fungi (*Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*) and Root Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) on chili (*Capsicum annum*). World Applied Science Journal, 27(11): 1455-1460.

7) **Adam, M. A. M., Phillips, M. S. and Blok, V. C. 2006.** Identification Of *Meloidogyne* spp. From north east Libya and comparison of their-and Inter-specific genetic variation using RAPDs. Journal of Nematology, 7 (4):599-609.

8) **Agrios, G. N. 1997.** Plant pathology 4th edition Academic press New York, 635pp.

9) **Ashoub, A. H. and Amara, M. T. 2010.** Biocontrol activity of some bacterial genera against Root- knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Journal of American science, 6(10): 321-328.

10) **Barker, K. R., Carter, C. C. and Sasser, J. N. 1985.** An advanced treatise on *Meloidogyne* volum II: Methodology. Department of plant pathology ant the united states agency for international development. North Carolina State University Graphics, 223 pp.

11) **Becker, J. O. Zavaleta, E., Colbert, S. F., Schroth, M. N., Weinhold , A. R., Hancock, J. G. and Van Gundy, S. D. 1988.** Effects of Rhizobacteria on Root-knot nematodes and gall formation. The American Phytopathology, 78:1466-1469.

12) **Carneiro, R. M. D. G., De Souza, S. I. and Belarmino, L. C. 1998.** Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. Nematologia brasileria. 22 (1)12-21.

13) **Dabaj, K. H. and Jenser, G. 1987.** List of plant infected by root-Knot nematodes in Libya. International

Nematology Network Newsletter, 4:28-33.

14) **El banna, K., Gamal-Eldin, H. and Abuzaed, E. 2010.** Characterization of Egyptian fluotescent rhizosphere Pseudomonad isolates with high nematicidal activity against the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita.* Journal of Biofertil biopestici, 1:102.

15) **Fourgani, G. M. and Edongali, E. A. 1989.** Speciation of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) associated with crop plants in Libya. International Nematology Network Newsletter, 6(1): 38-39.

16) **Gomez, K. A. and Gomez, A. A. (1984).** Statistical procedure for agricultural research. John Wiley and Sons. New York. Chichester. Brisbane. Toronto. Singapore 1st edition, 690 pp.

17) **Gowsalya, A., Ponnusami, V. and Sugumaran, K. R. 2014.** Isolation of bacteria from soil sample for Exopolysaccharide production. International Journal of ChemoTec Resarch, 6(5): 2925-2928.

18) **Hashem, M. and Abo- ELyousr, A. 2011.** Management of the root–knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. Crop Protection, 30: 285 – 292.

19) **Holt, J. G., Krueg, N. R., Sneath, P. H., Staley, T. and Williams, S. T. 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition. Williams Wilkins-Baltimore U.S.A.787 pp.

20) **Johnson, I. F. and Curl, E. A. 1972.** Methods for research on ecology of soil borne pathogens, Burgess Publishing Company, 247pp.

21) **Khan, M. Q., Abbasi, W. M., Zaki, M. J. and Khan, S. A. 2010.** Evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates against Root-knot nematodes following seed application in okra and mungbean . Pakistan Journal of Botany, 42(4): 2903 – 2910.

22) **Khan, M. W. and Dabaj, K. H. 1980.** Some preliminary observation on Root-Knot Nematodes of vegetable crops in Tripoli region of Libyan Jamahiriya. Libyan Journal of Agriculture, 9: 127-136.

23) **Lelliott, R. A., and Stead, D.E. 1987.** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: Methods in Plant Pathology, Vol. 2. T.F. Preece Series, British Society of Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 pp.

24) **Li., Bin, Xie, G., Soad, A. and Coosemans, J. 2005.** Suppression of *Meloidogyne javanica* by antagonistic and plant growth-promoting

identification of plant pathogenic bacteria, .3rd edition. St Paul, MN, USA, APS Press, 164 pp.

30) **Siddiqui, I. A. 2000.** Use of growth – promoting bacteria in the control of root – knot nematode and root – infecting fungal of crop plant. A thesis submitted for the degree of doctora faculty of science university of Karachi, 359pp.

31) **Siddiqui, I. A . and Shaukat, S. S. 2003.** Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. Journal of Phytopathology, 152: 48-54.

32) **Skerman, V. B. 1967.** A guide to the identification of the Genera of Bacteria. 2nd edition. Baltimore, Maryland: Williams and wilkins.126 pp.

33) **Vetrivelkalai, P., Sivakumar, M. and Jonathan, E. I. 2010.** Biocontrol potential of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in bhendi. Journal of Biopesticides, 3(2):452 – 457.

34) **Zaghloul, R. A., Neweigy, N. A., Abou_Aly, H. E., El_Sayed, S. A. and Bahloul, A. M. 2015.** Nematicidal activity of biocontrol agents against root-knot nematodes in-vitro. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6(1): 429-438.

rhizobacteria. Journal of Zhejiang University Science, 6B(6): 496-501.

25) **Medeiros , J., Mariano, R., Pedrosa, E. M. R. and Silveira, E. B. 2009.** Inconsistency of the biological control of *Meloidogyne incognita* race2 in melon by endophytic bacteria. Horticultura Brasileira, 27: 319-324.

26) **Perombelon, M. C. and Van Der Wolf, J. M. 2002.** Methods for the detection and quantification of (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosptica*) on potatoes: a laboratory manual . Scottish Crop Research institute occasional publication No.10.

27) **Ruiz, S. E., Cristobal, A. J., Reyes, R. A., Tun, S. J., Garcia, R. A. and Pacheco, A. J. 2014.** In vitro antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strain isolated from soils of the yucatan peninsula against *Macrophomina phaseolina* and *Meloidogyne incognita*. International Journal of Experimental Botany, 83: 45-47.

28) **Sasser, J. N. and Careter, C. C. 1985.** An advanced treatise on *Meloidogyne* V(I), Biology and Control., Department of plant pathology ant the United states agency for international development. North Carolina State University Graphics, 223 pp.

29) **Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun W. 2001.** Laboratory guide for

Abstract \

Evaluation the efficacy of culture filtrates of some Rhizobacteria isolates against (J2) of Root Knot nematode *Meloidogyne javanica* Treub in vitro.

Ayman H. S. R. ALtrkawi, Mohamed A. M. Adam, Abdelkrim M. Amer and Mahmoud E. M. Ehwaeti

Plant Protection Dep., Fac., of Agri., Omar Al-mukhtar uni., Elbida-Libya. P.O. Box 919

Corresponding author: E-mail: Mohamed.adam@omu.edu.ly(Mohamed AM Adam)

**Abstract **

The aim of this study, was isolation and identification of some Rhizobacteria strains and evaluate the efficacy of their culture filtrates against Root Knot Nematode *Meloidogyne javanica*. The (RKN) sample that brought from Ogela region during the visit of the Libyan Society of Plant Protection to the region. Results of identification of *Meloidogyne* sp. using perineal pattern confirm that the species is *M. javanica*. The bacteria strains were isolated from soil and root of tomato plants from different locations of the following areas : EL- Wasita, EL-Hamama and EL- Haneia in ALjabel ALakther region. Then, the efficacy of culture filtrates of 40 Rizobacteria isolates were evaluated on the mortality of second stage juveniles (J_2) in *vitro*. Results of the experiment showed differences in the ability of the filtrates of bacteria isolates on killing of (J_2), in different times and the Lt_{50} parameter . The most effective culture filtrates was of *Pseudomonas* sp. While the less effective was *P. flourscence*. After the identification process of the five selected bacteria isolates from evaluate the efficacy of their culture filtrates test against (J_2). The bacteria isolates were identified as *Bacillus subtitles*, *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas flourscence*. The percentage of mortality of (J_2) was increased with rising the exposed time to the culture filtrates.

Keywords: Bacteria, Nematode, Culture filtrates, Soil.