بسم الله الرحمن الرحيم

جامعة وادي النيل
كلية التربية
قسم علوم الحياة

بحث تكميلي لنيل درجة البكالريوس مرتبة الشرف

بعنـــــوان

عزل وتعريف البكتيريا الموجودة بخيوط شبكة العنكبوت واستخدامها في المكافحة الحيوية

Isolation and Screening of Bacteria from Spider Web for Antibacterial and Antifungal Activity

إعـداد الطالبات :

إلهـام خلف الله العوض	أح/ 16/2008
الســارة العــوض علـي	أح/ 14/2008
رفيـــدة الأزرق حمـزة	أح/ 36/2008
منى محمود عبد الرحيم	أح/ 78/2007

إشراف الدكتورة :

إلهـــام شريف داؤد

مايو 2012م

بسم الله الرحمن الرحيم

إستهـــــلال

﴿ مثل الذين إتخذوا من دون الله أولياء
كمثل العنكبوت أتخذت بيتاً وإن أوهن
البيوت لبيت العنكبوت لو كانوا يعلمون ﴾

صدق الله العظيم

سورة العنكبوت الآية (٤١)

إهـــــداء

إلى أحق الناس بحسن صحابتي إلى من سهرت الليالي الطوال بغية راحتي وبحنانها وحبها ولطفها تزول كآبتي وتحت قدميها جنتي وسعادتي

ألقيت بين يديك السبق وتعلما * أرجو رضاك الذي أعلو به القمم

أنت الهنا والمنى أنت الدنى * وأنا على ثلاك وليداً قد نما وسما

أمي الحبيبة

إلى أنفاساً اقطعت وجهد كبير دون مقابل يكفيه دوماً أن يرانا قد وصلنا إلى بر الأمان

إلى سيد لو بشر الله أمة * بغير نبي بشرنا به الرسل

حالته عطايا كفه دون وعده فليس له انجاز وعد ولا هطل

والدي العزيز

إلى من يرتعش قلبي بذكراهم إلى نسمة الربع التي تنسج ببريق عينيها أجنحة المحبة والذكريات

إلى الدكتورة / إلهام شريف داؤود

إلى من تغدو الدنيا بصحبتهم واحة نستظل بها من هموم الحياة إلى زملائي وزميلاتي

شكر وعرفان

قال تعالى : (ولئن شكرتم لأزيدنكم) صدق الله العظيم

القلب يحلو صادقاً معنى الثناء والنفس تجزي شكرها لله
أن وهب العطاء حتى إذا اعتزف اللسان وحارت الأعضاء

بقلوب مليئة بالحب والعرفان وذكرى مفعمة بالوفاء والاعتزاز نتقدم بالشكر وبكل فخر واحترام لكل يد مدت العون وكل نفس جادت بالكرم والعطاء نتقدم بالشكر الجزيل

إلى الدكتورة / إلهام شريف داؤود

مشرفة البحث

الشكر أجزله إلى كل الأساتذة بقسم الأحياء وكل أساتذة جامعة وادي النيل وزملاء البحث في قسم الأحياء والذين ما بخلو علينا بأحسن المشاركة والعمل كفريق واحد لإخراجه بالصـــورة المطلوبة

والشكر إلى كل من أسهم بفكرة ووقته لإخراج هذا البحث

فهـــــرس الموضـــــــوعات

	الموضـــــــــــــــــــــوع	رقم الصفحة
	الآية	I
	الإهداء	II
	الشكر والعرفان	III
	فهرس المحتويات	IV
	ملخص البحث	V
	الفصل الأول : المقدمة	
	المقدمة	1 – 4
	الهدف من الدراسة	5
	الفصل الثاني : الأبحاث السابقة	
2 – 1	الأجناس البكتيرية	6
2 – 2	الاكتينوميسيتات	6
2 – 3	البكتيريا المتجرثمة الاختيارية	7
2 – 4	الفيوزاريوم	8
2 – 5	فصيلة انتريباكتريسي	10 – 9
2 – 6	المكافحة الحيوية	11 – 10
	الفصل الثالث : المواد والطرق	
3 – 1	المواد	12
3 – 2	جمع العينات	12
3 – 3	المواد الكيميائية	13
3 – 4	تنشيط بكتيريا الكلبسيلا	13
3 – 5	الأثر التضادي لبكتيريا Steptomyces sp وبكتيريا Bacillus sp على نمو فطر الفيزاريوم Fusarium oxysporium وبكتيريا كلبسيلا Klebsiella sp	14 – 13
	الفصل الرابع : النتائج	
4 – 1	عزل وتعريف البكتيريا	15
4 – 2	عزل وتعريف فطر الفيوزاريوم	15
4 – 3	الأثر التضادي لبكتيريا Steptomyces sp وبكتيريا Bacillus sp على نمو فطر الفيزاريوم Fusarium oxysporium وبكتيريا كلبسيلا Klebsiella sp	16 – 15
4 – 4	الجداول والأشكال واللوحات	27 – 17
	الفصل الخامس	
	المناقشة	29 – 28
	الخلاصة	30
	التوصيات	31
	المراجع	36 – 32

ملخص البحث

تهدف هذه الدراسة إلى إجراء مسح للبكتريا الموجـودة بـشبكة العنكبـوت واستخدامها كأحد عوامل المكافحة الحيوية الصديقة للبيئة . فعزلت بكتريـا Streptomyces sp وبكتريـا Bacillus sp ودرس أثرهمـا علـى نمـو معزولات فطـر Fusarium oxyporum وبكتريـا Klebsiella وذلـك باستخدام طريقة المزرعة الثنائية لمدة ثمانية أيام وحسبت النـسبة المئويـة للنقصان قطر فطر F . oxysorium وبكتريا Klebsiella وكانت 100 % و 80.3 % نتيجة لأثر بكتريا Streptomyces sp على الفطـر والبكتريـا على التوالي 77.8 ، 78.3 نتيجة لأثر Bacillus sp علـى نفـس الفطـر والبكتريا على التوالي . هذه النتائج تدل على فعاليتهما في القضاء على الفطر والبكتريا .

الفصـــل الأول

المقدمة

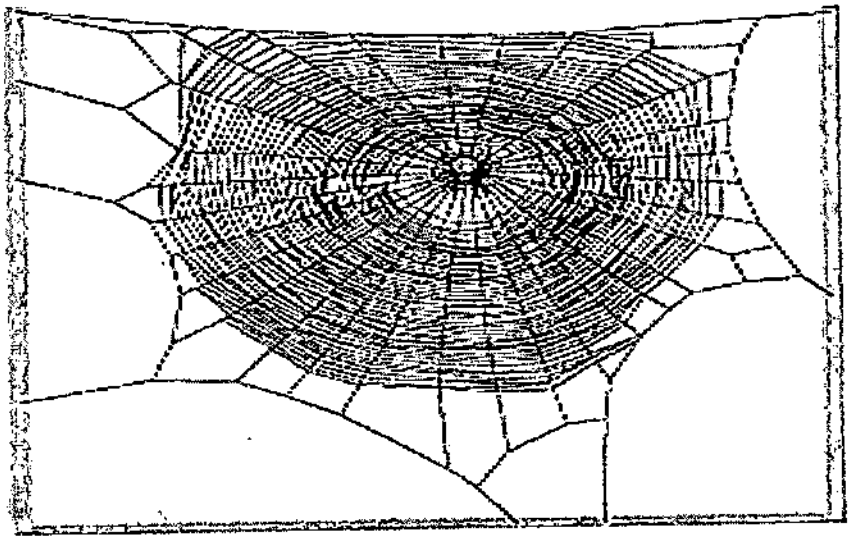
Introduction

الباب الأول

المقدمة

Introduction

قال تعالي (مثل الذين اتخذوا من دون الله أولياء كمثل العنكبوت اتخذت بيتا وان أوهن البيوت لبيت العنكبوت لو كانوا يعلمون (العنكبوت-٤١)



المقدمة

Introduction

تتكون خيوط شبكة العنكبوت من بروتين خاص يسمي بروتين الكيراتين وهو من النوع الفا ويظهر على شكل خيط عديد الطيات من الأحماض الأمينية المجدولة حلزونيا يفرزها العنكبوت من غدة موجودة فى بطنه ثم تنتقل عبر قنوات غدية الى الرأس حيث توجد الة عجيبة هى بمثابة مدافع تسمى المدافع العنكبوتية لضخ البروتين وتكوين خيوط الحرير . تخرج خيوط العنكبوت في صورة سائل لزج مطاطي ومرن لذلك يتميز بقوة شد كبيرة ثم تحاط تلك الخيوط ببروتين آخر شبيه بالمطاط مكون بسلاسل من الأحماض الامينية من النوع بيتا وهي تعطية القوة والمتانة ضد التقصف والكسر. يحدث القص عند التعرض لقوى الشد التى تؤدى الى قطع الروابط الهيدروجينية التى تربط الأحماض الأمينية ببعضها بين صفائح بيتا المطوية. كذلك تتميز خيوط العنكبوت بعدم ذوبانة في كثير من المذيبات مثل الماء والأحماض الخفيفة بمقاومتها للتحلل بكثير من الانزيمات وكل هذة (Werner *et.al.*,2007)والقلويات , ايضا تتميز الميزات تعطية قوة ومتانة

للعناكب اشكال شباك مختلفة كشباك القبة dome spider او عنكبوت النسج القمعي ,

او شباك العنكبوت سلمى الشباك Ladder- web –spider او عنكبوت الحديقة الصليبية

. Garden cross spider

لخيوط العنكبوت استخدامات عديدة في المجالات المختلفة ففي مجال الطب استخدمت لتضميد الجروح

وكذلك لعلاج وجع الاسنان وكذلك صنعت منها خيوط تستخدم في العمليات الجراحية وتكوين خيوط . العصب البصري الدقيقة (Hagn *et. al.* ,2010).كذلك تستخدم خيوط العنكبوت في صناعة شباك

الصيد وذلك لقوتها ومتانتها أما في المجال العسكري استخدمت حديثا في صناعة دروع لا يخترقها الرصاص وكذلك في الهند واليابان صنعت منها ملابس حريرية فاخرة (Mona *et. al.*,2011)

عزل الباحث Iwai *et. al.* (2009) 1,159 سلالةمن الاكتينوميستات من خيوط ومواد عنكبوتية أخري

بعضها عبارة اكتينوميستات خيطية وأخري غير خيطية. أثبت هذا الباحث أن نوع وشكل الخيوط والبيئة الموجودة بها العنكبوت تتحكم في الأجناس والأنواع البكتيرية المعزولة منها.

في هذا البحث عزلت أجناس بكتيرية وعرفت موروفولوجيا واستخدمت في المكافحة الحيوية ضد معزولات فطرية وبكتيرية شملت فطر فيوزاريوم اوكسيسبوريوم وبكتيريا كلبسيلا .

مصطلح المكافحة الحيوية يعني استخدام كائن حي أو جين أم منتج جيني لتقليل اثر الكائنات المتطفلة ومكافحة الأمراض حسب ما عرفها الباحث المليجي وزكية (1418هـ). تستخدم كائنات دقيقة

فطرية أو بكتيرية وأجزاء من النباتات لمكافحة الفطريات مثل بكتيريا الباسيلس والاستربتوميسس

(Kamil,et. al.,2007 and Arifuzzaman *et.al.*,2010) .

الهدف من الدراسة

نسبة للفوائد المهمة لخيوط العنكبوت ودورها في المجال الطبي من خلال الاستخدمات الفطرية علي المستوي الشعبي , لذلك تهدف هذة الدراسة إلي الأتي:

1- عزل وتعريف البكتيريا الموجودة بشبكة العنكبوت إعتمادا علي الصفات المورفولوجية.

2- إستخدام العزلات البكتيرية في المكافحة الحيوية ضد معزولات فطرية وبكتيرية متطفلة .

3- تفسير فعالية خيوط العنكبوت في التئام الجروح وتخفيف الم الأسنان , وتمليك الباحثين بالنتائج العلمية التي تساعدهم في ابحاثهم.

4- اختيار عوامل مكافحة حيوية مناسبة للقضاء علي الكائنات الممرضة ومعرفة الية المكافحة الحيوية لوضع استراتيجية مثلي في اختيار العوامل المكافحة الصديقة للبيئة.

الفصل الثاني

الأبحاث السابقة

Historical Reviews

الأبحاث السابقة

Historical Reviews

تعتبر خيوط العنكبوت مهمه لإستخدامها في المجالات المختلفة ولاحتوائها علي أجناس و انواع بكتيرية تستخدم في المكافحة الحيوية ضد أجناس فطرية وبكتيرية متطفلة مثل فطر الفيوزاريوم *Fusarium* sp. وبكتيريا *Klebsiella* sp. (Iwai *et. al.* 2009) .

2. 1. الأجناس البكتيرية التي تعيش بشبكة العنكبوت Genus of Bacteria associated with Spider Web

عزل (Iwai *et. al.* 2009) 239 معزولة بكتيرية تنتمي لمجموعة الاكتينوميستات غير الخيطية من خيوط وكيوتكل وبيض العنكبوت الباحثون وكانت كل المعزولات البكتيرية تابعة لتحت الرتب Micrococcineae, Frankineae and Propionibacterineae, وتوصلوا إلي أن هذة المواد العنكبوتية تعتبر بيئة ملائمة لنمو الاكتينوميسيتات الغير خيطية أكثر من التربة. كذلك عزلوا اكتينوميستات خيطية بنسبة 74.4% من كل الاكتينوميستات المعزولة. أكثر جنس تم عزله كانت بكتيريا *Streptomyces* sp. بنسبة 33% بين كل المعزولات .

2.2 الاكتينوميسيتات Actinomycetes

تسمى البكتيريا الخيطية وهي ارقي انواع البكتيريا , وتعتبر حلقة إتصال بين مجموعة البكتيريا وحيدة الخلية والفطريات الحقيقية . ضمت الاكتينوميسيتات للبكتيريا الحقيقية لانها بدائي النواة وموجبة لصبغة الجرام وتصاب بالفيروسات البكتيرية وتتاثر بالمضادات الحيوية البكتيرية. تضم افراد مترممة وانواع و متطفلة وأخري تتكافل مع النباتات الزهرية. وأهم الأجناس التابعة لها الCorynebacterium Mycobacterium sp., Nocardia sp. ,Actinomyces Streptomyces.

(متولي, 2005).

1.2.2 بكتيريا ستربتوميسيس Streptomyces

جنس Streptomyces تنتمي لمجموعة الأكتينوميسيتات و أفرادها عبارة عن بكتريا موجبة لصبغة الجرام تعيش حرة مترممة واسعة الانتشار في التربة والماء كما تغطي النباتات . لها صفات مورفولوجية وكيميائية مختلفة (Godfellow and Donell, 1989).

بكتريا ***Sterptomyces* sp.** موجبة لصبغة الجرام تظهر علي هيئة خيوط طويلة ومتفرعة وتسمي الكتل الخيطية وتتميز بترتيب الجراثيم الكونيدية علي الخيوط الهوائية، الصفات المورفولوجية تتمثل في شكل المستعمرات الكروية أو البيضاوية ، الحواف ملساء أو مجعدة او جذرية . الهيفات هوائية ومنبطحة ، الهوائية منها متفرعة تحمل جراثيم تتخذ الهيفات الهوائية شكل خطافي أو لولبي ، لونها ابيض أما الهيفات المنبطحة لا تتجزأ ولونها يتراوح بين الابيض والرمادي الداكن تتميز أجناس بكتريا الاكتينوميسيت وخاصة جنس Streptomyces بقدرتها الفائقة علي انتاج مركبات بيولوجية نشطة ، منها نصف الإنتاج الكلي للمضادات الحيوية اذ تعتبر اكبر مصدر لإنتاج المضادات الحيوية بالاضافة لمواد تمثيل غذائي ثانوية والتي لها تطبيقات طبية ضد العوامل المسببة للسرطان (Stefka *et al.*,2006) كما تلعب دور هام في مجالات الأدوية (Bibb,200). وفي كوريا سجل الباحث Rhee,2003 مقدرة بكتريا Streptomyces علي انتاج مضادات فطرية قوية واستخدمت للقضاء علي فطر ***Pyricularia oryzae***. كذلك اثبت الباحثون Arifuzzaman *et.al.*,(2010) Joo, (2005) مقدرة بكتريا الاكتينومسيتات علي إنتاج مضادات فطرية واسعة النطاق تكافح العديد من الفطريات .

2. 3. البكتيريا المتجرثمة الإختيارية The Facultative anaerobes Spore -Bearers

تضم مجموعة كبيرة من الأنواع البكتيرية المتجرثمة , معظمها تعيش في التربة وفي الخضروات وبقايا الحيوانات المتعفنة. معظم بكتيريا الباسيلس مترممة إلا أن هنالك أنواع متطفلة مثل بكتيريا باسيلس *Bacillus anthrax* التي تصيب الحشرات وهنالك نوع واحد يصيب الإنسان ويسبب مرض آنثيراكس

الجمرة الخبيثة . الأنواع النافعة منها أكثر من الأنواع الضارة .

بكتيريا الباسيلس عصوية متجرثمة موجبة لصبغة الجرام هوائية إختيارية , لها مزارع لونها كريمي أو ابيض, وشكلها مسطح أو مرتفع يشبه القبة , موجبة للكاتليز (Claus, D. and Berkeley, 1996).

أهم أنواعها. *Bacillus subtilus, B. licheniformis, B. circulans, B. amyloliqufíciens,*

B .thermophilous.

بعضها تستخدم في كثير من المجالات الطبية والصناعية تنتج مضادات حيوية بكتيرية و البعض انزيمات تكافح الفطريات الفطريات (Abou-Zeid et.al.,2009)الآخرينتج

4.2. الفيوزاريوم *Fusarium spp.*:-

ينتمي فطر الفيوزاريوم لشبه الفصيلة الثيوبركيولارية والتي يتصف افرادها بالتراكيب المميزة . لاطوارها اللاجنسية تعرف بالوسائد الجرثومية وهي عبارة عن حشيات ثمرية في صورة وسائد ذات ألوان زاهية . تتكون الكونيدات داخل هذه الوسائد علي أعناق قصيرة للغاية بسيطة أو متفرعة وتتألف من عدة خلايا تسمي بالفاليدات تولد كل منها كونيدات مئتالية ولكنها ليست سلاسل بل تحاط بمادة هلامية . وتضم هذه الشبه فصيلة الكثير من أشباه الأجناس أهمها جنس فيوزاريوم وهو من اوسع الفطريات انتشارا في الطبيعة وتسبب أنواعه المتطفلة العديد من الأمراض للنباتات كذلك توفر العديد من الأنواع المترممة والتي تسكن في التربة وتسبب أمراض تعفن الجذور والسيقان (متولي ,2005) .

1.4.2 الأمراض التي يسببها فطر الفيوزاريوم *Fusarium* Diseases

يتسبب جنس الفيوزاريوم في إحداث العديد من الأمراض للنباتات . تختلف هذه الأمراض علي حسب نوع الـ***Fusarium*** المسبب للمرض . ففي مناطق عديدة في ايران سجل الباحث (2011),Akrami *et.al.* مرض الذبول الفيوزاريومي لنبات العدس والذي يسببه ***Fusarium oxysporum*** ,أيضا سجل هذا المرض لأفراد العائلة النجيلية في جزر الكناري .كماعزل الباحث Julio *et al.* 2010 فطر ***Fusarium oxysporum*** من أوراق نبات النخيل المصابة بمرض الذبول والذي ظهرت أعراضه كذبول غير متماثل في الأوراق .

وفي المملكة العربية السعودية سجلت الباحثة (2011),Muneera *et al.* مرض تعفن ثمار النخيل والذي يسببه فطر ***Fusarium moniliforme*** . أيضا عزل فطر ***Fusarium moniliforme*** في العديد من الحبوب في أنحاء مختلفة من العالم ويسبب هذا الفطر مرض لفحة السنابل للقمح والشعير والذرة الشامية (Akinsanmi et al. 2004)كذلك سجل هذا المرض بواسطة انواع اخري من فطريات الفيوزاريوم مثل ***F.graminearum*** وفي الباكستان عزلت العديد من فطريات الفيوزاريوم والتي تسبب مرض التعفن التاجي للجذور (IFtikar *et. al.*,2003).

كذلك عزلت الشمري (2008) فطريات ***F.poae ,.moniliforme and F.oxysporum***من حبوب القمح والشعير والذرة الشامية من مزارع مختلفة بالمملكة العربية السعودية بمنطقة حائل .

أيضا سجلت أمراض الذبول للعائلة البانجانية في أنحاء مختلفة من العالم وفي مصر سجل مرض الذبول لنبات السمسم والمسبب له فطر ***F.oxysporum*** كما سجل الباحث مديح(2006)أمراض مختلفة تسببها فطريات الفيوزرايوم في أنحاء مختلفة من العالم ففي مصر سجل إمراض الذبول للعائلة الباذنجانية ولنبات السمسم المسبب له فطر ***F.oxysporum*** كذلك سجل هذا الباحث مرض العفن الأحمر للعائلة

النجيلية والتي تظهر أعراضه علي الساق في منطقة الإغماد والمسبب له فطر ***F.moniliforme*** .
وسجل مرض الذبول الوعائي للعائلة الباذنجانية مثل الطماطم ، البطاطس، الفلفل و الباذنجان والذي يسببه فطر ***F.oxysporum*** وأيضا سجل أمراض اعفان الفيوزاريوم في الخضر والذي يسببه ***F.oxysporum F.equisti ,F.solani,F.semitietium*** في العراق سجل مرض خباس طلع النخيل والذي يسببه ***F.moniliforme*** .

2.4.2 . السموم التي يفرزها جنس الفيوزاريوم ***Fusarium*** fungicidal

السموم الفطرية عبارة عن منتجات طبيعية تكونها الفطريات كمخلفات تمثيل غذائي ثانوية والتي تنتج علي السلع الزراعية في الحقل والصوامع.

عالمياً سجلت إحصائيات بحوالي 25% من المحاصيل تتأثر بهذه السموم سنوياً ، Martin *et. al.*,2006)، يكثر تلوث المنتجات الزراعية والأعلاف بهذه السموم الفطرية في المناطق ذات الطقس المعتدل أي في المناخ المداري وشبه المداري (Krsh *et. al.*,2001) يسبب هذا التلوث مشكلة كبري ويزداد في المناطق المدارية وشبه المدارية نسبة لملائمة الظروف المناخية والتي تتلائم مع الطرق التقليدية البسيطة للزراعة والحصاد وطريقة التخزين الغير سليمة (Tirdo *et. al.*,2010).

معظم أنواع جنس ***Fusarium*** لها المقدرة علي إنتاج العديد من السموم الفطرية ، هذه السموم تودي إلي تلوث السلع الزراعية ومحاصيل الحبوب في أماكن زراعتها في كل أنحاء العالم . من أشهر هذه السموم الفيومازين Fumonisins والزيرليون Zearlenone والتي تنتجها العديد من أنواع جنس الفيوزاريوم علي رأسها ***F.moniliforme*** و تعتبر هذه السموم السابقة ذكرها من الخطورة بمكان فهي سموم مسرطنة تتسبب في إحداث الضرر بالأعضاء المختلفة مثل الكبد ، الكلي ،الرئتين والقلب والبنكرياس والذي ينتج عنه ارتفاع نسبة الوفيات (Ortoneda *et. al.*, 2002).

5.2 فصيلة انتربكتريسي Enterbactreiaceae

تضم هذة المجموعة عدد كبير من الأجناس البكتيرية العصوية , غير متجرثمة , تخمر الجلكوز وتنتج حامض أو حامض وغاز وموجبة لإنتاج انزيم الأوكسيديز.

تقسم الانتربكتريسي إلي قسمين هما المجموعة التي لاتخمر سكر اللاكتوز والقسم الثاني المجموعة التي تخمر سكر اللاكتوز وهي مجموعة الكوليفورم وتضم الأخيرة أجناس بكتيرية مثل

Escherichia, Klebsiella, Citrobacter, Proteus, Serratia and Enterobacter

.(Claus, D. and Berkeley, 1996)

1.5.2 بكتيريا كلبسيلا *Klebsiella* sp.

بكتيريا غير متحركة , موجبة للاندول عصوية سالبة لصبغة الجرام , المستعمرات لزجة في البيئات التي تحتوي علي كربوهيدرات تنتمي لمجموعة الكوليفورم والتي تلوث الماء وتسبب نزلات معوية وتسبب للانسان امراض عديدة مثل الالتهاب الرئوي والتهاب الكبد والمجاري البولية وتعفن الدم بالإضافة إلي امراض أخري (Claus, D. and Berkeley, 1996)

6.2. المكافحة الحيوية Biological control

للتخلص من الفطريات المرضية استخدمت طرق مختلفة للقضاء عليها فاستخدمت المبيدات الكيميائية لمعالجة الفطريات ، لكن ظهرت سلبيات لهذه المبيدات الكيمائية بالإضافة إلي تكاليفها الباهظة من الناحية الاقتصادية فهي ملوثات البيئة والتي توثر سلبا علي الإنسان والحيوان ، كما أن بعض الفطريات تظهر مقاومة لهذه المواد (Calhelha *et al.*2006, Haggag and Mohamed *et al.*,2007) لذلك فان معظم التوجهات الحالية في مجال مقاومة الفطريات الضارة تقوم علي إيجاد طرق ووسائل بديلة للمكافحة الكيميائية . فاستخدمت كائنات حية دقيقة مجهرية وأنسجة ومستخلصات نباتية .

توجد الكائنات الدقيقة المجهرية في كل بيئات النبات ويقصد بها الكائنات التي يمكن استخدامها لمكافحة الكائنات الممرضة للنبات وسواء كانت فطرية ام بكتريا أو اكتينوميسيتات فأينما وجدت الكائنات الممرضة يوجد معها في الغالب أعداء طبيعيون سواء في التربة ام علي سطوح الجذور والسيقان والأوراق والبذور لكن قد لا تكون بالأعداد الكافية لوقف نشاط الكائن الممرض ، ومهمة الباحث هي التعرف علي هذه الكائنات

وإكثارها واستخدامها لمجابهة الكائنات الممرضة (Papavizas,1992).

1.6.2. أستخدام المستخلصات النباتية: Use of plant tissues and extracts

استخدمت المستخلصات النباتية كبديل للمبيدات الكيميائية ففي الباكستان استخدم الباحث Khan *et. al.* (1973), نبات النيم لمكافحة العديد من الأجناس الفطرية مثل ***Fusarium oxysporm ,Alternaria*** ***Curvularia tubertcutate, Helminthosporium tenis,*** وفي العام 1995 اثبت الباحث Locke التأثير الفعال لزيت النيم بتركيز (2-10%) في مكافحة فطريات *Fusarium oxysporum* ، *Aspergillus niger* و *Alllternaria alternata* كما اثبت الباحثان (Agbenin and Marley,(2006 ان المستخلص الجاف للنيم يقضي تماما علي نمو ميسلوم فطر ***Fusarium oxysporum*** عند كل التراكيز المستخدمة .

كما أثبت الباحثان (2010), Zarafi and Moumoudou فعالية مستخلص اوراق وبذور النيم في الماء البارد عن المستخلص في الماء الساخن في القضاء علي الفطريات.

2.6.2 المكافحة الحيوية باستخدام الفطريات Biological control using Fungal cells:

في دراسات عديدة أجراها الباحث Paultiz,(2001) اوضح فيها امكانية تقليل الاضرار الناجمة عن الفطريات الممرضة الساكنات التربة (Soil-born fungi) بالنسبة لامراض اعفان الجذور والذبول وذلك باستخدام فطريات التربة التي لها علاقة تطفلية مثل. *Trichoderma* sp and *Gliocladium* sp., علي الفطريات الضارة المسببة للامراض مثل *Penicillium* *Sclerotina sclerotirum*

Rhizotonia solani,Selertium yoifsil و*Fusarium*, وانواع من جنس *Pythium* spp. كما اوضح هذا الباحث انه من خلال العشرة سنوات الماضية اعدت ما يقارب ثمانين منتجاً حيوياً فطريا وبكتريا يستخدم في المكافحة الحيوية و في جميع أنحاء العالم في ايران استخدم الباحثون Akrami *et al.* (2011), انواع مختلفة من جنس *Trichoderma* sp. في مكافحة فطر *Fusarium oxysporum* المسبب لمرض الذبول الفيوزارمي لنبات العدس فاستخدموا هولاء الباحثون فطريات *T.vivens* , *T.asperellum* ,*T. hazianum* كل علي حدة مرة ثم متحدة مع بعضها لمكافحة هذا المرض واثبتوا فعالية هذه الفطريات

مع بعضها في المكافحة عن استخدامها مفردة.

3.6.2 المكافحة الحيوية باستخدام البكتريا Biological control using Bacteria

استخدمت أجناس مختلفة من البكتريا في مكافحة العديد من الأجناس الفطرية ومن هذه الأجناس البكتيرية *Bacillus cereus*-28-9 و *B.subtitis* (Nourozian *et al.* ,2006) والتي استخدمت لمكافحة فطريات, *Botrytis elliptica*, *Fusarium oxysporum* علي التوالي كما استخدمت أجناس كثيرة من بكتريا الاكتينوميسيتات وعلي رأسها بكتريا *Streptomyces* sp. لمكافحة العديد من الأجناس الفطرية مثل *Fusarium oxysporum* الذي تم مكافحته ببكتريا *Streptomyces olivaceus,* (Anitha and Rabeeh,2009) *Streptomyces* وفي اليابان استخدم الباحثون (Nourozain *et al.* ,(2006 بكتريا*Streptomyces* , *Bacillus subtitis* و*Pseudomonas fluorescens* في مكافحة مرض لفحة السنابل والذي يسببه فطر *Fusarium oxysporium*

الفصل الثالث

المواد والطرق

Material and Method

المواد والطرائق

Material and Method

١,٣ المواد: استخدمت في هذه الدراسة بعض المنابت الفطرية منها:

* **بيئة اجار المولت:** ٣٠جرام موت، ١٥جرام اجار و لتر ماء مقطر.

*محلول هيبوكلوريت الصوديوم(الكالسيوم) تركيزه ٥,٠,

تم تحضيره من كلوركس تجاري تركيزه ١٠%.

اما المنابت البكتيرية شملت الأتي :

* **بيئة الاجار المغذي** تتكون من 1جرام مستخلص لحم ، 2جرام مستخلص خميرة ، 5جرام ببتون ، * 5جرام كلوريد الصوديوم ، 15جرام اجار ولتر ماء مقطر .

بيئة آجار الايوسين وأزرق المثيلين والتي تتكون من ببتون ١٠جرام ، لاكتوز ١٠ جرام ، ٢جرام ثنائي البوتاسيوم احادي الهيدروجين الفوسفاتي ، ٠,٦٥ جرام أزرق الميثلين، ٠,٤ جرام ايوسين و١٥ جرام آجار في لتر ماء مقطر.

٢- ٣ جمع العينات Collection of samples

جلب فطر فيوزاريوم اوكسيسبوريوم*Fusarium oxysporium* من عينة نبات حمص مصاب وبكتيريا.sp *Klebsiella* من أحدي مختبرات التحاليل الطبية بمدينة عطبرة .

٣- ٣ - المواد الكيميائية Chemicals

كل المواد الكيميائية المستخدمة من نوع مستوي آنالار(Analar grade) أو ما يعادله،

وكل البيئات من شركة اوكسيد (Oxoid Chemical Company) وبعض البيئات تم تحضيرها بالاستعانة بمرجع (Harrigan and McCance, 1966).

٢,٣ عزل البكتيريا الموجودة بخيوط العنكبوت Isolation of Bacteria from Spider Threads

جمعت شباك عنكبوت من كلية التربية – جامعة وادي النيل وعقمت بكحول إيثانول ثم غسلت بماء مقطر معقم وزرعت في بيئة الآجار المغذي بعد تعقيمها بواسطة جهاز الاوتوكلاف عند درجة حرارة ١٢١°م وتحت ضغط ١٥ رطل / بوصة^{٢} ثم صبت في اطباق بتري وبعد تصلبها زرعت العنكبوت وحضنت في حضانة عند درجة حرارة ٣٠°م لمدة عشرة أيام. بعد ذلك تم فحص الاطباق حرارة البكتيرية

وحضرت شرائح وعرفت البكتيريا علي أساس اصفات المورفولوجية.

٣-٣ عزل فطر فيوزاريوم من عينة الحمص Isolation of Fusarium oxysporium

جهزت بيئة آجار المولت وعقمت كما في التجربة (٢,٣) وصبت علي الاطباق حتي تصلبت. بعد ذلك نقلت اليها قطعة صغيرة من العينة المصابة وزرعت بمنتصف الطبق وحضنت في حضانة عند درجة حرارة °م٢٨ لمدة ٥ أيام ثم فحصت الاطباق وحضرت شرائح وعرف الفطر.

٤,٣ تنشيط بكتيريا الكلبسيلا Activation of *Klebsiella* sp.

جهزت بيئة آجار الايوسين وأزرق الميثلين وعقمت بواسطة جهاز الاوتوكلاف وصبت بالاطباق ثم نقلت اليها مزرعة البكتيريا لتجديدها وتنشيطها حيث حضنت في حضانة عند درجة حرارة ٢٨م° لمدة ٣ أيام.

٥,٣ الأثر التضادي لبكتريا *Streptomyces sp.* وبكتيريا Bacillus sp. علي نمو فطر الفيوزاريوم *Fusarium oxysporium* وبكتيريا كلبسيلا *Klebsiella* sp

استخدمت طريقة المزارع الثنائية (أقراص الاجار) زرعت بكتريا الStreptomyces sp في بيئة الاجار المغذي وحضنت عند درجة حرارة 28مْ لمدة 4أيام بتكرار 3مرات ثم اختبر قرص من مزرعة بكتريا Streptomyces sp قطره 6 ملم باستخدام ثاقب فليني نقل هذه القرص تحت ظروف التعقيم إلي طبق أجار محتوي علي بيئة (آجار المولت) المحتوي علي مزرعة لفطر ***Fusarium oxysporium*** بحيث تكون البكتريا عند احد طرفي البيئة وفطر***F usarium oxsporium*** عند الطرف الآخر كما جهز طبق بفطر ***Fusarium oxysporium*** فقط واستخدم كضابط حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28±2م لمدة 4-8أيام. قيست درجة التضاد الحيوي بقياس المنطقة التي لم يحدث بها نمو كما وصفها الباحثان Acar and Goldstein ,1996 كررت هذه التجربة مع بكتيريا ***Klebsiella*** sp . أجريت هذة التجربة ايضا لمكافحة فطر الفيوزاريوم اوكسيسبوريوم وبكتيريا كلبسيلا وفيها استبدل العامل

المكافح(بكتيريا ستربتوميسس) ببكتيريا باسيلس. كذلك استخدمت طريقة أخري جهزت نفس البيئة السابقة وكل العوامل الأخري ،الإختلاف فقط في وضع المزرعة للبكتيريا المكافحة فبعد نموها لمدة ٤ أيام أخذت مزرعة بطول البيئة قطرها ٢ملم ووضعت بمنتصف بيئة النمو المحتوية علي الفطر مرة وعلي البكتيريا مرة أخري كل علي حدة علي جانبي العامل المكافح حسب ما وصفها الباحث Arifuzzaman *et.al.*,(2010) .

الفصل الرابع

النتائج

Results

النتائـــــج Results

أجريـــت هـــذه الدراسة على خمس عينات من خيوط العنكبوت جمعت من كلية التربية بجامعة وادي النيل وتم اجراء التجارب بمختبر الكائنات الدقيقة بقسم علوم الحياة .

١,٤. عزل وتعريف البكتيريا Isolation of Bacteria

عزلت اجناس مختلفة من البكتيريا من خمس عينات عنكبوت جمعت من جهات مختلفة بكلية التربية وأعطيت الرموز ش١ ،ش٢ ش٣ ش٤ وش٥ ورصدت النتائج بجدول (١) والذي يوضح أن البكتيريا المعزولة كانت عبارة عن ثلاث أجناس ستربتوميسس وباسيلس واللتان وظهرتا في اربع عينات اما الجنس الثالث فكان ميكرومونوسبيريوا والتي عزلت من العينة ش١ فقط.

زرعت البكتيريا المعزولة في بيئة الآجار المغذي لتنقيتها وعرفت المعزولات البكتيرية علي اساس الصفات المورفولوجية للمزارع واشكال الخلايا البكتيرية وذلك باستخدام المجهر الضوئي ولوحة (١ و ٢).

2.4 . عزل وتعريف فطر الفيوزاريوم Isolation and Identification of *Fusarium* sp.

عزل فطر الفيوزاريوم من عينة الحمص التي جلبت من محطة أبحاث الحديبة وعرف الفطر مورفولوجيا

وكان نوع الفيوازريوم هو *Fusarium oxysporium* لوحة (٣).

3.4 التأثير المضاد لبكتيريا *Streptomyces* sp. وبكتيريا ال *Bacillus* sp. علي نمو فطر *Fusarium oxysporium* وبكتيريا *Klebsiella sp.*

شملت المعزولات *Klebsiella sp.* و *F.oxysporum* التي زرعت علي بيئة المولت آجار للفطر وبيئة الآجار المغذي للبكتيريا باطباق بتري في صورة مزرعة ثنائية فزرعت معزولات *Fusarium sp* بمنتصف الطبق وزرع حولها علي الحواف مرة بكتيريا ستربتوميسس ومرة أخري بكتيريا الباسيلس كما زرع بمنتصف طبق اخر فطر الفيوزاريوم فقط واستخدم هذا الطبق كضابط ، ، ثم لوحظ اثر **هذة الأجناس البكتيرية** علي نمو معزولات *Fusarium* sp. ورصدت النتائج التي توضح الأثر الفعال لفطر *Fusarium* وانتشاره علي سطح البيئة .

كما دعمت هذه التجربة باختبار آخر تم فيه قياس طول قطر مزرعة *Fusarium* الموجودة في المزرعة الثنائية (*Fusarium+ Streptomyces*)و(Fusarium+ Bacillus) والمزرعة الأحادية (الضابطة)

ابتداء من اليوم الرابع حتي اليوم الثامن(بفترة زمنية 24 ساعة بين كل قراءة واخري) ورصدت النتائج بجدول (2) وشكل (1).

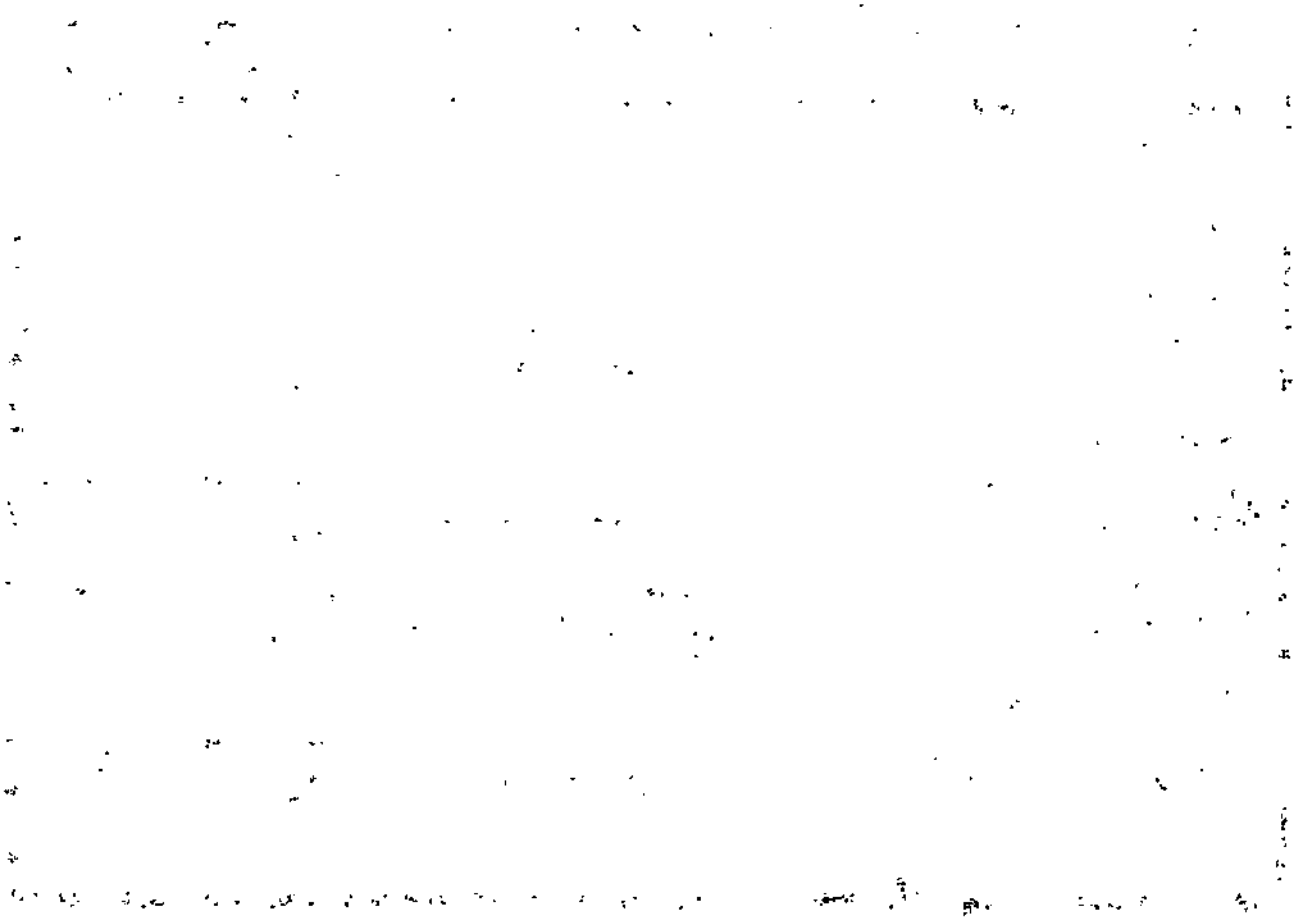
يوضح الجدول(2) تناقص قطر ***Fusarium* sp.** في حالة المزرعة الثنائية . ففي اليوم الرابع كان طول قطر فطر فيوزاريوم مونيليفورم 2,7 سم بينما في اليوم الرابع غطت مزرعة بكتيريا Streptomyces سطح البيئة لذلك تعذر قياس فطر ***F.oxysporum*** بينما كان طول قطر بكتيريا **Klebsiella** في اليوم الرابع 2,6سم وفي اليوم الثامن 5, سم أيضا حسبت النسبة المئوية لنقصان طول القطر ومثلت برسم بياني فطر

(شكل 1ولوحة ٤) الذي يوضح النسبة المئوية لنقصان الفطر في اليوم الخامس 44,4% لفيوزاريوم اوكسيبوريوم فكانت 100% ***F.oxysporum*** **اما بكتيريا Klebsiella فكانت النسبة المئوية لنقصان القطر في اليوم السادس 19.2 وفي اليوم الثامن 80.7.**

كررت هذة التجربة مع بكتيريا **Klebsiella وفطر فيوزاريوم و التي تم فيها مكافحتهما باستخدام *Bacillus*** ورصدت النتائج بجدول (3) وشكل(2ولوحة ٥) . توضح النتائج أثر بكتيريا الباسيلس بكتيريا **sp.**

علي نمو فطر الفيوزاريوم إذ تناقص القطر في المزرعة الثنائية فكان في اليوم الرابع ٢,٧سم بينما في اليوم الثامن ٠,٦ سم والنسبة المئوية لنقصان الفطر تراوحت بين ٢٢,٢ في اليوم الخامس إلي ٧٧,٨ % في اليوم الثامن . اما بالنسبة لبكتيريا كلبسيلا فكان القطر ٢,٣سم فاليوم الرابع وتناقص إلي ٠,٥سم في اليوم الثامن

والنسبة المئوية لنقصان الفطر تراوحت بين ١٤,٧ في اليوم الخامس إلي ٧٨,٧% في اليوم الثامن. في اللوحات ٤ و٥ يظهر الأثر الفعال لبكتيريا ستربتوميسس وبكتيريا الباسيلس في مكافحة فطر الفيوزاريوم وبكتيريا كلبسيلا . بكتيريا ستربتوميسس كانت أكثر فعالية إذ كافح الفطر بنسبة١٠٠% في اليوم الثامن



جدول (1) يوضح الأجناس البكتيرية المعزولة من عينات خيوط العنكبوت

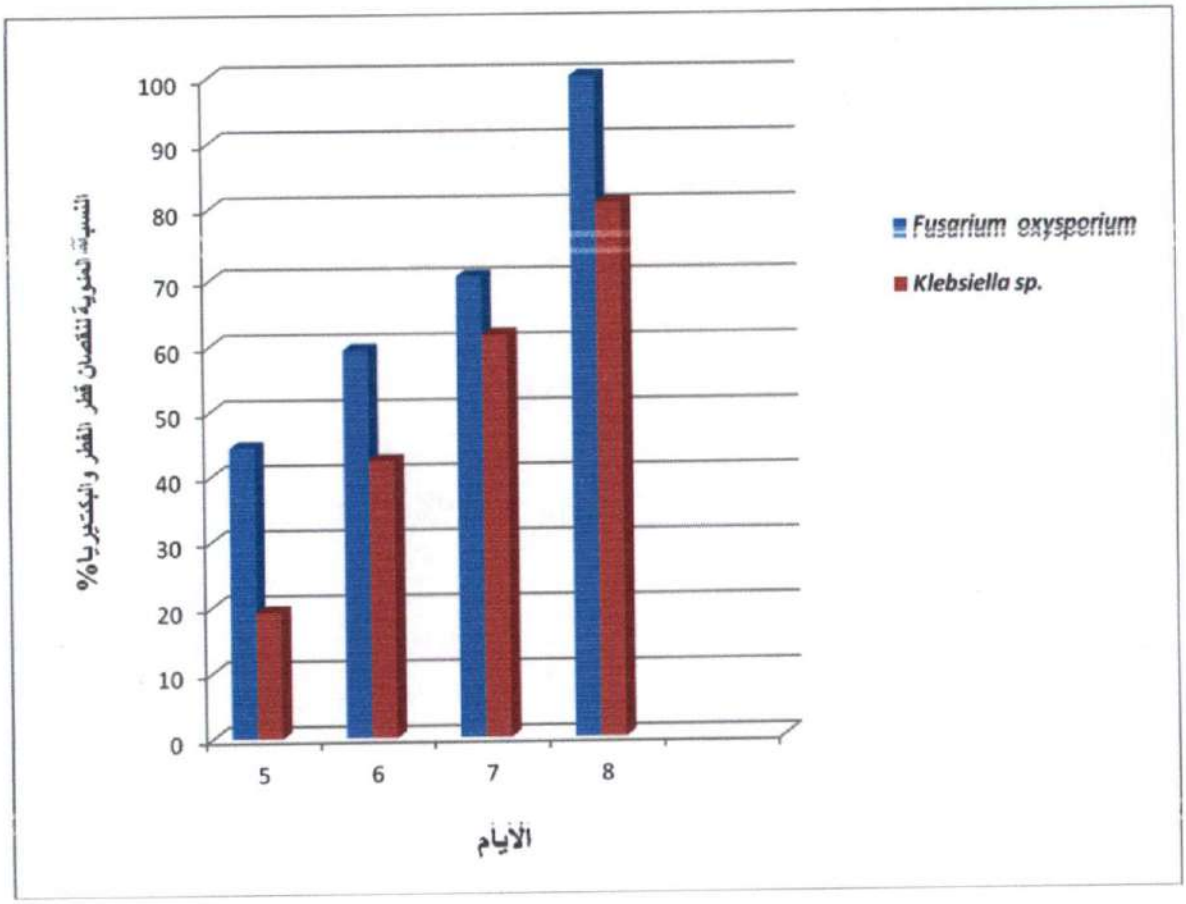
رقم المتسلسل	العينات	المصدر	البكتريا المعزولة
1	ش1	كلية التربية جامعة وادي النيل	*Streptomyces sp.* *Bacillus sp* *Micromonospora sp*
2	ش2	كلية التربية جامعة وادي النيل	*Streptomyces sp.* *Bacillus sp*
3	ش3	كلية التربية جامعة وادي النيل	*Streptomyces sp.*
4	ش4	كلية التربية جامعة وادي النيل (مبنى الإدارة)	*Bacillus sp* *Streptomyces sp.*
5	ش5	كلية التربية جامعة وادي النيل (مبنى الإدارة)	*Bacillus sp*

جدول (2): أثر بكتيريا *Streptomyces* sp. علي نمو معزولات من فطر الفيوزاريوم وبكتيريا Klebsiella sp.

الكائنات الممرضة	الأيام	طول قطر الفيوزاريوم في المزرعة الثنائية *Fusarium* (mm.)	طول قطرالفيوازريوم وبكتيريا كليسيلا في المزرعة الأحادية (mm.) (control)	النسبة المئوية لنقصان قطر الفطر والبكتيريا (%)
F.oxysporium	4	٢,٧	٤,٥	
	5	١,٥	٤,٧	٤٤,٤
	6	١,١	٦	٥٩,٣
	7	٠,٨	٧,٢	٧٠,٤
	8	Zero	٩,٢	١٠٠
Klebsiella sp.	٤	٢,٦	٤,٥	
	5	٢,١	٤,٧	١٩,٢
	6	١,٥	٦,٣	٤٢,٣
	7	١,٠	٨	٦١,٥
	8	٠,٥	٨,٥	٨٠,٧

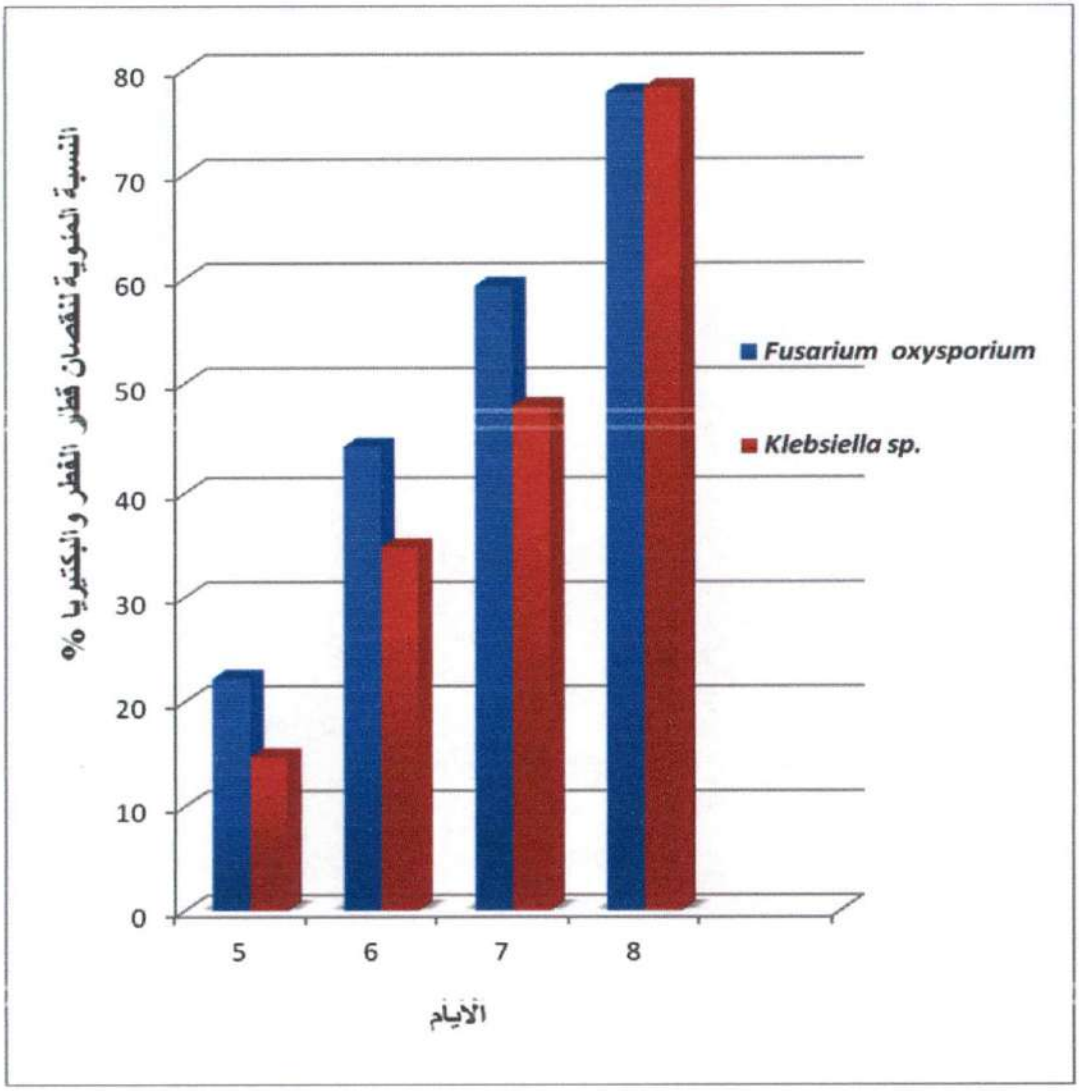
جدول(٣). أثر بكتيريا *Bacillus* sp. علي نمو معزولات من فطر الفيوزاريوم وبكتيريا sp. Klebsiella

الكائنات الممرضة	الأيام	طول قطر الفيوزاريوم في المزرعة الثانية *Fusarium* (mm.)	طول قطرالفيوازريوم وبكتيريا كلبسيلا في المزرعة الأحادية (mm.) (control)	النسبة المئوية لنقصان قطر القطر والبكتيريا (%)
F.oxysporium	4	٢,٧	٤,٥	
	5	٢,١	٤,٧	٢٢,٢
	6	١,٥	٦,٣	٤٤,٤
	7	١,٠	٧,٠	٥٩,٣
	8	٠,٦	٧,٢	٧٧,٨
Klebsiella sp.	٤	٢,٣	٤,٥	
	5	١,٥	٤,٧	١٤,٧
	6	١,٢	٦,٣	٣٤,٨
	7	٠,٨	٨	٤٧,٨
	8	٠,٥	٨,٥	٧٨,٣

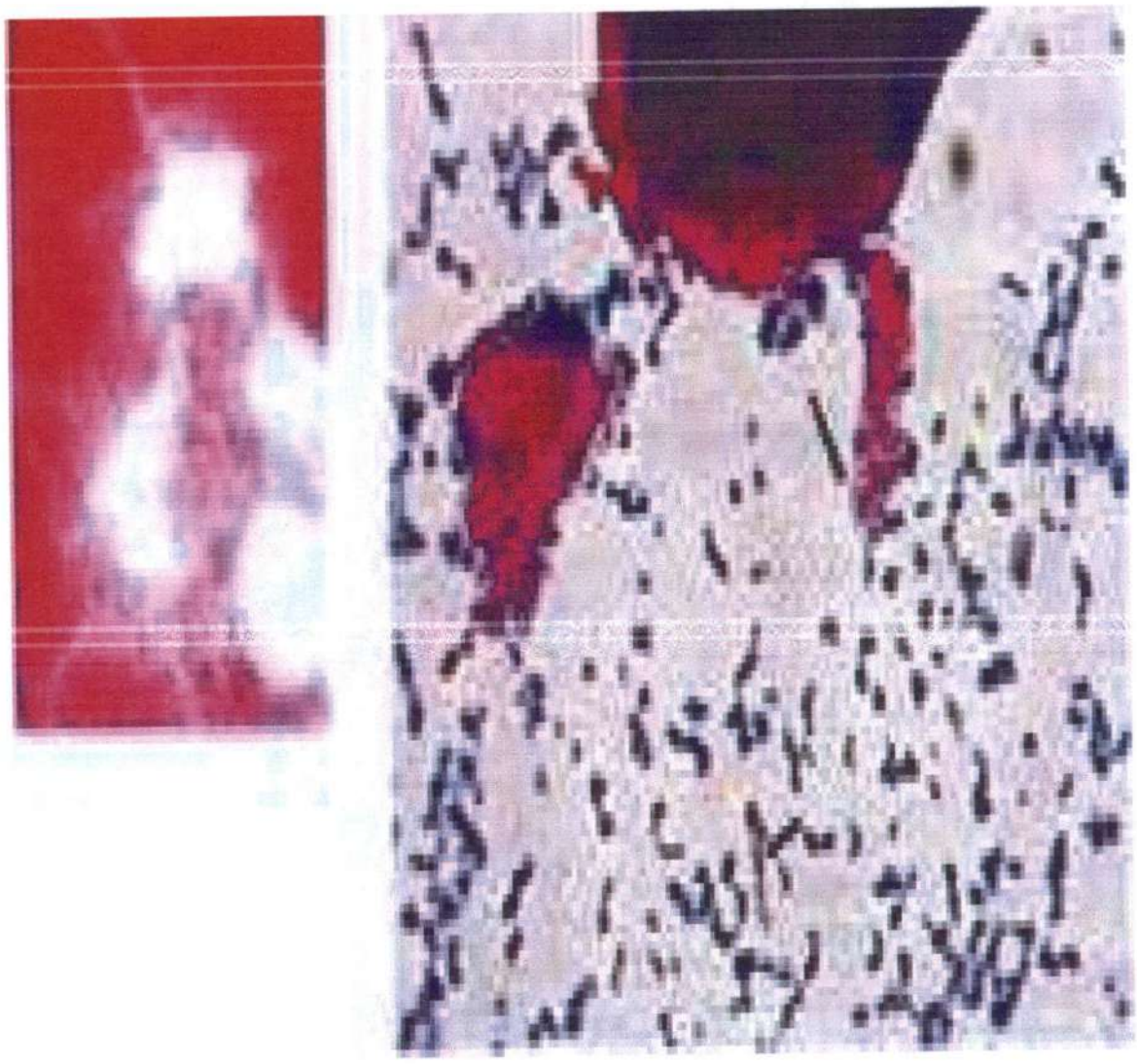


شكل (١) : تأثير بكتيريا *Streptomyces* علي نمو فطر *Fusarium oxysporium*

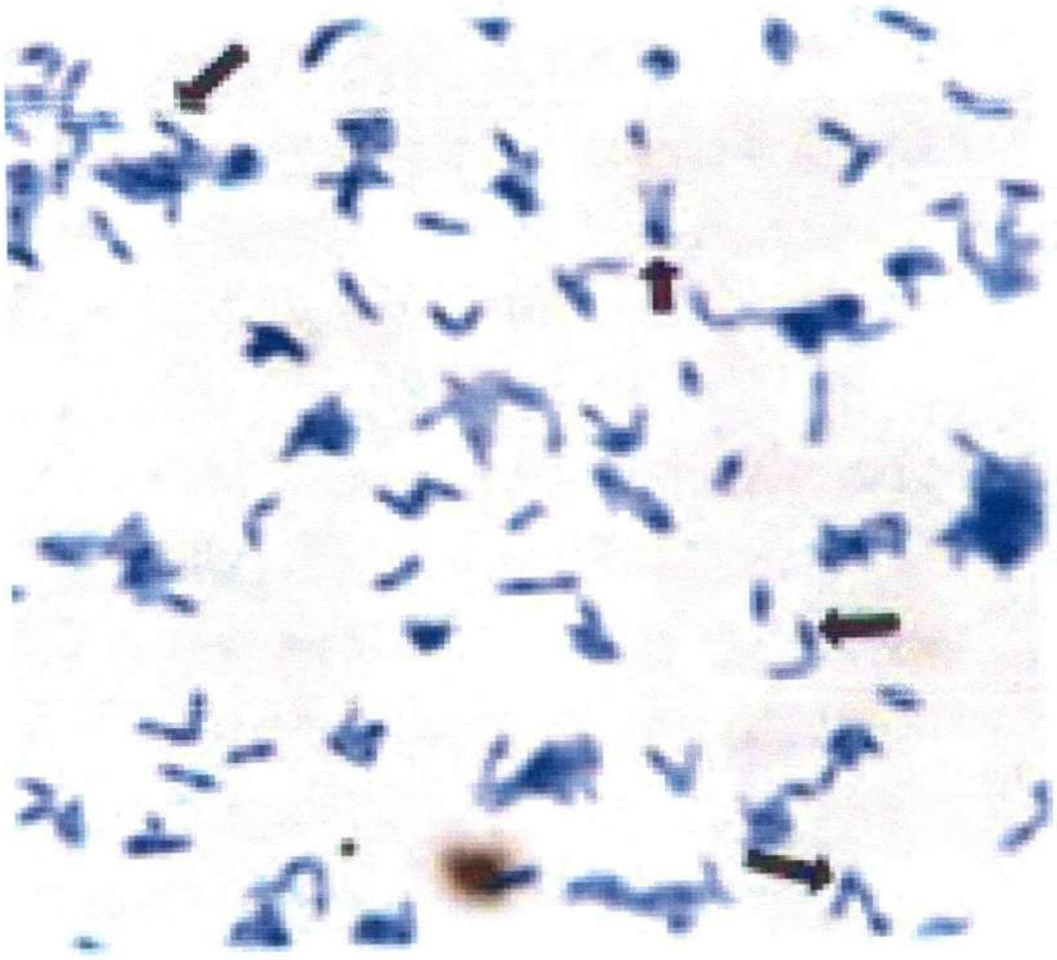
وبكتيريا *Klebsiella* sp.



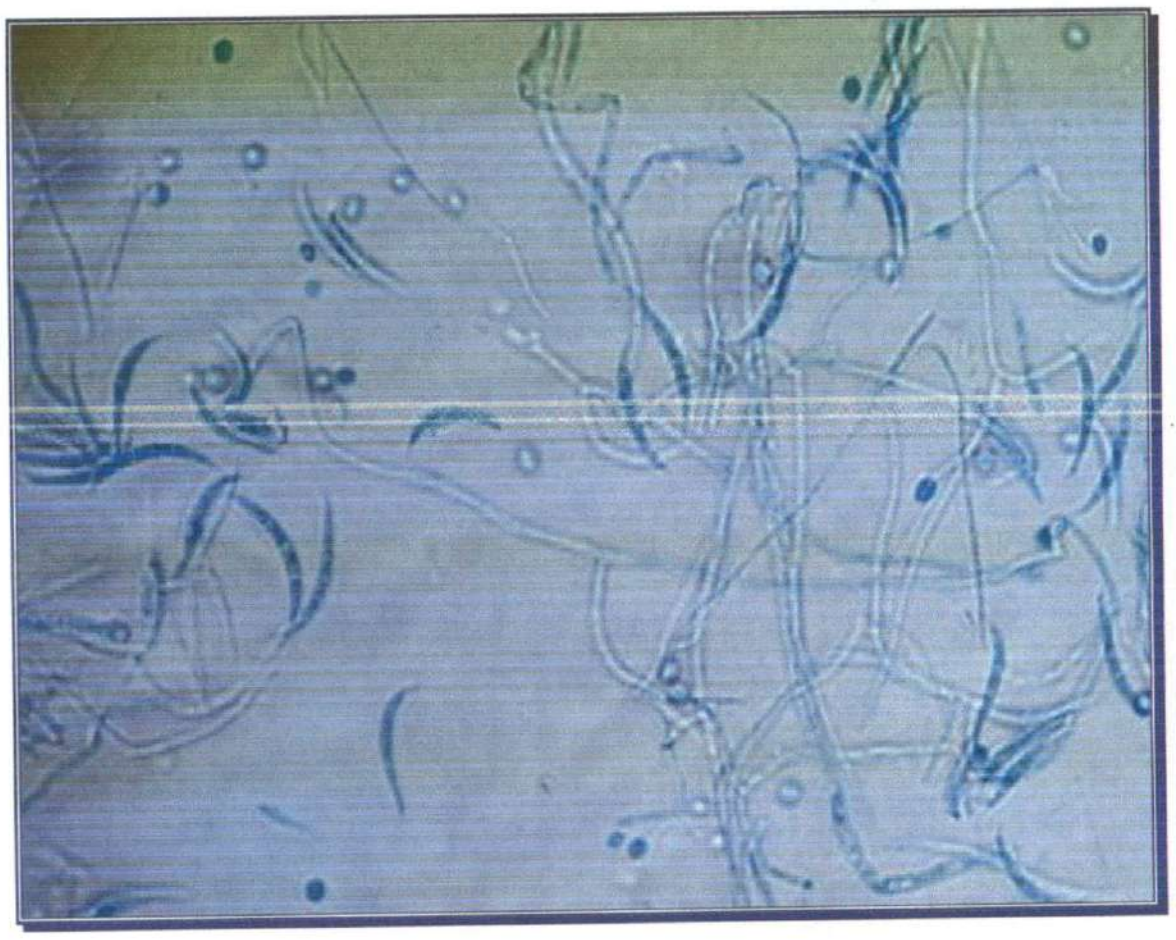
شكل (٢) : تأثير بكتيريا *Bacillus sp.* علي نمو فطر *Fusarium oxysporium* وبكتيريا *Klebsiella* sp.



لوحة (١) : توضح شريحة لبكتيريا *Streptomyces sp.*

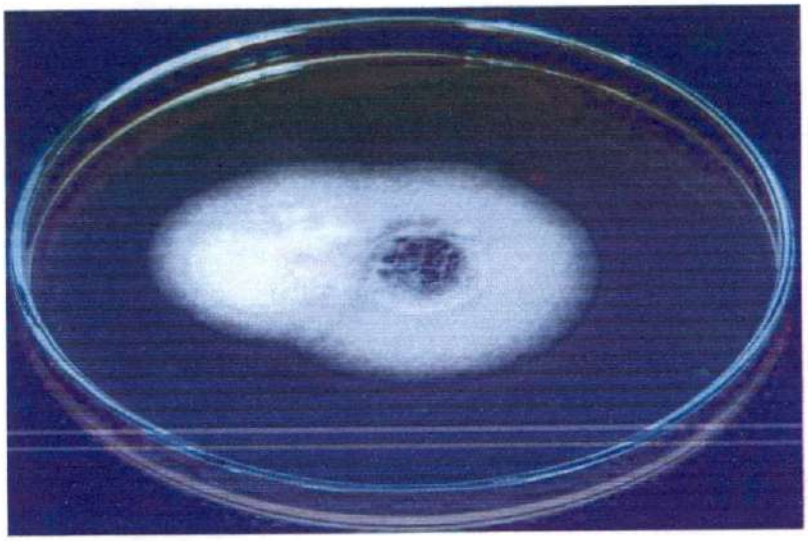


لوحة (٢) : توضح شريحة لبكتيريا *Bacillus* sp.

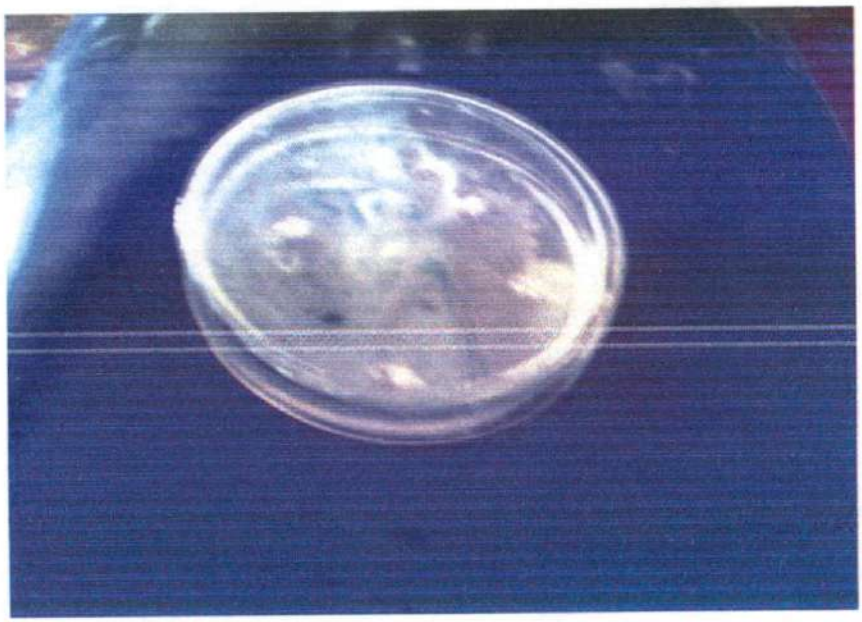


لوحة (٣) : شريحة لفطر *Fusarium oxysporium*

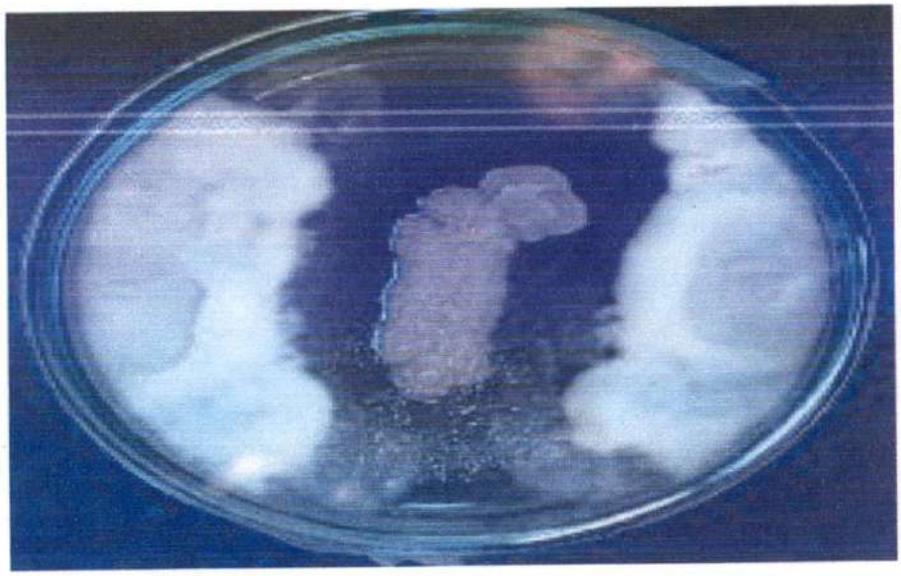
لوحة٤



(A)مزرعة لفطر الفيوزاريوم في المزرعة الاحادية كضابط



(B) أثر بكتيريا *Streptomyces* علي نمو فطر فيوزاريوم في المزرعة الثنائية



(C) أثر بكتيريا *Bacillus* sp. علي نمو فطر *Fusarium oxysporium*

لوحة ٥

(A) أثر بكتيريا *Streptomyces* علي نمو بكتيريا *Klebsiella* sp.

(B) أثر بكتيريا *Bacillus* sp. علي نمو بكتيريا *Klebsiella* sp.

الفصل الخامس

المناقشة
Discussion

تضمنت هذه الدراسة إجراء مسح بكتيري وعزل للأجناس البكتيرية الموجـودة بخيوط العنكبوت والتي تم عزلها من خمس عينات ورصدت النتائج وعرفت البكتيريـا على أساس صفاتها المورفولوجية . كل المعزولات البكتيرية كانـت تنتمـي لـثلاث أجناس هي Bacillus و Streptomyces و Micromonospora . عزل الجنـسين سترنتوميسس وباسيلس من أربعة عينات بينما ميكرومونوسبوريوا عزل من عينة واحدة فقط .

معظم أنواع بكتيريا الستربتوميسس والباسليس تم عزلها من التربة . ففي مصر عزل الباحثون .Hassan et.al ٦٠ نوع من بكتريا Streptomyces كلها عزلت من عينات مختلفة من التربة (2009) .

وفي بنغلاديش عزل الباحثون (2010) Arifuzzaman et .al ٥٥ جـنس ونوع من مجموعـة الاكتينوميـسيتات شـملت بكتيريـا ستربتوميـسس ونوكارديـا وميكرومونوسبورا . أما من شبكة العنكبوت Iwai et . al عزل الباحثون (2009) ١,١٥٩ مليون جنس ونوع من الأكتينوميسيتات منها ٢٣٩ من الأنواع الغيـر خيطيـة والباقي خيطي .

بالنسبة لبكتيريا الباسيلس فتم عزلها من التربة بواسطة مجموعة من Abou- ; Elham and Sirag (2009) Kamil et . al . و Zeid et . al , 2009 البـاحثين . (2007)

في تجربة المكافحة الحيوية اختبرت المعزولات البكتيريـة Streptomyces Bacillus لمكافحة فطر الفيوزاريوم وبكتيريا Klebsiella sp ، وتعتبـر المكافحـة الحيوية البديل الأمثل لمكافحة الفطريات الممرضة التي تعيش في التربة مثـل فطـر Fusarium وبكتيريا Klebsiella sp ومن مميزات العوامل الحيويـة فـي مكافحـة الكائنات الممرضة في أنها صديقة للبيئة غير مكلفة وآمنة في تأثيرهـا علـى البيئـة والإنسان والحيوان والنبات .

في هذه الدراسة أوضحت النتائج سيطرة Streptomyces على معزولات فطر Fusarium oxysporium

فبكتيريا ***Streptomyces*** sp. أوقفت النمو القطري لفطر ***F.oxysporum*** بنسبة 100% و٨٠,٧% لبكتيريا ***Klebsiella sp.*** في اليوم الرابع عشر علي التوالي هذه النتائج مطابقة لتلك التي تحصل عليها

الباحثان Fiume and Fiume **(2008)** في دراسة المكافحة الحيوية التي أجراها واستخدم فيها بكتريا ***Streptomyces sp. Bacillus,*** لمكافحة الفطريات المسببة الجذور الفلينية والتي أثبتت فعاليتها في وقف النمو القطري للفطريات الممرضة ، كذلك اثبت الباحثون Arifuzzaman *et .al.* (2010) فعالية معزولات أجناس من الاكتينوميسيتات مثل ***Streptomyces,*** ***Micromonospora*** و ***Nocardia*** في مكافحة عدد من الأجناس البكتيرية مثل سالمونيلا ، شجيلا و ***E. coli*** وغيرها من الانواع الأخري والتي أثبتت فعاليتها في القضاء عليها واعتبرت هذة البكتيريا لهل القدرة علي إنتاج مضادات بكتيرية واسعة المدي.

أما بكتيريا الباسيس ***Bacillus*** sp. اوقفت النمو القطري لفطر ***F.oxysporum*** وبكتريا ***Klebsiella*** sp.

بنسبة مئوية ٧٧,٨% و٧٨,٣% علي التوالي . أثبتت بكتيريا الباسيلس مقدرتها علي مكافحة البكتيريا والفطريات بنفس الكفاءة. كذلك اثبت الباحثون Kamil *et. al.* (2007) مقدرة بكتيريا ***Bacillus licheniformis*** and ***B. thuringiensis*** في مكافحة عدد من الأجناس الفطرية مثل ***Rhizoctonia solani, Macrophomina phasiolina, Fusarium culmorum , Pythium sp,*** ***Alternaria alternata and Sclerotium rolfsii***

تعيش بكتريا الـــ ***Streptomyces sp.*** وبكتيريا ***Bacillus*** sp. في التربة وهي معروفة بإنتاجها للمضادات الحيوية بالإضافة إلى ذلك تنتج إنزيمات ومواد أخرى ناتجة عن التمثيل الغذائي لها القدرة على تحليل وتدمير جدار الخلية الفطرية (Bafti *et al* , 2005) . يختلف تأثير البكتريا على المعزولات الفطرية المختلفة وهذه النتائج مطابقة لتلك التي تحصل عليها الباحث Nourozain *et al.*, 2006 والذي اختبر تأثير ثلاث انواع من البكتريا هي ***Bacillus Subtilis*** strain 53, ***Streptomyces*** Sp.strain3, Pseudomonas ***Flourescens biovs*** strain32 على فطر ***Fusarium grovminearum*** واثبت فعالية هذه الأنواع في إيقاف نمو هذا الفطر.

الخلاصـــــــة

أثبتت هذة الدراسة فعالية خيوط العنكبوت في معالجة الجروح نسبة لإحتوائها علي أجناس بكتيرية فعالة في مكافحة الفطريات والبكتيريا. فبكتيريا ستربتوميسس كانت أكثر فعالية من بكتيريا في مكافحة فطر الفيوزاريوم.

التـــــوصيات

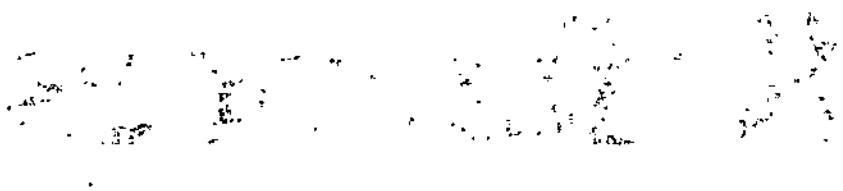
فتحت هذه الدراسة آفاق بحثية تتلخص في الأتي:-

١- مسح بكتيري لخيوط العنكبوت ومصادر أخري مثل التربة لتحديد الأجناس النتجة للمحللات الفطرية والبكتيرية

٢- عزل إنزيمات الكايتنيز والمضادات الحيوية البكتيرية والمواد الناتجة عن التمثيل الغذائي التي تحلل او تفكك جدار الخلية الفطرية والبكتيرية ومن ثم القضاء عليها.

٣- تصنيف عوامل المكافحة الحيوية والإنزيمات باستخدام تقنيات الأحياء الجزئية الحديثة

٤- اختيار عوامل مكافحة حيوية مناسبة في القضاء علي الكائن الممرض ومعرفة الية المكافحة الحيوية لوضع استراتيجية مثلي في اختيار العوامل المكافحة الصديقة للبيئة.



المراجـــــع

References

المراجـــــع الأجنبيـــــة

References

1. Abou-Zeid, M. Altalhi A. and Abd El-Fattah,D. (2009). Bacterial control of pathogenic fungi isolated from some wild plants in Taif Governorate, Saudi Arabia. *Mycopath* 7(1): 11-20 .

2. Agbenin, O.N and P.S. Marley. 2006. *In vitro* assay of some plant extracts against *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici,* causal agent of tomato wilt. *Journal of Plant Protection Research*, 46(3): 215-220.

3. Akrami M ., Golzary H . and Ahmadzadeh M .(2011). Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African Journal of Biotechnology* 10(14): . 2653-2658.

4. Arifuzzaman, M., Khatun2 M. and Rahman, H. (2010). Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. African Journal of Biotechnology 9(29): 4615-4619.

5. Bafti, S., Gholam, H., Aghighi, S., Biglari,S. Farrokhi, P. and Aghelizadeh, A. (2005). Biological control of Fusarium oxysporium f. sp. Melonis, the causal agent of root rot disease greenhouse cucurbit in Kerman province of Iran. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1 (1): 22-26.

6. Bibb, M.J.,(2005). Regulation of secondary metabolism in Streptomycetes. Current Opin. Microbiology, 8: 208-215

7. Calhelha, R.C., Andrade, J.V., Ferreira, I.C. and Estevinho, L.M. (2006). Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. Food Microbiology 23: 393- 398.

8. Claus, D. and Berkeley, P. C. W. (1986). Genus Bacillus In: "Bergey's Manual of systematic

9. Dong, M., X.J.He, P. Tulayakul, J. Y. and Dong K. S. (2010). The toxic effect and fate of ntravenously administrated zearlenone in goats. Toxin , 55: 532- 530.

10. Elham, Sh. and Ibrahim , S. (2009). Production of amylase by thermophilic isolates of *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans*. *SJBS* (B) 5: 9-19.

11. Fiume , G. and Fiume , F.(2008). Biological Control of Corky Root in Tomato. *Comm. Appl. Biol. Sci*, , 73(2) : 233-248.

12. Goodfellow, M. and A.G. O'Donnell, (1989). Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. Proceeding of the 44th Symposium on Society for General Microbiology, (SCGM'89), Cambridge University Press, Cambridge, pp: 343-383.

13. Haggag, W.M. and Mohamed, H.A.A. (2007). Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 1: 7-12.

14. Hagn F, Eisoldt, L.; Hardy, JG; Vendrely C. and Coles M. (2010) A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* 465:239–242

15. Harrigan, W.F. and Margaret, E. McCance, (1966)" Laboratory Methods in Microbiology". Pp.3-316. Academic Press London.

16.Hassan, M. , Kamal, Y.and AbdEl-Monaem, N.(2009). Isolation,Screening and Identification of Newly Isolated Soil S Streptomyces *(Streptomyces* sp. N for β - Lactamase Inhibitors Production. *World Applied Science Journal* 7 (5): 637 -646 .

17. Iftikar, S. Sultain, A. Munir, A. Iram, S. and Ahmad, T. (2003) Fungi associated with rice- wheat cropping system in relation to zero and conventional tillage technologies *Jourual of Biological Science,* 3(12): 1076- 108.

18. Iwai, K. Iwamoto; S. Aisaka K .;and Suzuki , M.(2009). Isolation of Novel Actinomycetes from Spider Materials. *Actinomycologica* 23 (1) : 8-25.

19. Joo, G.J. (2005). Production of an anti-fungalsubstance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in redpeppersby *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters* 27: 201-205.

20. Julio H., Ana E., Juan M. , Ana P., Maela L., Paloma A. and Josep A. (2010). Survey of

diseases caused by *Fusarium* spp. on palm trees in the Canary Island. *Phytopathology.Mediterr* 49: 84–88.

21. Kamil, Z. ,. Rizk, M,. Saleh, M. and. Moustafa, S. (2007). Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. *Global Journal of Molecular Sciences* 2 (2): 57-66

22. Krska, R., Baumgartner,S. and Josephs R. (2010). The state- of the art in the analysis of type A and B trichothecene mycotoxin in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 371: 285-299.

23. Martins, M.L.,Guerra, M.M. and Bernardo, F.(2006). Zearalenone, deoxyvalenol and fumonisions in mixed- feed for laying hens. *Mycotoxin Research*, 22: 206- 210.

24. Mona, W, Jan, J., Hedhammar, M .and Anna, R.(2011). Current progress and limitations of spider silk for biomedical applications. Biopolymers 97: (6), 468–478.

25. Muneera A., EL-Naggar M. A., Omer S. A., Eman M. A. and Ammar M. F. (2011). Effect of Toxic *Fusarium moniliforme* on Some Biochemical Component of Some Date Palm Cultivars. American Journal of Food Technology 6 (9): 730 – 741.

26. Nourozian J., Reza Etebarian H. and Khodakaramian G.(2006). Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. Songklanakarin Journal of Science Technolog . 28: 29-38.

27. Ortoneda, M., Capilla, J. pastor, F. Pouol, I. Guarro, J. (2002). Efficieny of liposomal amphotercin B in treatment of systemic murine fusariosis. Antimicrobial Agents Chemotherpy, 46: 2273- 2278.

28. Papavizas,G.C.(1992).Biological control of selected seed – borne plant pathogen with *Gliocladium* and *Trichodrma* In: "Biological Control of Plant Diseases (Tajamos,.E. Papavizas, G. C.Cook, and R. J.eds.). New York Plenum Press 223 – 230.

29. Paulitz, T. C. and Belanger, R. R. (2001). Biological control in green house system. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133.

30. Rhee, KI.(2003). Purification and Identification of an Antifungal Agent from *Streptomyces* sp. KH-614 Antagonistic to Rice Blast Fungus, *Pyricularia oryza*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(6): 984–98.

31. Stefka, A.N., T. Nikoleta and Y. Ljubomira, (2005). Taxonomy of *Streptomyces* sp. Strain B. *J. Culture Collection*, 4: 36-42.

32.Tirado, M.C., Clarke R., Jaykus, L.A., McQuatters-Gollop A. and Frank, J.M. (2010). Climate change and food safty: *A Review Food Research International*, 43: 1745-1765.

33. Werner, R . Udo C. and Juergen S. (2007) . Expression of spider silk and spider silk-like protein in potato and tobacco. In press 1-

34. Zarafi, A. and Moumoudou, U. (2010). In vitro and in vivo control of pearl millet midrib spot using plant extracts. *J. App. Biosci*. 35: 2287- 2293

المراجـــــع العربيـــــة

١- موضى الشمري (٢٠٠٨) مسح للفطريات المحمولة داخل بعض انواع الحبوب بمنطقة حائل. رسالة ماجستير

جامعة الملك عبد العزيز كلية التربية للاقسام العلمية – قسم النبات.

2- المليجي عبد الستار وزكية محمود (١٤١٨ هـ) أمراض القمح. الناشر دار المريخ النشر، الرياض المملكة العربية السعودية ص ٣٣- ١٢٨.

3- مديح محمد علي (٢٠٠٦) أمراض النبات. الناشر مكتبة اوزيريس القاهرة جمهورية مصر العربية ص ٢٧٦-397 .