التحميل مجانى
مجلة 14(3) 2017
مجلة بغداد للعلوم

DOI: http://dx.doi.org/10.21123/bsj.2017.14.3.0497

تقييم الفعاليةالحيوية المضادة لبعض البكتريا المرضية والأكسدة للايض الثانوي للفطر *Fusarium solani* المعزول من التربة

رشيد رحيم حتيت

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة ميسان، ميسان، العراق.

البريد الالكتروني: biorashed@yahoo.com

استلام البحث 2016/3/20
قبول النشر 2016/11/24

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص الفطر *Fusarium solani* من التربة المحلية وتنقيته وتنميته في وسط Potato Dextrose Agar واستخلص الراشح باستعمال المذيب اثيل استيت (Ethyl acetate) للحصول على الايض الثانوي الذي اظهر فعالية واضحة تجاه كلتا العزلتين القياسيتين *E.coli*(ATCC25922) و *S.aureus* (NCTC6571) والعزلات المرضية *K. pneumonia*, *S.pyogenes* , *S.typhimurium* باستعمال تقنية الانتشار بالأقراص وكانت أقطار مناطق التثبيط للايض الثانوي الفطري 24.0 ملم تجاه *E.coli* و31.5ملم تجاه*S.aureus*. و34.0 ملم تجاه *K.pneumoniae* و18.0 ملم تجاه *S.pyogenes* و33.5 ملم تجاه العزلة *S.typhimurium*. وكشف اختبار التركيز المثبط الأدنى minimal inhibitory concentration للمستخلص الفطري ان اقل تركيز مثبط تجاه العزلة *S.aureus* بلغ6.25 ميكروغرام/مل وكان اقل تركيز قاتل(minimal bactericidal concentration)أيضا تجاه العزلة *S.aureus* اذ بلغ 12.5ميكروغرام/مل.كما لم يظهر الايض الثانوي الفطري أي سمية تجاه كريات الدم الحمر للإنسان. وقد اختبرت الفعالية ضد تأكسدية للمستخلص الفطري من خلال قياس قابليتها على اختزال أيونات الحديد الثنائي (Fe II) وقد أظهرت نسب تثبيط عالية.إذ أن الايض المنتج من فطريات التربة يمكن أن يكون مصدرا بديلا للمضادات البكتيرية التجارية .

الكلمات المفتاحيه: الفعالية الضد بكتيرية، المستخلص الفطري، البكتريا المرضية ،فطريات التربة.

المقدمة:

الفطريات هي كائنات حية متباينة التغذية (Heterotrophic)،ذات تنوع و إنتشار كبير في جميع الأنظمة البيئية. تعيش الفطريات في بيئاتها المختلفة مع العديد من البكتريا و الكائنات الحية الأخرى و لأجل المقاومة و البقاء فأنها تمتلك العديد من الاستراتيجيات المهمة مثل إنتاج المثبطات تجاه تلك الأحياء.كما تعد الفطريات من أهم الكائنات الحية الدقيقة في أنتاج مركبات الايض الثانوي التي هي عبارة عن مركبات ناتجة في أوساط زرعية وهي ليست ضرورية لنمو الفطر وإنما تكون نواتج خارج خلوية وقد تكون لها فوائد أخرى ،يعد العالم Sachs (1873) أول من عرف منتجات الايض الثانوي secondary metabolites والذي أشار إليها بوصفها منتجات طبيعية من الإحياء المجهرية فقد عزلت وشخصت العديد من مركبات الايض الثانوي لعدد من الأنواع الفطرية النامية في أوساط زرعيه والتي لها فعالية مثبطة لأحياء مجهريه أخرى لاسيما البكتريا ويقدر الان عدد مركبات الايض الثانوي الميكروبية المعروفة بمايقارب50.000 نوع[1] تنتج الأحياء المجهرية مركبات ايض ثانويه (كالمضادات الحيوية، السموم، القلويدات والستيرويدات وغيرها) خلال طور الاستقرار(Stationary phase) [2] .الايوض الثانوية يمكن ان تصنف بحسب تركيبها الكيميائي وخواصها الفيزيائية إلى Alkaloides, Terpenoide, polyketide

Organic acid Phenols, Steriodes Saponins, Peptides , Ethers , Oils وغيرها [3]. أن المركبات الحيوية المستخلصة من الفطريات تتفاوت في مدى فعاليتها لتثبيط البكتريا وهذا يعتمد على طبيعة المركب الناتج في الوسط الزرعي والظروف التي ينمى فيها الفطر[4]وبسبب ازدياد مقاومة سلالات من البكتريا للمضادات الحيويةالمستعملة ، فقد توالت الدراسات والأبحاث حول اكتشاف مضادات عديدة بعد اختبار فعاليتها الحيوية وتشخيصها ومعرفة تركيبها الكيميائي[5] .

المواد وطرائق العمل:

عزل الفطريات

جُمعت عينات ترب زراعية من مناطق مختلفة في محافظة ميسان\العراق خلال عام2015 وذلك بإزاحة1 سم من الطبقة السطحية واخذت العينات على عمق(12 - 5)سم ووضعت في أكياس بلاستيكية معقمة وجلبت إلى المختبر،استعملت طريقة التخفيف (Johnson *et al.*,1959) وذلك بوزن 10 غم من العينة ووضعت في دورق زجاجي يحتوي 100 مللتر من الماء المقطر المعقم ثم رج المزيج جيدا" . نقل 1 مللتر من العالق بوساطة ماصة معقمة وأضيفت إلى 9 مللتر من الماء المقطر المعقم للحصول على تخفيف 10^{-2} ، ثم نقل 1 مللتر من هذا التخفيف إلى 9 مللتر من الماء المقطر المعقم للحصول على تخفيف 10^{-3}. ونقل 1 مللتر من هذا التخفيف ووضع في أطباق بتري معقمة وأضيف إليها الوسط ألزرعي (Potato Dextrose Agar) الذائب والمعقم والمبرد الى درجة حرارة (45)م وحرك حركة رحوية لتوزيع العينة بشكل متجانس ثم ترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم حضنت الإطباق في الحاضنة بدرجة حرارة(25 ±)2 م ولمدة 5(-7) أيام . استخدمت ثلاثة مكررات لكل تركيز. فحصت الإطباق بوساطة مجهر التشريح وأُخذت قطعه من النمو الفطري وزرعت على وسط (PDA) للحصول على مزارع نقيه ثم نقلت أجزاء من المستعمرات المعزولة إلى أوساط مائلة(slant tubes) وحضنت بدرجة حرارة 25 ± 2 م لمدة 5 – 7 أيام ثم حفظت في الثلاجة بدرجة 8 م الى حين الاستعمال ، لغرض تصنيف الأنواع المعزولة وتشخيصها نقل جزء من المستعمرات إلى شريحة زجاجية نظيفة حاوية على صبغة Lacto phenol cotton blue وشخصت العزلات الفطرية المنقاة بحسب المصادر التصنيفية [6].

نمو الفطر *F.solani* على أوساط التخمر

نمي الفطر *F.solani* على وسط مرق البطاطا الدكستروز(Potato dextrose Broth (PDB بوصفه وسطا للتخمر وذلك لغرض الحصول على المركبات الأيضية الفعالة إذ لقحت دوارق زجاجية سعة 500 مل حاوية على 300 مللتر من الوسط) (PDB) بـِ5 أقراص مأخوذة بوساطة ثاقب الفلين من مستعمرة الفطر النقية ثم حضنت الدوارق في درجة حرارة 27م لمدة 10 أيام [7].

استخلاص الايض الفطري الثانوي

بعد انتهاء مدة الحضن تم فصل راشح مزرعة الفطر بوساطة الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة لمدة 15 دقيقة ثم رشحت باستعمال أوراق ترشيح نوع Whatman No.1 ثم عدل الأس الهيدروجيني للراشح إلى 3 باضافة حامض الهدروكلوريك HCL بتركيز 0.1عياري ، بعدها استخلصت المواد الفعالة ثلاث مرات من الراشح بإضافة كمية من المذيب العضوي خلات الاثيل Ethyl acetate وبما يعادل حجم الراشح باستعمال قمع الفصل Separating funnel مع الرج لمدة 10 دقائق . جمعت الطبقة العضوية ووضعت في اطباق زجاجية وتركت تتبخر بدرجة حرارة 45م ثم جمعت المستخلصات وحفظت في قناني زجاجيه معقمه ومحكمة الغلق في الثلاجة بدرجة حرارة 8م الى حين الاستعمال .[7]

السلالات البكتيرية المختبرة

أ: العزلات البكتيرية القياسية

Escherichia coli(ATCC 6572)
Staphylococcus aureus(ATCC 25923)

ب:العزلات البكتيرية المرضية (تم الحصول عليها من مختبر الإحياء المجهرية .كلية الصيدلة .جامعة ميسان)

Streptococcus pyogenes
Klebsiella pneumoniae
Salmonella typhimurium

اختبار الفعالية الضد بكتيرية لمركبات الايض الثانوي الفطري

أتبعت طريقة الانتشار من الأقراص على الوسط الصلب Disk diffusion method Agarإذ حضرت الاقراص المشبعة بالمادة الخام اعتمادا على طريقة [8] .

تحديد التركيز المثبط الادنى والقاتل الادنى للايض الثانوي الفطري

حدد التركيز المثبط الأدنى (MIC)كما حدد التركيز القاتل الادنى (MBC)اعتمادا على طريقة [9].

اختبار السـمية الخـلوية للايض الثانوي الفطري

استعملت كريـات الدم الحـمر للإنسان لتحديد السـميـة الخلويـة للمستخلص الفطري وبحسـب [10].

اختبار الفعالية الضد تأكسدية للايض الثانوي الفطري

اختبرت فعالية الايض الثانوي المستخلص بوصفه مضادا للأكسدة من خلال قياس قابليتها على الاختزال إذ اختبرت قدرة المادة المستخلصة الخام على اختزال أيونات الحديد الثنائي (Fe II) وأجري الاختبار بناء على الطريقة الموصوفة من قبل [11].مع أجراء التحوير اللازم والاتي:-

1-تحضير المحلول الخازن Stock solution حضر محلول الحديد الثنائي بتركيز 100 PPM بوزن (0.0227 غم) من كلوريد الحديدوز (FeCl2) واذيبت في 100 مل من الماء منزوع الايونات deionized waterباستخدام قنينة دورق حجمي سعة (100 مل) ثم حضرت منة تركيز (ppm1) في قنينة حجمية سعة 20 مل .

2- حساب الطول الموجي لأعلى امتصاصية (λmax)

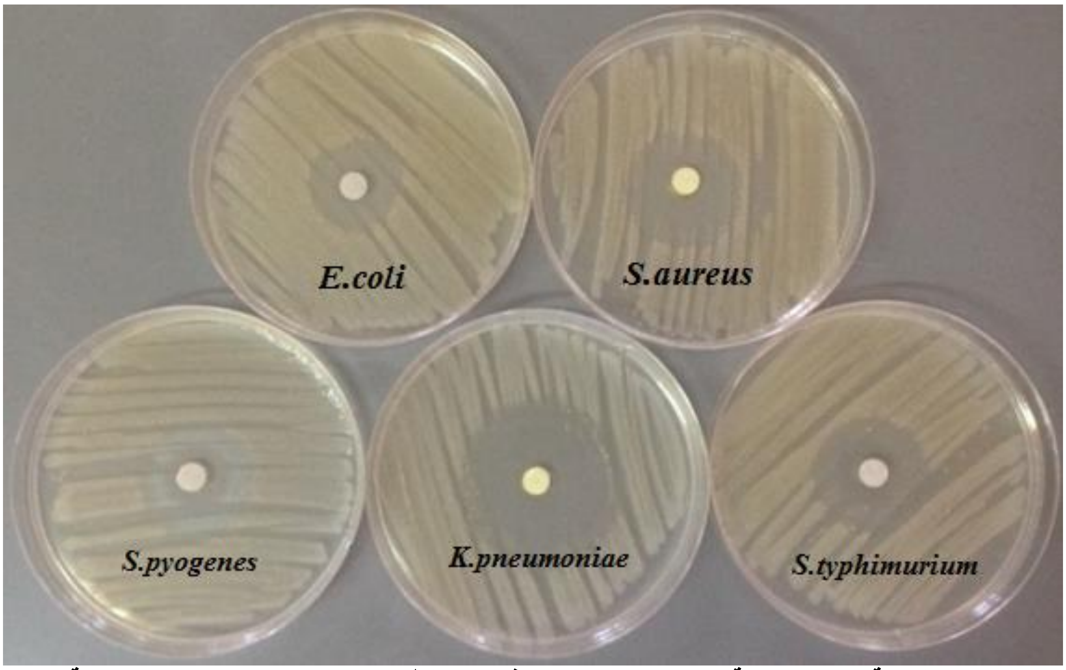
أخذ محلول يتكون من الحديد الثنائي بتركيز 1ppm وأضيف إلية 0.1 مل من حامض HCl بتركيز (0.1N) وتم المزج في قنينة زجاجية أسطوانية سعة 25 مل مع التحريك المستمر للحصول على محلول متجانس ثم أضيف 3 مل من المحلول المائي للكاشف 1,10-phenanthroline (phen) العديم اللون بتركيز0.2% فتكون معقد الحديد – الكاشف وهو محلول لونه احمر بعد ذلك رج المحلول بصورة جيدة ليتجانس المحلول ومن ثم قيست الامتصاصية في مدى من الأطوال الموجية مابين(360-630)نانومتر باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي(spectrophotometer) ومن ثم تم تحديد الطول الموجي المقابل لأعلى امتصاصية (λmax) . بعدها تم تحديد فعالية المادة الخام المضادة للتأكسد حيث أضيف (0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4و5) مل الى التركيز 25 ملغ/مل معقد الحديد-الكاشف وثم تحدد امتصاصية المحلول في كل مرة بعد زمن فترة زمنية مقدارها 15 دقيقة مقابل محلول سيطرة يتكون من معقد الحديد-الكاشف فقط ، اذ ان انخفاض الامتصاصية مع ازدياد حجم محلول المادة الخام يدل على فعالية المادة الخام المضادة للأكسدة.

النتائج والمناقشة:

بينت النتائج امتلاك مركبات الايض الثانوي الفطريفي المستخلص الخام فعالية تثبيطية تجاه البكتريا المرضية المختبرة بأقطار تثبيط متباينة فقد اظهرت مركبات الايض الثانوي الفطري أعلى فعاليه تثبيطية تجاه العزلة *K.pneumoniae*بقطر تثبيط بلغ 34.0 ملم تلتها العزلة*S.typhimurium* بقطر تثبيط بلغ 33.5 ملم فيما اظهر اقل فعالية تثبيطيه تجاه العزله *S.pyogenes* بقطر تثبيط بلغ 18.0ملم(جدول1) .قد يعود هذا الاختلاف في تثبيط نمو البكتريا إلى اختلاف المكونات الكيميائية التي يحتويها الايض الثانوي المستخلص من الفطر كالتانينات والتربينات الاحادية والفينولات وغيرها وكذلك امتلاك البكتريا لعدد من آليات المقاومة للمضادات الحيوية فقدرة بعض أنواع البكتريا على تغير التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي بينما تمتلك أنواع آخري القدرة على إعادة إخراج المضاد الحيوي من داخل الخلية البكتيرية أو تغير في تركيب مادتها الوراثية من خلال الطفرات ، مما دفع الباحثين باتجاه البحث عن انواع جديدة من المضادات الحيوية كما تفاوتت قيم التركيز المثبط الادنى MIC للمادة المستخلصة الخام للفطر *F. solani*ضد السلالات البكتيرية القياسية والمرضية(جدول2) قد يعود سبب ذلك الى الاختلاف في تركيب الجدار الخلوي للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام اذ يتصف جدار البكتريا السالبة بقلة نفاذية الغلاف الخارجي للمضادات الحيوية بسبب وجود الطبقة الخارجية والتي تحول دون وصول المضادات إلى المنطقة الهدف.وكذلك فأن احتواء جدار البكتريا السالبة لصبغة كرام على مركبات Lipopolysaccharides وLipoprotein و جدران البكتريا الموجبة لصبغة كرام بنفاذيتها للمركبات الفعالة ولذلك تكون أكثر تأثرا من البكتريا السالبة لصبغة كرام[12].

جدول(1) معدل أقطار مناطق تثبيط النمو (ملم) للمستخلص الفطري

السلالات البكتيرية	اقطار التثبيط النمو (ملم)
E.coli	**24.0**
S.aureus	**31.5**
S.pyogenes	**18.0**
K.pneumoniae	**34.0**
S.typhimurium	**33.5**

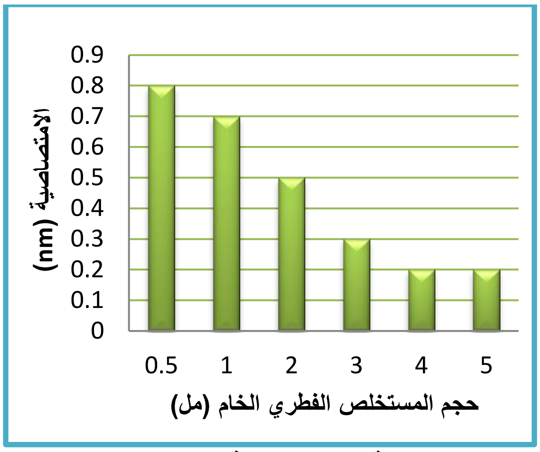


شكل(1) الفعالية الضد بكتيرية لمستخلص الايض الثانوي الفطري ضد عدد من البكتريا المرضية

جدول (2) التركيز المثبط الأدنى والقاتل الأدنى MIC و MBC لمستخلص الايض الثانوي الفطري الخام

السلالات البكتيرية	(MIC) (مايكروغرام \مل)	(MBC) (مايكروغرام \مل)
E.coli	25.0	50.0
S.aureus	6.25	12.5
S.pyogenes	50.0	100.0
K.pneumoniae	25.0	50.0
Sal.typhimurium	50.0	100.0

بينت نتائج الدراسة الحالية عدم احتواء مستخلص الايض الثانوي للفطرالخام *F.solani* لأي فعالية سميه تجاه كريات الدم الحمر اذ لوحظ عدم حدوث تحلل في كريات الدم الحمر خلال مدة الحضن وعند درجة حرارة 37م وهي الظروف التي يجري عندها الاختبار وقد يعود ذلك لعدم قابلية الفطرعلى انتاج الانزيمات المحللة لكريات الدم الحمر[13].هي ليست ذات سمية ولذلك فان بالإمكان استعمالها بوصفها مضادات حيوية لتثبيط نمو البكتريا المرضية ألا أنه يجب تطبيق البروتوكولات الدوائية بهذا الخصوص ومنها أجراء تجارب علـــى الفئران المختبرية بعد أصابتها بالبكتريـــــــا الممرضة لمعرفة مدى فاعليـــــة هذه المركبــــــات في علاج الفئران المصابة كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية بأن لمستخلص الايض الثانوي للفطر*F.solani* فعالية ضد تأكسدية تعمل على اختزال ايونات الحديد الثنائية وتحويلها إلى ذرات الحديد مع وجود فرق معنوي ملحوظ عند مستوى احتمال ($p \leq 0.05$)، كما بينت النتائج إن الفعالية الضد تأكسدية للمستخلصات الفطرية الخام تزداد بزيادة حجم المستخلص الفطري الخام فقد سجلت عند الحجم 0.5 ملم اعلى امتصاصية بلغت 0.8 أما عند الحجم 5.0 مل فقد سجلت اقل امتصاصية بلغت 0.2(شكل2)إذ كلما قلت نسبة الامتصاصية ارتفعت نسبة الفعالية الضد تأكسدية وقد يعزى سبب الفعالية الضد تأكسدية إلى وجود مجموعة (OH) الحرة التي تحويها المستخلصات الفطرية، آن هذا الفحص مستعمل بكثرة نظرا للخصائص التي يتميز بها ومنها السهولة ،السرعة ،انخفاض الكلفة الاقتصادية له .لقد زاد الاهتمام في الوقت الحاضر بالحصول على مركبات مضادة للتأكسد من مصادر طبيعية ومنها المستخلصات الفطرية[14].وهذا يتفق مع دراسة[15].الذي أشار إلى أن المستخلص الميثانولي لأنواع من الفطريات التابعة للأجناس *Fusarium* و *Aspergillus* و*Penicillium* و*Mucor* لها فعالية بوصفها مركبات مضادة للتأكسد.



شكل (2)الفعالية الضدتاكسدية للمستخلص الفطري الخام

المصادر:

[1]Berdy,J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. J. Antibiot. 58: 1–26.

[2]Mohamed, A. W.; Asolkar, R. N. Inderbitzin, P. and Fenical, W. 2007. Secondary metabolite chemistry of the marine - derived Fungus Massarinasp., strain CNTo16 phytochem. 68: 1212 - 1218.

[3]Anke, T. 1989. .Basidiomycetes: Asource for new bioactive metabolites. Prog. Ind. Microbiol. 27: 51-66.

[4]Stephen, J.C. and Horace, G.C. 2000. Biologically active Natural Products. CRC press New York, Washington, DC. Pp.277.

[5]Domsch, K.H.; Gams, W. and Aderson, T. 1980. Compandium of soil Fungi. Academic press, London, Pp.858.

[6]Kim , H. J. ; Kim ,J. C. ; Kim , B. S. ; Kim , H. G. and Cho , K. Y. 1999. Antibiotic and phytotoxic activities of Ophiobol from Helmintho species. plantpathol. J., 15 (1): 14-20.

[7]Gould, J. C. and Bowie, J. H.1952. The determination of bacterial sensitivity to antibiotics .Edinbugh Medical J. 59 -178.

[8]Samuel. P., Prince, L. and Prabakaran, P. 2011. Fungal bioproespecting from south east coast of tamilnadu - india with special reference to antibacterial activity. International Journal Of Pharma World Research, 2:1-14.

[9]Xian-guo, H and Ursula, M. 1994. Antifungal compound from *Solanumni grescens*. J. Enthopharm. 43: 173-177.

[10] Furman, N. H. 2000. Standered methods of chemical analysis, 7th edition. D. Van Nostrad company, INC., New Jersey, USA.

[11] Chandrashekhara, S. 2010. Isolation and characterization of antibiotic production from soil isolates by fermentation. Ph.D. thesis, Vinayaka Missions University, India

[12] Jain, P. and Pundir, R. K. 2011. Effect of fermentation medium, pH and temperature variations on antibacterial soil fungal metabolite production. Journal of Agricultural Technology, 7: 247-269.

[13] Jayanthia, G.; Kamalraja, S.; Karthikeyan, K. and Muthumary, J. 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus Phomopsissp. GJJM07 isolated from Mesuaferrea. International Journal Current research, 1: 85-90.

[14] Johnson, L. E.; Curl, E. A.; Bond, J.H. and Fribourgh, H. A. 1959.Methods for studying soil microflora. publ Co. Minneapolis. USA.

[15] Murthy, N. K.; Pushpalatha, K. C. and Joshi, C. G. 2011. Antioxidant activity and phytochemical analysis of endophytic fungi isolated from *lobelia nicotianifolia*. J. Chem. Pharm. Res., 3 :218-225

Evaluation of bioactivity against some pathogenic bacteria and oxidation for fungal secondary metabolites of *Fusarium solani* isolated from soil

Rashid Rahim Hateet

Department of Biology, College of Science, University of Missan, Missan, Iraq.

E-mail: biorashed@yahoo.com

Received 20/3/2016
Accepted 24 /11/2016

Abstract:

The study included isolate and diagnose fungus *Fusarium solani* of the local soil and purified and development in the PDB medium and the filtrate extracted using a solvent (Ethyl acetate) to obtain the fungal secondary metabolites extract. This extract has shown bioactivity against both reference isolates (*E.coli* (ATCC25922) and *S.aureus*(NCTC6571)) and pathogenic isolates *S.pyogenes*, *K. pneumonia and S.typhimurium* using agar disk diffusion technique , The diameters of the inhibition zones of fungal secondary metabolites24.0 mm against *E.coli* and 31.5 mm against *S.aureus*,and 34.0 mm against *K.pneumoniae* and 18.0 mm against *S.pyogenes* and 33.5mm against *S.typhimurium*. The test revealed the minimum inhibitory concentration (MIC) of the fungal extract less inhibitor concentration towards our isolation *S.aureus* was 6.25 µg/ ml also less deadly concentration (MBC).Also against isolate *S.aureus* was 12.5µg/ ml. also fungal extract showed no toxicity toward human red blood cells. Tested the antioxidant of the fungal extract by measuring its ability to be reduced iron duo ions (Fe Π) have shown high rates of inhibition. The metabolic product of soil fungi can be an alternative source of commercial anti-bacterial.

Key words: Antibacterial activity, Secondary metabolites, pathogenic bacteria, Soil