

استخلاص وتنقية صبغة البايوفردين من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* المعزولة محلياً وامكانية استخدامها كعامل سيطرة بيولوجية *

علي قاسم خزعل، مؤيد صبري شوكت، سحر عبد الوهاب الشالحي

قسم التقنيات الاحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد- العراق.

الخلاصة

استخلصت صبغة البايوفردين من العزلة المحلية (*Pseudomonas fluorescens* (PFAS14) المنتجة للصبغة وذلك بعد 10 ساعات من بدء الحضانة في 28 م ووصلت الى اعلى انتاجية بعد 46 ساعة بشكل معقد مرتبط مع الحديد بوساطة المذيبات العضوية والترسيب بالاملاح ، ثم نقيت باستعمال تقنيتي كروماتوغرافيا التبادل الايوني والترشيح الهلامي .
درس طيف الامتصاصية لصبغة البايوفردين المنقاة ووجد ان اعلى امتصاصية كانت عن الطول الموجي 370 نانوميتر ، في حين كانت اعلى امتصاصية لمعقد البايوفردين - الحديد عند الطول الموجي 400 نانوميتر .
اختبرت الفعالية التثبيطية لصبغة البايوفردين المنقاة وراشح العزلة البكتيرية (PFAS14) ومعقد البايوفردين - الحديد ضد الفطريات الممرضة النباتية والبكتريا المرضية وخميرة الـ *Candida albicans* وقد وجد ان لصبغة البايوفردين وراشح العزلة البكتيرية (PFAS14) فعالية تثبيطية ضد الفطريات الممرضة النباتية والبكتريا المرضية في حين لم يكن لمعقد البايوفردين - الحديد اي فعالية تثبيطية . كما درست علاقة المحددات الوراثية البلازميدية بانتاجية صبغة البايوفردين ووجد عند تحييد بلازميدات العزلة (PFAS14). ان الجينات التركيبية والتنظيمية المتعلقة بانتاجية الصبغة محمولة على الكروموسوم البكتيري وليس على البلازميدات.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF PYOVERDINE PRODUCE BY LOCALLY ISOLATED *Pseudomonas fluorescens* And Its Ability As A Biological Control Agent

Ali.Q.Khazaal, Muayad.S.Shawkat, Sahar.A.AL-Shalchi

Department of Biotechnolgi. College of Science, University of Baghdad. Baghdad-Iraq.

Abstract

Pyoverdine was extracted from the local isolate (PFAS14) after 10 hours of incubation time and reached maximum production after 46 hours.

The extraction of pyoverdine was done as ferric-pyoverdine complex by organic solvent and precipitate with salt then purify with ion exchange and gel filtration chromatography.

The maximum absorbance of pyoverdine was at 370 nm., while the maximum absorbance of ferric-pyoverdine complex was at 400nm.

The pyoverdine showed inhibition activity against pathogenic fungi, bacteria and *C. albicans*, the supernatant of (PFAS14) isolate was also active while the ferric-pyoverdine complex does not show any activity.

Curing the plasmid of PFAS14 isolate do not effect the production of pyoverdine and this confirms that the structural and regulator genes responsible for pyoverdine production were mediate by chromosome.

• مستل من رسالة ماجستير

المقدمة

تعد محاصيل الحنطة والرز والذرة من اهم المحاصيل الاقتصادية في العالم التي تتعرض الى العديد من الممرضات مسببة انخفاضاً في كمية ونوعية الحبوب المنتجة منها واهمها الاصابة بالفطريات [1] وغالباً ما تستعمل المبيدات الكيميائية لمكافحة الاصابات الفطرية الا ان الزيادة في استخدام المبيدات بشكل غير مدروس ادى الى ظهور العديد من المشاكل البيئية والصحية مثل حالات التسمم الفردية والجماعية فضلاً عن دخولها في السلسلة الغذائية للحياة البرية والمائية وتأثيرها على العديد من الحشرات النافعة مثل الاعداء الحيوية والنحل ، فقد لوحظ ان استعمال بعض المبيدات يؤثر في نمو الفطر *Beauveria bassania* الذي له القابلية على القضاء على العديد من الافات الاقتصادية بصفته عامل سيطرة بيولوجية [2] و [3].

لقد برزت فكرة استعمال الاحياء المجهرية غير الممرضة في تثبيط الممرضة منها الموجودة في الترب المزروعة دون التأثير في بقية مجاميع الاحياء المجهرية [4] و [5]. ومن امثلة الاحياء المجهرية المستعملة في السيطرة البيولوجية *Agrobacterium* و *Rhizobium* و *Alcaligenes* و *Arthrobacter* [6] ان الوسائل التي تمكن تلك الاحياء المجهرية من تثبيط الممرضات النباتية تكون عن طرائق عدة ابرزها :

❖ تحفيز المقاومة الجهازية : وتعرف بأنها عملية المقاومة الفعالة التي يبديها النبات كيميائياً وفيزيائياً عند الاصابة بالمسببات المرضية التي تتحفز بالعوامل الحيوية او غير الحيوية [7].

❖ التنافس على المغذيات : لقد وجد ان بكتريا *P. fluorescens* لها القدرة على سحب عنصري الكربون والنترجين والنااتجة من افراز الجذور لغرض نموها والاستفادة منها مما يؤدي الى قلة توافرها لبقية الاحياء ومن ثم الى تثبيط الممرضات [8].

❖ انتاج المركبات الكلاية للحديد : تمتاز بكتريا *P. fluorescens* بانتاجها للمركبات الكلاية للحديد مثل البايوفردين التي لها الفة عالية اتجاه الحديد اذ ينتج البايوفردين عندما تنمو تلك البكتريا في ظروف شحيحة من الحديد عندها يرتبط البايوفردين بالحديد ليكون معقداً لا تستطيع بقية الاحياء المجهرية ، استغلاله [9].

لقد فضلت بكتريا *P. fluorescens* في السيطرة البيولوجية على العديد من العوامل الاخرى بسبب سرعة انقسامها قياساً ببكتريا *Bacillus spp.* ومقاومتها للأشعة فوق البنفسجية [10] وانتاجها لصبغة البايوفردين [11] فضلاً عن تأثيرها في فايرس موزائيك الخيار [12] والتعفن الجاف *Fusarium solani* [13] ومرض Anthracnose في البقوليات [14].

المواد وطرائق العمل

استخدمت العزلة البكتيرية المحلية PFAS14 والتي تميزت بأنها افضل العزلات في انتاج صبغة البايوفردين والتي تم عزلها وتشخيصها وغربلتها [15] لغرض استخلاص وتنقية الصبغة ودراسة فعاليتها التثبيطية ضد الفطريات الممرضة النباتية والبكتريا والخميرة *C. albicans* فضلاً عن دراسة علاقة المحددات الوراثية البلازميدية بانتاجية صبغة البايوفردين .

استخلاص وتنقية البايوفردين

اتبعت طريقة Cody and Gross [16] في عملية استخلاص صبغة البايوفردين واعتمدت طريقة Csaky [14] لمتابعة الصبغة خلال مراحل الاستخلاص والتنقية . ولأجل الحصول على صبغة البايوفردين بحالة نقية اتبعت خطوتان لهذا الغرض على النحو الآتي :

1- كروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني CM Cellulose 22 وتم تنشيط مادة التبادل الايوني على وفق الطريقة الموصوفة من قبل [18].

انقضاء مدة الحضان وملاحظة النتائج ومقارنتها لدنا العزلة غير المحيدة [23].
من جانب آخر نمت بكتريا *P. fluorescens* في وسط succinate و King B بدرجة 41 م مدة 24 ساعة وملاحظة قابليتها على انتاج البايوفريدين وقياسها بالعزلة المنماة بدرجة 28 م .

النتائج والمناقشة

تحديد طور النمو الافضل لانتاجية صبغة البايوفريدين :
يهدف تحديد المدة الزمنية المثلى لانتاج البايوفريدين درست العلاقة بين اطوار النمو للعزلة المنتخبة و انتاجية PFAS14 صبغة البايوفريدين يلاحظ من الشكل (1) ان البكتريا تدخل الطور اللوغاريتمي بعد ساعتين من الحضان ثم تصل الى طور الثبات بعد 12 ساعة لتدخل طور الهلاك بعد 18 ساعة ، اما انتاجية صبغة البايوفريدين فقد بدأت بعد 10 ساعات من بدء الحضان ووصل الى اعلى انتاجية بعد 46 ساعة اي في طور الهلاك .

وتتفق النتيجة مع ما ذكره [24] اذ بلغت اعلى انتاجية للصبغة بعد 40 ساعة . وعلى الرغم من دخول الخلايا طور الهلاك الا ان انتاجية صبغة البايوفريدين تزداد ، وهذا يعود الى ان الصبغة ترتبط بجدار الخلية البكتيرية وان تنمية البكتريا في ظروف الاهتزاز يساعد على افراز الصبغة الى خارج الخلية الى الوسط الزرعى ، كما ان موت الخلايا وتحللها يساعد في افراز الصبغة الى الخارج [25]. فضلاً عن ذلك فان صبغة البايوفريدين في الوسط الزرعى تعمل محفزاً ايجابياً للجينات المعبرة عن انتاج الصبغة مما يسبب الانتاج بشكل أكثر [26].

استخلاص صبغة البايوفريدين

استخلصت صبغة البايوفريدين من العزلة PFAS14 المنماة في وسط succinate في 28 م مدة 40 ساعة وهي افضل الظروف لانتاج الصبغة اذ وجد [27] ان المصدر الكربوني Succinic acid هو افضل المصادر لانتاج صبغة البايوفريدين ، كما انه يحتوي على عدد من العناصر مثل المغنيسيوم والكارصين والفوسفات التي لها تأثير تحفيزي في عملية انتاج الصبغة .

ابتدأت عملية الاستخلاص باضافة كلوريد الحديد الى وسط التخمير اذ لوحظ تحول اللون التآلقي للصبغة الى اللون البني

2- كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام هلام Sephadex G-25 وحضر هلام Sephadex G-25 تعليمات الشركة المجهزة (Farmacia Fine Chemicals Sweden) اجري الكشف عن نقاوة البايوفريدين بوساطة تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) اذ استخدمت صفائح السليكا الجاهزة من نوع 60F 254 في تحديد قيمة الـ R_f لتحديد نقاوة البايوفريدين الناتج من خطوة الترشيح الهلامي [18].

اختبار الفعالية الحيوية لصبغة البايوفريدين في تثبيط نمو الفطريات

تم اختبار الفعالية الحيوية للبايوفريدين في تثبيط الفطريات بطريقتين:

1- اعتمدت طريقة [19] في اختبار فعالية صبغة البايوفريدين المنقاة جزئياً ضد الممرضات الفطرية النباتية الآتية : *F. oxysporum* و *R. solani* و *A. flavus* و *A. alternaria* والدليل على الفعالية التثبيطية لصبغة البايوفريدين ضد نمو الفطريات هو عدم ظهور نمو حول الحفر .
2- استخدام رائق العزلة البكتيرية ومعقد البايوفريدين - الحديد وصبغة البايوفريدين في اختبار الفعالية الحيوية اعتماداً على [20].

اختبار الفعالية الحيوية لصبغة البايوفريدين في تثبيط نمو البكتريا المرضية وخميرة *C. albicans*

استخدمت البكتريا المرضية الآتية :
S. aureus و *E. coli* و *Pr. Mirabilis* و *K. pneumoniae* وخميرة *C. Albicans* حسب الطريقة المذكورة من قبل [21].

عزل الدنا الكلي للعزلة المنتقاة وتجربة تحييد الدنا البلازميدي

استخدمت طريقة Salting out الموصوفة من قبل [22] لعزل الدنا الكلي للعزلة المنتقاة مع اجراء بعض التحويرات المتمثلة في عدم استخدام انزيمي اللايسوزايم والبروتينييز K ضمن خطوات العزل .

تم تحييد الدنا البلازميدي للعزلة المنتقاة باستخدام الحرارة بعد تنمية العزلة البكتيرية على وسط الاكار المغذي بدرجة 41 م مدة 24 ساعة ، ثم عزل الدنا الكلي من العزلة المنتقاة بعد

على الصبغة باعطائها تفاعل موجب بخلاف القمم الاخرى (B و C و D) التي اعطت نتيجة سالبة .
 اخذت اجزاء القمة (A) وركزت باكياس الدليزة حيال السكروز واضيف اليها مادة EDTA التي تساعد على الارتباط بالحديد وفصله عن معقد البايوفردين - الحديد للحصول على البايوفردين بشكل اكثر نقاوة .
 اجريت خطوة الترشيح الهلامي باستعمال عمود يحوي مادة sephadex G25 الذي غسل بدارىء الباييردين - حامض الخليك 50 مولار ، وقيست الامتصاصية على الطول الموجي 370 نانوميتر المناسب لقراءة البايوفردين المنفصل عن الحديد واجري التفاعل اللوني للاجزاء المفصولة الذي اكد الحصول على البايوفردين اذ لوحظ من الشكل (3) الحصول على قمة واحدة كبيرة وبقيمة امتصاص قدرها (0.13) وهذه النتائج تتوافق مع ما حصل عليه [24].

وللتأكد من نقاوة البايوفردين المستخلص عرض المحلول الناتج من خطوة الترشيح الهلامي لتقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة ويلاحظ في الشكل (4) الحصول على بقعة حادة عند تعريضها للاشعة فوق البنفسجية وان قيمة R_f لصبغة البايوفردين المنقاة اذ بلغت (0.5) ويتفق ذلك مع [31] الذي ذكر ان الحركة النسبية للصبغة تزداد مع زيادة ذوبانية الصبغة في محلول الفصل . وتجدر الاشارة الى ان استخدام مادة EDTA بوصفها مادة خالوية لازالة الحديد من المعقد بدلاً من استعمال مادة 8-hydroxyquinoline التي تسبب مشاكل في تلوين الناتج النهائي وتعرض البايوفردين للتحلل.

الفحوص الفيزيائية

* استخدم جهاز Atomic Absorption لقياس كمية الحديد في معقد البايوفردين - الحديد الناتج من عملية التبادل الايوني والتي بلغت 2.32 جزء من المليون (p.p.m) وكمية الحديد في مستخلص البايوفردين الناتج من عملية الترشيح الهلامي بعد اضافة الـ EDTA وانفصال الصبغة بشكل اكثر نقاوة بواسطة خطوة الترشيح الهلامي .

* استخدم جهاز المطياف الضوئي الماسح scanner spectrophotometer لقياس طيف الامتصاصية لكل من معقد البايوفردين - الحديد ومستخلص صبغة البايوفردين الناتج من عملية الترشيح الهلامي على الاطوال الموجبة (200 - 1100) نانوميتر اذ يلاحظ من الشكل (5) ان اعلى امتصاصية لمعقد البايوفردين - الحديد كانت عند الطول

المحمر ، وهذا دليل على ارتباط البايوفردين بالحديد مكوناً معقد البايوفردين - الحديد غير المتألق على خلاف ارتباطها وتكون معقدات مع عناصر غير الحديد مثل الالمنيوم اذ تبقى الصبغة متألقة [28]. بعد عملية التركيز بالدليزة وترسيب البروتينات بملح كلوريد الصوديوم تذوب صبغة البايوفردين عند اضافة الفينول - كلوروفورم فينفسل الراشح الى طبقتين احدهما بلون بني محمر تمثل معقد البايوفردين - الحديد في الطبقة العضوية ، ولغرض سحب المعقد من الطبقة العضوية الى الطبقة المائية اضيف ايثر ثنائي الاثيل مما يكون ثلاث طبقات ، طبقة الاثير الصلب ، والطبقة العضوية السفلى ، والطبقة المائية الوسطى التي تحتوي على معقد البايوفردين - الحديد اذ ان ثنائي اثيل الاثير قد يعمل على سحب معقد الصبغة من الطبقة العضوية الى الطبقة المائية اعتماداً على خواص الصبغة التي تذوب في الماء [29].

تنقية صبغة البايوفردين

اجريت التنقية باستخدام المبادل الايوني CMC22 وغسل العمود بدارىء الباييردين - حامض الخليك 50 ملي مولار التي تذوب فيها صبغة البايوفردين ، جمع المحلول النافذ وقيست الامتصاصية على طول موجي 400 نانوميتر الذي يعد الطول الموجي الامثل للمعقد البايوفردين - الحديد وتم الحصول على قمتين (A و B) بقيمة امتصاص (0.54 و 0.05) على التوالي كما موضح في الشكل (2) .

اجريت خطوة الاسترداد عند الوصول الى الخط الصفري بتعريض العمود الى دارىء الباييردين - حامض الخليك بزيادة تدريجية في التراكيز (0.05 مولار - 2 مولار) وعند قياس الامتصاصية على طول موجي 400 نانوميتر ثم الحصول على قمتين اخريتين (C و D) بقيمة امتصاص بلغت (0.14 و 0.23) على التوالي ، الشكل (2) على خلاف [30] اللذين حصلوا على ثلاث قمم وهذا قد يعود الى ان خطوات الفصل والتنقية لصبغة البايوفردين كانت تعتمد على تنقية الصبغة بشكل غير مرتبط مع الحديد بعكس خطوات الاستخلاص والتنقية في هذا البحث والتي تعتمد في الحصول على البايوفردين بشكل معقد مرتبط مع الحديد ثم ازالة الحديد منه .
 وبهدف متابعة القمة التي تحتوي على البايوفردين ثم تعريض اجزاء القمم الاربعة الناتجة من خطوة الغسل والاسترداد الى التفاعل اللوني المتخصص لوحظ ان القمة الاولى (A) تحتوي

في الفطريات او ان ارتباط الحديد بمجاميع Hydroxymate في السلسلة البيبتيدية قد منع الفعل التثبيطي لهذه السلسلة . لغرض المقارنة بين فعالية صبغة البايوفريدين وفعالية رائق العزلة PFAS14 تم قياس منطقة التثبيط الناتجة من تثبيط صبغة البايوفريدين والرائق اذ يظهر الجدول (1) النتائج المستحصل عليها .

الفعالية التثبيطية ضد البكتريا الممرضة وخميرة *Candida*

تم استحصال نتائج مماثلة عند اختبار فعالية صبغة البايوفريدين - الحديد ضد بكتريا *S. aureus* و *Basillus spp* و *Pr. mirabilis* وخميرة *C.albicans* كما موضح من الشكل (9) والجدول (2) . ويلاحظ هنا عدم وجود فعالية تثبيطية لصبغة البايوفريدين ضد بكتريا *E. coli* و *K. pneumoniae* هذا قد يعود الى عدم اختراق الصبغة للجدار الخلوي لهذه البكتريا ، او لامتلاك هذه الانواع البكتيرية القدرة على انتاج المركبات الكلابية للحديد مثل *Enterochelin* و *Enterobactin* اللذان يعملان على توفير الحديد للخلية البكتيرية .

النسق البلازميدي وتحييد بلازميدات العزلة PFAS14

اجري اختبار عزل الدنا البلازميدي وتجارب التحييد للعزلة PFAS14 بهدف دراسة مدى علاقة المحتوى البلازميدي مع انتاج صبغة البايوفريدين . لقد تمثلت نتائج عزل الدنا الكلي للعزلة تحت الدراسة بالحصول على الدنا الكروموسومي وثلاث حزم من الدنا البلازميدي كما موضح في الشكل (10) . يوضح الشكل نفسه نتائج عملية التحييد باستخدام الحرارة العالية لنمو العزلة PFAS14 اذ يلاحظ ظهور ثلاث حزم بلازميدية في حالة النمو بدرجة حرارة 28 م في حين فقدت هذه الحزم عند نموها في درجة 41 م مدة 24 ساعة. تم الكشف عن صبغة البايوفريدين في العزلة المنماة بدرجة 41 م بتعريضها للاشعة فوق البنفسجية وملاحظة تألقها وكذلك من استعمال بيروكلورات الحديد للعزلة المنماة في وسط Succinate وملاحظة الامتصاصية وقياسها مع انتاجية الصبغة لم تتأثر بفقدان الحزم البلازميدية نتيجة النمو بدرجة حرارة مرتفعة واستنتج من ذلك ان الجينات المعبرة عن انتاج الصبغة

الموجي 400 نانوميتر وبلغت 0.5 بينما يظهر الشكل (6) ان اعلى امتصاصية للبايوفريدين كانت عند 370 نانوميتر وبلغت 1.5 وهذه النتائج تتفق مع ماحصل عليه [16] و [31].

اختبار فعالية صبغة البايوفريدين ضد الممرضات الفطرية النباتية

اختبرت الفعالية التثبيطية لصبغة البايوفريدين المنقاة جزئياً من خطوة الترشيح الهلامي وذلك بوضع 100 مايكروليتر من الصبغة المذكورة مع الممرضات الفطرية النباتية وحضنها في درجة 25 م مدة 5 ايام اذ وجد ان لصبغة البايوفريدين فعالية تثبيطية ضد الممرضات الفطرية *A. flavus* و *A. alternate* و *R. solani* و *F.oxysporum* تمثل بعدم ظهور نمو للفطر حول الحفر الموضوع فيها البايوفريدين كما موضح في الشكل (7) والشكل (8-B) . وقد اثبت [32] قابلية صبغة البايوفريدين النقية في تثبيط البكتريا *Erwinia* كما اثبت كل من [33] و [34] و [35] فعالية الصبغة التقنية على الفطريات *Pythium* و *Gaenmannomyces graminis* و *Lythinm ultimum* و *Fusarium oxysporium* على التوالي .

وتأتي الفعالية التثبيطية لصبغة البايوفريدين المنقاة جزئياً في قابليتها على سحب الحديد من الوسط والارتباط به وعدم جاهزيته للفطريات وتكوين معقد البايوفريدين - الحديد الذي لايتستطيع الكائنات الاخرى الاستفادة منه فضلاً عن احتواء صبغة البايوفريدين على سلسلة بيبتيدية تتكون من 6 - 12 حامضاً امينياً اذ اكد [36] ان السلسلة البيبتيدية القصيرة المتكونة من 9-10 حامض اميني تمتلك آليات مختلفة في تثبيط الكائنات المجهرية اكثر من السلسلة البيبتيدية الطويلة ، اما رائق المزرعة البكتيرية للعزلة PFAS14 المنماة في وسط TSB فقد لوحظت فعاليتها التثبيطية ضد الفطريات المختبرة كما يظهر في الشكل (8 - A) وذلك بسبب احتوائها على عدد من المضادات الحيوية المختلفة والمركبات الكلابية للحديد وسيانيد الهيدروجين .

ولم يلاحظ اية فعالية تثبيطية لمعقد البايوفريدين - الحديد ضد الفطريات الممرضة كما يظهر في الشكل (8 - C) وذلك قد يعود الى المجاميع الفعالة في صبغة البايوفريدين تكون مرتبطة بالحديد وهذا يمنع الصبغة من سحب الحديد من الوسط والتأثير

والجينات التنظيمية تكون محمولة على الكروموسومات البكتيرية

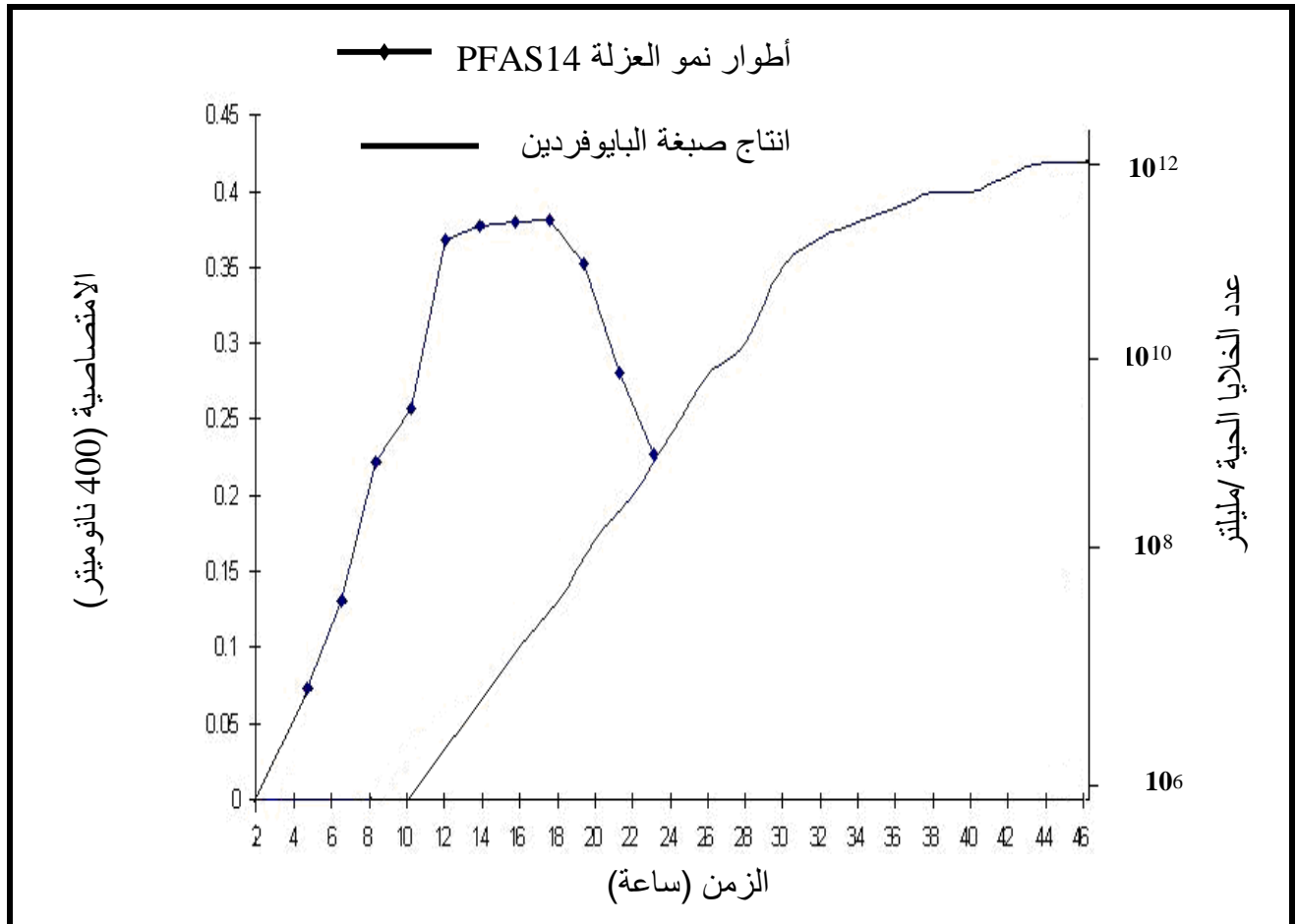
وهذه النتائج متوافقة مع (37) الذي ذكر بأن الجينات المسؤولة عن انتاج الصبغة وعملية تنظيمها موزعة على مجاميع جينية محمولة جميعها على الكروموسوم البكتيري .

الجدول 1: تأثير محلول صبغة البايوفردين المستخلصة من العزلة البكتيرية PFAS14 على نمو بعض سلالات الاعفان معبراً عنه بدلالة اقطار منطقة التثبيط (مليمتر)

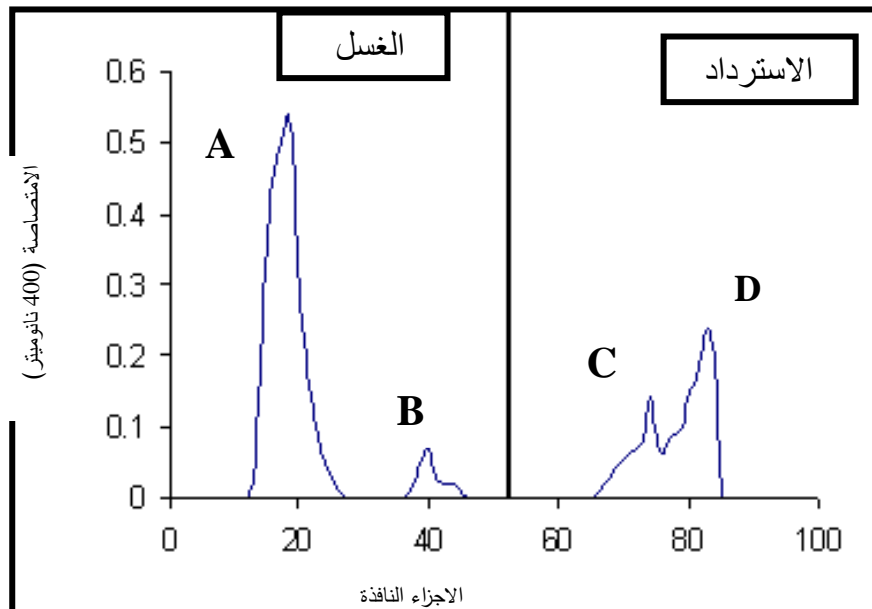
الكائن المجهري	رائق العزلة PFAS14	صبغة البايوفردين المنقاة جزئياً
<i>F. oxysporum</i>	23	22
<i>R. solani</i>	20	18
<i>A. flavus</i>	26	20
<i>A. alternata</i>	21	23

الجدول 2: تأثير محلول صبغة البايوفردين المستخلصة من العزلة البكتيرية PFAS14 على نمو بعض البكتريا المرضية معبراً عنه بدلالة اقطار منطقة التثبيط (مليمتر)

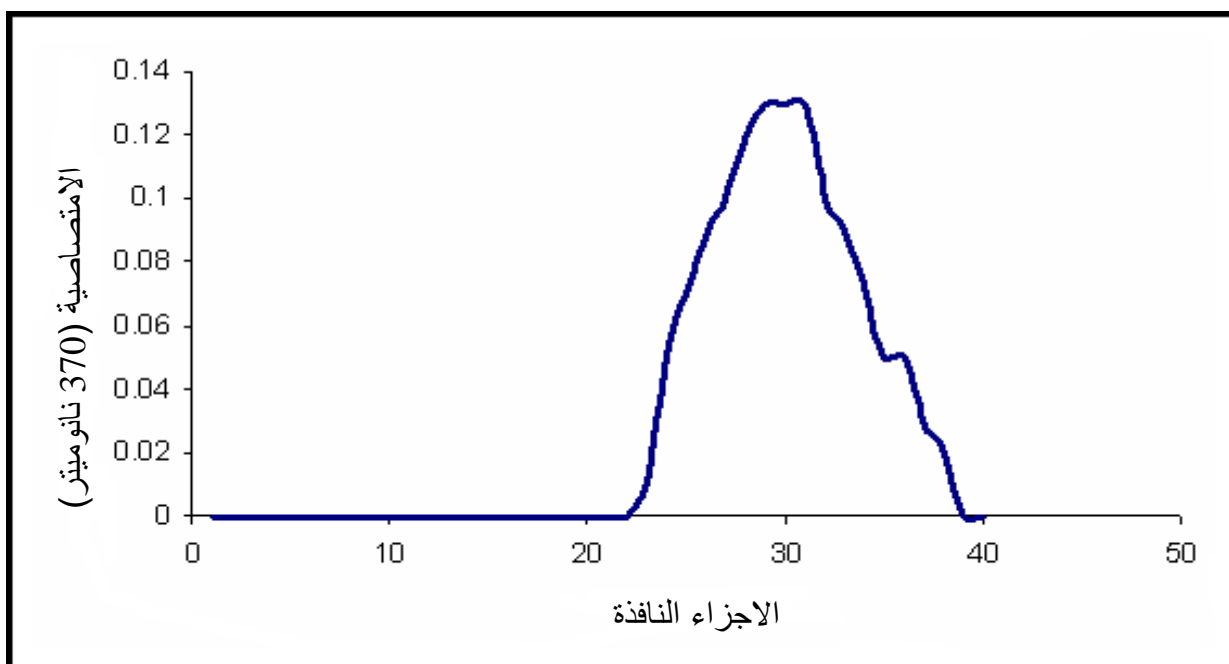
الكائن المجهري	رائق العزلة PFAS14	صبغة البايوفردين المنقاة
<i>S. aureus</i>	-	13
<i>Bacillus spp.</i>	15	16
<i>Pr. mirabilis</i>	26	23
<i>E. coli</i>	8	-
<i>Klebseilla</i>	10	-
<i>C. albicans</i>	-	28



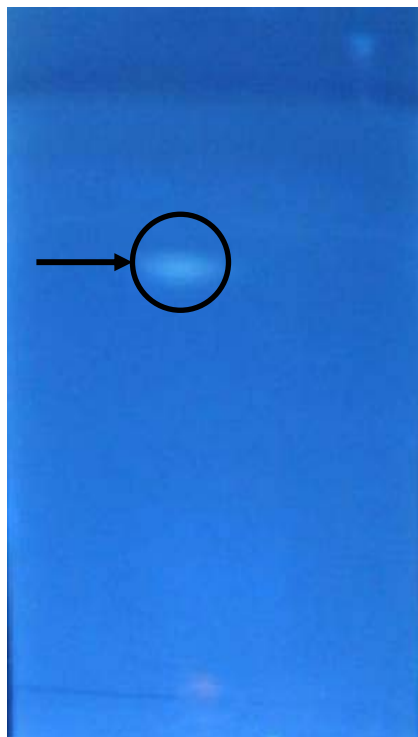
الشكل 1: اطوار النمو للعزلة PFAS14 وانتاجية صبغة البايوفريدين



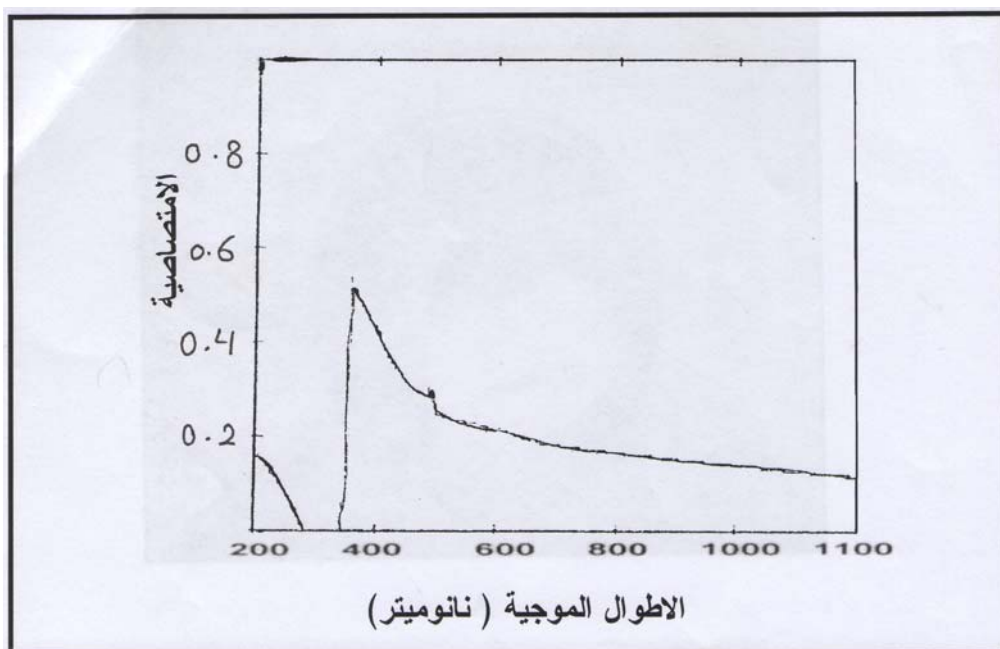
الشكل 2: القمم الناتجة من كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستعمال عمود CM Cellulose 22 بأبعاد 2.5×13 سم والغسل بدارىء البايوردين - حامض الخليك 50 ملي مولار ذي رقم هيدروجيني 5 والاسترداد بدارىء البايوردين - حامض الخليك بزيادة تدريجية 0.1 - 2 مولار ذي رقم هيدروجيني 5 بسرعة جريان 0.5 مليلتر/دقيقة وبأجزاء حجم كل منها 3 مليلتر.



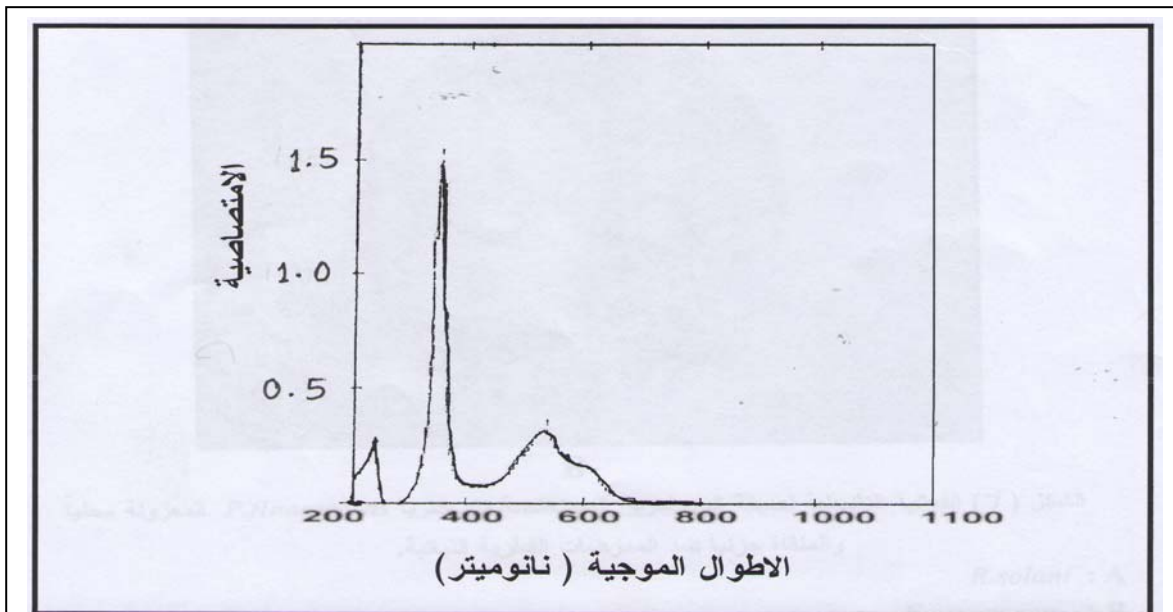
الشكل 3: القمة الناتجة من عملية الترشيح الهلامي باستعمال مادة Sephadex G25 المعياً بعمود بأبعاد 2.8×30 سم CM والغسل بدارىء الباييردين - حامض الخليك 50 ملي مولار ذي رقم هيدروجيني 5 لمعقد البايوفيرين-الحديد بعد اضافة مادة EDTA و بسرعة جريان 0.5 مليلتر/دقيقة و باجزاء حجم كل منها 3 مليلتر .



الشكل 4: البقعة الناتجة من صبغة البايوفيردين المنقاة جزئياً باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.



الشكل 5: طيف الامتصاص لمعقد البايوفيردين-الحديد الناتج من خطوة التبادل الايوني



الشكل 6: طيف الامتصاص لصبغة البايوفردين المنقاة جزئياً الناتجة من خطوة الترشيح الهلامي



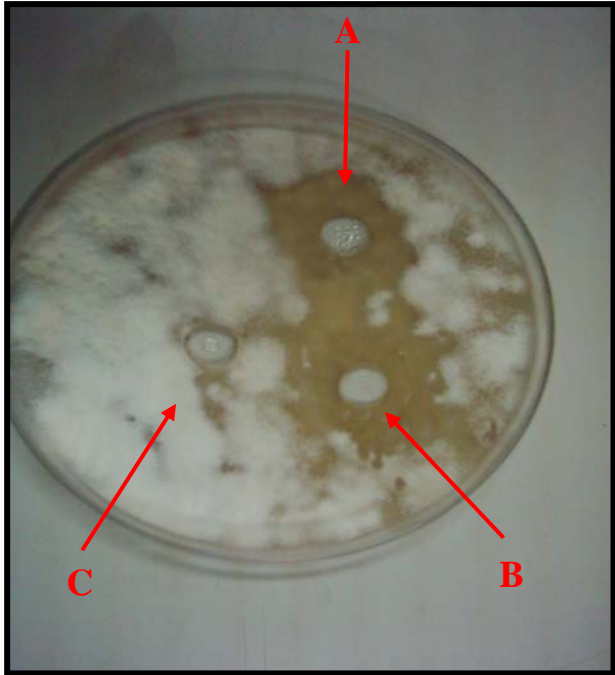
A



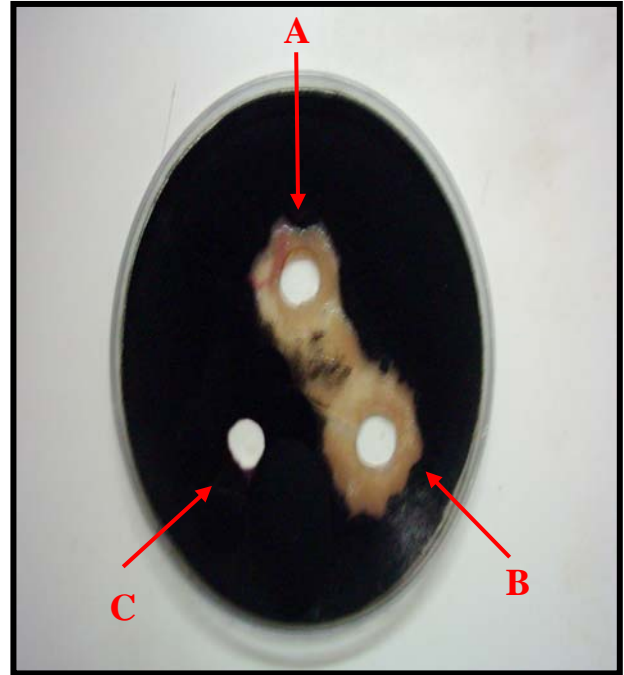
B

الشكل 7: الفعالية التثبيطية لصبغة البايوفردين المستخلصة من بكتريا *P.fluorescens* المعزولة محلياً والمنقاة جزئياً ضد الممرضات الفطرية النباتية.

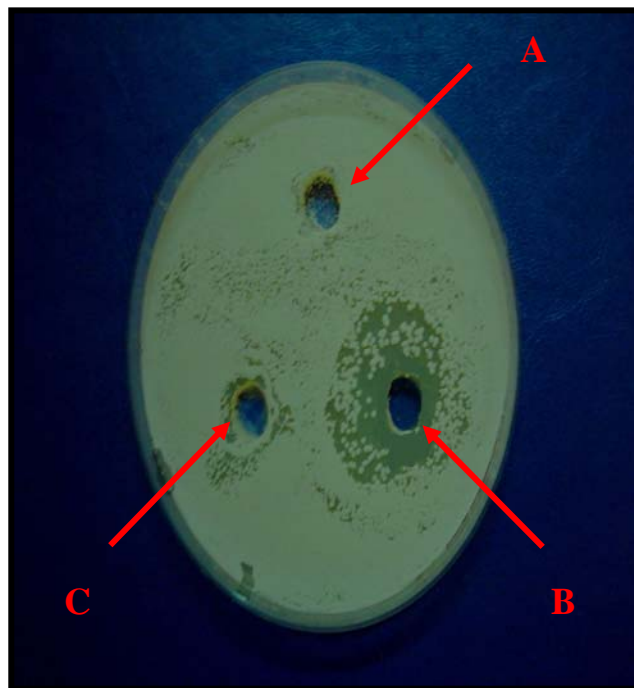
R.solani : A
F.oxysporum : B



R. solani



A. alternata



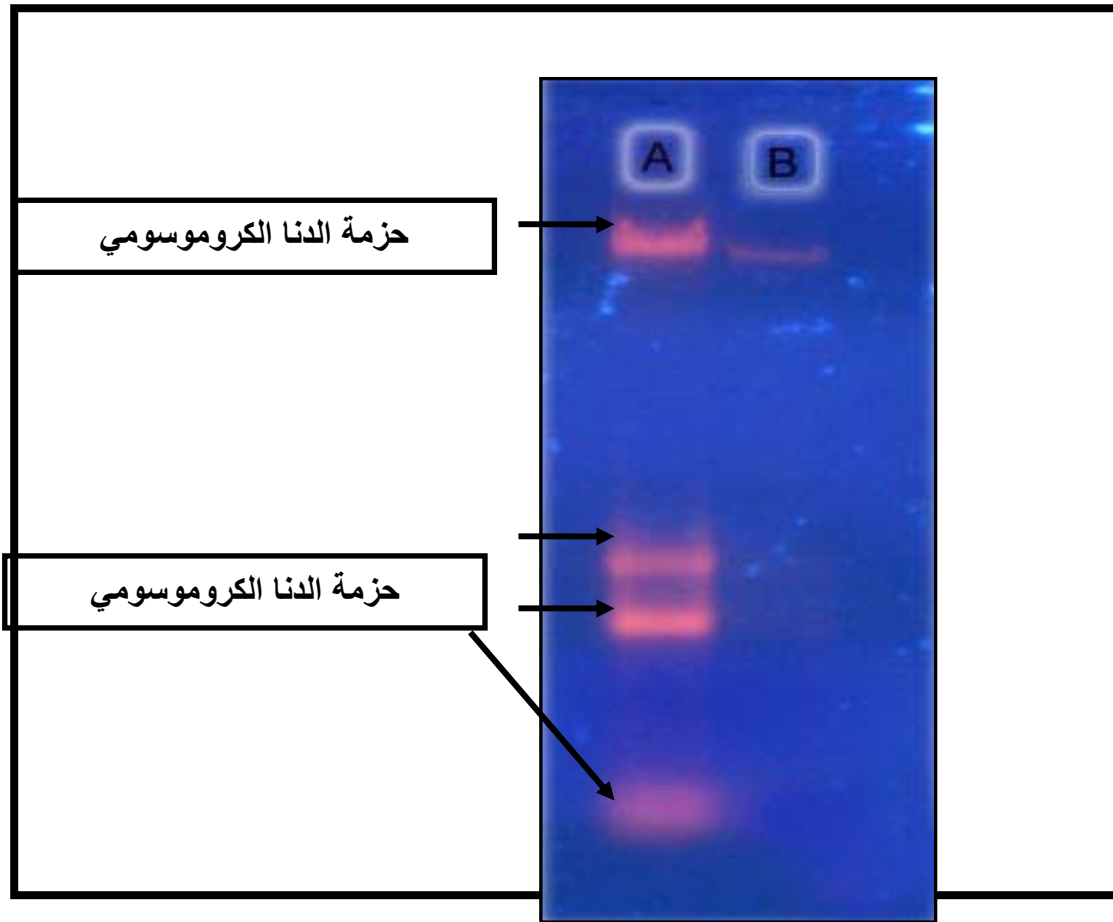
A. flavus

الشكل 8: الفعالية التثبيطية ضد الممرضات الفطرية النباتية.

A: رائق العزلة البكتيرية PFAS14

B: صيغة البايوفردين المنقاة

C: معقد البايوفدين - الحديد



الشكل 9: الترحيل الهلامي الكهربائي باستعمال الاكاروز 8% بفارق جهد 70 فولت لمدة 90 دقيقة.

A : العزلة البكتيرية PFAS14 غير المحيدة.

B : العزلة البكتيرية PFAS14 المحيدة.

11. العاني ، ليث خليل توفيق محمد أمين . 2005. استحداث المقاومة ضد فايروس موزائيك الخيار باستخدام بكتريا *Pseudomonas fluorescens* رسالة ماجستير - كلية الزراعة / جامعة بغداد.
12. القره غولي ، جابر محسن جابر حسين . 1999. تأثير بكتريا *Pseudomonas fluorescens* والمعاملة بكبريتات الكالسيوم على مسبب مرض التعفن الطري ومرض التعفن الجاف على درنات البطاطا في الحقل واثاء الخزن . اطروحة دكتوراه فلسفة - كلية الزراعة - جامعة بغداد .
13. Tripathi, M.; Johri, B.N. and Sharma, A. 2006. Plant growth promoting *Pseudomonas* sp. Strains reduce natural occurrence of Anthracnose in Soybean (*Glycine max L.*) in central Himalayan region. *Curr. Microbiol.* **52**:390-394.
14. Visca, P.; Serino, L. and Orsi, N. 1992. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginose* mutant blocked in the synthesis of pyoverdine *J. Bacteriol.* **174**:5727-5731.
15. خزعل ، علي قاسم. 2007. استخلاص وتنقية صبغة البايوفريدن من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* المعزولة محلياً وامكانية استخدامها كعامل سيطرة بابلوجية . رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة بغداد .
16. Cody, Y.S. and Gross, D.C. 1987. Characterization of pyoverdine pss, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:928-934.
17. Csaky, T.Z. 1984. On the estimation of Bound hydroxylamine in Biological Materials. *Acta Chem. Scan.* **2**:450-454.
18. Whitaker, J.R. and Bernard, R.A. 1972. Experiment for introduction to Enzymology. The Wiber press. Davis.
19. UI-haq, M.I.; Jared, N.; Ahmed, R. and Rehman, A. 2003. Evaluation of different strain of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of Fusarium will of Ckickpea. *Pak. J. plant pathol.* **2**:65-74.
20. Jayaswal, R.; Fernandez, M. and Schroeder, R. 1990. Isolation and Characterization of *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1053-1058.

References

1. Hamdan,; Weller, D. M. and Thomashow, L. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Caemannomyces graminis* Var tritici by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4- 80R. *Applied and Environ. Microbiol.* **57**: 3270 – 3277.
2. شعبان ، عواد والملاح ، نزار مصطفى. 1993 . المبيدات . دار الكتب للطباعة والنشر - جامعة الموصل
3. Shapiro, D.I.; Reilly, C.C.; Hutchkiss, M.W. and Wood, B.W. 2002. The potential for enhanced fungicide resistance in *Beaureria bassania* through strain discovery and artificial selection. *J. Inver. Pathol.* **81**: 86 – 93.
4. Gram.L.; Melchiorsen, J.; Spanggaard, B.; Huber, I. and Nielsen. T. F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:969 – 973.
5. Shaukat, S.S. and Siddiqui, I.A. 2003. The influence of mineral and carbon source on biological control of charcoal rot fungus *Macrophomina phaseolina* by fluorescent *Pseudomonas* in tomato. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**: 392 – 398.
6. Benizri, E.; Baudoin, E. and Guckert, A. 2001. Root colonization by Inoculated plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biocont. Sci. Tech.* **11**: 557 – 574.
7. Heil, M. and Bostock, R.M. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defense. *Ann. Bot.* **89**: 503-512.
8. O'Sullivan, D. J. and O'Gara, F. 1992. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-672.
9. Leeman, M.; Den Ouden, F.M.; Van Pelt, J. M.; Dirx, F. P. M.; Steijl, H.; Bakker, P. A. H. M. and Schippers, B. 1996. Iron availability affects Induction of Systemic resistance to Fusarium wilt of Radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathol.* **86**:149-155.
10. Ding, Z.; Zhang, J.; Chen, z.; Hang, D. and Li, J. 2001. Some biological characteristic genetically engineered insecticidal *Pseudomonas fluorescens*. *Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao.* **41**:3-8.

34. Gill, P.R. and Warren, G.J. **1988**. An Iron – Antagonized fungi static Agent that is not required for Iron assimilation from fluorescent Rhizosphere *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **170**:163-170.
35. Duijff, B.J.; Recorbet, G.; Bakker, P.; Loper, J. E. and Lemanceau, p. **1999**. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of non pathogenic *Fusarium oxysporum* FO 47 and *Pseudomonas putida* WCS 358. *phytopathol.* **89**:1073-1079.
36. Hancock, H. E.W. and Chapple, D.S. **1999**. Peptide antibiotics. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy.* **43**:1317-1323.
37. Moores, J. C., Magazin, M., Ditta, G.S. and Leong, J., **1984**. Cloning of genes involved in the biosynthesis of Pseudobastin, a high – affinity iron transport agent of plant growth – promoting Psuedomoas strain. *J. Bacteriology.* **157**: 53 – 58.
21. Rees, T.J. **1997**. The development of a novel antifungal silage inoculate. Ph. D. Thesis, Cornfield University Biotechnology Center, U.K.
22. Kieser, T. **1995**. Preparation and Analysis of Genomic and plasmid DNA. John Innes center, U.K. P: 17.
23. Trevors, J.T. **1986**. Plasmid curing in bacteria. *FEMS. Micro. Rev.* **32**:149-157.
24. Meyer, J.M. and Hornsperger, M. A. **1978**. Role of Pyoverdine *p.f.*, the iron binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in Iron transport. *J. Gen. Microbiol.* **107**:329-331.
25. Buyer, J.S.; DeLorenzo, V. and Neilands, J.B. **1991**. Production of the Siderophores Aerobactin by a halophilic *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2246-2250.
26. Mossialos, D.; Ochsner, U.; Baysse, C.; Chabl.; Prinary, J. P.; Koedom, N.; Budzikiewicz, H.; Fernandez, D.U.; Schfer, M.; Ravel, J. and Cornelis, P. **2002**. Identification of new conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent *Pseudomonas* involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **45**:1673-1685.
27. Rechid, D. and Ahmed, B. **2005**. Effect of Iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescen.* *Afr. J. Biotech.* **4**:697-702.
28. Olmo A, D.; Caramelo, C. and San Jose, C. **2003**. Fluorescent complex of yoverdine with aluminum. *J. Inorgan. Biochem.* **97**:384-387.
29. Chakrabarty, A.M. and Roy, S.C. **1964**. Characterization of pigment from *Pseudomonas*. *Biochem. J.* **93**:144-148.
30. Cox, C.D. and Adams, P. **1985**. Siderophores activity of pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **48**:130-138.
31. Philson, S.B. and Llinas, M. **1982**. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. I. isolation and characterization. *The J. Biol. Chem.* **257**:8081-8085.
32. Kloepper, J. W.; Leong, J.; Teintze, M. and Schroth, M.N. **1980**. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature.* **286**:885-886.
33. Schroth, M.N. and Hancock, J.G. **1982**. Disease- suppressive soil and root – colonizing bacteria. *Sci.* **216**:1376-1381.