

تقييم فعالية مستخلص الطحالب الخضراء المزرقة التجاري (*Spirulina*) المضادة للزائفة *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* المسببة لمرض سل الزيتون مخبرياً

أ. د. موسى السمارة*

د. ابراهيم العبيد**

د. إياد محمد***

م. رواد احمد****

(تاريخ الإيداع 2022 /3/13 – تاريخ النشر 2022 /8/25)

□ ملخص □

تمت دراسة كفاءة المستخلص المائي التجاري *Spirulina* DXN. ضد البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* المسببة لمرض سل الزيتون مخبرياً. بعد عزل وتنمية البكتيريا الممرضة من التدرنات الموجودة على أشجار الزيتون المصابة في منطقة القدموس (محافظة طرطوس، سورية).

وتمت تنميتها على الوسط الغذائي (NA) Nutrient agar، وتم اختبار التأثير التثبيطي للمستخلص الطحلي بطريقة الانتشار التي تعتمد على وضع أقراص ورقية بتركيز محدودة من المستخلص على سطح وسط الأجار المزروع بالعزلة وتحضين على حرارة 28 درجة مئوية لمدة خمسة أيام. وبينت النتائج أن مستخلص *Spirulina* قد أظهر بالتركيز المختلفة المعتمدة (1،0،10،15،20،25) % تأثيراً تثبيطياً على نمو بكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* وبلغت القيم (20،17،0،23،28،33) % على التوالي، وبالتالي يمكن استخدام هذا المستخلص الطحلي في مكافحة البكتيريا المسببة لمرض سل الزيتون.

كلمات مفتاحية: *Spirulina*، البكتيريا، مرض سل الزيتون، *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*، نسبة التثبيط.

* أستاذ، قسم الوقاية البيئية - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة تشرين - سورية. moussa1957@gmail.com

** مدرس، قسم وقاية النبات - كلية الزراعة، جامعة تشرين - سورية. ibrahim.alabid@gmail.com

*** دكتور، مدير عام قسم وقاية النبات - وزارة الزراعة - سورية. eyadm2009@gmail.com

Evaluation of the effectiveness of the green algae extract (*Spirulina*) against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causal agent of olive knot disease *in vitro*

*Moussa Al samara

** Ibrahim Alabid

*** Eyad Mohammed

**** Rawad Ahmad

(Received 13/3/2022.Accepted 25/8/2022)

□ABSTRACT □

This research aimed to study the efficiency of a commercial aqueous extract of blue-green algae (*Spirulina*) against the bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* that causes olive knot disease *in vitro*. Pathogenic bacteria were isolated from galls on infected olive trees in kadmous area.

It was grown on Nutrient agar (NA) medium, and the inhibitory effect of the extract was tested by measuring the inhibition distance around the paper disc treated with the extract. The results of this research showed that the extract of blue-green algae showed at different concentrations (1,5,10,15,20,25) an inhibitory effect on bacterial growth *in vitro*, except for the concentration of 1%, while the concentration of 5% was 17%, While the growth of bacteria was inhibited by 20%, at a concentration of 10%, while the percentage of inhibition was 23% at a concentration of 15%, while the percentage of inhibition was 28% at a concentration of 20%, while the concentration of 25% gave an inhibition rate of 33%. The results of this research showed that the extract of *spirulina* algae is a safe and promising new method that can be used in control of the bacteria that cause olive knot disease in future.

Key words: *Spirulina*, Bacteria, olive Knot disease, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* .Inhibition percentage

* Prof, Department of Environmental Prevention, Higher Institute for Environmental Research, Tishreen University, Syria. moussa1957@gmail.com.

**Assistant prof, Department of plant protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Syria. ibrahim.alabid@gmail.com.

***Doctor, Director General of Plant Protection Department - Ministry of Agriculture – Syria. eyadm2009@gmail.com.

**** Phd Rawad Ahmad, Department of Environmental Prevention, Higher Institute for Environmental Research, Tishreen University, Syria. Rawad.ahmad899@gmail.com.

مقدمة:

استخدمت المبيدات الكيميائية للسيطرة على مسببات الأمراض النباتية، ولكن أدى الاستخدام المكثف لهذه المواد الكيميائية إلى تطور مقاومة البكتيريا للمبيدات الكيميائية في الكثير من دول العالم (Brent & Holloman, 1998)، زاد استخدام هذه المبيدات في تراكيز عالية من خطر التسمم نتيجة الاعتماد على المنتجات الزراعية كغذاء رئيس في الحياة اليومية، لذلك هناك اهتمام متزايد بالبحوث في مجال استخدام المستخلصات النباتية، والطحالب لمكافحة الآفات والأمراض النباتية في الزراعة (Costa et al., 2000). يساهم مستخلص الطحالب البحرية في تقليل استهلاك الأسمدة والمركبات الكيميائية المستخدمة في عملية الإنتاج الزراعي (مطروود وآخرون، ٢٠١٦). تنتمي الطحالب الخضراء المزرققة أو الطحالب الزرقاء *Spirulina* (أرثوسبيرلا) إلى عائلة *Oscillatoriaceae*، وتنمو في المناخات شبه الاستوائية في البحيرات المالحة والمحيطات، وتنمو بشكل طبيعي في الأوساط القلوية والدافئة في المياه العذبة في آسيا، وأفريقيا، وأوروبا، وأمريكا الشمالية، وقد استخدمت كغذاء في المكسيك (Hwang et al., 2011). تعيش الطحالب الخضراء المزرققة في المياه العذبة (البحيرات) وفي مياه البحار المالحة، وعلى الرغم من أنها ذاتية التغذية الضوئية، إلا أن بعضها كائنات غيرية التغذية اختيارية التغذية، قادرة على النمو على ركائز معينة في الظلام أيضاً بعضها غير ضوئي، وبالتالي فهي الزامية غيرية التغذية. تنتج الطحالب الخضراء المزرققة مركبات متنوعة نشطة بيولوجياً، ومن هذه المركبات المضادات الحيوية التي تثبط نمو البكتيريا والفطريات الممرضة النباتية مثل: *Botrytis cinerea*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Rhizoctonia solani*، *Aspergillus oryzae*، *Erysiphe polygoni*، *Erysiphe polygoni*، *Chaetomium globosum*، *Cunninghamella blakesleeana* (Kulik, 1995).

بين استخدام مستخلصات الطحالب البحرية من الجنس *Spirulina* تأثير أمن وفعال في معالجة مسببات الأمراض النباتية، والأقل ضرراً على البيئة، وأظهر مستويات تأثير مختلفة عند استخدامها في معالجة الأمراض النباتية كمضادات للفطريات، والبكتيريا، وأظهر Abbassy وآخرون (٢٠١٤) تأثير المضاد لنشاط الفطريات الممرضة للنبات مثل: (*Rhizopus stolonifer*، *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Aspergillus niger*، *Alternaria solani*، *Pythium debarianum* و *Botrytis cinerea* و *Penicillium digitatum*). وبعض أنواع البكتيريا الممرضة للنبات مثل: (*Agrobacterium tumefaciens* و *Erwinia carotovora var. carotovora*). (Abbassy et al., 2014). واستخدمت *Spirulina* ضد مسببات الأمراض البكتيرية مثل: *S. aureus*، *E. coli*، *P. aeruginosa*، *Salmonella* sp، *Shigella* sp (Elshouny et al., 2017). تنتج الطحالب الخضراء المزرققة (*Spirulina*) مركبات مختلفة نشطة بيولوجياً تؤثر على المستقبلات الخلوية (Noaman et al., 2004)، وتشمل المضادات الحيوية التي تثبط نمو البكتيريا والفيروسات والفطريات المسببة لأمراض البشر والنباتات (Kulik, 1995). بينت الأبحاث أهمية الطحالب البحرية والتي هي بالعادة مزيج من المركبات الخام وليست مركبات معزولة بشكل مجزأ تحتوي على الفينولات الطبيعية، التي لها دور كبير كمضادات بكتيرية وفطرية وتحسن من تكوين اللجنين في النباتات مما يزيد من مقاومتها للأمراض في النبات، وتنشط تكوين منظمات النمو الطبيعية، و Polyamine، والمضادات الحيوية الطبيعية ضمن النبات والغيتو ألكسين (Sitara et al., 2008). أظهرت الأبحاث

الحديثة (Yazdani *et al.*, 2011) أن الفائدة من استخدام الخلاصة الخام هو التأثير المتكامل لمزيج المركبات الفعالة التي تحفز تكوين الفورم الدهيد بطريقة طبيعية داخل النبات عن طريق مجموعة الميثل الموجودة بها، وبالتالي ترفع من درجة تحمل النبات للإصابات المرضية، وتمتلك مدى واسع ضد الكائنات الحية الدقيقة، إضافة الى انخفاض مقاومة الممرضات لها، تستخدم طحالب السبيرولينا كغذاء للإنسان، وكغذاء للأسماك، وكعلف للحيوانات (Ahsan *et al.*, 2008). يعد نقص العناصر الغذائية اللازمة لنمو النبات سبباً رئيساً لضعف نمو النبات، وقلة مقاومته للأمراض التي تصيبه. بينت الأبحاث أنه من الضروري الاستفادة من الطحالب، وخاصة *Spirulina* التي تحتوي على الأحماض الأمينية اللازمة لنمو النبات، إضافةً إلى أنها غنية بمضادات الأكسدة، إذ تحتوي على عنصر نشط رئيس يدعى (phycocyanin) وهي عبارة عن مادة مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات، وتحتوي على حمض الأوليك جاما لينولينيك، وعلى العناصر المعدنية الأتية: النحاس، والكالسيوم، والزنك، والفوسفور، والحديد، والمغنيسيوم، والبوتاسيوم، والمنغنيز (Salmean *et al.*, 2015). وتعد من الأغذية الغنية بالأصبغة النباتية، فهي تحتوي على الكلوروفيل، إكزانثين، البيتا كاروتين وتتميز بقدرتها العالية على إجراء عملية التمثيل الضوئي. وقد أتاحت منظمة الصحة العالمية استخدامها كأصبغة غذائية طبيعية، وتحتوي على الفيتامينات الأتية: B6، B3، B2، B1، K، B12 (Salmean *et al.*, 2015).

تعد البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* هي العامل المسبب لمرض سل الزيتون، وهي بكتيريا عصوية، سالبة غرام، تتحرك بواسطة سيات قطبية، عددها من (1-5) سيات، درجة الحرارة المناسبة لنموها (23-28) درجة مئوية، وتتسبب بخسائر في إنتاج الزيت، والثمار، لمحصول الزيتون، وتتسبب بظهور أورام وتقرحات على الأوراق والأفرع والثمار، وتشوه وتخريب النسيج الداخلي الخشبي للساق والأفرع، لشجرة الزيتون وتشوه منظر، وشكل الشجرة العام وتساقط أوراقها (Ramos *et al.*, 2012). يعتمد كبر حجم الثآليل والعقد والتدرنات التي تسببها بكتيريا سل الزيتون على كمية الإنتاج البكتيري للهرمون النباتي حمض الأنندول الخلي indoleacetic (IAA) وهرمون السيتوكينين (Penyalver *et al.*, 2000).

٢- أهمية البحث وأهدافه:

تشكل شجرة الزيتون مصدراً اقتصادياً هاماً للعديد من الأسر في سورية وإن إصابة هذه الشجرة بمرض سل الزيتون وانتشاره بشكل واسع في الساحل السوري، حيث يعد من أهم الأمراض البكتيرية التي تسبب ضرراً كبيراً للأشجار المصابة، وخسائر في الإنتاج بالتالي انخفاض المردود الاقتصادي لتلك الأسر بشكل كبير. وبسبب قلة الدراسات العلمية حول هذا المرض في سورية، والحاجة الملحة لمكافحة المرض لتقليل خسائر الإنتاج، بإتباع أفضل أساليب مكافحة المتكاملة التي تحافظ على سلامة البيئة، وتحقيق الزراعة المستدامة والإنتاج الأمثل.

ولقد هدف هذا البحث إلى:

- اختبار فعالية مستخلص الطحالب الخضراء المزرقة *Spirulina* مخبرياً ضد البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* المسببة لمرض سل الزيتون.
- اختيار التركيز الأمثل من مستخلص الطحالب الخضراء المزرقة *Spirulina* لاستخدامه في عمليات مكافحة ومعالجة مرض سل الزيتون الذي تسببه بكتيريا الزائفة *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

٣- طرائق البحث ومواده:

٣-١- جمع العينات: جمعت العينات من بساتين الزيتون المصابة في منطقة القدموس بمحافظة طرطوس في سورية، وأجريت الدراسة المخبرية عليها في مخابر المعهد العالي لبحوث البيئة، ومخبر الأمراض البكتيرية والفيروسية في كلية الزراعة في جامعة تشرين.

٣-٢- عزل وتنميط البكتيريا: تم عزل البكتيريا الممرضة من أشجار الزيتون المصابة، بنزع الأورام أو التآليل من الأشجار المصابة وتقطيعها الى قطع صغيرة بعد إجراء التعقيم السطحي بمادة هيبوكلووريت الصوديوم التجاري تركيز (٥%) لمدة (٣-٥) دقائق، ثم بالكحول (٧٥%) لمدة دقيقة واحدة، ثم غسلت بالماء المقطر والمعقم، ووضعت على ورق ترشيع معقمة لتجف وتم هرس النسيج المقطع في (٥ ميليلتر) من الماء المقطر والمعقم وبعد (١٥ دقيقة) نشرت قطرة من المعلق على سطح الآجار المغذي ثم حُضنت الأطباق على درجة حرارة (2±٢٦) سيليسيوس لمدة (٤٨) ساعة (أبو غرة، ٢٠٠٤).

٣-٣ تحديد أو تنميط البكتيريا الممرضة:

نمطت العزلات البكتيرية اعتماداً على: الخصائص الشكلية والمجهريّة (الصبغ والتلون)، الخصائص الزراعية (صفات المستعمرات)، الاختبارات الكيميائية الحيوية (اختبار التنفس).

٣-٤- تحضير اللقاح البكتيري:

تم تنشيط العزلة البكتيرية قبل إجراء اختبار التأثير التثبيطي لمستخلص *Spirulina* على الوسط الغذائي (Nutrient Agar) عند درجة حرارة ٢٨ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة، وأخذ عدة مستعمرات من البكتيريا المنشطة على الوسط المغذي (NA) ومزجها مع الماء المقطر المعقم بحيث يكون عدد الخلايا الكلي تقريباً بحدود ١٠^٧ وحدة مشكلة للمستعمرة البكتيرية.

٣-٥- طريقة إنتشار القرص: أخذ جزء من المستعمرة البكتيرية حديثة النمو بوساطة أبرة التلقيح البكتيري، ومزجت مع الماء، ثم أخذ ١٠٠ ميكروليتر من المعلق البكتيري وفرشت في طبق يحتوي المستنبت الغذائي (Nutrient Agar) ثم شربت أقراص ورقية بقطر ٥ ملم بالتركيز الآتية (١،٥،١٠،٢٠،٢٥) لمستخلص *Spirulina* D X N التجاري إنتاج ماليزيا، وطبقت ثلاثة مكررات لكل تركيز، بينما شربت أقراص الشاهد بالماء المقطر المعقم، تركت الأطباق مدة ساعة في درجة حرارة الغرفة لتهيئة مستخلص *Spirulina* وانتشاره على سطح المستنبت، ثم حضنت الأطباق مدة (٢٤-٤٨) ساعة في درجة حرارة ٢٨ درجة مئوية، ثم قيس قطر تثبيط النمو البكتيري بمسطرة ميليمترية، وحسبت النسبة المئوية للتثبيط واحد وفق المعادلة الآتية: (Bouaichi et al., 2015)

النسبة المئوية لتثبيط % = متوسط قطر النمو البكتيري للشاهد - متوسط قطر النمو البكتيري للمعاملة

١٠٠x

متوسط قطر النمو البكتيري للشاهد

التحليل الإحصائي: تم إجراء التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام اختبار (Tukey) Anova-one way) عند أقل فرق معنوي ١% وكان لكل معاملة ثلاث مكررات.

٤- النتائج والمناقشة:

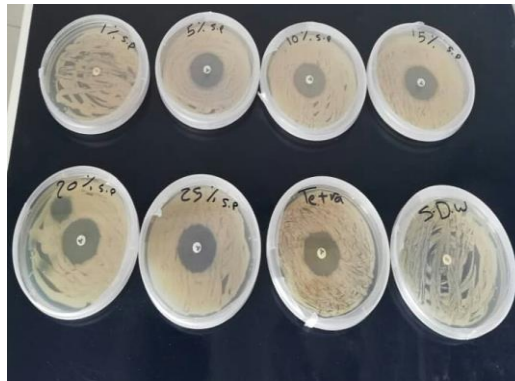
٤-١- تأثير المستخلص بطريقة انتشار القرص: أظهر المستخلص بتركيزه المختلفة تأثيراً على نمو البكتيريا ما عدا التركيز (١%) حيث كان نمو البكتيريا بدرجة مماثلة لنموها في طبق الشاهد من المستخلص، أما التركيز ٥% فقد كانت نسبة تثبيطه ١٧%، أما عند التركيز ١٠% فقد كانت نسبة تثبيطه ٢٠%، في حين بلغت النسبة المئوية للتثبيط ٢٣% عند التركيز ١٥%، بينما كانت نسبة التثبيط ٢٨% عند التركيز ٢٠%، ولقد بينت النتائج أن النسبة المئوية للتثبيط عند التركيز ٢٥% هي ٣٣%. وكما هو موضح في جدول (١).

الجدول (١) حساسية البكتيريا الزائفة *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* للتركيز المختلفة من مستخلص

Spirulina

التركيز %	متوسط قطر النمو البكتيري (سم)	نسبة التثبيط %
الشاهد	٩ ^a	٠
١	٩ ^a	٠
٥	٧.٥ ^b	١٧
١٠	٧.٢ ^{b,c}	٢٠
١٥	٦.٩ ^c	٢٣
٢٠	٦.٤ ^d	٢٨
٢٥	٦ ^e	٣٣

الأحرف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية عند مستوى المعنوية $P < 0.01$ حسب اختبار Anova-one way (Tukey).



الشكل (١) تأثير مستخلص *Spirulina* بالتركيز على نمو البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* مقارنة مع الشاهد والمضاد الحيوي Tetracline.

بينت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام اختبار Anova-one way (Tukey) وجود فروق معنوية $p < (0.01)$ بين التركيزات المختلفة في تأثيرها على نمو البكتيريا مقارنة مع الشاهد غير المعامل بالمستخلص. إضافة إلى ذلك تم مقارنة تأثير مستخلص السبيرولينا مع مركبات ذات فعالية في الحد من نمو البكتيريا، فقد بينت التجارب أن نسبة التثبيط عند التركيز ٠.٠٢% للمضاد الحيوي تتراسكلين كانت ٢٠%، بينما أوكسي كلور النحاس ٢٢% كما يبين

الشكل رقم (٢) تأثير مستخلص السبيرولينا بتركيزه المختلفة على نمو البكتيريا مقارنة مع الشاهد والمضاد الحيوي تتراسكلين.

٥- الاستنتاجات والتوصيات:

١-٥- الاستنتاجات:

١- أظهر هذا البحث أهمية التفكير بطرائق مكافحة جديدة لمرض سل الزيتون لما يسببه من خسائر فادحة في إنتاج الزيتون.

٢- أثبت مستخلص الطحالب الخضراء المزرقة بتركيزه المختلفة فعالية في منع نمو البكتيريا المسببة لمرض سل الزيتون مخبرياً.

٢-٥- التوصيات:

٣- ينصح باختبار مستخلص الطحالب الخضراء المزرقة (السبيرولينا) في المشاتل لمكافحة مرض سل الزيتون.

٤- استكمال الدراسات العلمية على مستخلص الطحالب الخضراء المزرقة (السبيرولينا) كمنتج غير مكلف، آمن وفعال وصديق البيئة.

المراجع:

- ١- أبو غرة، محمود. (٢٠٠٤). تعريف البكتيريا *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* المعزولة من نبات الأس *Myrtus Communis* في سوريا. جامعة دمشق، مجلة العلوم الزراعية، ٢٠، ١٧٥-١٨٩.
- ٢- مطرود، سميرة؛ حسن، فاطمة؛ كاظم، إبراهيم (٢٠١٦). تأثير موعد الزراعة والرش بمستخلص الطحالب البحرية *Kelpak* في نمو وحاصل البذور والزيت لنبات الريحان *Ocimum basilicum var Cinnamon L*. مجلة جامعة ذي قار للبحوث الزراعية، المجلد ٥ (١).

المراجع الأجنبية:

- 1-Abbassy, M.A., Rabia, S., Marei, G. (2014). *Antimicrobial Activity of Some Plant and Algal Extracts*. International Journal of Plant & Soil Science. 3(10), 1366-1373.
- 2-Ahsan, M., Habib, B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M.R. (2008). *A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*, FAO Fisheries and Aquaculture Circular, No. 1034
- 3-Bouaichi, A; Habbadi, K. (2015). *Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi causal agent of olive knot*. Journal of agriculture and Veterinary science, 8, 41-45.
- 4-Brent K.J., Holloman, DW. (1998). *Fungicide resistance: The assessment of risk*. FRAC, Global Crop Protection Federation, Brussels, Monograph, 2, 1-48.
- ٥-Costa T.R., Fernandes F.L.F., Santos S.C., Oliveria C.M.A., Liao L.M., Ferri P.H., Paulo J.R., Ferreira H.D., Sales B.H.N., Silva M.R.R. (2000). *Antifungal activity of volatile constituents of Eugenia dysenterica leaf oil*. Ethnopharmacol, 72, 111-117.
- ٦-Elshouny. W.A., El-Sheekh, M.M., Sabae, S.Z., Khalil, M.A and Badr, H.M. (2017). *Antimicrobial activity of spirulina platensis against aquatic bacterial*

isolates. Journal of microbiology Biotechnology and Food sciences, doi: 10.15414, 6, 5, 1203-1208.

٧-Fravel, D.R. (2005). *Commercialization and implementation of biocontrol*. Annu Rev Phytopathol. 43, 337-359.

٨-Guinebretiere M.H., Nguyen, C., Morrison, N., Reich, M., Nicot, P. (2000). *Isolation and characterization of antagonists for biocontrol of the postharvest wound pathogen Botrytis cinerea on strawberry fruits*. J Food Prot. 63, 386-394.

٩-Kulik M.M. (1995). *The potential for using cyanobacteria (blue green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi*. Eur J Plant Path. 101(6):585-599.

10-Noaman N.H, Khaleafa A.F, Zaki S.H.(2004). *Factors affecting antimicrobial activity of Synechococcus leopoliensis*. Microbial Res.159, 395-402.

11-Penyalver, R., Ferrer, A., Bertolini, E., García, A. (2000). *Detection of Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi in Olive Plants by Enrichment and PCR*. Applied and Environmental Microbiology 66(6), 2673-7.

12-Ramos, C., Casado, I.M.M., Bardaji, L., Aragón, I.M. (2012). *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi: Some like it knot*. Molecular Plant Pathology 13(9), 998-1009.

13-Salmean, G.G., Castillo, L.F., Cevallos, G.C. (2015). *Nutritional and toxicological aspects of Spirulina (Arthrospira)*. Nutricion Hospitalaria, 32(1), 34-40.

14-Sitara, U; Niaz, I; Naseem, J; Sultana, N. (2008) *Antifungal effect of essential oils on In vitro growth of pathogenic fungi*. Pakistan Journal of Botany, 40, 409-414.

15-Wilson, C.L.E.(1989). *Postharvest biological control of Penicillium rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria*. Sci Hortic. 40, 105-112.

16- Yazdani, D; Tan, H.Y; Zainal Abidin M.A., Jaganath. I.B. (2011).

A review on bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi, Journal of Medicinal Plants Research. 5, 6584-6589.