التداخلات البيوكيميائية لمخلفات اشجار اليوكالبتوس والنيم مع بعض النباتات والاحياء المجهرية

Biochemical interaction between Eucalyptus, Neem residues with some plants and microorganisms

اياد وجيه رؤوف انسام غازي العاني نهاد طه محمد

كلية العلوم / جامعة بغداد

A.W.AL-SHAHWANY A. G. AL -AANI N. T. MOHAMMAD

College of Science/ University of Baghdad

المستخلص

اجريت دراسة لمقارنة التاثير الاليلوباثي لمخلفات اشجار اليوكالبتوس *Eucalyptus globules* والنيم *Azadirachta indica* في نمو وانبات بذور الفجل *Raphanus sativus* والرشاد *Lepidium sativum* من خلال اضافة مخلفات الاشجار بمستوين 3 و 6 غم / كغم للتربة . كما تضمنت الدراسة تقييم الفعالية الميكروبية لزيت بذور اليوكالبتوس والنيم على الاحياء المجهرية الممرضة *Escherichia coli* و *Klebsiella pnenumonia* و*Staphylococcus aureus* و *Pseudomonus aeruginosa* و *Proteus mirabilis* . استخدمت الزيوت بتراكيز 2.5 و 5 و 10 و 15 % . اتبعت طريقة التقطير البخاري Stem Distillation في استخلاص الزيوت ، كما اعتمدت طريقة Agar well diffusion في اختبار فعالية المستخلصات ، واخذت قياسات اقطار مناطق التثبيط Inhibition zone لمقارنة فعالية تراكيز الزيوت التثبيطية . ادت اضافة مخلفات اليوكالبتوس والنيم للتربة بمستوى 6 غم / كغم الى تثبيط انبات بذور الفجل والرشاد في حين ادى الاضافة بمستوى 3 غم / كغم الى اختزال معنوي في اعداد واطوال نباتات ،. كما اظهرت النتائج القدرة التثبيطية لزيت يوكالبتوس في نمو *E.coli* و *S.aurus* و *K . pnenumonia*بالتراكيز (10 و15) % ، في حين لم تسجل لكلا الزيتين اي تثبيط ضد *P. mirablils* و *P. aeruginosa* . مما تقدم يتضح أن زراعة اشجار اليوكالبتوس والنيم على حافات الانهار والمسطحات المائية يساعد في الحد من نمو الادغال مع افضلية اليوكالبتوس لتاثيرها الواضح ضد بعض الاحياء المجهرية الممرضة التي قد تلوث المياه .

Abstract

The study was carried to determinate the allelopathic effects of *Eucalyptus globules* and *Azadirachta indica* against *Raphanus sativus* and *Lepidium sativum* by adding their residues to the soil at rates of (3 , 6) gr / kg soil . The second part of study was to extract the oil seed and determine the biological activities against some pathogenic microorganisms namely *Escherichia col, Klebesiella pneumonia, Staphylococcus aureus,* Pseudomonas *aeruginosa, Proteus mirabilis*. These oils used at cons. (2.5, 5, 10, 15)% prepared and separated by stem distillation. Agar well diffusion method was used in bacteria preparing, and comparing extracts effect by determining the inhibition zone. Residues of Eucalyptus and Neem added to the soil at rates of 3gr/ kg soil significantly reduced the seed germination number and shoot length. While adding 6gr/ kg soil inhibited the seedling growth. Also the result shows inhibitory effects of the

Eucalyptus oils against *E .coli, S. aurus* and *K. pnenumonia*, put there was no inhibition against *P. aeruginosa* and *P.mirablils* treatments. In conclusion, it seem much useful to cultivated Eucalyptus and Neem trees at river bank and lake beach because their residues could be use as herbicides, antibacterial against same microorganisms which polluted the water.

المقدمة

الاليلوباثي ظاهرة قديمة اكتشفت منذ حوالي 2000 سنة , وتعرف التداخلات البايوكيمائية الضارة والنافعة بين أنواع النباتات وبضمنها الأحياء المجهرية [1] . أن هذه الظاهرة قد تعطي تفسيرا مقنعا للعديد من التغيرات الحاصلة في الأنظمة البيئية ecological systems المختلفة [2] . فقد اكدت العديد من الدراسات ان التأثيرات الاليلوباثية ناتجة عن تحرر مركبات أطلق عليها Allelochemicals التي تعد نواتج ايضية ثانوية تنتج من أي جزء من النبات سواء أكان أوراقاً، جذوراً، سيقاناً، أزهاراً وبذوراً ، وتعد الأوراق والجذور مصدراً رئيساً لهذه المركبات [3،4،5] . تعتبر الجذور مصدراً مهماً في تحرر المركبات الاليلوباثية وتأثيرها يكون مباشراً على جذور النبات المجاور وعلى الأحياء المجهرية الموجودة في التربة كما في نبات اليوكالبتوس [6] ، ويمكن إن تحرر هذه المركبات من النثار عندما تتراكم لفترات طويلة في التربة[7] . كما ذكر [6] ان مغسولات العديد من الحوامض الفينولية قد شخصت في اوراق العديد من النباتات اثناء فترة سقوط الامطار ، فقد اظهرت قطرات الندى المجمعة من تحت اشجار اليوكالبتوس *Eucalyptus globules L.* تاثيرا تثبيطيا على انبات البذور . وفي دراسة اخرى تبين ان انبات بذور الباقلاء والذرة الصفراء قد انخفض بصورة معنوية عند معاملتها او زراعتها بالتركيز 5% من مغسولات *E rostrata* ، كذلك لوحظ ان جميع التراكيز لغسولات *E globulus* والتي كانت (5 ، 10 ، 15، 20) % ثبطت انبات بذور الدخن . ان مغسولات اوراق اليوكالبتوس *E. citriodora* ادت الى تثبط انبات بذورالماش *V. radata* و *V. mungo* ونبات *Arachis hypogaea* ، كما اظهرت تثبيطا اكثر على استطالة الرويشة والجذير للنباتات المذكورة [8] . وقد شخصت المركبات التي تؤثر في نمو و تطورالنبات من خلال آليات مباشرة مثل التأثير على بناء الهرمونات ، فتح وغلق الثغور ، موازنة الأغشية الخلوية ، تكوين الصبغات ، البناء الضوئي ، التنفس ، بناء البروتين والهيموكلوبين البقولي و تثبيت النتروجين ، اما الاليات غير مباشرة فتشمل التأثير في صفات التربة وحالتها الغذائية او التأثير على الأحياء المجهرية الموجودة في التربة [2] .

يعود أصل اشجار النيم *Azadirachta indica* إلى جنوب آسيا (الهند وبورما) فهى شجرة سريعة النمو كثيفة الظل دائمة الخضره وتنمو بكثافة ، أما ارتفاعها فيصل إلى 16 متراً وأحياناً يبلغ 25 متراً. وتمتاز الشجرة بجذع قاس صلب ، بنى داكن ، يتراوح قطره ما بين(75 و 150) سنتيمتراً . تصل نسبة زيت بذور اشجار النيم 45% . ويستفاد منها في تحسين نوعية المياه من خلال تطهيرها من بعض المسببات المرضية او بعض الاحياء الحاضنة لها خاصة قواقع المياه العذبة التى تأوى أطوار الطفيليات . وثمة عدة تجارب مثيرة أجراها علماء هنود فى حقول الأرز اذ القوا فيها بعض أغصان النيم فوجدوا أن يرقات البعوض أبيدت بالكامل ، كما رصدوا انخفاضاً مذهلاً فى نسبة إصابة المزارعين بداء الملاريا . كما ادت الى إبادة الكثيرمن الطفيليات النباتية [9] .

هدفت الدراسة الى ايجاد نباتات ذات تاثير اليلوباثي يمكن زراعتها على حافات المسطحات المائية لغرض تقليل من نمو الادغال ، وكذلك للحد من تكاثر الاحياء المجهرية المرضة على حافات وتلويثها للمياه . وقد اعتمدت اشجار اليوكالبتوس والنيم لسرعة نموهما ولفوائدهما الاقصادية فضلا عن استخدامات الطبية لهما .

المواد وطرائق البحث

تضمنت الدراسة عدداً من التجارب المختبرية لدراسة التأثيرات الاليلوباثية وقد شملت الدراسة تأثير مزج مخلفات اوراق اليوكالبتوس والنيم مع التربة حيث تم مزج مسحوق المخلفات وبنسب إضافة (0 و3 و6) غم /كغم تربة , ووضعت جميعها في أصص بلاستيكية سعة 2 كغم وأضيف لكل أصيص 500 مل ماء وغطيت الأصص بأكياس من النايلون مثقبة , وحضنت لمدة أسبوع واحد وفي درجة حرارة 24 ± 2 وبعد انتهاء فترة التحضين , وزعت الترب بـ 10 بذورمن الفجل والرشاد في أصص بلاستيكية بارتفاع 13سم وقطر15سم ، وسقيت بالماء وبعد 18 يوم من الزراعة تم حساب النسبه المئوية خمسة نباتات كما يلي :

$$\text{النسبة المئوية للإنبات} = \frac{\text{عدد البادرات الظاهرة}}{\text{عدد البذور المزروعة}} \times 100$$

كما سجلت اعداد واطوال تللك النباتات .

دراسة تاثير زيت البذور في نمو بعض الأنواع البكتيرية:

اجريت هذه الدراسة على خمسة انواع من البكتيريا الممرضة ، هي *Escherichia coli* و *Klebsiella pneuumonia* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonus aeruginosa* و *Proteus mirabilis* المستحصل عليها من مختبرات الاحياء المجهرية للدراسات العليا في قسم علوم الحياة لكلية العلوم – جامعة بغداد والتي تم الحصول عليها من بعض مستشفيات محافظة بغداد .

تم تجفيف البذور على درجة حرارة 35 م لمدة 24 ساعة بعد ذلك طحنت البذور بواسطة مطحنة كهربائية . واستخلص الزيت من مسحوق البذور بإضافة 4 لتر ماء الى 50 غم مسحوق البذور ووضعت في جهاز الـ Clevenger حيث اتبعت طريقة التقطير البخاري Steam Distillation في الحصول على الزيوت ، تم تخفيف الزيت بتراكيز (0 و 5 و 10 و15) % باستعمال اثلين كلايكول .

تحضير المزروع البكتيري :

تم تحضير العالق البكتيري بتنمية البكتريا على وسط الاكار المغذي لمدة تتراوح بين 18-24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م وبعدها نقلت (3-4) مستعمرات مفردة الى انابيب اختبار حاوية على5 مل من وسط المرق المغذي وحضنت بدرجة 37 م لمدة 18 ساعة في الحاضنة .

تاثير التراكيز المختلفة لزيت بذور في نمو الاحياء المجهرية الممرضة :

استخدمت طريقة Agar well diffusion [10] وعلى النحو الاتي:

- صب 25 مل من وسط الاكار المغذي لكل طبق زجاجي .
- تمت مجانسة العالق البكتيري ذي زمن 18 ساعة ، واجريت له التخافيف العشرية .
- لقح الوسط بـ 0.1 مللتير من العالق البكتيري ذي تركيز 1×10^4 وحدة مكونة للمستعمرة / مل ونشر باستخدام قطنة معقمة Sterile swab وتركت الاطباق لمدة 15 دقيقة حتى تجف .
- عملت اربعة حفر بقطر 5 ملم داخل كل طبق باستخدام ثاقب زجاجي معقم .
- اضيفت 0.1 مل من التراكيز المتدرجة المحضرة للمستخلصات النباتية باستعمال ماصة دقيقة معقمة ، وعملت حفرة السيطرة في مركز الطبق المتمثلة باضافة اثلين كلايكول .
- عملت ثلاثة مكررات لكل طبق ، بعدها حضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة في الحاضنة .
- حددت فعالية كل تركيز من زيت بذور بقياس قطر منطقة التثبيط (Inhibition zone) ، علماً ان منطقة التثبيط هي المنطقة الخالية من النمو البكتيري .

التحليل الإحصائي:

نفذت التجارب حسب تصميم القطاعات العشوائية الكاملة(R.C.B.D) ، اجري التحليل الإحصائي للبيانات باستخدام الحاسوب الآلي بواسطة برنامج SAS ومقارنة المتوسطات الحسابية باستعمال اختبار دنكن متعدد المدى .

النتائج والمناقشة

1. تاثير اضافة مخلفات اليوكالبتوس والنيم في انبات ونمو بذور الفجل والرشاد

تشير النتائج جدول (1 و 2) إلى أن إضافة مخلفات نبات اليوكالبتوس والنيم إلى التربة اختزلت معنويا انبات بذور واطوال نبات الفجل والرشاد ، وازداد الاختزال بزيادة مستوى المخلفات في التربة . ففي جدول (1) يلاحظ اختزل عدد بذور الفجل النابته من 19 في معاملة المقارنة إلى (13 و 4) عند المستويين (3 و 6)غم /كغم من مخلفات اليوكالبتوس على التوالي ، في حين اختزل الى (12 و 3) عند المستويين (3 و 6)غم /كغم عند استخدام مخلفات النيم على التوالي . اما بذور الرشاد فقد اختزل اعداد البذور النابته من 14 في معاملة المقارنة إلى 3(و 0) عند المستويين 3 و 6 غم /كغم تربة المضاف اليها مخلفات اليوكالبتوس على التوالي، واما عند اضافة مخلفات النيم فقد اختزل العدد الى 1 و 0 عند المستويين (3 و 6) غم /كغم تربة على التوالي . كما اشارة النتائج الى تفوق نبات النيم بتاثيراته الاليلوباثيه.

جدول (2): معدل اعداد البذور الفجل والرشاد النابتة

تسلسل	نوع النبات	معاملة السيطرة	اعداد البذور النابتة في تربة ممزوجة بمخلفات 3 غم /كغم تربة		اعداد البذور النابتة في تربة ممزوجة بمخلفات 6 غم /كغم تربة	
			نبات اليوكالبتوس	نبات النيم	نبات اليوكالبتوس	نبات النيم
1	الفجل	19 a	13 b	12 b	4 c	3 c
2	الرشاد	14 b	3 c	1 d	0	0

و اختزلت مخلفات اليوكالبتوس والنيم معنويا اطوال النباتات النامية وازداد الاختزال بزيادة مستوى المخلفات . اذ يلاحظ من جدول(2) ان مخلفات اليوكالبتوس والنيم اختزلت معنويا اطوال النباتات الفجل ، إذ بلغت اطوال النباتات 90 ملم في معاملة المقارنة ، و(20 و 10) ملم عند المستويين(3 و 6)غم / كغم تربة عند استخدام مخلفات اليوكالبتوس على التوالي . اما عند استخدام مخلفات النيم فقد بلغت اطوال الفجل (20 و 0.5) ملم عند المستويين (3 و6) غم /تربة . كما سبب إضافة مخلفات إلى التربة انخفاضا معنويا انعكس ذلك على اطوال النباتات الرشاد اذ بلغت 10 و 0 ملم عند المستويين (3 و 6) غم/ كغم مخلفات اليوكالبتوس على التوالي ، وازداد الانخفاض عند اضافة مخلفات النيم في التربة الى(0.5 و 0) ملم عند المستويين (3 و6)غم / كغم .

جدول (2) : معدل اطوال نباتات الفجل والرشاد (ملم)

تسلسل	نوع النبات	معاملة السيطرة	اطوال النباتات النابتة في تربة ممزوجة بمخلفات 3 غم /كغم تربة		اطوال النباتات النابتة في تربة ممزوجة بمخلفات 6 غم /كغم تربة	
			نبات اليوكالبتوس	نبات النيم	نبات اليوكالبتوس	نبات النيم
1	الفجل	90a	20 b	20 b	10 c	0.5 c
2	الرشاد	30b	10 c	0.5 d	0	0

لقد أشارت نتائج الدراسة إلى أن إضافة مستوى قليل نسبيا من مخلفات اليوكالبتوس والنيم سببت تأثيرات اليلوباثية كبيرة في انبات بذور المحاصيل المختبرة و بدرجات مختلفة بين المحاصيل المدروسة . فالدراسات التي اجريت عند فصل وتشخيص المركبات الاليلوباثية في نبات اليوكالبتوس انها تحوي العديد من المركبات الاليلوباثية ، فقد عُزِل وُشخِص ومنها Scoplin , Caffeic acid , Gentistc acid, ∞-pinene , P-coumaric Chlorogenic acid , Ferulic acid ,Camphore , مركبا اليلوباثيا من المجموع الخضري [8] ، اما نبات النيم فقد كانت جميع المركبات المعزولة لها قدرة اليلوباثية كبيرة في تثبيط بزوغ بادرات للعديد من المحاصيل والأدغال ، كما أن لبعضها تأثيراً تضامنياً في تثبيط نمو الأنواع النباتية المدروسة فقد اشتملت هذه المواد على gallic ,tannic , ferulic acids فضلا عن bioflavonoids والتي منها myricetin و auercitin و kemferol وكذلك تحتوي على tannins و alkaloids و Various resins [11] . هذا يشير إلى أن الاجزاء الخضرية لنبات النيم تحوي مركبات اليلوباثية بإمكانها أن تتحرر منها بعد تحللها بفعل الأحياء المجهرية الموجودة في التربة وان تذوب بالماء وتصبح جاهزة لان يأخذها النبات وإحداث الضرر فيه ،كما وان زيادة تلك المخلفات أدت إلى زيادة التأثير الاليلوباثي من خلال زيادة تركيز المركبات الاليلوباثية في التربة .

2. فعالية زيت بذور اليوكالبتوس والنيم ضد بعض الأحياء المجهرية

يظهر الجدول (3) أن الأحياء المجهرية المختبرة قد تباينة نتائج تثبط نموها، وبشكل عام ازداد التثبيط بزيادة التركيز كما يتضح من النتائج وجود تفاوت في حساسية الكائنات المجهرية للزيوت المختبرة، إذ يلاحظ أن البكتريا *Escherichia coli* هي أكثر الأنواع حساسية تليها البكتريا *Klebesiella pneumonia* ، في حين كانت البكتريا *Staph. aureus* اقل حساسية لزيت اليوكالبتوس، باستثناء البكتريا *Pseudomonus*

aeruginosa و *Proteus mirabilis* التي لم تُثبط بكلا الزيتين . ويلاحظ أيضا أن زيت النيم لم يكن مثبطا بشكل واضح حتى عند زيادة التراكيز المستخدمة .

جدول (3): التاثير التثبيطي للزيوت ضد بعض الاحياء المجهرية الممرضة

حقول التثبيط (ملم) Zone of inhibition (mm)																				
نوع بكتريا / نوع الزيت	*E. coli*				*Klebsiella sp.*				*P. aeruginosa*				*P. mirabils*				*S. aureas*			
	%2.5	%5	%10	%15	%2.5	%5	%10	%15	%2.5	%5	%10	%15	%2.5	%5	%10	%15	%2.5	%5	%10	%15
زيت اليوكالبتوس	+	+ +	+ +	+ +	-	+ +	+ +	+ +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ +
زيت النيم	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

ملاحظة : (- < : 5 ملم , + : 5-9 ملم , + + : 10-19 ملم)

أظهرت النتائج ان زيت النيم لم يكن فعالا ضد الأحياء المجهرية المختبرة برغم من وجود الدراسات تؤكد وجود المركبات الكيميائية الفعالة فيه مثل Nimbidin و Nimbdol اللذان يعتبران من المضادات البكترية الفعالة [12] . ان عدم وضوح فعاليته التثبيطية ربما يعود لاختباره بطريقة الحفر Agar well diffusion بسبب عدم قابلية المركبات الكيميائية للانتشار في الاكار ، وهذا ما اكده بعض الباحثين من أن بين العوامل التي تحدد فعالية المستخلصات هي نوع الكائن المجهري المدروس وطريقة الاختبار والتركيز المستعمل وحجم اللقاح [13،14،15] . وربما كانت طريقة الاستخلاص (Steam Distillation) غير مناسبة لاستخلاص جميع المثبطات الكيميائية الموجودة في بذور نبات النيم ، اذ يشار إلى أن بعض المركبات الكيميائية الفعالة لها القابلية للإذابة في المحاليل غير القطبية ، وهذا ما اكده الباحثين الذين أشاروا إلى أن قطبية المحلول هي من العوامل المهمة في تحديد إذابة واستخلاص المركبات الكيميائية الفعالة [3،14،16] .

مما تقدم يتضح أن زراعة اشجار اليوكالبتوس والنيم على حافات الانهار والمسطحات المائية يساعد في الحد من نمو الادغال مع افضلية اليوكالبتوس لتاثيرزيت بذوره الواضح ضد بعض الاحياء المجهرية والتي قد تسبب في تلويث المياه .

في ضوء نتائج تجارب التداخلات البيوكيميائية لمخلفات اشجار اليوكالبتوس والنيم نوصي بالتوسع في اجراء تجارب اخرى للمقارنة بين تاثير مستخلصات هذه النباتات ضد الحشرات الناقلة للامراض لاسيما النباتات التي يمكن زراعتها في البيئة العراقيه .

المصادر

1. Haig, T, Partley, J., and An, M.(1998) . Allelopathy: from concept to reality. Proceedings of the 9th Aust. Agro. Conference, Wagga Wagga
2. Mulla MS, Su T. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1999, 15(2): 133–52.
3. Mahasneh, A. M., Abbas, J. A. and El-Oqilah, A. A. 1996. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain. phytotherapy Res. 10: 253-257.
4. Reigosa,M.J.,Sanchez-Moreirars,A.,Gonzalez,L(1999).Ecophysiological Approach in Allelopathy In ciritical reviews in plant sciences. 18(5): 577 – 608.
5. Vanghn, S.F and Boydston, R.A. (1997). Volatile allelochemicals releases by crucifer green manures. Chem. J. Ecol. 23:2107 – 2116.

6. Del-Moral, R. and Muller, C. H. 1970. The allelopathic effects of Eucalyptus camaldulensis . Am. Midl. Nat. 83: 254-282.
7. Rizvi, S. J. and Rizvi, V. 1992. Allelopathy. Basic and Applied Aspects. Chapman and Hall Press. London
8. Mariluz Sp. Dionglay1, Irma I. Palanginan1 and Maristar Sp. Dionglay. EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITES OF E. CAMALDULENSIS LEAF OIL AGAINST SCABIES. Fax: (049) 536 3630, E-mail: mariluz_dionglay@yahoo.com
9. Mulla MS. and Su T. 1999 .Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(2): 133–52.
10. Rice, E. L. 1984. Allelopathy. 2nd Ed, Academic press, New York.
11. Meliaceae A.Juss . 2005. Phonlic Acids in neem (*Azadirachta indica*) A major Pre-Existing Secondary Metabolites .J herb. Pharmacother . 5(1):35-43.
12. Obomanu F.G., Ogbalu K.O., U .U. Gabriel, G.K. Fekarurhobo and B.I. Adediran .2006.Larvicidal properties of *Lepidagathis alopecuroides* and Azadirachta *indica* on *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* .African Journal of Biotechnology .5(9):761-765 .
13. العاني، اوس هلال جاسم. 1998. دراسة مكونات الحبة السوداء المحلية *Nigella sativa L.* وتأثير مستخلصاتها على بعض الأحياء المجهرية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، العراق.
14. Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbial. Rev., 12: 564-582.
15. المحمدي، لهيب رجب عماد. 2002. عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* مع أمكانية رسم الخارطة الافتراضية لحركة هذه البكتريا بين المصادر المختلفة. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، جمهورية العراق.
16. الذهب، أزهار عمران لطيف. 1998. الفعالية التضادية لمستخلصات نباتات عراقية في بعض البكتريا الممرضة. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل، جمهورية العراق.