جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جـــــامعة بابـــــل
كليـة العلوم للبنـــات

# انتاج مضاد حياتي من الفطر *Trichoderma longibrachiatum* باعتماد تقنية الحالة الصلبة

# Production of Antibiotic from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* Using sold state fermentation

سرى رحمن نوار المسافر
Sura Rahman Nawar AL-Mosafer

(M.Sc., Biology/Babylon Univ., 2017)
ماجستير علوم حياة/كلية العلوم للبنات/ جامعة بابل
surarahman92@yahoo.com

أ.م.د نداء شهاب حمد
Assist. Prof. Dr. Nida'a Shihab Hamad
كلية العلوم للبنات/جامعة بابل
nida.shab@yahoo.com

## الموجز

اجريت هذه الدراسة في مختبرات كلية العلوم للبنات / جامعة بابل للتحري عن الفطريات المنتجة للمركبات الضد ميكروبية في تربة محافظه بابل للمدة من ايلول2015 الى ايلول 2016 . حيث جمعت عينات التربة من مناطق مختلف وشملت الترب الزراعية والترب الغير مزروعة كذلك الترب الملحية وترب الشاطئ والترب الصناعية ,تم تنقية 200 عزله فطرية عشوائيا واختبرت قدرتها التضادية مع عدد من الاحياء المجهرية الممرضة لتحديد قدرتها الانتاجيه .

تم اختبار 200 عزلة فطرية بواسطة المسح الاولي لتحديد قابليتها على تثبيط البكتريا الممرضة السالبة والموجبة والفطريات المرضية خارج الوسط الحي .

بينت نتائج التضاد ان 72 عزلة كانت قادره على تثبيط 3 او اكثر من الكائنات الممرضة وقد اختبرت هذه العزلات لتحديد انتاجيتها للحوامض حيث وجد ان 13 فقط كانت غير منتجه و59 عزله منتجه بنسب مختلفة .

استثنيت العزلات المنتجة للحوامض من الدراسة لان نسبه الحامض ادت الى قتل الاحياء المجهرية الممرضة . اما العزلات غير المنتجة فقد اختيرت منها العزلات الاكثر فعالية في التثبيط وذات مدى تثبيطي واسع .

تم تشخيص العينات الفطرية مظهريا باستخدام المجهر الالكتروني واوساط زرعيه تشخيصية مختلفة ,اما التشخيص الجزيئي للعزلات فقد تم باستخدام البادئ العام ITS1و ITS4 لتضخيم منطقة Internal transcribed spacer, حيث بينت نتائج التشخيص المظهري والجزيئي للعزلات بانها تعود للجنس *Trichoderma longibrachiatum*.

اما نتائج فحص الحساسية فقد اوضحت ان العزلة S4 هي الاقوى في الانتاج على وسط مخلفات البطاطا الصلب بالمقارنه مع الاوساط السائلة وتحت ضروف مثلى من درجة حراره واس هايدروجيني وزمن انتاج .

بينت النتائج بان المضاد المنتج ذو تاثير واسع الطيف ضد مجموعة من البكتريا الموجبه والسالبة لصبغة كرام لذالك تم اختبار فعاليته ضد مجموعة من الخمائر والاعفان الممرضه للانسان والمعزوله من مختبرات مستشفيات محافظة بابل.

عند مقارنه النتائج التي تم الحصول عليها مع نتائج المضادات الصيدلانية وجد ان تاثير المضاد المنتج يفوق تاثير كل من Tetracycline, Amikacin, Ampicillin, Gentamycin, بصورة كبيرة بالاضافة الى تاثيرها على مجموعة من الاعفان الممرضة.

اما اعلى قطر تثبيط تم الحصول علية يعود للعزلة S4 ضد البكتريا Bacillus seraus بقطر mm43.35 بعد تنمية الفطر على وسط مخلفات البطاطا الصلب لمدة 9 ايام بدرجه حراره 30 °م. وهو اعلى من قطر تثبيط المضاد Meropenem ضد البكتريا المذكوره.

تضمنت الدراسة جوانب اخرى وهي استخلاص المضاد من وسط التخمر باستخدام خلات الاثيل والماء المقطر ثم تنقيه المركب باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة .

كذلك تم تشخيص المركبات الفعالة باستخدام التحاليل الكيميائيه التالية( FTIR,HNMR and CHNS ) لمعرفة المجاميع الفعالة والتركيب الكيميائي للمضاد المستخلص المستخلصة وتحديد ذوبانية وسمية ونقاوة والوزن الجزيئي للمركب المستخلص.

**Summary**

This study is conducted in the laboratories of Science College for Women's / University of Babylon to investigate the antimicrobial producing fungi in the soil of Babylon province from September 2015 until September 2016 . Soil samples are collected from different regions included agricultural, non-agricultural, salty, sandy and carbonate soil, purified 200 fungal isolates randomly and tested the antagonism with a number of pathogenic microorganisms .

The 200 fungal isolates are tested by primary screening method to determine their ability to inhibit in *vitro* Pathogenic gram positive and negative bacteria and pathogenic fungi.

The primary screening illustrate that 72 isolate were able to inhibition 3or more pathogenic organisms. These isolates were tested to determine the acid productivity which found that only 13 were non-acid production and 59 isolate are product in different concentration.

The acids producing isolates are excluded from the study because the rate of acid led to killing of test pathogenic microorganism .The selected isolates are non-acid productive and most effective in the inhibition of test pathogenic microorganism with a wide range.

The samples are morphologically identified using the electron microscope and different diagnostic agricultural media (PDA, CYA, MEA), either molecular diagnosis of isolates have been using ITS1 and, ITS4 primer to amplify the Internal transcribed spacer region, the morphological and molecular identification results of the isolates showed that it belongs to *Trichoderma longibrachiatum*.

The sensitivity results illustrate that the isolate S4 is the strongest in the production on potatoes peals solid media in compared with liquid residues

media under the optimal production condition including temperature, hydrogen power and time of production.

Results show that the isolated antimicrobial compounds were broad-spectrum against both **G+ve** and **G-ve** bacteria so it has been tested its effectiveness against a group of pathogenic yeasts and molds isolated from laboratories of Babylon hospitals.

When comparing the results obtained with the results of pharmaceutical antibiotics found that the effect of the product exceeds the effect of Tetracycline, Amikacin, Ampicillin, Gentamycin, in addition to significantly impact on a range of pathogenic molds.

The highest inhibition zone is obtained due to the isolation of S4 against the bacteria *Bacillus seraus* with diameter 43.35mm after the incubation the isolates on the potato peals solid media for 9 days at a temperature of 30 ◦C. These diameter is higher than the inhibition zone of Meropenem antibiotics against the same bacteria.

Other aspects of this study include an extracted of the active compounds from the fermentation media using ethyl acetate and distilled water and then purifying the compound using thin layer chromatography(TLC) technique.

Also it has been diagnosed the active compounds using the following chemical analysis (FTIR, HNMR and CHNS) to illustrated the type of effective compound and detected the solubility, toxicity, purity and molecular weight for extracted compounds.

## المقدمة:

تعد التربة مصدرا طبيعيا للاحياء المجهرية ومنتجاتها الايضية (Smith, 2012). حيث ان عدد قليل جدا من الاحياء المجهرية يمكن اعتبارها كمصدر لانتاج المضادات الحياتية حيث تعتبر الفطريات بالمرتبة الثانية بعد الاكتينومايسيت في انتاج المضادات الحياتية تليها البكتريا Hackl *et al*.2004, Aroba, 2000).

الكسندر فلمنك هو اول مكتشف للمضادات الحياتية من الفطر *Penicillium notatum* (Dutta,2005) حيث بين قدرة المضاد على علاج عدد من الاصابات البكتيرية, هذا الاكتشاف كان البداية لتطور العوامل المضادة المنتجة من قبل الكائنات الحية (Taylor *et al*. ,2003).

تعد المجتمعات الميكروبية الدقيقة في التربة أكثر تعقيدا ومتنوعة وذات أهمية في الأنشطة البيولوجية المختلفة، وأنها مصدر مهم لانتاج عوامل مضادة ميكروبات جديدة وغيرها من المنتجات التي لديها أهمية في التكنولوجيا الحيوية (Hugo, 1998 ). حيث تعد منطقة الجذور في التربة مهمة جدا وذلك لوفرة مجتمعاتها الميكروبية وتعدد انواعها ( Robbert *et al*.,1996; Brooks *et al*., 2004 ).

تم دراسة الأنواع الترايكوديرما كعوامل حيوية ضد مسببات الأمراض النباتية الفطرية المعزولة من العديد من أنواع التربة (Alqayi and Alwan, 2015). وأظهرت البيانات التي تم الحصول عليها من العديد من الدراسات أن بعض العزلات من الترايكوديرما كانت قادرة على خفض نسبة الاصابة بأمراض النباتات بصورة كبيرة التي تسببها الفطريات الممرضة للنبات، أيضا تعمل بعض الأنواع المعروفة للفطر كعوامل سيطرة حيوية في المكافحة البيولوجية وكذلك تزيد من القدرة على مقاومة الأمراض النباتية (Howell, 2003), وذلك من خلال التنافس على الغذاء والمكان كذلك قدرته على انتاج العديد من المركبات الايضية القادرة على تثبيط نمو جراثيم الفطريات الاخرى او قتل الخلية النباتية او خفض الاس الهيدروجيني وبالاضافة الى ذلك يمتلك فطر الترايكو ديرما القدرة على التطفل بالاتصال المباشر مع الكائن الممرض وافراز الانزيمات المحللة للجدار والمواد السمية ومضادات حية (Druzhinina *et al*.,2011).

الفطر ترايكوديرما من الفطريات الكيسية المعروف بقدرته التضادية ضد مجموعة واسعة من الكائنات الحية المجهرية حيث يعود ذلك لقدرة الفطر على انتاج مدى واسع من المركبات البايلوجية كالانزيمات المحطمة للجدار الخلوي ,مركبات طيارة واخرى غير طيارة, عوامل جذب ايون الحديد, siderophores ( Harman *et al*. 2004; Reino *et al*. 2008; Vinale *et al*. 2008; Stoppacher *et al*. 2010; Druzhinina *et al*. 2011). والمركب 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) المعروفة بقدرته التضادية ضد عدد كبير من الفطريات الممرضة للنباتات كذلك يعمل على تحفيز وتنظيم نمو النبات (Tarus *et al*. 2003) .

**تفاصيل الفكرة**

1- جمع العينات

تم جمع عينات التربة البالغ عددها 50 عينة بواقع 250 غم لكل عينة من مختلف انواع الترب المزروعة والغير مزروعه والترب الرملية والملحية والصناعية واستخدام تقنية التخفيف لزراعة العينات على وسط البطاطا الصلب .

نقيت الفطريات المعزولة عشوائيا بواقع ثلاث مكررات لكل عزلة وتم تشخيصها مضهريا باستخدام وساط (MEA) Malt Extract Agar ووسطCzapek's Yeast Agar (CYA).

شخصت العينات جزيئيا باستخدام تقنيه ال Sequencing حيث استخلص الحمض النووي باستخدام عدة استخلاص( Miniprep $^{tm}$ kit from zymo research) وتنقينه باستخدام (MEGA quick$^{TM}$ Total Fragment DNA Purification Kit)

2- اختبار قابلية العزلات على انتاج المضاد

اختبرت العزلات الفطرية لتحديد قدرتها التضادية ضد مجموعة من البكتريا الممرضة السالبة والموجبة لصبغة كرام المعزولة من الحالات السريرية في مستشفيات محافظة بابل والتي تتميز بقدرتها على مقاومة مجموعة من المضادات الحياتية المستخدمه كعلاجات لحالات طبية واسعة والمشخصة باستخدام جهاز VITEK 2 compact system وكذلك مجموعة من الخمائر والفطريات الممرضه والمعزولة من مستشفى مرجان التعليمي في بابل (المشخصة من قبل كادر المستشفى والاستاذه الدكتوره نداء شهاب حمد) باستخدام طريقة التخطيط المتعامد.

3- الاحياء المجهرية الممرضة المستخدمة في التجربة

*Bacillus seraus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii , Klebcilla pneumoniae , Streptobacilli, Streptococcus faecalis, Proteus meraplis* and *Staphylococcus epidermidis*.

C*andida albicans ,C. tropicalis, C.glabrata, C. dubliniensis, C.krusei and C.parapsilosis.*

*Aspergillus niger. Aspergillus flavus, Penicillium chrysogenum . and Trichophyton rubrum.*

4- تحديد الضروف المثلى لانتاج المضاد

اختبرت قابلية الفطر على الانتاج اولا باوساط مختلفة سائلة وهي وسط قشور البطاطا ,قشور الشونذر, قشور الشلب, ومولاس السكرحيث بينت النتائج ان وسط قشور البطاطا كان الاكثر دعما لانتاج المضاد يلية وسط مولاس السكر اما وسط قشور الشلب فكان اقلها انتاجية.

استخدم وسط قشور البطاطا السائل لتحديد الضروف الاخرى وهي الاس الهيدروجيني ودرجة الحرارة وتركيز السكر وتاثير الرج على انتاج الفطر ,حيث استخدم الوسط بدرجات حموضه مختلفة حددت باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم 1N وحمض الهيدروكلوريك مع استخدام المحاليل منظمة الكلايسين والفوسفات لتحديد حموضة الوسط (5.5,6,7.8,9,10) ,بينت النتائج ان الرقم الهيدروجيني 7 كان الامثل للانتاج. اما درجة الحرارة فقد استخدم المدى الحراري من 20 الى 40 ◦م لتحضين الفطر وكانت درجة الحرارة 30 ◦م هي الامثل للانتاج تليها درجه الحرارة 25◦م.

لتحديد تركيز السكر استخدمنا اربعة تراكيز مؤية وهي 1% ,2%,3% و4% كان تاثير السكر عكسيا على الانتاج حيث قل الانتاج بصوره كبيرة وتوقف الانتاج لعزلات اخرى.

حضنت العزلات ضمن الضروف المثلى لفتره 15 يوم واختبرت يوميا لتحديد استمرارية الانتاج فكانت النتائج كالتالي:

بدء انتاج المضاد في اليوم الخامس من فترة الحضن واستمر الانتاج الى اليوم الربع عشر الى ان النتاج كان غير مستقر حيث كان اقطار التثبيط متفاوتة .

اما تاثير الرج فكان سلبيا على الانتاج لكلا العزلتين

بالاعتماد على النتائج السابقة وجد ان الفطر يفضل حالة التحضين المستقرة لذلك تم استخدام تقنية تخمرات الحالة الصلبة (SSF)

تم تحضير وسط الانتاج الامثل باستخدام قشور البطاطا المجففة بدرجة حرارة 70 ◦م ولمده يومين بعدها تم طحن الوسط ليصبح بشكل دقائق صغيره بقطر 2ملم ليتم تحضير الوسط الصلب بعدها حددت درجة الرطوبة المثلى للفطر ونوع المصدر النيتروجيني حيث استخدمت فوسفات الامونيوم ونترات البوتاسيوم وكان تاثيرهما سلبي ايظا على الانتاج.

لتقنية الحالة الصلبة ميزات مهمة جدا وهي دعم النمو المستقر للفطر وتزويده بصورة ثابتة ومستقرة بالعناصر الغذائية الضرورية لنموه لفترات زمنية طويله بالاضافه الى تقليل حجم الماء والتخلص من الرغوة التي تتكون في حالات التخمر السائلة كذلك فان الانتاج يكون مركز(Demain and Jermini, 1989, Berovic and Loger -derenin , 1993).

كانت للحالة الصلبة تاثير كبير على انتاج الفطر حيث بدء الانتاج من اليوم الرابع للتحضين وباقطار تثبيط عالية واستمر لمدة سبعة ايام من التحضين وبصورة مستقرة.

5- مقارنة المضاد مع المضادات الشائعة

استخدمت المضادات المعتمدة بصورة واسعة للنواع البكتيرية الممرضة لتحديد قابلية البكتريا على مقاومة هذه المضادات ومقارنتها مع المضاد المنتج كما موضح في الجدول رقم (1) الذي يبين تاثير المضادات المختلفة ضد مجموعة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام:

Table (1): Diameter of inhibition zone in mm for antibiotics disc

| Bacteria | Ampicillin AM | Meropenem MEM | Gentamycin CN | Amikacin AK | Tetracycline TE |
|---|---|---|---|---|---|
| *Bacillus cereus* | R | 39.00 | 24.21 | 20.10 | R |
| *Escherichia coli* | R | 38.58 | R | 21.63 | 23.36 |
| *Staphylococcus aureas* | R | 14.63 | 10.36 | R | R |
| *Pseudomonas aeruginosa* | R | 33.12 | 21.59 | 20.51 | R |
| *Acinetobacter* | R | 33.02 | 21.42 | R | R |
| *Klebsiella pneumoniae* | R | 37.07 | 16.29 | 18.31 | 20.04 |
| *Streptobacilli* | R | 38.31 | 24.81 | 24.58 | 29.19 |
| *Proteus meraplis* | R | 35.37 | R | 15.05 | R |
| *Staphylococcus epidermidis* | 20.19 | 20.19 | R | R | 9.54 |

ان تاثير المضاد المنتج كان اقوى واوسع من تاثير كل من Ampicillin , Gentamycin, Amikacin and tetracycline. حيث شمل تاثير المضاد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام كما موضح في الجدول رقم (2) والشكل رقم (1) الي يوضح تاثير المستخلصات الفطرية ضد مجموعة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام:

Table (2) : Diameter of inhibition zone in mm for fungal extracts

| | **Diameter of inhibition zone (mm)** | |
|---|---|---|
| **Treatment** | **S2** | **S4** |
| *Bacillus seraus* | 14.33 | 18.70 |
| *Escherichia coli* | - | 11.30 |
| *Staphylococcus aureus* | 14.46 | 21.33 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 12.10 | 10.68 |
| *Acinetobacter baumannii* | 24.17 | 24.68 |
| *Klebcilla pneumoniae* | 18.69 | 25.10 |
| *Streptobacilli* | 26.17 | 30.90 |
| *Streptococcus faecalis* | 26.17 | 30.27 |
| *Proteus meraplis* | 14.80 | 15.44 |
| *Staphylococcus epidermidis* | 11.21 | 21.23 |

اما تاثيره على الخمائر والفطريات الممرضة فكان تاثيره اقل من البكتريا كما موضح في الجدول رقم (3) الذي يوضح تاثير المستخلصات الفطرية ضد مجموعة من الفطريات الممرضة:

Table (3): Diameter of inhibition zone in mm

| | **Diameter of inhibition zone (mm)** | |
|---|---|---|
| **Treatment** | **S2** | **S4** |
| ***C. tropicalis*** | - | - |
| ***C. albicans*** | - | - |
| ***C. glabrata*** | - | - |
| ***C. duplensis*** | - | - |
| ***C. kruzei*** | - | - |
| ***C. parapsilosis*** | - | - |
| ***Aspergillus flavus*** | - | - |
| ***Aspergillus niger*** | **13.08** | **8.73** |
| ***Trichoderma raprum*** | **14.14** | **9.03** |
| ***Penicillium chrysogenum*** | **9.20** | **8.55** |

6- استخلاص المضاد

استخلص المضاد من الوسط الصلب باستخدام محلول ethyl acetate والماء المقطر بنسبة 1:1 مع الرج لمده ساعة في الضلام. بعدها تم فصل الناتج باستخدام اوراق الترشيح للتخلص من المواد الصلبة.
بعد التجفيف بدرجة حرارة 50°م اذيب الناتج باستخدام 1 مل من محلول DMSO بتركيز 10% وحفظ بدرجة حرارة0°م.

7- تنقية المضاد
استخدمت طريقة كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة لتنقية الناتج كما في شكل رقم (2).

8- تم تحديد المركب الفعال باستخدام طريقة Contact Bioautography كما في شكل رقم(3).

9- اما اعلى قطر تثبيط تم الحصول علية يعود للعزلة S4 ضد البكتريا Bacillus seraus بقطر mm43.35 بعد تنمية الفطر على وسط مخلفات البطاطا الصلب لمدة 9 ايام بدرجه حراره 30 °م. وهو اعلى من قطر تثبيط المضاد Meropenem ضد البكتريا المذكوره كما في شكل رقم(4).

10- شخص المركب الناتج باستخدام الطرق الكيميائية التالية:

Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), Nuclear magnetic resonance(NMR) and Euro EA Elemental Analyzer (CHN).

11- اختبار سمية المضاد
استخدمت طريقة التثبيط خارج الوسط الحي Cytotoxic assay باستخدام دم الانسان وخمسة تراكيز من المضاد المستخلص(10, 25, 50, 75 and100µg/ml) لتحديد سمية المستخلص بعد استخلاصة بواسطة جهاز المبخر الدوار حيث اوضحت نتائج الاختبار بان المضاد المستخلص يكون سام في التراكيز العالية (µg 100 ) .

## النتائج:

اظهر المضاد المنتج قابلية عالية على تثبيط انواع عديده من البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام والمعروفة بقدرتها على مقاومة عدد من المضادات 3 او اكثر وباقطار تثبيط تفوق تثبيط المضادات Ampicillin , Gentamycin, Amikacin and tetracycline.

كذلك فان من السهل جدا توفير ظروف انتاج المضاد حيث يمكن انتاجة على مخلفات البطاطا وبدرجة حرارة الغرفة بدون الحاجة الى اضافة مصدر نيتروجيني او سكر او اي مواد اخرى.

ان نتائج التحليل الجزيئي للفطر اثبتت بان الفطر يعود للجنس *T. longibrachiatum*

| Code | Species scientific name | ID |
|---|---|---|
| S2 | *T. longibrachiatum* | KP641159.1 |
| S4 | *T. longibrachiatum* | HQ141714.1 |

اما نتائج التحاليل الكيميائية فقد اظهرت بان المركب يحتوي على الكاربون والهيدروجين والنيتروجين بالاضافة الكبريت وهي مركبات اليفاتية كما مبين في الجدول التالي:

| Compounds | S2 | S4 |
|---|---|---|
| Aromatic ring (C=C) $cm^{-1}$ | 1415.7 | 1463.97 |
| (C=O) $cm^{-1}$ | 1643.3 | 1745 |
| (O=H) $cm^{-1}$ | 3381.21 | – |
| Aromatic (CH) $cm^{-1}$ | – | 3008.9 |
| Aliphatic (CH) $cm^{-1}$ | 2926.01 | 2991.5,2881 |
| (N-H) $cm^{-1}$ | – | – |
| (S-O) $cm^{-1}$ | – | – |
| (S=O) $cm^{-1}$ | – | – |
| (O=C-H) | – | 2729.2 |

## المميزات

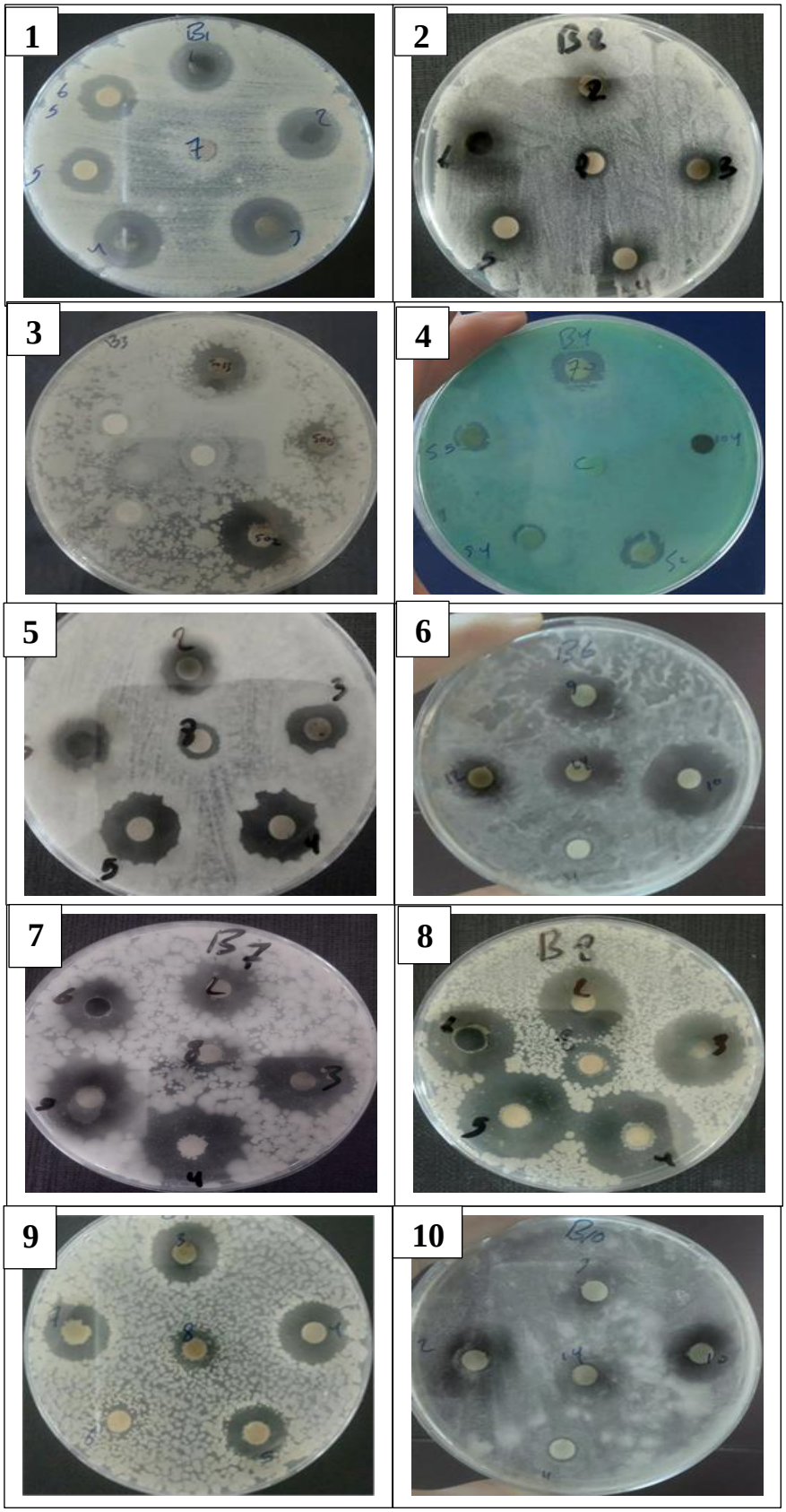
1- انتاج المضاد الحياتي لاول مره من الفطر *T. longibrachiatum* .
2- تاثير المضاد كان عالي جدا حيث يفوق في تاثيره المضادات Tetracycline, Amikacin, Ampicillin, Gentamycin,.

3- المضاد واسع الطيف حيث شمل تاثيره عدد كبير من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام والفطريات المرضية.

4- انتاج المضاد باستخدام تقنية تخمر الحالة الصلبة .
5- انتاج المضاد الحياتي غير مكلف اقتصاديا ورخيص الثمن.

## الادعاءات

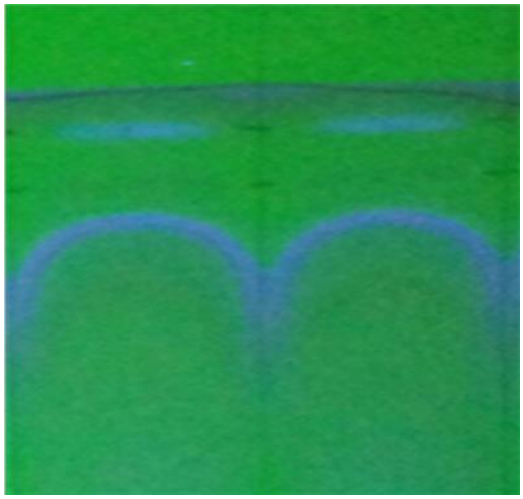
1. لاتوجد دراسات مقارنه على الفطر قيد الدراسة ولم يسجل الفطر على انه قادر على انتاج مضاد بكتيري .
2. تم مقارنه المضاد المنتج مع اقراص المضادات الحياتية Tetracycline, Amikacin, Ampicillin, Gentamycin, وكان تاثيره يفوق تاثير هذه المضادات.
3. تركيبة المضاد الجديد اثرت على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام بدون اي مقاومة للمضاد.
4. انتج المضاد باستخدام تقنيات الحالة الصلبة التي تتيح انتاج تراكيز عالية من المضاد باستخدام كميات قليلة من الوسط الزرعي.
5. انتج المضاد باستخدام مخلفات البطاطا بدرجه حراره الغرفة وبدون اي تكلفة اقتصادية حيث ان انتاج المضاد لايتطلب تركيز سكر او نيتروجين او مخمرات هزازة.



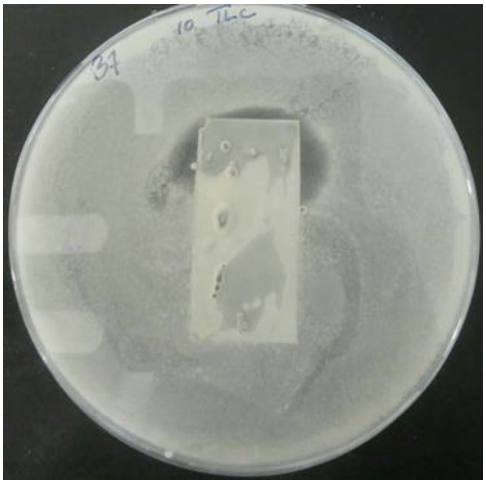

شكل رقم (1) الصور التالية توضح نتائج تثبيط المضاد بعد التنقية على البكتريا المرضية قيد الدراسة وعلى التوالي:

*1-Bacillus seraus, 2-Escherichia coli, 3-Staphylococcus aureus, 4-Pseudomonas aeruginosa, 5-Acinetobacter baumannii , 6-Klebcilla*

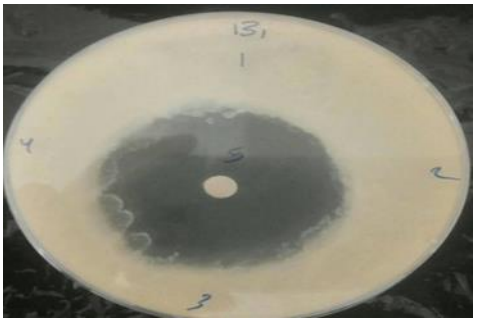
*pneumoniae , 7-Streptobacilli, 8-Streptococcus faecalis,9- Proteus meraplis and 10-Staphylococcus epidermidis*



شكل رقم(2) المضاد النقي على لوح السليكا بطريقة كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة(TLC)



شكل رقم (3) تحديد المركب الفعال من لوح السليكا باستخدام تقنيه Contact Bioautography



شكل رقم(4) تاثير مستخلص العزلة S4 على بكتريا *Bacillus seraus*

## References


- **Alqayi , S. A. and Alwan, A. H.( 2015).** Molecular Identification of Rhizosphere *Trichoderma* spp. and Their Antagonistic Impact Against Some Plant Pathogenic Fungi. Baghdad Science Journal .Vol.13(1)2016.
- **Aroba, K. (2009).** Antifungal Activities of Actinomycetes Isolated from a Sample of Iraqi Soils. Iraqi J. Comm. Med., July,22 (3).
- **Berovic , M.and Loger -derenin ,M. (1993).** Solid State Fermentation of pectinolitic Enzyames by *Aspergillus niger*. J. Chem .Tech Biotchnol.58 : 209-211.
- **Brooks, G.F.; Butel, J.S.; Morse, S.A.; Jawetz Melnick and Adelberg's. (2004).** Medical Microbiology, 23rdedn. McGraw Hill Companies, Singapore.
- **Demain. A.L. and Jermini, M.F.G. (1989).** Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *cephalosporium acremoninm*. Experiential. 45: 1061-1065.
- **Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V. and Kubicek, C.P. (2011).** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nat. Rev. Microbiol. 16:749-759.
- **Druzhinina, I.S.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera-Estrella; A.; Horwitz, B.A.; Kenerley, C.M.; Monte, E.; Mukherjee, P.K.; Zeilinger, S.; Grigoriev, I.V. and Kubicek, C.P. (2011).** *Trichoderma* : the genomics of opportunistic success. Nat Rev Microbiol 16:749– 759
- **Dutta, A.C.(2005).** Botany for Degree Students 18thedn. Oxford University Press, New York.
- **Hackl, E.; Boltenstern, S.; Bodrossy, L. andSessitsch ,A. (2004).** Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. Appl. Environ. Microbiol.; 7: 5057-5065.
- **Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004).** *Trichoderma* species –opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2:43–56.
- **Howell, C. R. (2003).** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and evolution of current concepts. Plant Dis. 87: 4-10.

- **Hugo, W.B. and Russell, A.D. (1998).** Pharmaceutical Microbiology, 5thedn. Blackwell Science, U K.
- **Reino, J.L.; Guerrero, R.F.; Galan, R.H. and Collado, I.G. (2008)** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochem Rev 7:89–123
- **Robbert, J.E.; Speedie, M.K. and Tyler, V.E.(1996).** Antibiotics. In Balado D (ed), Pharmacognosy and Pharmacobiotechnogy. Williams and Wilkins, England.
- **Smith, J.E. (2012).** Biotechnology, Cambridge, New York, USA.
- **Stoppacher, N.; Kluger, B.; Zeilinger, S.; Krska, R. and Schuhmacher, R. (2010).** Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. J.Microbiol Methods 81:187–193
- **Tarus, P.K.; Lang'at-Thoruwa, C.C.; Wanyonyi, A.W. and Chhabra, S.C. (2003).** Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. Bull Chem Soc Ethiop 17:185–190
- **Taylor, D.J.; Green, D.P.O. and Stout, G.W.(2003).** Biological Science, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- **Vinale, F., Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.; Marra, R.; Woo, S.L. and Lorito, M. (2008).** *Trichoderma*- plant-pathogen interactions. Soil Biol Biochem 40:1–10