وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم / قسم البيئة

استخدام مخلفات أوراق الشاي "نفل الشاي" لتحضير وسط زرعي لتنمية فطر المقاومه الأحيائيه Trichoderma harizanum

مقدم إلى مجلس كلية العلوم/جامعة القادسية كجزء من متطلبات نيل شهادة بكلوريوس دعلوم/ علوم البيئة

من قبل الطالب:

يوسف علي نعيم

بأشراف :

م. صبا عبد الامير كاظم

بسم الله الرحمن الرحيم

(قل إعملوا فسيرى الله عملكم ورسوله والمؤمنون)

صدق الله العلي العظيم

الآية(105) السورة (التوبة)

شكر و تقدير

" كن عالما .. فإن لم تستطع فكن متعلما ، فإن لم تستطع فأحب العلماء ،فإن لم تستطع فلا تبغضهم "بعد رحلة بحث و جهد و اجتهاد تكللت بإنجاز هذا البحث ، نحمد الله عز وجل على نعمه التي منَ بها علينا فهو العلي القدير ، كما لا يسعنا إلا أن نخص بأسمى عبارات الشكر و التقدير الى رئاسة قسم البيئة / كلية العلوم كذلك الى الست "صباء عبد الامير كاظم " لما قدمته لي من جهد و نصح و معرفة طيلة مدة انجاز هذا البحث . كما نتقدم بالشكر الجزيل لكل من أسهم في تقديم يد العون لإنجاز هذا البحث، و نخص بالذكر أستاذتنا الكرام الذين أشرفوا على تكوين دفعة البيئه .إلى الذين كانوا عونا لنا في بحثنا هذا ونورا يضيء الظلمة التي كانت تقف أحيانا في طريقنا .إلى من زرعوا التفاؤل في دربنا وقدموا لنا المساعدات والتسهيلات والمعلومات ، فلهم منا كل الشكر.

يوسف علي نعيم

الإهداء

إلهي لا يطيب الليل إلا بشكرك ولا يطيب النهار إلى بطاعتك .. ولا تطيب اللحظات إلا بذكرك .. ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك .. ولا تطيب الجنة إلا برؤيتك

الله جل جلاله

.. إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة .. ونصح الأمة .. إلى نبي الرحمة ونور العالمين

سيدنا محمد صلى الله عليه وأله وسلم

إلى من كلله الله بالهيبة والوقار ..

إلى من علمني العطاء بدون انتظار ..

إلى من أحمل أسمه بكل افتخار ..

أرجو من الله أن يمد في عمرك لترى ثماراً قد حان قطافها بعد طول انتظار وستبقى .. كلماتك نجوم أهتدي بها اليوم وفي الغد وإلى الأبد

(والدي العزيز)

إلى ملاكي في الحياة .. إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان والتفاني .. إلى بسمة الحياة وسر الوجود

إلى من كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى أغلى الحبايب

(أمي الحبيبة)

إلى أخوتي ورفقاء دربي وهذه الحياة بدونكم لاشيء معكم أكون أنا وبدونكم أكون مثل أي شيء .. في نهاية مشواري أريد أن أشكركم على مواقفكم النبيلة

(اخوتي)

الى من علمني كيف اخط الحروف وأمزج الكلمات الى من نقش في قلبي الحب والمعرفه والصدق وألاحترام الى استاذي ومعلمي المشرف التربوي

(المرحوم الاستاذ راضي)

إلى الأخوه الذين لم تلدهم أمي .. إلى من تحلو بالإخاء وتميزوا بالوفاء والعطاء إلى ينابيع الصدق الصافي إلى من معهم سعدت ، وبرفقتهم في دروب الحياة الحلوة والحزينة سرت

إلى من كانوا معي على طريق النجاح والخير

إلى من عرفت كيف أجدهم وعلموني أن لا أضيعهم

(أصدقائي)

يوسف علي نعيم

الخلاصة:

استعملت مخلفات اوراق الشاي (Black Tea (*Camellia sinens* لتحضير وسط غذائي صلب لتنمية فطر المقاومة الاحيائية *Trichoderma harizanum* اذ تم قياس قطر المستعمرة النامية للفطر المختبر على الوسط الصلب وبالمقارنة مع معاملة المقارنة والتي تضمنت تنمية الفطر على وسط (PDA) بدون اي اضافة ولمدة 7ايام وبدرجة 37 مْ واظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين الوسطين الغذائيين في تنمية فطر المقاومة الاحيائية *T. harizanum* على الرغم من تفوق وسط مخلفات الشاي في كثافة النمو للفطر المختبر. كذلك تم قياس الوزن الجاف للفطر على الوسطين الزرعيين فظهرت النتائج الوزن الجاف والوزن الرطب للفطر المختبر تفوق وسط مخلفات اوراق الشاي السائل على الوسط الغذائي السائل (PDB) اذ بلغ الوزن الرطب للفطر المنمى على وسط مخلفات الشاي (13.28) غم والوزن الجاف (1.96) غم بينما معاملة المقارنة كان فيها الوزن الرطب (11.12)غم والوزن الجاف (1.46) غم للفطر المختبر.

المحتوى	الصفحه
الفصل الاول	7
المقدمه	7
الفصل الثاني	10
طرائق العمل	10
الفصل الثالث	11
النتائج والمناقشه	11
الهدف من البحث	14

الفصل الاول

المقدمة :

يعد الفطر ***Trichoderma*** من أكثر الاجناس المستخدمه في مجال السيطرة الحيوية على الفطريات الممرضة التي تصيب النبات وقد أثبتت كل أنواع هذه الجنس كفاءة عاليه في هذا المجال ومن هذه الأنواع ***Trichoderma harziaum***فقد أجريت دراسات عديدة أثبتت كفاءة هذا النوع في السيطرة الحيوية على عدد من الفطريات الممرضة للنبات فقد وجد طه (1988) إن الفطر ***Trichoderma harziaum*** له قدرة التطفل على خيوط الفطر ***Rhizoctonia Solana*** وأكد هذه النتيجة (2000) .Howell teal حيث وجدوا أن الفطر ***Trichoderma harziaum***له القدرة على التطفل المباشر على خيوط الفطر ***Rhizoactionia Solana***عن طريق الالتفاف عليها واختراقها.ولاحظ سرحان وفزاع (1991) القدرة التضادية لهذا النوع ضد الفطر الممرض ***Alternaria alternata*** في دراسة أجريت لاختبار قدرة التضاد لهذا النوع كما أشار Harman&Hyaes (1993) إلى كفاءة الفطر ***Trichoderma harziaum*** ضد فطر ***الذبول Fusarium oxysporum***على الطماطه.أضافه إلى ذلك فأن (2001) Lus Maria وجد إن قدرة التضاد للنوع ***Trichoderma harziaum*** ضد الفطر ***Alternaria alternata*** تزداد بوجود بعض منظمات النمو النباتية مثل Gibb relic acid و indelicate acid . في دراسات حديثه وجدان الفطر***Trichoderm harziaum*** يحفز نموه بوجود بعض مبيدات الادغال فقد وجد الجوهري (1998) إن مبيد الادغال البروبانيل الذي يستخدم في حقول زراعة الارز يحفز نمو هذا النوع في الحقل والمختبر. كما وجد العامري(1999) إن هذا النوع يحفز بوجود مبيد D-2,4 الذي يستخدم في حقول زراعة الحنطة, وتأتي هذه الدراسة لتوضيح تأثير احد هذه المبيدات وهومبيد D-2,4 على القدرة التضادية لهذا النوع ضد بعض الفطريات الممرضة للنبات.

كما اكتشف Hruber gaskin (1986) إن الفطر ***Trichoderma harziaum*** له القدرة على النمو على العديد من المواد العضوية المحتوية على السكريات وبدرجات متفاوتة , وكانت مخلفات أوراق الشاي من أكثر المواد التي حققت نمو ناجح للفطر ***Trichoderma*** , كما أشار Jorden و martn (2004) إلى إن أوراق نبات الشاي الرطبه تشكل مواد اساسيه في نمو مجاميع مختلفة من الفطريات واكثرها نموا هو فطر *Trichoderma harziaum* وفطر *Alternaria alternata*.

أكتشف إن استعمال الشاي كان قد بدأ في الامبراطورية الصينية القديمة منذ أكثر من 47 قرناً مضت وان اكتشافه تم بالصدفة ثم جرى تطوير وتحسين استخدامه في الجانب الصحي لصالح الانسان .وقد ركزت مجاميع كثيرة من الناس على الشاي الاخضر لغرض العناية الصحية وتخفيف الالم ، وتحسين الهضم وتخفيف الاجهاد وتقوية مناعتهم الجسمية ، وربما في إطالة أعمارهم Choوجماعته (2007). يحتوي الشاي الاخضر على العديد من المكونات المهمة منها الكافائين ، فيتامينات ، معادن وزيوت ، ومن اهم هذه المكونات الفينولات المتعددة وخصوصاً ***(EGCG)gallate-3-Epigallocatechin*** والذي يعتقد بانه يحسن صحة الفرد ، حيث إن وجود الفينولات هي المسؤولة عن التأثير الاكبر لمستخلص الشاي الاخضر عند مقارعة الامراض او الاجهادCabreraوجماعته (2006). تحضر خلاصة الشاي الاخضر من أوراق نبات ***sinensis Camellia*** غير المخمر وتكون غنية بعدة أنواع من مركبات الفالفونيات الحيوية والتي تدعى الكاتيشينات ***catechism***وهذه الاخيرة تعد من مضادات الاكسدة القوية ***antioxidants powerful*** وللشاي الاخضر فعالية مضادة للتطفر Ant mutagenic حيث يثبط العوامل المطفرة ***mutagens*** وهو بنفس الوقت سوف يخفف من احتمالية الاصابة بمرض سرطان الرئة لدى الاشخاص وهو واقي للجلد من الامراض الجلدية وسرطان الجلد ، وله تأثير مضاد للسموم والشيخوخة المبكرة aging early ، وكذلك يقي الجسم من تأثير الاشعة فوق البنفسجيه.واثبت Jung ; Ellis(2001) وجماعته للشاي الاخضر دوراً هاماً في تقليل التهاب البنكرياس ، وهو يختزل تركيز الكولسترول الكلي في المصل ويخفف من تركيز المركبات البروتينية-اللبيدية واطئة الكثافة للكولسترول C-LDL إما الشاي الاسود فانه

يحضر من تخمر الشاي الخضر وبالتالي سوف يفقد الكثير من محتويات إل ***catechism*** الفعالة حيوياً لهذا ينخفض تأثيره عند مقارنته مع الشاي الاخضر Coimbraوجماعته (2007).

والاهمية الاخرى لهذا الشاي تقع في منعه أو تقليله تأثير حدوث بعض الامراض القلبية مثل مرض الشرايين التاجية ***disease artery coronary*** الذبحة القلبية ***pectoris Angina*** أو إمراض وعائية مثل تصلب الشرايين ***Atherosclerosis*** وذلك من خلال تقليل الجهد ألتأكسدي ***stress Oxidative*** الذي يتعرض له المرضى.إن تناول مستخلص الشاي الاخضر لفترة طويلة يقلل من تركيز ***C-LDL*** ويزيد من تركيز ***C-HDL*** ويخفض مستوى الكولسترول في الدم(2005) ; Cooper,وجماعته .ولكن هذا لا يعني بأنه لا توجد للشاي الاخضر تأثيرات جانبية أو غير مرغوبة ومنها منعه أو تقليله من امتصاص الحديد والبروتين وهذا يعود إلى فعل مادة الدباغين ***Tannin*** والتي تغطي الطبقة المخاطية ***Mucosa***في الامعاء الدقيقة عند تناول الشاي غير المعد بصورة جيدة ولا توجد ضوابط أو قواعد تحدد تناول الشاي الاخضر مع هذا لم تكن هناك أية أدلة تشير إلى حصول سمية بسبب تناول الشاي الاخضر وجماعته (2003).

الفصل الثاني

طرائق العمل:

1 -تم الحصول على عزلة فطر Trichoderma harizanum من مختبروحدة ابحاث البيئة والوقاية من التلوث / كلية العلوم / جامعة القادسية .

2 - تم تحضير وسط مخلفات الشاي بإضافة 200 غم من مسحوق مخلفات الشاي المجففة والمعقمة بعد طحنها الى 20غم من المولاس كمادة غذائية لتنمية الفطر و20غم من المادة المصلبة للوسطAgar)) وبعد اذابة المكونات بصورة جيدة تم تعقيم الوسط المحضر ب Autoclave)) بدرجة حرارة 121 م ه وضغط 15 باوند/ انج ولمدة 60 دقيقة بعدها صب الوسط في اطباق بتري بلاستيكية وترك الوسط ليتصلب و يبرد ثم لقحت الاطباق بقطعة من الفطر المختبر وذلك باستخدام الثاقب الفليني وبواقع 3 مكررات لكل من الوسط المصنع من مخلفات اوراق الشاي والوسط الغذائي (PDA) ووضعت في منتصف الطبق ثم حضنت الاطباق لمدة 7 ايام بدرجة 37م ه.

3 -قياس الوزن الرطب والوزن الجاف للفطر Trichoderma harizanum :

تم استخدام دوارق مخروطية سعة 250 مل ووضع فيها الوسط الزرعي السائل المحضر من مخلفات اوراق الشاي بدون اضافة المادة المصلبة للوسط (Agar) ودوارق اخرى وضع فيها الوسط الزرعي السائل (PDB) Potato s Dextrose Broth واستخدم كمعاملة المقارنة ثم لقحت الدوارق بواقع 3 مكررات لكل معاملة بقطعة قطرها 7.5ملم من زرعة الفطر المختبر وبعمر 7 ايام وحضنت الدوارق في الحاضنة بدرجة حرارة 25م ه لمدة 7 ايام بعدها تم ترشيح الغزل الفطري على ورق ترشيح معقم وتم قياس الوزن الرطب للفطر بالميزان الحساس ثم جففت في الفرن بدرجة حرارة 6م ه لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم قياس الوزن الجاف للفطر بالميزان الحساس (محمود ,1985)

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة:

اوضحت نتائج الاختبار وجود تأثير مشجع لنمو الفطر على وسط مخلفات اوراق الشاي المحضر مختبريا وبالمقارنة مع معاملة المقارنة والتي تضمنت تنمية الفطر المختبر على الوسط الغذائي PDA)) وفي الشكل ادناه يوضح كثافة في نمو الفطر على الوسط المحضر من مخلفات اوراق الشاي تفوق كثافة نمو الفطر نفسه على الوسط الغذائي (PDA)

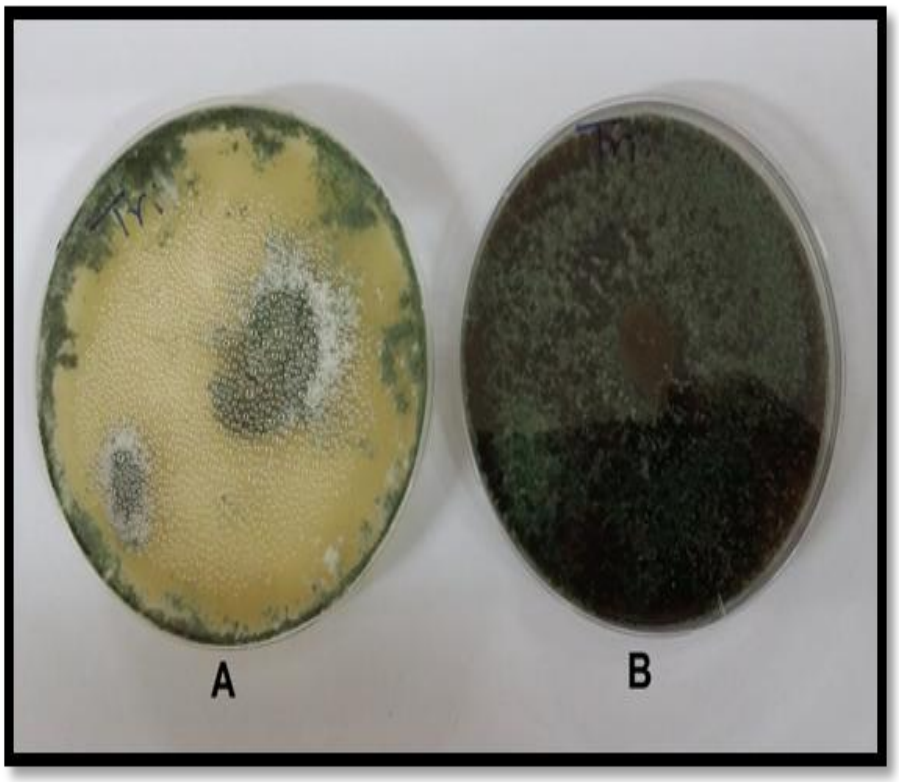
واظهرت نتائج الوزن الجاف والوزن الرطب للفطر المختبر تفوق وسط مخلفات اوراق الشاي السائل على الوسط الغذائي السائل (PDB) اذ بلغ الوزن الرطب للفطر المنمى على وسط مخلفات الشاي (13.28) غم والوزن الجاف (1.96) غم بينما معاملة المقارنة كان فيها الوزن الرطب (11.12)غم والوزن الجاف (1.46) غم للفطر المختبر.

يعود السبب الى قدرة عزلات المقاوم الحيوي ***Trichoderma*** على انتاج الانزيمات وبولي فينول اوكسيديز اللذان يؤكسيدان الفينولات (Ibraheem, 2009) ويعتبر الشاي مصدرا غنيا بالفينولات المتعددة (Polyphenol) وخصوصا الفلافينويدات Flavonoids)) وهي مجموعة من المركبات الفينولية التي تمثل نكهة الشاي ويحتوي على 30% من الفلافينويدات في مادته الصلبة بينما يحتوي اقل من 5% من الخلاصة الصلبة الذائبة في الماء على اشباه الفلافانول (Dinae,et.,al.2002)

تشكل العناصر الغذائية أهمية كبيرة لنمو الفطريات وفي حالة نقص أو تغير في تركيز هذه العناصر فإنها تؤثر على نمو الفطريات من أهم هذه العناصر (الكربون C , النيتروجين N, الفسفور P , المغنيسيوم Mg , البوتاسيوم K) حيث تحتاج الفطريات في تغذيتها إلى عناصر أساسية كبرى مثل (C , N , P , Mg , Ca) ويكون احتياجها بكميات كبيرة وغياب أياً منها يؤثر سلبياً على النمو, أما العناصر الغذائية الصغرى فهي عناصر ضرورية لكن تحتاجها الفطريات بكميات قليلة وغياب أياً منها يمكن أن يؤثر على نمو الفطريات وهي(Fe , Co , Mn , Zn, Mo) و يشكل الكربون حوالي 50٪ من الوزن الجاف للخلية ويعتبر جزء من مكونات الخلية التركيبية والوظيفية و يوجد في أغلب

مكونات الخلية كذلك يوجد بصور وتراكيز مختلفة يدخل في جميع العمليات الايضية (العتيبي ,2008)

تستغل المصادر الكربونية الموجودة في الطبيعة من قبل الفطريات للحصول على وحدات بنائية أو كمصادر للطاقة مثل الكربوهيدرات فالكاربون يعتبر من أهم العناصر الضرورية لنمو الفطر فمن المعروف أن البروتوبلازم والإنزيمات وجدار الخلية والمواد الغذائية المخزنة داخل الفطر تعتبر مركبات من الكربون حيث يشكل الكربون نصف الوزن الجاف من خلايا الفطر , وتختلف الفطريات في مقدرتها على استعمال بعض المركبات كمصدر للكربون سواء كانت بسيطة مثل الجلوكوز والجالاكتوز أو مركبة مثل النشاء والسليولوز.



الشكل (A) يوضح نمو الفطر على الوسط الغذائي PDA والشكل (B) نمو الفطر على الوسط المحضر من مخلفات اوراق الشاي

الهدف من البحث

استخدام مخلفات أوراق الشاي لتكوين وسط زرعي لبعض أنواع الفطريات المستخدمه في المقاومه الاحيائيه(فطر ال*Trichoderma*) بدلا من الاوساط الزرعيه التجاريه الأخرى.
الاستفاده من ماده منتهية المفعول أو مستخدمه في غرضها الاساسي سابقا . تخليص البيئه من النفايات والتي قد تشكل عبئا تحللها.

المصادر:

1. الجوهري, احسان افليح .1998.دراسه عن مصير مبيد البروبانيل في حقول الارز محافضه القادسيه واتاثيرهو على بعض احياء مجهريه الماء والتربه. دراسة دكتورا /كلية العلوم/ الجامعه المستنصريه.
2. سرحان,عبد الرضى وفزاع .1991. التضاد الحيوي للفطر Alternranaria alternate باستخدام بعض الفطريات والبكتريا. مجلة العلوم الزراعيه العراقيه.مجلد22 , العدد1. 215-206
3. العامري,نيران عبيد.1999.دراسة تأثير مبيد الادغال D-2,4 على الاحياء المجهرية في محافظة القادسية.رسالة ماجستير, كلية التربية ,جامعة القادسية.
4. طه ,موسى ابراهيم .1988.المكافحه الحيوية لتعفن جذور الباقلاء .رسالة ماجستير,كلية العلوم.جامعة صلاح الدين.العراق

15- محمود ، انتصار عبد الحميد (1985) . تاثيرات المستخلصات النباتية على بعض الفطريات المسببة للامراض النباتية . رسالة ماجستير . كلية الزراعة . جامعة بغداد

16 المعتيبي ,فاطمةعليان .(2008) . مذكرة مادة فسيولوجي فطر العملي331 حدق .جامعة الملك سعود/ كلية العلوم / قسم النبات والأحياء الدقيقة.

17-Luz Maria,P.2001. In vitro biocontrol activity of Trichoderma harzianum on Alternaria alternate in presence of growth regulators. Plant biotechnology. 4:215-220

18-Harman ,G.E. & Hayes,C.K.1993 .The genetic nature and biocontrol ability of progeny from protoplast fusion in Trichoderma .Biotechnology Plant Protection . J.Wiley-Liss. P.237-255

19-Howell,C.R.,Hanson,L.E,&Puckhaber,L.2000.Induction of terpriod synthsis in cotton roots & Control of Rhizoctonia solani by seed treatment with Trichoderma harzianum Phytopathology . 90:248-252.

20-Cabrera , C., Artacho , R. and Gimenez, R.(2006)Review : Beneficial effect s of green tea .J.of the Amer.Coll. of Nutrition .25(2):79-99.

21-Cho, S. H., Park, B.H and Lee ,J(2007) Effect of dietary inclusion of various sources of green tea on growth, body composition and blood chemistry of the juvenile olive flounder, Paralichthys olivaceus.Fish Physiol.Bichem.33:49-57.

22-Coimbra, S. A. Santos-Silva, P. Rocha-Pereira, S. Rocha, and E. Castro (2007)Green tea consumption improves plasma lipid profiles in adults Nutrition Research, Volume 26(11): 604-607.

23-Cooper , R.(2005) Medical benefits of green tea Altern.complement Med. 11(3):521-528.

24-Jung , Y.D. and Ellis , L.M. (2001) Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea.Int.J.Exp. Pathol.82(6):309-316.

25-Maron, D.J. ; Guo , P.L. and Nai , S.C.(2003) Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched Green tea extract Amer.Med.Association.23:1448-1453.

26-Hruber gaskin R.(1986)Review : Beneficial effect s of green tea .J.of the Amer.Coll. of Nutrition .25(2):79-99.

27-Jorden ,martn.(2004) Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidant status and plasma lipid profile in humans.J.Nutri. Biochem.16(3):144-149.

28-Wong , M.H. ; Fung , K.E. and Carr , H.P.(2003) Alaminium and fluoride contents of tea , with emphasis on brick tea and their health implications.Toxicology Letters 137(12):111-120.

29-Dinae, L., Mckay, P. and Jeffrey, B., J. American Collage of Nutrition., 2002, 20,