قابلية انواع الفطريات المعزولة من بعض ترب محافظة البصرة

على تثبيط النمو لأنواع من البكتريا الممرضة مختبرياً

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم / جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

في علم البيئة

(التقانات البيئية)

تقدمت بها

رسل حيدر طالب

بكالوريوس علم البيئة

2017

بإشراف

أ. د مصطفى عبد الوهاب الدوسري

ربيع الثاني 1443 **تشرين الثاني2021**

The ability of fungi isolated from some soils of Basra Governorate to inhibit the growth of species of pathogenic bacteria *In vetro*

A thesis

Submitted to the

College of Science – University of Basra in partial Fulfillment of the Requirement for the Degree

Of Master of Science in Ecology

(Ecotechnology)

By

Rusul Hayder Talib

B.SC. Ecology

(2017)

Supervised by

Prof. Dr. Mustafa A. Al-Dossary

Rabi Althani 1443 **November 2021**

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى عزل الفطريات من مصادر تربة مختلفة في محافظة البصرة ودراسة قدرتها على انتاج المركبات الضد ميكروبية و تأثير بعض العوامل على قابليتها على الانتاج، حيث جمعت 6 عينات من التربة من مناطق زراعية ورسوبية مختلفة عزل منها 25 نوعا فطريا تعود الى 17 جنساً أضافة الى الخيوط الفطرية العقيمة، وشخصت الفطريات المذكورة انفاً باعتماد التشخيص المظهري والجزيئي وخلال هذه الدراسة سجيل نوعين فطريين تعزل لأول مرة من التربة في العراق وهما *Aspergillus iranicus* و *Talaromyces funiculosus*، وكانت الفطريات الممثلة للحالة اللاجنسية Anamorphic Fungi هي السائدة بنسبة ظهور بلغت 72% ، وكان الجنسين *Aspergillus* و *Penicillium* الاكثر ظهوراً بنسبة 100% أذ ظهرا في جميع العينات، وسجل الفطران *Aspergillus niger* و *Penicillium* sp.1 أعلى نسبة ظهور بلغت 100% حيث ظهرا في العينات جميعها، تلتها بالمرتبة الثانية الفطريات الكيسية Ascomycota بنسبة ظهور بلغت 16% وجاء بعدها في المرتبة الثالثة الفطريات اللاقحية Zygomycota بنسبة ظهور8% ، كما سجلت الفطريات البازيدية Basidomycota اقل نسبة ظهور بلغت 4 % وبنوع واحد فقط.

اجري اختبار اولي لمعرفة قابلية الفطريات على انتاج المضادات الميكروبية باستخدام طريقة التضاد الميكروبية Dual cultures اذ اظهر الفطران *A. iranicus* و *Chaetomium seminis-citrulli* تثبيط لكلا النوعين من البكتريا المختبرة وهي *Escherichia coli* و*Staphylococcus aureus* ، وكان كل من الفطرين *Roussoella* sp. و *Talaromyces funiculosus* هما الافضل في تثبيط البكتريا السالبة لصبغة كرام *E. coli*، بينما كان الفطران *Trichocladium antarcticum* و *A. chevalieri* هما الافضل في تثبيط البكتريا الموجبة *S. aureus* ، اما بقية الانواع تراوحت قابلية تثبيطها من متوسط كما في الفطر*Penicillium* sp.2 الى ضعيف كما في الفطرين *Aspergillus* sp. و *A. niveus*، كما ان بعض الأنواع لم تظهر اي تثبيط للبكتريا المختبرة.

بعدها اجري اختبار تأكيدي لقابلية العزلات الفطرية المختارة على إنتاج المضادات الميكروبية وذلك من خلال تنميتها في الاوساط السائلة ولمدة 14 يوم، واظهرت المستخلصات الفطرية تثبيطاً لكل انواع البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Bacillus subtilis* و

Staphylococcus aureus والبكتريا السالبة لصبغة كرام *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*.

اختير الفطران *Aspergillus iranicus* و *Talaromyces funiculosus* لدراسة قابليتهما على انتاج المضادات الميكروبية ودراسة تأثير كل من درجة الحرارة والاس الهيدروجيني و المصدرين النتروجيني والكربوني على النمو وبالتالي على انتاجهما للمضادات الميكروبية، بينت النتائج ان درجة الحرارة 30° م والاس الهيدروجيني 6 هما الافضل لنمو الفطرين وانتاج المضادات الميكروبية، وكان كل من خلاصة الخميرة و سكر السكروز هما المصدران المغذيان الافضل بالنسبة للفطر *A. iranicus* بينما كان كل من نترات الصوديوم وسكر المالتوز هما المصدران المغذيان الافضل بالنسبة للفطر *T. funiculosus* .

شخصت المركبات الكيميائية في المستخلصات الفطرية ولكلا الفطرين باستخدام تقنية الغاز المتصل بمطياف الكتلة GC-MS وبينت النتائج وجود 27 مركب يمتلك فعالية ضد ميكروبية في مستخلصات الفطر*A. iranicus* و 23 مركب يمتلك فعالية ضد ميكروبية في مستخلصات الفطر *T. funiculosus* ساهموا في تثبيط البكتريا المختبرة، وبين التحليل بجهاز GC-MS عن وجود مضادات ميكروبية اضافة الى مركبات ذات فعالية تثبيطية كالمركبات المتطايرة و الاحماض الدهنية و المركبات الهيدروكربونية العطرية و الكحولات.

بعدها طبقت الظروف المثلى للنمو لكل فطر لمعرفة قابليتهما على انتاج المركبات الضد ميكروبية في الاوساط السائلة وقيس تأثير المركبات الضد ميكروبية في المستخلصات الفطرية خلال ثلاث فترات وهي 7 و14 و 21 يوم، بينت النتائج خلال الاسبوع الاول ثبط كل البكتريا المختبرة اذ كان اعلى تثبيط للبكتريا السالبة لصبغة كرام وهي *P. aeruginosa* من قبل المستخلص الفطري للفطر *T. funiculosus* بمقدار 13ملم واعلى تثبيط للبكتريا الموجبة بمقدار17ملم لكل *B. subtilis* و*S. aureus* من قبل المستخلص الفطري للفطر *A. iranicus* . بينما اقتصر التثبيط فقط على البكتريا الموجبة لصبغة كرام عند الاسبوع الثاني والثالث.

الخلاصة

The current study aimed to isolate fungi from different soil sources in Basra Governorate and study their ability to produce antimicrobial compounds and study the effect of some factors on their antimicrobial production ability. Six soil samples were collected from different regions, twenty five fungal species belonging to Seventeen genera have been isolated, in addition to sterile mycelia. Fungi were diagnosed based on phenotypic and molecular diagnostics. During this study, two fungal species were recorded for the first time from the Iraqi soil which are: *Aspergillus iranicus* and *Talaromyces funiculosus*. Most of the isolated species were represented by the Anamorphic fungi with an occurrence of 72%, the genuses *Aspergillus* and *Penicillium* were represent 100% percentage of appearance, they were appeared in all samples, two species *Aspergillus niger and Penicillium* sp.1 has recorded the highest percentage of appearance with 100%, as its appears in all samples. Followed by Ascomycota in the second place with an occurrence rate 16%. followed by Zygomycota in the third place with an percentage of occurrence 8%. Basidomycota recorded the lowest percentage of appearance with a percentage of 4% and with only one species.

A preliminary test was conducted to determine the ability of fungi to produce antimicrobial compounds using dual cultures method. The fungi *A. iranicus* and *Chaetomium seminis-citrulli* showed inhibition of both types of tested bacteria: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The highest inhibition rate of Gram-negative bacteria *E. coli* was shoed by *Roussoella* sp. and *Talaromyces funiculosus*, and the highest inhibition of Gram-positive bacteria *S. aureus* was shoed by *Trichocladium antarcticum* and *A. chevalieri*. The ability of the rest of other species ranged from medium, as in *Penicillium* sp.2 to weak as in the fungi

Aspergillus sp. and *A. niveus*, and some species did not show any inhibition rate for the tested bacteria.

After that, a confirmatory test was conducted to find out the ability of the selected fungal species to produce antimicrobials compounds by growing them in liquid media for 14 days. The fungal extracts showed inhibition of all types of gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Aspergillus iranicus and *Talaromyces funiculosus* were chosen to study their ability to produce antimicrobial compounds and study the effect of temperature, pH, nitrogen and carbon sources on their growth and consequently on their production of antimicrobial compounds. The results have showed that the temperature of 30° C, pH 6 were the best for their growth and production of antimicrobial compounds, sucrose and yeast extract were the best nutrient sources for *A. iranicus*, while sodium nitrate and maltose were the best nutrient sources for *T. funiculosus*.

chemical compounds in the fungal extracts for both fungi were diagnosed using GC-MS technology, the results showed the presence of 27 active antimicrobial compounds in the fungal extract of *A. iranicus* and 23 active antimicrobial compounds in the fungal extract of *T. funiculosus*, which contributed to inhibiting the tested bacteria. The analysis by GC-MS revealed the presence of antimicrobial compounds in addition to compounds having an inhibitory activity such as volatile compounds, fatty acids, aromatic hydrocarbons and alcohols.

Then the optimal growth conditions were applied for each fungus to know their ability to produce antimicrobial compounds in liquid media. The effect of antimicrobial compounds in fungal extracts was measured

during three periods, which are 7, 14 and 21 days. The results showed that during the first week, all tested bacteria were inhibited, and the highest inhibition rate of gram-negative bacteria, *P. aeruginosa*, was shoed by the fungal extract of *T. funiculosus* 13 mm, and the highest inhibition of gram-positive bacteria was 17 mm for each *B. subtilis* and *S. aureus* and was shoed by the fungal extract of *A. iranicus*. While the inhibition was restricted to gram-positive bacteria at the second and third week.