فعالية التضاد لعزلات محلية من *Bacillus* sp. تجاه فطريات أعفان الجذور مخبريًا

In Vitro, Antagonistic Activity of Local *Bacillus* sp. Isolate Against Root Rot Fungi

د. عماد سوسان [1]

Dr. Emad Sosan [1]

emad.sosan1969@gmail.com

Received 29 April 2024; Accepted 7 August 2024

(1) قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

(1) Department of Life Science, faculty of Science, Damascus University, Syria.

الملخص

أجريت الدراسة لتقييم فاعلية عزلات من بكتريا *Bacillus* sp. في تثبيط مشيجة الفطريات *Sclerotium cepivorum* و*F. solani* و*Fusarium oxysporum* و*Rhizoctonia solani* المسببة لأعفان الجذور. حيث عُزلت البكتريا من حقول البندورة والخيار وأرض غير مزروعة في مزارع أبو جرش بالإضافة إلى عزلة تجارية (Rhizo-N). نُفذ البحث في قسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم بجامعة دمشق لعام 2023. أظهرت النتائج أنّ للعزلات البكترية *Bacillus* sp. المعزولة من حقول البندورة والخيار قدرة عالية في تثبيط مشيجة الفطريات المختبرة. حيث أعطت نسبة تثبيط تام (100%) للفطرين *Sclerotium cepivorum* و *Rhizoctonia solani* عند التركيز 250 ميكروليتر. في حين كان للعزلة من تربة غير معاملة فعالية تضادية منخفضة تجاه الفطريات المختبرة. في حين أعطت العزلة التجارية تأثيرات عالية في تثبيط جميع الفطريات المختبرة. حيث أعطت تثبيط تام (100%) لمشيجة الفطريات عند التركيز 200 ميكروليتر. وزاد تأثير التضاد للعزلات البكترية *Bacillus* sp. بزيادة التركيز، وكان الفطران *Sclerotium cepivorum* و*Rhizoctonia solani* الأكثر حساسية لعزلات *Bacillus* sp. المختبرة، بينما كان الفطر *F. solani* الأكثر مقاومة تجاه عزلات البكتريا المختبرة.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus* sp.، فطريات، تضاد، أعفان جذور.

Abstract

The study was conducted to evaluate the effect of isolates of *Bacillus* sp. bacteria in inhibiting the mycelium of the fungi *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, and *Rhizoctonia solani*, which cause root rot. The bacteria were isolated from tomato and cucumber fields and uncultivated land in Abu

©2025 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands. **ISSN: 2305-5243/ EISSN: 3005-6438. (p: 123-136)**

Jerash farms, in addition to a commercial isolate (Rhizo-N). The research was carried out in the Department of Plant Biology at the Faculty of Science at Damascus University for the year 2023. The result obtained that *Bacillus* sp. bacterial isolates from tomato and cucumber fields had a high effective in inhibition mycelium of the tested fungi. Where gave complete (100%) inhibition of the fungi *Sclerotium cepivorum* and *Rhizoctonia solani* at a concentration of 250 micro liters. While the isolation from soil not planted had low antagonistic activity against the tested fungi. While the commercial isolate was highly effective in inhibiting all tested fungi. It gave complete (100%) inhibition of the fungal mycelium at a concentration of 200 microliters. The antagonistic effect of *B. subtilis* bacterial isolates increased with increasing concentration. The two fungi, *Sclerotium cepivorum* and *Rhizoctonia solani*, were the most susceptible to the *Bacillus* sp. isolates tested. However, *F. solani* was the most resistant fungus to the tested bacterial isolates.

Key world: *Bacillus* sp., Fungi, Antagonistic, Root Rot.

المقدمة

تتعرض معظم نباتات المحاصيل والخضار إلى العديد من الآفات الزراعية ومن أهمها الفطريات التي تسبب أعفان البذور والجذور قبل وبعد الانبثاق وأعفان الساق والبادرات (Agrios, 2005). تسبب فطريات أعفان الجذور أضرارًا كبيرة للمحاصيل الحقلية والخضار في ظروف الحقل والبيوت المحمية، وتنتشر أعفان الجذور في جميع أنحاء العالم ولها القدرة على البقاء بالتربة لفترة طويلة. من أهم فطريات أعفان الجذور والبذور الفطريات التابعة للجنس *Fusarium* ومنها النوعان *Fusarium solani* و*Fusarium oxysporum* (Inoue *et al.*, 2002; Zitnick-Anderson *et al.*, 2018). يدخل الفطر داخل أوعية الخشب ونتيجة لإفراز الفطر مجموعة من الأنزيمات المحللة لجدران الخلايا Chitinase والسموم مثل Fusaric Acid (Gapillout *et al.*, 1996; Michielse, 2009). يصيب الفطر محاصيل اقتصادية أهمها البطاطا مسببًا مرض الذبول الفيوزارمي والتعفن الجاف، وعفن الجذور في البندورة (العائلة الباذنجانية) وتعفن قاعدة ساق البازلاء وتعفن جذور الحمص (Edel *et al.*, 2001; Forsyth *et al* 2006; Edel-Hermann e*t al.*, 2012)، كما أنّ فطريات التابعة للجنس *Sclerotium* من الفصيلة Sclerotiniaceae من فطريات التربة، وأهمها الفطر المسبب لمرض العفن الأبيض على الثوم والبصل *Sclerotium cepivorum* (Shalaby *et al.*, 2013). يصيب النباتات التابعة للجنس *Allium*، التي تشمل البصل والثوم، والكراث. ولا توجد أصناف بصل أو ثوم مقاومة لهذا المرض حتى الآن على مستوى العالم، ويمكن أن يكون مدمرًا للغاية؛ لأنه يمكن أن يؤدي إلى خسائر كبيرة في محصول البصل أكثر منه في الثوم، في معظم البلدان (Rosas *et al.,* 2010; Gonzales and Mattos, 2018). كما أنّ الفطر *Rhizoctonia Slani* من فطريات التربة التي تسبب أعفان الجذور والبذور لكثير من المحاصيل والخضار (Rini *et al.,* 2007; Sharma- Poudyal *et al.,* 2015) ويسبب القشرة السوداء على البطاطا (Zhang *et al.,* 2014).

تستخدم المبيدات الكيميائية في مكافحة فطريات أعفان الجذور إما عن طريق معاملة البذور أو معاملة الكورمات والتقاوي أو غمر الشتلات ومعاملة التربة (Mann, 2004). Benomyl وthiophanate-methyl (Vatchev and Maneva, 2012). وذكر (Rose *et al.,* 2003) أنَّ مبيدي thiram وbenomyl يستخدمان لمعاملة البذور أو غمر الشتلات أو معاملة التربة لمكافحة

فطريات أعفان الجذور. كما تستخدم المبيدات الكيميائية الوقائية من مجموعة الكربميت Mancozebn و Capta والمبيدات الجهازية من مجموعة البنزاميدازول الجهازية (Carbendazim) في مكافح فطريات أعفان الجذور (Nazir *et al.,* 2022). غير أن استخدام المبيدات الكيميائية له تكاليف عالية وكذلك يسبب أضرارًا للعاملين بالمجال الزراعي (Cremonese, 2017) وتترك آثارًا متبقية على المحاصيل وتؤدي لظهور صفة المقاومة (Lucas *et al.,* 2015) وتسبب تلوث البيئة (Arias-Estevez, 2008).

بدأ الباحثون منذ عقود بالاتجاه إلى استخدام طرائق حديثة بالمكافحة لمسببات أمراض النبات التي تكون تكاليفها منخفضة وغير ملوثة للبيئة وغير سامة للإنسان. تتمتع المكافحة الحيوية بالعديد من المزايا كبديل في الإدارة المتكاملة للأمراض مثل آثار جانبية ضارة قليلة أو معدومة، وحالات مقاومة نادرة، ومكافحة طويلة المدى، ونسبة التكلفة/المنفعة ملائمة، وليس لها أعراض التسمم، ويمكن استخدامها كجزء من الإدارة المتكاملة للأمراض (Schisler *et al.,* 2004; Guédez *et al.,* 2008). تستخدم المبيدات الحيوية بنسبة 5% من مجمل طرائق المكافحة عالميًا (Damalas and Koutroubas, 2018).

بكتريا *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872) إحدى أهم الأنواع التابعة للجنس *Bacillus* تتبع فصيلة Bacillaceae وتسمى أحيانًا بعصيات العشب، تتميز خلاياها بأنها عصوية موجبة لاختبار صبغة غرام هوائية إجبارية وأحيانًا اختيارية تشكل أبواغ وهذه الصفة تعطيها القدرة على تحمل الظروف القاسية كارتفاع الحرارة والجفاف ذات قوام لزج. تنتشر في الماء والتربة ودرجة الحرارة المثلى 25-30 م° (Bandow *et al.*, 2002). يستخدم هذا النوع من الجراثيم في التسميد الحيوي لكونه له قدرة في زيادة انحلال الفوسفور وزيادة نشاط أنزيم الفوسفاتيز في منطقة رايزوسفير جذور النباتات (Swain *et al.*, 2012; Rafique *et al.*, 2018). صنفت منظمة الغذاء والدواء الأمريكية البكتريا *B. subtilis* من الكائنات الحية الدقيقة الآمنة (Zweers *et al.,* 2008). وتعدُّ أمنة للإنسان كونها تستخدم في تخمير فول الصويا (Lyngwi and Joshi, 2014). درس العديد من الباحثين استخدام بكتريا *B. subtilis* في مكافحة العديد من المسببات المرضية (Haleem *et al.,* 2011). كما وجد (Gong *et al.,* 2006) أنّ بكتريا *B. subtilis* لها تأثير في تثبيط مشيجة الفطريات بنسب مختلفة فقد ثبطت مشيجة كل من الفطريات *Alternaria kikuchiana* (29%) و*Fusarium oxysporum* (32%) و*Penicillium digitatum* (30%). وجد عزام وزملاؤه (2006) أن عزلات من بكتريا *Bacillus* sp. لها قدرة في تثبيط الفطر المسبب للعفن الأبيض *Sclerotinia sclerotiorum*. ذكر (Karima *et al.,* 2012) فاعلية النوع *B. subtilis* في المكافحة الحيوية لمرضات النبات *Fusarium solani*. وأوضح سليمان وعبد الحافظ (2013) أنّ كلا النوعين من بكتريا *Bacillus mycodes* و*B. Cereus* ثبط نمو الفطر *Fusarium solani* بنسبة 53.52 و53.52% والفطر *Rhizoctonia solani* بنسبة 99.21 و74.90% على الترتيب. وبين السنيدي (2018) أنّ بكتريا *B. subtilis* ثبطت نمو الفطريات *F. solani* و*Fusarium oxysporum* و*R. solani* بنسبة 94.95 و92 و77.14% على الترتيب. في حين أثبت (Gonzales and Mattos, 2018) تأثير بكتريا *B. subtilis* في تثبيط مشيجة الفطر *Sclerotium cepivorum* بنسبة 99%.

الهدف من الدراسة

دراسة تأثير بعض العزلات المحلية من بكتريا *Bacillus* sp. في التضاد لفطريات *Sclerotium cepivorum* و*F. solani* و*Fusarium oxysporum* و*Rhizoctonia solani*

مواد وطرائق البحث

مكان تنفيذ البحث: أجري البحث مخابر قسم علم الحياة النباتية بكلية العلوم بجامعة دمشق عام 2023.

العزلات الفطرية: جرى الحصول على عزلات من الفطريات *Sclerotium cepivorum* و*F. solani* و*Fusarium oxysporum* و*Rhizoctonia solani* معرفة من قبل قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق. جرى تجديدها وتنميتها على بيئة بطاطا دكستروز أجار (PDA).

عزل وتعريف البكتريا .sp *Bacillus* من التربة

جرى اختيار ثلاثة حقول من منطقة أبو جرش المحيطة بكلية الهندسة الزراعة: الحقل الأول مزروع بنباتات بندورة، والحقل الثاني مزروع بنباتات الخيار (النباتات بمرحلة النمو الخضري)، والحقل الثالث غير مزروع وذلك خلال الشهر السابع من عام 2023. جُمعت عينات تربة من التربة الملاصقة لجذور النباتات (Rhizosphere) أو من التربة غير المزروعة بعد إزالة التربة السطحية على عمق 10 سم. أُخذ 50 غرام من كل موقع بالحقل وبمعدل 5 مناطق بالحقل (250 غرام لكل حقل)، وضعت التربة بكيس نايلون ووضعت بحافظة مبردة نقلت إلى المخبر. وضع 10 غرام من التربة بعد إزالة بقايا الجذور في دروق سعة 250 مل وأكمل الحجم إلى 100 مل ماء مقطر معقم. وضعت في حمام مائي على درجة حرارة 60 م° لمدة ساعة للتخلص من البكتريا غير المتبوغة. ومن ثم وضعت العينات على جهاز رج سرعة 150 دورة/دقيقة لمدة ساعة في حمام مائي على درجة حرارة 25 م° لمدة ساعة (Ubalua, 2014). تم الحصول على التخفيفات بنقل 1 مل من المعلق إلى 9 مل ماء معقم حتى الوصول إلى التخفيف 10^{-4}. أخذ 100 ميكروليتر من كل عينة وتم نشرها على طبق بتري يحوي وسط الآغار المغذي Nutrient Agar (N.A) (Madika *et al.,* 2017) بمعدل خمسة أطباق لكل عينة. حُضنت الأطباق على درجة حرارة 25±2 م° وبعد مرور 24-48 ساعة من التحضين جرى اختيار مستعمرات من الجراثيم تطابق المواصفات القريبة من شكل مستعمرات بكتريا *Bacillus*، مستديرة أو غير منتظمة الحواف سميكة وذات لون كريمي، نقلت إلى أطباق بتري يحوي وسط مغذي (N.A).

تعريف بكتريا .sp *Bacillus*

عُرفت عزلات البكتريا وفقًا لشكل المستعمرة ولونها، شكل الخلايا تحت المجهر، ووجودها على شكل سلاسل (Cowan and Steel, 2003)، واختبار صبغة غرام (Colwell and Grigorova, 1987). وفقًا للاختبارات البيوكيميائية: اختبار الأُكسيداز، اختبار كاتلاز (Facklam and Elliott, 1995)، اختبار تحلل البكتين (Lelliot *et al.,* 1994)، اختبار التنفس (Murray *et al.,* 2007)، اختبار قدرة البكتريا على التبوغ (Vries, 2011)، اختبار تحلل الجلاتين (Dela cruz, 2012)، اختبار تحلل النشاء واختبار اختزال النترات واختبار إنتاج حمض الإندل الخلي IAA وفحص الحركة واختبار Methyl red واختبار Vogas-Proskaur وفحص الحركة وفحص اختزال النترات (Harrigan and McCance, 1976; Shields and Cathcart, 2011) اختبار النمو بتركيز الملح المرتفع (Starr *et al.,* 1981).

تحمل الرقم الهيدروجيني

حضر وسط النمو بأرقام هيدروجينية 5 و7 و9 pH، وصنفت وفقًا للمراجع العلمية حتى الوصول للجنس والنوع Bergey's manual of systemic bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974).

العزلة التجارية Rhizo-N®-Powder: [ريزون مسحوق تركيز البكتريا *Bacillus subtilis* فيه 30×10^{-6} خلية/غ)].

اختبارات التضاد بين عزلات *Bacillus* sp. المعزولة محليًّا وعزلة بكتريا تجارية (ريزون) وفطريات *F. oxysoporum* و*F. Solani* و*R. solani* و*S. cepivorum*

نُميت الجراثيم *Bacillus* sp. المعزولة من التربة ومن المستحضر التجاري على الوسط المغذي N.A في أطباق بتري وحُضنت عند درجة حرارة 25 م° لمدة 24 ساعة. تؤخذ مستعمرة واحدة من كل طبق ووضعت بأنابيب اختبار سعة 20 مل تحوي 10 مل وسط المغذي Nutrient السائل وحُضنت عند درجة حرارة 25 م° مع التحريك لمدة 48 ساعة. حُضّر وسط مغذي خليط من البطاطا دكستروز أجار ووسط NA بمعدل (1:1)، وعُقم بالأوتوكلاف، وصُب الوسط المغذي في أطباق بتري معقمة بقطر 90 مم. بعد تصلب الوسط المغذي، لقّحت الأطباق بالعزلات البكتيرية المحضرة مسبقًا بمعدل 50 و100 و150 و200 و250 ميكروليتر نشرت على كامل سطح الطبق باستخدام ماصة باستور الزجاجية المعقمة، تركت لمدة 24 ساعة حتى يستقر اللقاح، ثم لقّحت الأطباق في وسطها بأقراص بقطر 5 مم مأخوذة من حافة مستعمرات الفطريات المدروسة بواسطة ثاقب الفلين، وبمعدل ثلاث مكررات لكل فطر وكل عزلة وكل تركيز، وفي معاملة الشاهد جرى تلقيح الأطباق بالعزلات الفطرية فقط وبمعدل ثلاث مكررات أيضًا. ومن ثُم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 25±2 م° لمدة 7 أيام، حيث وصل نمو مشيجة الفطريات بأطباق الشاهد لحافة الطبق، بعدها جرى قياس قطر نمو الفطريات في أطباق المعاملة وحُسبت نسبة التثبيط وفقًا للمعادلة:

$$\text{تثبيط نمو المشيجة (\%)} = \frac{\text{قطر المستعمرة في الشاهد – قطر المستعمرة بوجود البكتريا}}{\text{قطر المستعمرة في الشاهد}} \times 100$$

التحليل الإحصائي

جرى تحليل نتائج الاختبارات وفق برنامج التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS 20، حيث استخدم التصميم العشوائي التام Completely Randomized Design، كما جرى حساب قيمة أقل فرق معنوي (LSD) بمستوى معنوية 0.01.

النتائج والمناقشة

تعريف البكتيريا *Bacillus* sp. المعزولة من التربة

اعتمد التشخيص الأولي على شكل وحجم ولون المستعمرات وطبيعة نموها، فقد أظهرت بعض العزلات على الوسط المغذي في درجة حرارة 25 م° لمدة 24 ساعة مستعمرات بشكل دائري كبيرة نسبيًا ملساء ذات حافة مستديرة أو غير منتظمة الحواف بتقدم النمو ولونها أبيض إلى كريمي لزجة قليلًا، ويزداد غمق اللون بزيادة عمر المستعمرة، يتراوح قطر المستعمرة بين 1.8-3.2 مم. بالفحص تحت الميكروسكوب تظهر البكتريا على شكل نقط عصوية تتجمع بشكل سلاسل قصيرة كونها تمتلك تشكل أبواغ شبه مركزية (Semicentral). بعد 24 ساعة وفقًا للمراجع التصنيفية لتشخيص الجنس (Buchanan and Gibbons, 1974). وبفحصها على شريحة زجاجية باستخدام صبغة غرام وجدت موجبة وتتوافق مع (Madika *et al.*, 2017). أُعطيت العزلات رموزًا وفقًا للحقل: BS-Tomt عزلة من حقل البندورة، وBS-Cucr من حقل الخيار وBS-Soil من التربة فقط و$BS\text{-}Local^R$ العزلة التجارية. يبين الجدول (1) نتائج الاختبارات البيوكيميائية لتعريف العزلات *Bacillus* sp. ومقارنتها بالعزلة التجارية. حيث وجد أن لها قدرة على تحلل الجيلاتين والنشاء. يبين الجدول (2) نتائج الاختبارات الفسيولوجية لتعريف العزلات *Bacillus* sp. ومقارنتها بالعزلة التجارية. حيث وجد أنها عصوية الشكل متبوغة موجبة لصبغة غرام ومتحملة للملوحة

حتى 7%. تتوافق هذه النتائج مع (Chung *et al.*, 2008). وجد (Ruicheng *et al.*, 2014) أن العزلة Y-1 من بكتريا *Bacillus subtilis* موجبة غرام هوائية وتحلل النشاء وموجبة لاختبار Vogas-Proskaur متحملة للملوحة حتى 5%. وتتوافق مع (Shalaby *et al.*, 2013)، عصوية، هوائية متحملة للملوحة حتى 7%.

الجدول 1. نتائج الاختبارات البيوكيميائية لتعريف العزلات جراثيم .*Bacillus* sp ومقارنتها بالعزلة التجارية

العزلة البكتيرية	BS-Tomt	BS-Cucr	BS-Soil	BS-Local^R
التنفس	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية
كاتالاز	+	+	+	+
Vogas-Proskaur	+	+	+	+
أوكسيداز	-	-	-	-
اختبار الإندول	-	-	-	-
تحلل البكتين	+	+	+	+
تحلل النشاء	+	+	+	+
تحلل الجيلاتين	+	+	+	+
متيل ريد	-	-	-	-

الجدول 2. نتائج الاختبارات الفسيولوجية لتعريف العزلات جراثيم .*Bacillus* sp ومقارنتها بالعزلة التجارية

العزلة البكتيرية		BS-Tomt	BS-Cucr	BS-Soil	BS-Local^R
الشكل		عصوية	عصوية	عصوية	عصوية
غرام		+	+	+	+
التبوغ		+	+	+	+
الحركة		+	+	+	+
تحمل NaCl	%5	+	+	+	+
	%7	+	+	+	+
	%10	-	-	-	-
تحمل PH	5	-	-	-	-
	7	+	+	+	+
	9	+	+	+	+

التضاد الحيوي لعزلة .*Bacillus* sp المعزولة من تربة الرايزوسفير لجذور نباتات البندورة على العزلات الفطرية المختبرة بعد 7 أيام

تظهر نتائج الجدول (3) أن عزلة البكتريا BS-Tomt المعزولة من حقل البندورة لها تأثيرات تضادية كبيرة تجاه الفطريات الممرضة للنبات المدروسة، وتباينت القدرة التضادية وفقًا للتركيز ونوع الفطر. حيث زاد التأثير التضادي للبكتريا بزيادة التركيز. وكانت الفروق معنوية بين التراكيز من 150 حتى التركيز 250 ميكروليتر لجميع الفطريات المختبرة. وقد أعطى أقل تركيز مستخدم (50 ميكروليتر) النسب المئوية للتثبيط 15.32 و28.26 و43.52 و49.25% لكل من فطريات *F. solani* و*F. oxysporum* و*S. cepivorum* و*R. solani* على الترتيب. في حين أعطى أعلى تركيز مستخدم (250 ميكروليتر) النسب المئوية للتثبيط 81.54 و100 و100 و100% وفقًا للترتيب السابق. في حين أعطت عزلة البكتريا BS-Tomt أعلى تضاد تجاه الفطرين *S. cepivorum* و*R. Solani* ودون فروق معنوية بينهما عند جميع التراكيز المختبرة. رغم أنها أعطت أعلى تضاد تجاه الفطر

R. solan، في حين أعطت العزلة أقل تضاد تجاه الفطر *F. solani* وبفروق معنوية مع باقي الفطريات وعند جميع التراكيز. حيث أعطت العزلة البكترية تضادًا تجاه الفطر بنسبة تثبيط أعلى من 50% عند التركيز (200 ميكروليتر).

الجدول 3. التضاد الحيوي لعزلة BS-Tomt المعزولة من تربة الرايزوسفير لجذور نباتات البندورة على العزلات الفطرية المختبرة بعد 7 أيام

حجم المعلق البكتري (µL)	النسبة المئوية لتثبيط النمو (%)				LSD 0.01
	F. solani	*F. oxysporum*	*S. cepivorum*	*R. solani*	
50	15.32^{dC}	28.26^{dB}	43.52^{cA}	49.25^{cA}	8.21
100	22.36^{dC}	36.12^{dB}	48.62^{cA}	52.36^{cA}	6.98
150	41.29^{cC}	68.19^{cB}	73.56^{bA}	75.25^{bA}	3.57
200	69.85^{bC}	82.39^{bB}	92.65^{aA}	96.23^{aA}	5.29
250	81.54^{aB}	100^{aA}	100^{aA}	100^{aA}	7.59
LSD 0.01	8.62	9.87	9.12	6.28	-

الأحرف الكبيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بالسطر.
الأحرف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بالعامود.

التضاد الحيوي لعزلة BS-Cucr المعزولة من تربة الرايزوسفير لجذور نباتات الخيار على العزلات الفطرية المختبرة بعد 7 أيام

توضح النتائج المبينة في الجدول (4) أن عزلة البكتريا BS-Cucr من حقل الخيار لها تأثيرات تضادية تجاه الفطريات الممرضة للنبات المدروسة، وزادت الفاعلية التضادية للبكتريا بزيادة التركيز. وكانت الفروق معنوية بين جميع التراكيز المستخدمة لجميع الفطريات المختبرة. وقد أعطى التركيز (150 ميكروليتر) النسب المئوية للتثبيط 39.25 و58.62 و65.28 و71.75% لكل من فطريات *F. solani* و*F. oxysporum* و*S. cepivorum* و*R. solani* على الترتيب. في حين أعطى أعلى تركيز مستخدم (250 ميكروليتر) النسب المئوية للتثبيط 75.25 و84.12 و100 و100% وفقاً للترتيب السابق. في حين أعطت عزلة البكتريا BS-Cucr أعلى تضاد تجاه الفطر *R. solani* وبفروق معنوية مع باقي الفطريات عند التراكيز من 100 إلى 200 ميكروليتر. بينما أعطت عزلة البكتريا تثبيطًا تامًّا (100%) لمشيجة الفطرين *S. cepivorum* و*R. solani* عند أعلى تركيز مستخدم (250 ميكروليتر). في حين أعطت العزلة أقل تضاد تجاه الفطر *F. solani* وبفروق معنوية مع باقي الفطريات وعند جميع التراكيز. حيث أعطت العزلة البكتيرية نسبة تثبيط لمشيجة الفطر أعلى من 50% عند التركيز (200 ميكروليتر).

الجدول 4. التضاد الحيوي لعزلة BS-Cucr المعزولة من تربة الرايزوسفير لجذور نباتات الخيار على العزلات الفطرية المختبرة بعد 7 أيام

حجم المعلق البكتري (µL)	النسبة المئوية لتثبيط النمو (%)				LSD 0.01
	F. solani	*F. oxysporum*	*S. cepivorum*	*R. solani*	
50	8.75^{eD}	13.26^{eC}	18.29^{eB}	25.39^{eA}	3.18
100	17.26^{dD}	28.69^{dC}	36.87^{dB}	43.18^{dA}	3.72
150	39.25^{cD}	58.62^{cC}	65.28^{cB}	71.75^{cA}	3.65
200	67.29^{bD}	75.29^{bC}	88.26^{bB}	92.87^{bA}	2.58
250	75.25^{aC}	84.12^{aB}	100^{aA}	100^{aA}	4.16
LSD 0.01	4.19	4.36	5.13	4.87	-

الأحرف الكبيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بالسطر.
الأحرف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بالعامود.

التضاد الحيوي لعزلة BS-Soil المعزولة من تربة غير مزروعة على العزلات الفطرية المختبرة بعد 7 أيام

تشير البيانات أن العزلة BS-Soil المعزولة من تربة غير مزروعة كان تأثيراتها التضادية تجاه الفطريات المختبرة منخفضة (الجدول 5). غير أنّ قدرة العزلة التضادية زادت بزيادة التركيز. ووجد من التحليل الإحصائي أنّ الفروق ظاهرية بين الفطريات عند جميع التراكيز المستخدمة بين الفطريات *F. solani* و*F. oxysporum* و*S.cepivorum* و*R. solani*. وقد زادت الفاعلية بزيادة التركيز وبفروق معنوية. فقد أعطى أقل تركيز (50 ميكروليتر) 3.50 و4.25 و5.75 و5.60% وأعطى أعلى تركيز (250 ميكروليتر) نسب مئوية للتثبيط 59.68 و62.35 و63.89 و60.57% وفق الترتيب السابق.

الجدول 5. التضاد الحيوي لعزلة BS-Soil المعزولة من تربة غير مزروعة على العزلات الفطرية المختبرة بعد 7 أيام

حجم المعلق البكتري (µL)	النسبة المئوية لتثبيط النمو (%)				LSD $_{0.01}$
	F. solani	*F. oxysporum*	*S. cepivorum*	*R. solani*	
50	3.50^{eA}	4.25 ^{eA}	5.75 ^{eA}	5.60 ^{eA}	2.31
100	12.25^{dA}	15.50 ^{dA}	14.23 ^{dA}	13.75 ^{dA}	3.65
150	18.40^{cA}	20.25 ^{cA}	19.50 ^{cA}	21.96 ^{cA}	3.72
200	33.98^{bA}	35.26 ^{bA}	35.26 ^{bA}	34.50 ^{bA}	3.12
250	59.68^{aA}	62.35 ^{aA}	63.89 ^{aA}	60.57 ^{aA}	4.36
LSD 0.01	4.68	4.21	3.28	5.64	-

الأحرف الكبيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بالسطر.
الأحرف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بالعامود.

التضاد الحيوي لعزلة البكتريا التجارية BS-Local^{R} على العزلات الفطرية المختبرة بعد 7 أيام

تشير البيانات أنّ العزلة التجارية BS-Local^{R} لها تأثيرات تضادية عالية على جميع أنواع الفطريات المختبرة، وتباينت القدرة التضادية وفقًا لنوع الفطر فقط عند التراكيز المنخفضة. في حين زادت الفاعلية التضادية للبكتريا بزيادة التركيز (الجدول 5). وكانت الفروق معنوية بين التراكيز من 100 حتى 250 ميكروليتر. وأعطى التركيز (50 ميكروليتر) نسب مئوية للتثبيط أعلى من 50% للفطريات *F. oxysporum* و*S. cepivorum* و*R. solani* على الترتيب. في حين أعطى التركيز (150 ميكروليتر) نسب مئوية للتثبيط أعلى من 50% للفطر *F. Solani*. وأعطى التركيز (200 ميكروليتر) تثبيطًا تامًّا لنمو الفطريات المختبرة. ولم يكن هنالك فروق معنوية بنسب تثبيط الفطرين *S. cepivorum* و*R. solani* عند جميع التراكيز المستخدمة.

الجدول 6. التضاد الحيوي لعزلة التجارية BS-Local^{R} على العزلات الفطرية المختبرة بعد 7 أيام

حجم المعلق البكتري (µL)	النسبة المئوية لتثبيط النمو (%)				LSD $_{0.01}$
	F. solani	*F. oxysporum*	*S. cepivorum*	*R. solani*	
50	40.27^{dC}	52.36^{cB}	61.28^{cA}	63.75^{bA}	5.23
100	44.23^{dC}	62.28^{cB}	70.25^{cA}	75.36^{bA}	6.38
150	62.45^{cC}	75.23^{bB}	87.55^{bA}	92.26^{aA}	7.26
200	100^{a}	100 ^{a}	100^{a}	100^{a}	-
250	100 ^{a}	100 ^{a}	100^{a}	100^{a}	-
LSD 0.01	7.26	13.36	11.26	14.11	-

الأحرف الكبيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بالسطر.
الأحرف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بالعامود.

تستخدم بكتريا *Bacillus* sp. في الزراعة للتسميد الحيوي وكمضادات فطرية ضد العديد من فطريات الممرضة للنباتات. وتعود فاعلية بكتريا *Bacillus* sp. في تثبيط فطريات أعفان الجذور إلى قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية وإتاحة الفوسفور للنباتات، من خلال إفراز بعض الأنزيمات مثل أنزيم الفوسفتيز (Roberti and Selmi, 1999; Chiu *et al.*, 2006). بين Stein (2005) التضاد الحيوي لبكتريا *B. subtilis* لقدرتها في إنتاج المركبات التي لها تضاد حيوي Surfactin وfengycin وmycosubtilin وbaciflomycin وamphilic ومركبات ذات توتر سطحي كارهة للماء. وجد (Gong *et al.*, 2006) أن أهم المركبات الموجود في الوسط المغذي لنمو البكتريا *B. subtilis* العزلة (PY-1) هي iturin A ومماكباته (βAA:C16) iturin A6 و iturin A2 (βAA:C14) وهي مركبات مشابهة للبيدات الحلقية (lipopeptides) ولها تضاد فطري كبير. وقد ذُكر قدرة المركب iturin A على تثبط اختيارية الجدار الخلوي ويخرب تصنيع اللبيدات ويمنع إنتاج الأبواغ الفطرية ويثبط نمو الميسليوم (Latoud , *et al.,* 1987). في حين أشار (Li *et al.,* 2023) إلى أن فاعلية *B. subtilis* (عزلة LY-1) تباين وفق لنوع الفطر ضمن الجنس الواحد فقد أعطت تثبيطًا لنمو المشيجة ولتشكل الجراثيم *F. proliferatum*< *F. oxysporum*<*F. solani* وأعطى تثبيطًا لإنتاج الأبواغ وقدرتها على الإنتاش للفطر *F. solani* أكثر من 95%. وفسر قدرتها في تثبيط نمو الفطريات كونها تنتج أنزيمات cellulase، protease، وamylase مما يعطيها القدرة على تحليل البروتين والسليلوز والنشا للفطريات. وقد بين العديد من الباحثين قدرة عزلات *Bacillus subtilis* في مكافحة الفطريات الممرضة للنباتات وفقًا لنوع الفطر والعزلة المستخدمة وطريقة العمل. وذكر (Araujo *et al.,* 2005) أن بكتريا *B. subtili* لها فاعلية متباينة على الفطريات *Rhizoctonia solani* و*Sclerotinia sclerotiorum*. وجد (Senthilkumar *et al.*, 2009) أن بكتريا *B. subtilis* لها تضاد فطري تجاه العديد من الفطريات *Sclerotium rolfsii* و*Rhizoctonia bataticola* و*Fusarium udum* وتباين التأثير وفقًا لنوع الفطر. وقد أظهر (Karima *et al.,* 2012) أن بكتريا *B. subtilis* لها فاعلية في تثبيط مشيجة الفطرين. *F. solani* و*R. Solani* دون فروق معنوية. وجد (Shalaby *et al.,* 2013) أنّ عزلات بكتريا *B. subtilis* المعزولة من ريزوسفير نباتات البصل السليمة أعطت تثبيط نمو الفطر *Sclerotium cepivorum*. في حين بين (Ruicheng *et al.,* 2014) أن العزلة Y-1 من بكتريا *B. subtilis* وأعطت تثبيطًا لمشيجة الفطريات *F. oxysporum* (64.90%) و*F. solani* (62.77%) وفطر *Rhizoctonia solani* (56.73%). وذكر (Mosquera *et al.,* 2014) أنّ بكتريا *B. subtilis* لها قدرة على تضاد الفطريات النبات وتختلف القدرة بتركيز البكتريا في الوسط المغذي. فقد وضح (Mejía-Bautista *et al.,* 2016) أن بكتريا *B. subtilis* أعطت تثبيط مشيجة الفطر بنسبة 69.1% *F. solani*. ووضح (Alsayed *et al.,* 2022) فاعلية العزلة *Bacillus subtilis* EG21 بتركيز 100 ميكروليتر ضد فطر *Rhizoctonia solani* فقد أعطت تثبيطًا تامًّا لمشيجة الفطر ولها قدرة على إنتاج انزيمات cellulase وpectinase وchitinase.

الاستنتاجات والتوصيات

- العزلات المحلية من بكتريا *Bacillus* sp. المعزولة من منطقة الرايزوسفير لجذور نباتات البندورة والخيار لها قدرة تضادية تجاه الفطريات المختبرة
- العزلات من بكتريا *Bacillus* sp. المعزولة من التربة المحلية لها قدرة على تحمل الملوحة حتى 7%.
- دراسة تأثير أهم الأنزيمات التي تنتجها العزلات المحلية للبكتريا التي تسبب تضاد تجاه الفطريات.
- تعريف بكتريا *Bacillus* sp. باستخدام تقانة البيولوجيا الجزيئية للتأكد من نوعها الدقيق.

المراجع

- سليمان، عصام داود ونور عبد الحافظ. 2013. تأثير المستخلصات النباتية المائية والكحولية الخام لأوراق اليوكاليبتوس والآس وعوامل المكافحة الأحيائية في نمو الفطور المسببة لموت بادرات وتعفن جذور اللوبياء. مجلة وقاية النبات العربية، 31 (1). 57 -63.
- السنيدي، محمد علي. 2018. فاعلية المكافحة الحيوية للبكتريا *B. subtilis* ضد الفطريات ضد الفطريات *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici, F.solani, Rizhoctonia* solani في المختبر والمشتل. مجلة جامعة أسيوط للعلوم البيئية. 21(2): 75-37.
- عزام، فراس وأبو غرة، محمود والمملوك، عمر فاروق. 2006. عزل بكتريا من جذور بعض النباتات والأجسام الحجرية والتربة ذات تأثير مضاد في الفطر المسبب لمرض *Sclerotinia sclerotiorum* عفن سكليروتينيا. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 22(2): 257-275.

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology.fifth Edition. Printed in the United States of America (New York).PP. 948.
- Alsayed A., F. L'Haridon, E. Abou-Mansour, and L. Weisskopf. 2022. Disease Inhibiting Effect of Strain *Bacillus subtilis* EG21 and Its Metabolites Against Potato Pathogens *Phytophthora infestans* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 112:2099-2109.
- Araújo, F.F., A. A.Henning and M. Hungria. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by Bacillus subtilis and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development.World J Microbiol Biotechnol. 21: 1639-1645.
- Arias-Estevez, M. 2008 The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agr. Ecosyst. Environ.* 123, 247-260.
- Bandow, J.E;.Br tz, H. and M. Hecker. 2002. *Bacillus subtilis* Tolerance of Moderate Concentrations of Rifampin Involves the B- Dependent General and Multiple Stress Response. Journal of Bacteriology. January; 184(2): 459- 467.
- Bergey, D. H. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams and Wilkins.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. (8th Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Chiu, Y., Rekha, P., Wei, L., and Arun, A. 2006. Encapsulation of plant growth promonting bacteria in Alginate beads eniched with humic acid. Wiley inter Sci, 17, 76-83.
- Chung, S., H. Kong, J. S. Buyer, D. K. Lakshman, J. Lydon, S. D. Kim, and D. P. Roberts. 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80:115-123.
- Cohn, Ferdinand. 1872. "Untersuchungen über Bacterien". Beiträge zur Biologie der pflanzen1.pp 127-224.

- Colwell and Grigorova. 1987. Methods in microbiology. current methods for classification and identification of microorganisms. 19. 1-67.
- Cowan, S.T. and Steel, K.J. 2003. Manual for the Identification of Medical Bacteria 3rd ed. / edited and rev. by G.I. Barrow and R.K.A. Feltham.Cambridge University Press. London. pp 188-238
- Cremonese, C. 2017 Occupational exposure to pesticides, reproductive hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. Reprod. Toxicol. 67, 174-185.
- Damalas, C. A., and Koutroubas, S. D. 2018. Current status and recent developments in biopesticide use. Agriculture 8:13.
- Dela Cruz, T. E. 2012. Gelatin Hydrolysis Test Protocol. Retrieved from American Society for Microbiology. 1-10
- Edel, V., Christian, S., Gautheron, N., Recorbet, G., and Alabouvette, C. 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. FEMS Microbiology Ecology, 36(1), 61-71.
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., and C Steinberg. 2012. Genetic diversity of Fusarium oxysporum and related species pathogenic on tomato in Algeria and other Mediterranean countries. Plant Pathology, 61, 787-800.
- Facklam, R., and Elliott, J. A. 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clinical microbiology reviews, 8(4), 479-495.
- Forsyth, L. M., L. J. Smith and E. A. B. Aitken. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing Fusarium wilt severity. Mycology Reserch, 110:929-935.
- Gapillout, I., M. L. Milat and J. P. Blein. 1996. Effects of fusaric acid on cells from tomato cultivars resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum.* f. sp. *lycopersici*.European Journal of Plant Pathology, 102(2): 127-132.
- Gong,M. J.-Dong Wang, J. Zhang, H. Yang, X.-Feng LU, Y. PEI and J.-Qiu cheng. 2006. Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 *in Vitro* and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 38(4): 233-240
- Gonzales; V and L. Mattos. 2018. Cultural, biological and chemical control of the white rot fungus (*Sclerotium cepivorum*, Berk) in onions (*Allium cepa*) in Arequipa´s countryside. Peruvian Journal of Agronomy 2 (3): 27- 34.
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L. and R. Olivar. 2008. Biological control a tool for sustaining and sustainable development. Control Biológico 7(13):50-74.

- Haleem Khan, A. A, Naseem, Rupa, L. and Prathibha. 2011. Screening and potency evaluation of antifungal from soil isolates of *Bacillus subtilis* on selected fungi. AdvancedBiotech., 10(7):35-37.
- Harrigan, W.F. and M. E. McCance. 1976. Laboratory methool in food and dairy microbiology. Academic press Inc. San Diego.
- Inoue, I, F. Namiki and T. Tsuge. 2002. Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein. Plant Cell 14: 1869-1883
- Karima, H.E. H. and N. G. El-Gamal.2012. *In vitro* Study on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* Isolates Causing the Damping Off and Root Rot Diseases in Tomatoes. Nature and Science.10(11).16-25.
- Latoud C, Peypoux F and G. Michel. 1987. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Modifications of membrane permeability and lipid composition. J Antibiot (Tokyo), 40: 1588-1595.
- Lawal. A.K, B. A. Oso, A. I. Sanni, J.A. Grillo and G. N. Elemo. 2011. Production of L.glutamic acid from Bacillus isolates cultivated on agro-industrial wastes containing.
- Lelliot RA, Billing E, Hayward AC. 1966. A determinative scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic Pseudomonads. J. App. *Bacteriology*. 29. 70-489.
- Li, Y.; Zhang, X.; He, K.; Song, X.; Yu, J.; Guo, Z. and M. Xu. 2023. Isolation and Identification of Bacillus subtilis LY-1 and Its Antifungal and Growth-Promoting Effects. Plants, 12, 4158.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J. and B. A. Fraaije. 2015. The evolution of fungicide resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* 90, 29-92.
- Lyngwi, N. A., and R. Joshi. 2014. Economically important *Bacillus* and related genera: a mini review. Biology of Useful Plants and Microbes, 3, 33-43.
- Madika, A., Ameh, J.B. and Machido D. A. 2017. Isolation and Screening of *Bacillus subtilis* from Soil for Amylase Production. UJMR, Vol. 2 N. 2, 82-86.
- Mann, P.J. 2004. The Pesticide Manual. 3th ed. Database Right © 2004 BCPC (British Crop Protection Council.
- Mejía-Bautista, M. A., J. Cristóbal-Alejo, J. M. Tun-Suárez and A. Reyes-Ramírez. 2016. *In vitro* activity of *Bacillus* spp. On mycelial growth inhibition of *Fusarium equiseti* and *Fusarium solani* isolated from habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq). Agrociencia, 1123.1135.
- Michielse, C.B. and M. Rep. 2009. Pathogen profile update: Fusarium oxysporum. Mol. Plant Pathol. 10, 311-324.
- Mosquera, S., Gonzalez-Jaramillo, L. M., Orduz, S. and Villegas-Escobar, V. 2014. Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. Biocatal. Agric. Biotechnol. 3, 378-385.

- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Pfaller. M.A.2007 Manual of 286 Clinical Microbiology. 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.pp.2488.
- Nazir, N., Z. A. Badri, N. A. Bhat, F. A. Bhat, P. Sultan, T. A. Bhat, M. A. Rather and A. Sakina. 2022. Effect of the combination of biological, chemical control and agronomic technique in integrated management pea root rot and its productivity. Scientific Reports. 12:11348.
- Rafique, M., Riaz, A., Anjum, A., Qureshi, M. A., and F. Mujeeb. 2018. Role of Bioinoculants for Improving Growth and Yield of Okra (*Abelmoshus esculentum*). Universal Journal of Agricultural Research, 6(3), 105-112.
- Rini, C. R. and K.K. Sulochana. 2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. Journal of Tropical Agriculture 45 (1-2): 21-28.
- Roberti, R. and C. Selmi, 1999. Biological control of plant pathogens by *Bacillus subtilis*. Informatore Filopathogico, 49 (718): 12 - 21.
- Rosas, V., D. Ulacio, M. Jimenez, W. Perdomo and A. Pardo. 2010. Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk. y la pudrición blanca en ajo. Bioagro, 22(3), 185-192.
- Rose, S., M. Parker and Z. K. Punja. 2003. Efficacy of biological and chemical treatments for control of Fusarium root and stem rot on greenhouse cucumber. Plant Dis. 87, 1460-1462.
- Ruicheng Ju , Y. Zhao ,Jinyu Li , H. Jiang , P. Liu , T. Yang , Z. Bao, B. Zhou ,X. Zhou and X. Liu. 2014. Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings. Ann Microbiol 64:377-383.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W and M A. Jackson. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. Phytopathology, 94(11):1267-1271.
- Senthilkumar M, Swarnalakshmi K, Govindasamy V and K. Annapurna. 2009. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, Rhizoctonia bataticola. Curr Microbiol 58:288-293.
- Shalaby, M, K. E. Ghoniem and M. A. El-Diehi.2013. Biological and fungicidal antagonism of *Sclerotium cepivorum* for controlling onion white rot disease. Annals of Microbiology, 63.4.
- Sharma-Poudyal, D.; Paulitz, T.C. and L. J. du Toit. 2015. Evaluation of onion genotypes for resistance to stunting caused by *Rhizoctonia solani* AG 8. HortScience , 50, 551-554.
- Shields, P. and Cathcart, L. (2011) Motility test medium protocol. American Society for Microbiology. 1-10.
- Starr, M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows and H. G. chlegel. 1981. The Prokaryotes. Vol. II. Springer-Verlag New York.
- Stein, T. 2005. Bacillus subtilis Antibiotics: Structures, Syntheses and Specific Functions. Molecular Microbiology, 56, 845-857.

- Swain, M. R., K. Laxminarayana and R. C. Ray. 2012. Phosphorus solubilization by thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. Agricultural Research, 1(3), 273-279.
- Ubalua, S. O. 2014. Production and optimization of extracelluar-amylase productivity from *Bacillus subtilis*. African J. of Microbiology Research. Vol. 8 No. 45. P. 3761-3769.
- Vatchev,T. and S. Maneva. 2012. Chemical control of root rot complex and stem rot of greenhouse cucumber in straw-bale culture. Crop Protection 42, 16-23.
- Vries, Y.P.de. 2011 Bacillus cereus spore formation, structure, and germination, Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands - with summary in Frisian and Dutch,128 p.
- Zhang, X.-Y.; Yu, X.-X.; Yu, Z.; Xue, Y.-F. and L. P. Qi. 2014. A simple method based on laboratory inoculum and field inoculum for evaluating potato resistance to black scurf caused by Rhizoctonia solani. Breed. Sci. 64, 156-163.
- Zitnick-Anderson, K.; Simons, K. and J. S. Pasche. 2018. Detection and qPCR quantification of seven Fusarium species associated with the root rot complex in field pea. Can. J. Plant Pathol. 40, 261-271.
- Zweers, J.C., I. Baràk, D. Becher, A.J.M. Driessen, M. Hecker, V. P. Kontinen, M. J. Saller,L. Vavrova and X. A.J.M. Dijl. 2008. Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. Microbial cell factories, 7:10.

N° Ref: 1176