دراسة تأثير المبيد الفطري توبسان (Thiophanate-Methyl) على بكتريا *E. coli*

تاريخ الاستلام : 2013/10/21 تاريخ القبول :2014/2/17

مي حميد محمد الدهيمي
جامعة القاسم الخضراء/ كلية علوم البيئة

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة معرفة تأثير مبيد التوبسان بثلاث تراكيز مختلفة هي (0.05, 0.005, 0.0005) ملغم/لتر على نمو مستعمرات بكتريا *E. coli* المعزولة من رواسب نهر الحلة وايجاد ان امكن التركيز نصف القاتل LC_{50}من هذا المبيد لهذه البكتريا. اذ اظهرت النتائج ان التراكيز المختلفة للمبيد اظهرت تأثيرات مختلفة على نمو مستعمرات البكتريا وكانت معدلاتها تتراوح ما بين (137- 232) مستعمرة/ مل و (462- 538) مستعمرة/ مل و (605- 657) مستعمرة/ مل وبنسبة مئوية تتراوح ما بين (17.41-29.71)% و(60.16-65.44)% و(71.51-83.06)% لكل من التراكيز الثلاثة على التوالي.كما اشارت النتائج ان قيمة التركيز نصف القاتل LC_{50} من مبيد التوبسان كان 0.0099 ملغم/لتر. اظهرت انابيب الاختبار الحاوية على المبيد والبكتريا نموا في بعضها مما قد يشير الى تكيف البكتريا مع التراكيز المضافة من المبيد. اشارت النتائج وجود فروق معنوية بين معدلات النمو عند مستوى احتمالية (0.05) ووجود معاملات ارتباط عكسية بين التراكيز ومعدلات النمو.

الكلمات المفتاحية : مبيد فطري ,توبسان , بكتريا , مستعمرة

Microbiology Classification QR 75-99.5

المقدمة

اهتمت اغلب الدراسات بإيجاد مبيدات فعالة في مكافحة الآفات وذات تاثير قليل او معدوم على البيئة ونتيجة لذلك انتجت انواع كثيرة من المبيدات منها ما هو مشتق من مواد طبيعية [27] ومنها ما هو مصنع [40], ولكن مع ذلك فانه لم يتم ايجاد مبيد فعال له تاثير فقط على الافة المخصص لها. اضافة الى ذلك فقد وجدت الكثير من الدراسات ان تأثيرات المبيدات كانت متفاوتة على الاحياء وبحسب نوع المبيد الذي تتعرض له, اذ ان بعض المبيدات الفطرية اختزلت مجتمعات البكتريا المثبتهللنايتروجين بينما المبيدات الحشرية كانت تقتلها بالكامل كما في دراسة Sudhakar وجماعته (2000) , بينما في دراسة Ortolaniوجماعته (2004) كانت المبيدات الفطرية تتسبب بقتل بعض انواع الاحياء مثل الرخويات كالقواقع, اما دراسة Johnsonوجماعته (2010) فقد وجد ان كل من مبيدات الاعشاب والفطريات والحشرات المستخدمة في الدراسة كان لها تاثير مميت على نحل العسل *Apismellifera*, ومع ذلك فقد اتفقت الكثير من الدراسات على ان وجود هذه المبيدات بكل انواعها في البيئة وان كان وجودها قصير الا ان لها تاثير كبير في الاحياء التي تكون بتماس مباشر معها او احيانا بتماس غير مباشرة [3 ;33]

المبيدات الفطرية من الادوات المهمة التي تستخدم في السيطرة على العديد من الامراض النباتية وعلى عكس المبيدات العشبية والحشرية فانها لا تقتل الاعشاب او الحشرات بل تستخدم في حماية النباتات من الاصابات الفطرية وعادة يتم رشها قبل اصابة النباتات [25]كنوع من الوقاية مما تجعل من المبيد الفطري اكثر فعالية في المكافحة. ان المعاملة بمثل هذه المبيدات يكون مؤقت بحكم الظروف الجوية المحيطة بالنبات او عمليات الغسل[26] التي تعمل على ازالته من النبات ليجد طريقة فيما بعد الى البيئة الى ان يتحلل ولذلك ولحين وصوله الى تلك المرحلة فانه يؤثر في البيئةوالاحياء التي يمكن ان تتواجد فيها.

بكتريا *E. coli*هي من البكتريا التي يمكن ان تتواجد في البيئة بصورة مستمرة كنتيجة لمعاملة الاراضي الزراعية بالاسمدة العضوية من مصادر طبيعية [22; 20 ;4]او كنتيجة للنشاطات البشرية التي يمكن ان توصلها الى البيئة المائية وبيئة اليابس [7 ;18]على حد سواء, وعليه ولكون ان هذه البكتريا يمكن ان تكون ممرضة للكائنات الحية ومنها الانسان[17]لذا ارتأت هذه الدراسة معرفة تاثير نوع من انواع المبيدات الفطرية على هذه البكتريا. انالمبيد المستخدم في هذه الدراسة هو مبيدTM (Thiophanate-Methyl) والمعروف تجاريابالتوبسان (Topsin) وهو من مجموعة benzimidazole وهو مبيد فطري نظامي [44] يستخدم لحماية ووقاية اشجار وشجيرات وجذور العديد من المحاصيل من العديد من الفطريات الممرضة , كما انه يستخدم في حماية الجروح النباتية الناتجة من عملية التطعيم [2].

المواد وطرق العمل :-

اولا: تحضير المبيد الفطري

حضر المبيد الفطري Thiophanate-MethylI بثلاث تراكيز وهي (0.05 , 0.005 , 0.0005) ملغم/ لتر من محلول قياسي محضر سابقا ذو تركيز 0.5 ملغم/ لتر باستخدام قانون التخفيف لغرض معرفة تأثير المبيد بهذه التراكيز على نمو بكتريا *E. coli* وذلك عبر سلسلة من فترات الحضانة (خمسة مراحل) في انابيب اختبار حاوية على وسط اللاكتوز Lactose broth كل واحدة منها مزج فيها تركيز معين من المبيد مع الوسط الزرعي المستخدم(بعد اضافة 1 مل من انبوبة التنشيط التي ظهر فيها الزرع). بعدهاحضنت الانابيب لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 م^{o}بخمسة مكررات, ثم زرعت محتويات الانابيب الموجبة على وسط ماكونكي غير المعامل بالمبيد بطريقة صبالأطباق[13] ولكل تركيز.

ثانيا: حساب اعداد البكتريا

نشطت البكتريا المستخدمة في التجربة في وسط الغراء المغذي Nutrient broth بعد ان عزلت من رواسبنهر الحلة وشخصت باستخدام وسط زرعي اختياري هو وسط Eosin Methylene Blue Agar (EMB),كما اتبعت الاجراءات المستخدمة لمنظمة الغذاء والدواء في عزل وتشخيص هذه البكتريا [12; 13]. استخدمت طريقة صب الأطباق على وسط زرعي اختياري هو MacConkeyAgar[42; 13] في معرفة أعداد مستعمرات هذه البكتريا وذلك بعد ان تركت لتتصلب وحضنت مقلوبة بدرجة حرارة 37 م^{o}لمدة 48 ساعة, اما بالنسبة لعينة السيطرة فقد استعمل ماء مقطر في تحضير الوسط الزرعي في انابيب الاختبار والاطباق, بعدها تم قراءة انابيب السيطرة وعدت المستعمرات البكتريا المدروسة النامية على وسط ماكونكي غير المعامل بالمبيد.

التحليل الاحصائي

استخدم التصميم التام التعشية (CRD) وحللت النتائج احصائيا باستخدام اقل فرق معنوي (LSD) بعد ان خضعت لتحليل التباين وايجاد معامل الارتباط[43].

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج وجود تباين في نمو المستعمرات البكتيرية النامية على وسط ماكونكيبين التراكيز الثلاثة المدروسة, وان تركيز 0.05 ملغم /لتر كان الاكثر تأثيرا في نمو المستعمرات البكتيرية على الوسط الزرعي اذ كانت اعداد المستعمرات فيه قليلة تتراوح ما بين (137-232) مستعمرة/مل (جدول 1), وبنسبة نمو تتراوح ما بين (17.4129.71-)% (جدول 2). كما اظهرت النتائج ان قطر بعض المستعمرات كان اكبر من قطر المستعمرات الطبيعية في عينة السيطرة اضافة الى ان هنالك بعض المستعمرات لم تكن حادة الاستدارة والتي ظهرت في مستعمرات الخطوة الثانية والثالثة والذي قد يعود الى حدوث طفرات في بعض الخلايا البكتيرية [41] كنوع للتكيف مع وجود المبيد, او ان المبيد سبب في عرقلة تكوين بعض المركبات المهمة في عملية انقسام الخلية [9], كما ان المبيد قد يسبب في حدوث انتخاب لسلالات معينة [4]تؤدي الى نمو مستعمرات متباينة مما قد يفسر التباين في حجم المستعمرات النامية والتي تختلف باختلاف استجابة الخلايا البكتيرية للظروف الخارجية او اي مادة منبهه بحسب رأي بعض الباحثين [41 ;39]. كما اشارت النتائج الى ان اعداد الانابيب الحاوية على المبيد والتي اظهرت نمو كانت تتراوح ما بين (2- 3) انبوبة بعكورة قليلة (جدول 3) وقد يعود نمو هذه البكتريا الى اختلافات فردية بين الخلايا البكتيرية والتي قد تعود مثلا الى اختلافات في السلالة البكتيرية [35], او ان تلك البكتريا امتلكت ربما تركيب جيني مميز قد مكنها من الاستمرار [6]. ان نمو المستعمرات على وسط ماكونكي غير المعامل قد يعود سببه الى قدرة بعض الخلايا البكتيرية على التكيف والاستمرار بالنمو على اوساط زرعية مختلفة بعد زوال التراكيز العالية للمؤثر الذي يمكن ان يكون سام في حالة عدم قدرة البكتريا على التكيف معه [33]. كما اظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين معدلات اعداد المستعمرات البكتيرية النامية على اوساط زرعية غير معاملة بالمبيد بعد ان زرعت من اوساط زرعية معاملة بالمبيد ولمدة خمسة مراحل نمو مما يشير الى تاثير المبيد على نمو المستعمرات البكتيرية عند وجوده في الوسط.

اظهرت النتائج ان معدلات اعداد المستعمرات البكتيرية في تركيز 0.005 ملغم/لتر من المبيد كانت تتراوح ما بين (462-538) مستعمره/مل (جدول 1) وبنسبة نمو تتراوح ما بين (60.16-65.44)% (جدول 2), وان اعدادها كانت قليلة مقارنة بالسيطرة, والذي قد يعود الى عدم قدرة بعض الخلايا البكتيرية على الانقسام بسبب وجود تاثير للمبيد [15]. اما مستعمراتها فقد كانت كبيرة ومتداخلة فيما بينها تقريبا وذات احجام غير متساوية ولكنها اقل حجما مقارنة بالتي ظهرت في تركيز مبيد 0.05 ملغم/لتر والذي بحسب دراسة [31]قد يعود السبب الى حدوث تغييرات داخل الخلايا البكتيرية كمحاولة لهذه البكتريا من التأقلم مع وجود المبيد كإنتاج مركبات تعمل على احتجاز المبيد وتراكمه داخل الخلايا لكون ان تراكيزه تسمح بدخوله الى البكتيريا وعدم قتل البكتريا مباشرة, او ان المبيد قد سبب لها اضرار في التركيب الوراثي او السايتوبلازميادت الى حدوث مثل هذه التغييرات [9] مما ادى الى نمو مثل هذه المستعمرات. كما لوحظ ان احجام هذه المستعمرات كانت تصغر اكثر ويزداد عددها مع كل مرحلة من الزرع مما يقود الى الاعتقاد الى انها قد تكون نوع من انواع المقاومة قد اوجدتها الخلايا البكتيرية لغرض

الاستمرار في الوجود, اذ ان الخلايا البكتيرية ربما تكون قد عملت على اصلاح الخلل لاستمرار نوعها بسبب مخزونها الجيني الواسع والقادر على اصلاح نفسه [29; 34]. ان اغلب الدراسات تشير الى ان التركيب الجيني للخلايا البكتيرية هو مفتاح استمرارها [14 ;10] وان ما يحدث من تغييرات فيها يعود اليه. كما اظهرت النتائج ان انابيب الاختبار المدروسة قد اظهرت نموا مما يعني ان اغلب الخلايا البكتيرية قد تمكنت من توفير طرق للنمو في هذا التركيز من المبيد والذي قد يعود الى سرعة استجابة البكتريا للظروف المحيطة بها والتي تكاد تكون مسيطر عليها بسبب تركيز المبيد [4]او ربما قدرتها على تفكيك المبيد كانت تتناسب تقريبا مع تركيزه في الوسط.

اشارت النتائج الموضحة في (جدول 1) الى ان اعداد المستعمرات البكتيرية في تركيز 0.0005 ملغم/لتر من المبيد كانت تتراوح ما بين (605-657) مستعمرة/مل وهي اعلى ما سجل من اعداد مستعمرات مقارنة بتركيز 0.05 و 0.005 ملغم/لتر, اذ اظهرت النتائج ان اعدادها كانت قليلة مقارنة بالسيطرة. كما امتازت هذه المستعمرات بصغر حجمها وانتشارها المنتظم مقارنة بتركيز 0.005 ملغم/لتر, اذ ان مستعمراتها تكاد تكون متناسقة في حجمها الصغير وقد يعود السبب الى ان هذا التركيز من المبيد قد يكون قد حث الخلايا البكتيرية لإحداث تغييرات منتظمة داخلها [30; 41]عندما لم تقتلها من المرة الأولى , وان التركيز الذي تواجد به المبيد كان مناسبا للبكتريا لتتجنبه او لتطور ميكانيكيات مناسبة لها للتقليل من تاثيراته [9; 16]مما يكون قد اثر على حجم المستعمرات النامية, كما وان التركيز القليل من المبيد يمكن ان يكون مناسبا للعمل على اقصاء بعض الخلايا البكتيرية وايجاد خلايا ذات تركيب جيني مناسب [33]. كما لوحظ ان اعداد المستعمرات كان يزداد في كل مرحلة بحسب ما اشارت اليه النتائج (جدول 1) مع بقاء حجم مستعمراتها اقل حجما من عينة السيطرة ولكن اكبر حجما مما كانت عليه في اول مرحلة, مما يعني ان البكتريا ربما تكون قد تأقلمت مع وجود المبيد مع العلم ان بعض الدراسات كدراسة Persson(2000) اشارت الى ان التركيز القليل للمبيد قد يكون له تاثير ايجابي على البكتريا من خلال استخدامه كمصدر غذائي مهم بعد تحطيمه وهو بتراكيز قليلة من قبل البكتريا. كما اظهرت النتائج ان انابيب الاختبار المزروعة بالبكتريا كانت تظهر نمو في كل المراحل وبشكل كثيف جدا مقارنة بتركيز 0.005 ملغم /لتر, وقد يعود السبب الى ان هذا التركيز للمبيد مكن البكتريا من تطوير طرق لتجنب هلاكها كتحطيم المبيد او منع دخوله [21 ;8] او تغيير التردد الجيني والذي في بعض الدراسات يمكن ان يؤدي الى تكوين سلالات مميتة [11] او ما يعرف بالطفرة التطورية او زيادة التنوع البكتيري [23 ;19]. ان ظهور نمو في انابيب الاختبار جميعها (جدول 3) بشكل كثيف وقلة نمو المستعمرات على وسط ماكونكي قد يعود الى وجود اختلافات في قابلية البكتريا في النمو على كلا الوسطين, او ان وسط ماكونكي يحوي مادة يمكن ان تتداخل او تتاثر مع وجود المبيد في داخل البكتريا مما قد يسبب من عرقلة في نمو البكتريا في الاوساط الزرعية[5].

اظهرت النتائج (شكل 1) ان التركيز القاتل لنصف اعداد المستعمرات البكتيرية LC_{50} كان (0.0099) ملغم/لتر والذي بعده يزداد معدل هلاك البكتريا كنتيجة ربما لعدم قدرتها على التكيف مع التراكيز العالية للمبيد والذي بحسب بعض الدراسات يمكن ان يؤدي الى ظهور سلالات مقاومة لأنواع مختلفة من المبيدات او اي مواد اخرى مما يصعب من عملية التعامل مع مثل هذه البكتريا [6 ;35] وخاصه انها تعد من الخلايا البكتيرية التي لها تاثير مهم على صحة الاحياء, كما انها في بعض الدراسات قد تعمل على زيادة مقاومتها لبعض المضادات الحيوية [28 ;1]. اشارت النتائج ايضا الى وجود معامل ارتباط سلبي بين تراكيز المبيد المستخدم ومعدلات نمو المستعمرات البكتيرية (جدول 1 و3) مما قد يؤدي الى انتقاء خاص للسلالات البكتيرية الحاملة لجينات المقاومة وبالتالي انتشارها بين الخلايا البكتيرية وتكوين فيما بعد مستعمرات *E. coli* لها القدرة على مقاومة العديد من المواد الكيمياوية سواء كانت مضادات حيوية او مبيدات حتى بعد زوال المؤثر كجزء من التركيب الجيني [32; 23].

جدول (1) معدلات اعداد مستعمرات بكتريا *E. coli* النامية على وسط ماكونكي (مستعمرة/مل) لسلسلة من خمسة مراحل متعاقبة في زراعة البكتريا بعد 48 ساعة لكل مرحلة.

التركيز (ملغم /لتر)	معدلات اعداد المستعمرات النامية (مستعمرة/مل)					المعدل
	المرحلة الأولى	المرحلة الثانية	المرحلة الثالثة	المرحلة الرابعة	المرحلة الخامسة	
0	846	787	768	781	791	794.6
0.05	214	137	162	232	194	187.8
0.005	538	515	462	489	510	502.8
0.0005	605	617	629	617	657	625

LSD= 4.856, r= -0.027

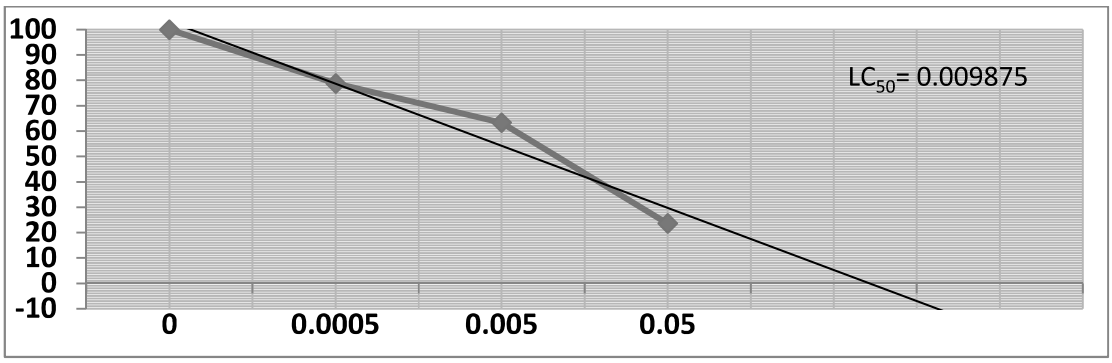
جدول (2) النسبة المئوية لمعدلات اعداد مستعمرات بكتريا *E. coli* النامية على وسط ماكونكي (مستعمرة /مل) لسلسلة من خمسة مراحل متعاقبة في زراعة البكتريا بعد 48 ساعة لكل مرحلة.

التركيز (ملغم /لتر)	نسبة النمو (%)					المعدل
	المرحلة الأولى	المرحلة الثانية	المرحلة الثالثة	المرحلة الرابعة	المرحلة الخامسة	
0.05	25.29	17.41	21.09	29.71	24.53	23.606
0.005	63.59	65.44	60.16	62.61	64.48	63.256
0.0005	71.51	78.39	81.9	79.00	83.06	78.772

جدول (3) عدد انابيب الاختبار الحاوية على المبيد الفطري والتي ظهر فيها نمو لبكتريا *E. coli* لسلسلة من خمسة مراحل متعاقبة في زراعة البكتريا بعد 48 ساعة لكل مرحلة.

التركيز (ملغم /لتر)	عدد الانابيب التي ظهر فيها النمو في كل مرحلة					المعدل
	المرحلة الأولى	المرحلة الثانية	المرحلة الثالثة	المرحلة الرابعة	المرحلة الخامسة	
0	5	5	5	5	5	5
0.05	3	3	3	2	2	2.6
0.005	2	5	2	5	5	3.8
0.0005	5	5	5	5	5	5

r= -0.069



شكل (1) قيمة التركيز القاتل لنصف اعداد المستعمرات من المبيد الفطري لبكتريا *E. coli* النامية على وسط ماكونكي (مستعمرة/مل).

Refferences

1. Akond, M. A.; Alam, S.; Hassan, S. M. R. and Shirin, M. (2009). Antibiotic Resistance of *Escherichia Coli* Isolated From Poultry and Poultry Environment of Bangladesh. Internet Journal of Food Safety, Vol.11, p. 19-23.
2. APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority). (2010).Thiophanate-methyl preliminary review findings report: The reconsideration of the active constituent thiophanate-methyl, registration of products containing thiophanate-methyl and approvals of their associated labels. ISBN: 978-0-646-54058-0.
3. Bunemann, E. K. and McNeill, A. (2004). Impact of fertilisers on soil biota. In "Soil biology in agriculture". Proceedings of a workshop on current research into soil biology in agriculture. Ed. R. Lines-Kelly. Tamworth, NSW Department of Primary Industries, pp: 64-71.
4. Byappanahalli, M. N.; Whitman, R. L.; Shively, D. A.; Sadowsky, M. J. and Ishii, S. (2006). Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. Environmental Microbiology, 8(3): 504–513.
5. Byappanahalli, M.; Fowler, M.; Shively, D. and Whitman, R. (2003). Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a 14idwestern coastal stream. Appl. Environ.Microbiol., 69: 4549–4555.
6. Byappanahalli, M.N. (2000). Assessing the persistence and multiplication of fecal indicator bacteria in Hawaii's soil environment. PhD Thesis. Honolulu, HI, USA: University of Hawaii at Manoa.
7. Campbell, G. R.; Prosser, J.; Glover, A. and Killham, K. (2001). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology, 91: 1004-1010.
8. Chanika, E.; Georgiadou, D.; Soueref, E.; Karas, P.; Karanasios, E.; Tsiropoulos, N. G.; Tzortzakakis, E. A. and Karpouzas, D. G. (2011). Isolation of soil bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticides. Bioresource Technology, Volume 102, Issue 3, Pages: 3184–3192.
9. Chart, H.; Perry, N. T. and Jenkins, C. (2004). The expression of an R3 lipopolysaccharide-core by pathotypes of Escherichia coli. Journal of Applied Microbiology, 96: 982–986.
10. Chaudhuri, R. R. and Henderson, I. R. (2012). The evolution of the Escherichia coli phylogeny. Infect Genet Evol.,12(2): 214-26.
11. Duriez, P.; Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Bingen, E.; Chaventré, A.; Elion, J.; Picard, B. and Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. Microbiology, 147(Pt 6):1671-6.
12. FDA (US. Food and Drug Administration). (2002). Isolation and

(2010). Structural and genetic evidence for the close relationship between Escherichia coli O71 and Salmonella enterica O28O-antigens. FEMS Immunol Med Microbiol., 59: 161–169.

22. Ibekwe, A. M.; Grieve, C. M. and Ching-Hong, Y. (2007). Survival of Escherichia coli O157:H7 in soil and on lettuce after soil fumigatiom. Can. J. Microbiol., 53: 623-635.

23. Johnsen, K.; Jacobsen, C. S.; Torsvik, V. and Sørensen, J. (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. Biology and Fertility of Soils, Volume 33, Issue 6, pp: 443-453.
24. Johnson, R. M.; Dahlgren, L.; Siegfried, B. D. and Ellis, M. D. (2010). Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apismellifera*) . PloS ONE Journal, 8(1): 54092-54092.
25. Kibria, G.; Haroon, Y. A. K.; Nugegoda, D. and Rose, G. (2010). Climate change and chemicals. Environmental and biological aspects. New India Publishing Agency, PitamPura, New Delhi.
26. Komarek, M.; Cadkova, E.; Chrastny, V.; Bordas, F. and Bollinger, J. C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International,* 36: 138 – 151.
27. Koul, O.; Walia, S. and Dhaliwal, G. S. (2008). Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. Biopestic. Int.4(1): 63–84.
28. Kumar, H. S.; Parvathi, A.; Karunasagar, I. and Karunasagar, I. (2005). Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Volume 21, Issue 5, pp: 619-623.
29. Lee, H.; Popodi, E.; Tang, H. and Foster, P. L. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome enumeration of *Enterobactersakazakii* from dehydrated powdered infant formula. Available from serial online.
13. FDA (US. Food and Drug Administration). (2005). Bacteriological Analytical Manual. 18th Ed., AOAC, Washington, DC.
14. Gordon, D. M.; Bauer, S.and Johnson, J.R. (2002). The genetic structure of Escherichia coli populations in primary and secondary habitats. Microbiology, 148(Pt 5):1513-22.
15. Guven, K.;Yolcu, M.; Gul-Guven, R.; Erdogan, S. and De Pomerai, D. (2005). The effects of organic pesticides on inner membrane permeability in *Escherichia coli* ML35. Cell Biology and Toxicology, Volume 21, Issue 2, pp: 73-81.
16. Guyard C.; Cailliez, J. C.; Tissier, J. P.; Dei-Cas, E. and Mercenie, A. (2002). Cloning and characterization of *WMSU1*, a *Williopsissaturnus*var. *mrakii*gene encoding a new yeast SUN protein involved in the cell wall structure. Yeast, 19: 1127–1138.
17. Guzman, J. A., Fox, G.A. and Payne, J. B. (2010). Surface runoff transport of Escherichia coli after poultry litter application on pastureland. Trans. ASABE, 53: 779-786.

18. Hardina, C. M. and Fujioka, R. S. (2006). Soil: The environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's streams. Environmental Toxicology and Water Quality, Volume 6, Issue 2, pages: 185–195.
19. Higgins, J. andHohn, C. (2008). Effects of prevalent freshwater chemical contaminants on in vitro growth of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia.* Environmental Pollution, Volume 152, Issue 2,Pages: 259–266.
20. Hill, D. D.; Owens, W. E. and Tchounwou, P. B. (2006).The Impact of Rainfall on Fecal Coliform Bacteria in Bayou Dorcheat (North Louisiana). Int. J. Environ. Res. Public Health, 3(1): 114-117.
21. Hu, B.; Perepelov, A. V.;Liu, B.; Shevelev, S. D.; Guo, D.; Senchenkova, S. N.; Shashkov, A. S.; Feng, L.; Knirel, Y. A. and Wang, L.

sequencing. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 9;109(41): E2774-83.

30. Li, Q.; Chen, R.; Li, W.;Qiao, C. L. and Wu, Y. J. (2007). A genetically engineered *Escherichia coli*, expressing the fusion protein of green fluorescent protein and carboxylesterase B1, can be easily detected in the environment following degradation of pesticide residues. Biotechnology Letters, Volume 29, Issue 9, pp: 1357-1362.

31. Liu, J. (2011). Filtering out pesticides with E. coli(Genetically modified bacteria filters out toxic vapors).Int. J. Environ. Pollut., 45: 3-14.
32. McLellan, S. L. (2004). Genetic diversity of Escherichia coli isolated from urban rivers and beach water. Appl. Environ.Microbiol., 70(8): 4658-65.
33. Naphade, S. R.; Durve, A. A.; Bhot, M.; Varghese, J. and Chandra, N. (2012). Isolation, characterization and identification of pesticide tolerating bacteria from garden soil. European Journal of Experimental Biology, 2 (5):1943-1951.
34. Ochman, H. (2003). Neutral Mutations and Neutral Substitutions in Bacterial Genomes. Mol. Biol. Evol., 20(12): 2091–2096.
35. Oh, S.; Buddenborg, S.; Yoder-Himes, D. R.; Tiedje, J. M. and Konstantinidis, K. T. (2012). Genomic diversity of Escherichia isolates from diverse habitats. PloS One, 7(10): e47005.
36. Ortolani, E. L.; Antonelli, A. C. andSarkis, J. E. S. (2004). Acute sheep poisoning from a copper sulphate footbath. Veterinary and Human Toxicology,46, 6, 315-318, 0145-6296.
37. Persson, M. (2000). Effects of modern pesticides on bacterial activity and denitrification in lake sediment. Thesis 20 p., Department of Environmental Assessment, Swedish University of Agricultural Sciences.

38. Sudhakar, P.; Chaitopadhyay, G. N.; Gangwar, S. K.; Ghosh, J. K. and Saratchandra, B. (2000). Effect of common pesticides on nitrogen fixing bacteria of mulberry *(Morus alba* L.). Indian J. of Agric. Res., 34 (4) : 211-216.

39. Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B. and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal Escherichia coli. Nat. Rev.Microbiol., 8(3): 207-17.
40. Tomizawa, M. and Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. Journals of Pharmacology and Toxicology, Volume 45, pp: 247-268.
41. Walk, S. T.; Alm, E. W.; Calhoun, L. M.; Mladonicky, J. M. and Whittam, T. S. (2007). Genetic diversity and population structure of Escherichia coli isolated from freshwater beaches. Environ.Microbiol., 9(9): 2274-88.
42. Yagoub, S. O. (2009). Isolation of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. From raw fish sold in fish market in Khartoum state. Journal of Bacteriology Research, Vol. 1(7), pp: 085-088.

المصادر العربية

43- النعيمي, محمد عبد العال و طعمة, حسن ياسين. (2008). الاحصاء التطبيقي. الطبعة الأولى, دار وائل للنشر والتوزيع, عمان, الاردن.

44- الوكيل, محمد عبد الرحمن. (2010). اهم الامراض التي تصيب امراض الزينة. مجلة علوم البيئة والتكنولوجيا, كلية الزراعة , جامعة المنصورة, ص:1-13

Study the effect of Topsin (Thiophanate-Methyl)fungicide on *E. coli* bacteria

Receved :21/10/2013 **Accepted : 17/2/2014**

May Hameed Mohammad Aldehamee
College of Environmental Sciences- AL-Qasim Green University

Abstract

This study aimed to know the effect of three concentration of Topsin fungicide (0.05, 0.005, 0.0005) mg/l on *E. coli* colony isolated from sediment of Euphrates river and find if possible half lethal LC_{50} from pesticide to bacteria. The results appeared that different concentrations have different effects on bacterial colonies growth which were average (137-232) colony/ml, (462-538) colony/ml and (605-657) colony/ml with percentage (17.41-29.71)%, (60.16-65.44)% and (71.51-83.06)% to three concentration respectively. The result pointed to the value of LC_{50} was 0.0099 mg/l. Also test tubes that have pesticide showed growth, which pointed to bacteria adaption for these concentration. The results pointed to a significant differentiation between growth average in probability at level (0.05) and reverse correlation coefficient between concentration and average of growth.

Key worlds: Fungicides , topsin ,Bacteria Colony