استخدام العزلة *Azotobacter vinelandii* المحورة وراثياً مع تحضير سماد عضوي حيوي من مواد محلية واختباره حيويا

ادهام علي العسافي [*] , احمد محمد العيثاوي [*] و ظافر فخري الراوي [**]
[*] كلية العلوم/ جامعة الانبار
[**] كلية التربية/ جامعة الانبار

الخلاصة

من الصعب أن نجد نوع من العزلات الميكروبية التي تتمكن من توفير جميع احتياجات النبات ، لذلك يتطلب استعمال أكثر من نوع من هذه العزلات لتوفير تلك الاحتياجات, وان استعمال خليط من العزلات المثبتة للنيتروجين والمذيبة للفوسفات في مزيج لقاح واحد أدى إلى خفض فعاليتهما ،لذلك جاءت فكرت التجربة باستعمال العزلة *Azotobacter vinelandii* المحورة وراثياً لامتلاك صفة إذابة الفوسفات إضافة لقدرتها اصلاً على تثبيت النيتروجين، وتحضير خلائط من المواد المتوفرة محليا لإيجاد Compos ملائم لتحسين ظروف نمو النبات وصفات التربة،اختبرت قدرة العزلة على تثبيت النتروجين ، وإذابة مركبات الفوسفات من مركبات الفوسفات السوبر فوسفات (T-CaP) أو الصخر الفوسفاتي (RP)، وقدرتها على إنتاج مركبات Sidrophores ومركبات الاندول .حضر الخليط بمزج مكونات مختلفة النوع والكمية من مواد محلية نباتية ومخلفات حيوانية متوفرة محليا ومواد معدنية طبيعية شملت مادة عضوية لمخلفات الأبقار Organic mater (C/N=27/1) والمادة الجافة لنبات الشمبلان المائي *Ceritophylium demeresm* ونوعين من الصخر الفوسفاتي ، الابتايت الطبيعي (RP-N) (8%P) والصخر الفوسفاتي الابتايت المكلسن (RP-C) (12%P)،وبهدف تحويل مكونات الخليط إلى مواد أكثر فائدة استعمل لقاح بكتريا *A.vinelondii* المحورة بتخمير المكونات لمدد زمنية 10 و20 و 30 يوم قبل إضافتها للتربة بشكل مخمر وغير مخمر في تغير بعض صفات التربة، استعملت 4 خلطات منتخبة مخمرة وغير مخمرة وخلطت بنسبة1% من التربة المستعملة. واستعلت2 من الخلائط المنتخبة بصورتها مخمره وغير مخمره بنسبة 1% مقارنة باستعمال سماد TSP وسماد اليوريا في تجربة سنادين بزراعة بذور نبات اللوبيا *Vicia catiang*.

أشارت النتائج أن العزلة تمكنت من تثبيت النتروجين بمعدل 2.8 ملغمN\ لتر وبكثافة ميكروبية 6.2×10^8 Cfu/g ، وأذابت مركبات الفوسفات بمعدل قطر بلغ 10.6 ملم مع مصدر الفوسفات من TCaP وأظهرت قابليتها على إنتاج مركبات الاندول بمعدل 11.6 ملغم\لتر وسط، وجد أن الخلطة المكونة 300 و700 غم من RP-N وخليط OM تميزت بأفضل محتوى من مركبات الفوسفات الذائبة71.2%من الفوسفور الكلي وكمية النتروجين الكلي 19.6غم N / كغم خلطة ، وأصبح أفضل معدل لنسبة C/N في الخلطات بعد التخمير9:1،وحقق استعمال الصخر الفوسفاتي الطبيعي أفضل نسبة إذابة ،وازدادت كمية النتروجين مع استعمال مخلفات مسحوق نبات الشمبلان.وأدى استعمال الخلطات المخمرة إلى تحسن صفات التربة بعد30 يوم من الحضن بمعدل محتوى من الفوسفور الذائب 30 ملغمP / كغم تربة و 150 ملغمN / كغم تربة على التوالي، وتفوقت سرعة الإنبات مع معاملتي الخلطتين المخمرة وأعطت النباتات المعاملة أفضل معدل لها في طول النبات والجذور بلغت 171و18.8ملم على التوالي وبلغ معدل للوزن الجاف 20.6 و190 ملغم / نبات للجذور والمجموع الخضري

على التوالي ، وحققت المعاملات أفضل إصابة لبكتريا الرايزوبيا المتوطنة في التربة اصلاً لجذور النبات بمعدل عدد 22عقدة بنسبة 68% عقده فعالة، مع وصول نسبة البروتين في الوزن الجاف للنبات بمعدل 17.9%،وحسن محتوى التربة من الفوسفور الجاهز والنيتروجين الكلي بمعدل20.5و130 ملغم \ كغم تربة على التوالي. وتؤكد هذه النتائج ان المواد المخمرة توفر مصادر كاربونية متنوعة لنمو ونشاط الأحياء المجهرية مما زاد من نشاط العزلة *A.vinlendii* في تثبيت النتروجين وإذابة مركبات الفوسفات وإنتاج مركبات السايدروفور ومنظمات النمو الأمر انعكس على تحسين صفات التربة و تهيئة المواد المغذية للنبات .

The Use of The Genetically Modified of *Azotobacter vinelandii* In Isolate with the preparation of The Bio-organic Fertilizer From Local Materials and then Bio-testing It

A. A. A. Al-Assafii[*] , A. M. Turky[*] , D. F. Al-Rawi [**]

[*] College of scenes\ University of Al-Anbar
[**] College of Education\ University of Al-Anbar

Abstract

It is difficult to find an isolate that can give all plant needs , therefore it requires more than one isolate to give the various needs of the plant . The use of a mixture of isolates that can fix nitrogen and dissolve phosphate in a certain vaccine results decrease in their activity ,therefore the idea of using the isolate , *Azotobacter_vinelandii* which is modified to dissolve phosphate and fix nitrogen in the preparation of local materials to make a compose is suitably fit to enhance the conditions of plant growth and soil features. The isolate ability on fixing nitrogen and dissolving super phosphate (T-CaP) or phosphate rocks (RP) compounds was tested by their abilities to give sidrophores and indol compounds .A mixture of various qualitative and quantitative components of local plant and animal , other natural minerals consisted of cow organic matter (C/N = 27/1) dried materials of the plant , *Ceritophylium demeresm* ,two other phosphate rocks , natural apatite (Rp-N)(%8P) and calcinated phosphate apatite (RP-C) (%12P) was prepared .The aim was to change these components into a more useful mixture .A bacterial vaccine, *A. vinelandii* that was modified by fermintating the mentioned components on different time intervals 10 , 20 and 30 days before one day of their addition to the soil in a fermented and unfermented nature to change soil characters .Four fermented and unfermented mixtures were used mixed 1% of the used soil .Two fermented and non-fermented mixtures with 1% were selected as compared to the use of TSP and Urea fertilizer in pot experiment planted with *Vicia catiang* .

Results indicated that the used isolate was able to fix nitrogen with an average of 2.8 mg/L with a microbial density of 6.2×10^8 Cfu/g indol ,dissolved phosphate compounds (TCaP) with an average of 10.6 mg/L and produced indol components with and an average of 11.6 mg/L . The mixtures of 300 and 700 mg of RP-N and OM was found to the best in containing the dissolved phosphate compound , 71.2% from the total phosphorus and the total nitrogen 19.6 gm N/kg mixture which was the best average for the C/N in the mixtures after fermentation 1:9 . The use of the natural phosphate rocks gave the best dissolving results and nitrogen quantity was increased with the use of *C. demeresm* plant wastes .The use of the fermented mixtures enhanced soil texture after 30 days of incubation with an average of 30 mg of dissolved phosphorus /kg soil and 150 mg nitrogen,also rapid germination were achieved with an

average of 71 and 20.2 for plant and root length respectively The average root and vegetative dry weights was 160 and 178 g/plant respectively .Those treatments showed a better rhizopeal bacterial infection for plant roots with an average of 22 effective knots with 68% with protein percent 17.9 % in dried weight of the plant . Also ,they enhanced the soil content with viable phosphorus and nitrogen with an average of 20.5 and 130 mg/kg soil respectively .These results assure the existence of various carbon resources for microbial growth and activity resulted from the fermented mixtures which , in the mean time increased the fixation of nitrogen and dissolving phosphate compounds and finally producing Sidrophores , growth regulators , enhancing soil texture and viability of nutrients to the plants .

المقدمة

تتطلب عملية إعداد اللقاحات الميكروبية وتطبيعها كمخصبات حيوية في التربة عمليات مهمة ومعقدة، علاوة على توفير بعض المستلزمات التي تمكنها من أداء فعالياتها في الموقع وتتباين احتياجات النبات من العناصر الغذائية ومن الصعب أن نجد نوع من العزلات تتمكن من توفير جميع احتياجات النبات ، لذلك يتطلب استعمال أكثر من نوع من العزلات لتوفير الاحتياجات المتنوعة للنبات مما يعقد عملية تحضير اللقاح البكتيري واستعماله وذلك لما يصاحبها من عملية التلوث والتضاد الميكروبي التي تؤدي أحيانا إلى خفض كفاءة العزلة عند استعمالها كخليط مع عزلات أخرى .وحصل (1) على مجموعة من العزلات البكتيرية قادرة على تحرير الفسفور من الصخور الفوسفاتية كان اغلبها يعود إلى أجناس *Enterobacter* و *Pseudomonas* ، ولاحظ (2) أن البكتريا المذيبة للفوسفات قد حررت كميات كبيرة من الفوسفور الذائب وبواقع 185 ملغم / لتر من الصخر الفوسفاتي وسماد السوبر فوسفات الذي كان يعاني تثبيتاً بواسطة كاربونات الكالسيوم في الترب القاعدية وذكروا أن البكتريا المذيبة للفوسفات قد أنتجت كميات جيدة من منظمات النمو IAA و GA3 وإنزيم الفوسفاتيز .وفي دراسة أجراها (3) باستعمال6 عزلات بكتيرية مذيبة للفوسفات ومنتجة للاندول ،لاحظوا أن جميع العزلات التي لقحت بها بذور الشعير أدت إلى زيادة في نمو النبات وجاهزية الفسفور في التربة والفسفور الماخوذ من قبل النبات ، وزيادة الكثافة الميكروبية مع زيادة ملحوظة في وزن الجذور ووزن المجموع الخضري وأوصوا باستخدام هذه العزلات كلقاح حيوي في الزراعة عموماً.

أما (4) فقد لاحظا أن بكتريا *Pseudomonas* عملت على إذابة مركبات الفسوسفات بمعدل 206 و 502 ملغم P / لتر من المصدرين هايدروكسي ابتايت و فوسفات الكالسيوم على التوالي مما أدى إلى زيادة الحاصل والفسفور المأخوذ من قبل النبات، وانتخب(5) أربعة عزلات بكتيرية تميزت بكفاءة عالية في إذابة مركبات الفوسفات وذكر أن التباين في القدرة على إذابة مركبات الفوسفات يعود إلى مدى قدرتها على إنتاج الأحماض العضوية وطبيعة ونوع الحامض العضوي المنتج . كما حصل (6) على تثبيت للنتروجين تراوح بين(3.2 – 16.5) ملغم N / لتر لمجموعة من عزلات من *Azotobacter* التي كانت تنتج الاندول أيضا وبتراكيز تراوحت بين (17.7 – 22.7) ملغم / لتر ، وكان هناك ترابط بين إنتاج الاندول وتثبيت النتروجين . وذكر (7) إن أعظم فائدة من استخدام اللقاح البكتيري يمكن أن تحصل مع استعمال لقاح مختلط كاستعمال لقاح يظم بكتريا مثبتة للنتروجين مع البكتريا المذيبة للفوسفات وتوفير ظروف نجاح نشاط اللقاح في البيئة كاستعمال المواد التي تضمن استمرار نشاطه مع إضافة اللقاحات بكثافة عالية لضمان الاستيطان الميكروبي، أما (8) فقد أوضحا أن عمل معقد من Rhizoenterine المحضر من البكتريا المثبتة للنتروجين مع البكتريا المذيبة للفسفور رمز له CBP (Complex bacterial preparation) والذي استعمل في تلقيح بذور الذرة قد أدى إلى تقليل نسبة

السماد المعدني بنسبة 50 % من غير حدوث أي انخفاض في الحاصل . وأشار (9) إلى أن استعمال اللقاحات الميكروبية لبكتريا *Azotobacter chroococcum* و *Azospirillum brasilense* و *Streptomyces mutabilis* بشكل مفرد أو ثنائي أو ثلاثي ، قد أدى إلى حدوث تأثيرات متبادلة في النبات والتربة فقد أدى استعمال اللقاحات بشكل مفرد إلى زيادة في تثبيت النتروجين في الوسط وإذابة مركبات الفسفور وتواجد مركبات السايدروفور وإنتاج الاندول (IAA) ولكن بكميات قليلة بينما أدى استعمال لقاحات ثنائية من *Az.chroococcum* مع *St.mutabilis* او *As.brasilense* مع *St.mutabilis* إلى تحسين قابلية العزلات في زيادة تثبيت النتروجين ، وكذلك زيادة الفسفور والمغنسيوم الذائبين ومركبات الاندول وكمية السكر المنطلقة في التربة وزيادة الكثافة الميكروبية.

في حين أدى استعمال خليط لقاح العزلتين *A.chroococcum* و *A.brasilense* إلى ظهور تضاد ميكروبي وانخفاض في الأعداد والفعاليات الميكروبية في البيئة مما اثر سلباً على نبات الحنطة الملقح بها. أما (10) فقد بينا أن عمل اللقاحات الميكروبية التي تتركز فعاليتها في المنطقة المحيطة بجذور النبات يؤدي إلى توفر حماية من التاثيرات البايلوجية للبيئة على النبات . ووجد (11) أن كثافة الرايزوبيا الفعالة تساعد على تحقيق الإصابة لجذور النبات مبكراً مما تزيد من عدد العقد الجذرية التي تكون متميزة بحجمها وفعاليتها وظهر ذلك واضحاً مع رايزوبيا فول الصويا الأمر الذي يؤدي عند عدم إضافة اللقاح أو عدم تواجد أعداد من الرايزوبيا عند الإنبات والأيام الأولى للزراعة بعدد كافي لتحقيق الإصابة يترتب على ذلك فشل تكوين العقد، وثبت أن منظمات النمو تقوم بتقليل الأثر الضار للملوحة على النبات ، إذ درس(12) تأثير استعمال بكتريا Bacillus المنتجة لمنظمات النمو تحت الملوحة على إنبات ونمو الطماطة أن نسبة الإنبات قد انخفضت من 88 الى 26 % عند زيادة تركيز المحلول الملحي من 704 إلى 39500 ملغم / لتر إلا أن إضافة العزلة وراشحها المحتوي IAA أدت إلى زيادة الإنبات بنسبة تتراوح بين(10 – 15 %) كما أدت إضافة هذه المنظمات إلى زيادة سرعة الإنبات بنسبة 31 % بعد الأسبوع الأول وبنسبة 39% بعد الأسبوع الثاني وازداد محتوى النبات من العناصر الغذائية NPK. وأكدت الدراسات أن استعمال خليط من العزلات المثبتة للنيتروجين والمذيبة للفوسفات في مزيج لقاح أدى إلى خفض فعاليتهما مقارنتا مع استعمال كل لقاح وحدة على انفراد مما يدلل على وجود تضاد ميكروبي أو منافسة مايكروبية على استعمال مصادر الكاربون في البيئة لان كلا العزلتين متباينة التغذية Heterotrophic كما أن استعمال خلائط من المواد العضوية المتوفرة والمخمرة يوفر مصادر كاربونية ذو C/N ملائم للتربة والنبات والميكروبات في التربة . لذلك جاءت التجربة باستعمال العزلة *Azotobacter.Vinlideii* المحورة وراثياً في دراسة سابقة (13) لإذابة الفوسفات فضلا عن قدرتها في تثبيت النيتروجين وتحضير خلائط من المواد المتوفرة محليا لإيجاد Compos ملائم لتحسين ظروف نمو النبات وصفات التربة .

المواد وطرائق العمل

العزلة البكتيرية:

حصل على عزلة بكتيرية محورة وراثيا تعود لجنس *Azotobacter vinelandii* من مختبرات الأحياء المجهرية لقسم علوم الحياة جامعة الانبار المعزولة من الترب الزراعية، كان قد تم نقل الجينات المسؤولة عن إنتاج المواد المذيبة لمركبات الفوسفات من عزلة *Pseudomonas aeruginosa* بطريقة الاقتران البكتيري (Conjcation) لها (13). اختبرت قدرة هذه العزلة المحورة على تثبيت النتروجين في الوسط الخالي من النتروجين (YEMA)، وقُدر نشاط أنزيم النتروجينيز باستعمال طريقة كلدال بتقدير كمية النتروجين الكلي (14)

. كذلك اختبرت قدرة العزلة لإذابة مركبات الفوسفات وذلك بتنمية العزلة على وسط بيكوفسكابا الصلب المجهز من مركبات الفوسفات السوبر فوسفات (T-CaP) او الصخر الفوسفاتي(RP) وقياس قطر المنطقة الشفافة حول المستعمرة بعد الحضن في درجة حرارة 28 م^0 لمدة 72 ساعة (5) كذلك اختبرت قدرة العزلة على إنتاج مركبات Sidrophores بطريقة كاشف .(CAS)، كما اختبرت قدرة العزلة في إنتاج مركبات الاندول (IAA) بطريقة (15).

تحضير الخلطة Compos preparation

حضر خليط (Compos) بوزن كلي جاف قدرة 1 كغم للمعاملة، بمزج مكونات مختلفة النوع والكمية من مواد محلية نباتية ومخلفات حيوانية متوفرة محليا ومواد معدنية طبيعية شملت مادة عضوية لمخلفات الأبقار (C/N=27/1) Organic mater (OM) والمادة الجافة لنبات الشمبلان المائي *Ceritophylium demeresm*(Cd) (C/N =16/1) ونوعين من الصخر الفوسفاتي ، الابتايت الطبيعي (RP-N) (8P%) والصخر الفوسفاتي الابتايت المكلسن (RP-C) المعرض إلى درجة حرارة 1200 م$^{\circ}$ (أفران معمل الفوسفات في عكاشات) لإزالة حوالي 30% من كاربونت الكالسيوم ويصل محتواه P 12% (جدول1) .

بهدف تحويل مكونات الخليط بطرائق التحلل الحيوي إلى مواد اكثر فائدة في مجال تغذية النبات وذلك باستعمال لقاح بكتريا *A. vinelondii* المحورة ذات القدرة على تحليل المركبات العضوية وتثبيت النتروجين الجوي وإذابة مركبات الفوسفات في الوسط فقد جرى تخمير المكونات لمدد زمنية 10 و20 و 30 يوم قبل إضافته للتربة. إذ حضرت أشكال مختلفة من الخلطات من المكونات وحسب جدول 1 وعقمت المكونات مع الصخر الفوسفاتي بنوعية RP-N و RP-C باستعمال الحرارة الجافة (160 م$^{\circ}$) لمدة ساعتين وعقمت OM و Cd بطريقة التندلة على درجة حرارة 72 م^0 لثلاثة أيام متتالية للتخلص من المحتوى الميكروبي الطبيعي، ثم وزعت الخلطات في بيكرات زجاجية حجم 2 لتر معقمة بواقع كغم خلطة/ بيكر . لقحت الخلطات من لقاح العزلة المحورة *A. vinelondii* بمعدل 10^6 cfu/g بعد أن رطبت الخلطة بالماء المقطر المعقم لمستوى رطوبي دون الماء الحر ثم حضنت في درجة حرارة 28 م^0 لمدة 30 يوم .رطبت بالماء المقطر المعقم كلما دعت الحاجة لذلك، واعتمادا على الفقد في الوزن .ثم قدر كلا من الكاربون(C)و N الكلي والفوسفور الجاهز والكثافة المكيروبية وحسبت نسبة C/N ثم انتخبت الخلطات الجيدة للتجارب اللاحقة .

جدول(1) مكونات الخلطة قبل التخمير

رقم الخلطة	مكونات الخلطات غم \ كغماخلطة	محتوى الخلطات

C/N	C	N	Av-P	TP	Cd	OM	RP	
27:1	294	10.85	1.25	30.60	-	700	300	**1**
27:1	168	7.75	1.01	53.28	−	400	600	**2**
16:1	266	16.52	0.75	27.44	700	−	300	**3**
16:1	152	9.44	0.78	51.68	400	−	600	**4**
20.4:1	280	13.68	1.90	28.84	350	350	300	**5**
20.4:1	160	2.82	1.5	52.48	200	200	600	**6**
27:1	294	10.85	1.15	44.68	−	700	300	**7**
27:1	168	7.75	0.95	77.28	−	400	600	**8**
16:1	266	16.52	0.77	39.44	200	−	300	**9**
16:1	152	9.44	0.75	75.68	400	−	600	**10**
20.4:1	280	13.68	1.6	41.04	350	350	300	**11**
20.4:1	160	7.82	1.2	75.84	200	200	600	**12**

اختبار دور الخلائط في تحسين بعض صفات التربة

لغرض معرفة دور المواد المحضرة (Compos) بشكل مخمر وغير مخمر في تغير بعض صفات التربة المبينة مواصفاتها في جدول2 ، استعملت الخلطات المنتخبة المرقمة 3 و 5 و9 و11 مخمرة وغير مخمرة وخلطت بنسبة1% من التربة المستعملة. إذ عقمت التربة المستعملة قبل المعاملة بطريقة الموصدة لثلاثة مرات متتالية ووزعت بمعدل 100 غم \ بيكر زجاجي(حجم نصف/لتر) رطبت المعاملات لمستوى السعة الحقلية . ولغرض تقدير كمية CO_2 المنطلقة أثناء مدة التخمير، وضع بيكر بحجم 50 سم ^{3} يحتوي 30 سم ^{3} NaOH (0.1N) على سطح المعاملات داخل البيكر ، ثم غطي سطح البيكر بالصوف الزجاجي وحضنت لمدة 30 يوم بدرجة حرارة 28م^0 قدر بعدها كمية CO_2 المنطلقة بتسحيح NaOH المتبقي مع HCl (N0.1) بوجود دليل الفينولفثالين، وعدة الكمية المستهلكة من NaOH مكافئه لكمية CO_2 المنطلقة خلال مدة التخمير.كما قدر النتروجين الجاهز NO_3 و NH_3 حسب طريقة كلدال وقدر النتروجين الكلي وقدر الفوسفور الجاهز ، كما قدر الكاربون بطريقة (14) وحسبت نسبة C/N. والكثافة الميكروبية (TM) بطريقة التخفيف وصب الأطباق (16).

جدول (2) صفات التربة المستعملة في التجربة المختبرية والبايولوجية

نوع تربة التجربة	المفصولات غم/كغم			OM	C	N	P	$CaCO_3$	pH	EC	نسبة الماء الجاهز
	طين	غرين	رمل								
المختبرية	410	340	260	0.51	216	103	12.3	224	7.65	3.40	15.8
السنادين	240	340	420	0.36	80	90	7.6	105	7052	4.31	12.2

التجربة البايولوجية :

درست نباتات اللوبيا المزروعة في تربة رملية مزيجة ذات ملوحة 4.31 دسي سيمز التي تعاني من ضعف في تكون العقد الجذرية (Nodulation) واستعلت الخلائط المحضرة في الدراسة رقم 5و 11 بصورتها مخمره وغير مخمره وبنسبة 1 % مقارنة باستعمال سماد السوبر فوسفات (TSP) (P %19.6) بمعدل 50 كغم/ دونم

وسماد اليوريا (N46 %) بمعدل 30 كغم/دونم، لمعرفة دورها في تحسين نمو النبات وصفات التربة حيث جهزت معاملات التجربة في سنادين بلاستيكية حجم 5 كغم وضع فيها 3كغم من التربة الرملية المزيجة المنخولة بمنخل قطر 2 ملم وتم تجهيزها بالكميات المطلوبة من الخلطات المنتخبة ومزجت جيدا ثم زرعت فيها بذور نبات اللوبيا *Vicia catiang* بتاريخ 1 \ 3 \ 2006 وبثلاثة مكررات بخمسة بذور للسندانة خفت لنبات واحد بعد اكتمال الإنبات ، نظمت المعاملات بنظام تصميم CRD في مكان محمي، رويت لمستوى السعة الحقلية ثم رويت كلما دعت الحاجة باستعمال الطريقة الوزنية لفقد الرطوبة، واستمرت التجربة لعمر 45 يوم. قدر وزن المادة الجافة للجذر والجزء الخضري، وقدر طول النبات وطول الجذر وعدد العقد الجذرية الفعالة وغير الفعالة وكمية N و P الماخوذ في النبات والمتبقي في التربة والكثافة الميكروبية في التربة وحللت النتائج إحصائياً باستعمال طريقة اقل فرق معنوي (L.S.D. P>0.05).

النتائج والمناقشة

تمكنت العزلة *A.vinelondii* المحورة من تثبيت النتروجين وإذابة مركبات الفوسفات وأظهرت نتائج اختبارهاقدرتها على تثبيت النتروجين في الوسط YEMA بمعدل 2.8 ملغمN \ لتر خلال 72 ساعة وبلغت الكثافة الميكروبية 6.2×10^8 Cfu/g ، كذلك أظهرت نتائج الاختبار لإذابة مركبات الفوسفات في وسط بيكوفسكايا الصلب قدرتها على إذابة مركبات الفوسفات من خلال تسجيل معدل قطر المنطقة الشفافة حول المستعمرات النامية على الوسط بمعدل بلغ 10.6، 8.4 ،7.31 ملم على التوالي مع اختلاف تنوع استعمال مصادر الفوسفات من TCaP وRP-N وRP-C في الوسط ،كذلك أظهرت العزلة قابليتها على إنتاج مركبات الاندول بمعدل 11.6 ملغم \لتر وسط. وتؤكد هذه النتائج أن العزلة *A.vinelondii* المحورت تحمل صفتي تثبيت النتروجين واذابة الفوسفات ألا أن مقارنة معدل كمية النتروجين المثبتة في الوسط مع القيم المتحققة من العزلة *A.vinelondii* (التي حورت بطريقة الاقتران البكتيري إلى هذه العزلة في تجارب سابقة) بلغ 3.34 (13)، كذلك فان معدل قطر الإذابة لمركبات الفوسفات المتحقق من العزلة *Pseudomonas aeruginosa* التي استعملت مصدراً للجينات الموهوبة للعزلة *A.vinelondii* المسؤولة عن إذابة مركبات الفوسفات بلغ 12.84 ملم (13) كما وجد من الصفات المقدرة للعزلة قابليتها على إنتاج مركبات Sidrophres وتؤكد هذه النتائج قدرة هذه العزلة المحورة على الاحتفاظ بالصفات المنقولة أليها من الأجيال اللاحقة . كما وجد أن قابليتها على تثبيت النتروجين وإذابة الفوسفات ظلت بمستوى كفاءة الأجيال الأولية للعزلة .مما يعزز إمكانية استعمالها في مجال الأسمدة الحيوية والتي يمكن أن تعوض عن جزء من حاجة النبات من الأسمدة المعدنية وتقلل من استعمال اللقاحات بشكل منفرد الأمر الذي يخفض من الجهد والتكاليف عند تحضير اللقاحات ويزيد من قابلية الاستعمال وزيادة الإقبال من المستعملين.

دور عملية التخمر في تحسين مكونات الخلائط

أدت عملية تخمير مكونات الخلطات دورا مهما في تحسين مكوناتها (جدول3) ، ووجد أن الخلطة رقم 5 المكونة من 300 و700 غم من(350) RPN وخليط OM قد تميزت بأفضل محتوى من مركبات الفوسفات الذائبة بنسبة أذابة 71.2 % من الفوسفور الكلي في الخلطة ليصل كمية الفوسفور 20.58 غمP / كغم خلطة ، كما وصلت كمية النتروجين الكلي في الخلطة 19.6غمN / كغم خلطة ، منها 12.62 نتروجين بصيغة NH_4 و NO_3 وأصبح معدل نسبة C/N في الخلطة بعد التخمير 9:1، كذلك وجد أن مكونات الخلطة رقم 3 المكونة من 300 غم RPN و700غم مسحوق نبات Cd أن مركبات الفوسفات قد أذيبت بنسبة 70 % ليصل محتوى

الخلطة 78.68غمP / كغم خلطة ، كما أصبحت كمية النتروجين الكلي 18.76غمN / كغم منها 12.32 غم بصيغة NH_4 و NO_3 وانخفضت نسبة C/N لتصل 11:1 ، وأشارت نتائج تحليل مكونات الخلطات أن كمية الفوسفور الذائب في الخلطات 2 و4 و6 كانت أعلى من الخلطات 1 و3 و5 ، ألا أن معدل نسبة الإذابة لمركبات الفوسفات كانت اقل وتتراوحت بنسبة إذابة 55% وهذا ربما يعود إلى المحتوى الكلي للخلطة من الصخر الفوسفاتي (500غم/كغم خلطة).

من جانب أخر أظهر تحليل مكونات الخلطات التي استعمل فيها مصدر الصخر الفوسفاتي المكلسن أن نسبة إذابة مركبات الفوسفات كانت أدنى من نسبة الإذابة المتحققة في الخلطات التي استعمل فيها الصخر الفوسفاتي الخام وتراوحت نسبة الإذابة بين38.6% و49.5% وتميزت الخلطة رقم11 المكونة من استعمال 300غم RPC و 350 و350 غم من OM و Cd بأفضل محتوى من الفوسفور المذاب بلغ 20.31 غمP / خلطة، بنسبة إذابة 49.5 % وبمحتوى من النيتروجين الكلي بلغ 17.9غم /كغم منة 10.52 غم بصيغة NH_4 و NO_3 ومعدل نسبة C/N بلغت 10:1 و محتوى مايكروبي لعزلة *A.vinlendii* بمعدل7.90Log.Cfu/g (جدول3).

كما أظهرت الخلطة رقم 9 نسبة إذابة46.4% لمركبات الفوسفات ليصل كمية الفوسفور الجاهز إلى 18.4غم P /غم، وبمعدل محتوى من النتروجين الكلي 19.6غمN / كغم منه12.12بصيغة NH_4 و NO_3 مع تحقق نسبة C/N في الخلطة بمعدل 10:1 ومحتوى ميكروبي *A.vinlendii* بلغ7.81 Log.cfu/g.وتبين من النتائج أن كمية CO_2 المنطلقة من الخلطات التي استعمل فيها RP-N أعلى من الكميات المنطلقة من استعمال RP-C ، وربما يعود ذلك لمحتوى النوع الأول على $CaCO_3$%32 ، التي يكاد يخلو منها النوع الثاني بعملية الحرق الحراري . كما تعبر كمية CO_2 المنطلقة عن الفعالية الحيوية للبكتريا في استهلاك المصدر الكاربوني وعملية تثبيت النتروجين التي انعكست بشكل واضح في مكونات الخلطات 5 و11على كمية النتروجين المثبتة من البكتريا وتحسين نسبة C/N في الخلطة .

وأكدت النتائج أن استعمال الصخر الفوسفاتي الطبيعي حقق أفضل نسبة إذابة مقارنة بالصخر الفوسفاتي المكلسن وربما يعود ذلك إلى أن عملية تعريض الصخر الفوسفاتي لحرارة 200 مº ثناء عملية الكلسنة قد أدت إلى تكون روابط جديدة بين مكونات الصخر أثرت على عملية الإذابة كذلك أنها ربما أفقدت الصخر الفوسفاتي بعض المكونات من الكاربونات والمسامية التي بقيت تزيد من قابلية الأحياء على الإذابة وهذا ما اكدتة نتائج الاختبار في التجربة والتي أكدت قدرة العزلات بتحقيق أعلى قطر لإذابة مركبات الفوسفات من الصخر الفوسفاتي الخام مقارنة بالصخر المكلسن . كذلك تبين أن قدرة العزلة على تثبيت النتروجين في الخلطة قد ازدادت بوجود الصخر الفوسفاتي الخام مقارنة باستعمال الصخر الفوسفاتي المكلسن، وتبين أيضا زيادة كمية النتروجين في الخلطة مع استعمال مخلفات مسحوق نبات الشمبلان ذو C/N 1:16 مقارنة باستعمال OM ذات C/N 1:24 وربما يعود ذلك إلى قابلية الأول على التحلل أسرع إضافة لمحتواة من النتروجين الأصلي الذي يضاف إلى مكونات الخلط أيضا .الأمر الذي انعكس على زيادة الكثافة الميكروبية ، وأظهرت النتائج أيضا أن مع زيادة كمية الصخر الفوسفاتي بنوعيه في الخلطة من 300 إلى500 أو700 أدى إلى انخفاض كمية النتروجين الكلي في الخلطة بعد التخمير، وهذا ربما يعود إلى طبيعة فعالية العزلة في إذابة مركبات الفوسفات والذي ظهر واضحا في زيادة كمية الفوسفور الذائب في الخلطات مع زيادة كمية الصخر الفوسفاتي في الخلطات مصادر.

جدول (3) مكونات الخلطات بعد التخمير30 يوم مع لقاح *A.vinlendii*

رقم	الفوسفور غماكغم و%	C	النيتروجين غماكغم	C/N	TM	CO_2

غم /كغم	Log. cfu/g		NH_4+NO_3	الكليN	غم /كغم	AvP %	TP	AvP	الخلطة
86	6.51	14:1	9.21	14.68	21.6	58.1	30.6	17.75	**1**
85	8.13	11:1	6.52	10.43	114	53.3	53.88	28.72	**2**
86	8.21	11:1	12.32	18.76	210	70.1	27.40	19.19	**3**
84	6.81	10:1	7.48	11.60	110	54.2	51.68	28.0	**4**
118	8.34	9:1	12.62	19.60	176	71.2	28.84	20.53	**5**
86	7.31	10:1	7.45	10.62	106	55.2	52.48	29.00	**6**
70	7.21	15:1	8.61	14.4	220	45.1	44.68	20.15	**7**
48	6.36	12:1	5.82	10.16	120	38.6	77.28	30.10	**8**
70	7.81	10:1	12.12	19.60	198	46.4	39.44	18.40	**9**
52	7.53	11:1	60.60	10.50	108	43.5	75.68	33.00	**10**
76	7.96	10:1	10.52	17.90	184	49.5	41.04	20.31	**11**
45	6.81	12:1	6.42	10.00	118	44.3	75.84	33.60	**12**

TM = الكثافة الميكروبية ، AvP =الفوسفور الجاهز

التجربة المختبرية

أظهرت نتائج استعمال الخلطات المخمرة 3 و5 و9 و11 تفوق خصائص التربة المقدرة بعد 30 يوم من الحضن على خصائص التربة مقارنة لاستعمال الخلطات غير المخمرة (جدول 4) ووجد أن أعلى محتوى للتربة من الفوسفور الذائب بلغ 30 و29 ملغمP / كغم تربة مع استعمال الخلطة 11 و5 على التوالي .كذلك احتوت على أعلى معدل للنتروجين الكلي بلغ 150 و145 ملغمN / كغم تربة على التوالي، منة 17.3 و16.5ملغم بصيغة $NH_4+ NO_3$ \ كغم خلط وبنسبة C/N 2:1 ومعدل محتوى ميكروبي قدره 7.32 Log. cfu/g و7.31.بينما وجد أن استعمال الخلطة 3 و9 يؤدي إلى تحسين معدلات الصفات المقدرة اقل معنويا من الخلط من 5 و11من جانب أخر وجد أن كمية CO_2 المنطلقة والمقدرة في الخلطتين 3 و5 أعلى معنويا من الكمية المقدرة في الخلطتين 9و11 .لسهولة تحلل المكونات أعمادا على نسبة C/N في الخلطة.

وجد أن معدل كمية الفوسفور الجاهز في المعاملات التي استعمل بها الخلطات غير المخمرة تراوح بين 15 و17 ملغم /P كغم كذلك تراوحت كمية النتروجين الكلي بين 76 و84 ملغم N كلي / كغم وبمعدل C/N 4.2:1 و5.5:1وكذلك وجد أن كمية CO_2 المنطلقة المقدرة عند استعمال الخلطتين 3 و5 غير المخمرة بلغ 90 و96 ملغمCO_2 \ كغم تربة على التوالي بينما بلغ 50 و70 ملغم CO_2 \ كغم تربة في معاملتي الخلطتين 9و11 على التوالي .

وتؤكد هذه النتائج أهمية عملية التخمير على تجهيز مكونات الخلطات وتحولها إلى صيغ أكثر جاهزية للنبات ودورها في إذابة المركبات في التربة وزيادة عملية المعدنة وزيادة الكثافة المكروبية للعزلة في التربة الأمر الذي انعكس على صفات التربة الأخرى .وعدت الخلطات 5و11 المخمرة أفضل المعاملات المحضرة

جدول (4) بعض صفات التربة المعاملة من الخلطات المخمرة وغير المخمرة بعد 30 يوم حضن

CO_2 غم /كغم	TM Log.cfu/g	C/N	NH_4+NO_3 غم /كغم	C غم /كغم	TN غم /كغم	AvP غم /كغم	رقم الخلطة	التخمير
150	6.82	3.9:1	11.65	320	106	25	3	
180	7.31	2.0:1	16.5	300	145	29	5	**مخمرة**
110	6.51	2.6:1	11.56	310	120	27	9	
130	7.32	2.0:1	17.3	295	150	30	11	
90	5.26	5.5:1	8.62	370	76	16	3	**غير مخمرة**

96	6.21	4.5:1	8.75	360	80	15	5	
50	5.38	438:1	6.51	380	78	16	9	
70	6.81	4.3:1	7.56	350	84	17	11	

التجربة البايولوجية

1- صفات النبات

يتبين من الجدول 5 تحقق نسبة إنبات بلغت100% في جميع المعاملات خلال أربعة أيام، ألا أن سرعة الإنبات قد تفوقت عند استعمال معاملتي الخلطتين رقم 5 و11 المخمرة بنسبة 100 % خلال 2.5 يوم تلتها المعاملتين 5 و11 غير المخمرة خلال 3 أيام ومعاملة NP خلال أربعة أيام .

كما أعطت النباتات المعاملة من الخلطتين 5 و11 المخمرة أفضل معدل لها في طول النبات والجذور انعكس ذلك على معدل الوزن الجاف لهما وللنبات خلال مرحلة نمو 45 يوما .إذ بلغ معدل طول المجموع الجذري 20.2 و22.0 سم

والوزن الجاف للجذور 160و171 غم/نبات من المعاملتين على الترتيب وبلغ معدل طول النبات والوزن الجاف من المعاملتين السابقة 71 و68 سم و190و178 غم /نبات على الترتيب. كذلك ساهمت مكونات المعاملتين 5 و11 بتحقيق أفضل إصابة لبكتريا الرايزوبيا المتواجدة في التربة لجذور النبات إذ بلغ معدل عدد العقد الجذرية 22 و18 عقدة وبنسبة 68 % و77 %عقده فعالة للمعاملتين على التوالي انعكست هذه الصفات للنبات على محتواة من النتروجين والفوسفور البالغ 10.68و4.04 ملغمN \ نبات الكلي و3.38 و3.61 ملغمP /الوزن الجاف للنبات .والأمر الذي انعكس على وصول نسبة البروتين في الوزن الجاف للنبات بمعدل 17.9 و18.5للمعاملتين على التوالي .وأدى استعمال المعاملتين 5 و11غير المخمرة إلى زيادة في الصفات المقدرة إلا أنها كانت أدنى من استعمال المعاملتين 5 و11 المخمرة ورغم أن استعمال سماد NP ضمن التوصية السمادية للنبات إلا انه لم يحقق معدلات النمو وتحسين الصفات المقدرة كما حصل في استعمال الخلطات المخمرة .إذ انعدم تكون العقد الجذرية على جذور النبات مما انعكس على خفض الوزن الجاف للنبات ليصل106غم /نبات ،ومحتواه من النتروجين 3.34 ملغمN \ نبات والفوسفور1.90 ملغمP /الوزن الأمر الذي انعكس على محتواة من البروتين ليصل 10.87 %.

2- صفات التربة المقدرة

أدى استعمال الخلطات المخمرة إلى تحسين صفات التربة المقدرة بعد 45 يوم من الإضافة ، حيث تحسن محتوى التربة من الفوسفور الجاهز الذي بلغ 20.5 و18.9ملغم P\ كغم تربة في المعاملتين المخمرة 5 و11 تلتها المعاملتين غير المخمرة بمعدل 13.5 و14.4ملغم P\ كغم لمعاملة NP بمعدل 12.6 ملغم P \ كغم تربة.

كذلك ازداد بشكل معنوي كمية النتروجين الكلي في التربة نتيجة استعمال معاملتي الخلطتين المخمرة 5 و11 ليصل 141 و130 ملغم N\ كغم تربة تلاهما كمية النتروجين في التربة بفعل إضافة المعاملتين غير المخمرة 5 و11 بمعدل 108 و112 ملغم N على التوالي. في حين انخفض محتوى التربة من النتروجين الكلي ليصل 56 ملغم /N كغم بفعل استعمال سماد . NP كذلك وجد تغير طفيف في معدل الرقم الهيدروجيني للتربة بفعل استعمال الخلطات المخمرة وغير المخمرة مقارنة باستعمال سماد NP لم تتأثر صفة الايصالة الكهربائية بفعل المعاملات للتربة.

من جانب أخر وجد أن المحتوى الميكروبي الكلي قد ازداد بشكل معنوي احصائيا وبلغ 7.10 و7.51 ثم6.110 و5.89 Log cfu /g باستعمال الخلطتين5 و11المخمرة وغير المخمرة على التوالي بينما ظل المحتوى الميكروبي بمعدل 4.3 Log cfu/g في التربة المسمدة من NP.

وقد وجد أيضا أن محتوى التربة من البكتريا المثبتة للنتروجين قد ازداد أيضا بفعل استعمال الخلطات المخمرة والذي بلغ5.06 و5.12Log cfu/g كذلك تراوح بين3.61 و21 Log cfu/g مع استعمال الخلطات غير المخمرة.والذي أدى إلى زيادة كمية النتروجين المثبة في التربة كما لوحظ في النتائج(جدول 6).

وتؤكد هذه النتائج أن المواد المخمرة توفر مصادر كاربونية متنوعة لنمو ونشاط الأحياء المجهرية مما يزيد من نشاط عزلة بكتريا *A.vinlendii* في تثنيت النتروجين وإذابة مركبات الفوسفات وإنتاج مركبات السايدروفور ومنظمات النمو الأمر الذي انعكس على تحسين صفات التربة ومنة تهيئة المواد المغذية للنبات مما أدى إلى تفوق قيم الصفات المقدرة تحت استعمال الخلطتين المخمرة 5 و11 الأمر الذي يؤكد أن عملية التخمير تؤدي إلى تحويل المركبات والمواد المكونة لها إلى صيغة أفضل جاهزية للنبات والأحياء المجهرية في البيئة (7 ، 9 ، 11).

جدول (5) بعض صفات النبات المقدرة

التخمير	المعاملات	نسبة الإنبات	سرعة الإنبات يوم	الوزن الجاف ملغم		طول النبات سم		عدد العقد الجذرية/ نبات		محتوى النبات ملغم/ نبات	
				جذر	خضري	الجذر	خضري	فعالة	غير فعالة	P	N
مخمرة	5	100	2.5	160	178	20.2	71	15	22	3.75	9.73
	11	100	2.5	171	190	22.0	68	14	18	4.04	10.68
غير مخمرة	5	100	3.0	121	145	18.0	53	6	12	2.70	6.94
	11	100	3.0	1.30	1.56	20.0	62	8	12	2.88	7.70
NP	NP	100	4.0	86	106	14.0	42	-	-	1.92	3.34
L.S.D	L.S.D	n.s	1.3	11.61	10.5	2.82	6.61	3.10	3.81	0.81	2.84

جدول (6) بعض صفات التربة المقدرة بعد 45 يوم

المعاملات	TN ملغم/كغم	AvP ملغم /كغم	EC دي سيمنز/م^2	PH	Bacteria N- Fix.Log cfu/g	TM Log cfu/g
5	141	20.5	3.65	7.56	5.06	7.10
11	130	18.9	3.66	7.53	5.12	7.51
5	108	13.5	3.68	7.61	3.61	6.10
11	112	14.4	3.75	7.63	3.21	5.89
NP	56	12.6	3.81	7.68	1.83	4.30
L.S.D	6.80	2.65	n.s	0.18	1.32	1.70

المصادر

Vazque , ZP. ; Holguin , G. ; Puente , M. E. and ashan , Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associates in semirid coastal lagoon. Bio and fert. Soil. 30 (5 – 6) : 460 – 468 .

1-Ponmurugan , P. and Gopi , C. (2006). In vitro production of growth regulators and phosphataase activity by phosphate solubilizing bacteria . African. J. Bio. 5 (4) : 348 – 350 .

2-Ramazan , C. ; Mesude , F. and Erdoan , u (2007). The effect of plant growth promoting on Barley seedling Growth , nutrient uptake and some Soil properties. Turk. J. Argic : 31 : 189 – 199.

3-Diby , P. and Sarma , Y. R. (2006). Plant growth promoting Rhizobacteria mediated root prolife ration in black pepper.

4-العسافي ، ادهام علي عبد (2002) . استخدام تقنية ميكروبية لزيادة جاهزية الفسفور وعناصر اخرى من الصخر الفوسفاتي . اطروحة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة الانبار .

5-Jong , S. J. ; Sang , S. L. ; Hyoun , Y. K. ; Tae , S. A. and Hong , G. S. (2003). Plant growth promotion is Soil by inoculated Micro – organisms. J. Micro. 41 (4) : 271 – 276 .

6-Kundu , BS , Gaur , Ac. (1980) . Estoplish – ment of nitrogen fixing & phosphate – solubilising bacteria in Rhizosphere and their affect on yield & nutrient uptake of wheat crop. Plant and Soil 122 (1) 223 – 320 .

7-Shatkina , SF and Khristenko , SI. (1996) . Effect of different fertilizer system and seed inoculation on the microflora biochemical and agrochemical charactertics of typical chernozen , corn yield and quality of silage . Eurasian soil. Sci. 29 (8) : 956 – 962 .

8-El – shanshoury , A. R. ; (1995) . Interaction of Azotobacter chroococcum *Azospirillum Brasilense* and streptomyces mutabilis in relation to their effect on wheat development . J. Agro. Crop. Sci. 75 (2) : 119 – 127 .

9-Curtis , H. and Barnes , N. (1993) . Biologia quintaediction . Buenos aires. Argentina. Editorial medica panamericana .

10-Lindeman , W. C. ; Ham , G. E (1979) . Soybeen plant growth , nodulation and nitrogen fixation as affected by root temperatwre. Soil. Sci. Am. J. 43 : 1134 .

11-Wotike , M. ; Hunge , Hunge , H. and Schnitzler (2005) . Bacillus subtilis as growth promoter in hydroponically Grown tomatoes under saline conditions. Int. Soc. Hort. Sci. Vol. 38 (7) : 659 – 6636 .

12-العيثاوي ، احمد محمد . 2005 .دراسة وراثية اولية للحصول على عزلة بكتيرية مثبتة للنتروجين الجوي ومذيبة للفوسفات اطروحة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة الانبار.

13-Black, C.A.(1965). Methods of Soil Analysis Amer. Soc. of Agron. Inc..

14-Louw , H. A. and Webley D. M. (1958). A plant method for estimatins the numbers of phosphate dissolving and acid – productivity bacteria in soil nature . lonb. 182 : 1317 – 1318 .

15-Pahen , C. L. and Glick , B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of I – 3 AA . Gan. J. Micro. 42 : 207 – 220 .