استخدام لقاح بكتيري ثنائي سماداً حيوياً للحنطة العراقية

خميس حبيب مطلك* مهدي ضمد القيسي** حميد مجيد العبيدي***

الملخص

عزلت 12 عزلة من بكتيريا ***Rhizobium spp.*** من العقد الجذرية لانواع من البقوليات (الباقلاء، الماش، الجت، البرسيم) السائد زراعتها في وسط العراق، وقد تم انتخاب ثلاث توليفات منها مع البكتيريا المعتمدة لقاحاً بكتيرياً للحنطة وهي ***Azospirillum brasilense*** أعتماداً على كفاءتها فـــي تثبيت النايتروجين معبراً عنه بعدد العقد الجذرية في تجارب الانابيب (**Tube culture technique**)، وفي تجارب الاصص مع 50% تسميد كيميائي نايتروجيني وبدلالة معايير نمو النبات (الوزن الجاف وكمية الحاصل ونسبة البروتين في الحبوب) مقارنة مع معاملة السيطرة (100% تسميد كيميائي).

تم الحصول على 12 عزلة من بكتيريا ***Rhizobium spp.*** اربع عزلات منها تعود الـــى بكتيريا ***R. leguminosarum*** عزلت مـــن العقد الجذرية للماش والباقلاء، واربع عزلات من بكتيريا ***R. meliloti*** من الجت، واربع عزلات من بكتيريا ***R. trifolii*** عزلت من العقد الجذرية لنبات البرسيم.

وقد أختيرت العزلات البكتيرية الاكفأ من انواع ***Rhizobium spp.*** في تثبيت النايتروجين بدلالة العقد الجذرية، إذ تفوقت العزلة **RL2** من بكتيريا ***R. leguminosarum*** واعطت ما معدله **16.3** عقدة/نبات، والعزلة **RM1** من بكتيريا ***R. meliloti*** وأعطت ما معدله **29.0** عقدة/نبات. أما عزلات بكتيريا ***R. trifolii*** فقد سجلت العزلة **RT3** اعلى عدداً من العقد الجذرية، إذ أعطت مامعدله **24.0** عقدة/نبات.

وعند ادخال هذه العزلات كلقاحات بكتيرية مع حنطة الخبز في تجارب الاصص بعد مزجها مع العزلة المعتمدة ***A. brasilense*** بنسبة **1:1** وأستعمال **50%** تسميد كيميائي، ظهر خريج اللقاحات المتكون **Az.+RL2** الاكفأ في تحسين معدلات الاوزان الجافة (**8.59** غم/أصيص)، وهذه النتائج تفوقت معنوياً على معاملة السيطرة (**100%** تسميد كيميائي) التي بلغت فيها الاوزان الجافة **6.93** غم/أصيص وحاصل الحبوب **19.43** غم/أصيص، ونسبة البروتين في الحبوب هي **12.83%** في حين سجل حاصل الحبوب للمعاملة نفسها **19.83** غم/أصيص، والنتائج الاخيرة لا تختلف معنوياً عن معاملة السيطرة.

المقدمة

يقدر ما يثبت من النايتروجين الجوي حيوياً على اليابسة ما يقارب **140** مليون طن سنوياً، يمثل التثبيت التعايشي (**Symbiotic nitrogen fixation**) تقريباً **112** مليون طن، والباقي يثبت من قبل الأحياء المجهرية الترابطية (**Associative**) وحرة المعيشة (**Free living organisms**) وان البكتيريا التعايشية (***Rhizobium spp.***) تثبت حوالي **80** مليون طن سنوياً (6)، وبكتريا **Azospirillum** فتثبت بمعدل **48** كغم. نايتروجين/هكتار/سنة، في حين تثبت بكتيريا **Azotobacter** ما معدله **7** كغم.نايتروجين/هكتار/سنة (2).

وقد بينت العديد من الدراسات ان استخدام التلقيح البكتيري مع بذور الحنطة وبقية المحاصيل الحبوبية بواسطة البكتريا **Azospirillum** الذي تنتج عنه زيادة في كل من حجم وعدد الجذور الذي يحسن من جانبه عملية امتصـــاص المغذيـــات والماء، وهذا يؤدي الى زيادة في الإنتاج الكمي للحبوب (10، 17، 20، 26). وجد **Okon**

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.

* وزارة العلوم والتكنولوجيا – بغداد، العراق.

** وزارة الزراعة– بغداد، العراق.

*** كلية الزراعة– جامعة الكوفة– النجف، بغداد.

وجماعته (17) إن استخدام اللقاح البكتيري مع الحنطة أدى الى زيادة في الإنتاجية بنسبة 10%. فيما ذكر Swdrzynska (21)، إن تلقيح نبات الحنطة بسلالات فعالة من *A. brasilense* كان عاملاً مهما في تحسين نموها وزيادة إنتاجية الحبوب الى 27%.

ولاحظ باحثون إن تلقيح الحنطة بلقاح Azospirillum يؤدي الى تثبيت النايتروجين وزيادة امتصاص الماء وبقية العناصر الغذائية مثل النترات والفوسفات والبوتاسيوم والمغنيسيوم، فضلا عن إن البكتيريا تنتج العديد من منظمات النمو والهرمونات مثل (IAA)، Gibberillins، ومواد من أشباه Cytokinins وبعض الفيتامينات مثل Riboflavin، Niacin وThiamine كما إن اغلب الأحياء المجهرية المثبتة للنايتروجين ومنها بكتيريا Azospirillum تفرز Siderophores التي تكون معقدات تخلب الحديد (19، 25).

استخدمت أنواعاً من البكتيريا حرة المعيشة Azotobacter وخاصة النوعين *A. chroocoeeum*، *A.vinelandii* التي لقحت بها الحنطة مع السماد المعدني (NPK) او السماد العضوي إذ أظهرت النتائج وجود فروق معنوية في كمية الحبوب ووزن القش وعدد السنابل ومحتوى النايتروجين (15). كما وجد إن بكتيريا Azotobacter فضلا عن تثبيت النتروجين الجوي بصورة حرة لها المقدرة على إنتاج العديد من المركبات التي تساعد في نمو النبات وزيادة مجموعهُ الجذري والخضري ومن ثم زيادة الإنتاج، ومن هذه المركبات منظمات النمو كالجبرلين (Gibberellin) والسايتوكينين (Cytokinin), Indol 3–acetic acid, كما تنتج مركبات Sidrophores وبنوعين هما Phenolates وHydroxyamates وهذه تفيد كعامل للسيطرة الحيوية (Biological control) في السيطرة على العديد من الأمراض التي تسببها فطريات Penicillum، Aspergillus، Pythium وFusarium (15، 24).

اما البكتيريا التعايشية Rhizobia فقد عرفت في استخدامها مع البقوليات كلقاح بكتيري يؤدي الى سد حاجة النبات من النايتروجين بنسب تتراوح بين 60– 85% بحسب نوع العائل البقولي وكفاءة السلالة البكتيرية المستخدمة والظروف البيئية والعمليات الزراعية المستعملة (16)، ولم يكن لهذه البكتيريا استخدامات كلقاح بكتيري مباشر مع المحاصيل غير البقولية (Non legumes) إلاّ في الزراعة المركبة (Intercropes) او في التتابع في الدورات الزراعية (8، 11).

اما Dakora (7) فقد أشار إن بكتيريا الرايزوبيا تنتج العديد من المواد الايضية (Metabolite) مثل الهورمونات النباتية auxins، cytokininz، Gibberellin وabscicic acid والفيتامينات مثل riboflavin، وان إفراز هذه المواد يشجع نمو النباتات ويزيد الإنتاج حتى وأن لم يكن هناك تثبيت للنايتروجين الجوي.

فيما وجد Phillips وجماعته (18) ان بكتريا الرايزوبيا تحرر مادة Lipo-chito-oligosaccharides (LCOs) التي هي إشارات لتحفيز تكوين العقد الذرية، وكذلك وجد أن هذه المادة تحفز إنبات (Germination) مدى واسع من الأنواع النباتية وبآلية غير معروفة.

وتهدف الدراسة الحالية الى استخدام تقنية التثبيت الحيوي للنايتروجين مع حنطة الخبز من خلال استخدام لقاح بكتيري مزدوج من نوعين من البكتيريا احدهما حرة المعيشة (Azospirillum) والأخرى تعايشية (Rhizobium) لاختزال 50% من التسميد الكيميائي النايتروجين المضاف عند زراعة الحنطة.

المواد وطرائق البحث

العزل والتنقية

تم عزل أنواع بكتيريا *Rhizobium spp* من العقد الجذرية لنبات الباقلاء والماش والجت والبرسيم المزروعة في مناطق مختلفة من وسط العراق كما في جدول (1)، إذ اختيرت العقد الجذرية الكبيرة وغسلت بعناية أولاً ثم عقمت

بواسطة 3% بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) ولمدة 3–4 دقائق، غسلت العقد الجذرية بماء مقطر معقم عشر مرات, ثم اختيرت العقد الفعالة الكبيرة ووضعت في طبق بتري معقم، ثم سحقت العقد مع 0.5 ماء مقطر تحت ظروف التعقيم ثم نشر جزء من سائل العقد الجذرية بواسطة الناقل (Loo) على أطباق حاوية على الوسط الغذائي المعقم الخاص ببكتريا Rhizobium وهو Yeast extract mannitol agar، ثم حضنت المزارع على درجة 28°م لمدة 2–3 يومياً.

اختيرت المستعمرات البيضاء اللزجة المخاطية وأعيد تنميتها (Restreaking) على الوسط نفسه لغرض التنقية والحفظ، تمت تنقية *R. leguminosarum* من العقد الجذرية لنباتات الباقلاء والماش، وبكتريا *R .meliloti* من العقد الجذرية لنبات الجت، اما بكتريا *R. trifolii* فقد تم عزلها وتنقيتها من العقد الجذرية لنبات البرسيم.

كما أجريت الفحوص المظهرية للمستعمرات، وكذلك تم إجراء صبغة كرام للعزلات جميعها المذكورة آنفاً (23). زرعت البكتيريا عل أطباق حاوية على الوسط الغذائي الصلب (Ym) وحضنت لمدة 2–3 أيام في حاضنة بدرجة 28°م، فحصت المستعمرات النامية وسجلت الصفات المظهرية لها من حيث لونها وشكلها ومدى قدرتها على إفراز مواد لزجة مخاطية (13).

اما بكتيريا *A. brasilense* فقد تم الحصول عليها من قسم التقانات الإحيائية/دائرة البحوث الزراعية والبايولوجية/منظمة الطاقة الذرية سابقاً (4).

جدول 1: مناطق عزل أنواع من البكتريا *Rhizobium spp.*

رقم النموذج	المنطقة	المصدر النباتي
1	الخالص / ديالى	الباقلاء
2	بلد / صلاح الدين	الماش
3	الراشدية/ بغداد	الماش
4	المحمودية / بغداد	الباقلاء
5	الخالص / ديالى	الجت
6	بلد / صلاح الدين	الجت
7	الراشدية/ بغداد	الجت
8	المحمودية / بغداد	الجت
9	الخالص / ديالى	البرسيم
10	بلد / صلاح الدين	البرسيم
11	الراشدية/ بغداد	البرسيم
12	المحمودية / بغداد	البرسيم

قابلية العزلات على تثبيت النايتروجين الجوي

دراسة كفاءة العزلات البكتيرية بطريقة تكوين العقد الجذرية

اتبعت الطريقة المعتمدة من قبل Hardarson (13)، إذ تم إنبات بذور الماش, الجت والبرسيم بعد غسلها وتعقيمها كما في الفقرة السابقة، ثم وضعت في أطباق معقمة حاوية على كمية من Water agar المتصلب وضعت حاضنة على 28°م لمدة يومين لغرض الإنبات، ثم نقلت البادرات بعد البزوغ الى أنابيب معقمة ذات حجم 80سم^3 حاوية على Water agar المتصلب بصورة مائلة والمضاف إليها المحلول المغذي المعقم (محلول هو كلاند) المخضر كما في الفقرة السابقة وتم غلق الأنابيب بواسطة سداد من رقائق الألمنيوم المعقم وبشكل محكم وتم ثقب فتحتين في السداد، واحدة لغرض الزراعة والأخرى للسقي بالمحلول المغذي، ثم أضيف 1سم^3 من اللقاح البكتيري للعزلات المحددة الحاوي

على 109 و.م.م/ سم^3 من أنواع بكتريا ***Rhizobium spp*** وأغلقت الفتحتان بواسطة قطع صغيرة جداً من القطن المعقم، حسب طريقة Vincent(23) نقلت الأنابيب المزروعة الى الحاضنة على درجة 25 م ومدة إضاءة 12 ساعة و12 ظلام وتمت مراقبة النمو للنباتات أثناء التجربة وباستمرار سقيها وبظروف معقمة وبعد مرور شهر على التجربة تم حساب العقد الجذرية المتكونة على جذور النباتات البقولية المحددة (الماش، الجت والبرسيم).

تقويم العزلات البكتيرية مع حنطة الخبز

اختيرت اصص (سنادين) بلاستيكية سعة 3.5 كغم مبطنة بأكياس بلاستيكية معقمة بالكحول، أضيفت لها 3كغم تربة مطحونة ومخلوطة مع الرمل بنسبة 1:1 ومعقمة بجهاز الموصدة (التعقيم) على حرارة 121 م لمدة ساعة، وتم التأكد من عدم تلوث العينة عن طريق إجراء اختبار أنموذج التربة على الوسط الغذائي Nutrient agar أضيف مع التربة في الطبقة السطحية الأسمدة الكيميائية وبنسبة 50% من التوصيات المعتمدة والموصى بها لمحصول الحنطة محسوبة على وزن الأصيص وبواقع 0.25غم من اليوريا وعلى دفعتين وسوبر فوسفات 0.22غم (دفعة واحدة) وكبريتات البوتاسيوم 0.075غم (دفعة واحدة). اما معاملة السيطرة فقد استخدمت الأسمدة الكيميائية فيها بنسبة 100%، زرعت 5 بذور من الحنطة صنف تموز 3 لكل أصيص وذلك بعد تعقيمها سطحياً باستعمال كلوريد الزئبق $HgCl_2$ ثم بالكحول الاثيلي 95% ومن ثم غسلت بالماء المقطر المعقم مرات عدة ثم عوملت باللقاح البكتيري (عزلات بكتيريا ***Rhizobium spp.*** والعزلة المختارة ***A. brasilense***) تم خلط البذور مع خلط اللقاح البكتيري وبنسبة 1:1 وتركت لمدة ساعة لغرض التصاق اللقاح بالبذور، بعد الإنبات تم خفض (تقليل) النباتات الى 3 بادرات/أصيص، وعند النضج حصدت النباتات من قرب سطح التربة وجفف المجموع الخضري في فرن كهربائي على حرارة 70 م لمدة 24 ساعة, أجريت القياسات المطلوبة وهي الأوزان الجافة، كمية الحاصل وتقدير نسبة البروتين (1).

تحضير اللقاحات البكتيرية

اختيرت العزلة المحلية ***A. brasilense*** وثلاثة انواع من بكتيريا ***Rhizobium spp.*** لاستعمالها لقاحاً بكتيرياً لنبات الحنطة في التجارب المختبرية والحقلية، إذ نميت هذه البكتيريا على الوسط الغذائي السائل Nfb broth وYm broth على التوالي، وذلك بوضع 50سم^3 من هذا الوسط في دورق سعة 100سم^3 وبعد التعقيم بجهاز الموصدة (Autoclave) تم التلقيح بهذه البكتيريا عن طرق إضافة 1سم^3 من المزرعة المنشطة مسبقاً على الوسط الغذائي نفسه وكان العدد 2.2×10^9 و.م.م/سم^3 ثم الحضن على درجة 28 م في الحاضنة الهزاز ولمدة 2-3 أيام. ثم قدرت كثافة البكتيريا باستعمال طريقة التخافيف والعد بالاطباق, ثم لقحت أكياس من البولي اثلين المعقمة الحاوية على 100غم من البتموس (الذي سبق تعقيمه بجهاز الموصد على درجة 121 م لمدة ساعة) بـ 10سم^3 من هذا اللقاح أضيف 40 سم^3 في الماء القطر المعقم ثم مزجت مكونات اللقاح يدوياً ووضعت في الحاضنة على درجة 28 م لمدة 48 ساعة. ثم حفظت أكياس اللقاحات في الثلاجة لحين الاستخدام او الدراسة (14).

تم استعمال (التصميم العشوائي الكامل (CRD) في تحليل نتائج الفحوص أحصائياً, وتمت مقارنة المتوسطات حسب اختبار L.S.D. وباستعمال الحاسبة الالكترونية.

النتائج والمناقشة

عزل البكتيريا المثبتة للنايتروجين

تم عزل هذه البكتريا وكما موضح في جدول (2) من مصادر بقولية مختلفة، إذ عزلت أربع عزلات من البكتيريا ***R. leguminosarum*** من العقد الجذرية لنبات الماش والباقلاء وأعطيت الرموز RL1, RL2, RL3, RL4 من أربع مناطق في وسط العراق هي: الخالص/ديالى وبلد/صلاح الدين والراشدية/بغداد والمحمودية/بغداد على

التوالي, ومن العقد الجذرية لنبات الجت تم عزل أربع عزلات من بكتيريا *R. meliloti* وهي RM1, RM2, RM3 وRM4 ومن المناطق المذكورة آنفاً على التوالي ايضاً، اما عزلات بكتريا *R. trifolii* فقد عزلت من العقد الجذرية لنبات البرسيم من المناطق المحددة نفسها وأعطيت الرموز RT1, RT2, RT3 وRT4 على التوالي ايضاً. لذلك فقد جمعت 12 عزلة من أنواع بكتيريا *Rhizobium spp.* من المواقع والعوائل البقولية المحددة في الدراسة وعند فحص مستعمراتها النامية على الوسط الغذائي القياسي كانت ذات شكل ابيض داكن، وقوام لزج مخاطي. اما عند فحصها مجهرياً فقد تبين أنها عصوية، سالبة لصبغة كرام وغير مكونة للابواغ ولا تصطبغ بصبغة Congo Red.

ان تصنيف بكتيريا الرايزوبيا لا يشابه بقية أنواع البكتيريا الأخرى التي تجري لها العديد من الفحوص المايكروبايولوجية والبايوكيميائية, بل أن تصنيفها الى أنواع يعتمد على قابلية البكتيريا في تكوين العقد الجذرية على عوائلها البقولية المتخصصة (13). كما إن أنواع هذه البكتريا جميعها تخصصية في عملها، إذ إن كل نوع من أنواعها تصيب وتتعايش بصورة تكافلية (Symbiotic) مع العائل البقولي المحدد لها لتصيب جذوره وتتعايش معه غذائياً، فبكتيريا *R. leguminosarum* تصيب جذور الماش والباقلاء، في حين تصيب بكتيريا *R. meliloti* جذور نباتات الجت, اما بكتريا *R. trifolii* فتصيب جذور نباتات البرسيم، وبعد الإصابة تكون ما يسمى بالعقدة الجذرية (Root nodule) وهي مصنع تثبيت النايتروجين الجوي في البقول (7).

جدول 2: عزل أنواع بكتيريا *Rhizobium spp.* من عوائلها البقولية .

رمز العزلة	نوع البكتيريا	العائل النباتي	المنطقة
RL1	*R.leguminosarum*	الباقلاء	الخالص / ديالى
RL2	*R.leguminosarum*	الماش	بلد / صلاح الدين
RL3	*R.leguminosarum*	الماش	الراشدية/ بغداد
RL4	*R.leguminosarum*	الباقلاء	المحمودية / بغداد
RM1	*R. meliloti*	الجت	الخالص / ديالى
RM2	*R. meliloti*	الجت	بلد / صلاح الدين
RM3	*R. meliloti*	الجت	الراشدية/ بغداد
RM4	*R. meliloti*	الجت	المحمودية / بغداد
RT1	*R. trifolii*	البرسيم	الخالص / ديالى
RT2	*R. trifolii*	البرسيم	بلد / صلاح الدين
RT3	*R. trifolii*	البرسيم	الراشدية/ بغداد
RT4	*R. trifolii*	البرسيم	المحمودية / بغداد

دراسة كفاءة العزلات البكتيرية في تثبيت النايتروجين الجوي

تثبيت النايتروجين الجوي بطريقة تكوين العقد الجذرية

درست كفاءة العزلات البكتيرية المحددة من أنواع بكتيريا *Rhizobium spp.* في تثبيت النايتروجين الجوي بدلالة تكوين العقد الجذرية المتكونة على جذور عوائلها البقولية، وكما مبين في الجدولين (2 و4) إذ تشير النتائج الى تفوق معنوي للعزلة RL2 عن جميع عزلات بكتريا *R. leguminosarum* في تثبيت النتروجين الجوي بدلالة العقد الجذرية حين سجلت ما معدله 16.3 عقدة جذرية/نبات، اما عزلات بكتريا *R. meliloti* فقد تفوقت فيها العزلة RM1 معنوياً عن بقية العزلات وأعطت من العقد الجذرية ما معدله 29.0 عقدة/نبات في حين سجلت العزلة RT3 أعلى عدداً من العقد الجذرية وهو 24.0 عقدة/نبات من بين العزلات الأربعة لبكتيريا *R. trifolii* التي تم تلقيح النبات بها، إذ لوحظ وجود فرق معنوي عن العزلة RT4 في حين لاتوجد فروق معنوية في إعداد العقد الجذرية بينها وبين العزلات RT1 وRT2 (24.0 عقدة/نبات). إن زيادة عدد العقد الجذرية وحجمها على جذور النباتات البقولية عند تلقيحها بالبكتيريا المثبتة للنايتروجين يعود الى زيادة إعداد هذه البكتيريا التي لها القابلية في إصابة

واختراق الجذور وهذا يعتمد على كفاءة العزلة البكتيريا أولاً وتوفر الظروف المناسبة لها لبناء العلاقة التعايشية مع النبات (22)، وقد ذكر يوسف وسعد (3) إن العوامل المحددة لنمو النبات العائل تؤثر في عملية التثبيت الحيوي للنايتروجين الجوي سواء أكانت بصورة مباشرة من خلال التأثير في عملية تكوين العقد الجذرية وعملها أم بصورة غير مباشرة من خلال خفض قابلية النبات العائل في تجهيز العقد الجذرية بالمغذيات ونواتج التمثيل الضوئي.

جدول 3: قابلية العزلات البكتيرية ***Rhizobium spp.*** في تثبيت النايتروجين بدلالة العقد الجذرية

العزلات البكتيرية	معدل إعداد العقد الجذرية	0.05 L.S.D.
Control	0.0	4.65
RL1	8.3a	
RL2	16.3 b	
RL3	11.0c	
RL4	9.0c	
Control	0.0	4.25
RM1	29.0a	
RM2	14.0b	
RM3	10.0b	
RM4	10.3b	
Control	0.0	6.47
RT1	22.6a	
RT2	21.0a	
RT3	24.0a	
RT4	12.0b	

* كل رقم يمثل ثلاث، ** الأرقام المتشابهة لا يوجد فرق معنوي بينهما.

اختيار كفاءة البكتيريا مع حنطة الخبز بتجارب الأصص

يبين جدول (3) اختبار العزلات الكفوءة في تثبيت النايتروجين الجوي مع بكتيريا ***Rhizobium spp.*** بعد مزجها مع لقاح بكتيريا ***A. brasilense*** (وهو اللقاح البكتيري المعتمد للحنطة المحلية (4) في تجارب زراعة حنطة الخبز في الأصص. وقد اعتمدت صفات الأوزان الجافة للنباتات وحاصل الحبوب ونسبة البروتين في الحنطة لمعرفة العزلات الأكفأ من أنواع بكتيريا ***Rhizobium spp.***.

وتبين من النتائج التي تم الحصول عليها الى وجود تفوق معنوي على مستوى **0.05** لمزيج اللقاحات التالية **Az+RL2**، **Az.+RM1** و**Az+RT3** عندما سجلت أوزان الحنطة الجافة فيها **8.59, 7.48** و**8.21** غم/أصيص على التوالي, بالمقارنة مع معاملة السيطرة التي كانت **6.93** غم/أصيص، ومنها يلاحظ إن هناك تفوق معنوي لأنواع توليفات اللقاحات البكتيرية جميعها عن معاملة السيطرة, وهذا يتفق مع ما أشار إليه **Bashan** (5) الى إن استخدام البكتيريا المثبتة بالنايتروجين مع الحنطة يؤدي الى زيادة امتصاصها للنايتروجين المثبت وتحويله الى أحماض أمينية ومن ثم مركبات بروتينية يستفيد منها النبات في العمليات الحيوية وتكوين الأنسجة المختلفة مما يؤدي الى تحسين النمو وزيادة المجموع الخضري.

اما حاصل حبوب حنطة الخبز فقد كان مزيج اللقاحات **Az+RL2** الأفضل بين عزلات بكتيريا ***R. leguminosarum*** حين أعطى **19.43** غم/أصيص وهو لايختلف معنويا عن معاملة السيطرة التي سجلت **19.93** غم/أصيص اما عزلات بكتريا ***R. meliloti*** فقد كان المزيج **Az+RM1** هي الأفضل بين عزلاتها حين أعطى حاصل حبوب مقداره **16.49**غم/أصيص لكن حاصل الحبوب الذي سجلته معاملة السيطرة يختلف عنه معنوياً، في حين كان المزيج **Az+RT3** الأفضل من بين عزلات بكتيريا ***R. meliloti*** الذي أعطى حاصل حبوب مقداره

17.83غم/أصيص وبالمقارنة مع معاملة السيطرة فهو يختلف اختلافاً معنوياً عنها ايضاً، وهذه النتائج تتفق مع العديد من الباحثين الذين أشاروا الى إن استعمال لقاح البكتيريا المثبتة للنايتروجين يزيد من حاصل الحبوب.

وتشير النتائج المحتوى البروتيني لحنطة الخبز بعد إضافة اللقاحات البكتيرية لها والمبينة في الجدول نفسه الى إن مزيج اللقاح البكتيري Az+RL2 تفوق بشكل معنوي في نسبة البروتين، إذ كان 12.83% عن معاملة السيطرة التي كانت 12.13%، في حين كان مزيج اللقاحات Az+RM1 من عزلات بكتيريا *R. meliloti* والمزيج Az+RT3 من عزلات بكتيريا *R. trifolii* الأفضل في تحسين نسبة البروتين حين سجلا 11.30 و11.70% على التوالي, لكنها لم تصل الى مستوى المعنوية مع معاملة السيطرة.

جدول 4: اختبار العزلات البكتيرية في تثبيت النايتروجين الجوي مع حنطة الخبز بتجارب الأصص

نوع اللقاح البكتيري	وزن المادة الجافة (غم / أصيص)	حاصل الحبوب (غم / أصيص)	نسبة البروتين (%)
معاملة السيطرة	6.93 e	19.93 a	12.13 b
A. brasilense	6.70 g	11.40 g	10.20 i
Az.+RL1	7.43 c	17.13 b	11.40 d
Az.+RL2	8.59 a	19.43 a	12.83 a
Az.+RL3	8.15 c	17.40 b	11.30 d
Az.+RL4	8.09 b	16.86 d	11.90 b
Az.+RM1	7.48 c	19.49 d	11.30 d
Az.+RM2	7.18 e	13.20 f	10.53 h
Az.+RM3	6.48 b	11.60 g	10.70 f
AZ.+RM4	7.16 e	10.83 g	10.33 h
Az.+RT1	7.48 c	10.96 g	10.80 f
Az.+RT2	7.32 c	13.40 e	11.10 e
Az.+RT3	8.21 g	17.83 b	11.70 c
Az.+RT4	7.42 c	14.20 e	10.36 h
0.05 L .S. D	0.29	0.81	0.26

* كل رقم يمثل معدل ثلاثة مكررات، ** الأرقام المتشابهة لا يوجد فرق معنوي بينها .

إن ذلك يشير الى إن هناك زيادة في نسبة البروتين ناتجة عن نشاط البكتيريا المثبتة للنايتروجين وبالتالي زيادة في الحنطة, اما بكتيريا الرايزوبيا فقد وجد إنها تنتج العديد من المواد الكيميائية التي تؤثر في نمو وتحفيز النبات وتحفيز بزوغ البذور وتشجع عملية التركيب الضوئي وبالتالي زيادة المجموع الخضري وزيادة إنتاج النبات (8).

تشير دراسة كفاءة اللقاحات البكتيرية مع حنطة الخبز في تجارب الاصص الة أن اللقاح البكتيري المتكون من *A. brasilense* والعزلة R12 من بكتيريا *R. leguminosarum* قد استطاعا معاً ان يوفرا الاحتياجات الغذائية لنبات الحنطة مع اضافة 50% من التوصية السمادية للسماد الكيميائي النايتروجيني.

وهذه النتائج تؤكد نتائج عدد من الباحثين مع ان اضافة مزيج بكتيريا الازوسبرلم والازوتوبكتر او مع فطريات المايكورايز بصورة منفردة أو مجتمعة تحسن من نمو عدد كبير من المحاصيل النجيلية من خلال تحسين حالة النايتروجين التغذوية النبات كنتيجة للتثبيت الحيوي للنايتورجين او في زيادة امتصاص الجذور للمغذيات او الى مقدرة البكتيريا المثبتة للنايتروجين في افراز عدد من منظمات النمو كالاوكسينات والجبرلينات وكذلك المواد المنشطة والمحفزة لامتصاص العناصر الصغرى كالحديد (9، 12).

المصادر

1- بشير، عفراء يونس (2003). التداخل بين المايكورايزا وبكتريا الازوتوبكتر والازوسبرلم وتأثيره في نمو وحاصل الحنطة. أطروحة دكتوراه, كلية الزراعة، جامعة بغداد– بغداد، العراق.

2- محمود، سعد علي تركي؛ محمد عبد الحافظ عبد الوهاب والعادي مبارك محمـــد (1977). مايكروبايولوجيـــا الاراضي. الطبعة الثانية، مكتبة الانكلو المصرية، القاهرة.

3- يوسف، امل نعوم وتركي مفتن سعد (1999). دور التسميد الحيوي بالبكتريا العقدية في تحسين نمو وإنتاجية محصول الماش والحنطة الذي يعقبه. مجلة الزراعة العراقية، 4(2): 119-130.

4- Al-Maadhidi, J. F. (1989) Isolation and characterization of *Azospirillum spp.* From Iraqi wheat cultivars. J. Univ. Kuwait Sci., 16: 343-348.

5- Bashan, Y.; H. Gina and E. Luz (2004). Azospirilluny plant relationship: Physiological, molecular, agricultural and environmental advance (1997-2003). National Research Council, Canada.

6- Beck, D.; F. Materon, and F. Afandi (1993). Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. (19), ICARDA, Syria.

7- Dakora, F.D. (2003). Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legume. new phytologist, 165 (1): 39–49.

8- Dakora, F. and S. Keya, (1997). Contribution of legumes nitrogen fixation to sustainable Agriculture in sub. Sahran Africa. Soil Biol. Biochem., 29: 809- 817.

9- Day, M. and J. Doberiener (1976). Physiological aspects of nitrogen fixation by *Azospirillum* from digitaria roots. Soil Biol., 8:45-50.

10- Dobereiner, J. and Baldani, V. (1981) Selective infection of the maize roots by streptomycin resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. Can. J. Microbiol., 25: 1264-1269.

11- Eaglesham, A.R. (1989). Nitrogen inhibition of root nodules symbiosis in doubly rooted soybean. Crop Sci., 29:115-119.

12- Fallik, E. and Y. Okon (1996). Inoculants of *A. brasillense*: Biomass production survival zea mays. Soil Biol. Biochem., 28: 123-126.

13- Hardarson, G. (1985). Biological nitrogen fixation of grain legumes. FAO / IAEA. Agricultural Biotechnology laboratory.

14- Krieg, N.R. and J. Dobereiner (1984). Genus Azospirillum In: Bergeys Mannual of Systematic Bacteriology, (1:94–104). Williams and Wilkins, Baltimore. London.

15- Lakshmana, M. (2000). Azotobacter inoculantion and crop productivity. In: Azotobacter in sustainable agriculture. Ch. 11 (ed). Narula, India.

16- Mulongoy, K. (1989). Technical Paper 2: Biological Nitrogen Fixation. FAO Corporative Document Repository.

17- Okon, Y.; S. Albert and R. Burris (1977). Methods for growing Spirillum for counting it in pure culture and in association with plants. Appl. Environ. Micrboil, 33: 85-88.

18- Phillips, D.; C. Joseph; G. Yang and H. Volpin (1999). Identification of lumichchrome as Sinorhizobium enhancer of altalfa root respiration and shoot geowth Acad. Sci. USA, 96: 12275-12280.

19- Rodrijues, O. (2000). Nitrogen translocation in wheat inoculated with Azospirillum and fertilized with nitrogen. Pesq. Agropec. Bras, 35 (7): 10-15.

20- Saubidet, M.; N. Fatta and A. Barneix (2000). The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. Plant Soil, 245:215-222.

21- Swdrzynska, D. (2000). Effect of inoculation with *Azospirillum brosilense* on development and yielding of winter wheat. Polish J. of Environ. Studies, 5(9): 423-428.

22- Terry, R.E. and S. Jolley (1994). Nitrogenase activity is required for the activation of iron in soybean. J. of Plant Nutrition, 17(8): 1417-1428.

23- Vincent, J.M. (1970). Amanual for the pratical study of root-nodule bactereia. IB Handbook. No. 15. Black wall Scientific Publication, Oxford.

24- Viviene, N.; K. Matriu and F. Dakora (2005). The rhizosphere signal molecules lumichrome alters seedlings development in both legumes and cereals. New Physiologist, 166(2): 439- 444.
25- Viviene, N.M. and F.D. Dakora (2004). Potential use of rhizobia as apromoter of land growth for increased yield in landraces of African cereal crops. African Journal of Bitechnology, 3(1): 1-7.
26- Weber, O; V. Baldani and J. Dobereiner (1999) Isolation and characterization of diazotrophs from banana and pine apples plant. Plant Soil, 210: 103-113.

USING A DAUL BACTERIAL INOCULANT AS BIO-FERTILIZER FOR IRAQI WHEAT

K.H. Motlag* M.T. Al-Kaisey** H.M. Al-Obaidy***

ABSTRACT

Twelve isolates of *Rhizobium spp.* were isolated from root nodules of four legumes plants (broad bean, mung bean, alfalfa and clover) from the middle of Iraq. Three different combinations of this isolates with the recommended bacterium (*A. brasilense*) were selected based on their efficiency in nitrogen fixation (root nodules number/plant) using tube culture technique and pots experiment with 50% chemical fertilization as manifested by plant growth parameters (dry weight, productivity and the percentage of protein in the seeds), compared to 100% chemical fertilization as control treatment.

The results showed that twelve isolates of *Rhizobium spp.* were isolated, four isolates from each of *R. leguminosarum* (broad bean and mung bean), *R. meliloti* (alfalfa) and *R. trifolii* (clover). Nitrogen fixation test (number of nodules/plant) showed that isolate RL2 from the bacterium *R. leguminosarum* isolate RM1 from the bacterium *R. meliloti* and isolate RT3 from *R. trifolii* were the superior recorded 16.3, 29.0 and 24.0 nodule/plant, respectively.

The dual inoculant of these superior isolates and recommended isolate of wheat *A. brasilense* (1:1) under 50% chemical fertilization, revealed that Az. +RL2 was the best one which induced significant increment in growth parameters dry weight 8.59 gm/pot seed protein percentage 12.83%, seed productivity 19.43 gm/pot compared to control (100% ehemical fertilization) which were 6.93 gm/pot and protein 12.3%, respectively.

Part of Ph.D.Thesis for the first auther

* Ministry of Sci. and Tech.- Baghdad, Iraq.
** Ministry of Agric.- Iraq, Baghdad.
***Collage of Agric.- Al-Koffa Univ.- Najef, Iraq.