أهمية المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis* في نمو نباتات الذرة الصفراء المخزنة لمدة ثلاثة اشهر من الاصابة بالفطرين *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus*

أ.د. سامي عبد الرضا علي **رملة احمد**

كلية العلوم / جامعة الكوفة

الخلاصة :-

عند زراعة الحبوب المعفرة بالمستحضر الحيوي بعد مرور (3) أشهر على خزنها أعطت نسب أنبات عالية وصلت الى 100 % مقارنه بمعاملة السيطرة والبالغة 83% مع انخفاض نسبة موت البادرات من 83% الى صفر عند استعمال المستحضر الحيوي بتركيز 20غم/كغم حبوب مع تواجد لقاح الفطر***A. niger*** .

و أظهر تقدير بعض العناصر المعدنية الصغرى والكبرى في أوراق النباتات الناتجة عن الحبوب المعاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 5 غم/كغم حبوب بعمر ثلاثة أسابيع زيادة في تركيز عناصر النتروجين والفسفور والحديد إذ وصلت الى 0.96 و 0.52 و 0.064 ملغم/لتر على التوالي . و حصلت زيادة في كمية الكلوروفيل a وb في أوراق النباتات الناتجة عن الحبوب المعاملة بتراكيز المستحضر الحيوي وكانت أعلى زيادة في كمية الكلوروفيل عند استعمال التركيز 20 غم/كغم حبوب أذ بلغت 5.3 و3.4ملغم /100غم على التوالي .

المقدمة Introduction:-

تقوم الاحياء المجهرية الموجودة بالتربة بوظيفة مهمة في تنظيم حركة المواد العضوية المتحللة وتوفير العناصر الغذائية المهمة للنبات مثل الفسفور والنتروجين والكاربون فضلاً عن أنها تجعل المكونات الغذائية بشكل لائق للنبات التي تؤدي الى زيادة المحاصيل وبشكل اقتصادي حيث ان السماد الحيوي Biofertilizer هو عبارة عن أحياء مجهرية تعمل على اتساع النظام الجذري وزيادة في انبات البذور، ويختلف السماد الحيوي عن السماد العضوي والكيميائي في ان تقنية إنتاجه تكون بسيطة وكلفة تجهيزه قليله فضلاً عن أن تأثيره على نمو النبات وحاصلة أفضل .(Chen،2006).

حيث استعملت سلالة بكتريا *B . Subtilis* FZB24 سماداً حيوياً لنبات القطن مما ادى الى زيادة في نمو نبات القطن وحاصل الياف القطن بنسبة 30% مقارنة مع السماد الاعتيادي الذي يحتوي على النتروجين والفسفور والبوتاسيوم ويعود السبب الى زيادة حجم النظام الجذري وتحريك الانزيمات في منطقة المحيط الجذري وكذلك الزيادة في كمية المغذيات المأخوذة (Yaoو جماعته،2006).

وفي دراسة تم فيها معاملة بذور الحنطة ببكتريا *Bacillus Subtilis* و*Azospirillum brasilense* وزراعتها لمعرفة تأثيرهما بوصفهما سماداً حيوياً تحت الظروف الحقلية حيث وجد بان استخدام هذه البكتريا ادى الى زيادة كبيرة في المساحة الورقية وتركيز الكلوروفيل فضلاً عن زيادة الناتج من حيث الكتلة الحيوية وحاصل الحبوب (Panwarو Ompal، 2000). وأشار Young وجماعته (2003) الى أن السماد الحيوي المتمثل ببعض أنواع البكتريا التابعة لجنس *Bacillus* سبب زيادة مقدارها 25% في نمو محصول الخس .

المواد وطرق العمل Materials and Methods:-

مستلزمات الدراسة :-

الأوساط الزرعية Culture media:

وسط أكار مستخلص البطاطا و الدكستروزPotato dextrose agar:-

حضر حسب طريقة Collee وجماعته (1996) وذلك بأخذ 200غم من البطاطا بعد غسلها وتقطيعها إلى قطع صغيرة وضعت في إناء معدني ثم أضيف إليها لتر ماء مقطر ،وغليت لمدة 20 دقيقة وبعدها رشحت بوساطة قطعة شاش نظيفة ثم أضيف إلى الراشح 20غم من سكر الدكستروز و15غم أكار وعقم بجهاز الموصدة لمدة 20 دقيقة بحرارة 121مْ تحت ضغط 1 جو، واستعمل الوسط في عزل الفطرين *A.niger* و *A.flavus* وتشخيصهما .

وسط مستخلص البطاطا والدكستروز Potato dextrose broth:

حضر بنفس الطريقة الواردة في الفقرة 3-1-3-1 لكن دون اضافة مادة الاكار إلى الراشح واستعمل هذا الوسط لغرض إكثار لقاح الفطرين *A.niger* و *A.flavus* . (Collee وجماعته ،1996).

حبوب الذرة الصفراء Yellow Corn seeds

جلبت حبوب الذرة الصفراء من الاسواق المحلية لمدينة النجف حيث استعمل محصول العروة الخريفية لعام 2007 لغرض عزل الفطريات الملوثة ، أما التجارب الخزنية فقد طبقت على محصول العروة الخريفية لعام 2008 **المادة الحيوية:-**

استعمل مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *B. subtilis* محملة على مادة كاربونات الكالسيوم **$CaCo_3$** تم الحصول عليه من مختبر بحوث الفطريات في قسم علوم الحياة /كلية العلوم.

طرائق العمل :-

عزل الفطرين *A.niger* و *A.flavus* وتشخيصهما من حبوب الذرة الصفراء:

جلبت حبوب الذرة الصفراء من مناطق مختلفة (النجف ،الكوفة ،أبوصخير والعباسية) ، عقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 3% لمدة 5 دقائق ، غسلت بعدها بماء معقم ، ثم جففت وزرعت في أطباق بتري حاوية على أكار مستخلص البطاطا والدكستروز (P.D.A) مع اضافة 48 ملغرام /لتر كلورامفينيكول لمنع نمو البكتريا ،وضعت خمس حبات في كل طبق أربع منها محيطية ، والخامسة في منتصف الطبق ،حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 مْ ±2 لمدة 7 أيام (ميخائيل وبيدر،1982). بعد انتهاء مدة الحضن تم حساب النسبة المئوية لظهور الفطر من خلال المعادلة التالية:-

$$\text{النسبة المئوية لظهور الفطر} = \frac{\text{عدد عينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$$

(Krebs،1978) ثم تم تنقية عزلتي الفطرين *A.niger* و *A.flavus* بنقل قرص من كل مستعمرة وزرعه على طبق حاوي على وسط P.D.A جديد ، كررت العملية عدة مرات ،شخصت العزلتان اعتمادا على الصفات التصنيفية التي وضعها Rapper وFennel (1965).

حفظ عزلتي الفطرين *A.niger* و *A.flavus*:-

نميت العزلتان في أنبوبتي اختبار تحوي كل منهما على وسط P.D.A بصورة مائلة وحضنتا بحرارة 25 مْ ± 2 ولمدة 7أيام ، حفظت في الثلاجة لحين استعمالها في التجارب المختبرية اللاحقة .

تحضير لقاح الفطرين *A.niger* و *A.flavus*:-

حضر الوسط الغذائي السائل P.D.B ووزع في دوارق سعة 500 مل وبمعدل 250 مل لكل دورق ، عقمت الدوارق في جهاز الموصدة ولقحت بأقراص من مستعمرة الفطر *A.niger* المنماة مسبقا على وسط P.D.A بعمر 7أيام ، وأجريت نفس العملية للفطر *A.flavus* وحضنت جميع الدوارق بحرارة 25 مْ ±2 لمدة 7 أيام لغرض استعمال اللقاح في التجارب المختبرية والخزنية اللاحقة .

اختبار كفاءة تراكيز مختلفة من المستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* في حماية حبوب الذرة الصفراء من الإصابة بالفطرين *A.niger* و *A.flavus* في المخزن:-

تم تهيئة 13.5 كغم من حبوب الذرة الصفراء انتاج العروة الخريفية لموسم 2008 حيث قسمت الحبوب على ثلاثة أقسام أساسية القسمين الاول والثاني يحتوي كل منهما على 6 كغم من الحبوب لوثت حبوب القسم الاول بلقاح الفطر *A.flavus* (3 x 10^5 بوغ / مل) وذلك بوضعها في كيس نايلون نظيف وأضيف اليها 25مل /كغم حبوب من معلق الفطر ثم رجت الاكياس لعدة مرات لغرض توزيع لقاح الفطر على اسطح الحبوب أما القسم الثاني فتم تلويثه بالاسلوب السابق نفسه باستثناء أضافة لقاح الفطر *A.niger*(3 x 10^5 بوغ / مل) بعد

الانتهاء مباشرة من تلويث الحبوب بلقاح الفطرين كلّ على حده عوملت الحبوب بتراكيز المستحضر الحيوي حيث قسمت كمية الحبوب (6)كغم والملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* على أربعة اقسام ثانوية وضع كل منها (1.5كغم) في كيس نايلون نظيف ومعقم حيث أضيفت تراكيز المستحضر الحيوي (5 و10و20) غم/كغم وكلّ على حده الى حبوب كل كيس من الاكياس الثلاثة ثم رجت جيدا لتوزيع المستحضر الحيوي على أسطح الحبوب، بعد ذلك وزعت محتويات كل كيس من الحبوب الملوثة بلقاح الفطر والمعاملة بتركيز المستحضر الحيوي على ثلاث عبوات من البولي فيانيل كلورايد(p.v.c) (poly vinyl chloride) وبكمية 500غم /عبوة وبواقع ثلاث مكررات.أما القسم الثانوي الرابع من الحبوب فلم يتم معاملته بالمستحضر الحيوي وهو الاخر وزع على ثلاث عبوات وبنفس الكمية المذكوره سابقا نفسها.نفذت الخطوات السابقة نفسها على الحبوب الملوثة بلقاح الفطر *A.niger*اما القسم الرابع من الاقسام الاساسية غير معاملة لا بلقاح الفطر ولا بالمستحضر الحيوي

ت	رمز المعاملات	التوصيف
-1	**B0+A.N**	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* دون أضافة المستحضر الحيوي
-2	**B5+A.N**	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 5 غم /كغم حبوب
-3	**B10+A.N**	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 10 غم /كغم حبوب
-4	**B20+A.N**	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 20 غم /كغم حبوب
-5	**B0+A.F**	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* دون أضافة المستحضر الحيوي
-6	**B5+A.F**	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 5 غم /كغم حبوب
-7	**B10+A.F**	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 10 غم /كغم حبوب
-8	**B20+A.F**	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.flavus* معاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 20 غم /كغم حبوب
-9	**Control**	حبوب بدون تلويث بلقاح الفطر وغير معاملة بالمستحضر الحيوي

(محسن،2006) وبذلك تكون المعاملات المستعملة في التجربة كالاتي:-

وبعد مرور ثلاثة أشهر من خزن الحبوب تم حساب وتقدير مايلي :-

تقييم كفاءة و نشاط المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* على نباتات الذرة الصفراء الناتجة من الحبوب المعاملة بالمستحضروالمخزنة لمدة ثلاثة أشهر :-

لغرض التعرف على اثر المستحضر الحيوي وفعاليته في حال زراعة الحبوب في التربة تم تهيئة 27 أصيص قطر 10 سم ملئت بتربة مزيجية غير معقمة قسمت على ثلاث مجموعات تضم كل من المجموعتين الاولى والثانية (12) اصيص ، المجموعة الاولى من الاصص تم زراعتها بحبوب الذرة الصفراء الملوثة بلقاح الفطر*A.flavus* والمعاملة بتراكيز المستحضر الحيوي0و5و10و20 غم/كغم والمخزنة لمدة ثلاثة أشهر وبواقع ثلاث حبوب لكل أصيص وكررت عملية الزراعة في أصص ثلاثة لكل تركيز (مكررات) اما المجموعة الثانية من الاصص فتم زراعتها بالاسلوب الوارد في أعلاه نفسه باستثناء زراعة الحبوب الملوثة بلقاح الفطر *A.niger* المعاملة بالمستحضر الحيوي وبالتراكيز أعلاه نفسه .اما المجموعة الثالثة فتمثلت معاملة المقارنة و تضم ثلاثة أصص زرعت بحبوب لم يتم معاملتها بأي شئ وضعت جميع الاصص في غرفة النمو growth champer (المعموري ، 2008) وتم متابعة وحساب مايلي :-

النسب المئوية للانبات :

حسبت هذه النسبة بعد 10 ايام من زراعة بذور الذرة الصفراء وذلك بحساب عدد البذور النابتة وفقا المعادلة الاتية :-

$$\text{النسبة المئوية للانبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{} \times 100$$

العدد الكلي للبذور المزروعة

النسب المئوية لموت البادرات :

حسبت هذه النسبة بعد 10 ايام من الانبات لنبات الذرة الصفراء وذلك بحساب عدد البادرات الميتة واستخرجت النسب المئوية لموت البادرات على وفق المعادلة الاتية :-

عدد البادرات الميتة

النسبة المئوية لموت البادرات = ــ×100

العدد الكلي للبادرات النابتة

مؤشرات النمو :

حسبت بعد 3 اسابيع من الانبات لنبات الذرة الصفراء ، وتضمنت مؤشرات النمو :

تقدير كمية الكلوروفيل aو b:

استخدمت طريقة Harboren (1973) مع إجراء بعض التحويرات الطفيفة عليها لتقدير كمية كلوروفيل a و b وذلك بأخذ وزن 0.5غم من نصل الورقة وقطع الى قطع صغيرة بسكين حادة ومعقمة ثم سحق بهاون خزفي مع إضافة كمية قليلة من كاربونات الكالسيوم Caco3 لتسهيل عملية الاستخلاص . بعدها أضيف 20 مل اسيتون 80% بعدها استمرت عملية السحق ولمدة 10 دقائق ثم رشح الخليط بواسطة قطعة من الشاش المعقم . جمع المستخلص واعيد الراسب الى الهاون الخزفي واضيف 15 مل اسيتون 80% وكررت الخطوات السابقة نفسها بعدها جمع المستخلص الكلي ورشح عبر ورق ترشيح نوع Whatmman No.1 مثبت في قمع زجاجي محمول على بيكر زجاجي مدرج بعدها أكمل حجم الراشح بعد انتهاء عملية الترشيح الى 10 مل اسيتون 80% .استخدم جهاز قياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer من نوع (Div spectronic (Analytical systems 20.تم تعيير الجهاز بواسطة الاسيتون ثم قدر الكلوروفيل بنوعيه على الطول الموجي 663 و646 وحسب مقدار الكلوروفيل a, b و كالأتي: -

$$\textbf{chl.b gm \ L} = 12.12(Ab663) - 2.81(Ab646)$$

$$\textbf{chl.a gm \ L} = 20.13(Ab646) - 5.03(Ab663)$$

ثم حسبت كمية الكلوروفيل لكل 100 غم من النسيج النباتي وذلك با ستخدام المعادلة التالية والموضحة من قبل Zaehringer وجماعته (1974)

$$\textbf{Mg \100gm} = \frac{\text{Gm \L}}{\text{1000 ml}} \times \frac{\text{100 g}}{\text{sample w (g)}}$$

تقدير بعض العناصر الكبرى والصغرى :-

تم تقدير بعض العناصر المغذية الكبرى والصغرى في النباتات بعمر (3)أسابيع والناتجة من انبات الحبوب المعفرة بالمستحضر الحيوي بتركيز 5غم /كغم حبوب:-

تقدير تركيز عنصر النتـــروجين:-

تم وزن (0.2) غم من المادة الجافة المطحونة للاوراق الوسطية ولكل معاملة من المعاملات الخزنية. ووضعت في انبوبة الهضم (Digestion tube).اضيف لها 5 مل من حامض الكبريتيك المركز (99%) و2 مل من حامض البركلوريك المركز كعامل مساعد . بعدها اضيف خليط من املاح الهضم بوزن 1غم (K2SO4و SeSO4 و CuSO4).ووضعت الانابيب على مسخن وتم رفع درجة الحرارة تدريجيا الى (450) م° (الى ان اصبح المحلول ازرق).بردت الانابيب واكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر . ثم اخذ من هذا

الحجم 10 مل ووضعت في انبوبة التقطير .واضيف له 10 مل من هيدروكسيد الصوديوم ذو تركيز (40%).ووضعت الانبوبة في جهاز تقطير النتروجين . بعد تشغيل الجهاز وبدء ضخ بخار الماء تم جمع الامونيا المتحررة من النموذج في بيكر يحوي على 25 مل من حامض البوريك بتركيز (2%) مع قطرتين من خليط دلائل Bromo Cresal و Green Methyl red المذابتان في الايثانول. تم جمع الامونيا حتى اصبح حجم حامض البورك 50 مل ثم اوقفت عملية التقطير . سحح حامض البورك الحاوي على الامونيا مع حامض الهيدروكلوريك (0.01N).

حسب حجم الحامض المستهلك (Jackson ،1958) وتقدر نسبة النتروجين حسب المعادلة:-

$$\%N = \frac{\text{حجم HCL المستهلك} \times \text{العيارية} \times 0.014 \times \text{حجم التخفيف}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

تقدير تركيز عنصر الفسفور:-

وزنت (0.5) غم من العينة المجففة والمطحونة للاوراق للنباتات الناتجة من كل معاملة من المعاملات الخزنية. بعدها تم اذابة العينة في 5 مل من حامض الكبريتيك و2مل من حامض البروكلوريك. وتم استخدام موليبيدات الامونيوم وحامض الاسكوربيك (الطريقة اللونية وتم القياس باستخدام جهاز الطيف الضوئي على طول موجي 700nm.(ابراهيم وجماعته،2000).

تقدير تركيز عنصر البوتاسيوم :-

أخذ 50 ملغم من المادة الجافة المطحونة للاوراق الوسطية للنباتات الناتجة من حبوب المعاملات الخزنية وكلا على حده. واضيف لها 5 مل من محلول حامض النتريك المركز . وتم هضم بدرجة حرارة 180م الى ان اكتملت عملية الهضم . ثم جفف الناتج على درجة الحرارة 370م لمدة خمسة ساعات . بردت العينة واضيف لها 22.5 مل الماء المقطر خالي من الايونات. وتم قياس تركيز البوتاسيوم باستخدام المطياف اللهبي (اخذت القراءة من الجهاز مباشرة) (ابراهيم وجماعته،2000).

تقدير تركيز عنصر الحديد :-

تم تجفيف العينة وطحنها وجعل النموذج على شكل مسحوق ورقي بحيث يمثل النباتات الناتجة عن الحبوب المخزنه . بعدها اخذ 1 غم من العينة وأضيف اليها 10 مل من خليط حامضي (5 مل حامض النتريك و 2 مل حامض البروكلوريك و 1 مل حامض الكبريتيك). ثم سخن الخليط حتى درجة 75 م . بخر الخليط حتى 0.5 مل ثم خفف المتبقي الى 25 مل بالماء المقطر .ووضع في دورق حجمي ثم تم تقديره في جهاز الامتصاص الذري على طول موجي 248.3 نانوميتر(ابراهيم وجماعته،2000).

النتائج والمناقشة :-

تقييم نشاط وفعالية المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* المعفر لحبوب الذرة الصفراء في التربة بعد نهاية ثلاثة أشهر من الخزن:-

نسب الانبات :-

أثر الفطران *A.flavus* و *A.niger* في حيوية حبوب الذرة الصفراء المخزنة كما هو مبين في جدول (1) حيث انخفضت نسبة الانبات الى 33% و16% على التوالي على حين ارتفعت نسبة الانبات في الحبوب المعاملة بالمستحضر الحيوي الى 100 % عند استعمال تركيز (10 غم/كغم)حبوب. ان احد اهم الاسباب التي ادت الى رفع نسب الانبات في الحبوب المعاملة بالمستحضر الحيوي هو كفاءة المستحضر الحيوي في حماية الحبوب من الاصابة بالفطرين *A.flavus* و *A.niger* حيث تشير نتائج نسبة

الاصابة الى قدرة هذا المستحضـــر على توفر حماية تامة من الاصابة بهمـــا، ويمكن القـــول من خلال نتائج انبـــــات المعاملـــة الحبوب أن

المعاملات	نسبة الانبات (%)
B0+A.N	16.5
B5+A.N	83
B10+A.N	100
B20+A.N	100
B0+A.F	33
B5+A.F	91.5
B10+A.F	100
B20+A.F	100
Control	83
$L.S.D_{(0.05)}$	18.49

بالمسـتحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* حفزت الانبات من خلال قدرة المستحضر الحيوي على رفع نسبة الانبـات من 83% في الحبوب السليمة وغير المصـــابة بأي من الفطرين (مقارنة) الى 100 % وهذا ربما يعود الى أمكانية البكتريا *B. subtilis* على افراز هرمونات محفزة للانبات ، وهناك أدلـــــــة قاطعة أثبتتـــها أكثـــر من دراســـة قدرة بعض أنواع جنس البكتريا *Bacillus* كبكـــتريا *B.cereus* و *B. Circulans* على افراز هرمونات الجبرلينـــات و حامض الاندول Indol Acetic Acid و الزياتين (الجميلي وموسى ، 2008) و لهذه الهرمونات اثر في انبات البذور اذ ان البذور تكون محـــــاطة بطـبقة رقيقة من خـــلايا حية غنية بالبروتين تسمى طبقـــــــة aleuron Layer وهذه الطبقـــة تحفز بواسـطة الجبرلينات لتكوين الانزيمات المحللة والتي تهضم النشا والبروتين كأنزيمـــات α-amylase وamylase- β وانواع مختلفة من protease التي تحولهـــا الى مواد بسيـــطة وذائبـــة تستـــعمل لتغذية الجنين (محمد واليونس ،1991)..

الجدول (1): تأثير تراكيز المستحضر الحيوي في النسبة المئوية لانبات حبوب الذرة الصفراء المزروعة.

نسب موت البادرات :-

أشارت نتائج هذا الاختبار والمبينة في الجدول (2) الى ان جميع تركيزات المستحضر الحيوي ذات نتائج جيدة في خفض معدلات نسب موت البادرات ، وجاء التركيز (10و 20) غم/كغم حبوب في مقدمة تلك

التراكيز في خفض معدلات الموت اذ بلغت 0 % ولكلا الفطرين في حين ارتفعت هذه النسبة الى 16.5% و8.25% في حال التراكيز 5 غم/كغم حبوب للفطرين *A.niger* و *A.flavus* على التوالي.

الجدول (2): تأثير تراكيز المستحضر الحيوي في النسبة المئوية لموت البادرات في حبوب الذرة الصفراء المزروعة.

وقد يعود سبب تفوق التركيزين 10 و20 غم/كغم على بقية التراكيز المستعملة الى زيادة اعداد البكتريا في منطقة المحيط الجذري (Rhizosphere) وبالتالي توفيرها حماية أفضل ، فقد ذكر عبد الرضا وجماعته (2004) ان الاصابة بالفطر *Fusarium oxysporum* تتناسب عكسيا مع

المعاملات	نسبة موت البادرات (%)
B0+A.N	83
B5+A.N	16.5
B10+A.N	0
B20+A.N	0
B0+A.F	66.5
B5+A.F	8.25
B10+A.F	0
B20+A.F	0
Control	16.5
$L.S.D_{(0.05)}$	26.54

تركيز لقاح البكتريا *Pseudomonas putida* فكلما زادت كمية لقاح البكتريا قلت نسبة الاصابة ، فزيادة كميات المستحضر الحيوي تعني زيادة في أعداد البكتريا في منطقة الجذور المتأثرة Rhizosphere واشارت كثيرٌ من الدراسات والبحوث الى أن القدرة التثبيطية لهذه البكتريا تأتي من قدرتها على انتاج المضادات الحيوية Surfactin و Mycosubtilin و Fengycin التي لها الفعالية العالية على تثبيط العديد من الفطريات المرضية ،(Akpa و جماعته،2001;Kinsinger وجماعته ،2003 ; Leclere وجماعته ،2005)و انها تمتلك القدرة على انتاج بعض الانزيمات كأنزيم Chitinase المحلل لمادة الكايتين وهو المكون الاساسي لجدران خلايا معظم الفطريات الراقية ومنها الناقصه (Prakashو Podil, 1996)

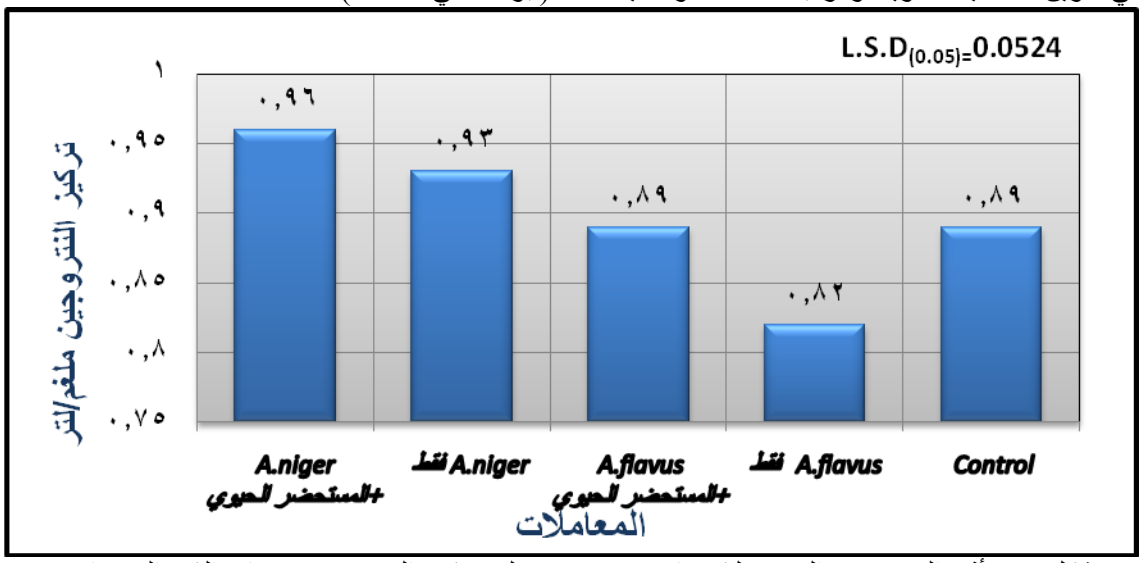
تقدير كميات بعض العناصر الكبرى والصغرى:-

عنصر النتروجين :-

اوضحت النتائج المبينة في الشكل (1) ان اعلى تركيز للنتروجين كان في النباتات المعاملة بالفطر *A.niger* والمستحضر الحيوي ومعاملة الفطر *A.niger* فقط اذ بلغت0.96 و0.93ملغم/لتر على التوالي بتفوق عالي المعنوية على المعاملات الاخرى، تلتها النباتات المعاملة بالفطر *A.flavus* والمستحضر الحيوي ومعاملة الفطر *A.flavus* فقط ومعاملة المقارنة اذ بلغت التراكيز 0.89 و0.82 و0.89 ملغم /لتر على التوالي.

وقد يعود سبب تفوق معاملة الفطر والمستحضر الحيوي الى اثر البكتريا المعروف في تجهيز النبات بعنصر النتروجين فضلاً عن العناصر الغذائية الاخرى .فقد ذكر Yao وجماعته (2006) ان البكتريا *B. subtilis* FZB24 وفرت العناصر الغذائية المهمة لنمو النبات مثل الفسفور والنتروجين والكاربون فضلاً عن انها تزيد من جاهزية العنصر من لدن النباتات وبالتالي زيادة في كمية المغذيات المأخوذة.

أو قد يعود السبب الى قدرة البكتريا على تثبيت النتروجين الجوي مباشرة . او الى زيادة جاهزية عنصر النتروجين للنباتات من خلال تشجيعها لنمو العديد من الاحياء المجهرية في التربة كالبكتريا المثبتة للنتروجين Rhizobial والفطريات المرافقة للجذور (Garbaye ، 1994; Mcspadden-Gardener، 2004).و يعمل هذا المستحضر الحيوي على حماية جذور النباتات من الاضرار الناجمة عن الفطر والمتمثلة بقتل وتحليل كلي أو جزئي للمجموع الجذري للنبات ومن ثم تنمو الجذور بصورة طبيعية في التربة مما يزيد من فعاليتها في امتصاص العناصر الغذائية كالنتروجين والفسفور . يقوم النتروجين بوظيفة مهمة في النبات وذلك من خلال زيادة النموات الخضرية كما انه يقوم العديد من الوظائف الفسلجية المهمة للنبات حيث انه يدخل في تكوين البروتين والاحماض النووية و الكلوروفيل والانزيمات والفيتامينات والهرمونات النباتية و انه يدخل في تكوين الاغشية الخلوية ومركبات الطاقة والاميدات . (ابو ضاحي ،1989)



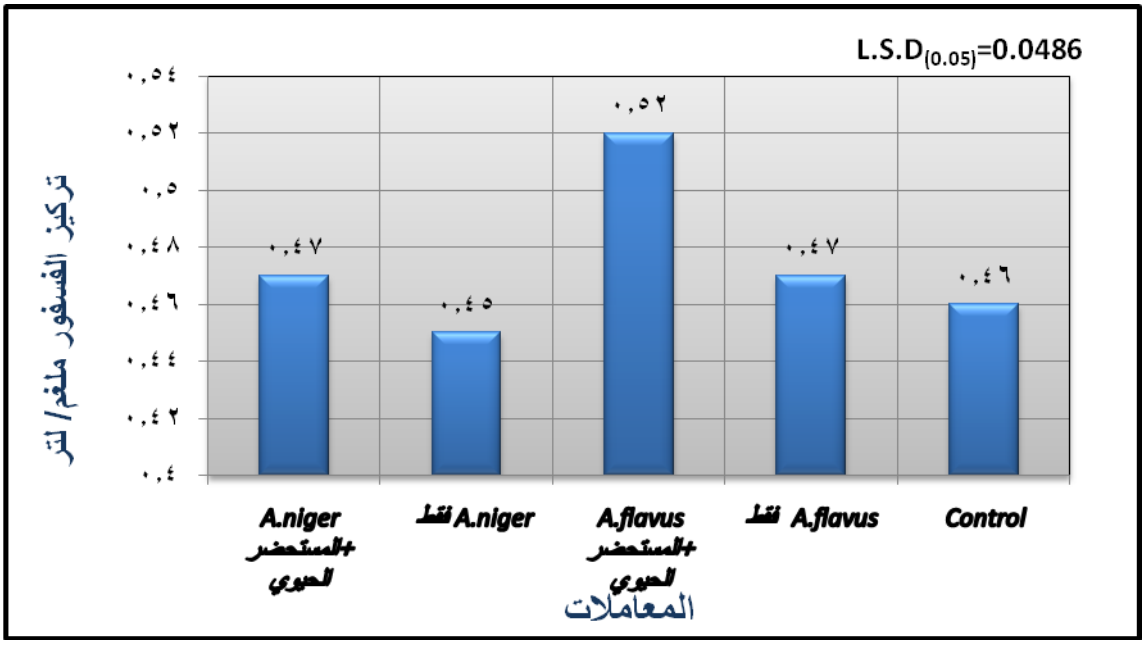
شكل (1) تأثير المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* على تركيز النتروجين في نبات الذرة الصفراء

عنصر الفسفور :-

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي في الشكل (2) ان اعلى تركيز لعنصر الفسفور كان في النباتات المعاملة بالفطر *A.flavus* والمستحضر الحيوي والمعاملة بالفطر *A.niger* والمستحضر الحيوي اذ بلغت التراكيز 0.52 و0.47 وملغم /لتر على التوالي ،بتفوق معنوي على المعاملات الاخرى ،كما اظهرت المعاملات *A.flavus* فقط و*A.niger* فقط فروقاً معنوية عن معاملة المقارنة اذ بلغت التراكيز 0.47 و0.45 و0.46 ملغم/لتر على التوالي.

تعود الزيادة الحاصلة في نسبة الفسفور لاوراق النباتات المعاملة بالمستحضر الحيوي الى قدرة البكتريا *Bacillus subtilis* على زيادة جاهزية عنصر الفسفور عن طريق قدرتها على تحليل الصخور الغنية بالفسفور ، أوعن طريق زيادة تركيز بعض الايونات على سطح الجذور نتيجة تواجد أنواع البكتريا المشجعة للنمو ومنها *B. subtilis* مما يزيد من امتصاص العناصر المغذية الاخرى ومنها الفسفور (Glick، 1995 ؛ Bertr وجماعته ،2000).فقد ذكر Yao وجماعته (2006) ان البكتريا *B. subtilis* FZB24 وفرت العناصر الغذائية المهمة لنمو النبات مثل الفسفور والنتروجين والكاربون فضلاً عن انها تجعل العناصر الغذائية بشكل جاهز للنبات وبالتالي زيادة في كمية المغذيات المأخوذة.حيث يؤدي الفسفور وظائف مهمة للنبات حيث يكون الاسترات مع مجاميع الهيدروكسيل و انه يدخل مع النتروجين في بناء الاغشية الخلوية وتكوين مركبات الطاقة والاحماض الامينية و انه يخزن في الاعضاء الثمرية في البذور على هيأة الفايتين (phytin)

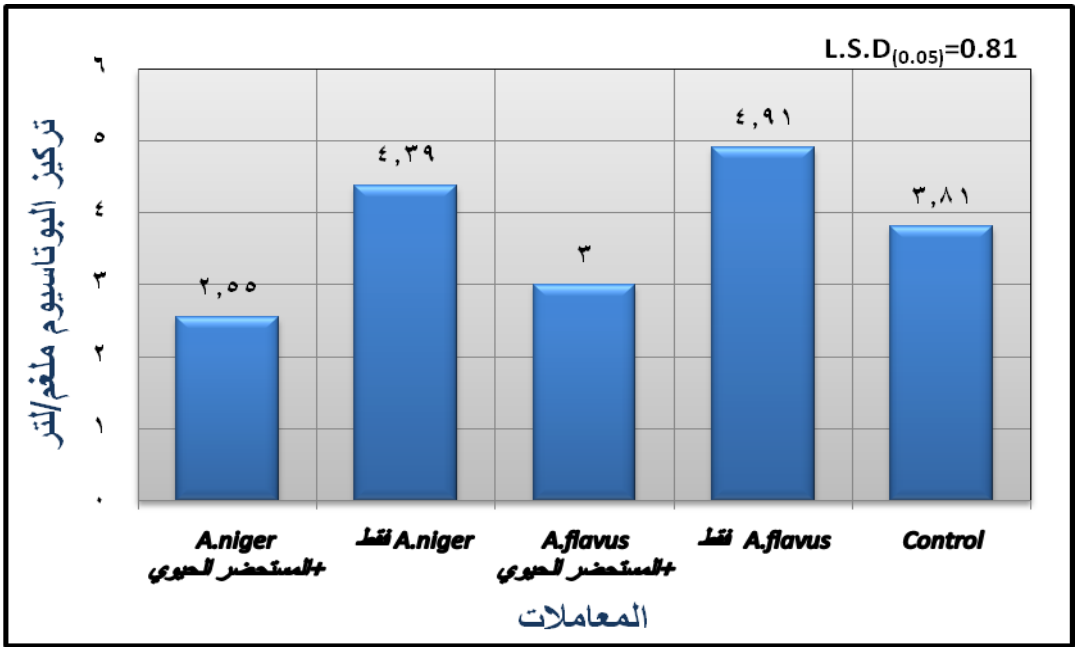
وهو ملح الكالسيوم والمغنسيوم لحامض الفاتيك phytic acid اذ ان الفايتين لـه أثر مهم في عملية الانبات (ابو ضاحي، 1989).



شكل (2) أهمية المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* في زيادة تركيز عنصر الفسفور في نبات الذرة الصفراء.

عنصر البوتاسيوم:-

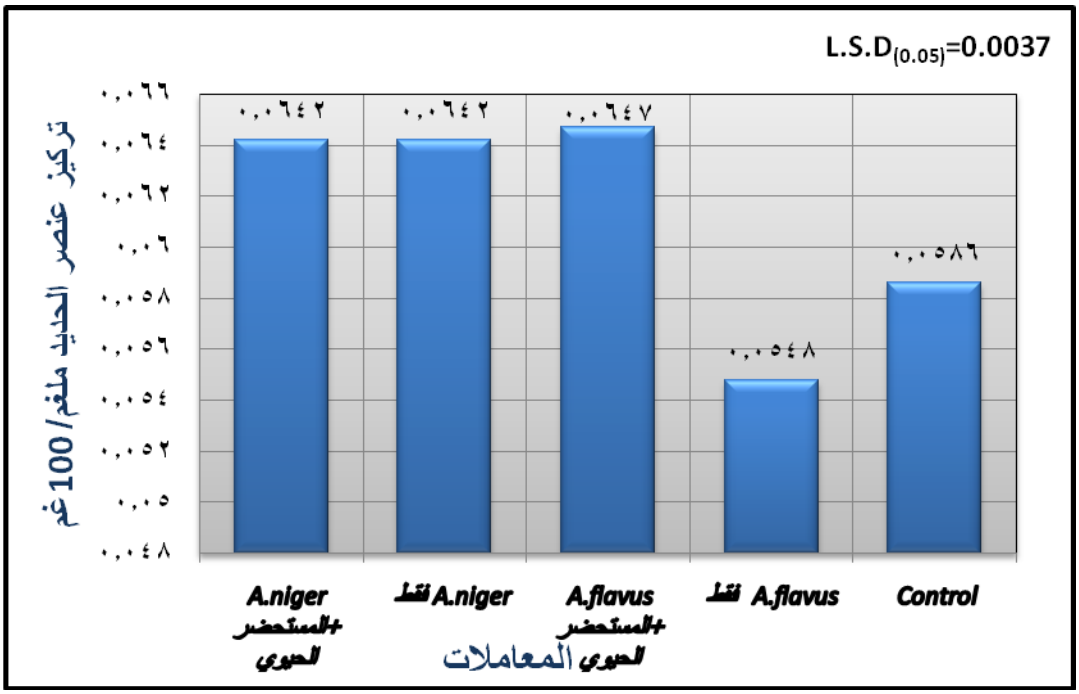
يتضح من الشكل (3) وجود اختلاف معنوي في تركيز عنصر البوتاسيوم اذ بلغت تراكيز عنصر البوتاسيوم في النباتات المعاملة بالفطر *A.flavus* فقط و*A.niger* فقط 4.91 و 4.39 ملغم /لتر على التوالي .تلتها نباتات المقارنة دون أي معاملة بتركيز 3.81 ملغم/لتر. أما النباتات المعاملة بالفطر*A.flavus* والمستحضر الحيوي والمعاملة بالفطر *A.niger* والمستحضر الحيوي فقد بلغت التراكيز فيها 3 و 2.55 ملغم /لتر على التوالي. ان السبب في انخفاض نسبة البوتاسيوم في هاتين المعاملتين قد يعود الى عدم توفر الاليـــــات لدى البكتريا *B. subtilis* على زيادة جاهزية عنصر البوتاسيوم للنباتات .



شكل (3) تأثير المستحضر الحيوي لبكتريا*B. subtilis* تركيز عنصر البوتاسيوم في نبات الذرة الصفراء.

عنصر الحديد:-

يتضح من الشكل (4) أن اعلى تركيز لعنصر الحديد كان في المعاملات بالفطر *A.niger* والمستحضر الحيوي ومعاملة الفطر*A.niger* فقط والمعاملة بالفطر*A.flavus* والمستحضر الحيوي اذ بلغت جميعا 0.064ملغم /لتر ،تلتها المعاملة بالفطر *A.flavus* فقط ومعاملة المقارنة اذ بلغت 0.0586 و0.0548 ملغم /لتر على التوالي.



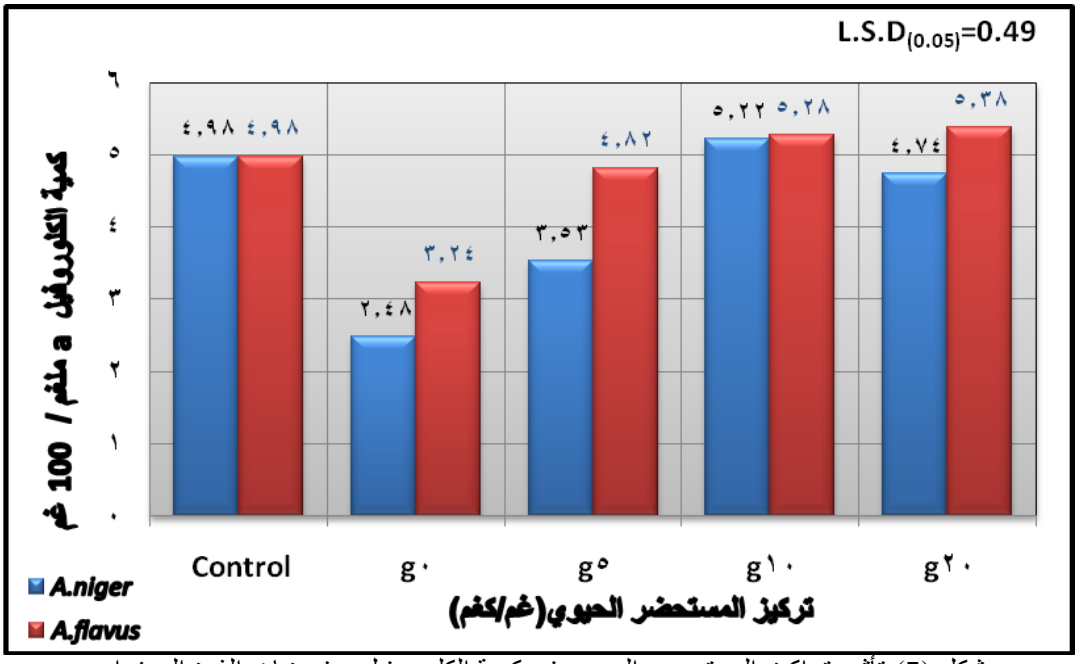
شكل (4) دور المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* في تركيز عنصر الحديد في نبات الذرة الصفراء.

وتظهر النتائج عدم ايجابية المستحضر الحيوي مع الفطر *A.niger* في زيادة نسبة الحديد في النباتات عنها في معاملة *A.niger* بمفردة وهذا يعني ان التأثير يعود الى الفطر وليس الى المستحضر الحيوي على حين كان للمستحضر الحيوي اثرٌ واضح في زيادة العنصر في معاملة الفطر *A.flavus* والمستحضر الحيوي .

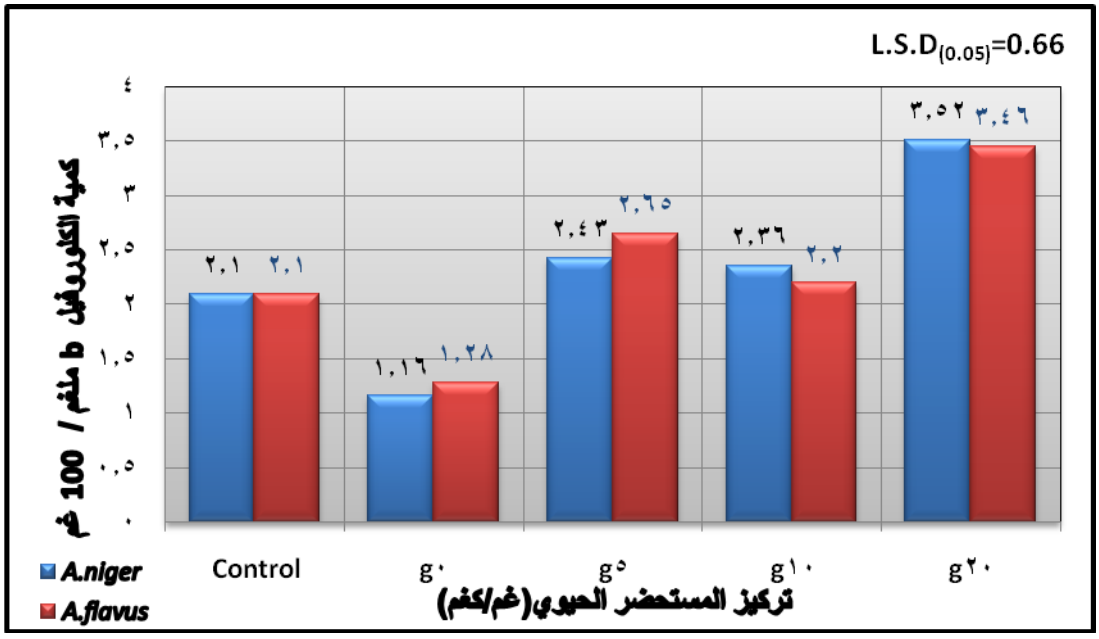
تقدير كمية الكلوروفيل a و b:-

اثرت جميع تراكيز المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis* ايجابيا في زيادة كمية الكلوروفيل a في اوراق نباتات الذرة حيث بلغت في النباتات الناتجة عن الحبوب الملوثة بالفطر *A.flavus* والمعاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 20 غم/كغم حبوب 5.36 ملغم/100 غم تلتها النباتات الملوثة بنفس الفطر والمعاملة بالمستحضر الحيوي بتركيز 10غم/كغم وبكمية 5.28 ملغم/100 غم ،اما كمية الكلوروفيل في النباتات الناتجة عن الحبوب الملوثة بلقاح الفطر*A.niger* والمعاملة بالمستحضر الحيوي بالتراكيز المختبرة (5 و 10 و20)غم/كغم فكانت (3.5 و5.2و4.7)ملغم /100غم على التوالي مقارنة بالنباتات الناتجة عن حبوب ملوثة بالفطر نفسه وغير معاملة بالمستحضر الحيوي والبالغة 2.4 ملغم /100غم (شكل 5) وعند استعراض نتائج تأثير المستحضر الحيوي في كمية الكلوروفيل b في النباتات المعاملة بالمستحضر الحيوي والملوثة بالفطرين *A.flavus* و*A.niger* نجدها زادت عن كميتها في النباتات الناتجة عن الحبوب الملوثه بالفطرين كلٍّ على حده والخالية من المستحضر الحيوي اذ بلغت عند التركيز 20 غم/كغم حبوب (3.52 و3.46)ملغم/ 100غم في حين كانت عند التركيز (صفر /كغم)(1.28و1.16) ملغم/ 100غم .(شكل 6). وقد يعزى سبب الزيادة الحاصلة في كمية الكلوروفيل الكلي في اوراق النباتات المعاملة بالمستحضر الى قدرة البكتريا *B. subtilis* على توفير كميات أضافية من العناصر المغذية وهذا ما أثبتته هذه الدراسة في الفقرة السابقة التي أكدت على زيادة عدد من العناصر المعدنية المختلفة التي بدورها تنعكس على زيادة كمية الكلوروفيل فزيادة نسبة النتروجين يزيد من تصنيع الكلوروفيل اذ ان (70%) من نتروجين الورقة يدخل في تركيب هذه الصبغة وان

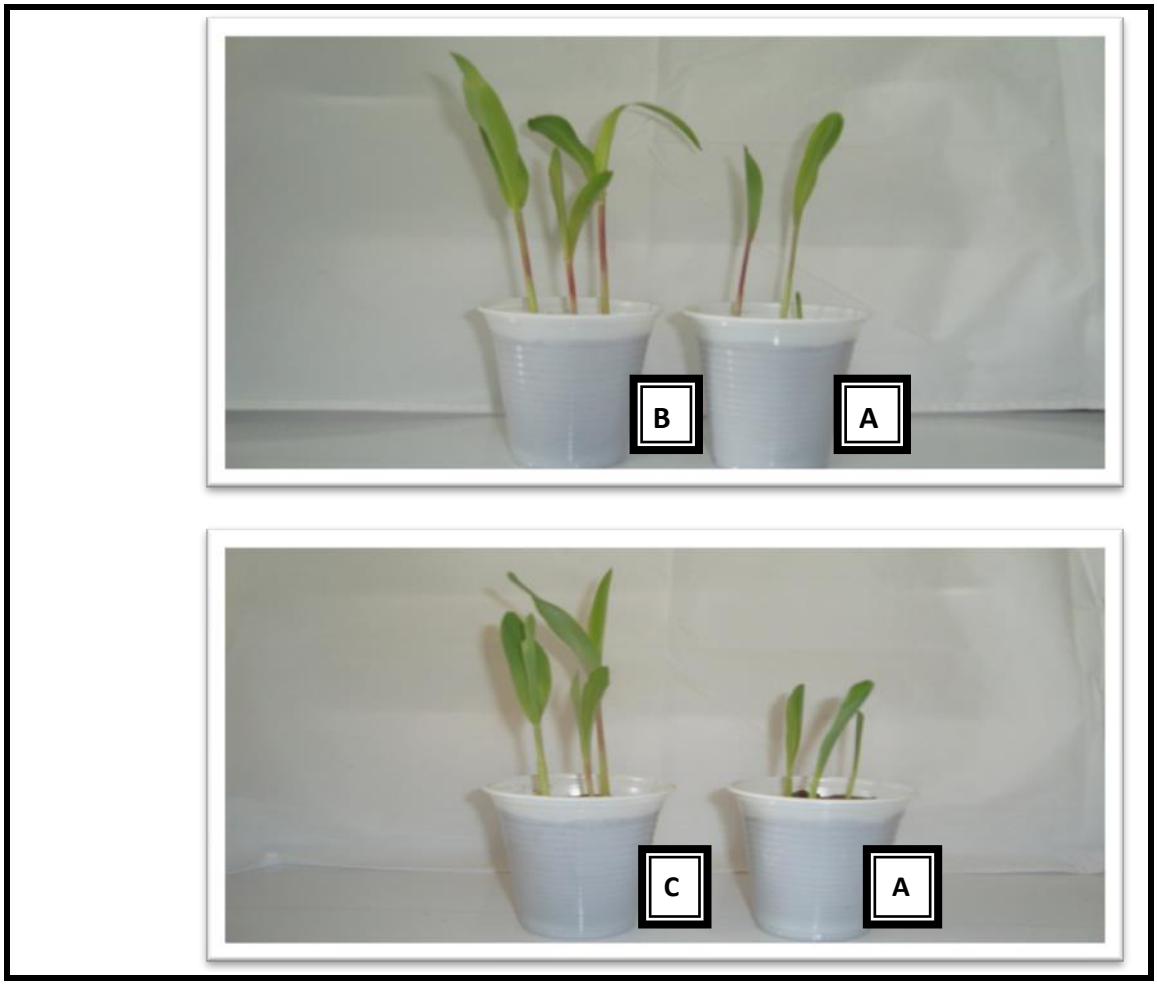
البلاستيدات الخضر تحتوي على اكثر من نصف المحتوى الكلي للنتروجين (الصحاف،1989) أما الحديد فإن له أثر فعال في زيادة محتوى الكلوروفيل من خلال تأثيره في زيادة أعداد وأحجام البلاستيدات الخضر ، أذ بين Guller وKracko (1993) أن للحديد اثر مهم في العمليات الخاصة بتخليق الكلوروفيل وزيادة أعـداد الكرنا في البلاستيدات الخضر من خلال تأثيره في فعاليات الأكسدة والاختزال الخاصة بتكوين الكلوروفيل وأشار محمد (2002) الى أن الحديد يشترك في وظائف العمليات الحيوية المهمة للنبات عن طريق دخوله عاملاً مساعداً في تكوين الكلوروفيل للنبات كأشتراكه في المركبات الحيوية المهمة مثل السيتوكرومات (cytochromes) التي تدخل في عمليتي البناء الضوئي والتنفس وكذلك مركب freedoxin المهم في عملية البناء الضوئي وعملية الاختزال النترات الى أمونيا (nitrate reduction) و ان لزيادة عنصر البوتاسيوم في الاوراق أهمية في زيادة البلاستيدات الخضر ونقصه يؤدي الى هدمها (الصحاف،1989) وهذا ما أشار اليه Ompal و Panwar (2000) في دراسة تم فيها معاملة حبوب الحنطة ببكتريا *B. Subtilis.* و*Azospirillum brasilense* وزراعتها لمعرفة تأثيرهما في تحسين نمو النبات تحت الظروف الحقلية اذ وجد بان استخدام هذه البكتريا ادى الى زيادة كبيرة في المساحة الورقية وتركيز الكلوروفيل فضلاً عن زيادة الناتج من حيث الكتلة الحيوية وحاصل الحبوب .و أشارت الملاحظات العيانية لطبيعية نمو النباتات الناتجة من الحبوب المعاملة بالتراكيز المختلفة من المستحضر الحيوي الى وجود تحسن جيد في نمو النباتات مقارنة بالنباتات الناتجة من البذور غير المعاملة بالمستحضر الحيوي (صور 1و2).

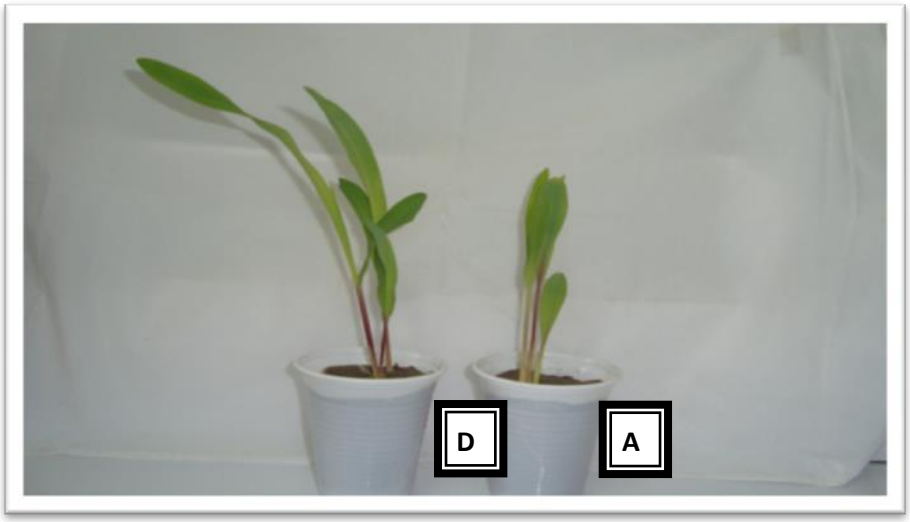


شكل (5):تأثير تراكيز المستحضر الحيوي في كمية الكلوروفيل a في نبات الذرة الصفراء.



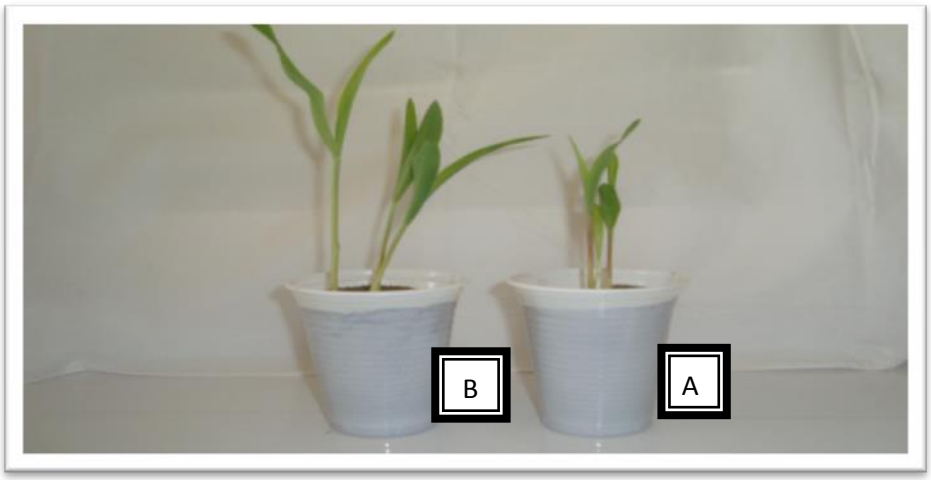
شكل (6):تأثير تراكيز المستحضر الحيوي في كمية الكلوروفيل b في نبات الذرة الصفراء.

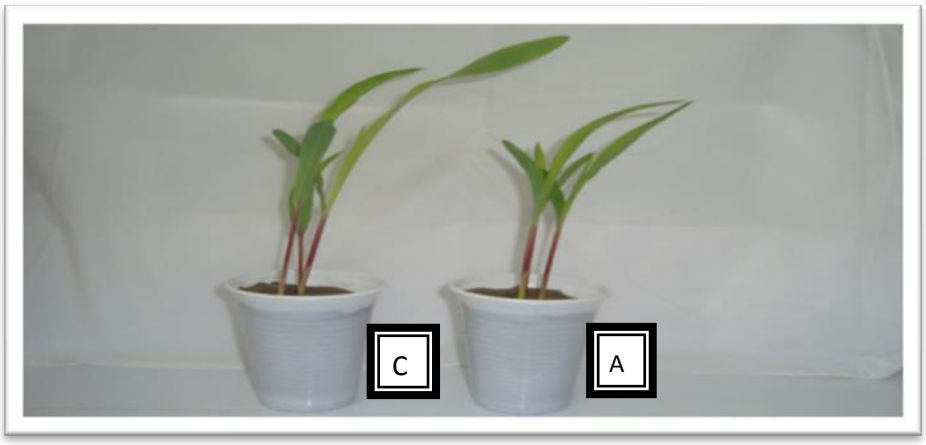


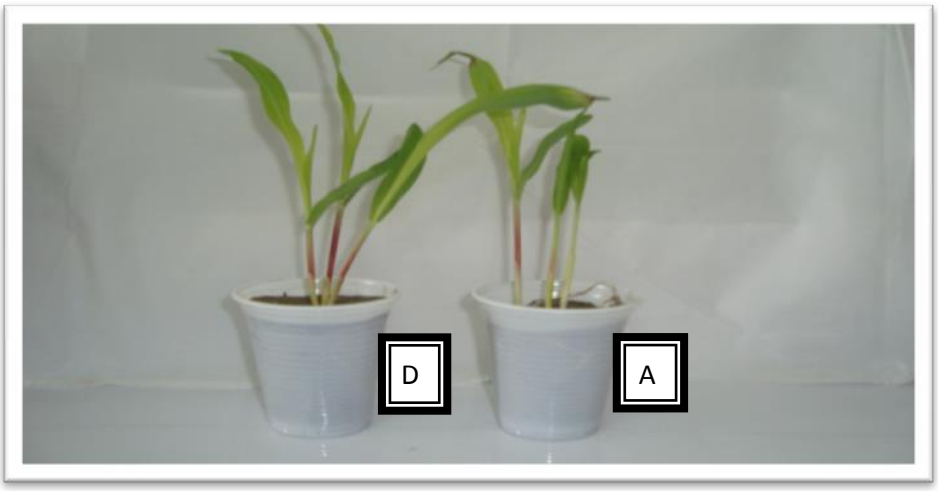


صورة (1) تأثير تراكيز المستحضر الحيوي على نمو نبات الذرة الصفراء والملوثة بالفطر *A. flavus*

A- المقارنة B- تركيز (5غم/كغم) C- تركيز (10غم/كغم) D- تركيز (20 غم/كغم)







صورة(2) تأثير تركيز المستحضر الحيوي على نمو نبات الذرة الصفراء والملوثة بالفطر *A.niger*

A- فطر فقط B – تركيز(5غم/كغم) C – تركيز(10 غم/كغم) D - تركيز(20 غم/كغم)

المصادر :-

المصادر العربية :-

ابراهيم ، عاصف محمد و محمد نظيف حجاج وابراهيم درويش مصطفى (2000). الطرق العملية لتقدير المكونات الكيميائية للانسجة النباتية . الطبعة الاولى . منشأة المعارف الاسكندرية.

أبو ضاحي ، يوسف محمد (1989). تغذية النبات العملي . مطبعة وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل .228 صفحة.

الجميلي ، سامي عبد الرضا ، ثامر خضير مرزة و الاء عبد علي الخفاف (a2007). تقييم كفاءة المبيدين الحيويين فلورامبل والباسلين على مرض نقص وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Pythium aphandermatum* لنبات الخيار في الحقل . مجلة جامعة كربلاء العلمية . المجلد (5) العدد (الاول).

الجميلي ، سامي عبد الرضا وموسى نعمة مزهر (2008). تأثير عنصري البورون والمنغنيز في نمو البكتريا *Bacillus cereus* وقدرتها على انتاج الهرمونات .المؤتمر العلمي الاول للعلوم الصرفة والتطبيقية لجامعة الكوفة . 13-14.

الصحاف ، فاضل حسين (1989). أنظمة الزراعة بدون استخدام تربة . وزارة التعليم العالي .جامعة بغداد .

عبد الرضا ،سامي و طـــه ياسين وعـادل العنسي (2004).تكامل لقاح بكتـــريا *Pseudomonas putida* ومبيد Bayelton في مقاومة مرض الذبول الفيوزارمي في الطماطة .مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية .المجلد (9) العدد(3).

محمد،عبد العظيم كاظم (2002). أساسيات تغذية وتسميد النبات . مكتب المصري لتوزيع المطبوعات . العراق .331 صفحة.

محمد ،عبد العظيم و مؤيد أحمد اليونس (1991).أساسيات فسيلوجيا النبات وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد . 461 صفحة.

المعموري، كوثر فاضل (2008). تكامل المبيد الحيوي الباسلين مع المبيد الكيمياوي الريدوميل وسماد الفسفور في السيطرة على مرض موت البادرات لمحصول الطماطة المتسبب عن الفطر *Pythium aphandermatum* .78صفحة .

ميخائيل، سمير و تركي بيدر(1982). أمراض البذور. دار الكتب للطباعة و النشر- جامعة الموصل. 190صفحة.

المصادر الاجنبية :-

Akpa, E. P.; Jacques, B. ;Wathelet, M. ; Paquot, R. ;Fuchs, H. ; Budzikiewic,z. and Thonart , P. (2001). Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis***.** Applied of Biochemistry and Biotechnology**,** 91-93: 551 561**.**

Bertr , H .;plassard ,C.; pinochet ,X.; Toraine ,B. ; Normand,P. and Cleyet-Morcael,J.C.(2000). simulation of The ionic transport grown –promoting rizobacterium (Achromobacter sp .) Candin Journal of Microbiology. 68:3328-3338.

Collee , J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology. Mackie & MaCarthey, Pearson professional limited. 14th ed.

Chen, J. (2006).the combined of chemical and organic fertilizers and / or biofertilizer for crop growth and salt fertility .International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use.(Bangkok) 10900 :16-20.

Garbaye, J .(1994). Helper bacteria : a new dimension to the Mycorrhizal symbiosis. New phytologist.128(2):129-210.

Glick ,B.R.(1995).the enhancement of plant grown by free –living bacteria. Candin Journal of Mcrobiology . 41:109-117.

Guller , L. and Kracko ,M.(1993). Ultra structure of grape vine chloroplast under Mgandfedeficiencies . photosynthestica . 29(3) :417-425.

Harboren ,J.B. (1973). Phyto chemical methods . Chapman and Hall. (London). 278 .

Jackson ,C.R.(1965). *Aspergillus* corwn rot of Peanuts in Georgia , seed treatment fungicidrs for control of seed born fungi in Peanut. Plant Disease Reporter ,46:888-892.

Kinsinger, R.F.; Shirk, M.C.; and Fall, R. (2003). Rapid surface Motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. Journal of Bacteriology. 185: 5627–5631.

Krebs ,C.J.(1978). Ecology : The experimental analysis of distribution and abundance Harper and Row publisher ,New York.

Leclere, V.; Bechet, M.; Adam, A.; Guez, J. S.; Wathelet, B.; Ongena, M.; Thonart, P.; Gancel, F.; Chollet-Imbert, M. (2004)

Functional significance of a periplasmic Mn-superoxide dismutase from Aero monashydrophila. Journal of Microbiology. 96, 828-833.

Mcspadden –Gardener ,B.B.(2004). Ecology of *Bacillus* and paenibaillus spp .In agricultural systems . American. phytopathological Society. 94:1252-1258.

Ompal ,S . and panwar J.D.S ,(2000).Response of *Azospirillum* and *Bacillus* on growth and yield of wheat under field conditions. Indian Journal of Plant Physiology. 5 (1): 0019-5502.

Prakash,A.P. and Podil ,A.R.(1996). Lysis and Biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1,candin Journal of Microbiology .42(6):533-8.

Raper , K.B. and Fennel ,D.I.(1965). The genus *Aspergillus* Williams and Wilkins company . Baltimore .pp :686.

Yao, A.; Bochow, H.; Karimov, S.; Boturov, U.; Sanginboy, S.; Sharipov, A. (2006) .Effect of FZB 24- *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests Archives of Phytopathology and Plant Protection. 39(4): 323-328.

Young, C.C.; Lai, W.A.; Shen, F.T.; Hung, M.H.; Hung, W.S. & Arun, A.B. (2003). Exploring the microbial potentially to augment soil fertility in Taiwan. In Proceedings of the 6th ESAFS International Conference: Soil Management Technology on Low Productivity and Degraded Soils,Taipei. (Taiwan). pp. 25-27.

Zaehringer ,M.V; Davis ,K. and Dean , L.(1974).persistent Green color snap beans color –related constituents and quality of cooked fresh beans. Journal of American science.99:89-92.

Bioformolation for *Bacillus subtilis* in corn growth which its three months storage after inoculation with *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*

Abstract

Treated seeds are cultured after three months of storge , and germination rate reached to 100% when compared with control 83% (seeds not treated with the bio formulation or any of the two fungi) ,were reduction in damping off from 83% to 0% by using the bio formulation at the cncentration of 20 gm/kg with the presence of incuolum ***A.niger*** **.**The estimation of Macro and Micro mineral elements in leaves of plants result from seeds that treated with the bio formulation at the concentration 5 gm/kgm after three weeks ,The Nitrogen , phosphor and Iron rate were 0.96, 0.52 and 0.064 mg/L respectively ,Also , chlorophyll a & b in the leaves of plants result from seeds that treated with the bio formulation especially at the concentration of 20gm/kg. The amount of chlorophylla &bwere5.3and 3,4 mg/100 gm constantly