تأثير التلقيح ببكتيريا الأزوسبيرلم المعزولة من ترب الجبل الأخضر و إضافة قش القمح على بعض الخصائص الفسيولوجية و محتوى النيتروجين في القمح

أدريس حمد عطية الله[1]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v26i1.164

الملخص

توجد بكتيريا جنس الأزوسبيرلم بكثافة في تربة الجبل الأخضر وسجل عددها $1.1 \times 10^3 - 13.2 \times 10^4$ خلية تكون مستعمرة لكل جرام تربة وذلك في عدد 23 عينة تربة وجذور نباتية تم جمعها من مناطق مختلفة من الجبل الأخضر. تبعاً للخواص المظهرية للخلايا والصفات المزرعية والصفات الكيموحيوية تم تعريف عدد 15 عزلة من بكتيريا الأزوسبيرلم نوع ليبوفيرم *Azospirillum lipoferum* تم بدراسة تأثير التلقيح باحدى هذه العزلات وهي (R_{23}) على نمو وتثبيت النيتروجين الجوي لصنفين من نبات القمح (جيزة 167، صنف محلي) النامي في وجود أو غياب مستويات مختلفة من قش القمح (0، 5، 10 طن / هكتار). أدى التلقيح ببكتيريا الأزوسبيرلم إلى زيادة تركيز النيتروجين المثبت من الهواء الجوي وسجلت النسبة المئوية للنيتروجين المثبت من الجو (Ndfa % 36.7%، 12.9% لصنفي جيزة 167، الصنف المحلي على الترتيب. كان لإضافة المادة العضوية تأثيراً سلبياً على النسبة المئوية للنيتروجين المثبت من الجو حيث انخفضت إلى 9.7%، 20.1 لصنفي القمح جيزة 167، الصنف المحلي على الترتيب. على الرغم من التأثير السلبي لإضافة النيتروجين غير العضوي على النسبة المئوية للنيتروجين المثبت، حيث سجل أقل معدل تثبيت ,11.2% 7.1% على الترتيب، و سجلت معاملات التسميد النيتروجين أعلى زيادة في قياسات النمو المختلفة سواءً عند استخدام السماد النيتروجيني (180 كيلوجرام N لكل هكتار) بصورة منفردة أو في وجود اللقاح البكتيري. أدى التلقيح ببكتيريا الأزوسبيرلم إلى زيادة عنصري المغنيسيوم والفسفور في المجموع الخضري لنبات القمح، بينما لم يلاحظ هذا التأثير لعنصر الكالسيوم. كما لم يلاحظ أي تأثير ملحوظ لإضافة المادة العضوية على المحتوى المعدني للمجموع الخضري لهذه العناصر، في كلٍ من صنفي القمح المختبر. و هذا يؤكد بان تأثير المادة العضوية يحتاج إلى وقت كافٍ لتحللها و هذا يعتمد أيضا على نوعيتها و على المجتمع الميكروبي المسؤول عن التحلل تحت ظروف التربة المستخدمة و هذه المشاهدة تحتاج إلى مزيد البحث.

[1] قسم علم النبات، كلية العلوم، جامعة عمر المختار، البيضاء–ليبيا.

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

المقدمة

تعتبر بكتيريا جنس الأزوسبيرلم من الأنواع المحفزة لنمو العديد من النباتات النجيلية والبقولية وغيرها، هذا بالإضافة إلى قدرتها على تثبيت النيتروجين الجوي بصورة حرة (Bashan et.al., 2004). يعتبر Beijerinck (1925) أول من عزل هذه البكتيريا الحلزونية الشكل وأطلق عليها *Spirillum lipoferum* ولكن لم يستطع إثبات قدرتها على تثبيت نيتروجين الهواء الجوي. بينما يعتبر Becking (1963) أول من أثبت قدرة هذه البكتيريا على تثبيت نيتروجين الهواء الجوي. وتعتبر Johana Döbereiner وطلابها عام 1976 أول من درس توزيع بكتيريا الأزوسبيرلم وأكدوا مدى انتشارها الواسع على جذور العديد من النباتات المنزرعة والطبيعية وذلك باستخدام الأوساط الغذائية النصف صلبة والخالية من النيتروجين، والتي تحتوي على حمض الماليك كمصدر كربوني (Day and Dobereiner, 1976). ومنذ ذلك الوقت تم عزل بكتيريا الأزوسبيرلم من مناطق مختلفة حول العالم وتعتبر من أشهر الأنواع البكتيرية وأكثرها دراسة من حيث أهميتها الاقتصادية وذلك لتأثيرها الإيجابي على نمو العديد من نباتات المحاصيل (Hartman and Baldani, 2006).تنتمي بكتيريا جنس الأزوسبيرلم إلى تحت رتبة البكتيريا البدائية (α-Subclass Protobacteria) والتي تتضمن مجموع من الأنواع البكتيرية التي تعيش متكافلة أو متعايشة على جذور النباتات مثل أجناس *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Gluconoacetobacter*. باستخدام تقنية تحليل الحمض النووي (DNA and rRNA-analysis) تم تمييز نوعين من جنس الأزوسبيرلم وهما *A. brasilense*، *A. lipoferum* (Tarrand et.al., 1978). ويعتبر هذان النوعان هما الأكثر شيوعاً والأكثر انتشاراً والأسهل من ناحية التعريف على اساس الخواص المزرعية والطرق الكيموحيوية المختلفة (Elkomy, 1992). وباستخدام تقنية تحليل 16S rRNA تم حديثا إضافة 5 أنواع أخرى لجنس الأزوسبيرلم وهي *A. dobereinerae*, *A. halopraeferens*, *A. amazonense*، *A. irakense*, *A. largimobile* (Stoffels et.al., 2001). لبكتيريا الأزوسبيرلم تأثيراً إيجابياً على نمو العديد من النباتات عند استخدام هذه البكتيريا كلقاحات حيوية، ويرجع هذا التأثير إلى قدرة هذه البكتيريا على إنتاج العديد من الهرمونات النباتية مثل أندول حمض الخليك و أندول حمض البيوترك والسيتوكينين و كذلك لقدرة هذه البكتيريا على تثبيت نيتروجين الهواء الجوي مما يزيد من المحتوى النيتروجيني للنباتات الملقحة، كذلك لنشاط هذه البكتيراي لإنزيم النيترات رديكتيز (Nitrate reductase) (Falik et.al., 1988; Elkomy et.al., 2003).

لإضافة المادة العضوية (مثل قش القمح، قش الأرز...) إلى التربة المنزرعة مميزات كثيرة منها

تحسين النشاط الميكروبي للتربة، كذلك تحسين الخواص الكيميائية والفيزيائية للتربة مما يحسن من إنتاجية النباتات المنزرعة (Stevenson, 1994; Ropper and Ladha, 1995; Brady and Wiell, 1999).

أهداف هذه الدراسة هي عزل وتعريف بكتيريا جنس الأزوسبيرلم من تربة خارج منطقة الريزوسفير (Bulk soil) و تربة الريزوسفير (rhizospheric soil) ومن يرية منطقة سطح الجذر لبعض النباتات النامية بمنطقة الجبل الاخضر، و كذلك دراسة تأثير التلقيح بإحدى هذه العزلات على نمو القمح و محتواه من النيتروجين في وجود أو غياب قش القمح.

المواد وطرق البحث

عزل وتعريف بكتيريا الأزوسيرلم: وذلك عن طريق تلقيح البيئة الانتخابية النصف صلبة والخالية من النيتروجين (NFb-medium) بمعلق التربة (او ملي من تركيز 10^{-2}) أو بقطع صغيرة ($\frac{1}{2}$ سم في الطول) من الجذور النباتية كما تم شرحه بواسطة Bashan and Holgium (1997). بعد يوم إلى يومين من تحضين الأنابيب الملقحة عند 30°م يلاحظ تكوين طبقة رقيقة بيضاء من النمو البكتيري أسفل سطح الوسط الغذائي بحوالي 10 مليمتر وهي صفة تمتاز بها بكتيريا الأزوسبيرلم. بعد الفحص المجهري لدراسة شكل البكتيريا الحلزوني والحركة النشطة المميزة لبكتيريا الأزوسبيرلم تم اجراء عملية التخطيط (Streak) على أوساط غذائية صلبة من بيئة الآجار المغذي (NA) للحصول على مستعمرات نقية وذلك لإجراء بعض التجارب المزرعية والكيموحيوية، وذلك لتعريف أنواع العزلات المختلفة. كذلك استخدمت بعض العزلات المرجعية للمقارنة وهي *A. brasilense* (SP7)، *A. lipoferum* (137) كما تم شرحه في مراحل التعريف الموجودة في كتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Dobereiner, 1984) وتم تقدير العدد الكلي لبكتيريا الأزوسبيرلم في التربة محل الدراسة مستخدماً طريقة الأطباق المخففة والوسط الغذائي (DN) مضافاً إليه أحمر الكونجو (Congo-red) كما شرحها Rodrigoues (Cacere, 1982).

تجارب الأصص Pot-experiments: تم تجهيز بذور القمح (صنف *Triticium aestivum*, Giza 167) وصنف محلي *Triticum aeotivum* local cultivar) وذلك بتعقيم البذور سطحياً مستخدماً محلول مكون من خليط من الكحول الإيثيلي بتركيز 95%، وفوق أكسيد الهيدروجين (20%) بنسبة 1 : 1 حجماً : جم. بعد تعقيم البذور تم إنباتها لمدة 3 أيام في أطباق بترى ثم زراعة البذور النابتة في أصص (5 بذور لكل إصيص) ويزن كل إصيص 5 كيلوجرام مملوءة بالتربة عبارة عن خليط من تربة طينية : تربة رملية بنسبة 2 : 1 حجماً : حجم.

تم تقسيم الأصص إلى مجموعات بحيث تمثل كل مجموعة بـ 3 تكرارات كالآتي :

أصص تحتوي على تركيزات 0 ,5 ,10 طن / هكتار مادة عضوية (قش قمح مطحون).

أصص تحتوي على التركيزات السابقة من المادة العضوية وتلقح نباتاتها بمعلق بكتيريا الأزوسبيرلم بتركيز 10^6 خلية تكون مستمرة لكل بذرة.

أصص تم تسميد تربتها بالسماد النيتروجيني KNO_3 بتركيز 180 كيلوجرام N لكل هكتار.

أصص تم تسميدها بالسماد السابق وملقحة ببكتيريا الأزوسبيرلم (عزلة رقم *A. lipoferum* R_{23} نامية لمدة 20 ساعة في بيئة NB السائلة).

بعد مرور أسبوعين من زراعة البذور تم تخفيف أعداد البادرات النامية إلى 3 نباتات لكل أصيص بحيث تم الإبقاء على الشتلات المتماثلة. وتم ري النباتات النامية تحت ظروف الصوبة بالماء كل 3 أيام بكميات مساوية للسعة الحقلية للأصص واستمر الإنبات لمدة 60 يوماً تقريباً. عند تجميع النباتات تم فصل المجموع الخضري عن الجذري لإجراء التحاليل الآتية :حساب مساحة سطح الورقة مستخدماً طريقة Norman and Campbell (1994)

$$\text{Leaf area}(cm^2) = K\ (\text{leaf length} \times \text{maximum leaf width})$$

حيث :K = 0.7

بعد تعيين الوزن الرطب للنبات يجري تجفيف للأنسجة النباتية عند 70°م، لمدة 24 ساعة و يحسب الوزن الجاف معبراً عنه جرام / إصيص. ثم تم تقدير النسبة المئوية للنيتروجين N% في الأنسجة النباتية مستخدماً طريقة كلدال وحساب المحصول الكلي للنيتروجين (Total N-yield) معبراً عنه بالمليجرام نيتروجين لكل أصيص تبعاً لـ Rennie and Rennie (1983) :

$$\text{Total N-yield} = \frac{\text{Dry wt.(mg)} \times \text{Total N \%}}{100}$$

(mg N/pot)

تم حساب النسبة المئوية للنيتروجين المثبت حيوياً (% NdFa) مستخدماً طريقة الاختلاف في المحصول الكلي للنيتروجين كالآتي :

$$\%\ \text{Ndfa} = \frac{\text{Nyield (Fx)} - \text{Nyield (nfx)}}{\text{Nyield (fx)}} \times 100$$

كما تم حساب كمية النيتروجين المثبتة معبراً عنها بالمليجرام N لكل أصيص كالآتي :

$$N_2\text{fixed (mgN/pot)} = \text{Nyield (fx)} - \text{Nyield (nfx)}$$

حيث (fx)، (nfx) هي النباتات الملقحة، النباتات غير ملقحة على الترتيب :

تقدير بعض العناصر المعدنية:تم تقدير محتوى الأنسجة النباتية من عنصر الفسفور مستخدماً طريقة البارامولبيدات كما شرحها (). كما تم تقدير عنصري الكالسيوم والماغنيسيوم مستخدماً طريقة المعايرة بالفيرسينيت (Schwarzenbach and Biederman, 1948; lack et al., 1982; Olsen and Summers, 1982).

التحليل الإحصائي: تم تحليل نتائج التجارب إحصائياً مستخدماً برنامج إحصائي : Statistica software (pc STAT, Ver. 1A. Copyright 1985, the University of Georgia).

وتم تعيين قيمة اقل فرق معنوي عند 5% (at 5%"L.S.D"(Least Significant difference)

النتائج والمناقشة

تظهر النتائج المقدمة في جدول (1) مدى انتشار و وجود بكتيريا جنس الأزوسبيرلم في جميع الترب المختبرة والتي تم جمعها من منطقة الجبل الأخضر (عددها 23 عينة تربة)، كذلك سجل وجود بكتيريا الأزوسبيرلم أعداد تراوحت بين $1,1 - 13,2 \times 10^4 \times 10^3$ خلية تكون مستعمرة لكل جرام تربة (CFU/g) وتتوافق هذه النتائج مع نتائج (Balandreau, 1986) الذي سجل اعداد بكتيريا الأزوسبيرلم يتتراوح بين $10^3 - 10^6$ (CFU/g) بينما سجل Hegazi (1988) تواجد بكتيريا الأزوسبيرلم بأعداد تتراوح بين $10^2 - 10^4$ (CFU/g) في تربة وادي النيل في مصر كما سجل نفس الباحث أن بكتيريا الأزوسبيرلم تمثل 1% تقريباً من الأعداد الكلية لبكتيريا التربة. كما أظهرت النتائج أنه تم عزل حوالي 28 عزله بكتيريا الأزوسبيرلم على البيئة الانتخابية النصف صلبة (NFb) والتي تحتوي على حمض الماليك كمصدر كربوني وحيد، بعد إجراء عملية التنقية تم الحصول على 15 عزلة نقية أجريت عليها التجارب المزرعية والحيوية لتعريفها. كونت عزلات الأزوسبيرلم طبقة رقيقة بيضاء اللون من النمو أسفل سطح الوسط الغذائي النصف صلب بحوالي 10 ملمتر وهذا النمو يميز بكتيريا الأزوسبيرلم والتي تفضل الظروف هوائية الدقيقة "أي ضغط منخفض من الأوكسجين" (Microaerobic) وتفسير هذا بأن في هذا المكان من النمو يكون تركيز الأكسجين مناسب للنمو والتنفس للميكروب دون أن يكون هذا التركيز مثبطاً لتثبيت النيتروجين الجوي (Day and Dobereiner, 1976). و ذلك لان انزيم النيتروجينيز (Nitrogenase) المعروف بمسؤوليته على تثبيت النيتروجين حساس للأوكسجين. بالإضافة إلى دراسة الخواص المزرعية والمورفولوجية لشكل الخلايا وصبغة جرام (جدول رقم 2) أظهرت عزلات الأزوسبيرلم ظاهرة Pleomorphism (أي تغير شكل الخلية في البيئة النصف صلبة بعد مرور 24 ساعة من التحضين) وهذه الصفة تمتاز بها بكتيريا الأزوسبيرلم نوع ليبوفيرم

A. lipoferum وهذه الخاصية أكدها De-Poli and Roth (1981). أظهرت النتائج أن جميع عزلات الأزوسبيرلم تستطيع استخدام (أكسدة العديد من الأحماض العضوية أو أملاحها (ماليك، سكسنيك، بيروفك) عند استخدامها كمصدر كربوني وحيد في حالة وجود $(NH_4)_2So_4$ في الوسط الغذائي. كما أظهرت النتائج المقدمة في جدول رقم (3) قدرة جميع عزلات الأزوسبيرلم المعزولة على استخدام (أكسدة وتخمر) العديد من السكريات المختلفة، بينما لم تظهر قدرتها على تحلل النشا أو تحلل وإسالة الجيلاتين وهذه صفات تمتاز بها نوع *A. lipoferum*. كما تظهر النتائج أن غالبية عزلات الأزوسبيرلم قدرتها على اختزال NO_3 إلى نيتريت NO_3 كذلك قدرتها على النمو في وجود الحمض الأميني L-Histidine والتي تميز نوع *A. lipoferum* من *A. brasilense*. أظهرت نتائج تلقيح نبات القمح ببكتيريا الأزوسبيرلم (جدول 4، 5) سلالة (R_{23}) تأثير إيجابي ومعنوي على قياسات النمو المختلفة (طول النبات، مساحة سطح الورقة، الوزن الرطب والجاف) وذلك بالمقارنة بالمعاملة الكنترول غير الملقحة. كما سجلت معاملات النبات بالتسميد النيتروجين عند المستوى الموصى به (180 كيلوجرام N للهكتار) سواءً في وجود أو غياب اللقاح البكتيري أعلى تأثير في قياسات النمو وذلك في صنفي القمح المختبرة. كما تظهر النتائج أن نبات القمح صنف Giza 167 أظهر استجابة للقاح البكتيري بصورة أكبر من الصنف المحلي و هذا يحتاج إلى تفسير، فقد سجل الصنف الأول نسبة 36,7% نسبة مئوية للنيتروجين المثبت حيوياً والتي تمثل 47.6 مليجرام نيتروجين مثبت بينما سجل الصنف المحلي 12.9% نسبة مئوية للنيتروجين المثبت حيوياً والتي تمثل 14.9 مليجرام نيتروجين مثبت (جدول 6). وهذه النتائج متفقة مع نتائج Rennie et. al., (1983) حيث سجل أن التلقيح ببكتيريا الأزوسبيرلم سجلت النسبة المئوية للنيتروجين المثبت حيوياً نسبة 32% في نبات القمح، بينما انخفضت هذه النسبة إلى 5 - 10% في نتائج Kucey (1988) عند تلقيحه لنبات القمح بواسطة بكتيريا *A. brasilense*. أظهرت النتائج أن إضافة المادة العضوية (قش القمح) بصورة منفصلة تأثيراً إيجابياً على قياسات النمو المختلفة لنبات القمح في كلا الصنفين (جدول 4، 5) وذلك بالمقارنة بالنباتات غير الملقحة (كنترول). كذلك كان لإضافة المادة (عند مستوى 5، 10 طن) مع اللقاح البكتيري تأثيراً إيجابياً على نمو صنفي القمح المختبرة بالمقارنة بالكنترول. و أن إضافة المادة العضوية تحسن من الخواص والتركيب الكيميائي والفيزيائي للتربة مما يزيد من إنتاجية النباتات المنزرعة (Roper and Ladha 1995; Brady and Wiel, 1999). على الرغم من التأثير الإيجابي للمادة العضوية على النمو كان لإضافتها تأثيراً سلبياً على النسبة المئوية للنيتروجين المثبت من الهواء الجوي في كلا صنفي القمح

المختـــبرة، فقـــد انخفضـــت Ndfa% إلى 9.7%، 11.2% في الصنف المحلي وانخفضت إلى 23.9%، 20.1% للصنف Giza 167 عند مستويات 5، 10 طن للهكتار على الترتيب. إن استخدام قش القمح الـذي يكـون فقـيرا جـدا في النيتروجـين و مكوناتـه العضوية صعبة التحلل (Recalcitrant) تجعل نسبة النيتروجين الى الكربون C:N ratio فيه واسعة وهذا كما بين الكثير من البحاثة في علم الكيمياء الحيوية للتربـة و ميكـرو التربـة (مثـل الكسـندر، 1982) يـدفع الميكروبـات المحللـة إلى اسـتيراد النيتروجـين الذائب (مثل الامونيوم NH^{+}_{4} و النترات NO^{-}_{3}) في محلول التربة (Soil solution)، و بالتالي فان القش المستخدم في هذه الدراسة شجّع الميكروبات المحللة (Decomposers) على منافسة نبات القمح على النيتروجين الذائب والذي ترتب عليه انخفاض محتوى القمح من النتروجين، أضف إلى ذلك فانه مع مرور الوقت واستمرار عملية التحلل (Decomposition) تنطلـق بعـض المغـذيات الاخـرى المرتبطـة بهـذه المخلفـات النباتيـة (Plant residues) و لكـن يصـــاحبها حـــدوث عمليـــة تثبيـــت للامونيـــا (Ammonia fixation) بسبب الارتباط الكيميائي للامونيـا بالمركبـات الحلقيـة الـتي تظهـر في المراحـل المتقدمة للتحلل و تكوّن الـدبال (Humus) والـتي يوصف فيها الدبال بأنه سماد بطيء الانطلاق فيما يتعلق بالنيتروجين (Stevenson, 1994). و القـول بـان التـأثير السـلبي للمـادة العضـوية علـى تثبيـت النيتروجين الجوي نتيجة لعملية معدنة المادة العضوية (Organic-matter mineralization) والتي تؤدي إلى زيادة في تركيز النيتروجين غير العضوي و المعروف بأنه يثبط نشاط إنزيم النيتروجين (Kassen et. al., 1997) لا يتفق مع ظروف هذه الدراسة. سجلت معاملة إضافة السماد النيتروجين غير العضوي عند مستوى 180كجم للهكتار أقل نسبة نيتروجين مثبت حيث سجلت Ndfa%، 7.1%، 11.2% للصنف المحلي وجيزة 167 على الترتيب على الرغم من التأثير الإيجابي للتسميد النيتروجيني على قياسات النمو المختلفة لأنه من المعروف أن نبات القمح يستجيب للتسميد النيتروجيني حتى مستوى 200 كجم/هكتار (Zambre et. al., 1984).تظهر النتائج في جدول رقم (6) التأثير الإيجابي والمعنوي للقاح البكتيري على المحصول الكلي للنيتروجين سواءً عند استخدام اللقاح منفصل أو في وجود المادة العضوية أو السماد النيتروجيني. وترجع هذه الزيادة أساساً في المحصول الكلي للنيتروجين إلى زيادة الوزن الجاف للنباتات الملقحة لأن زيادة النسبة المئوية للنيتروجين عادة غير ملحوظة حيث أن (المحصول الكلي للنيتروجين هو ناتج ضرب النسبة المئوية للنيتروجين في الوزن الجاف للنبات) وهذا يؤكد دور التأثير الهرموني لبكتيريا الأزوسبيرلم فمن المعروف أن لهذه البكتيريا القدرة على تخليق العديد من الهرمونات النباتية مثل أندول حمض الخليك، أندول حمض البيتوتاريك والسيتوكسينين (Hamdia and

Elkomy, 1997; Bashan and Holgiun, 1997).

جدول رقم (7) يظهر نتائج تراكم لبعض العناصر المعدنية في المجموع الخضري لنبات القمح الملقح ببكتيريا الأزوسبيرلم في وجود أو غياب المادة العضوية. على الرغم من زيادة تراكم عنصري الفسفور والماغنيسيوم في النباتات الملقحة ببكتيريا الأزوسبيرلم في كلا صنفي القمح نجد أن تراكم عنصر الكالسيوم يتناقص. كما تظهر النتائج أن لإضافة المادة العضوية ليس لها تأثير واضح على تراكم العناصر محل الدراسة. هذه النتائج متوافقة مع نتائج Elkomy et. al., (2004) حيث سجل الباحث تغير في محتوى بعض العناصر المعدنية (Ca, Mg, K, P) في أنسجة نبات الذرة الملقحة ببكتيريا الأزوسبيرلم ولكن بصورة غير منتظمة فقد يزداد تراكم أحد العناصر أو عنصرين ولكن يتناقص تراكم عناصر أخرى كما سجل الباحث أن هذا التأثير يختلف في المجموع الخضري للنبات عن المجموع الجذري في نفس النبات الواحد.

جدول (1) العدد* الكلي لكتيريا الأزوسبيرلم في التربة محل الدراسة مستخدماً طريقة التخفيف وبيئة DN + Congo-red

ر.م	النبات المزروع	اسم المنطقة	أعداد الأزوسبيرلم
1	كمون حلو	قرنادة	2.5×10^3
2	أبوفاس	البيضاء	1.1×10^3
3	طعمة الأرنب	الغريقة	15×10^3
4	درياس	عمرا لمختار	2.1×10^3
5	روبيا	الفائدية	26.1×10^3
6	وجله	المنصورة	9.2×10^3
7	زعتر	شحات	8.5×10^3
8	روبيا	وردامة	13.2×10^4
9	فول صويا	مسة	25.1×10^3
10	خروب	بالحديد	50.5×10^3
11	ذرة	الصفصاف	2.1×10^3
12	خيار	اسلنطة	14.5×10^3
13	خس	قندولة	42.5×10^3
14	طماطم	الحنية	46.4×10^3
15	شيح	الخويمات	17.5×10^3
16	درياس	مراوة	16.5×10^3
17	درياس	الجهاد	18.4×10^3
18	شعير	قصر ليبيا	3.5×10^3
19	قمح	زواية العرقوب	7.5×10^3
20	درياس	أقفنطة	8.5×10^3
21	شيح بري	الحمامة	56.1×10^3
22	شحمة الأرنب	الكوف	33.2×10^3
23	شعير	جردس	6.5×10^3

النتائج متوسط لـ 3 تكرارات.

جدول 2 بعض الخواص الكيموحيوية والمزرعية للعزلات البكتيرية من جنس الأزوسبيرلم

الاختبار / العزلات	*A. brasil* Sp7	*A. lip* 137	R_9	P_9	R_8	F_8	F_{18}	P_8	F_{23}	R_{17}	F_{14}	R_7	R_{10}	R_6	P_{10}	R_6	F_9
Cell-Shape	بيضي	بيضي	عصوي	عصوي	منحنى	منحنى	عصوي	عصوي	منحنى	بيضي	إلى	عصوي	منحني	منحني	بيضي	بيضي	
Gram-stain	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Polymorphism	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth on L-ttistidine	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin – Hydrolysis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Starch Hydrolysis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
استخدام Succinic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyinvic assolcso	+					+		+	+		+	+	+	+	+	+	
الحركة في بيئة نصف صلبة	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نمو في وجود 3% NaCl	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+/–	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –	+ / –
نشاط إنزيم NR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

جدول 3 أكسدة وتخمر أنواع مختلفة من الكربوهيدرات بواسطة عزلات الأزوسبيرلم

Manitol		Lctese		Dext		Mltose		Xylose		Sucrose		Fructose		Glucose		Index of
An	A	An	A	An	A	An	A	An	A	An	A	An	A	Fer	Cx	Slates #
+	+	-	-	-	-	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	Sp_7
±		±	±	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	I_{37}
+	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	R_9
+	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	P_9
+	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	R_8
+	+	±	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	F_8
+	+	+		+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	F_{18}
±	+	±	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	P_8
+	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	F_{23}
+	±	±	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	R_{17}
+	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	F_{14}
±	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	R_7
+	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	R_{10}
±	±	±	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	R_6
+	+	+	±	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	P_{10}
+	±	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	R_6
±	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	±	±	+	+	F_9

A؛ ظروف هوائية (Aerobic)

An؛ ظروف لاهوائية (Anaerobic)

F؛ تربة خارج منطقة الغلاف الجذري (Bulk Soil)

R؛ تربة منطقة الغلاف الجذري (Rhizosphere soil)

P؛ تربة سطح الجذر (Rhizoplane soil)

الارقام تشير الى المنطقة موضع الدراسة

جدول 4 تأثير التلقيح ببكتيريا *A. lipofeumr* و اضافة قش القمح على نمو نبات القمح (صنف محلي).

معاملات	طول النبات(سم)		مساحة الورقة	وزن المجموع الخضري (جم/اصيص)		وزن المجموع جذري (جم/اصيص)		%N
	ساق	جذر	(سم2)	رطب	جاف	رطب	جاف	
الشاهد#	7	0	7.1	0.3	.2	.6	5	.2
5 T/h	0	3	8.6	0.8	.1	.8	.6	.3
10 T/h	6	8	3.4	2.7	.8	.6	.2	.5
Az.	00	1	7.4	4.3	.9	.7	.7	.3
Az + 5	8	2	2.5	6.5	.7	.1	.6	.2
Az + 10	2	1.5	0.5	7.1	.1	.3	.3	.4
N	8	4	6.9	0.5	1.2	.8	.1	.5
AZ + N	4	5	1.5	1.7	2.4	.8	.3	.6
L.S.D 5%	.6	.9	.1	.2	.1	.3	.8	

Control؛ لم يضاف قش القمحT/h ؛ طن لكل هكتارAz ؛ ايزوسبيرلم5% ,.L.S.D ؛ اقل فرق معنوي عند 5%

جدول 5 تأثير التلقيح ببكتيريا الأزوسبيرلم *A. lipofeurm* على نمو نبات القمح (صنف مصري Giza 167) في تجربة الأصص في وجود أوغياب المادة العضوية

المعاملات	طول النبات		ساق الورقة	وزن مجموع خضري		وزن مجموع جذري		%N
	خضري	جذري		الرطب	الجاف	الرطب	الجاف	
الشاهد#	79	18.0	34.9	13.3	.26	9.5	4.09	1.3
5 T/h	81.2	21.0	37.6	17.2	7.3	12.4	7.1	1.2
10 T/h	80.0	20.5	39.9	17.1	7.4	16.5	11.6	1.4
Az.	83.5	21.2	62.1	18.3	8.01	17.2	12.6	1.6
Az + 5	83.1	20.8	75.6	19.2	9.8	16.5	11.9	1.4
Az + 10	80.6	23.2	73.2	18.9	8.7	15.6	12.7	1.3
N	91	21.5	40.8	25.2	14.6	14.7	11.5	1.4
AZ + N	88.2	19.9	72.3	24.1	13.7	18.9	11.9	1.7
L.S.D 5%	5.2	2.1	6.6	3.1	2.1	2.9	1.9	-

Control؛ لم يضاف قش القمح T/h ؛ طن لكل هكتارAz ؛ ايزوسبيرلم 5% ,.L.S.D ؛ اقل فرق معنوي عند 5%

جدول 6 تأثير التلقيح ببكتيريا الأزوسبيرلم في وجود أو غياب المادة العضوية على المحصول الكلي للنيتروجين (Total N-yield, mg N/pot)، النسبة المئوية للنيتروجين المثبت حيوياً (%Ndfa, mg N/pot) و النيتروجين المثبت (%)

المعاملات	الصنف الليبي			الصنف المصري		
	المحصول الكلي للنيتروجين	%Ndfa	FixedN	المحصول الكلي للنيتروجين	%Ndfa	FixedN
الشاهد#	100.8	-	-	80.6	-	-
5	103.4	-	-	85.2	-	-
10	113.2	-	-	103.6	-	-
Az	115.7	12.9	14.9	128.2	36.7	47.6
Az + 5	114.4	9.7	11.0	127.2	37.9	42.0
Az + 10	127.4	11.2	14.2	130.5	20.1	26.9
N	148.8	-	-	204.4	0	0
AZ + N	161.1	7.1	12.3	232.9	12.2	28.5

Control؛ لم يضاف قش القمح T/h ؛ طن لكل هكتارAz ؛ ايزوسبيرلم L.S.D., 5% ؛ اقل فرق معنوي عند 5%

جدول 7 تأثير التلقيح ببكتيريا *A. lipoferum* في وجود أو غياب المادة العضوية على محتوى أنسجة المجموع الخضري على بعض عناصر النمو (mg/g)

المعاملات	صنف جيزة 167			الصنف المحلي		
	Ca+2	Mg+2	P	Ca+2	Mg	P
الشاهد	6.7	4.1	2.4	7.3	4.6	3.1
5 T/h	6.2	3.7	2.6	6.6	4.1	2.8
10 T/h	7.1	4.5	3.7	7.1	3.8	3.3
Az	5.3	5.2	2.9	6.5	5.3	3.6
Az + 5	5.9	4.8	3.6	7.2	4.6	3.8
Az + 10	6.8	3.9	2.8	6.3	4.8	2.9
N	7.3	5.1	3.6	7.8	5.3	3.7
Az + N	6.1	3.8	4.1	7.3	4.2	4.2
L.S.D. 5%	1.1	1.6	1.1	2.3	1.6	1.3

Control؛ لم يضاف قش القمح T/h ؛ طن لكل هكتارAz ؛ ايزوسبيرلم L.S.D., 5% ؛ اقل فرق معنوي عند 5%

Effects of *Azospirillum lipoferum* strain isolated from Al Jabal Al Akhdar region and wheat straw on some physiological properties and nitrogen content of *Triticum aestivum* cultivars

Idress H. Attitalla [1]

Abstract

Azospirillum was abundant in high population levels and recorded 1.1×10^3 – 13.2×10^4 CFU/g in 23 soil samples collected from the rhizosphere of 24 plants grown in different sites distributed in El-Jabal Elakhdr eco-region. According to cell-morphological, cultural and biochemical characteristics, fifteen *A. lipoferum* isolates were identified. The effect of *A. lipoferum* (isolate R_{23}) inoculation and / or wheat straw (0.5 and 10 T/h) amendment on the grouth and N_2 fixation of two wheat cultivars (Giza 167 and local cultivar) was determined in pot experiments using the difference method (DM).

Azospirillum inoculation resulted in accumulation of fixed nitrogen, and N% from atmosphere being 36.7 and 12.9% for wheat Giza 167 and the local wheat cultivar, respectively. Straw amendment reduced %N from atmosphere to 9.7 and 11.2% at 5 and 10 T/h, respectively for wheat local cultivar and recorded 23.9 and 20.1% for wheat cultivar. Giza 167. Rational nitrogen fertilization (180 kg N/h) recorded the lowest %N from air and recorded 7.1 and 11.2% for wheat local and Giza 167 cultivars, respectively. The highest levels of increased growth parameters were obtained by N-fertilization in both inoculated and uninoculated plants for both cultivars. *Azospirillum* inoculation induced shoot Mg and P content, but not Ca in both cultivars. Organic matter addition had no significant effects in both cultivars used in the present study and such outcome needs further assessment.

Key words: Al Jabal Al Akhdar, *Triticum aestivum*, *Azospirillum lipoferum* ,wheat straw

[1] Botany Department, Faculty of science,Omar Al-Mukhtar University , Box 919, El-Beida, Libya

المراجع

الكسندر، مارتن (1982). مقدمة إلى ميكروبيولوجيا التربة، جامعة كورنيل؛ مءسسة جون وايلي و أولاده، الطبعة الثانية.

Balandrea, J. (1986): Ecological factors and adaptive processes in N_2-fixing bacterial populations of the plant environment. Plant of soil. 90: 73-92.

Bashan, Y. and Holguin, G. (1997): *Azospinllum* Plant. Relationships. Can. J. Microbiol. 43: 103-121.

Bashan, Y.; Holgiun, G. and de-Bashan, L. (2004): Azospirillum-plant velationships: physoloyical, molecular, agricultural, and environmental advances. Can. J. Microbiol. 50: 521-577.

Becking, J.H. (1963): Fixation of molecular nitrogen by an aerobic vibrio spirillum J. Microbiol. Sevol. 29: 326.

Beijerinck, M.W. (1925): Ube rein Spirillium, Welches freien stickstoff binden Kann? Centrabl. Bakt. II Abt. 63: 353-357.

Black, C. A. (1965) Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties, American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Brady, N.C and Weil R. R., (1999) The Nature and Properties of Soils (12 edition). Prentice- Hall, Inc.

Day J. and Döbereiner, J. (1976). Physiological aspects of N_2 fixation by Spirrilum from Digitaria roots. Soil Biology and Biochemistry, 8: 45-50.

De – Polli, H. and Roth, I. (1981): Scanning electron microscopy of large cells of Azospirillum Spp. Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Texas, P. 85.

Elkomy, H. (1992): Studies on the genus Azospirillum from the rhizosphere of maize and rice plants. Ph. D. Thesis Inst of pp. 169. Microbiology, Academic Science, Russia.

Elkomy, H.; Hamdia, M. and Abdel Baki, G. (2003): Nitrate reductase in wheat plants grown under Water stress and inoculated with Azospirillum spp. Biol. Plant. 46: 281-287.

Elkomy, H.; Hamdia, M.; Hetta, A. and Barkat, N. (2004): Possible roles of nitrogen fixation and mineral uptake induced by rhizobacterial inoculation on salt tolerance of

maize. Polish J. Microbiol. 53: 53-60.

Fallik, E.; Okon, Y. and Fischer, M. (1988): Growth response of maize roots to Azospirillum inoculation. Soil Biol. Biochem. 20: 45-49.

Hamdia, M. and Elkomy, H. (1997): Effect of Salinity, gibberellic acid and Azospirillum inoculation on growth and nitrogen uptake of zea mays. Boil. Plant. 40: 109-120.

Hartman, A and Baldani, J. (2006): The Genus Azospirillum Prokaryotes, 5: 115-140.

Hegazi, N. (1988): Modification of Soil environment through straw application versus *Azopirillum* spp. Inoculation. In Azospirillum. IV. Genetics, physiology and Ecology. W. Klingmuller (ed), Springer-verlag, Berlin.

Kassen, G.; pedrosa, F.; Souza, E. And Rigo, L. (1997): Effect of nitrogen compounds on nitrogenous activity in Herbaspirillum seropedicoe. Can J. Microbial 43: 887-891

Krieg, N. and Dobereiner, J. (1984): Genus *Azospirillum* In. Holt, J. and Krieg, N. (eds), Bergy's Manual of systematic Bacteriology 9th ed., Williams and wikins, Baltimore, pp. 94-104.

Kucey R. (1988). Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 34: 735-739.

Norman, J. and Campbell, G. (1994): Canopy In. Pearey, R.W. Ehleringer. J. Mooney. H. A. Rundel. P.W. (eds) Plant Physiological Ecology. Pp. 301-326. Chapman & Hall. London.

Olsen S. and Sommers L. (1982). In: Methods of soil analysis, Part (2) A. L. Page, R. H. Miller, D. R. Keeny (eds), American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

Reinnie, R. and Reinnie, D. (1983): Techniques for quantifying N_2 fixation in association with non-legumes under field and green-hose conditions. Can. J. Microbiol. 29: 1022-1035.

Rennie, R; Defreitas, J. and Ruschel, A. (1983): N^{15}- isotore dilution to queintify N_2 fixation associated with Canadian and Brazilian wheat. Can. J. Bot. 61: 1667- 1671.

Rodrigues-Caceres, E. (1982): Improved medium for isolation of Azospirillum Spp. Appl. Environ. Microbial. 44: 990-991.

Roper, M. and Ladha, J. (1995): Biological Nz fixation by heterotrophic bacteria in association with straw. Plant and soil 174: 211-224.

Schwarzenbach, G. and Biedermann, W. (1948): Komplexone – X – Erdalkalikomplexe von 0.0 – Dixyazofarbstoffen. Helv. Cim Acta. 31: 678-687.

Stevenson, F.J. (1994) Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reastions. 2nd edition. John Wiley and Sons, Inc.

Stoffels, M.; Castellanos, T. and Hartmann, A. (2001): Design and application of new 168 rRNA-targeted oligonucleotide probes for the Azospirillum. Syst. Appl. Microbiol. 24: 83-97.

Tarrand, J.; Krieg, N. and Dobereiner, J. (1978): Ataxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980.

Zamber, M.; Konde, B. and Sonar, K. (1984): Effect of Azospirillum brasiense under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. Plant and soil. 79: 61- 67.