تأثير التلقيح الحيوي ببكتريا ***Klebsiella pneumoniea*** وفطريات المايكورايزا ***Glomus mosseae*** ودور حامض الهيومك والمبيد الحيوي ***Trichoderma harzianum*** في حاصل ونسبة الزيت في الحبة السوداء ***Nigella sativa***

بسمان وسام عزيز **د. توفيق بشير السلمان**

كلية الزراعة والغابات/قسم علوم التربة والموارد المائية جامعة الموصل

- **تاريخ استلام البحث 2020/11/17 وتاريخ قبوله 1/3/2021**

الملخص:

أجريت تجربة عاملية في البيوت البلاستيكية لكلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل باستخدام عينة تربة مزيجية أخذت من منطقة الرشيدية في محافظة نينوى شمالي العراق وتم وضعها في سنادين بلاستيكية سعة 6 كيلوغرام وبستة معاملات وثلاثة مكررات زرعت بذور حبة البركة (الحبة السوداء) خلال الموسم الشتوي 2019. لقحت التربة بكتريا K. pneumoniea، التي تم الحصول عليها من مركز ميديا Media center في اربيل وهي معزولة على وسط MacConKey agar، وكذلك من قسم علوم الحياة / كلية العلوم جامعة الموصل. وأضيف المبيد الفطري T. harzianum وبثلاث مستويات، واختبرت قدرة بكتريا K. pneumoniea لتثبيت النيتروجين الجوي على وسط المرق الخالي من النيتروجين (Nitrogen-free broth (NF اظهرت النتائج كفاءة بكتريا K. pneumoniea في تثبيتها النتروجين الجوي بالاعتماد على قياس فعالية انزيم النيتروجينيز بوساطة كاشف Nessler، كما أظهرت النتائج مقاومة البكتريا للمبيد الفطري T. harzianum عند المستويين الثاني والثالث (0.5, 0.250 غم/ لتر)، كما أظهرت الدراسة تأثيراً معنويا إذ أعطت معاملة التلقيح بالمايكورايزا وبكتريا الكليبسيلا واضافة حامض الهيومك زيادة معنوية في ارتفاع النبات بلغت 68 سم وكذلك أعطى التداخل بينهم اعلى القيم بلغ 75سم مقارنة بمعاملة المقارنة 37 سم، كذلك وجود فروقات معنوية في وزن الحاصل اذ حققت معاملة السماد العضوي بمستوى 100% مع التداخل بين نوعي السماد الحيوي حيث أعطى اعلى معدل بلغ (9.73 غم) قياسا بمعاملة المقارنة التي أعطت اقل معدل بلغ(1.03غم)، كذلك النتائج أعطت تأثير معنوي في صفة حاصل الزيت في جميع المعاملات وفي التداخل بينها وتفوق التداخل بأعطائه أعلى معدل للصفة بلغ 41.81 % ومع اضافة اعلى مستوى للسماد العضوي مقارنة مع عدم اضافة السماد العضوي ومعاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل لنسبة الزيت (39.66% و22.53%) بنسبة الزيادة (2.15 % و19.38 %). أستخدم التصميم الاحصائي CRD وحللت النتائج بطريقة دنكن للمتوسطات.

The effect of biological pollination with *Klebsiella pneumoniae* and *Glomus mosseae* fungi and the role of humic acid and the Biocide *Trichoderma harzianum* the yield and percentage of oil in the black seed *Nigella sativa*

Basman wisam Aziz **D. Tawfeeq Bsheer Alsalman**

College of Agriculture and forestry \ Soil Science &Water Resources

University of Mosul

- **Date of research received 2020/11/17 and accepted 1/3/2021**

Abstract

A global experiment was conducted in the greenhouses of the College of Agriculture and Forestry / University of Mosul using a mixture of soil sample taken from the Rashidiya region in Nineveh Governorate, northern Iraq, and placed in 6-kilogram plastic anvils with six transactions and three replications of black seed (black seed) seeded during the winter season 2019. The soil was inoculated with K. pneumoniea bacteria, obtained from the Media Center in Erbil and isolated on MacConKey agar, as well as from the Department of Life Sciences / College of Science, University of Mosul. The fungicide T. harzianum was tested in three levels, and the ability of K. pneumoniea to stabilize atmospheric nitrogen on nitrogen-free broth (NF) broth was tested. The results showed the efficiency of K. pneumoniea in fixing atmospheric nitrogen by relying on measuring the efficacy of the nitrogenase enzyme by Nessler's reagent. The resistance of bacteria to the fungicide T. harzianum at the second and third levels (0.5, 0.250 g / l), and the study also showed a significant effect, as the treatment of inoculation with microscopic and Klebsiella bacteria and the addition of humic acid gave a significant increase of 68 cm, as well as the interaction between them gave the highest values of 75 cm compared to the treatment The comparison was 37 cm, as well as the presence of significant differences in the weight of the yield, as the organic fertilizer treatment achieved a level of 100% with the interaction between the two types of biological fertilizer, which gave the highest rate of (9.73 g) compared to the comparison treatment, which gave the lowest rate of (1.03 g). The results also gave Significant effect on the quality of the oil yield in all treatments and in the overlap between them and the overlap exceeded by giving it the highest rate of the characteristic, which reached 41.81%, and with the addition of the highest level of organic fertilizer compared with no addition of poison. D. Organic and the comparison treatment gave the lowest oil content rate (39.66% and 22.53%) with an increase rate (2.15% and 19.38%). The statistical design CRD was used and the results were analyzed using Duncan for means.

الكلمات المفتاحية: حبة البركة، بكتريا*Klebsiella pneumoniea* ، المبيد الحيوي *Trichoderma harzianum*

المقدمة

أكدت الدراسات أهمية البحوث في مجال التثبيت الحيوي للنيتروجين كون لهذا العنصر اهمية بالغة في التركيبة الاساسية لبناء الخلية الحية لاسيما المادة الوراثية والاحماض الامينية المكونة للبروتينات إضافة للبلاستيدات الخضراء المسؤولة عن بناء المادة الخضراء في اوراق النبات وكذلك بناء منظمات النمو كالسايتوكانينات والاوكسينات والهورمونات المسؤولة عن عمليات الايض الحيوي Miyawak وآخرون، (2006)، إن النيتروجين الجوي غاز غير فعال ويعتبر من الغازات الخاملة ومن غير الممكن ان يستفاد منه النبات بهذه الصورة الا ان يتحول الى الصيغة الفعالة وهي ايون الامونيوم وهذه العملية لا تتم الا بوجود انزيم النيتروجنيز (Nitrogenase) المسؤول عنها Latysheva وآخرون، (2012), وهناك انواع من البكتريا متخصصة في تثبيت النيتروجين لاتكافلية Free living nitrogen-fixing bacteria ومنها بكتريا Azotobacter و بكتريا الـ *Klebsiella* ويعد جنس *Klebsiella* انها مرضية لكن اكثر الدراسات التي تمت على بكتريا *K.pneumoniae* ركزت على كونها لها قابلية على تثبيت النيتروجين. وتم عزل الـ *Klebsiella* من مجموعة مختلفة من النباتات علما انها لاتسبب لها الاصابة باي من الامراض، وتمتلك البكتريا دوراً مهماً في تثبيت النيتروجين (Douglas 2008). كما اشار كل من Foutوآخرون،)2008 (وRuth وآخرون،)2017) الى دور *K.pneumoniae* في عملية تثبيت النيتروجين، وتعتبر *K.pneumonia* و *K. oxytoca* من اهم انواع ا القادرة على تثبيت النيتروجين الجوي وتوفيره للنبات Brisse واخرون، (2006). وتظهر النتائج التي حصل عليها الباحث Chen واخرون، (2016) ان لهذه

البكتريا اهمية من الناحية الزراعية لقابليتها في زيادة المحصول، ويعزى سبب تواجدها بأعداد كبيرة في النباتات والتصاقها لفقدانها الاسواط وهذا على الأرجح (Haahtela واخرون، 1986).

ويرتبط التثبيت الحيوي للنيتروجين بنشاط الانزيم المتخصص النيتروجنيز، يدخل في البناء التركيبي للإنزيم عنصري الموليبديوم والحديد اللذان يدخلان في تكوين البروتينات المعدنية للانزيم وهي البروتين المعدني Mo-Fe-protein اما النوع الثاني فهو عبارة عن البروتين المحتوي على الحديد ويسمى Fe-protein, ولهذا انزيم خصوصياته من هذه الخصوصيات انه

يعمل في ظروف لاهوائية ويعتبر ال Lighimogloben المتسبب في جعل الظروف المحيطة بالانزبم هي ظروف لاهوائية (Jenkins واخرون، 2004).

أدخل مصطلح *Trichoderma* في علم الفطريات التطبيقي سنة 1794 عن طريقPerson_ . كما أشار Bissett، (2011)انها من الفطريات المجهرية التي اعتبرت منذ 200 عام كفطريات المعدةGastéromycètes تنتمي هذه الكائنات الحية الدقيقة إلى مجموعة كبيرة من الفطريات التي ليس لها تكاثرا جنسيا معروفا. ينتج جنس *Trichoderma* العديد من الإنزيمات والمواد الحيوية الفعالة كما يستعمل كعامل للمقاومة البيولوجية وذلك لقدرته على التضاد المباشر مع أجناس فطرية أخرى، مستعملا آليات عديدة منها (تطفل فطري، تنافس، أيض حيوي)، يفرز فطر *Trichoderma* ثلاثة أنواع من المركبات التي تحرض على مقاومة النبات ضد العوامل الممرضة. تستعمل انواع الفطر مدى واسعا من المركبات كمصادر للكاربون والنتروجين.

فطر المايكورايزا من صور العلاقات التعايشية بين النباتات والفطريات وال Mycorrhizaمصطلح فطري يتكون من شقين Myco تعني فطريات وRhiza وتعني جذور أي فطريات الجذور وهي علاقات تبادل منفعة عالية التطور بين فطريات التربة وجذور النباتات ثم تطور مفهوم هذا المصطلح ليصف العلاقة التعايشية المشتركة التي تحصل مابين جذور النباتات الراقية مع فطريات التربة غير الممرضة لأنه في هذه العلاقة يتم التبادل بين الفطر والنبات لبعض المركبات والعناصر التي يتم الاستفادة منها في النمو والتكاثر لكلا الشريكين، تعود فطريات المايكورايزا الى *Glomeromycota* و*Basidiomycota* و*Ascomycota* (Tam، 1995).

تنتشر فطريات المايكورايزا في كل أنواع الترب وكثيراً ما تتواجد فطريات المايكورايزا في التربة الغنية بالعناصر المعدنية والمادة العضوية وهناك أدلة قليلة حول إمكانية تكوين مستعمرات مايكورايزية في الترب الجافة، وتنمو أيضاً في المزارع المائية والترب الغدقة (Peterson واخرون، 2004).

لفطر المايكورايزا وظائف عدة ومهمة للنبات و للتربة وللبيئة أو للأحياء المجهرية النافعة الأخرى والتي تعيش معها في التربة، فالمايكورايزا تعمل على تحسين تركيب و خواص التربة من خلال إحداث التغيرات الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية بواسطة افرازها مادة الكلومالين Glomalin وهذه تعد من المركبات البروتينية التي تعمل على لصق دقائق التربة فيما بينها وان 80% من هذه المادة تعمل على لصق الغزل الفطري بدقائق التربة، كذلك وجد ان هناك مركبات أخرى تفرزها المايكورايزا تعمل على تحسين تركيب التربة مثل مركب Polysaccharides الذي يساعد في لصق دقائق التربة مع بعضها البعض مما يزيد من قابليتها للاحتفاظ بالماء (مطرود، 2017).

بين سلمان، (2018) ان اضافة فطر المايكورايزا *Glomus mosseae*ادى الى التقليل معنوياً من الاثار الضارة الناجمة من العناصر الثقيلة منها Cd وPb مع زيادة المادة الجافة للمجموع الخضري والجذري، وزيادة نسبة تراكم العناصر الثقيلة في الجذور بزيادة تركيز العناصر قياسا بالجزء الخضري الذي كانت تراكمه فيه اقل بأربعة مرات من الجذور.

ويعد ايضاً حامض الهيوميك من الأسمدة العضوية التي لها أثر إيجابي على التربة والنبات، حديثا بدا الاهتمام بالتوجه الى استخدام الاحماض العضوية السائلة كبديل عن الأسمدة المعدنية نظرا" للأضرار الناجمة عن الاستخدام السيء والمفرط للأسمدة المعدنية وبهدف تحسين نمو النبات وأن للحصول على محاصيل وثمار خالية من التلوث، وللتقليل من الأثر المتبقي للأسمدة النيتروجينية كالنترات والنتريت في محاصيل الخضر والثمار (العلاف، 2017).

الهدف من هذه الدراسة لاثبات قابلية بكتريا الـ *Klebsiella* المرضية على تثبيت النيتروجين ودورها في زيادة الحاصل ونسبة الزيت وكذلك مقاومتها لتراكيز مختلفة من المبيد الحيوي*T. harzianum* المضاف للتربة، وتهدف الدراسة أيضا الى تأثير التسميد بفطريات Mycorrhiza بوجود التسميد الحيوي ببكتريا *Klebsiella*والسماد العضوي.Humic acid

المواد وطرائق العمل

اجريت هذه الدراسة في البيت البلاستيكي لكلية الزراعة والغابات حقليا باستخدام تربة مزيجية من منطقة الرشيدية بالموصل شمالي العراق والجدول (1) يبين خصائص تربة الدراسة ومختبريا" في مختبرات قسم علوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل واستخدمت العزلة البكتيرية *Klebsiella pneumoniea* المرضية المستحصل عليها من مركز ميديا في اربيل وقسم علم الحياة في كلية العلوم جامعة الموصل, اما المبيد الحيوي *T. harzianum* فقد تم استلامه من قسم وقاية النبات في كلية الزراعة والغابات .

الجدول (1) بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية لتربة الدراسة

الصفة	الموقع	الوحدة
	الرشيدية	
EC	0.93	$dS.m^{-1}$
PH	7.3	
CaCO3	189.9	$gm.Kg^{-1}$
O.M.	23.79	
Clay	550	$gm.Kg^{-1}$
Silt	425	
Sand	25	
Texture	Silty clay	

وسط **NF** الخالي من النيتروجين: **Nitrogen-free broth**

تحت ظروف التعقيم وكما مبين في جدول رقم (2) حضرت مكونات وسط المرق المغذي الخالي من النيتروجين ثم أكمل الحجم الى 1 لتر من الماء المقطر والمعقم ثم ضبط الاس الهيدروجيني على 7 وعقم الوسط بالمؤصدة تحت ضغط 1 جو ودرجة حرارة 121°م لمدة 15دقيقة وزع الوسط على انابيب اختبار بسداد محكم سعة حجم 30 $سم^3$ بواقع 15 $سم^3$ لكل انبوب واستخدمت هذه الانابيب لتنمية البكتريا ومعرفة قدرتها على تثبيت النيتروجين Wilson, 1952)).

الجدول (2) وسط **NF** الخالي من النيتروجين.

المكونات	التركيز **g/L**
Glucose	10 g
K_2HPO_4	0.52
KH_2PO_4	0.41
$MgSO_4.7H_2O$	0.16
NaCl	0.20
$CaSO_4.2H_2O$	0.20
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.002
$FeSO_4.7H_2O$	0.005
MgSO4.7H2O	0.1

كاشف نسلر **Nessler reagent**

لغرض الكشف عن قابلية بكتريا *K. pneumoniea* في تثبيت النيتروجين الجوي استخدم هذا الكاشف في تجارب الكشف عن المونيا المتكونة نتيجة افراز البكتريا لانزيم النيتروجنيز في عملية التثبيت الحيوي للنيتروجين الجوي، وحسب تعليمات الشركة المصنعة Sigma حفظ الكاشف في مكان بارد ومظلم لحين استخدامه.

تنمية وحفظ بكتريا *K. pneumoniea*

زرعت العينات البكترية قيد الدراسة على وسط MacConKey agar لغرض تنشيطها بواقع 10 µl لقاح بكتيري لكل 100سم^3 من الوسط وحضنت ليلة واحدة في جهاز الحاضنة الهزازة (*Shaker*) 200 دورة/دقيقة نقلت الى اطباق Petri dishالبلاستيكية الحاوية على وسط MacConKey agar الصلب وحضنت في حاضنة النمو Growth incubator عند درجة (1±37° م)، بعدها حفظت الاطباق البلاستيكية في الثلاجة عند درجة (4°م) لغرض وقف النمو البكتيري لحين استخدامها في التجارب اللاحقة.

تنمية البكتريا على وسط**:Nitrogen-free broth**

لغرض اختبار قدرة البكتريا على تثبيت النيتروجين الجوي تم باستخدام Loop بمزج حملة loop واحدة من الـزرع البكتيري المنشط ولقحت انبوبتي اختبار تحوي كل منهما على 10 سم^3 من الوسط الخالي من النيتروجين غلقت الانبوبتان وحضنت بدرجة حرارة 30° م بشكل مائل Slants، وتم قياس كثافة النمو بعد 6 ايام بوساطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600 nm.

اختبار قدرة بكتريا*K. pneumoniea* على تثبيت النيتروجين باستعمال كاشف **Nessler**:

بعد 6 ايام من تحضينها تم أختبار قدرة البكتريا على تثبيت النيتروجين وذلك بمزج 0.5 سم^3 من عينة الزرع البكتيري مع 1.75 سم^3 ماء مقطر معقم ثم اضيف 0.25 سم^3 من الكاشف في انابيب اختبار ومزج الخليط لمدة 10 ثواني وتركت الانابيب لمدة 10 دقائق. قيست الامتصاصية لجميع الانابيب بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 480 nm. اما معاملة السيطرة الــ control (المكون من مزيج من الكاشف والماء والوسط غير الملقح) فاستخدمت لتصفير الجهاز.

إختبار مقاومة البكتريا للمبيد ***T. harzianum*** وتحديد أقل تركيز مثبط لنموها:

تنفذ تجربة مختبرية لاختبار تأثير المبيد الحيوي *T. harzianum* في نمو بكتريا *Klebsiella pneumonia* لتحديد اقل تركيز مثبط لنمو البكتريا (MIC) Manimum Inhabitory Concentration ويجرى اجراء التخافيف المتسلسلة للقاح البكتري ثم يحضر الوسط المغذي المتخصص MacConKey agar ويصب في اطباق بتري ويضاف اليه المبيد الحيوي قبل تصلبها وبأربع مستويات الموصى به والتركيز العالي وأقل من الموصى به اضافة لمعاملة المقارنة (من دون مبيد) وباستعمال ابرة التلقيح يتم تخطيط الاطباق بثلاث مكررات لكل تركيز، تحضن الاطباق على درجة حرارة 37 م ولمدة حضن (3، 7، 10، 14) يوما. تسجل اعداد المستعمرات خلال مدة التحضين (موسى واخرون، 2012).

عزل سبورات فطريات المايكورايزا **VAM** من تربة الدراسة

لغرض التأكد من وجود فطريات المايكورايزا في تربة الدراسة أجريت عزل لسبورات فطريات المايكورايزا واستخدمت طريقة النخل الرطب والتصفية لعزل سبورات الفطريات الحويصلية الشجيرية VAM من عينات التربة وحسب ماجاء به (Phillips واخرون، 1970). اذ تم اخذ 100 غم تربة محيطة بجذور النباتات بعد تجفيفها هوائيا وتقدير نسبة الرطوبة الوزنية، ثم وضعت في بيكر لتر يحتوي **500** مل ماء مقطر رجت جيدا ثم تركت (لمدة 15-20) دقيقة. مرر العالق من مجموعة مناخل بقطر 38 و45 و180 و250 مايكرون، ثم غسلت المناخل وجمعت البقايا من السبورات والشوائب من فوق كل منخل في طبق بتري نظيف ومعقم.

اختبار كفاءة المايكورايزا في الاصابة

لغرض اختبار كفاءة فطريات المايكورايزا في الاصابة استخدمت طريقة (Tabatabaei) وذلك بوضع القطع الجذرية في انبوبة اختبار وتم غسلها جيدا من بقايا التربة العالقة بها، ثم اضيف محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH تركيز 10 % المحضر من اذابة 10 غم KOH في 100 مل ماء مقطر ثم وضعت الانابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 90 درجة سيليزية (لمدة 20 – 60) دقيقة اعتمادا على سمك ولون الجذور. تم غسل القطع الجذرية بعد ذلك بماء معقم. اضيف محلول تركيز 10% من حامض الهيدروكلوريك المحظر من اضافة 10 مل حامض HCl المركز في 90 مل ماء مقطر (لمدة 3-2) دقيقة وسكب الحامض دون غسل الجذور. اضيف محلول صبغة blue trypan على القطع الجذرية في انابيب الاختبار ثم نقلت الى حمام مائي 90 درجة سيليزية لمدة 12-30 دقيقة. اضيف حامض اللاكتيك على القطع الجذرية بعد استخراج القطع الجذرية من الانابيب ووضعها على مشبك ثم نشفت واصبحت جاهزة للفحص المجهري.

التجربة البايلوجية

نفذت تجربة بايولوجية واحدة باستخدام سنادين بلاستيكية سعة 6 كغم خلال الموسم الشتوي 2019 في البيت البلاستيكي في كلية الزراعة والغابات واستخدمت عينة التربة من محطة البحوث الزراعية في الرشيدية. لدراسة تأثير المبيد الحيوي *Trichoderma spp* في التسميد الحيوي (بكتريا *klebsiella*) وتأثير ذلك في حاصل نبات الحبة السوداء ونسبة الزيت. تتضمن التجربة ثلاث معاملات من الاسمدة الحيوية بكتريا *klebsiella* وفطريات Mycorrhiza واضافة وعدم اضافة المبيد الحيوي وثلاث مستويات من السماد العضوي حامض الهيوميك وبثلاث مكررات وكانت المعاملات كالاتي:

3 معاملات اسمدة حيوية,2 مبيد حيوي ,3 مستويات سماد عضوي, 3 مكررات=54 وحدة تجريبيه. كما موضح في الجدول التالي:

الجدول (3): يبين معاملات التسميد الحيوي والعضوي (**acid Humic**) في حالة اضافة وعدم اضافة المبيد الحيوي ***T.harzianum*** **).**

رقم المعاملة	معاملات التسميد الحيوي	مستويات ***-T.harizanum*** **acid Humic**			مستويات ***T.harizanum +*** **acid Humic**		
		1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
1	من دون اضافة *Klebsiella pneumoniea* و *Mycorrhiza G.mosseae*	0%	0 %	0%	0 %	0%	0%
2	*Klebsiella pneumoniea*	0%	50 %	100%	0 %	50%	100%
3	*Mycorrhiza G.mosseae* + *Klebsiella pneumoniea*	0%	50 %	100%	0 %	50%	100%

أضيفت الاسمدة الحيوية والمبيد الحيوي الى سنادين الدراسة بعد ظهور البادرات وحسب المستويات المذكورة سابقا".

تقدير نسبة الزيت الكلي للبذور:

لغرض قياس نسبة الزيت في بذور حبة البركة نستخدم الطريقة الكيميائية حسب الطريقة الواردة من قبل بإستعمال المذيب (Petroleum ether (40–60°C وتم استخلاص الزيت بواسطة جهاز السيكسوليت (.Soxhlet extractor)

حيث اخذ وزن (4غم) من البذور حبة البركة المطحونة والجافة حيث وضعت في ورق ترشيح واغلقت ثم وضعت في الكشتبان (Thimble) ثم اضيف (75 مل) من مذيب ايثر البترول في بيكر معلوم الوزن وبدرجة حرارة (110 م) ولمدة 3 ساعات ثم فصل المذيب عن الزيت عن طريق التبخير لمدة ساعة واحدة، ثم اخذ وزن البيكر مع الزيت من خلال فرق الوزن قدر نسبة الزيت الكلي في البذور (Tzompa-Sosa واخرون، 2014).

القياسات النباتية خلال فترة نمو الحاصل:

- قياس ارتفاع النباتات (سم):

تم قياس ارتفاع النباتات بواسطة شريط القياس من سطح التربة الى اعلى قمة للنبات من كل معاملة.

- مكونات الحاصل، وزن الحاصل غم.
- نسبة الزيت الكلي في الحبوب %.

النتائج والمناقشة

إختبار مقدرة بكتريا ***K. pneumoniea*** على تثبيت النيتروجين الجوي على وسط خالي من النيتروجين

أظهرت الدراسة مشاركة البكتريا المرضية في تثبيت النيتروجين الجوي أسوة بأحياء التربة المجهرية، لذلك حظيت تلك الاحياء بدراسات اوسع من تلك التي تثبت النيتروجين كما انها القت باهتمامها وبشكل مكثف على التطبيقات الحقلية. ان اختلاف القابلية على تثبيت النيتروجين من قبل الاحياء المجهرية المختلفة هي احدى السمات المميزة لتلك الاحياء لذا اختبرت قابلية بكتريا *K. pneumoniea* على النمو في الوسط الخالي من النيتروجين (Nitrogen-free broth (NF، وبعد مرور 6 ايام من تحضيها بالحاضنة بدرجة 30° م، اظهرت النتائج من خلال الاختبار بمحلول نسلر قدرة بكتريا *K. pneumoniea*على تثبيتها للنيتروجين ونشاط فعالية انزيم النيتروجينيز باستخدام كاشف نسلر، وهذا دليل يثبت ان هذه العزلة لها قدرة على تثبيت النيتروجين وامتلاكها لانزيم النيتروجينيز.

نسبة إصابة الجذور بالمايكورايزا

ان اصابة جذور النبات نتيجة تلقيح التربة بفطر المايكورايزا حيث بلغت نسبة الإصابة بلقاح المايكورايزا 60.85% ويعزى سبب نسبة الإصابة للجذور بالمايكورايزا الى كفاءة اللقاح المستعمل واستجابة العائل النباتي، وأيضا حاجة النبات لعنصر الفسفور Yinli Bi)واخرون،.(2018

تأثير إضافة السماد العضوي والحيوي والتداخل بينهما مع إضافة وعدم إضافة المبيد الحيوي **(*T.harzianum*)** على حاصل الحبوب.

يتبين من النتائج المتحصل عليها في الجدول (4) ان لإضافة السماد العضوي والحيوي والتداخل بينهما مع إضافة وعدم إضافة المبيد الحيوي (*T.harzianum*)تأثير على حاصل الحبوب والى وجود فروقات معنوية في وزن الحاصل اذ حققت معاملة السماد العضوي بمستوى 100% مع التداخل بين نوعي السماد الحيوي حيث أعطى اعلى معدل بلغ (9.73 غم) قياسا بمعاملة المقارنة التي أعطت اقل معدل بلغ(1.03غم)، اما عن تأثير إضافة السماد الحيوي (الفطري والبكتيري) كل على حدى تظهر النتائج تفوق معاملة إضافة بكتريا *K. pneumoniea* معنويا على معاملة إضافة فطر المايكورايزا حيث بلغ معدل وزن الحاصل(6.84غم) و(8.63 غم) قياسا مع معاملة المقارنة 0.74)غم)(1.03غم) ومعاملة فطر المايكورايزا بلغ معدل وزن الحاصل (6.77 غم) و(8.09غم) قياسا مع معاملة المقارنة 0.74)غم) (1.03 غم) وبكلتا الحالتين عندعدم إضافة المبيد الحيوي الفطري *T. harizanum*وعند اضافته على التوالي . وتتفق هذه النتائج مع ما جاء به (Al –Sultani, 2015) ووجد سلمان، (2018). عند التلقيح بفطريات Mycorrhiza ادت الى زيادة معنوية في المادة الجافة للمجموع الخضري والجذري لنبات الذرة الصفراء وبالتالي زيادة في معدل وزن الحاصل بأن استعمال المخصبات الحيوية. حيث يعود السبب في زيادة الحاصل الى دور السماد الحيوي والعضوي الذي يعمل على تحسين الصفات الكيميائية والفيزيائية والحيوية للتربة من خلال توفيره للعناصر الغذائية للأحياء الدقيقة في محيط الجذور والتي تؤدي الى تحلل المواد العضوية وبالتالي زيادة جاهزية العناصر الغذائية للنبات مما أدى الى زيادة النمو الخضري كزيادة الوزن الجاف للمجموع الخضري للنبات كما وأيضا زيادة في ارتفاع النبات. وأيضا يعود السبب في زيادة الحاصل الى دور المخصبات الحيوية حيث تعمل هذه المخصبات على افراز بعض منظمات النمو التي لها دور في زيادة نمو النبات حيث اشارت العديد من الدراسات ان فطر Mycorrhiza يعمل على زيادة نمو وحاصل النبات من خلال تكوين علاقة تكافلية مع جذور النبات والتي تزيد من قدرة النبات على امتصاص المغذيات الضرورية لنمو النبات الصافي وآخرون2017، كذلك لفطر الترايكودرما دور مهم في زيادة تطور ونمو الجذور كذلك زيادة جاهزية العناصر في محيط الجذور مما يؤدي زيادة امتصاص العناصر الغذائية في المنطقة الجذرية للنبات Ying)واخرون، 2018).

الجدول (4) تأثير الاضافة الحيوية ومستويات حامض **Humic** والمبيد الحيوي على وزن الحبوب (غم)

الإضافة الحيوية	***T.harizanum* -**			***T.harizanum* +**			متوسط الإضافة الحيوية
	مستويات اضافة حامض **Humic**						
	0%	50%	100%	0%	50%	100%	
Control	1.07	0.98	0.74	1.26	0.83	1.03	0.73 c
G. mosseae	3.98	4.48	6.77	4.03	5.04	8.09	1.83 c
K. pneumoniea	4.88	4.55	6.84	4.58	6.53	8.63	2.09 b
التداخل	6.76	6.75	7.81	5.61	8.33	9.73	2.49 a
متوسط المبيد الحيوي	1.86 b			2.29 a			

تأثير إضافة الأسمدة الحيوية على ارتفاع النباتات للمجموع الخضري في حالة إضافة وعدم إضافة المبيد الحيوي **T.*harzianum*))**

يتبين من الجدول (5) الى وجود فروقات معنوية في معدلات ارتفاع النبات مع جميع معاملات الدراسة مقارنة بمعاملة المقارنة حيث أدى اضافة السماد العضوي حامضHumic الى حدوث زيادة معنوية في ارتفاع النبات قياسا في حين ظهر تأثير العوامل الاحيائية باضافة اللقاح الحيوي والسماد العضوي تأثيرا" معنويا في زيادة ارتفاع النبات إذ أعطت معاملة التلقيح بال Mycorrhiza وبكتريا *K. pneumoniea* واضافة حامض الهيومك زيادة معنوية 68 سم وكذلك أعطى التداخل بينهم على القيم بلغ 75سم مقارنة بمعاملة المقارنة 37 سم. أما عن تأثير العوامل الأحيائية بمفردها فقد أظهرت النتائج عدم وجود فروقات معنوية في ارتفاع النبات.. وتبين من خلال النتائج أن التداخل بين المبيد الحيوي فطر *T.harizanum* والسماد العضوي والعوامل الاحيائية أظهرت ان للمبيد الحيوي تأثير ايجابي في الزيادة المعنوية في ارتفاع النبات حيث اعطت 74 سم مقارنة بمعاملة المقارنة 39 سم وهذا التأثير للمبيد الحيوي توضحه النتائج لجميع المعاملات مقارنة بمعاملة المقارنة حيث ظهرت فروقات معنوية كبيرة في الارتفاع وقد يعود السبب في الزيادة في إرتفاع النبات الى دور السماد العضوي حامض الهيومك المضاف الى التربة والتي تعمل على زيادة معدلات النتروجين وتحفيز النبات على إنتاج الاوكسينات خاصة في قمة النبات مما أدى الى إستطالة الخلايا وبالنهاية زيادة ارتفاع النبات Sharaki 1985,. كما إن لبكتريا *K. pneumoniea* وفطريات Mycorrhiza الدور الكبير في وفرة النتروجين والفسفور اللذان لهما دورا" في زياد نشاط عملية التركيب الضوئي مما يؤثر في زيادة ارتفاع النباتات Jixang وآخرون (2017) كما تلعب الأسمدة العضوية دوراً في التركيب الضوئي وبالتالي زيادة طول النبات (1988), Abu Dhahi and Al Yunis, كما ان للاسمدة العضوية وخاصة المتحلل منها كسماد حامض Humic دور مهم في تحسين خصائص التربة الخصوبية والفيزيائية مما يزيد من جاهزية العناصر الكبرى والصغرى الضرورية لبناء خلايا النبات وللقيام بالعمليات الحيوية (Dhiab, (2012 هذه النتائج تنسجم مع ما حصل عليه (2015), Al Sultani, و(2015),AlSharifi, الذين ذكروا بأن استعمال السماد العضوي أدى الى زيادة الارتفاع أما عن الزيادة المعنوية الحاصلة في ارتفاع النبات في معاملات التداخل فقد تعود لتداخل الاثر التجميعي للسمادين العضوي والحيوي بوجود المبيد الحيوي حيث إن هذه المخصبات تزيد من جاهزية العناصر الغذائية عن طريق عملياتها الحيوية كعنصري النتروجين والفسفور وكذلك تحفيزها للنبات لإنتاج منظمات النمو Fitter, (, (1985. وقد اثبتت الدراسات ان فطريات المايكورايزا عند إضافتها كلقاح حيوي فان لها دور كبير في اذابة وامتصاص الفسفور وكذلك تعمل على تحسين امتصاص الماء وايصاله الى النبات وقد يعزى السبب في ذلك الى اهمية عنصر الفسفور الذي يسهم في تحسين نمو النبات وادائه الوظيفي عند اضافة فطر المايكورايزا كسماد حيوي (Yoram and Koltai, 2010).

الجدول (5) تأثير الاضافة الحيوية ومستويات حامض **Humic** والمبيد الحيوي على ارتفاع النبات (سم).

الإضافة الحيوية	***-T.harizanum***			***T.harizanum +***			متوسط الإضافة الحيوية
	مستويات اضافة حامض **Humic**						
	0%	50%	100%	0%	50%	100%	
Control	31	34	37	32	42	39	32.33 c
G. mosseae	48	55	61	51	58	67	56.55 b
K. pneumoniea	44	54	64	48	59	68	56.11 b
التداخل	63	75	71	60	70	74	68.44 a
متوسط المبيد الحيوي	56.53 b			61.51 a			

تأثير الاضافة الحيوية ومستويات حامض **Humic** نسبة الزيت في الحبوب %

تدل النتائج في الجدول (6) أن الاسمدة الحيوية وبوجود السماد العضوي حامض **Humic** أعطت تأثير معنوي في صفة حاصل الزيت في جميع المعاملات وفي التداخل بينها وتفوق التداخل بأعطائه أعلى معدل للصفة بلغ 41.81 % ومع اضافة اعلى مستوى للسماد العضوي مقارنة مع عدم اضافة السماد العضوي ومعاملة المقارنة التي اعطت اقل معدل لنسبة الزيت (39.66% و22.53%) بنسبة الزيادة (2.15 % و19.38 %). ويرجع سبب الزيادة في حاصل الزيت الى دور وتأثير التداخل بين الأسمدة الحيوية والسماد العضوي **Humic** في زيادة صفة حاصل البذور تأثيرا" معنويا" في صفة حاصل الزيت في معاملات الدراسة وهذ يتفق مع ما وجده الداودي والجبوري(2014) في دراستهم لتاثير التسميد بفطريات Micorrhizaعلى نبات فول الصويا حيث أظهرت النتائج ان التسميد الحيوي أدى الى زيادة معنوية في حاصل البذور والزيت أثبت نجاح أستخدام السماد الحيوي 1EM مع محصول فول الصويا حيث يمكن أن تحل محل جزء من الأسمدة الكيمياوية بنوعيها النيتروجينية والفوسفاتية وبأستمرار أستخدام هذا السماد لعدة سنوات متتالية قد يمكن الاستغناء عن التسميد الكيمياوي كليا" , وكذلك تتفق النتائج مع ما حصل عليه أمين وعباس(2019) في دراستهم عن تأثير المخصب الحيوي والرش بالدبال والتسميد بالمغنسيوم في الصفات الكمية والنوعية للزيت الطيار في نبات المعدنوس حيث وجدا ان هناك زيادة معنوية في نسبة الزيت نتيجة التداخل بين تأثير السماد الحيوي والرش بالدبال .

ويلاحظ من الجدول أيضا" التأثير الايجابي لفطريات Micorrhiza في الزيادة المعنوية في نسبة الزيت في المعاملات مقارنة ببكتريا *K. pneumoniea* ومعاملة المقارنة حيث كانت نسبة الزيت في الحبوب في المعاملات الملقحة بفطر Micorrhiza وعند اضافة السماد العضوي 39.72% مقارنة بالمعاملات الملقحة ببكتريا لبكتريا *K. pneumoniea* التي اعطت38.74% ومعاملة المقارنة 22.53% وقد يعزى انخفاض نسبة الزيت في الحبوب في حالة المعاملات الملقحة ببكتريا الكليبسيلا الى ان التثبيت الحيوي للنيتروجين الذي تقوم به بكتريا *K. pneumoniea* يؤدي الى انخفض تركيز الزيت في الحبوب هذا يتفق مع ما وجده كل من Khaliq، (2004) وحسن وشاكر، (2013) ان التسميد النيتروجيني او وفرة النيتروجين في اجزاء النبات ترافقه انخفاض في محتوى الزيت في الحبوب نتيجة ارتفاع النبات وتفرعه وزيادة اعداد البذور المتكونة.

الجدول (6) تأثير الاضافة الحيوية ومستويات حامض **Humic** والمبيد الحيوي على نسبة الزيت%

متوسط الإضافة الحيوية	***T.harizanum* +**			***-T.harizanum***			الإضافة الحيوية
	مستويات اضافة حامض **Humic**						
	100%	50%	0%	100%	50%	0%	
% 22.02 c	22.53 %						**Control**
% 32.98 b	39.72	36.56	27.32	37.22	29.15	24.62	***G. mosseae***
% 33.15 b	38.74	33.88	29.31	36.25	32.75	27.15	***K. pneumoniea***
36.05 a %	41.81	37.15	32.85	39.66	34.76	30.67	التداخل
	35.48 a %			31.58 b %			متوسط المبيد الحيوي

تقدير اقل تركيزمثبط **MIC** من المبيد الترايكودرما في نمو خلايا بكتيريا الكليبسيلا

أوضحت نتائج هذا الاختبار أن هناك فروقات معنوية واضحة في تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الحيوي ترايكوديرما في تثبيط نمو بكتريا لبكتريا *K. pneumoniea* على الوسط الزرعي Mc Conkey حيث توضح النتائج في الجدول رقم (7) ان التركيز الاعلى من الموصى به (2 مل) ادى الى تثبيط قاتل للنمو بلغ 100% تقريبا عند التخفيفين الثالث والرابع (1000000/1 و10000000/1) على التوالي و وعند مدد 7 أيام 10 أيام مقارنة بقيم معاملة المقارنة عند نفس التخافيف والمدد في حين اظهرت النتائج ان للميبيد الحيوي تأثير تثبيطي لنمو بكتريا لبكتريا *K. pneumoniea* بنسب (30% - 50%) (عند مستوى التركيز الاول والثاني (0.5 مل و1 مل) على التوالي ولمدد مختلفة مقارنة مع النمو البكتيري لمعاملة المقارنة وعند نفس الظروف كما يظهر ذلك من الجدول اعلاه ويتوافق مع ما حصل عليه Soumikوآخرون (2010) عند استخدامه للمبيد الحيوي Trichoderma في تلقيح التربة اثر سلبيا على الفطريات عند المستويات العالية كما تبين النتائج ايضا ان عند المدة (14 يوم) لم يظهر للمبيد اي تأثير وعند كل المستويات والتخافيف وهذا ربما يكون بسبب بتأقلم البكتريا على التعايش مع الفطر الحيوي عند تركيزه العالي(Mahdy وآخرون، 2011).

الجدول (7) تقدير اقل تركيز مثبط **MIC** من المبيد الحيوي الترايكودرما في نمو خلايا بكتيريا الكليبسيلا

تخافيف البكتريا	3 ايام				7 أيام				10 أيام				14 يوم			
	C_0	C_1	C_2	C_3	C_0	C_1	C_2	C_3	C_0	C_1	C_2	C_3	C_0	C_1	C_2	C_3
1/10000	++++	+++	++	++	++++	++++	+++	++	++++	++++	+++	++++	+++++	+++++	+++++	++++++
1/100000	+++	++	++	+	+++	++	++	++	++++	+++	++	++	+++++	++++	++++	+++++
1/1000000	++	++	++	+	+++	++	++	-	+++	+++	++	-	+++++	+++	++++	++++
1/10000000	++	++	++	+	++	++	+	-	+++	+++	++	-	+++++	+++	++++	++++

C_0 = صفر **C_1** = 0.5 مل **C_2** = 1 مل **C_3** = 2 مل

\+ نمو ++ نمو جيد +++ نمو جيد جدا" +++++ نمو غير متأثر

ثبت المصادر العربية والأجنبية

- أمين، مازن موسى عبد وعباس، جمال أحمد (2019). تأثير المخصب الحيوي والرش بالدبال والتسميد بالمغنزيوم في الصفات الكمية والنوعية للزيت الطيار في نبات المعدنوس Petroselinum crispum Mill. المجلة السورية للبحوث الزراعية 6 (2) :350-368.
- حسن, احمد ياسين وشاكر, أياد احمد طلعت (2013) :تأثير ألتسميد بالحديد والنتيتروجين والري التكميلي في حاصل الكتان *Linum usitisitssimum L* مجلة ديالى للعلوم الزراعية 5(2)659-669.
- الداودي, علي حسين رحيم والجبوري,صالح محمد ابراهيم (2014) :تأثير التسميد الحيوي والفوسفاتي في صفات صنفين من فول الصويا {Glycine max(L) Merrill}مجلة تكريت للعلوم الزراعية1813-1646,(2) (14)..
- سلمان، نريمان داود (2018). عزل وتشخيص فطر المايكورايزا واستعماله في الازالة الحيوية للتربة المعاملة بالحمأة ونمو نبات الذرة الصفراء. مجلة ديالى للعلوم الزراعية، 205-221.
- مطرود، عبد النبي عبد الأمير (2017). دور فطريات المايكورايزا في نمو النبات وحمايته من الإصابات المرضية. الملتقى العلمي لعلماء وباحثين الزراعة والنخيل، كلية الزراعة، جامعة البصرة.
- العلاف، أياد هاني اسماعيل (2017). أشجار الفاكهة المثمرة في 333 سؤال وجواب / دار زهران للنشر والتوزيع / الأردن.
- موسى، أمل حسين، عبد الله، شهرزاد نجم (2012). دراسة تأثير المثبط الادنى MIC لبعض مضادات الحيوية في عوامل الالتصاق لبكتريا Acinetobaeter المعزولة من اصابات الجروح والحروق. مجلة كلية التربية الاساسية، الجامعة العدد (76) 813-826.
- **Abu Dhahi,** Y. H; and Al Yunis, M. A.(1988) Directory of Plant Nutrition. *Ministry Higher Education and Scientific Research. Iraq.*
- **Al -Sultani**, A. N. (2015) Effect of organic fertilizer and humic Master Thesis. Faculty of Agriculture.University Al – Qasim Green.
- **Al-Sharifi,** M. G. (2015) Effect of organic and chemical fertilizers in growth and yield Potatoes *Solanum tuberosum* L. Master Thesis. faculty of Agriculture. University of Kufa . Iraq.
- **Bissett**, J.(2011): A revision of the genus Trichoderma. II. Infrageneric classification Canadian Journal of Botany 69(11):2357-2372.
- **Brisse**, S.; Grimont , F. and Grimont , P. A. D. (2006) . Prokaryotes. New York, NY: Springer New York . p. 159-196.
- **Chen**,M;Y. Li. ; L. Tang; J. zheng (2016) :Genomic identification of nitrogen fixation klebsilla varicella, klebsilla pneumonia. Journal of basic microbiology 56(1)78-84 .
- **Dhiab,** N. S. (2012) Using phosphate rock and superphosphate and adding fertilizers fungal and bacterial growth and yield of potatoes. Horticulture DepartmenCollege Agriculture Baghdad University.
- **Douglas**, F. (2008). Colifroms- Medical Microbiology Book. USA.
- **Fitter,** A. H. (1985) Functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas under field conditions.*New Phytol.99,:237-263.Potato Research.* 54,P:137-155.

- **Brisse**, S.; Grimont , F. and Grimont , P. A. D. (2006) . Prokaryotes. New York, NY: Springer New York . p. 159-196.
- **Fout**, D.; Tyler, H.; Deboy, R.; Dougherty, S.; Ren, Q.; Badger, J. Durkin, A.; Hout, H.; Shirvastava, S.; Kothary, S.; Robert, J.; Donson, R.; Mohamoud, Y.; Khouri, H.; Roesh, L.; Kragfeld, K.; Struve, C.; Triplett, E. and Methe, B. (2008) . Complete genome sequence of the N2. fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumonia* 342 and virulence prediction verified in Mice – Plos. J. Gene., 4 (7):1-18.
- **Haahtela**, K.; Laakso, T., and Korhonen, T.K. (1986) . Associative nitrogen fixation by *Klebsiella spp*. adhesion sites and innoculation effects on grass roots. J. Appl. Environ. Microbiol ., 52(2):1074-1079.
- **Jenkins**, B. D.; Steward, G. F.; Short, S. M.; Ward, B. B.; and Zehr, J. P. (2004). Finger printing diazotroph communities in the chesapeake bay by using a DNA macroarray. J. Appl. Environ.Microbiol., 70: 1767-1776.
- **Jixang**,Lin;W.yingnan;S.shengnan;M.chunsheng;Y.xiufeng.(2017). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth photosynthesis pigments of leymus chinensis seedlings under s ah-alkali stress and nitrogen deposition.Science of the Total Enviroment(576),234-241.
- **Khaliq,** A. (2004). Irrigation and management effects on productivity of sunflower (Helianthus annuus L.) Ph D. Thesis Department of Agronomy, University of Agriculture, Faisalabad.
- **Koltai, H. and Yoram,** K. 2010. Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function, second edition, Springer Science.
- **Latysheva**, N.; Junter,V.L.;Palmer,W.J.; Codd,G. and Baker.D. (2012). The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria.J. Bioinformatics., 28 (5) 603-606.
- **Miyawak**, K.; Tarkowski, P.; Kitano, M.M; Kato, T.; Sato, S.; Tarkowska , D.; Tabata,S.; Sandberg , G. and Kakimoto, T. (2006). Role of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyl transferases and tRNA isopentenyl transferases in cytokinin biosynthesis . J.PNAS ., 103:16598-16603.
- **Peterson,** R. L.; Massicotte, H. B. & Melville, L. H. (2004). Mycorrhizas: anatomy and cell biology. National Research Council Research Press. ISBN 978-0-660-19087-7.
- **Ruth** A Schmitz; K . kai;G.Roman.(2017): Regulation of nitrogen fixation in *Klebsilla pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii* :Nif L, transducim, two environmental signals to the Nif transcriptional activator or Nif A. Journal of molecular microbiology4(3),235-242.
- **Sharaki,** M. M; A. K; (1985) Plant Physiology (Translator) Group Arabic for publication.

- **Soumik**,Sarkar,P.Narayanan,A.Divakaran,A.Balamurugan,R.P.remkumar(2010): The in vitro effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelial growth in the biocontrol fungus Trichoderma harzianum.
- **Tam,** Paul C.F. (1995). "Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by Pisolithus tinctorius". Mycorrhiza. 5: 181–187.
- **Tzompa-Sosa**, D.A.; Yi, L.; Van Valenberg, H.J.; Van Boekel, M.A.; Lakemond, C.M. Insect lipid profile: Aqueous versus organic solvent-based extraction methods. Food Res. Int. 2014, 62, 1087–1094.
- **Wilson**, P.W. and Knight, S.C. (1952) . Experiments in Bacterial Physiology. Burguess, Minneapolis, USA. 49.
- **Ying** -Tzu Li,;G.H.san ;M.H.yuh;H.H.cheng(2018):Effects of Tricoderma asperellum on nutrient up take and Fusarium wilt of tomoto. Crop production 110,275-282.
- **Yinli** Bi, Yanxu Z. and Zou H. (2018). Plant growth and their root development after inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi in coal mine subsided areas. International Journal of Coal Science & Technology volume 5, pages47–53.