بسم الله الرحمن الرحيم

جامعة السودان للعلوم والتكنولوجيا

كلية الدراسات الزراعية

قسم علوم التربة والمياه

بحث تكميلي لنيل درجة البكالاريوس مرتبة الشرف

بعنوان:

دراسة معملية لمعرفة أثر مستويات مختلفة من درجات الحرارة على نمو بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من نبات الفول المصري

إعداد الطالبة:

فاطمة الزهراء مأمون عثمان فضل

إشراف البروفسور:

محمد أحمد الحاج حداد

أكتوبر 2017م

الآية

بسم الله الرحمن الرحيم

قال تعالي:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُم مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ ۚ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ﴿٢٩﴾

صدق الله العظيم

سورة البقرة الآية (29)

الإهداء

إلهي لا يطيب الليل إلا بشكرك ولا يطيب النهار إلا بطاعتك

ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك ولا تطيب الجنة إلا برؤيتك جل جلالك

إلي من بلغ الرسالة وأدى الأمانة ونصح الأمة إلي نبي الرحمة ونور العالمين

سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم

الي الينبوع الذي لا يمل العطاء بسمة الحياة وسر الوجود إلي من كان دعائها سر نجاحنا

إلي من تحت قدميها جنات الخلد

أمي الغالية

الي من كلله الله بالهيبة والوقار إلي من علمنا العطاء من دون إنتظار إلي من نحمل

اسمه بافتخار ندعو الله أن يمد في عمره

والدي الغالي

إلي عبق الماضي المتفرد ودفئ الانتماء الاخضر ضد الأزمنة القادمة ...

أخوتي

إلي كل من أخذ العلم جوادا يمتطيه ليقطع به درب المعرفة الشائك وينهل من

معينها الثر ...

الي (s.a.m.k.o.n.i.y.a.t)

الي زملائي

إلي أعمامي

إلي من ستبقي صورهم في عيوني

إلي الجميع

شكر وتقدير

الشكر أولا وأخيرا لله تعالي

الشكر والتقدير لكل من أسدي لي نصحا أو قدم لي عونآ لإتمام هدا البحث..

وأخص بالشكر جميع الأساتذة بقسم علوم التربة والمياه.

أتقدم بوافر الشكر والتقدير للبروفيسور/ محمد أحمد الحاج حداد على الجهد الكبير والعمل المتميز

الذي قدمه لي والنصح الذي قدمه لي طيلة مشوار البحث

والشكر أيضا للدكتور / السموأل محمد ميرغني عثمان الذي لم يبخل بوقته الغالي وبذل مجهوده لمتابعة هدا البحث .

وللأستاذة زينب حاج شريف التي لم تبخل علينا بشيء جزاها الله خيرا ووفقها في كل طرقاتها

فهرس المحتويات

المحتويات **رقم الصفحة**

الآية I
الإهداء I
شكر وتقدير II
فهرس المحتويات IV
ملخص الدراسة VI
الباب الأول 1
المقدمة Introduction 1
الباب الثاني 2
الدراسات السابقة 2
1.2 بكتيريا الرايزوبيوم: 3
1.1.2مجاميع التلقيح التبادلية: 4
2.1.2الخصائص العامة للبكتريا: 4
3.1.2 المميزات الرئيسية لبكتريا العقد الجزرية : 4
2.2 البكتريا المتكافلة: 5
1.2.2 شكل العقدة البكترية: 6
2.2.2 طريقة تكوين العقد: 6
3.2 الظروف المؤثرة علي نمو البكتريا 7
1.3.2الحرارة Temperature 8
تم تقسيم الكائنات الحية الدقيقة من حيث تحملها للحرارة الي ثلاثة مجموعات: 9
2.3.2تأثير درجة الحرارة المرتفعة علي البكتريا: 9
3.3.2تأثير درجة الحرارة المنخفضة: 10
4.2 تثبيت النتروجين تكافليا :Symbioctic fixation of Nitrogen 10
5.2 افراز المركبات النتروجينية : 11
5.2 الرايزوبيوم وتكوين العقد الجزرية:Rhizobium and Nodulation 11
6.2العلاقة التكافلية بين بكتريا رايزوبيوم ونباتات العائلةالبقولية: 11
1.6.2 الاصابة بالبكتيريا 12
2.6.2الحياةالتكافلية بين الرايزوبيوم والبقوليات (الفول المصري) 13
3.6.2 فاعلية انزيم النيتروجينيز 13
4.6.2 أهمية العلاقة بين اللقاح البكتيري ونوع المحصول: 14

1.4.6.2 السلالة البكتيرية الفعالة: 14
2.4.6.2 السلالة البكتيرية الغير فعالة : 14
7.2 اللقاح البكتيري 15
8.2 التعقيم Sterilization 15
9.2 العائلة البقولية Leguminosae 15
10.2 الفول المصري *Vicia Faba* 16
1.10.2الوصف النباتي: 16
2.10.2 الظروف البيئية: 16
3.10.2 العمليات الزراعية: 17
الباب الثالث 18
مواد وطرق البحث 18
1.3 مصدر البكتريا 18
2.3تحضير اللقاح : 18
1.2.3 تحضير اللقاح السائل: 19
مكونات البيئة السائلة : 19
3.3 تحضير بيئة اجار مستخلص الخميرة (MSA) 19
4.3 الادوات: 20
5.3 الأجهزة : 20
6.3 تلقيح الأطباق: 20
7.3درجة الحرارة: 21
الباب الرابع 22
النتائج والمناقشة 22
1.4 نمو البكتيريا في درجة حرارة 20: 23
2.4 نمو البكتيريا في درجة حرارة 30: 23
3.4 نمو البكتيريا في درجة حرارة 40: 23
4.4 نمو البكتيريا في درجة حرارة 50: 23
المراجع: 24

ملخص الدراسة

أجريت الدراسه بمختبر التربة بكلية الدراسات الزراعية - شمبات - جامعه السودان للعلوم والتكنولوجيا، لمعرفة اثر مستويات مختلفة من درجات الحراره (20°, 30° ، 40°, 50° مئوية) علي نمو بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من محصول الفول المصري بمنطقة دنقلا _ السليم .

فترة التجربة 3 شهور، واظهرت النتائج ان هنالك فروقات واضحة في عدد المستعمرات نتيجة أثر درجات الحرارة حيث اعطت درجة الحرارة 40°م اكبر عدد لنمو المستعمرات البكتيرية مقارنةً مع (20°, 30° , 50° مئوية).

الفصل الأول

المقدمة Introduction

تعد بكتريا Rhizobiumالتي تعود إلي عائلة Rhizobiaceaeالمسؤولة عن تكوين العقد Nodules في جزور النباتات البقولية واختزال غاز النتروجين إلي امونيا ليقوم بدوره في عمليات أيض النبات.

الرايزوبيا هي من الاحياء الدقيقة والتي تؤدي دورآ مهما في العلاقات التعايشية المتخصصه علي النباتات البقولية .يعرف نبات الفول المصري في اللغه الانجليزية باسم Viciafaba ويعتبر من المحاصيل الغذائية المهمه ويمثل الغذاء الرئيسي لسكان السودان والمصدر الرئيسي للبروتين.

وتعتبر ولاية نهر النيل والشمالية من اكبر الولايات السودانية إنتاجا للفول المصري ،وذلك لصعوبة انتاجه في مناطق السودان الاخري ، بسسب إرتفاع درجات الحراره نسبيآ في الولايات الاخري ،وتزرع بهاتين الولايتين أكثر من 90% من مساحات الفولالمصري وتمد البلاد حوالي 80% من احتياجاتها (جريده الأيام 9 مارس 2005م ،العدد 8139) .

وعليه فإنه من الضروري جدا الأهتمام بدراسة هدا المحصول والعمل علي رفع إنتاجيته عن طريق التسميد الحيوي ببكتريا الرايزوبيومالتكافليه .وخفض تكاليف الأنتاج وذلك بمعرفة العوامل التي تؤثر علي الأنتاجية والتي تختلف من بلد الي اخري .(الطنوبي 1996).

الهدف من إجراء الدراسة:

1معرفة تأثير درجات الحر ارة علي نمو بكتريا الرايزوبيوم.

الباب الثاني

الدراسات السابقة

أجريت عدة دراسات علي المحاصيل البقولية لمعرفة مدي مقدرتها علي تكوين العقد الجزرية، باستخدام اللقاحات البكتيرية المختلفة ،حيث توصل Alexander (1982) الي ان نوع المحصول البقولي يؤثر علي درجة كفاءة الرايزوبيوم في تكوين العقد الجزرية ، وايضآ توصل Freire and Scholles (1996) ان البقوليات تقوم بعملية التثبيت وزيادة محتوي التربة من النتروجين وبالتالي تحافظ علي خصوبة التربة ، وفي تجربة اخري اجراها حياتي (1993) اثبت مقدرة بكتريا العقد الجزرية علي تثبيت النتروجين ولكنها تختلف في مقدرتها في تكوين العقد الجزرية ، وكذلك وجد Weaver and Frederid (1974) ان البقوليات تختلف في تكوين العقد بإختلاف نوع النبات البقولي ، وبينما توصل Muhtar and Newton (1987) ان سلالات رإ ايزوبيا غير فعالة في التثبيت لذلك ينصح بإضافة اللقاحات البكتيريا أثناء العمليات الفلاحية ، كما اثبتت الدراسات التي أجريت علي الحمص –الفول المصري –اللوبيا في مشروع (قندتوا) الزراعي مدي استجابة التلقيح ببكتريا العقد الجذرية بسلالات مستجلبه واخري محلية حيث اظهرت النتائج ان تلقيح الفول المصري أدي الي زياده معنوية في الوزن الجاف للمجموع الخضري والجذري و وزن العقد بينما لم تكن هنالك فروقات معنوية بين استخدام السلالات المستجلبة وكذلك ادي تلقيح نبات الحمص الي زياده معنوية في كل المعايير التي تم قياسها بعد 6 اسابيع في تكوين العقد (تاج السر وآخرون 2006).

1.2 بكتيريا الرايزوبيوم:

التصنيف العلمي للبكتريا:

Scientific classification	
Kingdom:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Alphaproteobacteria
Order:	Rhizobiales
Family:	Rhizobiaceae
Genus:	*Rhizobium*
S.N*Rhizobium leguminosarum*	

(wikipedia)

تتميز بكتريا العقد الجذرية بأنها سالبة لصبغة جرام وانها هوائية وعصوية الشكل ولا تشكل ابواغا . يبلغ عرض الخلية من(0.5-0.9) ميكرون وطولها 1.2-3 ميكرون وهي بكتريا متحركة تفقد حركتها في مرحلة الكهولة .

تتكافل الرايزوبيا مع النباتات البقولية بحيث يتم تثبيت النتروجين وتوجد علاقة خاصة بين هذه البكتريا وبعض النباتات غير االبقولية .حياتي (1993م)

تشكل البكتريا مجموعة الكائنات بدائية النوى، تعامل معها الانسان دون أن يراها فقد عرف أنها سبب المرض وأستعمل بعضها في عمليات تخمر مختلفة . ولقد كان لإكتشاف المجهر الأثر الكبير في التعرف عليها .

وهي اجسام دقيقة حية لاتري بالعين المجردة بل تحت المكبرات البسيطه والمكبرات المركبة ،وأول من إكتشف هذه الأحياء هو العالم Lufenhok عام 1676، وبعده عمل العالمان شيفان Shifan ولاتورLator علي فصل البكتريا من مجاميع مختلفة من جراثيم الخمائر الموجودة وسط سوائل حاوية علي مواد عضوية قابلة للتحلل

البروتيني . وقد إكتشف العالم الكيميائي الفرنسي "باستير" البكتربا الهوائية واللاهوائية من خلال تجاربه علي التخمر .

1.1.2مجاميع التلقيح التبادلية:

مجموعة التلقيح التبادلية	نوع بكتريا الرايزوبيا
مجموعه البرسيم الحجازي	*R. meliloti*
مجموعة البرسيم	*R.trifolii*
مجموعة البسلة	*R. Leguminosarum*
مجموعة الفاصوليا	*R. phaseoli*
مجموعة الترمس	*R. Lupini*
مجموعة فول الصويا واللوبيا العلف	*R. japonicum*

2.1.2الخصائص العامة للبكتريا:

1. كائنات دقيقة مجهرية بدائية النوي .
2. تتميز ببساطة التركيب .

3.1.2 المميزات الرئيسية لبكتريا العقد الجزرية :

1. بكتريا صغيرة اسطوانية .
2. غير متجرثمة وخلاياها متحركة بسوط قطبي وحيد او عدة اسواط محيطه .
3. هوائية إجباريآ strict aerobes.
4. تعيش حرة في التربة.

5. قادرة علي إصابة نباتات بقولية معينة محدثة العقد الجزرية ،فلكل نبات بقولي أو مجموعة من النباتات البقولية نوع أو سلالة معينة الرايزوبيا التي تستطيع أن تكون عليها العقد، بينما لاتستطيع ذلك سلالة أخري .

6. العلاقة عالية التخصص.

7. تظهر المستعمرات بيضاء اللون ،دائرية الشكل محدبة وشبه شفافة ومخاطيه.

8. التفاعل المتبادل عالي التخصص، اي ان كل نوع من البكتريا يتخصص في علاقة تكافليه مع نوع من النباتات البقولية دون غيرة وتطور هذه العلاقة.

2.2 البكتريا المتكافلة:

تتمكن أفراد جنس الرايزوبيوم عند إصابتها للنوع المناسب من النباتات البقولية من تكوين عقد جذور هذه النباتات وينتج عن معايشها لها استخدام النتروجين الجوي. هذه المكروبات عبارة عن عصويات سالبة لجرام غير متجرثمة هوائية .

تم تقسيم هذه المكروبات علي اساس الخاصية الاساسية التي تعتمد عليها كل سلالة علي إصابة جذور عدد محدد من النباتات البقولية المستخدمة كعوائل فإنه تم تقسيم هذه العوائل إلي عدد قليل مما يسمي بمجاميع التلقيح التبادلية .

وتشمل كل مجموعة من مجاميع التلقيح التبادلية علي أنواع من النباتات البقولية تتكون عليها عقد جذرية نتيجة للإصابة ببكتريا الرايزوبيوم الموجودة في عقد اي من النباتات المكونه لهذه المجموعة ، وعلي ذلك فإن أي مجموعة تلقيح تبادلية نموذجية تحتوي علي عوائل نباتية تصيبها سلالة معينة من بكتريا الرايزوبيوم . ولقد تم حتي

الان التعرف علي 20 مجموعة تلقيح تبادلية تحظي سبع منها باهتمام بالغ، وتم التعلاف لستة منها فقط علي الميكروب المسؤل عن إصابتها علي مستوي النوع .

كما تزداد أعداد هذه المكروبات علي مقربة من الجذور عنه في المناطق البعيده عن النباتات التي لها قدرة علي إصابتها ، وقد وجد أن هذا التاثير يماثل التأثر الناشئ في منطقة جذور النباتات غير البقولية الأخري Tuzimura,(1966) وقد توجد ميكروبات الرايزوبيا متأصلة في أرض لم يسبق زراعتها بمحصول بقولي ما ، ومع ذلك فإنة من المعتاد عدم وجود علاقة بين إنتشار هذه الميكروبات وتعاقب السنين التي تلى زراعة المحصول البقولي المناسبweaver e t.al (1972)

1.2.2 شكل العقدة البكترية:

غالبا ماتاخذ العقدة البكتبرية الشكل الاسطواني المستطيل Elongate and cylindrical وهذا النوع غالبا مايتواجد الا في المناطق القمية للجزر ،اما الشكل الكروي Spherical فهو يتواجد في مناطق مختلفة كما في الفول البلدي وفول الصويا اما الشكل الطوقي Caller فهو ممتد علي طول الجذر كما في الترمس (Dart،1975).

2.2.2 طريقة تكوين العقد:

يعتبر العالمان Hellriegel وWilfarthاول من اكتشفا في عام 1888م العلاقة الناشئة بين تكوين العقد الجذرية وتثبيت النتروجين الجوي .

تتلخص الخطوة الأولي في تكوين العقد في إفراز جذور النباتات لمواد منشطة لنمو البكتريا والتي لايقتصر فعلها علي البكتريا المكونة للعقد الجذرية Peters *e t.al* (1966) بل يمتد الي تنشيط نمو مجموعات ميكروبية مختلفة .عندئذ تتجمع

ميكروبات الرايزوبيا عند مواقع معينة قريبة من سطح الجزر . اوضح العالمان (Bohlool e t.al 1974)و(Dazzo e t.al 1975) ان الشواهد الحديثة الي أن عديدات السكريات الموجودة علي جدر الخلايا البكتيرية المهاجمة تعمل علي ارتباط هذه الخلايا بمركبات أخري توجد علي أسطح جذور النباتات التي تتميز بمقدرتها علي تكوين العقد علي جذورها .بينما نجد أن هذا الالتصاق لايحدث أو يوجد بدرجة قليلة بين بكتريا الرايزوبيا والنباتات البقولية التي لاتعتبر من ضمن العوائل النباتية المتخصصة في إصابتها.

وتحدث الاصابة في معظم النباتات البقولية عن طريق الشعيرات الجذرية التي تصاب ببعض التشوهات والتجعدات نتيجة لوجود ميكروبات الرايزوبيا الملائمة علي مقربة منها وا إفرازاتها لبعض المركبات .وتنشأ العقد الجذرية غالباً من مهاجمة سلالة بكتيرية واحدة سائدة الانتشار خارج جذور النباتات ولو أنه في بعض الاحيان قد تتسبب أكثر من سلالة واحدة في تكوين العقد (1974). Lindemann *et.al* لا تتمكن جميع أنواع بكتريا الرايزوبيا من اختراق جذور النباتات البقولية لذلك فإن مقدرة أي سلالة ما علي تكوين عقد علي جزور عائلة بقولي ما _وهو مايعرف بالقدرة علي العدوي _ذات أهمية إقتصادية بالغة .

3.2 الظروف المؤثرة علي نمو البكتريا

الظروف الفيزيائية التي تؤثر علي نمو البكتريا physical factors affecting bacterial growth

تؤثر الظروف البيئة المحيطة علي العلاقة التكافلية التي تنشأ بين بكتريا الرايزوبيا والبقوليات ، وذلك من خلال تأثيرها علي فسيولوجيا النبات العائل . فيؤدي عدم توفر

العناصر الغذائية المعدنية الي تغير واضح يظهر بصورة مختلفة في درجة نمو العقد الجذرية .

ولو أن هذه التغيرات عادة ماتعتبر انعكاسات النمو غير الطبيعي لنباتات العائل عادة ماتتم عملية تكوين العقد الجذرية عند درجات حرارة التربة المختلفة التي تتمكن جذور النباتات البقولية من النمو عندها ولو ان مثل هذه العملية يثبطها الي حد ما الارتفاع أو الأنخفاض الشديد في درجات الحرارة .

البكتريا الأرضية تتأثر بالتقلبات المختلفة التي تحدث للظروف البيئية الفيزيائية منها الحرارة والضغط والتهوية والحموضة والإشعاعات والملوحة والدورات الزراعية المتبعة.

1.3.2الحرارة Temperature

خلايا البكتريا لايمكن النمو علي درجات حرارة تزيد أوتقل عن تلك السائدة في بيئاتها الطبيعية .

تتلخص دراسة تأثير الحرارة علي بكتريا في معرفة قدرتها علي النمو بقوة او ببطء او توقفها عن النمو عند درجات الحرارة المختلفه (المرتفعه أو المنخفضة).

النظاق الحراري الذي يسمح لنمو البكتريا بصفة عامة يتراوح بين (0_75م) لكل نوع بكتري واحيانا لكل سلالة بكترية نطاق حراري يقع في حدود الدرجة الدنيا minimum _ والدرجة القصوي maximum وتقع بينهما الدرجة المثلى optimum .

ولقد سهلت طرق الدراسة التعرف علي مدي بقاء ميكروبات الرايزوبيا علي حالة نشطة ، ووجد أن إضافة أعداد كبيرة من هذه الميكروبات الي تربة رطبة لاينتج عنة

إنخفاض سريع في حيويتها بينما وجد أن معدل فقد حيوية هذه الميكروبات يزداد بازدياد درجة الحرارة ، وبدرجة مماثلة نجد أن العديد من السلالات لها القدرة علي البقاء في ارض جافه Danso *et.al* (1974) .

وتتميز بعض مجاميع بكتريا الريزوبيا بعدم مقدرتها علي مقاومة جو الصيف الحار طويلاً خاصة عند جفاف التربة ، حيث قد تتسبب مثل هذه الظروف في فشل زراعة المحاصيل البقولية لعدم تكون العقد الجذرية بدرجة كافية علي الرغم من توفر أعدادها بدرجة كبيره علي جذور نباتات محصول العام السابق Chatel e t.al (1973). وقد تعمل بعض أنواع معادن الطين السائدة علي تقليل التأثير الناشئ من ارتفاع درجات الحرارة في الأوساط البيئية الجافة Marshall (1964) .

تم تقسيم الكائنات الحية الدقيقة من حيث تحملها للحرارة الي ثلاثة مجموعات:

- محبة البرودة (psychrophiles) وتنمو بين صفر و20°م .
- متوسطة الحرارة (Mesophiles) وتنمو بين 20°م و40°م .
- محبة الحرارة (Themophiles) وتنمو في درجة 45°م أو أكثر ولاتنمو في درجة حرارة أقل من 40°م . حياتي (1993)

2.3.2 تأثير درجة الحرارة المرتفعة علي البكتريا:

يؤدي إرتفاع درجة الحرارة الي زيادة سرعة العمليات الايضية ضمن حدود معينة والإرتفاع عن الدرجة المثلي يؤدي الي إنخفاض سرعة العمليات الأيضية حتي الوصول لدرجة الحرارة القصوي والتي بعدها يتوقف النمو ويبدأ التأثير المميت للحرارة والمتضمن فساد للبروتينات والإنزيمات. كما وجد ايضاً أن معدل موت الخلايا البكتيرية يزداد بارتفاع درجة الحرارة وفي حالة توفر الماء مع الحرارة فإن

درجة التأثير تكون أكبر وذلك لان البروتينات الخلوية تفسد بدرجة أسرع في الحرارة الرطبة عنها في الحرارة الجافة.

التأثير الضار لدرجات الحرارة الأعلي من النطاق الحراري يكون مباشر علي البروتينات والاحماض الامينية حيث تتلف عند درجات الحرارة مابين 50 و90 مئوية.

3.3.2 تأثير درجة الحرارة المنخفضة:

يتوقف النمو البكتيري قبل الوصول لدرجة التجمد ويعزي ذلك الي درجة الحرارة المنخفضة وتؤثر علي الدجور الهام الزي يلعبة الغشاء الخلوي في نقل العناصر الغذائية من والي الخلية وهذا بدوره يؤدي الي انخفاض النشاط الأيضي .

4.2 تثبيت النتروجين تكافليا :Symbioctic fixation of Nitrogen

عرف من القدم ان بعض النباتات كالفول المصري والفاصوليا والباز لا وغيرها تحسن الأرض وتجعلها صالحة لزراعة محاصيل الحبوب بعدها، وقد تبين سبب فائده النباتات البقولية عندما ربطWilfarthو Hellriegelع علاقة النباتات البقولية بالنتروجين بالعقد الجزرية المتشكلة علي النباتات البقولية ، حيث وجد أن العقد تكونت علي جذور النباتات وان هده النباتات اكتسبت كميات كبيره من النتروجين عند تلقيح الوسط المستعمل الخالي من النتروجين ببادئ ترابي يحتوي علي يكتريا هده العقد . وعلي العكس من دلك فقد وجدا أن النباتات البقولية لمتكتسب نتروجينا ولم تنمو جيدا عند عدم تكوين العقد الجزرية علي جذورها نتيجة تعقيم البادئ الترابي المضاف ، وافترضنا بذلك أن البكتريا في الغقد الجذرية تمثل النتروجين الجوي وأن النبات يستعمل المركبات النتروجينية المثبتة من قبل هده البكتريا (محمد 2009).

5.2 افراز المركبات النتروجينية :

وجد أن محاصيل الحبوب أو محاصيل العلف النجيلية النامية مع البقوليات غالباً مع تحتوي علي كميات من النتروجين اكبر منة في حالة زراعتها علي حالة منفردة. ويعزي تاثير مثل هذه الزراعة المختلطة الي إفراز جذور النباتات البقولية للزائد من مركبات النتروجين الناتجة من عملية تثبيت النتروجين الجوي Agboola *et.al* (1972) ،ويعتبر Lipman (1910). اول من أظهر بوضوح عملية انتقال نتروجين التربة المثبت بواسطة النباتات البقولية .

وكقاعدة عامة اوضح العالمان (simpson 1965) و (Whitney *et.al* 1967) كمية المركبات النتروجينية التي تفرزها البقوليات تعد ضئيلة لهذا فإنها لاتمثل الا جزء فقط من احتياجات النباتات النامية معها من النتروجين . ومن ناحية أخري فعندما تتقدم النباتات البقولية في العمر وتموت أو عند قطع مجموعها الخضري فإن الجزور تفرز كميات لابأس بها من النتروجين الجوي .

5.2 الرايزوبيوم وتكوين العقد الجزرية: Rhizobium and Nodulation

لمعرفة علاقة البقوليات ببكتريا الرايزوبيوم سنقوم بفحص نبات الفول المصري صنف (تركي) . سنجد عقدا مختلفة الشكل والحجم تسمي العقد الجزرية Root Nodules وهي عبارة عن إنتفاخات في الجزور تحوي داخلها خلايا بكتيريا تعمل علي تبادل المنفعة بينها وبين النبات .

6.2العلاقة التكافلية بين بكتريا رايزوبيوم ونباتات العائلةالبقولية:

تتم العلاقة التكافلية التي تجمع بين بكتريا من جنس رايزوبيوم المثبتة للنيتروجين ونبات من العائلة البقولية (البرسيم مثلا) وفقا لمرحلتين رئيستين هما:-

1.6.2 الاصابة بالبكتيريا

تتم الاصابة بالبكتريا وفقا للخطوات التالية:

يحدث انجذاب بين الرايزوبيوم وجذور النبات البقولي وهذا الانجذاب هو في حقيقة الامر انجذاب كيميائي، حيث تفرز جذور النبات البقولي مادة عضوية تعرف بالكتين (بروتين)، فاذا حدث توافق بين هذه المادة ونوعية السكر الموجود على سطح جدار الخلية البكتيرية فان الالتصاق يتم بين البكتريا والشعيرات الجذرية للنبات البقولي.

يحدث التواء للشعيرات الجذرية نتيجة فعل هرمون IAA (اندول حمض الخل) ويتكون ثقب في الجدار الخلوي للشعيرة الجذرية فتدخل البكتيريا من هذا الثقب مكونة ما يعرف بخيط الاصابة (العدوى) وتتكاثر داخل القشرة دون الولوج الى سيتوبلازم خلايا الجذر.

تنشط خلايا الجذر المصاب وتنقسم حاملة خلايا البكتيريا الجديدة. تتكون العقد من الانقسام الغزير لخلايا النبات ومن تضخم الخلايا، كما ان الخلايا المجاورة تكبر في الحجم وتنشط في الانقسام، ويعلل انقسام الخلايا المجاورة توفر هرمون الهترواوكسين (Heteroauxin) حيث يساهم في زيادة نشاط خلايا العائل. وقد لوحظ ان عدد الكروموسومات في الخلايا الموجودة في وسط العقدة تحتوي على ضعف عدد الكروموسومات الموجودة اصلا في خلايا النبات العادي. وقد يعزى هذا الازدياد في عدد الكروموسومات الى تحفيز البكتيريا لهذه الخلايا نتيجة ملامستها لها او اقترابها منها، ويلاحظ في هذه الخطوة ان نصف العقد خالية من البكتيريا وتسمى بالنصف العقيم بينما يمثل النصف الاخر بعقد ناضجة توجد فيها بكتيريا على هيئة حروف مثل [V،X،Y،L،T]، ويسمى هذا الطور بالبكتروويد (Bacteroid) حيث تتم فيه

عملية تثبيت النتروجين الجوي نظرا لان البكتيريا في هذا الطور تنتج انزيم النيروجينيز الجوي نظرا لان البكتيريا في هذا الطور تنتج انزيم النيتوجين الى امونيا.

2.6.2الحياةالتكافلية بين الرايزوبيوم والبقوليات (الفول المصري)

Mutualism between rhizobium and legumes:

الحياة التكافلية هي تبادل المنفعة بين نوعين من الكائنات الحية حيث يستفيد كلاهما دون حدوث ضرر لأي منهما ، ويلاحظ أن كلا الكائنين يستفيد من الأخر ، ادا يدود النبات البكتريا بالغداء (سكر) ،بينما تثبت البكتريا النتروجين الجوي وتحولة الي أمونيوم ، حيث يمكن للنبات إمتصاصه وتوفر ماتبقي لديها منه . ونتيجه لهده العملية تحصل البقوليات علي حاجتها من النتروجين فلا تحتاج الي أسمده نتروجينية.

3.6.2 فاعلية انزيم النيتروجينيز

يفقد انزيم النيتوجينيز فاعليته عند تعرضه للأكسجين ولذا فان كثيرا من الاحياء الدقيقة الهوائية لها نظام تتفادى فيه تأثير الاكسجين على الانزيم، حيث تقوم بزيادة معدل تنفسها لتخفيض كمية الاكسجين، بينما يلجا البعض الاخر الى تركيبه خاصة ذات جدار سميك يقلل من نفاذية الاكسجين، وتتم في هذه التركيبة عملية تثبيت النتروجين كما هو الحال بالنسبة للحويصلات في الطحالب الخضراء المزرقة، اما بالنسبة لبكتيريا الرايزوبيوم التي تكون عقد بكتيرية مع بعض النباتات البقولية فأنها تتبع اليتين للتكيف مع تأثير الاكسجين على انزيم النتروجينيز. ففي الالية الاولى يتم وضع حواجز طبيعية داخل العقد نفسها، ونظرا لحاجة هذه العقد لتيار عال من الاكسجين حتى تتمو نموا طبيعيا فأنها تهيئ لنفسها بروتينا يشبه الهيموجلوبين في دم الانسان يسمى ليجهيموجلوبين(leghemoglobin) نسبة الى النباتات البقولية.

ويسهل هذا المركب عملية نفاذية الاكسجين عند مستوى التركيز المنخفض. وهذه الطريقة تشبه الى حد بعيد عملية نقل الاكسجين بوساطة الهيموجلوبين الى العضلات في الحيوانات الثدية. وتساهم هذه الالية في تقليل مستوى تركيز الاكسجين لكي يتعادل تركزه بما هو موجود فعلا في بقية التربة. وفي الالية الثانية تقوم بعض انواع البكتيريا التي تعيش حرة بتثبيت النيتروجين في الظروف اللاهوائية فقط وذلك لأنه ليس لديها طريقة لحماية انزيم النتروجينيز من الاكسجين حياتي (1993).

4.6.2 أهمية العلاقة بين اللقاح البكتيري ونوع المحصول:

ترجع اهمية هذه العلاقة الي تحديد اللقاح البكتيري الجيد والمناسب لمحاصيل كل مجموعة حتي تكون السلالة المستخدمة في عمل اللقاح البكتيري فعالة حياتي (1993).

1.4.6.2 السلالة البكتيرية الفعالة:

هي التي تكون عقد بكتيرية قادرة علي تثبيت النتروجين الجوي ولون العقد الجزريه فيها قرمزي لاحتوائها علي صبغة البقلهيموجلوبين.

2.4.6.2 السلالة البكتيرية الغير فعالة :

هي التي لا تستطيع تكوين عقد بكتيرية واذا تكونت عقد بكتيرية فإنها تكون كاذبة غير قادرة علي تثبيت النتروجين الجوي ولونها يكون ابيض نتيجة عدم تكون فيها صبغة البقلهيموجلوبين حياتي (1993) .

7.2 اللقاح البكتيري

يطلق علي البكتريا المحملة علي بيئة نمو إسم اللقاح البكتيري في صورة معلق بكتيري وهذا المعلق يتم تجهيزه في معامل خاصة حيث تفصل العقد البكتيرية من جزور المحاصيل البقولية ثم يتم إكثارها معملياً. وفي العاده يشمل اللقاح الخاص بمجموعة تحملة علي سلالة واحده او عدة سلالات كل منها ذو كفاءة عالية بالنسبة لاحدي المحاصيل البقولية.

8.2 التعقيم Sterilization

إزالة او إبادة لجميع الميكروبات في صورتها الخضرية او في صورة جراثيم الموجودة من الوسط المراد تعقيمة سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية او محاليل او اماكن او مسطحات محدود

9.2 العائلة البقولية Leguminosae

تعتبر العائلة البقوليه من العائلات النباتية الهامة من الوجهه الاقتصادية لماتتميز به نباتاتها من قدره علي تثبيت الازوت الجوي بواسطه البكتريا العقدية التي تعيش علي جزورها فتعمل علي زيادة خصوبه التربة علاوة علي احتواء بدور ونباتات هده العائلة علي نسبة مرتفعه من البروتين . ولكل نوع من أنواع المحاصيل البقولية سلالات خاصة من البكتريا تختص باصابتها وتلائمها ظروف أرضية وبيئية خاصة ، ولاتتكون العقد البكتيرية علي جزور النباتات في ارض لم تسبق زراعتها بهدا المحصول ، ولدلك فان عند زراعة نبات بقولي بأرض حديثة الاستصلاح اوبارض لم يسبق زراعتها بهدا المحصول يجب تلقيح التربة اوالبدور بالبكتريا الخاصة وتوجد مستحضرات معده لهدا الغرض يطلق عليه إسم عقدين مثل عقدين الفول المصري او عقدين الفاصوليا وهكذا .

تقوم عملية التكافل بين البقوليات وبكتريا العقد الجذرية بتثبيت حوالي 20% من النتروجين الكلي ، وتصل هذه النسبة الي 70% في المناطق المزروعة بالمحاصيل والاعلاف الزراعبية وتشمل عائلة البقوليات حوالي 750 جنسآ ، واكثر من 20000 نوعآ.

ترجع اهمية البقوليات الي انها لاتحتاج الي أسمدة النتروجين الكيميائية وأن ثمارها وحبوبها غنية بالنتروجين .

ترجع ايضا اهمية العملية التكافلية لبكتريا العقد الجذرية والبقوليات في أنها تساعد في زيادة خصوبة التربة حياتي (1993) .

10.2 الفول المصري *Vicia Faba*

يستخدم نبات الفول المصري كغذاء للانسان والحيوان.

1.10.2الوصف النباتي:

نوع نباتي يتبع جنس البيقية من الفصيلة البقولية الإسم العلمي (*Vicia Faba*) تعتبر منطقة اسيا الوسطي مركز النشؤ الأصلي للفول .

نبات حولي يصل إرتفاعه الي 180سم .ذو زوايا مضلعة شبة مربعه . الأزهار بيضاء مبقعة . الثمرة قرن يحمل بداخله عده بزور يختلف لون البزرة من البني الفاتح والبني والبنفسجي والاسود وسرة البذره واضحة .

2.10.2 الظروف البيئية:

يوافق الفول الجو المائل للبرودة ولكن البرد الشديد أو الصقيع يؤثران تاثيرآ سلبيآ عليه كما ان الامطار الغزيرة والرياح الشديدة تعملان علي سقوط الأزهار وتتسببان

في سقوط الأزهار . أما الحرارة الشديدة فتؤثر علي تكوين البذور علي النبات . يجود الفول في الأراضي الجيدة فيما عدا الأراضي الرملية والمالحة . صلاح الدين (2008) .

3.10.2 العمليات الزراعية:

ميعاد الزراعة : محصول شتوي وأنسب ميعاد لزراعتة النصف الأول من نوفمبر . ومن المهم زراعتة مبكراً حتي يتم نضجه قبل حلول الجو الحار الزي يضر البزور او هبوب الرياح التي تسبب سقوطها . صلاح الدين(2008) .

الباب الثالث

مواد وطرق البحث

Materials and methods

1.3 مصدر البكتريا

تم أخذ عينات من العقد الجزرية لنبات الفول المصري صنف (تركي) من التروس العليا والترس الثالث من السليم -دنقلا - الولاية الشمالية .تم أخذ العقد الجذرية ووضعها في حاويات بلاستيكية محتويه علي كربونات الكالسيوم ،وتم تعقيم جميع المواد المستخدمة والادوات واكياس أخذ العينات بكحول الايثانول .

2.3تحضير اللقاح :

تم تعقيم العقد الجذرية بواسطة الايثانول ووضعت في اطباق زجاجيه محتوية علي ماء معقم وتم هرسها بواسطة الساق الزجاجية للحصول علي المعلق البكتيري .

تم عمل بيئة مستخلص الخميرة والمانتول الصلبة وتم تعقيمها بواسطة جهاز التعقيم ثم صبها مباشرةً في اطباق زجاجية معقمة وتركها حتي تتصلب.

تم تلقيح الاطباقبالمعلق البكتيري بواسطة الماصة الاتومتيكية ثم وضعت الاطباق مقلوبة داخل الحضان في درجة حرارة 30°م لمدة اسبوع مع ملاحظة النمو البكتيري.

بعد مرور اسبوع تم تخطيط الاطباق بواسطة إبرة التلقيح بعد تعريضها للهب للحصول علي بيئة نقيه ووضعت في الحضان درجة حرارة 30°م لمدة اسبوع .

1.2.3 تحضير اللقاح السائل:

تم تلقيح بيئة مستخلص الخميرة والمانيتول السائلة ببكتريا الرايزوبيوم ووضعت في جهز الرجاج الكهربائي لمدة 10ايام في درجة حرار ة 28-30 °م. بعد ذلك تم حساب كثافة النمو البكتيري للقاح= 34×10^{8}CFU

مكونات البيئة السائلة :

المكونات بالجرام لكل لتر ماء مقطر:

- Mannitol (10g)
- Di potassium hydrogen phosphate 0.2g
- Magnesium sulphate (0.2g)
- Sodium chloride (0.1g)
- Potassium dihydrogen phosphate (0.1)
- Yeast extract (0.5g)

3.3 تحضير بيئة اجار مستخلص الخميرة (MSA)

الوسط الزراعي لمكونات جرام لكل لتر ماء مقطر:

- Mannitol (10g)
- Di potassium hydrogen phosphate 0.2g
- Magnesium sulphate (0.2g)
- Sodium chloride (0.1g)
- Potassium dihydrogen phosphate (0.1)
- Yeast extract (0.5g)
- Agar (15g)

4.3 الادوات:

1. أطباق بتري Petri dishes
2. ماصة (manual pipettes and Automatic)
3. زجاجات لحفظ البيئات Bottles
4. أنابيب Tubes
5. حامل أنابيب Rack
6. موقد بنزن Benzen Burner
7. إبر توزيع Inoculating loops
8. كأس زجاجي Conical Flask

5.3 الأجهزة :

1- جهاز التعقيم Autoclave
2- الحضان Incubator
3- كابينة التزريع Laminair flow
4- سخان كهربائي Hot plate
5- ثلاجة Fridge
6- ميزان Balance
7- رجاج Shaker

6.3 تلقيح الأطباق:

تم عمل التخفيف المتسلسل serial dilution ثم تم تلقيح الاطباق المحتوية علي بيئة مستخلص الخميرة بمعدل 1 مل لكل طبق من التخفيفات (10^4 و 10^8) ثم تم

وضعها في الحضان في درجات حرارة مختلفة 20، 30، 40 و50 مع تسجيل القراءات في كل طبق بعد مرور اسبوع من وضع الاطباق في الحضان.

7.3درجة الحرارة:

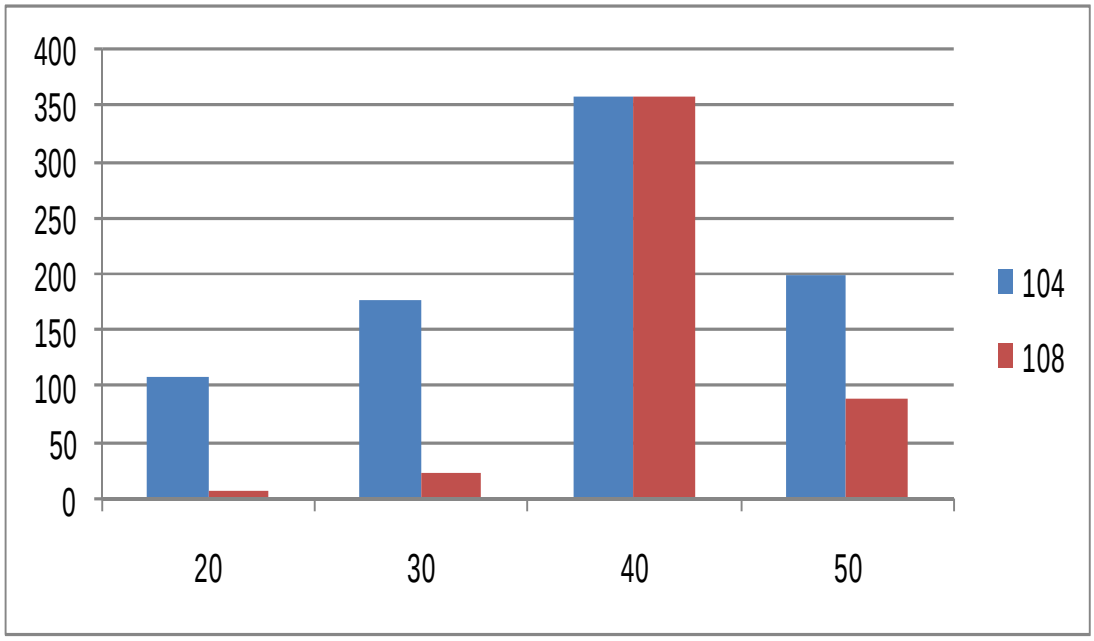
تم تحضين بكتريا الرايزوبيوم في اربعة درجات حرارة 20- 30- 40 -50 درجة مئوية.

الباب الرابع

النتائج والمناقشة

جدول (4.1) يوضح نمو بكتيريا الرايزوبيوم في درجات حرارة مختلفة:

درجات الحرارة / التخفيف	20°		30°		40°		50°	
	10^4	10^8	10^4	10^8	10^4	10^8	10^4	10^8
المتوسطات	110	8	178	25	TMTC	TMTC	200	90



شكل (1) يوضح متوسطات نمو بكتيريا الرايزوبيوم في درجات حرارة مختلفة

1.4 نمو البكتيريا في درجة حرارة 20:

أثبتت النتائج جدول (4.1) أن تعداد مستعمرات بكتيريا الرايزوبيوم قد قل مقارنة بدرجات الحرارة الأخرى (50/40/30). وهذا يطابق Danso *et.al* (1974)

2.4 نمو البكتيريا في درجة حرارة 30:

أثبتت النتائج جدول (4.1) أن تعداد مستعمرات بكتيريا الرايزوبيوم قد قل مقارنة بدرجات الحرارة الأخرى (50/40) وزيادة بنسبة 61% عن درجة الحرارة (20). وهذا يطابق Danso *et.al* (1974)

3.4 نمو البكتيريا في درجة حرارة 40:

أثبتت النتائج جدول (4.1) أن تعداد مستعمرات بكتيريا الرايزوبيوم قد سجلت أعلي تعداد للمستعمرات مقارنة بباقي درجات الحرارة الأخري وهذا يوضح تأقلم بكتيريا الرايزوبيوم علي المناخ الصحراوي السائد في المنطقة . حياتي (1993)

4.4 نمو البكتيريا في درجة حرارة 50:

أثبتت النتائج جدول (4.1) لن تعداد مستعمرات بكتيريا الرايزوبيوم قد زاد مقارنة بدرجات الحرارة الأخرى (50/40) و قل بنسبة بسيطة عن درجة الحرارة (40).

و بشكل عام تفوقت درجة الحرارة 40 على درجات الحرارة الاخرى ، حيث كان نمو بكتريا الرايزوبيوم في درجة الحرارة 40 أفضل ما يكون في الأطباق التي تم تزريعها من التخفيفين 10^4 ,10^8 .

المراجع:

الدراسات والبحوث:

1. محمد عمر الطنوبي،الإنتاجية الزراعية بين البحث العلمي والإرشاد الزراعي ، منشأت المعارف ،الإسكندرية1996م.
2. يس محمد إبراهيم دقش (2012). المحاصيل الحقلية دار السودان للنشر والطباعة، شركة مطابع السودان للعملة المحدودة ص 115
3. صلاح الدين عبد الرازق شفشق، عبد الحميد السيد الدبابي (2008). إنتاج المحاصيل الحقلية دار الفكر العربي للنشر ص 594
4. فتحي سعد النخلاوي، محمد عمر غندورة (2009) التقنيات المعملية في إنتاج المحاصيل الحقلية دار الرياض للنشر ص 445
5. تاج السر حسن محمد احمد ومقدم الشيخ عبد الغني وعوض جلال عثمان (2006) _استجابة نبات الفاصوليا والحمص للتلقيح بسلالات بكتريا العقد الجزرية المختلطة بولاية نهر النيل _مجلة شندي _العدد الثالث .
6. أزهري عبد العظيم حمادة (2005) .الفول المصري يحتضر في ونهر النيل الشمالية،جريدة الأيام مارس 2005م العدد 8139.
7. محمد عصام ابراهيم(2009) .أثر التلقيح البكتيري في نمو وإنتاج نبات البازلاء وعلاقتة بالتسميد الآزوتي ، جامعة ترشين أطروحة ماجستير ، ص14 .
8. الصديق احمد المصطفي الشيخ حياتي (1993) . الاحياء الدقيقة في التربة، دار جامعة الخرطوم للنشر ،ص.ب:321 الخرطوم السودان .

النشرات الإحصائية:

- مجلة التربية والعلم –المجلد (**21**) العدد(**4**) لسنة **2008**

المراجع الإنجليزية:

1. Agboola. .A .A. and A.A.A.Fayemi. (1972). Agron.J.64:409-412.
2. Bohlool.B.B. and f,1,,Schmidt .1974. Sdenet.185:269_271.
3. Chatel,D,L and C.A. parker.1973.Soil Biol.Biochem., 5:415-423.
4. Danso.S.K .A and M ,Alexander.1974.Soil.Sei.soe.Amer. Proc,38:86-89.
5. Dazzo ,F.B.and D.H ,Hubbell,1975.Appl. Microbial.30:1017-1033.
6. Lindemann , W.C.E.I .Schnnidt, and C.E .Ham. 1974. Soil sd, 118:274-279.
7. Lipman, J.G . 1910 . J. Agar.Sd, 3:297-300.
8. Marshall .K.C.1964. Aust .J .Agar .Res. 15:273-281.
9. Muhtar, N.O.(1979). Abu-Naieb, Saya A.(1987).Testing on organic
10. fertilizer effect on N-fixation by Azotobacter . Anm .Report
11. GRS\RAC-Sudan.PP206-214.
12. Peters, R.J.and M.Alexander.1967. Soil Sci, 102:380-387.
13. Simpson,J.R.1965. Aust.J.Agr.Res.,16:915-926.
14. Tuzimura , K., I. Watanabel ,and J.F.Shi. 1966.soil .Plant Nutr. 12:99-106.
15. Weaver,R.W.L.R.Frederick ,and L.C.Dumenit .1972. Soil Sci, 114:137-141.
16. Whitney,A .S. and Y.Kanehiro.1967. Agron .J,59:585-588.

17. Vincent‹J.’’The genus Rhizobium’’.In Starr‹M.P‹; Stolp‹ H.; Truper‹H.G.;Balows‹ A and Schilegel‹H.G. (eds). “The Prokaryotes”. Vol.1‹Springer-Verlang‹ U‹SA‹pp.818-837.(1981).

18. Weaver ,R. and Frederick ,L.R.(1974).Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max L. Merill. H. Field studies .Agronomy Journal 66:233-236.

19. Freire, J. and Scholles ,D.(1996)-The use and management of Rhizobium/ legume symbiosis. In: legume inoculation – Selection and characterization of Strains. Production .Use and Management (ed. A. Balattei and J. Aires. Freire) PP.131-148.Editorial Kingraf , Buenos Argentina.

20. https://en.wikipedia.org/wiki/Rhizobium