تحديد أدنى تركيز مثبط من المبيدات الكيميائية في أعداد بكتريا الازوتوباكتر تحت مدد حضن مختلفة .

فارس محمد سهيل علاء حسن فهمي
كليـة الزراعـة – جامعـة ديالى

الخلاصة

أجريت ثلاث تجارب مختبريه باستعمال تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (CRBD) لدراسة تأثير ثلاث مبيدات كيميائية المبيد الفطري(بينوميل)، المبيد الحشر ي (سوبرالتراسيدين) ومبيد الأدغال (جرا ورن آب) ولأربعة تراكيز لكل منهما (الموصى به واقل وأعلى منه والمقارنة) في أعداد بكتريا *A.chroococcum* عند استعمال ثلاث تخافيف مختلفة من اللقاح البكتيري (10^{-4} ,10^{-5}, 10^{-6}) ولأربع مدد حضن مختلفة لتحديد اقل تركيز مثبط لأعداد خلايا البكتريا (minimum Inhibitory Concentration (MIC .

أظهرت النتائج إن أدنى تركيز مثبط الـ (MIC) للمبيد الفطري (بينوميل) في تخفيف اللقا ح 10^{-4} هو (1.2) غم .لتر$^{-1}$ ، وفي التخفيفين 10^{-5} ,10^{-6} هو(0.6)غم .لتر $^{-1}$ وعند مدة الحضن (18) يوما . كان الـ (MIC) للمبيد الحشري (سوبرالتراسيدين) هو (0.875) مل .لتر $^{-1}$ وعند مدة الحضن (6 ، 12 ، 18) يوما ولجميع تخافيف اللقاح المستعملة . أما الـ (MIC) لمبيد الأدغال (جرا ورن آب) هو (20) مل .لتر$^{-1}$ عند مدة الحضن (6) أيام وفي الخفيفيـن , 10^{-5} 10^{-4} ، أما في التخفيف 10^{-6} فكان (10) مل .لتر $^{-1}$. عند مدة الحضن (12 ، 18) يوما كان الـ MIC (10) مل. لتر$^{-1}$ في التخفيف 10^{-4} ، وفي التخفيفين 10^{-6} و 10^{-5} هـــو (5)مل.لتر$^{-1}$.

تشير النتائج إلى ان تخفيف اللقاح المستعمل من نفس العزلة من بكتريا *A.chroococcum* يتأثر بتراكيز المبيدات المضافة ومدد الحضن المختلفة ، إذ كانت البكتريا في التخفيف 10^{-4} أكثر تحملا لمستويات المبيدات المضافة مقارنة بالخفيفين 10^{-6} و10^{-5} .

المقدمـة

تعد بكتريا الازوتوباكتر واحدة من المجاميع الميكروبية الاقتصادية الفعالة في التربة في مجال التسميد الحيوي (Mashhoor وآخرون، 2002) ، فهي من أجناس البكتريا المثبتة للنتروجين الجوي بصورة لاتعايشية ، تستعمل كسماد نتروجينيٍ مناسب في تحسين نمو العديد من المحاصيل الزراعية .(Papic ،2002) ، إضافة إلى إنتاجها العديد من منظمات النمو (Salmeron وآخرون، 1990) ، وقدرتها على التحلل الحيوي للمخلفات العضوية ، فضلا عن دورها في السيطرة الحيوية على الفطريات الممرضة (Sharma وآخرون،1986) .

الازوتوباكتر من المخصبات الحيوية الموجودة في تربة الرايزوسفير لعديد من المحاصيل الزراعية في الترب العراقية (البشير، 2003 : التميمي،2005 : ألغزي،2006) . تواجدها يحدده عدة عوامل منها نوع المبيدات وتراكيزها وطريقة ووقت إضافتها ، وتتباين حساسية هذه البكتريا تجاه أنواع المبيدات المضافة (الفطرية ، الحشرية ومبيدات الأدغال) ، إذ ان لهذه المبيدات تأثيرات متباينة في نمو الازوتوباكتر من تأثيرها المثبط أو المحفز عن طريق تحليلها ميكروبيا والتقليل من أخطارها إلى عدم التأثير ، بين Vannini وآخرون ،(1992) إن المبيدات الفطرية من أكثر المبيدات سمية في نمو الازوتوباكتر مقارنة بالمبيدات الحشرية ومبيدات الأدغال.

ذكرNastaija وآخرون،(2002) إن استعمال مبيدات الأدغال ومبيد حشري لم تكن ضارة في نمو *A.chroococcum* ، بينما استعمال المبيدات الفطرية سبب تثبيطا في نمو *A.chroococcum* ، في حين أوضح Pozo وآخرون،(1995) إن المبيدات الحشرية خفضت أعداد الأحياء المثبتة للنتروجين الجوي ، قد تكون هذه المبيدات غير سامة عند استعمالها بالتركيز الموصى بها حقليا

ولكن الاستعمال المتكرر لهذه المبيدات ولمدد طويلة قد يؤدي إلى تراكمها فينعكس على أحياء التربة المجهرية وعلى جذور النباتات .

يجب معرفة الاستعمال الأمثل للمبيدات سواءا من ناحية تراكيزها المؤثرة اوطريقة إضافتها ، ولهذا يجب انتقاء الأحياء ذات الكفاءة العالية في مقاومة المبيدات وإكثارها واستعمالها في تلقيح التربة ، وذلك من خلال دراسة مدى حساسية البكتريا للمبيدات ودرجة نشاطها ومقاومتها لها وذلك عن طريق معرفة اقل تركيز مثبط للنمو (MIC) كأساس لقياس مستويات المقاومة للبكتريا (Jones وآخرون،1992) . استهدف البحث دراسة تأثير مستويات مختلفة لثلاث مبيدات (فطرية ، حشرية وأدغال) في أعداد بكتريا الازوتوباكتر لتحديد اقل تركيز مثبط (MIC) لنمو البكتريا

المواد وطرائق العمل

نفذت ثلاث تجارب مختبريه باستعمال تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (CRBD) لاختبار تأثير ثلاث مبيدات كيميائية في نمو بكتريا الازوتوباكتر عند ثلاث تخافيف مختلفة من اللقاح البكتيري، لتحديد اقل تركيز مثبط لأعداد خلايا البكتريا (MIC Manimum Inhibitory Concentration (Rana وآخرون،1998 : Asama وآخرون،2003 : التميمي،2005) .

تضمنت كل تجربة (144) وحدة تجريبية ، نتجت من (3) تخافيف من لقاح الازوتوباكتر ($10^{-6},10^{-5},10^{-4}$) وأربعة مستويات من كل مبيد (فطري ، حشري وأدغال) على حدة و (4) مدد حضن (3، 6، 12 ،18) يوما و (3) مكررات .

تم عزل ثلاث عزلات من بكتريا الازوتوباكتر من تربة الرايزوسفير من حقول مزروعة بالذرة والشعير والبرسيم ومن مناطق مختلفة من محافظة ديالى وحسب طريقة تخافيف التربة (Becking ،1981). وأظهرت نتائج الفحص والتشخيص ان جميع العزلات الثلاث هي من نوع *A.chroococcumm* ، واختيرت العزلة (I_1) لاختبار نموها في التراكيز المختلفة للمبيدات ، وجدول (1) يبين مناطق جمع البكتريا ومصدر العزل وأعداد البكتريا .

استعمل في التجربة الأولى المبيد الفطري (بينوميل 50 %) وهو مبيد جهازي ذو تأثير فعال للأمراض الفطرية التي تصيب المحاصيل الزراعية، يضاف بمعدل(0.6) غم .لتر $^{-1}$. وفي التجربة الثانية استعمل المبيد الحشري (سوبر التراسيدين) وهو مبيد غير جهازي فعال في القضاء على أفات الخضراوات والمحاصيل الحقلية والطماطة والبطاطا والحمضيات ، يضاف بمعدل (1.75) مل.لتر $^{-1}$. أما التجربة الثالثة فاستعمل مبيد الأدغال (جرا ون د آب) وهو مبيد عشبي جهازي سام يستعمل لمكافحة العديد من الإعشاب الرفيعة والعريضة الأوراق ، يضاف بمعدل (10) مل .لتر$^{-1}$.

حضرت مزرعة سائلة من العزلة (I_1) ، إذ تم تنميتها في بيئة المانيتول السائلة الخالية من النتروجين وبعد أسبوع من الحضن ، تم إجراء التخافيف المتسلسلة وحضرت بيئة المانيتول – أكار (Allen،1961) وأضيف لها المبيدات التي تم تعقيمها قبل تصلبها وبأربعة مستويات ($C_3,C_2,C_1،C_o$) لكل مبيد على حدة ، مستعملين التركيز الموصى به واقل وأعلى منه إضافة إلى معاملة المقارنة ، وكما موضح في الجدول (2) . لقحت الأطباق باستعمال ثلاث تخافيف من اللقاح (10^{-4}, 10^{-5} ,10^{-6}) وذلك بإضافة (1) مل من المزرعة السائلة من كل تخفيف وبثلاث مكررات. حضنت الأطباق في الحاضنة على درجة (28 م^{o}) ولمدد حضن (3 ، 6 ، 12 ،18) يوما .

عدت المستعمرات النامية لكل تخفيف في الأطباق خلال مدد الحضن المختلفة وكانت معاملات كل تجربة كما يلي :

(3) تخفيف لقاح × (4) مستويات لكل مبيد × (4) مدد حضن × (3) مكرر =144 وحدة تجريبية لكل تجربة .

النتائج والمناقشة

تبين النتائج في الجدول (3) ان متوسط أعداد الخلايا البكتيرية في تخفيف اللقا ح 10^{-4} تفوق معنويا على متوسطه عند التخفيفين 10^{-5},10^{-6}، بصرف النظر عن إضافة المبيد الفطري ومدة الحض. ان متوسط الأعداد في التخفيف10^{-5} تفوق معنويا على متوسطه في التخفيف 10^{-6} .

بصرف النظر عن إضافة المبيد الفطري فان مدة الحضن (3 ، 6) أيام أدت إلى زيادة معنوية في متوسطات أعداد الخلايا البكتيرية في التخفيف 10^{-4},10^{-6} ، ثم انخفضت أعدادها معنويا عند مدة الحضن (12 ، 18) يوما في التخفيف 10^{-4} وغير معنويا في التخفيف 10^{-6} ، في حين أدت زيادة غير معنوية في متوسط الأعداد قي التخفيف 10^{-5}، وانخفضت انخفاضا معنويا عند مدة الحضن (12 ،18) يوما . سجلت أعلى القيم للأعداد عند استعمال التخفيف 10^{-4} وعند مدة الحضن (6) أيام .

أدى التركيز الثاني (C_1) إلى خفض معنوي في متوسط أعداد الخلايا ولجميع تخافيف اللقاح المستعملة بغض النظر عن مدة الحضن ، عند زيادة المستوى عن هذا الحد حدث انخفاضا معنويا في متوسط الأعداد في التخفيف 10^{-4} وغير معنويا في التخفيف10^{-6} و 10^{-5} . ان متوسط الأعداد قي التخفيف 10^{-4} كان متفوقا معنويا على متوسطه في التخفيفين 10^{-6} و 10^{-5} عند التراكيز C_3,C_2,C_1.

أشار Abul kalam ،(1995) إلى وجود تثبيط ضعيف في نمو الازوتوباكتر بعد إضافة المبيد الفطـــري (Tridemorph) . ذكر بشير ،(1996) إن بكتريا الرايزوبيا لم يتوقف نموها بوجود المبيد الفطري بينوميل إذا ما أضيف بالتركيز الموصى به أو اقل من ذلك ولا يبدأ التأثير المثبط إلا في التراكيز العالية .

أما معاملة المقارنة (C_o) فان متوسط أعداد الخلايا البكتيرية في التخفيف 10^{-4} سجل أعلى القيم عند مدة الحضن (3) أيام ، إذ كانت (70)*10^4 cfu .مل$^{-1}$ ثم انخفضت معنويا عند مدة الحضن (6، 12 ،18) يوما فبلغت (60 ، 12.5 ،9)*10^4 cfu . مل$^{-1}$ على التوالي. عند استعمال التخفيفين 10^{-6} و10^{-5} سجلت أعلى الأعداد عند مدة الحضن(6) أيام فكانت (55 *10^5 ، 40 *10^6) cfu . مل$^{-1}$ على التوالي ، وانخفضت معنويا عند مدة الحضن (12، 18) يوما ، وسجلت اقل قيمة لها عند مدة الحضن (18) . متوسط أعداد الخلايا في التخفيف 10^{-4} كان متفوقا على متوسطه في التخفيف 10^{-6} و10^{-5} وعند جميع مدد الحضن .

إن قيم اقل تركيز مثبط لنمو وأعداد خلايا الازوتوباكتر قد تأثر بدرجة كبيرة بتركيز المبيد المضاف ومدد الحضن . فعند مدة الحضن (3 ، 6 ، 12) يوما فان زيادة تركيز المبيد الفطري من الصفر (C_o) إلى التركيز (C_3,C_2,C_1) تسببت في خفض معنوي لمتوسط أعداد الخلايا في جميع تخافيف اللقاح المستعملة ،عند التركيز الثاني والثالث فان متوسط الأعداد زاد بصورة غير معنوية مع زيادة مدة الحضن من(3- 6) أيام ، بينما أدى التركيز الرابع(C_3)إلى زيادة معنوية بزيادة مدة الحضن ولجميع التخافيف المستعملة .وانخفضت الأعداد معنويا عند مدة الحضن (12 ،18) يوما . متوسط الأعداد في التخفيف 10^{-4} كان متفوقا معنويا عن متوسطه في التخفيف 10^{-6} ، 10^{-5} ولجميع التراكيز المضافة . لايوجد اقل تركيز مثبط لنمو البكتريا عند مدة الحضن (3 ، 6 ، 12) يوما .

إن انخفاض الأعداد البكتيرية ولجميع تخافيف اللقاح وعند إضافة تراكيز المبيد الفطري عند مدة الحضن (3) أيام وزيادتها عند مدة الحضن (6) أيام يمكن ان يعزى إلى مرور البكتريا بطور السكون (التطبع والتكيف) Lag phase أي ان الخلايا لا تبدأ بالنمو مباشرة وإنما تمر بمدة التطبع والتأقلم على الظروف الطارئة (إضافة المبيد) ، إذ ان الخلايا تتكيف مع الوسط الجديد حيث يلزمها بعض الوقت للتعود على البيئة الجديدة وقيامها ببناء أنزيمات جديدة تمكنها من الاستفادة من مكونات البيئة الجديدة (ألشرابي وآخرون،2004) . ان نسبة عالية من خلايا اللقـاح لاتستطيع النمو في الأوساط الجديدة التي تنتقل إليها فتموت مما يؤدي إلى هبوط أعدادها عند مدة الحضن (3) أيام وبعد تلك المدة يحصل تأقلم للبكتريا فنلاحظ زيادة ملحوظة في النمو ، أي ان البكتريا مرت بالطور اللوغارتمي Log phase ، إذ ان الأنزيمات متوفرة وبكامل نشاطها (الخفاجي،1987) ، إن البكتريا تبدأ بتحطيم المبيد الفطري وتقليل درجة سميته واستعماله مصدرا للغذاء والطاقة مما أدى إلى زيادة الأعداد عند مدة الحضن (6) أيام ، لقد ذكر Turcoو Konopka

،(1990)إن هناك أنواعا عديدة من الأحياء يمكنها إفراز الأنزيمات المحللة للمبيدات ولها المقدرة على القيام بعملها حتى لو كانت أعدادها قليلة جدا . ان انخفاض أعداد الخلايا عند مدة (12) يوما قد يعزى إلى مرور البكتريا بطور الضعف أو الموت ، إذ يبدأ عدد الخلايا الميتة يفوق عدد الخلايا الحية نتيجة الاستهلاك التدريجي للمواد الغذائية أو نتيجة تراكم المواد السامة أو تزاحم الخلايا ، لذا يصبح الوسط غير ملائم للنمو وعندها يتناقص النمو ثم يتوقف (ألشرابي وآخرون، 2004) . عند مدة الحضن (18) يوما فان زيادة تركيز المبيد الفطري من C_o إلى التراكيز C_1 C_2 C_3 تسببت في خفض معنوي في متوسط الأعداد في التخفيف 10^{-4} وغير معنو ي في التخفيفين 10^{-5},10^{-6}، ولم يسجل أي نمو عند التركيز الرابع C_3 في التخفيف 10^{-4} ، أي ان الـ MIC في هذا التخفيف هو (1.2) غم .لتر $^{-1}$ ، في حين لم يسجل أي نمو عند التركيز الثالث والرابع (C_3,C_2) في كلا التخفيفين 10^{-5},10^{-6}، أي إن الـ MIC في هذين التخفيفين هو (0.6) غم .لتر $^{-1}$. إذ أوضح Nastaija وآخرون،(2002) إن استعمال المبيد الفطري Mankogel قد سبب تثبيطا في نمو بكتريا *A.chroococcum* إذ لم يسجل أي نمو في أي تركيز . انخفاض الأعداد وانعدامها عند التراكيز العالية من المبيد عند مدة الحضن (18) يوما قد يعزى إلى نفاذ المبيد عند تلك المدة من الحضن ومن ثم نفاذ العناصر الغذائية الناتجة من تحلل المبيد وتراكم النواتج السمية مما يؤدي إلى قلة الأعداد ، أو يعتقد بان البكتريا استطاعت تحويل المبيد إلى نواتج سمية للنوع نفسه من الأحياء التي تؤثر في المركب الأصلي (Alexander ،1982) . ان انخفاض نمو وأعداد خلايا الازوتوباكتر في البيئات الصناعية الصلبة بزيادة مستويات المبيدات ذكرها Milosevic وآخرون،(2000) ، إذ إن نمو البكتريا في بيئة ذات محتوى عال من المبيدات قد يؤدي إلى زيادة في امتصاص المبيد من قبل البكتريا أو ربطه على المواقع الفعالة على سطح الخلية بحيث يؤدي إلى إيقاف عمل الأنزيمات الأمر الذي يؤدي إلى إيقاف النمو والعمليات الايضية.

نتائج الجدول (4) تبين بأنه لاتوجد فروق معنوية بين متوسطات الأعداد البكتيرية عند استعمال التخفيفين 10^{-4},10^{-5}، اللذان تفوقا معنويا على متوسطات الأعداد في التخفيف 10^{-6} بصرف النظر عن إضافة المبيد الحشري ومدة الحضن . عند ثبوت إضافة المبيد فان مدة الحضن (3 ، 6 ، 12 ، 18) يوما أدت إلى خفض معنوي في متوسط الأعداد في جميع التخافيف المستعملة مع زيادة مدة الحضن ، لاتوجد فروق معنوية بين مدتي الحضن (12 ،18) يوما ولكل التراكيز المستعملة . سجلت أعلى القيم للأعداد في التخفيف 10^{-5} وعند مدة الحضن (3) أيام ، وهذه لاتختلف معنويا عن قيمها في التخفيف 10^{-4}.

أدى التركيز الثاني (C_1) إلى خفض معنوي في متوسط أعداد الخلايا عند جميع تخافيف اللقاح المستعملة بغض النظر عن مدة الحضن . زيادة المستوى عن هذا الحد حدث انخفاضا غير معنويا في متوسط الأعداد في التخفيفين 10^{-4},10^{-5} ومعنويا في التخفيف 10^{-6} لاتوجد فروق معنوية بين متوسط الأعداد في التراكيز الثلاث وعند المستويات(C_3,C_2,C_1). فقد أوضح Pozo وآخرون، (1995) إن المبيدات الحشرية مثل Profenfos ، Chloropyrifos خفضت أعداد الأحياء المثبتة للنتروجين الجوي .

معاملة المقارنة (C_o) تبين ان متوسط الأعداد البكتيرية في التخفيف 10^{-4} سجل أعلى القيم عند مدة الحضن (3) أيام فبلغت (67.5) * 10^4 cfu . مل $^{-1}$ ثم انخفضت الأعداد انخفاضا غير معنويا عند مدة الحضن (6) أيام ومعنويا عند مدة الحضن (12 ،18) يوما ، إذ كانت (64 ، 17.5 ، 14) *10^4 cfu . مل$^{-1}$ لكل من مدة الحضن (6 ،12 ، 18) يوما التوالي ، بينما استعمال التخفيف 10^{-5},10^{-6} أعطى أعلى القيم عند مدة الحضن (6) ايام ، إذ كانت (60 *10^5 ، 42.5 *10^6) cfu. مل$^{-1}$، وانخفضت معنويا عند مدة الحضن (12، 18) يوما ، سجلت اقل القيمة لها عند مدة الحضن (18) يوما . ان متوسط الأعداد في التخفيف 10^{-4} كان متفوقا على متوسطه في التخفيف 10^{-5},10^{-6} وعند جميع مدد الحضن .

زيادة تركيز المبيد الحشري من الصفر(C_o) إلى التركيز (C_3,C_2,C_1) وعند مدة الحضن (3) ايام أدت إلى خفض معنوي في متوسط أعداد الخلايا البكتيرية ولجميع التخافيف المستعملة .

متوسط الأعداد في التركيز 10^{-5} كان متفوقا عن متوسطه في التركيز 10^{-4},10^{-6} ولجميع التراكيز المضافة . أي انه لايوجد تركيز مثبط لنمو البكتريا عند مدة الحضن (3) ايام وذلك لنمو البكتريا في جميع المستويات المضافة ، وقد يعزى السبب في مقاومة الازوتوباكتر للمبيد المضاف إلى قدرة البكتريا على تحطيم هذا المبيد ، إذ أشار Cain وHead ،(1991) إلى قابلية كثير من الأحياء المعزولة من التربة على تحليل المبيدات وإزالة أثرها السام ، كما بين مظلاه ،(2006) بان للأحياء المجهرية القدرة على تحلل المبيدات الحشرية ، إذ تحتاجها كمصدر للطاقة والكاربون والنتروجين

انخفاض الأعداد البكتيرية بزيادة التراكيز المضافة للمبيد الحشري قد ذكرت من قبل Salama وآخرون، (1975) ، إذ أوضح ان إضافة المبيد الحشري Dipterex وبتراكيز مختلفة في نمو الرايزوبيا مختبريا أدت إلى تقليل نمو الرايزوبيا بزيادة التركيز في الوسط الغذائي .

عند مدد الحضن (6 ،12 ،18) يوما لم يسجل أي نمو للبكتريا عند التركيز (C_1 ،C_2,C_3) ولجميع تخافيف اللقاح المستعملة ، أي ان الـ MIC للتخافيف الثلاث هو التركيز C1 (0.875) مل .لتر$^{-1}$ ، يتبين من هذه النتيجة ان البكتريا في جميع التخافيف المستعملة قد توقف نموها بوجود المبيد الحشري (سوبر التراسيدين) إذا ما أضيف بتركيز اقل من الموصى به حقليا. لقد ذكر Rana وآخرون ،(1998) إن قيم اقل تركيز مثبط لنمو *A.chroococcum* للمبيدات الكيميائية Maluthia ،Mancozeb سجل عند التراكيز (125 ، 200.7) PPm على التوالي . وبين بشير، (1996) ان اقل تركيز مثبط للمبيدين الحشريين Furadan , 85 Sevin لنمو الرايزوبيا سجل عند التراكيز (0.1 ، 5) غم .لتر$^{-1}$ على التوالي .

أوضحت النتائج في الجدول (5) ان متوسط الأعداد البكتيرية في التخفيف 10^{-4}تفوقت معنويا على متوسط أعدادها في التخفيفين 10^{-5},10^{-6} عند ثبوت تراكيز مبيد الأدغال المضافة ومدة الحضن . كما تفوق متوسط الأعداد في التخفيف 10^{-5} على متوسطه في التخفيف 10^{-6} . بصرف النظر عن إضافة مبيد الأدغال جرا ون د آب فان مدة الحضن (3 ،6 ،12 ،18) يوما آدت إلى خفض معنوي في متوسط أعداد الخلايا البكتيرية في التخفيف 10^{-4} مع زيادة مدة الحضن . أما في التخفيف 10^{-5},10^{-6} فان زيادة مدة الحضن من (3- 6) أيام آدت إلى خفض غير معنوي في متوسط أعداد الخلايا ومعنويا عند زياد ة مدة الحضن إلى (12 ، 18) يوما . سجلت أعلى الأعداد في التخفيف 10^{-4} ولمدة حضن (3) ايام ، إذ تفوقت معنويا ع ن قيمها في التخفيفين 10^{-5},10^{-6} . ان انخفاض النمو بزيادة مدة الحضن قد يعزى إلى ان بكتريا الازوتوباكتر سريعة النمو وذلك لتوفر العناصر الغذائية اللازمة لنموها في الوسط الغذائي خلال مدة الحضن (3) أيام تقل الأعداد نتيجة تراكم النواتج السمية أو قلة المواد المغذية وان الأوكسجين من أكثر المواد المستنفذة شيوعا (ألشرابي وآخرون،2004) .

عند ثبوت مدة الحضن فان التركيز (C_1) أدى إلى خفض معنوي في متوسط أعداد الخلايا عند جميع التخافيف المستعملة كلقاح ، زيادة المستوى عن هذا الحد حدث انخفاضا معنويا في متوسط الأعداد ولجميع التخافيف . متوسط الأعداد في التخفيف 10^{-4} كان متفوقا معنويا عن متوسطه في التخفيفين 10^{-5},10^{-6} وعند التراكيز (C_2,C_1) ، في حين لاتوجد فروق معنوية بين متوسطات الأعداد في التخافيف الثلاث عند التركيز(C_3). أشار Santos و Flores ،(1995) إلى إن لبعض مبيدات الأدغال تأثير مضر في نمو *A.chroococcum* . أوضح التميمي، (2005) إن إضافة خليط مبيدات الأدغال (توبك + لوكران) وبالتركيز الأقل من الموصى به أدى إلى خفض معنوي في متوسط أعداد *A.chroococcum* وزيادة التركيز عن هذا الحد لم يحدث انخفاضا معنويا في متوسط الأعداد . ونتيجة مشابهة حصل عليها السلمان، (1999)عند استعماله المستوى الموصى به من مبيد الأدغال اللوكران قد أدى إلى خفض معنوي في أعداد بكتريا *A. chroococcum* .

متوسط أعداد الخلايا في التخفيف 10^{-4} سجل أعلى القيم عند مدة الحضن (3) ايام وعند المعاملة التي لم يضاف لها مبيد الأدغال(C_o) ، إذ كانت (70) * 10^4 cfu .مل$^{-1}$ ثم انخفضت الأعداد انخفاضا معنويا عند مدة الحضن(6 ، 12 ، 18) يوما ، إذ كانت الأعداد (62,5 ، 14 ، 10) *10^4 cfu .مل$^{-1}$ على التوالي . أما في التركيز10^{-5},10^{-6} فسجلت أعلى القيم عند مدة الحضن

(6) ايام فبلغت الأعداد (58 *10^5 ،40 *10^6) cfu .مل$^{-1}$ إذ تفوقت معنويا عن قيمها عند مدة الحضن (3) ايام والتي كانت (50 *10^5 ، 32.5 *10^6) cfu .مل$^{-1}$ ، ثم انخفضت معنويا عند مدة الحضن (12 ، 18) يوما وسجلت اقل القيم عند مدة الحضن (18) يوما . متوسط أعداد الخلايا في التخفيف 10^{-4} كان متفوقا على متوسطه في التخفيفين 10^{-5},10^{-6} وعند جميع مدد الحضن . أوضح ألغزي،(2006) إن مدة الحضن (3 -7) أيام وعند عدم إضافة مبيد الأدغال الرونستار أدت إلى زيادة معنوية في متوسط نمو وأعداد بكتريا *A. chroococcum* . هذه النتيجة كانت متطابقة مع نتائجها عند إضافة المبيد الفطري والحشري ، أي ان متوسط أعداد البكتريا في المعاملة التي لم تستلم مبيد (C_o) ولجميع المبيدات الثلاث سلكت سلوكا متشابها .

زيادة تركيز مبيد الأدغال من (C_o) إلى التركيز (C_3,C_2,C_1) وعند مدة الحضن(3) أيام أدت إلى خفض معنوي في متوسط الأعداد البكتيرية وفي جميع تخافيف اللقاح الثلاث . لاتوجد اختلافات معنوية بين التراكيز (C_3,C_2,C_1) في التخفيف 10^{-4} ، في حين لم تظهر اختلافا ت معنوية بين التركيزين (C_3,C_2) في التخفيف 10^{-5},10^{-6} . من هذه النتيجة نجد انه لايوجد اقل تركيز مثبط الـ (MIC) لنمو البكتريا عند مدة الحضن (3) ايام ولجميع التخافيف المستعملة . هذه النتيجة كانت متطابقة مع نتائج ألغزي، (2006) ، إذ أشار إلى ان زيادة تركيز مبيد الرونستار من (C_o) إلى التراكيز(375 ، 750 ، 1500) سم^3.دونم$^{-1}$ وعند مدة الحضن (3) أيام أدت إلى خفض معنوي في نمو وأعداد خلايا *A.chroococcum* . نمو الازوتوباكتر في جميع التراكيز المضافة لمبيدات الأدغال ذكرت من قبل Nastaija وآخرون ،(2002) .

أما عند مدة الحضن (6) ايام فزيادة التركيز من C_o إلى C_2,C_1 تسببت في خفض معنوي لمتوسط الأعداد في التخفيفين 10^{-4},10^{-5} ولم يسجل أي نمو في التركيز الرابع C_3 ، أي ان الـ MIC هو (20) مل. لتر$^{-1}$ ، أما متوسط الأعداد في التخفيف 10^{-6} فقد انخفض معنويا عند التركيز الثاني (C_1) ولم يسجل أي نمو في التركيزين الثالث والرابع ، أي ان الـ MIC لهذا التخفيف هو (10) مل .لتر$^{-1}$.

أدى التركيز الثاني C_1 إلى خفض معنوي لأعداد البكتريا عند مدة الحضن (12) يوما وغير معنويا عند مدة الحضن (18) يوما في التخفيف 10^{-4} ولم يسجل أي نمو عند التركيزين (C_2، C_3) ، أي ان الـ MIC لهذا التخفيف هو (10) مل. لتر$^{-1}$ عند مدة الحضن (12، 18) يوما. أما في التخفيف 10^{-5} , 10^{-6} ، فلم يسجل أي نمو عند التراكيز (C_1، C_2، C_3) وعند مدتي الحضن (12، 18) يوما، أي ان الـ MIC لهذين التخفيفين هو (5) مل. لتر$^{-1}$. أوضح التميمي ،(2005) إن الـ MIC لثلاث عزلات من A.chroococcum هو التركيز الأعلى من الموصى به حقليا (300 + 100) PPm من خليط المبيدات (توبك + لوكران) . لقد أشارت الدراسات التي نفذها Milosevicو Govedarica ،(2002) إلى إن الازوتوباكتر أكثر حساسية لمبيدات الأدغال المضافة وإضافتها بكميات عالية تؤدي إلى قبل أحياء التربة .

يتبين من الجدول (6) ان الـ MIC للمبيد الفطري في أعداد البكتريا في التخفيف 10^{-4} هو(1.2) غم . لتر$^{-1}$ وفي التخفيفين 10^{-5} , 10^{-6} هو (0.6) غم لتر$^{-1}$ وعند مدة الحضن (18) يوما ، أما الـ MIC للمبيد الحشري فقد كان (0.875) مل.لتر$^{-1}$ وعند مدة الحضن (6 ،12 ، 18) يوما ولجميع تخافيف اللقاح . كان الـ MIC لمبيد الأدغال عند مدة الحضن هو (20) مل. لتر- 1 وفي التخفيفين 10^{-4} ,10^{-5} أما في التخفيف 10^{-6} فكان (10) مل. لتر$^{-1}$.عند مدة الحضن (12 ، 18) يوما الـ MIC هو (10) مل .لتر$^{-1}$ في التخفيف 10^{-4} وللتخفيفين 10^{-5} 10^{-6} هو (5) مل .لتر$^{-1}$ وعند مدتي الحضن (12 ،18) يوما .

من هذه النتائج يتبين بان المبيدات الثلاث اختلف تأثيرها على أعداد الازوتوباكتر ولذلك اختلف ألـ MIC لكل مبيد وحسب مدد الحضن المختلفة . إذ أوضح Nastaija وآخرون ،(2002) عند دراستهم تأثير ثلاث تراكيز ولأربعة مبيدات مختلفة (فطرية ، حشرية ،أدغال) على نمو ثلاث عزلات من الازوتوباكتر اختلاف تأثير تلك المبيدات على نمو A.chroococcum إذ ان جميع العزلات نمت في التراكيز الثلاث لمبيدات الأدغال والحشرات ، بينما التراكيز الثلاث للمبيد الفطري

Mankogal سببت تثبيط نمو العزلات . نستنتج أيضا بان تخفيف اللقاح المستعمل من نفس العزلة تأثر بتراكيز المبيدات المضافة ومدد الحضن ، إذ كانت البكتريا في التخفيف 10^{-4} أكثر تحملا لتراكيز المبيدات المضافة إذ كان الـ MIC لهذا التخفيف هو أعلى من الـ MIC للتخفيفين , 10^{-6} . 10^{-5}

إن النتائج في البيئات الصناعية الصلبة قد لاتنطبق مع النتائج الحقلية وذلك لوجود تداخل عوامل عديدة في الحقل تؤدي إلى تقليل التركيز الفعا ل للمبيد ، ومنها المزرعة الخليطة من أحياء التربة والتي يقوم قسم منها بمهاجمة المبيدات للحصول على مصدر للكاربون والطاقة وإبطال سميتها (Radosevich وآخرون،1995) ، فضلا على وجود عوامل أخرى منها الطين والمادة العضوية التي تعمل على مسك المبيد على سطوحها . إذ أشار التميم ي ،(2005) عند مقارنته لنمو A.chroococcum مختبريا وحقليا انه حصل تثبيط لأعداد البكتريا عند التركيز الأقل من الموصى به (75 +25)PPm من خليط التو ب ك واللوكران في الظروف المختبرية ، بينما في الحقل حصل انخفاض غير معنوي لأعداد البكتريا عند التركيز الموصى به حقليا (150 + 50) PPm من خليط التوبك واللوكران. بين ألغزي ،(2006) إن التركيز (375) سم^3 . دونم$^{-1}$ أدى إلى تثبيط أعداد A.chroococcum في التجربة المختبرية ، بينما في تجربة الأصص حصل تثبيط للإعداد عند التركيز (750)سم3 .دونم$^{-1}$.

جدول1. يبين مناطق جمع البكتريا ومصدر العزل وأعداد البكتريا .

رقم العزلة	منطقة جمع العينات	نوع المحصول	مصدر الجمع	عـدد البكتريـــا غم. تربة جافة$^{-1}$
I_1	كنعان - ديالى	ذرة	تربة الرايزوسفير	$10^4 * 2.6$
I_2	الحديد – ديالى	شعير	تربة الرايزوسفير	$10^6 * 1.3$
I_3	الحديد – ديالى	برسيم	تربة الرايزوسفير	$10^6 * 2.8$

جدول2. يبين أنواع المبيدات المستعملة وتراكيزها .

اسم المبيـــد	نوع المبيد	التراكيز المستعملة C_o C_1 C_2* C_3
بينوميـــل Benomyl	فطـري	0.00 ، 0.3 ، 0.6 ، 1.2 غم.لتر$^{-1}$
سوبر التراسيدين Super atracedian	حشـري	0.00 ، 0.875 ، 1.75 ، 3.5 مل.لتر$^{-1}$
جراونـد آب Grawned ab	أدغـال	0.00 ، 5 ، 10 ، 20 مل.لتر$^{-1}$

* التركيز الموصى بـه .

جدول3. يبين تأثير المبيد الفطري في أعداد البكتريا لمختلف التخافيف ومدد الحضن .

تخافيف اللقاح البكتيري	3 أيام				6 أيام				12 يوم				18 يوم			
	C_o	C_1	C_2	C_3	C_o	C_1	C_2	C_3	C_o	C_1	C_2	C_3	C_o	C_1	C_2	C_3
10^{-4}	70	32.5	30	12	60	35	32.5	27.5	12.5	10.5	4.0	3.0	9.0	2.0	1.5	0
10^{-5}	50	18	15	11	55	20.5	16.5	13	9.0	5.0	3.0	1.5	6.5	1.5	0	0
10^{-6}	30.5	17	14.5	6.5	40	19	17.5	9.5	6.5	3.5	2.5	1.0	4.0	1.5	0	0

LSD (0.05):

الأيـام (d) = 1.501 الأيام × التركيز = 3.002
التركيز(C) = 1.501 الأيام × التخفيف = 2.590
التخفيف = 1.299 التركيز × التخفيف = 2.590

الأيام × التركيز × التخفيف = 5.199

جدول4. يبين تأثير المبيد الحشري في أعداد البكتريا لمختلف التخافيف ومدد الحضن.

تخافيف اللقاح البكتيري	3 ايام				6 ايام				12 يوم				18 يوم			
	C_o	C_1	C_2	C_3	C_o	C_1	C_2	C_1	C_o	C_1	C_2	C_3	C_o	C_1	C_2	C_3
10^{-4}	67.5	31	27.5	22.5	64	0	0	0	17.5	0	0	0	14	0	0	0
10^{-5}	55	35	37.5	27.5	60	0	0	0	13.5	0	0	0	8.5	0	0	0
10^{-6}	32.5	30	19	17.5	42.5	0	0	0	6.5	0	0	0	4.5	0	0	0

LSD(0.05):

الأيــام (d) = 1.525 الأيام × التركيز = 3.051
التركيز(c) = 1.525 الأيام × التخفيف = 2.642
التخفيف = 1.321 التركيز× التخفيف = 2.642

الأيام × التركيز × التخفيف = 5.285

جدول5. يبين تأثير مبيد الأدغال في أعداد البكتريا لمختلف التخافيف ومدد الحضن .

تخافيف اللقـــاح البكتيري	3 ايام				6 ايام				12 يوم				18 يوم			
	C_o	C_1	C_2	C_3	C_o	C_1	C_2	C_3	C_o	C_1	C_2	C_3	C_o	C_1	C_2	C_3
10^{-4}	70	22.5	17.5	6	62.5	21	11	0	14	5	0	0	10	4	0	0
10^{-5}	50	21.5	6.5	3	58	17.5	4.5	0	11	0	0	0	6.5	0	0	0
10^{-6}	32.5	17	4.5	4.5	40	15.5	0	0	5.5	0	0	0	3.5	0	0	0

LSD(0.05):

الأيـام (d) = 2.06 الأيـام × التركيـز = 4.12
التركيز (c) = 2.06 الأيـام × التخفيف = 3.57
التخفيف = 1.78 التركيز × التخفيف = 3.57

الأيـــام × التركيز × التخفيف = 7.148

جدول 6. يبين الـ (MIC) للمبيدات الثلاث في أعداد البكتريا ولمختلف التخافيف ومدد الحضن .

تخافيف اللقاح البكتيري	18 يوم	6 12 18 يوم	6 12 18 يوم
	بينوميل غم. لتر$^{-1}$	سوبر التراسيدين مل .لتر$^{-1}$	جرا ونـــد آب مل. لتر$^{-1}$
10-4	1.2	0.875	20 10 10
10-5	0.6		20 5 5
10-6	0.6		10 5 5

المصـادر

التميمي ، فارس محمد سهيل . 2005 . تأثير التداخلات بين المبيدات الحيوية والكيميائية والتسميد الحيوي على نبات القمح .أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة ـ جامعة بغداد

الخفاجي ، زهرة محمود. 1987 . الفعاليات الحيوية للبكتريا . دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل . العراق .

ألشرابي ، نجم الدين ، ومنير هابيل ومصطفى البلخي. 2004 . الأحياء الدقيقة . منشورات جامعة دمشق ـ كلية الزراعة .

السلمان ، توفيق بشير.1999 . دور المبيدات العشبية في نمو وفعالية بكتريا الازوتوباكتر وأثرها في نمو الحنطة .رسالة ماجستير. كلية الزراعة والغابات ـ الموصل.

ألغزي ، اسعد كاظم عبدالله . 2006. تأثير مبيد الرونستار في نمو بكتريا الازوتوباكتـر. رسالة ماجستير . كلية الزراعة ـ جامعة بغداد .

بشير ،عفراء يونس. 1996.تأثير المبيدات في بكتريا الرايزوبيا وتكوين العقـــد الجذرية في نبات الباقلاء . رسالة ماجستير . كلية الزراعة والغابات ـ الموصل

بشير، عفراء يونس. 2003 . التداخل بين المايكورايـزا وبكتريـا الازوتوباكتـــر والازوسبرلم وتأثيره في نمو وحاصل الحنطة . أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة- جامعة بغداد .

مظـلاه، حيدر علي احمد .2006.المبيدات الحشرية وعلاقتها بتلوث البيئة في اليمن. كلية التربية . جامعة عدن . اليمن .

Abul kalam , Banerjee , A .K. 1995 . Action of the fungicide Tridemorph on the glucose , lactate and Succinat , dehydrogenase activities of some tridemorph – sensitive an resistant bacteria . , *Pestisides Science*, 43 (1) : 41- 45 .

Allen O.N. 1961. *Experiments in soil bacteriology*. Burges.Pupli-shing Co. Minneapolism , Minn, USA .

Alexander,M . 1982 .*Interoduction to soil microbiology*.John Wiley

and Sons. Inc New York .

Asama Aleem, Jasmine Isar ,Abdulmalik . 2003.Impact of longterm application of industrial waste water on the emergenc of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric Soil Bioresource *Technology* . 86 : 7-13 .

Becking , J.h . 1981.The family Azotobacterceae In : Starr, M.P. Ed : "The prokaryotes" Vol 1.Springer-velag .Berlin .Heidelbery. New York P : 795-871 .

Cain,R.B.and I.M Head .1991. Enhanced degradation of pesticides. . Its biochemical and molecular biological busis. In : pesticides In Soil and Water : Current perspectives (Walker , C. A .Ed) Levenham press L. td . Levenham. P: 23-40 .

Jones, S.E; Jones, A.L. and D.B. Johnson.1992 . Effects of differential pesticides inputs on the size and composition of Soil Microbial biomass: results from the Box worth and SCARAB Projects . Symposium on Environmentas Aspects of pescitide Microbiology . Siguna, Sweden, 17-21 August- Inpress .

Mashhoor ,W. A, M.A El- Borollosy, Sh.M Selim,A. Sohair, H..Nasr Hoda, and Abdel-Azeem. 2002. Production of an N_2- Fixing Inoculant Rcsistant to environmental stress Condition for Application as N-Bio fertilizer in desert Soil. Arab univ.J. Agric. Sci, Ain Shams Univ Caira . 10 (2). 567-580 .

Milosevic ,N, M. Govedarica.2002. Effect of herbicides on microbiological properties of soil . Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad .No. 102 . 5-12.

Milosevic, N.,M. Govedarica and B. Konstan tinovic . 2000.Uticaj Herbicide no dulaciju Soje Microbiological Aktivnost Zemlista .Sesti kongres korovima , Zabonik radova , Banja kovilijaca 455-460 .

Nastaija, B ,A. Cacic and M. Milic . 2002 . Effects of pesticides on *Azotobacter chroococcum* . Natural Sciences Matica Srpska Novi Sad , No .102, 23-28.

Papic-Vidalovic.T. 2002.An efficiency of Azotobacter soil .Novisad (Yugoslavia).

Pozo,C.Martinez Toledo , M.V ,V. Salmeron,B. Rodelas ,J.Gonzales-Lopez. 1995. Effect of chloropyrifos on soil . Microbial Activity , Environmental Toxicology and chemistry, 14 (2) : 187-192 .

Radosevich ,M , S.J. Traina, Y. Hao and O.H. Tourinen . 1995. Degradation and mineralization atrasine by a Soil bacterial Isolate.Applied and Environmental Microbiology, 61, 297- 302 .

Rana Athar, Shams tabrez Khan and Masood Ahmed. 1998.Isolation of pesticides and Heavy metal tolerant strains of *Azotobacter chroococcum* from the Rhizospheric Region of wheat crop biofertilizer and bio pesticide .Ed : by A.m. Dehmukh , tech-ci-publis India .pp : 145-149 .

Salmeron ,V. Martinez Toledo, Mv . and J. Gonzalezlopez. 1990. Nitrogen fixation and production of auxins , gibberllins and Cytokinin by an *Azotobacter chroococcum* strain Isolated from root of zeamays in presence of insoluble phosphate.Chemosphere ,20 : 417-422 .

Salama ,A .M , I.Y. Mostafa and Y. El. Zawahry. 1975. In secticides and soil microorganisms .III Fate of C^{14} Labelled Dipterexas Affected by two nodule forming Rhizobium .Spp . And roots Of their respective leguminous host plants Acta.bio.Acad .Sci Hung .26 : 1-7 .

Santos , A .and M. flores . 1995 . Effect of Glyphosate on nitrogen fixation of free- living hetrotrophic bacteria (abstract).Letters Application of Microbiology .20 (b) : 349-352 .

Sharma,P.K., S.K. Dey and V.P. Chahal. 1986. In vitro interoduct-Ion between phytopathogens and two Azotobacter species.Ind Phytophath .39: 117-119 .

Turco,R.F.and A. Konopka. 1990. Response of microbi population to Carbon furan in soils enhanced for degration .In: "Enhnanced Degration of pesticides in the environment." (Racke, K.D.and Coats .J.R.Eds). America chemical Society .Washington D.C pp : 153-166.

Vannini ,C ,M.C. Napoli ,N. Miclaus,E. Casalone, E. Gallo . 1992. In fluence of different pesicides on *Azospirillum brasilense* And *Azotobacter chroococcum* and Microbi processes related to the mechanism of detoxification Agrokemiaes Talajtan , 39 (3-4) : 503- 508

Determination of minimum inhibitory concentration from chemical Pesticides on bacteria Azotobacter numbers with period of incubation diffrant .

F.M.Suheil A.H .Fehmey
College of Agric. / Dyiala Univ.

ABSTRACT

Three Laboratory experiments were carried out with (CRBD) design, to Study the effect of three chemical pesticides namely; fungicide (benomyl) ,Insecticide (super atracedein) and herpicide (grawand ab) with (4) levels for each treatment on *A.chroococcum* number .Three dilution of inculation bacterial (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) with four period of Incubation (3, 6, 12 and 18) day were used for measuring (MIC) of bacterial cell number.

The results showed that (MIC) of fungicide with dilution of (10^{-4}) is (1.2) $g.L^{-1}$ and (0.6)$g.L^{-1}$ for each dilution of (10^{-5} and 10^{-6}) for (18) day Incubation . The (MIC) of Insecticide is (0.875)$ml.L^{-1}$ for the period of (6,12 and 18) day Incubation with all dilution Inculation .

The (MIC) of herbicide is (20)$ml.L^{-1}$ for (6) day Incubation with dilution of 10^{-4} , 10^{-5} and (10) ml $.L^{-1}$ for dilution of 10^{-6}. For the period of Incubation (12,18) day the (MIC) is (10)$ml.L^{-1}$ for dilution 10^{-4} and (5) $m.L^{-1}$ for both dilution of 10^{-5} and10^{-6}.

The results showed that the dilution of 10^{-4} is considered resistant for concentration of pesticide as compared with 10^{-5} , 10^{-6} .