LJEEST
www.srcest.org.ly

المجلة الليبية لعلوم وتكنولوجيا البيئة

Libyan Journal of Ecological & Environmental Sciences and Technology (LJEEST)

دور بكتيريا منطقة الجذور على ثبات وأنهيار بعض المبيدات

محمد علي السعيدي[1] هالة يوسف محمد حسن[2]

ARTICLE INFO

Vol. 2 No. 1 June, 2020

Pages A-(17 - 24)

Article history:
Received 22 December 2019
Accepted 19 January , 2020

.

Authors affiliation
1. Environ. Sci. Dept. Faculty of Engineering & Technology, Sebha University
2. General Sci. Faculty of Engineering & Technology, Sebha University

elssaidi@gmail.com

Keywords: Pesticide, Bacteria, Degradation, Rhizosphere

© 2020 LJEEST. All rights reserved.
Peer review under responsibility of LJEEST

الملخص

أجري هذا البحث بهدف التعرف على دور واثر أنواع من بكتيريا منطقة الجذور (*R. meliloti* ، *Azotobacter sp.* ، *B. subtilus* ، *B. lupine*) في التربة (Rhizosphere) على بعض بقايا المبيدات (الكلوربيروفوس ، اللنرون ، السنكور ، الجلايفوسيت) المتداولة محليا بمنطقة وادي الشاطئ ، ليبيا ، حيث تتراكم متبقيات تلك المبيدات في النباتات المزروعة وتصل في الغالب الى المواسم التالية. وقد بينت نتائج انهيار المبيدات أن بكتيريا (*R. meliloti*) ليس لها دور واضح في تحطم وانهيار مبيدي الكلوربيروفوس واللنرون ، بينما عملت على تحطم تراكيز معنوية من مبيد السنكور بعد 12 ساعة مع استمرار الميكروبات في النمو حتى 24 ساعة ، وازداد انهيار مبيد الجلايفوسيت بزيادة الجرعة المستخدمة. وضحت النتائج ايضا أن مبيد اللنرون له قدرة على مقاومة التحلل البيولوجي لبكتيريا (*B. lupine*) ، كما أن البكتيريا ليس لها دور فاعل في تحطم مبيد الكلوربيريفوس ، لكنها عملت على تكسير مبيد الجلايفوسيت خلال 12 ساعة الأولى من زمن التعرض ، واستمرت الميكروب في النمو حتى 24 ساعة ثم حدث تنشيط للمبيد فأصبح أكثر مقاومة للتحلل البيولوجي ، وكان للبكتيريا القدرة على تحلل مبيد السنكور. بينما بكتيريا (*B. subtilus*) ليس لها أي دور في تحطيم وتكسير مبيدي الكلوربيريفوس والجلايفوسيت بينما ساهم الميكروب في تكسير المبيد اللنرون خلال 12 ساعة ثم حدث تنشيط للمبيد مع الزمن فكلما زادت فترة التعرض كلما زادت مقاومة المبيد للتحلل وأن البكتيريا ليس لها أي دور في تكسير مبيد السنكور خلال الساعات الأولى من زمن التعرض ، ولكن بعد مرور 24 ساعة من التعرض بدأ المبيد في الانهيار. بكتيريا الازوتوباكتر (*Azotobacter sp.*) ليس لها أي تأثير على مبيد الكلوربيريفوس خلال الساعات الأولى للتعرض ، وزادت مع زيادة فترة التعرض مدة بقاء المبيد وتزداد مقاومة مبيد اللنرون للتحلل بزيادة التراكيز المستخدمة. ولم يحدث انهيار لمبيد الجلايفوسيت خلال 12 ساعة الأولى من زمن التعرض ثم حدث تحطيم للمبيد بعد 12-24 ساعة ثم عاد المبيد لنشاطه خلال 72 ساعة ، وليس للبكتيريا أي دور في تحلل مبيد السنكور خلال الساعات الأولى ثم حدث انهيار للمبيد مع مرور الزمن. ويستنتج أن بكتيريا الازوتوباكتر كانت أكثر تأثيرا على المبيدات المستخدمة تليها بكتيريا (*B. lupini*) وبكتيريا (*B. subtilus*) واخيرا (*R.. meliloti*).

Rhizosphere Bacteria Roles on Some Pesticides Stability and Degradation

Mohamed Ali Elssaidi1 Hala Yousef Hassan2

Abstract, This research was conducted with the aim of identifying the role and effect of localized root zone bacteria (*R. meliloti*, *B. lupine*, *B. subtilus*, *Azotobacter sp*.) In the soil (Rhizosphere) on some pesticide residues locally available in *Wadi* Al-Shati area, Libya, where residues of these pesticides accumulate in cultivated plants and often reach the following seasons. The pesticides degradation results showed that (*R. meliloti*) bacteria had no clear role in Chlorpyrifos and Linron breakdown while it worked to destroy significant concentrations of the pesticide after 12 hours with the microbes continuing to grow up to 24 hours, and the breakdown of the Glyphosate increased by the increasing of the dose Used. The results also showed that Linron has the ability to resist the biological decomposition of *B. lupine*, and the bacteria have no active role in Chlorpyrifos degradation, but it break down Glyphosate during 12 hours of exposure, and the microbe continued to grow until 24 hours, then the activation of the pesticide occurred and it became more resistant to biodegradation, and the bacteria had the ability to breakdown the pesticide. While (*B. subtilus*) bacteria has no role in degradation of Chlorpyrifos and Glyphosite, the microbe contributed to

breaking Linron within 12 hours, then activation of the pesticide occurred over time, the longer the exposure period, the greater the resistance of the pesticide to decomposition and that the bacteria had no role in cracking Sencor during the first hours of exposure, but after 24 hours of exposure, the pesticide began to collapse. Azotobacter had no effect on Chlorpyrifos during the first hours of exposure, increased with the increased exposure period, the duration of the pesticide's survival, and the resistance to Linron decomposition increased with increasing concentrations used. The Glyphosate collapse did not occur within the first 12 hours of exposure, and then the destruction of the pesticide occurred after 12-24 hours, and then the pesticide returned to its activity within 72 hours. It is concluded that Azotobacter was more effective on the pesticides used, followed by the bacteria (*B. lupini*) and the bacteria (*B. subtilus*) and finally (*R. meliloti*).

المقدمـــة

تسلك المبيدات في التربة عدة مسارات ويعتمد ذلك على خواص التربة ونوع المبيد ووجود المادة العضوية في التربة فبعض المبيدات تتحلل في وجود الأشعة فوق البنفسجية والعوامل الحيوية وبذلك لا تؤثر على التربة مع مراعاة الفترة اللازمة للتحلل وفترة التحريم لحماية المستهلك ولكن بعض المبيدات تبقي في التربة لفترة طويلة وتقاوم التحلل فتترك أثار سلبية على أحياء التربة. ومن مضار المبيدات أيضا التأثير على البكتيريا المفيدة للتربة مثل البكتيريا المثبتة للنيتروجين الجوي التي تعمل على تحويل النيتروجين من خلال عدة تفاعلات وتحتاج لظروف ملائمة لأنها بكتيريا حساسة للتغيرات البيئية. كما تتأثر ميكروبات التربة بدرجات مختلفة من المبيدات حسب نوع المبيد والمجموعة الميكروبية وظروف التربة فبعض المبيدات لها تأثير منشط لميكروبات التربة ومنها ما وجد له تأثير مثبط واكثر العمليات الحيوية تأثرا من استعمال المبيدات هي عملية تثبيت النيتروجين تكافليا لما لطبيعة هذه الميكروبات من حساسية لتغير الظروف البيئية مقارنة بعمليات أخرى مثل النشدرة التي تقوم بها أنواع عديدة من الميكروبات بعضها حساسة وبعضها قليل الحساسية. ولقد وضح (Alexander، 1977) أسباب مقاومة بعض المبيدات للتحلل البيولوجي الى غياب الإنزيمات القادرة على إحداث تغيرات في المجموعة الكيميائية التي يتبعها المبيد أو قد تكون الإنزيمات القادرة على تحليل هذه المجموعة الكيميائية موجودة ولكن وجود تحوير في تركيب جزئ المبيد يجعله غير قابل للنفاذ خلال جذر خلايا الميكروب الذي يوجد فيه الإنزيم أو قد تكون الميكروبات القادرة على تحليل المجموعة الكيميائية التي يتبعها المبيد موجودة فعلا ولكن وجود تحوير في تركيب جزئ المبيد يجعله غير قابل للتحلل الإنزيمي أوقد يكون المبيد المحور مثبطا للأنزيمات القادرة على تحليل المجموعة الكيماوية التي يتبعها هذا المبيد. ذكر (هاريس وشابمان 1982) إن تحلل المبيدات بواسطة البكتيريا يعود إلى أن البكتيريا تستخدم المبيدات كمصدر للكربون ، كما ذكر كل من (Sharmila & 1982 1989 Gorder) تحطيم للعديد من المركبات بواسطة الميكروبات الموجودة في التربة ،وتجري الدراسات المختلفة على المبيدات والبكتيريا في الظروف المعملية والحقلية لدراسة الآثار المترتبة عليها.

ودرس (Shin *et. al*., 1989) تأثير بعض مبيدات الأعشاب على بكتيريا (*Bradyrhizobium Japonicum*) المعزولة من جذور نبات فول الصويا في الظروف المعملية. تم تحضين البكتيريا مع المبيدات alachlor ، Linuron ، simazine باستخدام بيئة YEMA وأخذت النتائج بعد أسبوع من التحضين حيث حدث نقص شديد في أعداد البكتيريا عند التركيز400 ppm من المبيدات Alachlor، Linuron بمقدار 27.4 % ، 57.8 % على التوالى بينما حدث تأثير بسيط في التركيز ppm200 من Parquat وكان تأثير Alachlor مختلف مع عزلات من البكتيريا العقدية بعضها كانت مقاومة للمبيد نسبيا ، وبعضها كانت اكثر حساسية بينما كانت العزلة بينما كانت بعضها مقاومة جدا في الجرعة الموصى بها. وبين (Sandhu *et. al.*, 1991) رش مجموعة من مبيدات الأعشاب على نبات العدس الملقحة و غير الملقحة ببكتيريا *Rhyzobium leguminosarum* وتأثيرها على تكوين العقد الجذرية وتثبيت النيتروجين ، حيث أظهرت النتائج زيادة عدد العقد الجذرية والنيتروجين المثبت عاليا في النباتات غير المعاملة بينما حدث انخفاض شديد في النباتات المعاملة بمجوعة مبيدات Linuron ، Oxyfluorfen ، Metribuzin ، Oxadiazon. وذكر (Rober et.al, 1993) كيفية تحلل مبيد اللنرون في وسط مغذي سائل باستخدام عزلات بكتيرية تم عزلها من التربة حيث أثبتت الدراسة إن البكتيريا التي تم عزلها عملت على تحلل اللنرون بالكامل واستخدمته كمصدر للكربون والنيتروجين كما إنها عملت لتحلل monoLinuron and chlorbromuron ، حيث تحلل اللنرون إلى3 ، 4 - 1 - methylurea ، Linuron (dichlorophenyl 3 ، 4- dichlorophenylurea ، 3 ، 4 dichloroanaline ، 4 ولكنها غير قادرة على تحلل 1 dimethyl ، 1 ، monuron ، diuron أو metoxuron وعند ما تم التعرف على أنواع البكتيريا ظهرت بكتيريا عصوية سالبة جرام هوائية ليس لها أي دور في تحلل المبيد عندما تم اختبارها منفردة أما النوع الأخر الذي تم عزله وكان مسؤول عن التحلل هي بكتيريا .Pseudomonas sp. كما درس (Gurcharan *et.* 1994)

al., اثر المعاملات المستخدمة من مبيدات الأعشاب على نشاط الكائنات الحية الدقيقة في التربة حيث استخدم مبيد methabenzthazuron 1.31kg/ha ، Linuron at 0.75kg آدت المعاملات إلى انخفاض أعداد البكتيريا والفطريات كما أدت إلى نقص في أعداد العقد الجذرية ومستويات النيتروجين المثبت. وضح (Silva *et. al.*, 1998) تقييم تأثيرات تطبيقات التربة لمبيدات الأعشاب على تكوين العقد الجذرية وتثبيت النيتروجين في نبات اللوبيا وتضمنت الدراسة استعمال مبيدات أعشاب بالنسب الموصى بها وضعفها وهى trifluralin 8.6 ، 1.8 لتر/هكتار EPTC5 & ، 10 لتر/هكتار&pendimethalin 4.2 لتر/هكتار metribuzin & 1.1 ، 2.2 لتر/هكتار2.4 ، 4.8 2.4 ، Linuron4.8 & لتر/هكتار imazaquin & 1 ، 2 لتر/هكتار ولقحت هذه النسب مع Brad yrhizobium. بعد نمو اللوبيا 20 ، 40 ، 60 ، 80 يوم من الزراعة وقد أظهرت النتائج أن انخفاض عدد العقد الجذرية عند المعاملة في 1.8 لتر trifluralin ، 2.4 لتر Linuron ، 1 لتر imazaquin لكل التأثيرات حدث فقط في مراحل الدراسة لنمو نبات اللوبيا، وانخفض نشاط إنزيم النيتروجين عند المعاملة بمبيد الأعشاب Metribuzin ، Linuron بدرجة كبيرة أدى الى سمية النبات ويمنع النمو على الرغم من هذه التأثيرات التي لوحظت على العقد وتثبيتها للنيتروجين.

أجرى (Metin & Kazanicl, 1999) دراسة من خلال معاملة عينات من التربة بمجموعة من المبيدات الفسفورية الحشرية وهي مبيدات الايزوفينوفوس ، الفينوفوس ، الفورات، حيث أظهرت نتائج الدراسة إن عدد البكتيريا في عينة التربة المعاملة بمبيد الايزوفينوفوس كان اكثر من عينة التربة غير المعاملة، بينما اظهر مبيدي الفينوفوس والفورات تأثير واضح على أعداد البكتيريا في عينات التربة المعاملة. وبين (Wackett, 2004) دور الإنزيمات التي تفرزها البكتيريا في تحلل مبيدات الأعشاب من مجموعة الترايزين باستخدام بكتيريا Pseudomona.sp حيث أظهرت النتائج أن تحلل المبيدات مجموعة الترايزين الى حمض سيانوريك يتم بواسطة ثلاثة أنواع من الإنزيمات التي تفرزها بكتيريا Pseudomonas. sp وهي AtzA ، AtzB ، AtzC ، atz genes كما أن بعض من أنواع البكتيريا لها القدرة على استخدام المبيدات كمصدر للطاقة. كما اوضح (المسلاتى ، 2006) تأثير بعض مبيدات الحشائش على كائنات التربة الغير مستهدفة وأظهر في دراستة إن المعاملة بمبيد اللنرون قد قلل من التعداد الكلي للبكتيريا بعد 3 أيام من المعاملة حيث قل تعداد بكتيريا الباسيلس لأقل من المعدل الطبيعي في التربة كما زاد التأثير في التربة بعد 14يوم من المعاملة. وكان محفزا لتعداد بكتيريا السيدوموناس على الأعماق المختلفة. كما بينت الدراسة إن المعاملة بمبيد السنكور سببت تحفز للتعداد الكلي للبكتيريا بعد الانبثاق وتركزت في الطبقة السطحية للتربة على عمق 10سم وقلت عند الأعماق وظهر اعلي تعداد للبكتيريا على عمق 20 سم بعد 14 يوم من المعاملة وحدت نفس التأثير على نوعي الباسيلس والسيدوموناس. كما حدث تثبيط بدرجه قليلة لكل من نوعي بكتيريا الباسيلس والبسيدوموناس تحث الظروف المعملية بعد 24 ساعة من المعاملة بتركيزات مختلفة من مبيدي اللنرون والسنكور.

المواد والطرق

استخدم في هذا البحث مجموعة من المبيدات نورد مواصفاتها فثما بلي:

أ. مبيد الكلوربيروفوس

الاسم التجاري : سالوت

الاسم العلمي : o،o-diethylo-5 ، 3 ، 6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate;chlorpyrifos-ethyl.

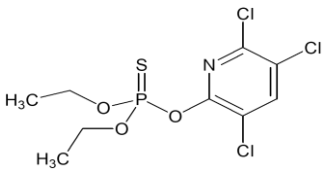
أسماء أخري للمبيد: Dursban (DowElanco) ، lorsbn (Makhteshim-Agan). pyrinex ، (DowElanco)

التركيب الجزيئ : C9H11CL3No3PS

الوزن الجزيئي : 350.59

نسب المكونات : C: 30.38%.H: 3.16%.CL: 30.34%.N: 4%.O: 13.69%.P: 8.83%.S: 9.15%

التركيب البنائي :



التصنيف الكيميائي : فسفوري عضوي

الاستخدام : حشري

التأثير: جهازي ، بالملامسة

السمية: مركب الكلوربيروفوس يقضي على النوع القارض من الحشرات وذلك بتأثيره الفعال عن طريق الجهاز الهضمي والملامسة. قا بلية المزج: يقبل المزج مع اغلب المبيدات الفطرية بعد الاستعمال ويستحسن إجراء عملية الرش فورا بعد الخلط ولا يقبل المزج مع المركبات القلوية مثل مسحوق بوردو والكبريت الجيري.

الجرعة السامة LD_{50} للفار: 244 ملجم/كجم من وزن الجسم لمركب التسمم عن طريق الجلد LD_{50} للفار: 2760 ملجم من وزن الجسم. المبيد مضر للنحل والأسماك لذلك يجب الامتناع عن الرش في فترة التزهير وعدم تلوث برك الأسماك والمياه. التوصيات ومعدلات الاستعمال: 120-200 مل/100 لتر ماء أو 25-40 مل /20 لتر ماء او1.20-2 مل/هكتار ، هذه المعدلات تكون كافيه للحالات الاعتيادية ولكن في حالات الإصابة الشديدة يلزم زيادة المعدل إلى 200 مل/100 لتر. ليس له تأثير عكسي على الحاصلات الزراعية إذا ما استعمل بالمعدلات الاعتيادية الموصى بها فترة الانتظار (14-21 يوم)

ب.مبيد الجلايفوسيت:

الاسم التجاري: كلاش

الاسم العلمي : N-(phosphonomethyl) glycine

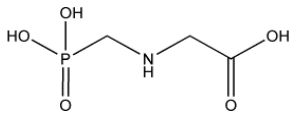
أسماء أخرى للمبيد: Gallup ، Land master ، Pond master ، Ranger ، Roundup ، Rodeo ،

التركيب الجزيئ : C3H8NO5P

الوزن الجزيئ : 169.08

نسب المكونات : C: 21.31% ، H: 4.77% ، N: 8.28% ، O: 47.31% ، P: 18.32%.

التركيب البنائي :



التصنيف الكيميائي: Phosphonoglycine

الاستخدام : عشبي

التأثير : تثبيط البناء الضوئي

السمية: حاد السمية: LD_{50} للفئران عن طريق الفم 5600ملجم/كجم من وزن الجسم وسمية الجلايفوسيت الحامضي(Roundup) له نفس التأثير. متوسط السمية: LD_{50} للفئران عن طريق الفم لملح trimethylsulfonium 750ملجم/كجم من وزن الجسم. المركبات الأخرى تكون معتدلة السمية LD_{50} للفئران عن طريق الفم تقع بين 1000و5000ملجم/كجم من وزن الجسم. LD_{50} للمبيد الجلايفوسيت اكثر من 10000ملجم/كجم من وزن الجسم للفئران والأرانب والماعز وهو غير سام عن طريق الجلدLD_{50} اكثر من 5000 ملجم/كجم من وزن الجسم للمركب الحامضي وملح. isopropylamine. LD_{50} عن طريق الجلد للمركب trimethylsulfonium اكثر من 2000 ملجم/كجم من وزن الجسم. ليس له تأثير على الجلد يحتوي على المجموعة الوظيفيةphosphatyl aمشابه لمبيد الحشرات التي تحتوي على ملح استرorganophosphate وهو غير مثبط لإنزيم الكولين استريز. التوصيات ومعدلات الاستعمال: -الجلايفوسيت مبيد عشبي غير انتقائي يستعمل للقضاء على النباتات الحولية والأعشاب الضارة عريضة الأوراق والنباتات الخشبية بالإضافة إلى مجموعة أخرى من الأعشاب ، مبيد حامضي يستخدم في صورة ملح ويتواجد في صورة مستحلب مركز ويستخدم بمعدل 7 لتر/هكتار

ج. مبيد اللنرون:

الاسم التجاري: اللنرون (افلون)

الاسم العلمي: 3-(3 ، 4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea

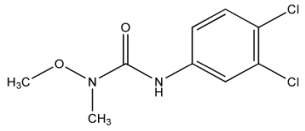
أسماء أخرى للمبيد: Linex ، Linorox ، Linurex ، Lorox ، and Sinuron Garnitan ، Sarclex ، Premalin

التركيب الجزيئ : C9H10CL2N2O2

الوزن الجزيئي : 249.11

نسب المكونات :. C: 11.25: CL: 28.47%.N% O: 12.83% 43.40%. H: 4.05%.

التركيب البنائي:



التصنيف الكيميائي: استبدال عن اليوريا

الاستخدام : عشبي

التأثير : يثبط البناء الضوئي

سميتة الحادة: LD_{50} للفئران عن طريق الفم 1200-1500ملجم/كجم من وزن الجسم ، LD_{50} للأرانب عن طريق الفم 2250 ملجم/كجم من وزن وعن طريق الجلد اكثر من 5000ملجم. السمية المزمنة: يسبب تحسس الجلد لخنازير غينا وحدوث تشوهات في خلايا الدم الحمراء للجرذان بمعدل 2.75 ملجم/كجم /يوم /سنتين. كما تسبب في حدوث أنيميا للكلاب عند الجرعة اكبر من 6.25 ملجم كجم/يوم. -التأثيرات المنتجة غير محتملة عند الإنسان عند مستويات التعرض المتوقعة. التأثيرات المشوهة: لا يسبب حدوث عيوب وراثية عندما اختبر على الأرانب والفئران عند الجرعات ، 6.25 ملجم/كجم /يوم من وزن الجسم في فترة الحمل. التأثيرات المسرطنه: حدوث أورام غدية غير خبيثة للجرعات من 72.5 ملجم/كجم/يوم للجرذان وحدوث ورم خلوي كبدي للفئران عند الجرعات180 ملجم/كجم يوم. التوصيات ومعدلات الاستعمال: اللنرون مبيد عشبي يستعمل قبل وبعد ظهور البادرات للقضاء على الأعشاب الضارة عريضة الأوراق الحولية والسنوية يعمل من خلال تثبيط التمثيل الضوئي للأعشاب الضارة ، يستعمل في المخازن والحقول لمحاصيل الذرة والذره البيضاء وفول الصويا والبطاطا والكرفس والجزر ويستخدم بمعدل1.3 كجم/هكتار

د. مبيد الميتروبيوزين:

الاسم التجاري : سنكور

الاسم العلمي: 4-amino-6-tert-butyl-4 ، 5-dihydro-3-methyltio-4-triazin-5-one ، 2 ، 1

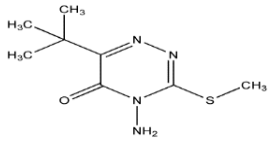
أسماء أخرى للمبيد: Lexone ، Sencoral ، and Sencorex

التركيب الجزيئ : C8H14N4OS

الوزن الجزيئي : 214.29

نسب المكونات: C: 44.48%. H: 6.59%. N: 26.15%. O: 7.47%. S: 15.31.

التركيب البنائي :



التصنيف الكيميائي: الترايزينات

الاستخدام: عشبي

التأثير: تثبيط البناء الضوئي

السمية الحادة: LD_{50} للفئران عن طريق الفم 700 ملجم/كجم من وزن الجسم وللجرذان 1090-2300 ملجم/كجم من وزن الجسم وخنازير غينا من 245- 274ملجم/كجم من وزن الجسم غير سام عن طريق الجلد LD_{50} 20000 ملجم/كجم للأرانب عن طريق الاستنشاق ليس له تأثير على الجلد للإنسان التعرض الحاد له تأثير مخدر للجرذان. التأثيرات المسرطنه: ليس له تأثيرات مسرطنه للجرذان عندما أعطيت جرعة 15ملجم/كجم/يوم/سنتين والفئران عند 380 ملجم/كجم/يوم/سنتين. - التأثيرات المشوهة: ليس لها تأثيرات مشوهة على الحيوانات. كما أجريت دراسة على جرعة عالية كان لها تأثير على الجهاز العصبي المركزي والغدة الدرقية والكبد.

التوصيات ومعدلات الاستعمال: ميتروبيوزين مبيد عشبي يستخدم للقضاء على الأعشاب الحولية عريضة الأوراق التي تصيب محاصيل الخضر من خلال تثبيط عملية البناء الضوئي للأعشاب ويستخدم بصورة سائلة أو في شكل مسحوق.

كما استخدمت سلالتين من بكتيريا الرايزوبيا تم عزلها من نباتات الحلبة (Trigonella Foenum greacum) والترمس (Lupinius albus) حسبما جاء في (زكي ، 1988). وبكتيريا الازوتوباكتر (Az. chroococcum) تم عزلها من عينة تربة أخذت من أحد المزارع من منطقة قمم الشاطئ حسبما جاء في (زكي ، 1988). كما استخدمت عزلات نقية من بكتيريا Bacillus.subtils تم الحصول عليها من معمل الأحياء الدقيقة بقسم علوم البيئة – كلية العلوم الهندسية والتقنية / جامعة سبها. وقد استخدمت الأوساط المغذية التالية :

- وسط نمو الرايزوبيا (بيئة احمر الكونغو) تم تحضيرها حسبما جاء في (أبو الذهب والجعراني ، 1983) وتتكون من:

ما نيتول	10 جم	مستخلص خميرة	1 جم
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	0.5 جم	احمر الكونغو (1:400)	10 مل
كبريتات ماغنيسيوم	0.2 جم	أجار	20 جم
كربونات كالسيوم	3 جم	ماء مقطر	1000 مل
كلوريد صوديوم	0.1 جم		

- وسط نمو الازوتوباكتر (بيئة قاعدية 77 لتنمية الازوتوباكتر)تم تحضيرها حسبما جاء في (زكي ، 1988) وتتكون من:

فوسفات ثنائية البوتاسيوم	0.5 جم	كلوريد الحد يديك أثار	
كبريتات الماغنيسيوم	0.2 جم	ماء مقطر	1000 مل
كلوريد صوديوم	0.2 جم		7.2 pH
كبريتات المنجنيز الثنائية	أثار		

- وسط نمو Bacillus.subtils (بيئة الاجار المغذي)تم تحضيرها حسبما جاء في (ابوالدهب والجعراني،1983) وتتكون من:

مستخلص لحم	3 جم	ماء مقطر	1000 مل
بيتون	5 جم		7.2 pH
أجار	20 جم		

زرعت النباتات المستهدفة تحت ظروف ري وتسميد طبيعي وتمت متابعة النمو وبداية تكوين العقد من المراحل الأولي التي تكونت فيها العقد بعد شهرين من نمو النباتات حتى مرحلة اختفاء العقد وانحلالها وكانت افضل مرحلة التي تم فيها الحصول على عقد كبيرة الحجم هي مرحلة ما قبل الأزهار. بعد ذلك جمعت النباتات وفصلت الجذور وتم إزالة العقدة الكبيرة وتقطع مع جزء من الجذر وتغسل جيدا بالماء لإزالة حبيبات التربة العالقة بها. ووضعت العقدة بعد ذلك في محلول سليماني (كلوريد الزئبقيك) بتركيز 1000/1لمدة 5 دقائق. تنقل العقدة من الطبق بواسطة ملقط معقم ثم توضع في طبق بتري به كحول 96% لمدة 5 دقائق ثم تزال العقدة وتوضع في طبق بتري به ماء معقم مع التقليب لغسلها من بقايا الكحول. تنقل العقدة وتوضع في طبق بتري به ماء معقم 1مل ثم يضغط عليه بواسطة ملقط معقم لتنفجر ولتكوين معلق بكتيري. ويحضرغشاء بكتيري من المعلق ونصبغه بصبغة (ازرق الميثلين) ونفحصه تحت العدسة الزيتية لملاحظة طور الباكترويد الذي يدل على أن العقدة صادقة. تجهز بيئة احمر الكونغو في أطباق بتري معقمة وتترك لتتصلب. ونلقح سطح أجار احمر الكونغو بما يعلق بالإبرة ذات العقدة عند غمسه بالمعلق البكتيري تحضن الأطباق على 28 مْ مدة 7 أيام ونلاحظ شكل المستعمرات. تعزل المستعمرات بصورة نقية على سطح أجار احمر الكونغو بعد عمل غشاء وصبغه بصبغة الجرام وفحصه مجهريا. السلالات التي تم الحصول عليها ظهرت على بيئة احمر الكونغو مرتفعة غير مصبوغة لامعة ثم أصبحت طباشيرية ذات قوام لزج جدا وعند الفحص المجهري ظهرت الخلايا تحت العدسة الزيتية عصوية قصيرة منتفخة سالبة جرام.

بكتيريا الازوتوباكتر سهلة التميز نظر لكبر حجم الخلايا عن معظم أنواع البكتيريا تختلف في الشكل من عصوية إلى كروية ولكن الخلايا المستديرة هي السائدة في التربة الزراعية، أما عزل هذه الميكروبات فليس من السهل إذ أن بعض الميكروبات تعيش في الخلايا المخاطية التي تغلف الخلية وكذلك بين خلايا الازوتوباكتر المتجمعة حيث أضيفت 1جم من عينة التربة وكانت النسبة المئوية للرطوبة 23% في 50 مل من بيئة 77 لتنمية الازوتوباكتر وترج جيدا. تم تحضين المزارع علي28 مْ لمدة 14 يوم وتظهر الازوتوباكتر على السطح على هيئة قشور. تعزل بعد ذلك بطريقة الأطباق المخطوطة على البيئة الصلبة للحصول على عزلات نقية. وقد تعمل غشاء من النمو بصبغة جرام للتعرف على شكل الخلايا. وللحصول على بيئات سائلة نأخذ مسحة من النمو ووضعها في البيئات السائلة.

تم تلقيح البيئات السائلة بإضافة 1مل من المزرعة السائلة لكل ميكروب من الميكروبات المختبرة فيكون التخفيف 102. وزعت المعاملات على الأوساط المغذية السائلة بحيث تمثل (الجرعة الموصى بها (Rd)و(ضعف الجرعة الموصى بها Rd 2) و(الجرعة الموصى بها ونصف Rd 1.5) و(نصف الجرعة الموصى بها ، Rd 0.5) (وربع الجرعة الموصى بها Rd 0.25) لكل مبيد في 100مل. نرج الأنابيب تم نخفف إلى 103- 104، بعد ذلك تم أخذ 1 مل من الخفيفات في أطباق بتري معقمة وذلك بعمل مكررين لكل تخفيف بحيث تمثل (صفر ساعة) وهي بعد إضافة المبيد مباشرة واستمرت إلى (12-24-48-72ساعة). جهزت البيئات الصلبة وصبت على الأطباق وحضنت الأطباق على 28 مْ من (48-72 ساعة) على حسب الميكروب. بعد فترة التحضين المناسبة تتم ملاحظة التأثير من خلال نمو المستعمرات على المعاملات المختلفة مقارنة مع المزرعة غير المعاملة. وقد تم التقدير الكمي للنمو البكتيري في 1مل من المزرعة الأصلية وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات النامية في الطبق في مقلوب التخفيف المستعمل.

النتائج والمناقشة

تأثير المبيدات على الميكروبات المختبرة

أ. اثر مبيد الكلوربيريفوس

النتائج الواردة في الجدول رقم (1) تبين تأثير مبيد الكلوربيريفوس على أعداد البكتيريا اللاتكافلية (بكتيريا *B. subtilus*) الى انه حدث تثبيط كبير في نمو البكتيريا خلال 24 ساعة من المعاملة في كافة التراكيز المستخدمة (2Rd 0.25*Rd*, 0.5*Rd*, *Rd*, 1.5Rd) بينما استمر الميكروب في النمو في العينة غير المعاملة (الشاهد). كما تشير النتائج الى تأثير مبيد الكلوربيريفوس على أعداد بكتيريا الازوتوباكتر الى أن المبيد أدى الى زيادة كبيرة في أعداد البكتيرديا خلال 12 ساعة مع كل التراكيز المستخدمة ثم حدث تناقص في أعداد البكتيريا خلال 24 ساعة عند استخدام التراكيز (1.5Rd–*Rd*, 2Rd) بينما استمرت الأعداد في الزيادة في التركيزين (2*Rd*, 1.5Rd) وعادت البكتيريا الى النشاط في التراكيز (0.25*Rd*, 0.5*Rd*, Rd) خلال 48 ساعة بينما كانت الزيادة مستمرة مع التركيزين (2*Rd*, 1.5Rd) ، وخلال 72 ساعة من زمن تعرض البكتيريا للمبيد كان التأثير مثبط تام بالنسبة للتركيز (2Rd) أما أثر التراكيز الأخرى استمر الى اكثر من 72 ساعة من زمن التعرض. اما بالنسبة فيما يتعلق بالبكتيريا التكافلية فان النتائج تظهر تأثير مبيد الكلوربيريفوس على أعداد بكتيريا (*R. meliloti*) المعزولة من جذور نبات الحلبة حيث أظهرت النتائج أن المبيد أدى الى تثبيط نمو البكتيريا بعد حوالى 12 ساعة من المعاملة في كافة التراكيز المستخدمة بينما استمرت البكتيريا في النمو في العينة غير معاملة. وتشير النتائج الى تأثير مبيد الكلوربيريفوس على أعداد بكتيريا (*B. lupini*) المعزولة من جذور نبات الترمس حيث كان للمبيد تأثير مثبط لنمو البكتيريا بعد حوالى 24 ساعة من المعاملة بكافة التراكيز المستخدمة مقارنة بنمو البكتيريا في العينة الغير معاملة.

جدول (1): أثر مبيد كلوربيروفوس على بكتيريا العقد الجذرية

البكتيريا	زمن التعرض (ساعة)	الشاهد	تضاعف الجرعة الموصى بها				
			0.25	0.5	1	1.5	2
B. subtilus	0	1900	188	149	105	99	155
	12	580	146	154	186	61	14
	24	730	0	0	0	0	0
	48						
	72						
A.otobacter	0	100	9	19	4	7	5
	12	20	24	25	53	30	85
	24	40	18	26	35	43	73
	48	10	13	13	31	41	58
	72	70	2	6	3	3	1
R. meliloti	0	2200	296	390	430	368	422
	12	258	1	1	1	1	1
	24	5600	0	0	0	0	0
	48						
	72						
B. lupini	0	1660	258	298	360	306	404
	12	6060	960	810	580	520	720
	24	4000	1	1	1	1	1
	48	99999	0	0	0	0	0
	72						

ب. اثر مبيد الجلايفوسيت

تشير النتائج الواردة في الجدول رقم (2) الى تأثير مبيد الجلايفوسيت على أعداد البكتيريا اللاتكافلية *B. subtilus* الى انه حدث تثبيط تام للبكتيريا خلال 24 ساعة من المعاملة في كافة التراكيز المستخدمة بينما استمرت البكتيريا في النمو في العينة غير المعاملة. بينما تشير النتائج الى تأثير مبيد الجلايفوسيت على أعداد بكتيريا الازوتوباكتر الى أن المبيد أدى الى انخفاض نمو البكتيريا خلال 12 ساعة من زمن التعرض ثم عادت البكتيريا الى نشاطها بعد 12 ساعة واستمرت في النمو الى حوالى 24 ساعة ثم حدث تثبيط تام للبكتيريا خلال 72 ساعة في كافة التراكيز المستخدمة. وعلى البكتيريا التكافلية كان تأثير مبيد الجلايفوسيت على أعداد بكتيريا (*R..meliloti*) والمعزولة من جذور نبات الحلبة حيث أظهرت النتائج أن المبيد قد أ أدى الى تثبيط نمو البكتيريا بعد حوالى 12 ساعة من المعاملة في التركيزين (0.25*Rd*, 0.5Rd)واستمرت البكتيريا في النمو بعد 12 ساعة وحدث تثبيط تام خلال 48 ساعة من زمن التعرض في التركيز (Rd) وانخفض النمو خلال 12 ساعة ثم عادت البكتيريا الى نشاطها واستمرت في النمو في التركيز ين (2Rd, 1.5Rd) ثم اصبح النمو في حالة مستقرة. وتشير النتائج ايضا الى تأثير مبيد الجلايفوسيت على أعداد بكتيريا (*B. lupini*) المعزولة من جذور نبات الترمس حيث أظهرت النتائج انخفاض في نمو البكتيريا خلال 12 ساعة الأولى من زمن التعرض ثم عادت البكتيريا الى نشاطها بعد 12 ساعة الى حوالى 24 ساعة من زمن التعرض في جميع التراكيزالمستخدمة وبعد ذلك حدث انخفاض في نمو البكتيريا مرة

أخرى في التركيزين (2*Rd*, 1.5Rd) وعادت الى نشاطها في التراكيز(0.25*Rd*, 0.5*Rd*, Rd).

جدول (2): أثر مبيد جلايفوسيت على بكتيريا العقد الجذرية

البكتيريا	زمن التعرض (ساعة)	الشاهد	تضاعف الجرعة الموصى بها				
			0.25	0.5	1	1.5	2
B. subtilus	0	22000	180	228	25	19	23
	12	258000	1	1	145	1	6
	24	56000	1	1	230	26	136
	48	244000	1	1	1	462	250
	72	99999	1	1	1	552	504
Azotobacter	0	100	51	30	27	0	0
	12	20	40	4	4	0	0
	24	40	43	90	10	0	0
	48	10	13	8	8	0	0
	72	70	1	0	0	0	0
R. meliloti	0	1900	46	48	135	100	128
	12	580	2	7	4	2	3
	24	730	0	0	0	0	0
	48	10	0	0	0	0	0
	72	820	0	0	0	0	0
B. lupini	0	1660	190	170	105	83	97
	12	6060	366	70	258	40	218
	24	4000	750	1230	1110	945	1290
	48	99999	39	130	336	82	350
	72		43	680	148	15	13

ج. تأثير مبيد السنكور

تشير النتائج الواردة في الجدول رقم (3) الى تأثير مبيد السنكور على أعداد البكتيريا اللاتكافلية الازوتوباكتر حيث أظهرت النتائج أن المبيد أدى الى انخفاض نمو البكتيريا خلال 12 ساعة الأولى في كافة التراكيز المستخدمة ثم عادت الى النشاط بعد حوالى 12 ساعة الى 24 ساعة من زمن التعرض ثم حدث نقص في النمو بعد 24 ساعة من زمن التعرض في كافة التراكيز المستخدمة.

كما تشير النتائج الى تأثير مبيد السنكور على أعداد بكتيريا *B. subtilus* حيث أظهرت الناتج زيادة في نمو البكتيريا خلال 12 ساعة ثم حدث انخفاض شديد في النمو بعد حوالي 12 ساعة واستمر الانخفاض الى 24 ساعة من زمن التعرض ثم عادت البكتيريا الى نشاطها بعد 24 سلعة في كافة التراكيز المستخدمة. وعلى البكتيريا التكافلية تشير النتائج الواردة في الجدول رقم (3) الى تأثير مبيد السنكور على أعداد بكتيريا (*R. meliloti*) المعزولة من جذور نبات الحلبة حيث أظهرت النتائج انخفاض في نمو البكتيريا خلال 12 ساعة الأولى من زمن التعرض ثم استعادت البكتيريا نشاطها بعد حوالى 12الى24 ساعة من زمن التعرض ثم حدث تثبيط تام لنمو البكتيريا خلال 48 ساعة من زمن التعرض. وتشير النتائج الى تأثير مبيد السنكور على أعداد بكتيريا (*B. lupini*) المعزولة من جذور نبات الترمس حيث أظهرت النتائج أن البكتيريا استمرت في النمو مع زيادة زمن التعرض في كافة التراكيز المستخدمة أي المبيد حفز البكتيريا على النمو.

جدول (3): أثر مبيد السنكور على بكتيريا العقد الجذرية

البكتيريا	زمن التعرض (ساعة)	الشاهد	تضاعف الجرعة الموصى بها				
			0.25	0.5	1	1.5	2
B. subtilus	0	1900	50	127	53	75	103
	12	580	58	126	132	140	76
	24	730	1	1	1	43	4
	48	10	18	1	11	6	18
	72	820	25	9	68	20	8
Azotobacter	0	100	16	10	2	19	20
	12	20	3	9	4	11	12
	24	40	71	23	24	38	71
	48	10	35	25	20	33	60
	72	70	3	3	4	2	3
R. meliloti	0	2200	498	378	194	288	240
	12	258	10	13	46	246	8
	24	5600	386	260	400	140	490
	48	2440	1	1	1	1	1
	72	99999	1	1	1	1	1
B. lupini	0	1660	109	78	186	112	98
	12	6060	456	302	486	426	372
	24	4000	9999	498	600	440	640
	48	9999		9999	9999	9999	9999
	72						

د. تأثير مبيد اللنرون

تشير النتائج الواردة في الجدول رقم (4) الى تأثير مبيد اللنرون على أعداد البكتيريا الاتكافلية B. subtilus حيث أظهرت النتائج انخفاض في نمو البكتيريا في كافة التراكيز المستخدمة ثم حدث تثبيط تام لنمو البكتيريا خلال 48 ساعة من زمن التعرض في التراكيز ((2Rd, Rd, 1.5Rd) وبينما حدث استقرار في نمو البكتيريا خلال 72 ساعة من زمن التعرض في التركيزين ((0.25Rd, 0.5Rd) وتشير النتائج إلى تأثير مبيد اللنرون على أعداد بكتيريا الازوتوباكتر حيث أظهرت النتائج زيادة في نمو البكتيريا خلال 12ساعة من زمن التعرض ثم حدث انخفاض في النمو بعد 12 ساعة الى حوالى 24 ساعة من زمن التعرض ثم حدث تثبيط للنمو بعد 48 ساعة من زمن التعرض في التركيزين (0.25*Rd*, 0.5Rd) أما بالنسبة للتركيزين (Rd, 1.5Rd) حدث انخفاض في نمو البكتيريا خلال 12 ساعة الأولى من زمن التعرض ثم عادت البكتيريا الى نشاطها بعد 12 ساعة الى 48 ساعة من زمن التعرض في التركيز (Rd) ثم حدث تثبيط تام لنمو البكتيريا في هذا التركيز خلال 72 ساعة وانخفاض في النمو في التركيز (1.5Rd). وعلى البكتيريا التكافلية تشير النتائج الى تأثير مبيد اللنرون على أعداد بكتيريا (*R.. meliloti*) المعزولة من جذور نبات الحلبة حيث أظهرت النتائج انه حدث تثبيط تام في نمو البكتيريا خلال 12 ساعة من زمن التعرض في كافة التراكيز المستخدمة بينما استمرت البكتيريا في النمو في العينة غير المعاملة. وتشير النتائج الى تأثير مبيد اللنرون على أعداد بكتيريا (*B. lupini*) المعزولة من نبات الترمس حيث أظهرت النتائج زيادة نمو البكتيريا خلال 24 ساعة الأولى من زمن التعرض ثم حدث تثبيط تام لنمو البكتيريا خلال 72 ساعة من زمن التعرض.

جدول (4): اثر مبيد اللنرون على بكتيريا العقد الجذرية

البكتيريا	زمن التعرض (ساعة)	الشاهد	تضاعف الجرعة الموصى بها				
			0.25	0.5	1	1.5	2
B. subtilus	0	75	67	121	135	83	83
	12	7	42	65	83	20	20
	24	14	12	77	20	19	19
	48	10	4	0	0	0	0
	72	5	8	0	0	0	0
Acotobacter	0	100	8	13	11	21	0
	12	20	26	90	13	18	0
	24	40	45	15	42	78	0
	48	10	11	38	48	7	0
	72	70	5	3	1	2	0
R. meliloti	0	2200	392	289	410	560	544
	12	258	1	1	1	1	1
	24	5600	1	1	1	1	1
	48	2440	1	1	1	1	1
	72	99999	1	1	1	1	1
B. lupini	0	1660	316	338	292	336	288
	12	6060	830	500	420	298	444
	24	4000	1080	1170	1230	1080	1080
	48	99999	26	149	190	300	460
	72		0	0	0	0	0

من خلال النتائج السابقة يمكن ان نخلص الى أن مبيد الكلوربيريفوس كان أكثر المبيدات فعالية في خفض أعداد بكتيريا (R. meliloti) المعزولة من جذور نبات الحلبة ثم تأثيره على كل من أعداد بكتيريا (lupini. B) المعزولة من جذور نبات الترمس وبكتيريا B. subtilus بينما كان المبيد أقل تأثيرا عى أعداد بكتيريا الازوتوباكتر من الميكروبات الأخرىحيث حدث تثبيط تام للبكتيريا بعد حوالى 72 ساعة من تعرض البكتيريا للمبيد في التركيز (2Rd). ومبيد الجلايفوسيت كان اكثر تأثيرا على أعداد بكتيريا B. subtilus ثم تأثيره على أعداد بكتيريا الازوتوباكتر وبكتيريا (B. lupini) المعزولة من جذور نبات الترمس بينما كان المبيد أقل تأثيرا على بكتيريا (R. meliloti) المعزولة من جذور نبات الحلبة. ومبيد السنكور كان اكثر تأثيراعلى أعداد بكتيريا (R. meliloti) المعزولة من جذور نبات الحلبة ومن تم تأثيره على أعداد بكتيريا B. subtilus وبكتيريا الازوتوباكتر بينما كان المبيد أقل تأثيرا على أعداد بكتيريا (B. lupini) المعزولة من جذور نبات الترمس بينما مبيد اللنرون كان اكثر تأثيرا على بكتيريا (R. meliloti) المعزولة من جذور نبات الحلبة وبكتيريا (B lupini) المعزولة من جذور نبات الترمس ومن تم تأثيره على بكتيرياالازوتوباكتر بينما كان اقل تأثيرا على بكتيريا B. subtilus

قائمة المراجع

ابوالذهب مصطفى ، الجعراني محمد (1983): " البكتيريا التمارين المعملية الأساسية. " الجزء الثاني ، دار المطبوعات الجديدة ، الإسكندرية - مصر.

زكـي سعد ، محمد عبد الوهاب ، محمد الصاوي (1988): " ميكروبيولوجيا الأراضي. " ، مكتبة الانجلو المصرية ، القاهرة - مصر.

زكـي سعد (1988): " ميكروبيولوجيا التطبيقية المعملية. " ، مكتبة الانجلو المصرية ، القاهرة - مصر.

محمد عبد الوهاب ، محمد الصاوي (1996): " الميكروبيولوجيا التطبيقية. " الطبعة الأولى ، المكتبة الأكاديمية ، القاهرة - مصر.

المسلاتي ، حسين ابراهيم (2006): " تأثير بعض مبيدات الحشائش على الكائنات الدقيقة غير المستهدفة في التربة ، رسالة ماجستير ، معهد الدراسات والبحوث البيئية ، جامعة عين شمس ، القاهرة - مصر.

Alexander, M. (1977): "Introduction to soil microbiology." 2nd edition. John Wiley and Sons, Inc., New York, New York. 457 pp.

Chapman, R.A., Harris, C.R., (1982): "Persistence of isofenphos and isazophos in a mineral and an organic soil." J. Environ.Sci. Health., B17:355-361.

Gorder, G.W., Dahm, P.A., Tollefson, J.J., (1982): "Carbofuran persistence in cornfield soils." J. Econ. Entomol., 75:637-642,.

Gurcharan Singh, Kundra HC, Brar LS, Gupta RP and Singh G. (1994): "Effect of herbicides on soil microorganism dynamics, Rhizobium-legume symbiosis and grain yield of pea (Pisum sativum)." Annals of Agricultural Research 15: 22-26.

Metin DIÚRAK, FerdaÛ KAZANICI (2001): "Effect of Some Organophosphorus Insecticides on Soil Microorganisms." Turk J. Biol. 25 (2001) 51-58

Roger, P. A., Zimmerman, W. J., and Lumpkin, T. (1993): "Microbiological management of wetland rice fields. In 'Soil Microbial Technologies." (Ed. B. Metting.) pp. 417-55. (Marcel Dekker: New York.)

Sandhu, PS. Dhingra, KK, Bhandari, SC, Gupta, RP. (1991): "Effect of hand-hoeing and application of herbicides on nodulation, nodule activity and grain yield of Lens culinaris." Med. Plant and Soil, 135, 293-296.

Sharmila, M., Ramanand, K., Sethunathan, N., (1989): "Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures." Can. J. Microbiol., 35: 1105-1110,

Shin, J.Y. and M.A. Cheney, (1989): "Abiotic dealkylation and hydrolysis of atrazine by birnessite." Environ. Toxicol., Chem., 24(6): 1353-1360.

Wackett, L.P. (2004): "Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment." J. Biol. Chem., 279: 41259 41262.