جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة المثنى / كلية الزراعة

تأثير اضافة الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات مختلفة من المادة العضوية في بعض خواص التربة المختلفة ونمو وحاصل الحنطة *Triticum aestivum* L.

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية الزراعة / جامعة المثنى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية

قسم الإنتاج النباتي

من قبل الطالبة

حنين عقيل جاسم الرماحي

بإشراف

أ.م.د عبد الله كريم جبار الجبوري

2022م **1443هـ**

بسم الله الرحمن الرحيم

يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا إِذَا قِيلَ لَكُمْ تَفَسَّحُوا فِي الْمَجَالِسِ فَافْسَحُوا يَفْسَحِ اللَّهُ لَكُمْ ۖ وَإِذَا قِيلَ انْشُزُوا فَانْشُزُوا يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ ﴿١١﴾

صدق الله العظيم

سورة المجادلة

الآية ﴿١١﴾

الإهداء

الى منبع الحنان والأمان من كان لها دوراً كبيراً في نجاحي (أُمي).

الى من علمنا العطاء دون انتظار (أبي).

الى من شاركني ايامي فرحاً و حزناً "أُم البنين" ، "لجُين" و "أحمد" (أخوتي).

الى روح غالية فارقتني (جدتي).

الى من افتخر بهم (أحبتي واصدقائي).

الى ارض وطني الأبية وابناء ثورة تشرين العظيمة (ارواحاً واحياء).

الى كل من يحمل في قلبهِ لي خيراً .

حنين

شُكر و تقدير

الحمدُ لله حمداً كثيراً على العافية والأصرار والتوفيق في إتمام رسالتي.

أتقدم بجزيل الشُكر والتقدير الى أُستاذي ومُشرفي الفاضل الدكتور المحترم "عبدالله كريم جبار" على كل ما قدمهُ لي من توجيهات ومعلومات قيمة ساهمت في إثراء موضوع دراستي في جوانبها المختلفة ،كما أتقدم بجزيل الشُكر والتقدير الى أعضاء لجنة المناقشة المحترمين كل من رئيس اللجنة الأستاذ الدكتور المحترم "سلوان محمد جاسم" ،الدكتورة المحترمة "صوفيا جبار جاسم" عضواً والدكتور المحترم "علي رحيم كريم" عضواً.

كما أتقدم بجزيل الشُكر والتقدير لعميد كلية الزراعة/جامعة المثنى الأستاذ الدكتور المحترم "حيدر حميد بلاو" لتذليل الصعوبات التي واجهتني خلال مسيرتي العلمية.

وفاءً وتقديراً واعترافاً مني بالجميل أتقدم بجزيل الشُكر الى كل من مدوا لي يد العون والمساعدة.

حنين

المستخلص:

نفذت هذه الدراسة لتقييم كفاءة السماد الحيوي المتكون من الأغشية الحيوية المنتجة من عزلات محلية لبكتريا *Pseudomonas flourescens* و بكتريا *Thiobacillus thioparus* بالإضافة الى ثلاث مستويات من السماد العضوي هي (صفر،0.5 ،1)% في نمو وحاصل الحنطة.

تم جمع نموذجين لتربة الرايزوسفير لمحصولي الجت والشعير من حقول في محافظة المثنى لغرض عزل بكتريا *Pseudomonas flourescens* بينما تم الحصول على عزلة بكتريا *Thiobacillus thioparus* من مختبر الدراسات العليا كلية الزراعة_جامعة المثنى ،استعملت الطرق الزرعية والمجهرية و فحص الحركة والاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلتي بكتريا *P. flourescens*.

من نتائج التشخيص وتجربة تقدير الغشاء الحيوي تم انتخاب عزلة واحدة تعود للزوائف الومضائية *P. flourescens* كأكفأ عزلة لغرض استعمالها في التجربة الحقلية اضافة الى عزلة *T. thioparus*.

نفذت تجربة حقلية بأستعمال تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) بثلاث مكررات لتقييم استعمال الغشاء الحيوي الثنائي المتكون من جنسين من البكتريا او لأحداهما وبأستعمال ثلاث مستويات من السماد العضوي والتوصية السمادية الكاملة (100، 75 ،100) كغم هـ$^{-1}$ للنتروجين والفسفور والبوتاسيوم.

أ- اظهرت نتائج التجارب المختبرية ما يأتي :

1- تم تشخيص عزلتين تحملان صفات بكتريا الزوائف الومضائية *P. flourescens*.

2- اظهرت العزلات البكتيرية المذكورة اعلاه قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي.

ب- نتائج التجربة الحقلية :

1- كان لأضافة الغشاء الحيوي تأثيراً معنوياً في اغلب الصفات المدروسة لنبات الحنطة.

2- سجلت معاملة الغشاء الحيوي B_2 تفوقاً معنوياً في صفتي الكمية الممتصة من النتروجين في المجموع الخضري وتركيز الكبريت الجاهز في التربة إذ سجلت معدلات بلغت (2.8% ،3131.39 ملغمS كغم تربة$^{-1}$) ،كما سجلت المعاملة B_2 4.74 ميكاغرام.هـ$^{-1}$ ،0.99% لحاصل الحبوب والكمية الممتصة من الفسفور في المجموع الخضري بالتتابع وبدون فروق معنوية مع المعاملة B_1 التي سجلت 4.69 ميكاغرام.هـ$^{-1}$ ،0.81%.

3- اظهرت التجربة الحقلية تباين في نتائج مستويات التسميد العضوي إذ تفوق المستوى O_1 في صفتي الكمية الممتصة من البوتاسيوم في المجموع الخضري واعداد بكتريا *T. thioparus* في التربة إذ سجل معدلات بلغت 1.42% ، 0.23×10^4 CFu gm^{-1} soil بالتتابع. بينما سجلت معاملة المستوى O_2 تفوق صفتي محتوى النتروجين والفسفور في التربة 55.09 ملغم N كغم تربة$^{-1}$ ،بلغ 26.20 ملغم P كغم تربة$^{-1}$ بالتتابع.

المحتويات

التسلسل	العنوان	الصفحة
1	المقدمة Introduction	1
2	مراجعة المصادر Literatures review	3
1-2	التسميد الحيوي Bio fertilization	3
1-1-2	الغاية من استخدام السماد الحيوي	4
2-1-2	مزايا استخدام السماد الحيوي	4
3-1-2	اهمية السماد الحيوي زراعياً	5
2-2	الغشاء الحيوي Biofilm	7
1-2-2	مكونات الغشاء الحيوي Biofilm components	8
2-2-2	دورة حياة الغشاء الحيوي Life cycle of biofilm	9
3-2	الغشاء الحيوي للأحياء المجهرية في (رايزوسفير) التربة Biofilm of microorganisms in the soil (rhizosphere)	13
4-2	استخدام الغشاء الحيوي في تقنية التسميد الحيوي Biofilm use in Biofertilization technique	14
5-2	بكتريا *Psudomonas* spp.	16
6-2	بكتريا *Psudomonas fluorescens*	16
7-2	دور بكتريا *P. fluorescens* في التربة والنبات	17
8-2	بكتريا *Thiobacillus* spp.	18
9-2	بكتريا *Thiobacillus thioparus*	19
10-2	دور بكتريا *T. thioparus* في التربة والنبات	19
11-2	المادة العضوية Organic matter	20
12-2	اهمية المادة العضوية للتربة	21
13-2	الحنطة Wheat	22
3	المواد وطرائق العمل Materials and methods	24
1-3	المواد Materials	24
1-1-3	الأجهزة Apparatus	24

المحتويات

2-1-3	الأوساط الزرعية والكواشف والمحاليل Culture media and reagents	25
2-3	طرائق العمل Methods	26
1-2-3	جمع عينات التربة	26
2-2-3	عزل بكتريا الزوائف *Psudomonas*	27
3-2-3	تحضير الأوساط الزرعية المستعملة في عزل وتشخيص بكتريا الزوائف الومضائية *P. fluorescens*	27
4-2-3	تحضير الكواشف والصبغات	29
5-2-3	التنقية Purification	30
6-2-3	تشخيص العزلات البكتيرية	30
1-6-2-3	الصفات الزرعية	30
2-6-2-3	الفحص المجهري المباشر	31
3-6-2-3	الأختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	31
7-2-3	التجارب المختبرية	33
8-2-3	تجميع الغشاء الحيوي البكتيري	33
9-2-3	التجربة الحقلية	34
10-2-3	الصفات المدروسة لنبات الحنطة	35
11-2-3	تحاليل التربة	36
12-2-3	التحليل الأحصائي	38
4	النتائج والمناقشة Results and discussion	39
1-4	عزل وتشخيص بكتريا *P. fluorescens*	39
1-1-4	الصفات الزرعية والمجهرية	39
2-1-4	الأختبارات الكيموحيوية	39
2-4	الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية لبكتريا *P. fluorescens* و بكتريا *T. thioparus* على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm	41

المحتويات

3-4	التجربة الحقلية	41
1-3-4	ارتفاع النبات (سم)	41
2-3-4	مساحة ورقة العلم (سم٢)	42
3-3-4	وزن 1000 حبة (غم)	43
4-3-4	حاصل الحبوب (ميكاغرام.هـ$^{-1}$)	44
5-3-4	الحاصل الحيوي (ميكاغرام.هـ$^{-1}$)	46
6-3-4	الكمية الممتصة من النتروجين في المجموع الخضري %	47
7-3-4	الكمية الممتصة من الفسفور في المجموع الخضري %	48
8-3-4	الكمية الممتصة من البوتاسيوم في المجموع الخضري %	49
9-3-4	اعداد بكتريا *P. flourescens* ($\times 10^5$ CFu gm^{-1} soil)	50
10-3-4	اعداد بكتريا *T. thioparus* ($\times 10^4$ CFu gm^{-1} soil)	51
11-3-4	محتوى النتروجين الجاهز في التربة (ملغم N كغم تربة$^{-1}$)	52
12-3-4	محتوى الفسفور الجاهز في التربة (ملغم P كغم تربة$^{-1}$)	54
13-3-4	محتوى البوتاسيوم الجاهز في التربة (ملغم K كغم تربة$^{-1}$)	56
14-3-4	محتوى الكبريت الجاهز في التربة (ملغم S كغم تربة$^{-1}$)	57

المحتويات

5	الأستنتاجات والمقترحات Conclusions and Proposals	58
1-5	الأستنتاجات Conclusions	58
2-5	المقترحات Proposals	59
6	المصادر References	60
1-6	المصادر العربية	60
2-6	المصادر الأجنبية	64
7	الملاحق Appenixes	85

الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	الأجهزة التي استعملت لإجراء التجارب التي تضمنتها الدراسة	24
2	الأوساط الزرعية التي استعملت لإجراء التجارب التي تضمنتها الدراسة	25
3	الكواشف والمحاليل التي استعملت لإجراء التجارب التي تضمنتها الدراسة	26
4	ارقام العينتين واسم المنطقة والحقل التي جمعت منه	26
5	بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية والحيوية لتربة الدراسة قبل الزراعة	38
6	الصفات الزرعية والمجهرية للعزلات البكتيرية	39
7	نتائج الأختبارات الكيميوحيوية للعزلة البكتيرية *P. flourescens*	40
8	نتائج قدرة عزلات بكتريا *P. flourescens* و *T. thioparus* لتكوين الغشاء الحيوي على نوعين من الأوساط الزرعية	41
9	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في ارتفاع النبات(سم)	42
10	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في مساحة ورقة العلم(سم٢)	43
11	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في وزن 1000 حبة(غم)	44
12	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في حاصل الحبوب(ميكاغرام.هـ$^{-1}$)	45
13	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في الحاصل الحيوي(ميكاغرام.هـ$^{-1}$)	46

الجداول

14	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في الكمية الممتصة من النتروجين في المجموع الخضري %	47
15	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في الكمية الممتصة من الفسفور في المجموع الخضري %	49
16	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في الكمية الممتصة من البوتاسيوم في المجموع الخضري %	50
17	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في اعداد بكتريا *P. flourescens* ($\times 10^5$ CFu gm^{-1} soil)	51
18	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في اعداد بكتريا *T. thioparus* ($\times 10^4$ CFu gm^{-1} soil)	52
19	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في محتوى النتروجين الجاهز في التربة(ملغم N كغم تربة$^{-1}$)	54
20	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في محتوى الفسفور الجاهز في التربة(ملغمP كغم تربة$^{-1}$)	56
21	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في محتوى البوتاسيوم الجاهز في التربة(ملغم K كغم تربة$^{-1}$)	57
22	تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في محتوى الكبريت الجاهز في التربة(ملغم S كغم تربة$^{-1}$)	58

1-المقدمة Introduction:

تمتاز التربة العراقية بصورة عامة بأنخفاض محتوى المادة العضوية وبالتالي ضعف نشاط الأحياء المجهرية فيها وارتفاع درجة تفاعل التربة بنسب عالية لوجود معادن الكاربونات ،هذه العوامل تؤدي الى قلة جاهزية العناصر المُغذية الموجودة في التربة ،أن السماد الحيوي هو احد التقنيات الحديثة المستخدمة لتقليل استعمال السماد الكيميائي بشكل مفرط ،حيث كان اتجاه العالم في الآونة الأخيرة هو استعمال عدة بدائل آمنة لتحسين صفات التربة ومحتواها من الفسفور والنتروجين (Osip وآخرون ،2000).

ان الأسمدة الحيوية Bio fertilizer تقوم بإفراز الهرمونات والمواد المشجعة للنمو (راهي والسامرائي ،2006). كما ان الأسمدة الحيوية تعمل على تمهيد طريق امتصاص العناصر المُغذية والماء الموجود في التربة من قِبل النبات وتعمل على تحسين خواص التربة عن طريق تجمع حبيباتها بسبب افراز المواد السكرية (البلخي ،1990).

من الجدير بالذكر اهمية وجود الغشاء الحيوي Biofilm الذي يتكون من بعض الأحياء المجهرية إذ يعد تكوين وانتشار الغشاء الحيوي من الأستراتيجيات المهمة لبقاء البكتريا المكونة لعناصر السماد الحيوي على قيد الحياة ،ويعمل الغشاء الحيوي حماية من عوامل الأجهاد البيئي مثل الأشعة فوق البنفسجية ،التغيرات في درجة الحموضة ،الأجهاد الأوزموزي والجفاف وذلك من خلال قدرة الغشاء الحيوي على تكوين حاجز يمنع انتشار المضادات الحياتية والمواد الدفاعية الاخرى من المضيف (Gilbert وآخرون ،1997) .

ينتشر الغشاء الحيوي على نطاق واسع ولهُ دور مهم في بيئات مختلفة منها بيئة التربة حيث يكون هنالك تباين بتواجدهُ بين تربة الرايزوسفير الغنية بإفراز الجذور والعناصر الغذائية مقارنة بالترب التي تفتقر لعنصر الفسفور والنتروجين والعناصر المغذية الاخرى والماء (Van de و Halverson ،2004).

ان التقدم الزراعي يحتاج الأستخدام الأفضل لفعالية الأحياء المجهرية واستخدامها الحيوي في التربة لتهيأة النبات ببعض العناصر المُغذية كمصدر رخيص وبديل آمن بيئياً مقارنة بالسماد الكيميائي وتكمن الصعوبة الأساسية لأمتداد هذه التقنية في تمكين اعداد واصناف مناسبة لتلك الأحياء المجهرية للعيش بصورة فعالة في تربة الرايزوسفير للنبات (Klopper وآخرون ،1989).

اما عن بكتريا *Pseudomonas* فهي احد اهم الأجناس البكتيرية التي تشجع نمو النبات و قد نالت اهتماماً واسعاً وذلك من خلال قدرتها على إذابة الفسفور وخلب الحديد وانتاجها للهرمونات النباتية ومقاومتها للأمراض النباتية (الكرطاني وآخرون ،2018).

ان التلقيح الحيوي لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* ادى الى تحسين نمو الحنطة (Frommel وآخرون ،1993). بالأضافة الى ذلك فأن بكتريا *Pseudomonas fluorescens* المعزولة من المحيط الجذري للنباتات تزيد من جاهزية العناصر المُغذية في التربة وتحفز نمو النبات (Kloepper ،1988).

ان بكتريا *Thiobacillus* لها دور مهم بأكسدة الكبريت احيائياً إذ تقوم بأكسدة الكبريت الى حامض الكبريتيك وخفض درجة تفاعل التربة وبالتالي زيادة ذوبانية وانطلاق العناصر الغذائية الأساسية في منطقة الرايزوسفير (Khan وآخرون ،2012).

يأتي الدور الأهم والضروري للمادة العضوية في التربة من خلال ناتج تحللها، إذ ان اضافة الأسمدة العضوية من المخلفات الحيوانية او النباتية تكون ذات نشاط عالٍ من التحلل مقارنة بتنافس الأحياء المجهرية في التربة، وهنا يبرز دور اضافة المادة العضوية من خلال الحفاظ على صفات التربة الكيميائية والفيزيائية وخصوبتها مما تعمل على انتاج زراعي مَثِيل وذلك عن طريق تغذية النبات بالعناصر المُغذية المحفزة للنمو (Mabuhay وآخرون ،2006).

تُعتبر الحنطة من اهم محاصيل الحبوب (Uppal وSriinivas ،2004) حيث تدخل 80% من الوجبات الغذائية اليومية لدى الشعوب إذ ان محصول الحنطة يزرع في معظم انحاء العالم تقريباً وهي من المحاصيل الأربعة المهمة المزروعة في العالم (Guthrie ،1989).

وعليه فأنه يجب تعزيز النشاط الحيوي بأستخدام تقنية التسميد الحيوي والعضوي واستخدام الغشاء الحيوي، ولهذا فأن هذه الدراسة تناولت تحقيق الأهداف بالأعتماد على :

1- دراسة تأثير اضافة الغشاء الحيوي Biofilm البكتيري في نمو وحاصل نبات الحنطة.
2- دراسة تأثير اضافة المادة العضوية في نمو وحاصل نبات الحنطة.
3- دراسة تأثير الأضافة المزدوجة للغشاء الحيوي Biofilm البكتيري والمادة العضوية في نمو وحاصل نبات الحنطة.

2- مراجعة المصادر Literatures Review:

2-1 التسميد الحيوي Bio Fertilization :

إن السماد الحيوي هو المادة المُصنعة او المُنتجة من أحياء مجهرية معينة حيث يمكن بدوره أن يُحسن خصوبة التربة ويزيد إنتاجية الحاصل ويُحسن نوع المحاصيل في الزراعة المستدامة ،كما يُعرف السماد الحيوي بأنهُ خليط أو تركيب متعدد من الأحياء المجهرية الحية ويُعزز جاهزية العناصر المُغذية وبالأخص عنصر النتروجين والفسفور وبقية العناصر المُغذية الأخرى عند تلقيح التربة أو البذور بهِ (Wu وآخرون ،2005). عَرف كل من Altomare و Lyanka (2011) ان السماد الحيوي مستحضر طبيعي يحتوي على نوع واحد أو أكثر من الكائنات الحية المجهرية النافعة الغير معدلة وراثياً والتي لا تحتوي على أي مبيد أو مواد كيميائية نشطة عندها يكون مستحضراً آمناً صحياً ولهُ أهمية في تحسين خصوبة التربة وذلك لقدرتها على تحرير العناصر المُغذية بشكل مستمر مما يجعلها آمنة إذا ما توافرت الظروف المثالية لنموها لتغطية بعض حاجة النبات المعاملة بها وبهذا فالتسميد الحيوي يسهم في تجهيز النبات ببعض حاجاته الغذائية بشكل مستمر وآمن بيئياً.

وضحَ الكثير من الباحثين إن السماد الحيوي يساهم في تجهيز العناصر المُغذية بفعل الأحياء المجهرية ومنها :

1-الأحياء المجهرية المُجهزة للفسفور :ومنها بكتريا .*Pseudomonas* spp وهي احياء مجهرية مذيبة للفسفور و تحويله الى عنصر مغذي جاهز للأمتصاص للتربة والنبات (الشمري ،2007).

2-الأحياء المجهرية المؤكسدة للكبريت :وهي مجموعة من الأحياء المجهرية (بكتريا، فطريات) تختلف فيما اذا كانت مؤكسدة لمركبات الكبريت مثل بكتريا *Aspergillus* وذاتية التغذية مثل بكتريا *Thiobacillus* (Choudhari وآخرون ،2008).

3-الأحياء المجهرية المثبتة للنتروجين :وهي الأحياء المجهرية المُثبتة للنتروجين بصورة حرة مع النباتات الغير بقولية تتألف من :

(A)بكتريا *Azotobacter* و *Azospirillum* .

(B)الطحالب الخضراء المزرقة Blue-green algae و الآزولا Azolla .

والأحياء المجهرية المثبتة للنتروجين بصورة تكافلية مع نباتات العائلة البقولية تتألف من : بكتريا العقد الجذرية *Rhizobia* ، *Bradyrhizobiu* ، *Azorhizobium* و *Sinorhizobium* (Choudhari وآخرون ،2008).

4-الأحياء المجهرية المُحتجِزة للرطوبة :وهي الأحياء المجهرية المستخدمة كأسمدة حيوية تساعد في زيادة تحمل النبات لظروف الجفاف مثل فطريات المايكورايزا الداخلية والخارجية (Choudhari وآخرون ،2008).

5-الأحياء المجهرية المُحللة لمركبات السيليلوز واللكنين :وهي عدد من (البكتريا،الفطريات) لها القدرة على تحليل مركبات السيليلوز واللكنين و منها :

(A) بكتريا *Arthrobacter* و *Cellulomonas* .

(B) فطريات *Trichoderma* و*Pleurotus* .

(C) فطريات *Trichoderma* spp. :وهي احياء مجهرية تعمل على تفكيك المادة العضوية وتحليلها إلى مكوناتها الأولية البسيطة لتنمو وتتكاثر عليها وتفيد النبات في إن واحد (Adesemoye وآخرون ،2008).

2-1-1 : الغاية من استخدام السماد الحيوي :

اشار Kumar وآخرون (2013) الى اسباب عدة جعلت من استخدام الأسمدة الحيوية أمراً مهماً ومنها:

1- الطلب على الغذاء وبالأخص محاصيل الحبوب إذ يتطلب توفير 28.8 مليون طن بينما المحاصيل الأخرى لا يتجاوز 21.6 طن إي إن هنالك ضعفاً مقداره 7.2 مليون طن وتكون الحاجة إلى توفير 321 مليون طن انذاك عام 2020.

2- ارتفاع اسعار الأسمدة المعدنية يُشكل عبئاً على المزارعين.

3- القلق المستمر بما يتعلق بالمخاطر البيئية.

4- استنزاف خصوبة التربة وذلك لأتساع فجوة المُضاف من الاسمدة المعدنية والمستهلك منها.

5- التحذير المستمر للزراعة المستدامة.

2-1-2 : مزايا استخدام السماد الحيوي :

اوضح كل من Choudhary وآخرون (2008) ان استخدام السماد الحيوي ذو مزايا عدة منها:

1- زيادة إنتاجية المحاصيل الزراعية بنسبة 20-30%.

2- اختصار استخدام الأسمدة المعدنية النتروجينية والفوسفاتية بنسبة 25%.

3- زيادة النشاط الحيوي للتربة.

4- تحفيز التربة خصوبياً.

5- حماية المحاصيل من الجفاف وبعض المسببات المرضية.

6- التقليل من تكاليف الإنتاج الزراعي .

7- السماد الحيوي يُعد صديقاً للبيئة Eco-friendly ولا يسبب حدوث تلوث للبيئة كما هو الحال مع السماد المعدني إذ ان إنتاج الأسمدة المعدنية بحاجة للكثير من الطاقة بالأخص إنتاج الأسمدة النتروجينية بعملية هابر_بوش عند تحويل النتروجين الجوي الى امونيا صناعياً وان استخدام الأسمدة النتروجينية الكيميائية ينتج انبعاث أوكسيد النيتروز NO الذي يعد من الغازات الدفيئة الرئيسة مع CH_4

و CO_2 ،لذلك فإن التسميد الحيوي يحد من انبعاث غازات الأحتباس الحراري وتطوير الزراعة المنخفضة الكاربون عن طريق الحد من استخدام السماد المعدني.

8- زيادة المساحات الزراعية الداخلة في الزراعة وإنتاجيتها ويعزى ذلك الى نجاح استخدام السماد الحيوي في الترب الملحية .

2-1-3 : اهمية السماد الحيوي زراعياً :

1- تأثير الأحياءالمجهرية لرايزوسفير التربة في نمو النبات :

اوضح Smith وآخرون (2000) أن المعاملة بالأسمدة الحيوية للتربة تؤثر بنسبة كبيرة في بزوغ البادرات في التربة الطينية أو الرملية مقارنةً بعدم المعاملة بها وذلك لسرعة معدلات امتصاص الماء للمعاملات الملقحة .

كما ذكر Tran وآخرون (2000) إن المعاملة بالأسمدة المعدنية قد يكون لها دور فعال في المرحلة الأولى من نمو النبات ومن ثم يأتي دور المعاملة بالأسمدة الحيوية في إمداد النبات بالعناصر المُغذية أي أن السماد الحيوي لهُ دور تكميلي للمعاملة بالسماد المعدني .

بدأ التسميد الحيوي على نطاق محدود في مجال زراعة المحاصيل البستنية لإنتاج غذاء صحي يخلو من التلوث وقد تمّددَ استخدامه زراعياً وذلك لقدرته في زيادة جاهزية العناصر المُغذية وقلة الحاجة إلى استخدام السماد المعدني الذي يرافقه تلوث بيئي بالأضافة الى تلوث المحاصيل بفعل تراكم النترات والنتريت كما أنه سهل الأستخدام ،آمن بيئياً وكلفة اقل (Shafeek وآخرون , 2004).

اشار Moinuddin وآخرون (2014) ان أحياء رايزوسفير التربة المجهرية سبب في العديد من التأثيرات المُفيدة منها تأثيرها في تغذية النبات وتأثيرها بإنتاج مواد منظمة للنمو ومقدرتها على إيقاف انتشار نمو المسببات المرضية للتربة و يُعد السماد الحيوي جزءاً مهماً من النظام التكميلي الغذائي الذي لابد أن يحظى أهمية المستوى الخصوبي لذلك فأنه من الضروري وجود عملية دعم وإسناد للتربة من اجل رفع قدرتها على الأنتاج عن طريق استخدام الأحياء المجهرية التي لها القدرة على تثبيت النتروجين الجوي أو إذابة الفسفور غير الذائب الموجود بالتربة .

كما ان الدراسات بينت ان التسميد الحيوي يزيد من كفاءة استخدام السماد المعدني ويقلل الكمية المغسولة منه وبالأخص النترات (Muneshwar وآخرون،2001 و Shafeek وآخرون،2014).

2- زيادة جاهزية العناصر المُغذية :

إن البكتريا *Pseudomonas fluorescens* تقوم بتزويد العائل النباتي بالعناصر المُغذية منها الحديد،المنغنيز،المغنيسيوم،الكالسيوم والبوتاسيوم إذ تعمل على انتاج مخلبيات الحديد Siderophores وبدورها تحافظ على العناصر المُغذية من الترسيب وتزيد امتصاصها بواسطة الجذور (الشمري ،2007).

بالأضافة الى أن التلقيح بالبكتريا المذيبة للفسفور ادى الى زيادة في حاصل الحنطة بالمقارنة مع المعاملة الغير مُلقحة وذلك بسبب زيادة جاهزية الفسفور وإنتاج المواد المحفزة للنمو (Yadav وآخرون ،2011).

إن عملية إذابة الفسفور هي ناتج لتأثير مشترك بين انخفاض درجة التفاعل التربة وإنتاج الأحماض العضوية (Fankem وآخرون ، 2006 ; Abd El-Gany وآخرون ،2013).

إن تراكم العناصر المُغذية لنبات الحنطة وبالأخص عنصري النتروجين والفسفور كانت نسبتهما (P%0.47 وN%5.01) عند استخدام السماد الحيوي الذي يتكون من العزلات البكتيرية *A.chroococcum* و *A.brasilense* و *P. fluorescens* مضافاً اليها 100% من الفسفور والنتروجين ما موصى بهِ لتسميد محصول الحنطة (Al-Shamma ،2013).

إن التسميد الحيوي للتربة ببكتريا *Pseudomonas* مع التسميد المعدني بنسبة 50%من االتوصية السمادية لمحصول الحنطة ادت الى نتائج غير مختلفة معنوياً عن إضافة التوصية السمادية الكاملة وأكدت ان بإمكان المزارعين التسميد بنصف التوصية السمادية للحنطة إذا ما لقحت البذور بالسماد الحيوي *Pseudomonas* (Yousefi وآخرون ،2014).

3- إفراز المواد المُشجعة للنمو :

هنالك العديد من أنواع البكتريا التي تستوطن رايزوسفير التربة لها القدرة على تحفيز النبات للنمو عندما تضاف إلى البذور،الجذور والأوراق وذلك اثناء إفرازها عدة مواد منشطة للنمو وهذه الإنواع من البكتريا تسمى البكتريا المحفزة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) والتي تشمل الأنواع الأساسية الاتية:

Bacillus , *Pseudomonas* , *Azospirillum* , *Azotobacter* , *Acetobacter* *Enterobacter* and *Herbaspirillum* (Klopper وآخرون ،1988).

وقد اكدَ Janzen وآخرون (1992) وAkbari وآخرون (2011) أن الاحياء المجهرية تساهم في تحسين النمو وزيادة الحاصل وذلك عن طريق تكوين منظمات النمو مثل الأوكسينات والجبريلينات والسايتوكاينينات واندول حامض الخليك (IAA) والفيتامينات التي تؤثر بصورة مباشرة أو غير مباشرة في زيادة إنتاج المحاصيل الزراعية وتنتج الأحياء المجهرية عدد من المواد المنشطة لنمو النبات ، وقد لوحظ ان هذه التأثيرات المنشطة بوضوح لأول مرة من قبل الأحياء المجهرية لرايزوسفير التربة في نبات الحنطة ويعزى ذلك التأثير إلى إنتاج هذه الأحياء المجهرية للأوكسين المنشط Indol Acitic Acide (IAA).

4- تحسين بعض الصفات التربة الفيزيائية و الكيميائية :

أن التسميد الحيوي له دور في خفض درجة تفاعل التربة بإنتاجه للحوامض العضوية كما يعمل على خلب الأيونات الثنائية الموجبة المسؤولة عن تثبيت الفسفور في الترب الكلسية والقاعدية (Ghosh وآخرون ،1981).

كما أشار Hass و Defago(2005) الى أن هنالك انخفاض تدريجي لقيم درجة تفاعل التربة المُسمدة حيوياً بالبكتريا المذيبة للفسفور مما شجع على زيادة الكمية المتحررة من الفسفور وزيادة جاهزيته في التربة القاعدية وان للأسمدة الحيوية تأثيراً إيجابياً في صفات التربة وذلك عِبرَ تحلل المواد العضوية وإنتاج المركبات الكاربونية ذات الشحنة السالبة التي لها دور في زيادة ثباتية تجمعات التربة.

كما ذكر Anoymous (2005) ان من مزايا استخدام السماد الحيوي زيادة امتصاص النبات للعناصر المُغذية الكبرى والصغرى وتحقيق زيادة في الحاصل وتحسين نوعية نوعيته وإمداد التربة بمواد مشجعة للنمو وتحسين خواص التربة الفيزيائية والكيميائية .

وقد وضحَ زكي وآخرون (2007) ان استخدام تقنية التسميد الحيوي ادى الى تحسن صفات التربة وحفظ اتزان العناصر المُغذية وتحويلها الى الصورة الذائبة والميسرة التي يحتاجها النبات .

2-2 الغشاء الحيوي Biofilm :

وهو عبارة عن تجمع خلايا الأحياء المجهرية ترتبط بخيوط دقيقة من بوليمرات خارج خلوية على السطوح بطريقة غير عكسية ،هذا التجمع يكون مغطى بما يشبه النسيج الغشائي الذي يتكون بشكل اساسي من سكريات متعددة Polysaccharide ويعد مادة الالتصاق الطبيعية للغشاء الحيوي (Marshall، 1976 ; Costerton، 1978).

وقد اشار Costerton وLappin-Scott (1995) ان تعريف الغشاء الحيوي بشكل دقيق هو ارتباط الخلايا مع بعضها البعض والتغطية بمادة النسيج الغشائي المتكونة من بوليمرات خارج خلوية والتي تنتج من الأحياء المجهرية نفسها متضمناً الخصائص الفسيولوجية كالتغير في معدل النمو و التعبير الجيني gene expression الذي يسيطر على تكون وتطور الغشاء الحيوي وإنتاج المكونات الضرورية للالتصاق .

وهنالك دراسات لكل من Rodney وWilliam (2002) اشارت الى ان تعريف الغشاء الحيوي هو مجموعة من الأحياء المجهرية المجاميع التي ترتبط خلاياها مع بعض بصورة غير عكسية الى السطوح البينية أو مع بعضها البعض وتُغطى بالغشاء النسيجي لبوليمرات خارج خلوية تنتجها خلايا الأحياء المجهرية نفسها والذي يحمل نمط ظاهري بالنسبة لمعدل النمو والتعبير الجيني.

تقوم البكتريا بتكوين الغشاء الحيوي وذلك بسبب :

1) ان الغشاء الحيوي يعتبر خط الدفاع للأحياء المجهرية الاول الذاتي ويزيد من بقاء وحيوية البكتريا في البيئة التي تتواجد فيها كما أن الغشاء الحيوي يقاوم القوى الفيزيائية التي تعمل على إزالة الخلايا عند إلتصاقها بصورة ضعيفة على الأسطح بالأضافة الى ذلك فأن الغشاء الحيوي يزيد من مقاومة البكتريا المنتجة له من خلال عملية تدعى البلعمة Phagocytosis من قبل البروتوزوا وخلايا الجهاز المناعي وتعيق اختراق جزيئات المواد السامة مثل المضادات الحياتية (Michael وآخرون،2015).

2) ان الغشـاء الحيوي يسـمح للبقاء في موقع بيئي وظيفي ملائم إذ إن الغشـاء الحيوي يكون احياناً في اتصـال مباشـر بالاسـطح الغنية بالعناصـر المُغذية كالأنسـجة النباتية والحيوانية وغيرها مما يسـمح للأستفادة من تلك المُغذيات (Michael وآخرون ،2015).

3) ان تكوين الغشـاء الحيوي يجعل الخلايا لبكتيرية تعيش في نظام مغلق وقريبة جداً من بعضـها مما يؤدي الى فرصة اكبر لتبادل المغذيات الضرورية والعوامل الوراثية (Michael وآخرون ،2015).

4) ان تكوين الغشـاء الحيوي هو الحل الأمثل لنمو الخلايا البكتيرية في الطبيعة المثلى (Michael وآخرون ،2015).

2-2-1 : مكونات الغشاء الحيوي Biofilm components :

ان التركيب الأسـاسـي للغشـاء الحيوي هو الماء وخلايا بكتيرية ومواد بوليمرية خارج الخلية Extracellular polymeric substance (EPS) (Sutherland ،2001).

بالأضافة الى تركيب ثانوي يشمل الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات وDNA وعدة نواتج مختلفة من التحلل والتي توثر على الخصائص العامة للغشاء الحيوي (Branda وآخرون ،2005).

تشكل المواد البوليمرية خارج الخلية(EPS) حوالي 50-90% من مجموع المادة العضـوية المكونة للغشـاء الحيوي وقد تختلف(EPS) للأغشـية الحيوية المختلفة في خواصـها الكيميائية والفيزيائية ولكنها جميعها تتكون بصورة رئيسية من السكريات المتعددة والتي تتكون اساساً من سلاسل لجزئيات طويلة جداً وزنها الجزيئي حوالي (0.5-2.0×10^6 Da) وبأمكانها الأرتباط بعدة طرق مختلفة ,بعض من هذه السـكريات تكون متعادلة الشـحنة او تكون متعددة الانيون والتعدد الانيوني يعود إلى وجود مجموعة حـامض اليوريـك مثـل D-glucuronic acid، D-galacturonic acid، Mannuronic acid وKetal-linked pyruvates ومجموع بقايا غير عضوية مثل الفوسفات ونادراً الكبريتات كما هو الحال في بكتريا سـالبة لملون كَرام (Sutherland، 1990) ويُعد التعدد الانيوني مهماً جداً في الغشـاء الحيوي لأنهُ يسمح للأيون الثنائي التكافؤ مثل الكالسيوم والمغنسيوم الأرتباط مع خيوط البولميرات وهذا الأرتباط يوفر قوة ربط في الغشاء الحيوي اثناء النمو والتطور (Flemming وآخرون ،2000).

بينمـا يكون الحـال في بعض البكتريـا موجبـة لملون كَرام مثـل بكتريـا المكورات العنقوديـة staphylococci فأن التركيب الكيميائي للمواد البوليمرية خارج الخلية يختلف تماماً وقد يتكون بالدرجة الرئيسـية من شـحنة موجبة Cationic (Hussain وآخرون ،1993) كما ان المواد البوليمرية خارج الخلية (EPS) قد تكون كارهة للماء وبعض انواع (EPS) قد يكون كارهاً او محباً للماء (Sutherland ،2001).

لقد اشار Lewandowski (2000) الى عدم تجانس الكتلة الحيوية في الغشاء الحيوي بالرغم من وجود قنوات مائية في بعض الأحيان وهذه القنوات تزيد من تدفق التركيز العناصر المُغذية الى الأجزاء الداخلية من الغشاء الحيوي والتخلص من الفضلات والمواد السامة الى الخارج .

ان الغشاء الحيوي يتميز برطوبة عالية لأحتواءه على كمية كبيرة من الماء تصل لأكثر من 97% من تكوينه (Zhang وآخرون ،1998) بالأضافة الى ذلك فأن الأواصر الألكتروستاتيكية والهيدروجينية هي قوى الربط الرئيسية المشتركة في الغشاء الحيوي (Mayer وآخرون ،1999).

هنالك خصائص مهمة للمواد البوليمرية خارج الخلية(EPS) تكون مؤثرة في الغشاء الحيوي :

اولاً: ان بناء تركيب السكريات المتعددة هو الذي يُحدد الشكل الأساسي للغشاء الحيوي (Sutherland ،2001).

ثانياً: ان الغشاء الحيوي بصورة عامة غير متجانس مكانياً وزمانياً لأن الأحياء المجهرية تنتج كميات متفاوتة من(EPS) وهي تتزايد مع تقدم عمر الغشاء الحيوي (Leriche وآخرون ،2000).

إن إنتاجية(EPS) تتأثر بشكل كبير في حالة التغذية لوسط النمو والكاربون الجاهز المهم للبناء وكذلك النتروجين والبوتاسيوم والفسفور الضروري لنمو وتطور الغشاء الحيوي ولقد وجد ان الأحياء المجهرية المكونة للغشاء الحيوي تؤثر في طبيعة التركيب وذلك لأن سمك الغشاء الحيوي يتأثر بعدد انواع الأحياء المجهرية المكونة له (James واخرون ،1995).

وضح Korber وآخرون (1994) في دراسته للغشاء الحيوي لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* بتفصيل أكبر بسبب وجود تباين في أنظمة الغشاء الحيوي النقي حيث اجرى قياس سُمك الغشاء الحيوي بعد 24 ساعة من تحضينها كان 19±42μm وكان التباين في قياسات سُمك الغشاء الحيوي نتيجة مستعمرات الأحياء المجهرية صغيرة وبعد 72 ساعة متوسط سُمك الغشاء الحيوي لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* ثابتًا،اما التباين الذي حصل بعد النمو المستمر للمستعمرات وتضخم مجاميع الخلايا البكتيرية زادت إلى 28 ± 42μm ،يتراوح قياس السُمك الفعلي المُقاس للغشاء الحيوي لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* بعد 72 ساعة من 0 الى 90μm.

2-2-2: دورة حياة الغشاء الحيوي Life cycle of biofilm:

(1) الألتصاق على الأسطح والألتصاق غير العكسي Anchoring on surfaces and non-reverse sticking :

إن الأرتكاز الأولي على الأسطح للمستعمرات البكتيرية يكون في بداية الأمر ضعيفاً إذ يسمح للمستعمرات البكتيرية ان تثبت نفسها بشكل دائم بأستخدام خاصية الألتصاق للخلية وجزيئات البروتين التي تتجمع على السطح ،ان البكتريا التي تبدأ بعملية الألتصاق تعمل على وصول البكتريا الأخرى الى السطح بواسطة توفير مواقع روابط متنوعة كذلك تبدأ ببناء مواد تمسك الغشاء الحيوي مع بعضه البعض

وجدير بالذكر ان هناك انواع غير قادرة على الأرتكاز على الأسطح الخاصة بها الا إنها تكون قادرة على تثبيت نفسها وتستطيع الأرتباط بصورة مباشرة بالمستعمرات البكتيرية القريبة منها (Sauer وآخرون ،2002).

إن الجينات التي تسمح بتطوير الغشاء الحيوي بعد وصول البكتريا الى مرحلة إدراك النصاب Quorum Sensing ويقصد بهِ الحد الأدنى لعدد المستعمرات البكتيرية ذات حجم معين ويعتبر مفتاح بدء التعبير الجيني من قبل الجينات المسيطرة على QS التي يظهر ان التصاقها يحفز تصنيع المادة البينية خارج خلوية والتي تضمن بها البكتريا التثبيت مباشرة الى السطح (Costerton وآخرون ،1999).

ولقد اشار Costerton وآخرون (1999) إنهُ عندما تنتقل الخلايا من وضعها في العوالق الى نظام تكوين مستعمرات الأحياء المجهرية فأنها تعاني من التحول في السلوك الذي يضمن تغيير في فعالية عدد من الجينات وان هنالك دليلاً على ان بعض الجينات الخاصة يجب أن يحصل لها تعبير جيني خلال مدة الألتصاق لتطوير الغشاء الحيوي .

اوضح Rosenberg و Kjelleberg (1986) ان البكتريا تمتلك خواصاً مؤثرة في مدى قدرة أرتكاز الخلية على السطح وهي الخاصية اللامائية Hydrophobicity لسطح الخلية البكتيرية وهي خاصية مهمة جداً في عملية الأدمصاص إذ أن التفاعلات المائية تميل الى الزيادة مع زيادة اللاقطبية الطبيعية في احد أو كلا السطحين (سطح الخلية البكتيرية وسطح الأرتكاز) وجود الأهداب Fimbria ،وجود الأسواط Flagella وإنتاج EPS وجميعها مؤثرة في معدل ومدى أرتكاز الخلية على السطح ومعظم الخلايا البكتيرية تكون سالبة الشحنة مع ذلك يحتوي السطح بعض المكونات المائية .

اكد كل من Bullitt وMakowski (1995) على دور الأهداب المهم في عملية الألتصاق ، فالأهداب Fimbria بالرغم ان البعض منها يشترك في عملية نقل المواد الوراثية والفايروسات فأن معظم هذه الخمائل Pili تحتوي نسبة عالية من بقايا الأحماض الأمينية اللامائية لذلك فأنها تلعب دوراً اساسياً في الخاصية اللامائية لسطح الخلية وبالتالي تؤثر على عملية الأرتباط (Rosenberg وKjelleberg ،1986) وذلك بسبب قابليتها على التغلب على حاجز التنافر الكهربائي الأولي بين سطح الخلية وسطح الالتصاق (Corpe ،1980) ،اما وجود الأسواط يلعب دوراً اساسياً في المراحل الأولى من ارتباط البكتريا من خلال قدرتها على التغلب على قوة التنافر بين سطوح الألتصاق وسطح الأرتكاز للمستعمرات البكتيرية (Klausen وآخرون ،2003) وقد أكد كل من Bashan وLevanony (1988) ان للبروتين الموجود على سطح الخلية البكتيرية دوراً مهماً في عملية الألتصاق إذ انهُ عند معاملة الخلايا الملتصقة بالسطح بالأنزيمات المحللة للبروتينات سوف يكون هنالك تحرر بكتريا من سطح الألتصاق وهذا يوفر دليل على دور البروتينات في عملية الألتصاق .

يعمل O-antigene وهو احد اجزاء طبقة Lipopolysaccharide (LPS) في البكتريا السالبة لملون كَرام على تقليل التصاق الخلايا من خلال منحه خاصية السطوح المحبة للماء للبكتريا السالبة لملون كَرام ،وقد أكد كل من williams وFletcher (1996) ان بكتريا *P.fluorescens* المطفرة والفاقدة ل O-antigene تلتصق بأعداد كبيرة مقارنة سطح المواد المائية .

وجد Beech وGaylarde (1989) أن Lectins يُثبط لكنهُ لا يمنع عملية الألتصاق حيث يملك صفة تفضيلية للأرتباط مع السكريات المتعددة في سطح الخلية أو إلى EPS ،وان ارتباط Lectins مع الخلية يقلل من الأرتباط وبالتالي يؤثر على ارتباط الخلية اذا كانت السكريات المتعددة تشترك في عملية الأرتباط (Rodney وWhipps، 2002).

إن المواد البوليمرية لسطح الخلية والأجزاء غير القطبية مثل الأهداب والأسواط والبروتينات والمركبات الموجودة في البكتريا الموجبة لملون كَرام (Mycolic acid) تسيطر على الأرتباط مع المواد اللامائية بينما EPS وLipopolysaccharides اكثر اهمية للأرتباط مع المواد المحبة للماء ، بشكل عام يحدث الألتصاق بصورة اسرع على السطوح الخشنة أو المواد الكارهة للماء وان الزيادة في سرعة التدفق وحرارة الماء وتركيز العناصر الغذائية يؤدي إلى زيادة الأرتباط اذا كانت ضمن المستوى الحرج (Rodney، 2002).

(2) النمو والنضج Growth and maturity :

ويعتبر نمو ونضج الغشاء الحيوي هي المرحلة التي يبدأ الغشاء الحيوي فيها بإنتاج مواد بوليمرية خارج الخلية (EPS) وترتبط الخلايا بشكل غير عكسي الى الأسطح وبذلك يتم انتاج كمية اضافية من(EPS) ويرافق ذلك التكاثر والأختلاف المظهري لإنتاج غشاء حيوي مختلف بالنضج سُمكاً وتركيباً إذ ان الغشاء الحيوي الناضج غالباً ما يحتوي قنوات تُساهم في نقل العناصر المُغذية والماء (Stoodlely وآخرون ، 1997 ; Stoodlely وآخرون ،2002).

وقد أشار Stoodlely وآخرون (1997) ان الخلايا التي تكون ذات مواقع مختلفة من الغشاء الحيوي تظهر عدة انماط للتعبير الجيني لأن الغشاء الحيوي احياناً يقوم بتطوير الأيض الخاص بهِ وهو في بعض الأحيان يقارن في سلوكه بنسيج الكائنات الراقية والتي فيها الخلايا الكثيفة بشكل ثابت تعمل معاً وتكون شبكة يمكن للمواد المختلفة ان تسير من خلالها كما ان هنالك عوامل تقوم بتطوير الغشاء الحيوي منها البيئة ،درجة حرارة النظام والتي تختلف بأختلاف الموسم وطول اليوم ،المناخ ،سرعة الرياح ،جاهزية العناصر المُغذية ،خشونة السطح ،الصفات الكهروكيميائية ،درجة التفاعل (PH المتعادل هو المثالي لنمو اغلب البكتريا المكونة للغشاء الحيوي) وتوفيرمواقع اضافية مهمة لعملية الألتصاق عن طريق وجود مواد جزيئية محصورة في الغشاء الحيوي.

(3) الحركة Motility :

عند استخدام سلالة متحركة واخرى غير متحركة من بكتريا الزوائف الومضائية *Pseudomonas fluorescens* فأن الخلايا المتحركة ترتبط مع بعضها بأعداد كبيرة فضلاً عن الأرتباط الذي يحدث عكس اتجاه الجريان ويكون اسرع من السلالة غير المتحركة إذ أن السلالات غير المتحركة لا تستطيع الألتصاق تاركة مساحة فارغة على أسطح الألتصاق مما يؤدي إلى حدوث تأخير في تكوين الغشاء الحيوي (Korber وآخرون ،1989).

وضح (Klausen وآخرون ،2003) اهمية الحركة بواسطة الاسواط من خلال عمليتي العج والسباحة (swimming وswarming) إذ تمثل السباحة swimming حركة الخلايا الحرة في الوسط السائل بينما تشير عملية العج swarming الى تراكم مجاميع الأحياء المجهرية على السطوح الصلبة الرطبة ،كلتا العمليتين ضروريتان في مراحل تكوين الغشاء الحيوي للبحث عن موطن تستقر فيه والأرتكاز على الأسطح وبناء هيكلية الغشاء الحيوي والتحرر من الغشاء الحيوي .

وقد اشارت الدراسات Kirov وآخرون (2005) الى ان البكتريا التي تكون الغشاء الحيوي يمكنها التحرك بعدة طرق مما يتيح لها سهولة استعمار الأنسجة المختلفة فقد يتحرك الغشاء الحيوي بشكل تجمعات من خلال التموج Rippling ،الأنطواء Introversion على الأسطح ،من خلال الأنفصال Detachment او من خلال العج والسباحة swarming and swimming إذ ان المستعمرات البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي ترغب لتكوين جدار خارجي للخلايا البكتيرية الثابتة بينما تكون في حالة شبه سائلة للمنطقة الداخلية من الغشاء الحيوي مما يسمح للخلايا العالقة من خلال السباحة ان تكون خارج الغشاء الحيوي تاركةً خلفها تلاً أجوف hollow mound .

(4) الأنفصال والتبعثر Detachment and scattering :

وجدَ كل من McEldowney و Fletcher (1988) من خلال دراسة العديد من العوامل التي تؤثر في انفصال الغشاء الحيوي وهي درجة التفاعل pH ،درجة الحرارة ،وجود جزيئات المواد العضوية ،الأدمصاص الى سطوح الأرتكاز والذوبان في الطور السائل .

ان الأنفصال الذي يحدث في الأغشية الحيوية يمكن وضعه في ثلاث مراحل هي التأكل Erosions ،الأنسلاخ Sloughing ،الكشط Abrasion والأنفصال Detachment وهي عملية نقل بينية تشترك بنقل الخلايا والمكونات الآخرى للغشاء الحيوي الى الكتلة السائلة المتحركة منه ،وان انفصال خلايا الأحياء المجهرية وما يتصل بها من مواد الغشاء الحيوي تحدث في المراحل الأولى من الأرتكاز (Characklis وآخرون ،1990).

الأنفصال/ التبعثر هي عملية انفصال روتيني وهي عملية مهمة في تطبيق الغشاء الحيوي (Raad وآخرون ،1992).

3-2 الغشاء الحيوي للأحياء المجهرية في (رايزوسفير) التربة Biofilm of microorganisms in the soil (rhizosphere) :

ان حركة البكتريا متأثرة بصفتين هما المحتوى المائي في التربة وحجم دقائق التربة وهي صفات التربة (Bashan، 1986).

كما ان بكتريا *P. fluorescens* التي تمتاز بالأنجذاب الكيميائي الذي يُعد عاملاً مهماً في استعمار الجذور وان دور البيئة والتغذية دور مهم في تكوين الغشاء الحيوي على اسطح الجذور مع تباين حالة العناصر المُغذية التي تأتي لاحقاً من السطح نفسه وهذا يفسر دور الأنجذاب الكيميائي المعنوي في ارتباط البكتريا مع الجذور وليس في تكوين الغشاء الحيوي على الأسطح غير الحية (Vande Broek وآخرون، 1998).

وضـحَ Lugtenberg وآخرون (1999) ان منطقة (رايزوسـفير) التربة هي المنطقة التي تعد الأهم من ناحية تجمعات احياء التربة المجهرية لأحتوائها على كميات وفيرة من العناصـــر المُغذية التي تتحرر بواســطة النبات ســواء كانت افرازات جذور او موت وتحليل خلايا القشــرة خلال نمو النبات ، تتكون الأفرازات تختلف من نبات الى لآخر وتختلف بأختلاف عمر النبات ، لكن بشكل عام تتكون هذه الأفرازات من السـكريات والأحماض العضــوية والأمينية يمكن أن تكون بمثابة طاقة ومصــدر للكاربون والنتروجين للأحياء المجهرية إذ كشفت دراسات الأحياء المجهرية لمنطقة (رايزوسفير) التربة ان البكتريا توجد بصورة عامة على هيئة مسـتعمرات دقيقة او تجمعات على أسـطح الجذور وهذه المسـتعمرات تكون غير مكتملة وغير منتظمة التوزيع .

ان الغشاء الحيوي المتكون على الجذور تتراوح ما بين اغشية صغيرة متعددة الخلايا الى اغشية شبكية واسـعة فقد وجد ان بكتريا الزوائف المُعززة لنمو النباتات ترتكز على أسـطح الجذور بشـكل متقطع وبعدها يتطور غشاء حيوي صغير على طول شقوق البشرة (Bloemberg وآخرون، 2000).

وقد اظهرت السـلالة CHAO المطفرة من بكتريا *P.fluorscenes* عالية المخاطية ان لها اسـتعداداً صارماً على استعمار جذور نبات الجزر (Bianciotto وآخرون، 2001).

بالأضـافة لذلك فأن قدرة بكتريا الزوائف الكريهة *P. Putida* إلى الاستجابة السريعة الى افراز الجذور والأقتراب من مواقع التجمع في الجذور وتكوين غشـــاء حيوي مســـتقر (Espinosa-Urgel وآخرون، 2002).

وجدَ Hinsa وآخرون(2003) ان LapA Large adhesion proteins وهو بروتين سطح الخلية التابع لبكتريا *P.fluorscenes* وزنه الجزيئي 900KDA يلعب دوراً مهماً في التصاق البكتريا على أسطح الزجاج والرمل واللدائن وقد اقترحوا ان هذا البروتين هو العامل الأساس للألتصاق .

بينَ Seneviratne وآخرون (2007) ان التربة تحتوي على ثلاثة أنواع رئيسة من الأغشية الحيوية للأحياء المجهرية وهي :

1- الأغشية الحيوية البكتيرية :وهي الأغشية التي تتكون او تنتج عن طريق البكتريا الموجودة في التربة بما في ذلك *Actinomycetes* وهذه تتكون على دقائق التربة وبعض الأسطح الحية للأنسجة النباتية.

2- الأغشية الحيوية الفطرية :وهي الأغشية التي تتكون او تنتج عن طريق بعض الفطريات الموجودة في التربة وهذه تتكون على دقائق التربة .

3- الأغشية الحيوية البكتيرية_الفطرية :وهي الأغشية التي تعتمد على سلوك الفطريات لأن الفطريات هنا تسلك اتجاه السطح الحيوي Biotic surface حيث تنمو عليه البكتريا بمعنى آخر ان البكتريا والفطريات كلاهما يعمل كسطوح حيوية لعملية الألتصاق.

2-4 استخدام الغشاء الحيوي في تقنية التسميد الحيوي Biofilm use in Biofertilization technique:

عند اضافة اللقاح الحيوي بصيغة (بكتريا-بكتريا) الى وسط نمو النبات فأن تلك الاحياء تعمل على تكون غشاء حيوي على النظام الجذري للنبات وتظهر هذه الاغشية تأثيراً ايجابياً في نمو وحاصل النبات ، فعند متابعة تأثير التلقيح بالسماد الحيوي فطر -بكتريا FRB على التثبيت الحيوي للنتروجين وجد حصول زيادة معنوية في فعالية انزيم النتروجنيز nitrogenase وتراكم النتروجين بالمقارنة مع استعمال بكتريا الريزوبيا بصورة مفردة(jayasinghearachchi و2004a,seneviratne).

فقد حصل عند استعمال لقاح الغشاء الحيوي المتطور للفطر والريزوبيا انه ساهم في تسجيل زيادة معنوية في النتروجين المثبت حيويا في فول الصويا بنسبة 30% بالمقارنة مع استعمال الريزوبيا بصورة منفردة (jayasinghearachchi و2004b,seneviratne) . كما اكدت دراسات حديثة مساهمة لقاح الغشاء الحيوي المتطور في زيادة تحرير الاحماض العضوية والمواد المنشطة لنمو النبات (PGPR) مما ادى إلى زيادة في الوزن الجاف لنبات الرز في نهاية الموسم لتصل الى (25%) بالمقارنة مع استعمال اللقاح بصورة منفردة (Seneviratnee و2006,Indrasena) , كما اشار(Roesti واخرون,2006) إلى حصول زيادة في محتوى البروتين في حبوب القمح وهذا يعود إلى الدور الايجابي للقاح المزدوج المتكون منPGPR وفطر Arbuscylar mucorrhizal.

اشار Bashan(1998) إلى حدوث تفاعلات تازرية عند استعمال لقاح مزدوج محتوي على الفطر Arbuscular-mycorrhizal وبكتريا diazototrophic ونتج عن هذا التأزر حصول زيادة معنوية في النمو وكذلك زيادة في محتوى الفسفور وتعزيز اصابة بالمايكورايزا للجذور وتحسين امتصاص المواد الغذائية مثل النتروجين والفسفور االزنك والنحاس والحديد.هذه اللقاحات تحفز نمو النباتات من خلال مجموعة من

الاليات التي تحسـن الحالة التغذوية للنبات وتثبيط المسببات المرضية(Biró واخرون,2000; Toljanderواخرون,2006 Artursson;2006,واخرون) .

لقد وجد أن اضافة الغشاء الحيوي الفطري – الريزوبيا FRB مباشرة إلى التربة يزيد من جاهزية النتروجين والفسفور بنسبة ضعفين و 15ضعف على التوالي مع زيادة فعالية لأنزيمNitrogenase على الرغم من التراكيز العالية للنترات في التربة مقارنة مع اللقاحات البكتيرية المنفردة (seneviratne و 2005,jayasinghearachi) . واظهر التلقيح بالغشاء الحيوي زيادة قدرها اربعة اضعاف في انتاج H^+ المفرز إلى الوسط الزراعي مقارنه مع اللقاح المفرد ووجدت علاقة سلبية بين درجة التفاعل في كلا النوعين والوزن الجاف و$NH4^+$ التربة , وهذه يعني أن أستعمال الغشاء الحيوي ادى إلى استعمار منطقه الرايزوسفير وزيادة انتاج IAAS مما ادى إلى زيادة حموضة التربة (senerivatne واخرون,2008A) , زيادة الحموضة في المواقع الدقيقة القريبة من الشعيرات الجذرية يؤدي إلى زيادة جاهزية$NH4^+$ في محلول التربة مما يساعد في زيادة نمو النبات (Xu واخرون ,1997) ,وهذا لا يمكن تحقيقه من استعمال اللقاح التقليدي او حتى المزارع البكتيرية المختلطة الا أن استعمال الغشاء الحيوي كلقاح يحقق هذا الهدف (Seneviratne و2006, Inderasene).كما يساهم استعمال لقاح الغشاء الحيوي في الاذابة الحيوية لصخر الفوسفات ,وقد ثبتت من خلال تطوير الغشاء الحيوي المتكون من (*Pleurotus ostreatus* و *Xanthoparmelia mexicana*و*Penicillium ssp*) lichen fungus انها زادت من الفسفور الذائب بنسبة اعلى من 230% مقارنة مع اللقاح الفطري فقط (Seneviratne وIndrasena,2006;Jayasinghearachchi و2006,seneviratne) .

تظهر مشكلة رئسية عند استعمال تقنية التلقيح التقليدية من المزارع البكتيرية هي بقاء اعداد قليلة من الاحياء المجهرية في التربة نتيجة للإجهادات البيئية المختلفة ومن هنا فقد وجد أن للغشاء الحيوي لبكتريا الريزوبيا دورا مهما في بقائها عند تراكيز ملحية تصل إلى 400µm NaCl وتراكيز من 0.4 µm tannic (acid) tannin الى 10^5-12اضعاف على التتابع مقارنة مع استعمال لقاح الريزوبيا بصورة مفردة (seneviratne واخرون,2007) إذ انها تصبح اكثر تحملا من الزروع المفردة لانخفاض درجة التفاعل والافتراس من قبل ديدان الارض ولذلك لوحظ أيضا الاستفادة من تكوين المستعمرات الدقيقة وإنتاج السموم وهي من الاليات الفعالة التي تسمح لبكتريا الاغشية الحيوية مثل *Pseudomonas aeruginosa* في مقاومة افتراس الابتدائيات لها وهكذا يستطيع الاستمرار في البيئة(Matz واخرون,2004) .كما اشار Burmolle واخرون(2006) إلى حدوث تفاعلات تأزريه تحدث بين الاغشية الحيوية المتعدد الانواع مما يودي إلى تعزيز تشكيل الغشاء الحيوي وزيادة المقاومة للمضادات الحياتية إذ أن البكتريا تكون محمية من هذه العوامل من خلال تشكل persister –cell وهي حالة حماية عالية تعتمد على جزء صغير من الخلايا الخارجية من الاغشية الحيوية (Roberts وstewart,2005) .

5-2 بكتريا *Psudomonas* spp :

صنف Migula (1900) هذه البكتيريا الى :

Domain: Bacteria
Division: Proteobateria
Class: Gama Proteobacteria
Order: Psedomonadales
Family: Pseudomonadacae

جنس *Pseudomonas* spp. يُعد من المستعمرات البكتيرية المهمة للبكتريا الهوائية ، إذ تم وصفها بأنها خلايا عصوية الشكل تتحرك عن طريق سوط قطبي Polar flagella او اسواط ، وهي بكتريا سالبة لملون كرام ولا تكون الأبواغ وهي غير مخمرة للسكريات وتستفاد من الأوكسجين الجزيئي كأكسدة نهائية بعضها يستعمل عملية عكس النترجة denitrifecation كأحد الخيارات ميكانيكية التنفس اللاهوائي ، وهي اختيارية التغذية إذ تعتمد ايون الهيدروجين مصدراً للطاقة.

جنس بكتريا *Pseudomonas* عصوية الشكل ابعادها (0.5–1 × 1.5 – 5 µm) غير محاطة بمحفظة ،لا تكون سبورات ،غير مخمرة لسكر اللاكتوز ،تتحرك بواسطة سوط قطبي واحد او اكثر ،هوائية اجبارية وتستخدم الأوكسجين مستقبلاً نهائياً للإلكترونات في السلسلة التنفسية والعديد من انواع هذا الجنس لايمكنها النمو في الظروف الحامضية 4.5 pH ،موجبة لأختبار الكتاليز catalase وسالبة او موجبة تجاه الأوكسديز oxidase (John وآخرون ، 1994).

يحتوي هذا الجنس البكتيري على اكثر من 140 نوعاً معظمها رمية المعيشة Saprophytes واكثر من 25 نوعاً لا يوجد لها علاقة بالإنسان (Iglewski ،1997).

ان المدى الحراري لنمو *Pseudomonas* spp يكون بين (4–40 م°) يتوقف النمو عند درجة حرارة(43 °م) اما رقم الحموضة او pH المثالي لنموها فيقع بين(7.4–7.6) (الكرخي ،2001).

6-2 بكتريا *Psudomonas fluorescens* :

قام Flugg (1886) بعزل بكتريا *P.fluorescens* وهي بكتريا عصوية الشكل ذات ابعاد (0.7–0.8 x 2.8 - 3.2 µm) خلال الطور اللوغارتمي ،توجد منفردة او مزدوجة وهي متحركة بواسطة اسواط قطبية Polar multitrichous ،تنتج هذه البكتريا صبغة ومضائية خضراء مصفرة منتشرة في الوسط تسمى Fluorescens ،ذات مستعمرات مخاطية عند نموها على الأوساط الحاوية على السكروز بنسبة (2–4 %) لأنتاجها الليفان Leavan من السكروز ،وهي هوائية اجبارية ماعدا بعض السلالات القادرة على القيام بعملية عكس النترجة Denitrification إذ يمكنها النمو لا هوائياً بوجود النترات ،بعض السلالات يمكنها استخدام (60–80) مصدراً كاربونياً مختلفاً كذلك لها القابلية على إنتاج انواع متعددة

من المضادات الحيوية التي تعد الآلية الرئيسية المستعملة في تثبيط مسببات امراض التربة (Fravel ،1988).

درجة الحرارة المثالية لنموها (20 - 30 مْ) ،واغلب السلالات تنمو في(4 مْ) ولا تنمو في(41 مْ) (Buchanan وGibbons ، 1974).

تمتاز بكتريا *P.fluorescens* بقدرتها التأكسدية العالية والتي تساعد على تكسير الملوثات البيئية المختلفة وتجهيز بعض الأنزيمات المفيدة (Exporters India ،2012).

7-2 دور بكتريا *P. fluorescens* في التربة والنبات :

بينت بعض الدراسات Weger (1987) وKlopper وآخرون (1988) ان بكتريا *fluorescens Pseudomonas* التي توجد في المحيط الجذري للنبات (الرايزوسفير) هي من افضل انواع البكتريا التي تحفز النبات للنمو إذ انها تزيد من جاهزية العناصر المُغذية في التربة .

ان الموطن الطبيعي لبكتريا *P.fluorescens* هو التربة وعلى الأغلب ان تخصصها الدقيق يكمن بالمواد العضوية تحديداً في منطقة (ريزوسفير)التربة ،بالأضافة لذلك قدرتها على استغلال الجذور الناضحة في التغذية ومن ثم تواجدها على سطوح الجذور مباشرة Rhizosplane (Rovira و Sands،1971).

تمتلك بكتريا *P.fluorescens* القدرة على تحفيز النبات على انتاج وتنظيم افراز منظمات النمو مثل Auxin ، Gibberellin و Cytokinin والتي لها دور كبير في تعجيل نمو النباتات المُعاملة بها (Amara وآخرون ، 1996).

بكتريا الزوائف الومضائية او المتألقة موجودة في اماكن عديدة وفضلاً عن تواجدها بالتربة الزراعية لكونها تمتلك صفات تؤهلها لتكون بكتريا محفزة لنمو النبات PGPR وهذا يشمل اغلب جنس الزوائف *Pseudomonas* ولكن السلالات الومضائية او المتألقة أكثر فعالية لذلك كان اتجاه الكثير من الباحثين في كافة انحاء العالم للخوض في مجال البحث عن السلالات العائدة لهذا النوع لتكون اكثر فعالية في الحفاظ على صحة التربة ذات أيض متنوع (Lugtenberg و Dekkers 1999 و Lata وTilak 2002).

وجود الزوائف الومضائية في التسميد الحيوي تؤدي دوراً فاعلاً في تحفيز النمو والصفات الإنتاجية لنبات الحمص (Rokhzadi وآخرون ،2008).

بَيّن جديع وآخرون (2009) إن كفاءة استعمال بكتريا *Pseudomonas flourescens* في التسميد الحيوي أدت إلى زيادة إنبات البذور بنسبة 13.0 و12.9% لموسمين متتالين لمحصول الحنطة صنف مكسيباك وزيادة الحاصل بنسبة 36.7% (4120 كغم.هـ $^{-1}$) عند معاملة البذور بالمستحضر الجاف

ومن ثم تلتها معاملة البذور والتربة باللقاح البكتيري إذ بلغت الزيادة نسبة 34.2% (4047.6 كغم .هـ$^{-1}$) و 33.8%(4015.0 كغم .هـ$^{-1}$) عن معاملة المقارنة .

وقد أشار Rosas وآخرون (2009) الى إن بكتريا *Pseudomonas* spp يمكن خلطها مع كل السلالات البكتيرية لتكوين سماد حيوي يُحسن من نمو وإنتاج نبات الحنطة.

8-2 بكتريا *Thiobacillus* spp :

تمتاز خلايا بكتريا *Thiobacillus* صغيرة الحجم ،سالبة لصبغة كَرام ،اسطوانية الشكل ،غير متحركة او متحركة بواسطة سوط قطبي مفرد ،تقوم بأكسدة الكبريت وتنتج حامض الكبريت (Khan وآخرون ،2012).

تحصل هذه البكتريا على الطاقة من خلال اكسدة مركبات الكبريت الغير تامة الأكسدة بالأخص من عنصر الكبريت والثايوكبريتات وفي بعض الحالات من السلفايد والسلفايت والثايونات المتعددة حيث ان الناتج الأولي من الأكسدة هو الكبريتات وبعض الأحيان يكون الناتج كبريتاً ،تنمو البكتريا تحت ظروف حامضية او قلوية تأخذ الكاربون من CO_2 او البيكاربونات في المحلول ،بعضها ذاتية التغذية الأجبارية وبعضها ذاتية التغذية الأختيارية وتوجد في التربة ومخلفات مياه المناجم ومياه المجاري.

وضح Vidyalakshmi وآخرون (2009) ان البكتريا المؤكسدة للكبريت ذاتية التغذية الكيميائية لها دور مهم واساسي في عملية اكسدة الكبريت الأحيائية التي تقوم بأنتاج حامض الكبريتيك وخفض درجة تفاعل التربة ومن ثم زيادة ذوبانية وانطلاق العناصر المُغذية في منطقة (رايزوسفير) التربة كما تفضل العيش في بيئة حامضية وتستخدم مركبات الكبريت غير عضوية للحصول على مصدر الطاقة وميكانيكية الأكسدة للصور المختزلة للكبريت تتبع المسار التالي :

$$S^{-2} \rightarrow S^{0} \rightarrow SO_3^{-2} \rightarrow SO_4^{2}$$

ان من اكثر الأنواع البكتيرية اهمية في انتاج الحوامض غير العضوية هي البكتريا المؤكسدة للكبريت من جنس *Thiobacillus* ،كما ان بكتريا *T.dentrificans* لاهوائية اختيارية تستخدم النترات كمصدر نهائي للألكترونات بديل الأوكسجين وبالتالي تختلف عن الأنواع الأخرى التابعة للجنس ،ان بكتريا *T.novellus* تكون قادرة على استهلاك المركبات العضوية وبالتالي تختلف عن الأنواع الأخرى التي تكون ذاتية التغذية اجبارياً (Alexander ،1977).

تختلف مواقع عزل البكتريا المؤكسدة للكبريت قد تُعزل من مياه المجاري ،منطقة (رايزوسفير) التربة ،اماكن تحتوي على ترسبات الكبريت ،مواقع الآبار النفطية وترب المناجم بالأضافة لذلك فأنها تقوم بخفض pH التربة لوسط ستاركي (الكبريت) و وسط الثايوكبريتات من 8 الى 4.5 و4 للوسطين على التوالي في نهاية مدة الحضن البالغة 15 يوم (Vidyalaksmi وآخرون،2007). ان البكتريا المؤكسدة للكبريت قد تُعزل من مخلفات مصانع السليلوز الحاوية على مركبات الكبريت ومياه فضلات معامل انتاج المطاط ومناطق مكونة الحماة الهوائية في معامل معالجة النفايات (Emky وآخرون ،2010) وقد تم استخدامها

حول العالم لأزالة كل مركبات الكبريت العضوية واللاعضوية السامة من مياه الفضلات مثل كبريتيد الهيدروجين (H_2S) وال Methyl Mercapthane(MM) و Dimethyl sulphide(DMS) و Dimethyl disulphide(DMDS) اذ تقوم بأكسدة هذه المركبات وتقليل أثرها السمي (Kantachote و Innuwat، 2004).

كما بينَ كل من Nguyen وآخرون (2015) ان هذه البكتريا تعمل على خفض محتوى التربة من العناصر الثقيلة وإزالتها مثل عنصر (Zn، Ni، Cu، Cr وAs) إذ تقوم بكتريا *T.ferrooxidans* خلال عملية الاكسدة بخفض pH التربة وتحويل الحديدوز (Fe^{+2}) الى حديديك (Fe^{+3}) وتعمل على إزالة ايونات Cu وPb.

9-2 بكتريا *Thiobacillus Thioparus*:

تم عزل وتشخيص الانواع التابعة للجنس *Thiobacillus* بأستخدام وسط الثايوكبريتات ووسط ستاركي (الكبريت) السائلة او الصلبة وكانت صفات جنس بكتريا *Thiobacillus Thioparus* بأستخدام وسط الثايوكبريتات السائل ذات نمو حلقي من الخلايا البكتيرية والكبريت الحرويصبح الوسط ذا عكورة وتنخفض درجة تفاعل الوسط الى 4.5 ،اما بأستخدام وسط الثايوكبريتات الصلب فتكون المستعمرات البكتيرية صغيرة قطرها(1–2)ملم دائرية صفراء مبيضة بسبب ترسب الكبريت ويتحول لونها الى البني في المستعمرات القديمة (Breed وآخرون ،1957).

10-2 دور بكتريا *T. Thioparus* في التربة والنبات:

وَضح النعيمي (1987) وقاسم وعلي (1989) زيادة جاهزية الفسفور المُغذي عند اضافة الكبريت تحت الظروف الهوائية الى حصول عملية الأكسدة الحيوية للكبريت ويتكون حامض الكبريتيك من خلال البكتريا ذاتية التغذية الكيمياوية Chemoautotrophs التابعة للجنس *Thiobacillus* ،كذلك يتكون حامض الكاربونيك في التربة الناتج من تفاعل الماء مع غاز CO_2 المتحرر من تحلل المادة العضوية بفعل الأحياء المجهرية او عن طريق تنفس الجذور وان حامض الكبريتيك المتكون خلال عملية الاكسدة يساهم في خفض pH التربة وبالتالي زيادة جاهزية الفسفور المُغذي من مركبات المعادن الفوسفاتية.

وقد وجد Besharati وآخرون (2007) عند معاملته لتربة كلسية فقيرة بعنصر الفسفور مأخوذة من عمق 0–30 سم واضيف لها صخر فوسفاتي بكمية 3.5 كغم. $هـ^{-1}$ وثلاثة مستويات من الكبريت 10و15و20 % ومن ثم لقحت ببكتريا *Thiobacillus* واستعمل نبات الذرة الصفراء بدليل ان هناك انخفاض PH التربة الى 7.6 عند المعاملة (كبريت20% + بكتريا + صخر فوسفاتي) قياساً بالمقارنة 7.8 نتيجة لحصول عملية الأكسدة الأحيائية وإنتاج حامض الكبريتيك .

وقد بينَ Salim وآخرون (2010) ان اضافة الكبريت الزراعي بكمية 1000 كغمS هـ$^{-1}$ الى تربة مزيجية غرينية مزروعة بنبات الحنطة ومُعاملة بالصخر الفوسفاتي بمستوى 160 كغم هـ$^{-1}$ والمادة العضوية 1000 كغم هـ$^{-1}$ والمُلقحة ببكتريا *Thiobacillus* أدت الى زيادة في الحاصل الى 2677 كغم. هـ$^{-1}$ قياساً بمعاملة المقارنة التي اعطت 1944 كغم هـ$^{-1}$.

11-2 المادة العضوية Organic matter:

تعد المادة العضوية مزيج من مركبات معقدة في مراحل مختلفة من التحلل (Barker وPilbeam ، 2007). بّين كل من Gregory (2006) وعمران (2005) ان المادة العضوية عبارة عن مواد نباتية وحيوانية مختلفة بمراحل التحلل ،إذ تعتبر جذور النباتات الحية والأحياء المجهرية جزءاً من مادة التربة العضوية ،من هنا تبين أن مصادر المادة العضوية تختلف من نباتية من جذور النباتات والأوراق المتساقطة على سطح التربة التي تمُّر بمراحل التحلل الحيوي بفعل الأحياء المجهرية ومصادر حيوانية تأتي نتيجة فعاليات أحياء وحيوانات التربة وخلاياها وأنسجتها بعد موتها.

يختلف محتوى المادة العضوية من تربة الى اخرى اعتماداً على الأستغلال الزراعي والظروف المحيطة بها ،إذ إنَّ محتوى المادة العضوية يكون أقل من 0.1% في التربة الصحراوية و100% في التربة العضوية (Gadd ،2007).

وضحَ Havlin وآخرون (2005) أن المادة العضوية تختلف وفقاً لتركيبها الكيميائي هي عبارة عن مركبات عضوية تشمل الكاربوهيدرات (تضم السكريات الأحادية والثنائية والثلاثية والمتعددة مثل السيليلوز والهيميسيليلوز والبكتين والأصماغ واللكنين والأحماض العضوية وأملاحها والدهون والزيوت) والبروتينات والبيتيدات المتعددة والأحماض الأمينية والبيورينات والأحماض النووية تدخل المادة العضوية ضمن الطور الصلب للتربة الذي يشكل نصفاً الى ثلث حجم التربة تُعد المادة العضوية إحدى أهم المكونات الطبيعية التي عرف الأنسان أهميتها ولم تعرف آلية تأثيرها في التربة وخصوبتها إلا في العقود الأخيرة بعد تطور العديد من العلوم (الكيمياء والمايكروبايولوجيا وكيمياء التربة وتغذية النبات...الخ) التي ساهمت في معرفة كثير من خصائص المادة العضوية وتركيبها وتحولاتها ضمن التربة تحت تأثير نشاط الكائنات الحية المجهرية (بوعيسى وغياث ،2005).

أن نسبة المادة العضوية تتباين من أفق إلى آخر ضمن مقد التربة الواحدة ويعود سبب هذا التباين الى مشاركة عوامل كثيرة تساهم في تحديد هذه النسبة ،إذ تتعلق بعض هذه العوامل بالظروف الجوية وخاصة درجات الحرارة وكمية الأمطار فتزداد نسبة المادة العضوية للتربة بزيادة كمية الأمطار وتفسير ذلك هو زيادة كمية النباتات النامية وبالتالي زيادة كمية المخلفات والبقايا العضوية الناتجة عنها في حين ترتبط المادة العضوية للتربة بعلاقة عكسية مع متوسط درجة الحرارة السنوية بأعتبار ان معدل عمليات الهدم يزداد مع

زيادة درجة الحرارة التي تزيد سرعة التفاعلات الكيميائية وتزيد نشاط الأحياء المجهرية في التربة (دعبول ،2008).

بين علي وسام (2012) ان عملية تحلل المادة العضوية تبدأ عند توفر الظروف الملائمة مثل الحرارة ،الرطوبة ،التهوية ودرجة تفاعل التربة (pH) فيختفي التركيب الأصلي لها وتصبح المادة المتبقية ذات لون بني_اسود وتكون مقاومة للتحلل نسبياً تسمى الدبال (Humus) الذي يعتبر مخزناً للمواد الغذائية التي تنطلق تدريجياً بصورة صالحة لأستخدامها للنبات ،وجدير بالذكر أهميته الأساسية في دورة الكاربون والنتروجين والكبريت والفسفور ومعظم الأيونات المعدنية ،من ثم تبدأ عملية التحلل بعد مهاجمة الأحياء المختلفة للمخلفات العضوية ،وتبدأ العملية بالمركبات سريعة التحلل مثل:السكريات والسليلوز والنشأ وتكون المركبات النتروجينية أكثر مقاومة للتحلل في البداية وأن حوالي 30% من النتروجين يكون سهل التحلل والباقي يمكن أن يبقى مدة طويلة جداً في عملية التحلل الثانوي .

12-2 اهمية المادة العضوية للتربة:

تعد إضافة الأسمدة العضوية للترب أساساً لتنشيط الدور الحيوي بالأضافة لكونها مصدراً مباشراً للعناصر الغذائية وتحسين خواص التربة الفيزيائية والكيميائية (المحمدي ،2009) ،كما تؤثر المادة العضوية في صفات التربة بصورة عامة من خلال تحسين علاقة التربة بالماء ،النبات ،الكثافة الظاهرية ،المسامية الكلية للتربة وكفاءة استعمال الماء (Okasha ،2007). أشار Atee و AL-Sahaf (2007) ان تأثير المادة العضوية يكون في مسارين هما تحسين خواص التربة وخصوبتها وأن ثقل المسار الأول يفوق الثاني وذلك لدور المادة العضوية في تحسين الخصائص الفيزيائية للتربة والأحتفاظ بالرطوبة والحرارة وهذا التحسن الفيزيائي يمكن أن يُسخَر بشكل خاص في الأنتاج النباتي للمحاصيل. يتمثل الدور الحيوي بكون مادة التربة العضوية مخزن للكتلة الحيوية ومصدر للعناصر المُغذية الكبرى ومحفزة لنشاط العديد من الأنزيمات ونمو النبات والأحياء المجهرية (Baldock وآخرون ،2000).

أشار فارس (1998) الى ان تأثير التسميد بالمادة العضوية في أطوار التربة المختلفة حيث إنها تعد مخزناً هاماً العناصر المُغذية الرئيسية من نتروجين وفسفور والعناصر الصغرى الآخرى كما إنها تزيد من السعة التبادلية للأيونات الموجبة أو السالبة وتعد مصدراً للطاقة اللازمة لنشاط الأحياء المجهرية وتُحرر غاز ثنائي أُوكسيد الكاربون في محيط التربة وتزيد من قدرة التربة للأحتفاظ بالماء وتحسين بناء التربة بزيادة ثباتية تجمعاتها وتيسر عمليات خدمة التربة من حراثة وعزق وغيرها وتقلل من تكوّن القشرة السطحية أو التصلب السطحي للتربة ومن درجة رصها(Soil compaction) وتزيد من تهويتها من خلال زيادة مساميتها وسرعة غيض الماء فيها. ان الأحماض الأمينية والعضوية والعناصر المُغذية الجاهزة الناتجة من تحلل المادة العضوية تؤدي دوراً مهماً في نمو النبات من خلال تحسين خواص التربة الكيميائية_الخصوبية مما ينعكس ايجابياً على حصول زيادة في نمو المجموع الخضري وإنتاج المحاصيل (Elia وآخرون ،1998).

وقد ذكر كل من نسيم (2005) ،Halvin وآخرون (2005) ان المادة العضوية تؤثر في خصوبة التربة تأثيراً ايجابياً وهذا بدوره يؤثر في النبات من خلال عمليات كثيرة ،إذ إن المادة العضوية تعد مصدراً للأمونيوم الجاهز للنبات وهي مخزن رئيسي للعناصر المُغذية الضرورية لنمو النبات التي يستفاد منها بعد تحلل المادة العضوية في التربة والمادة العضوية تؤدي الى زيادة السعة التبادلية للأيونات الموجبة للتربة ،وتعد مصدراً غذائياً لبعض الكائنات الحية المفيدة في التربة مثل ديدان الارض والبكتريا التكافلية المثبتة للنتروجين الجوي وبعض الفطريات المفيدة مثل المايكورايزا وتعمل ايضاً على التقليل من التغيرات الحادة في درجات الحرارة لسطح التربة بالأخص عند وجود بقايا عضوية كغطاء سطحي واقٍ كما تعمل على التقليل من تكون قشرة غير مسامية عند سطح التربة وذلك بزيادة تماسك حبيبات التربة وتقليل تفرقها الذي قد يحدث بسبب تساقط الأمطار وزيادة بعض العناصر المُغذية الضرورية للنبات مثل الفسفور والعناصر الأخرى ،كما تخفض المادة العضوية من الكثافة الظاهرية للتربة فتزيد من مساميتها وعندئذ تصبح بيئة التربة اكثر صلاحية لتغذية النبات ونموه وتحقيق إنتاج جيد.

أشار عبد العزيز وآخرون (2006) الى أن استخدام التسميد العضوي بمعدل 20 ميكاغرام هـ$^{-1}$ ادى الى تحسين بناء التربة مقارنة مع معاملة التسميد المعدني ،كما تقوم مادة التربة العضوية بزيادة جاهزية العناصر المُغذية الصغرى والحد من التأثير السلبي لبعض الأيونات السامة مثل الألمنيوم والكادميوم والرصاص في الترب الحامضية من خلال عمل المعقدات المختلفة (Sposito ، 2008).

بالأضافة الى ذلك فقد وجد Badawy (2008) ان إضافة السماد العضوي الى تربة ملحية تؤدي دوراً مهماً في تحسين خواص التربة من خلال تحسين أغلبية صفات التربة الفيزيائية مثل الكثافة الظاهرية والمحتوى الرطوبي والأيصالية المائية وكفاءة استعمال المياه وزيادة ثباتية التجمعات.

للمادة العضوية في التربة دوراً رئيسياً في قابلية صيانة التربة ومعدل الأنتاج وتؤثر بشكل مباشر من خلال تجهيزها للعناصر المُغذية للنبات وتأثير غير مباشر من خلال تحسين الصفات الفيزيائية والكيميائية للتربة (Keshavarz وآخرون ، 2012).

اشار Ingale وPhirke (2017) بأن اضافة المادة العضوية لها تأثير مهم في أعداد الأحياء المجهرية التي تقوم بعملية النترجة ،وقد أكدت العديد من الدراسات بأن إضافة المادة العضوية الى التربة أدت الى زيادة في أعداد البكتريا وذلك لأنها تحتوي على مواد جاهزة للأستفادة منها من قبل الأحياء المجهرية في التربة.

2-13 الحنطة Wheat:

تعد الحنطة من أهم المحاصيل النجيلية الأستراتيجية واكثرها انتاجاً واستهلاكاً في العالم إذ يُعتمد عليها بصورة رئيسية اكثر من ثلث سكان العالم وتأتي في مقدمة المحاصيل الغذائية الأساسية (الرز ،الذرة الصفراء والبطاطا) من حيث الأستهلاك البشري وذلك للقيمة الغذائية لها وللحصول على الأنتاج المرغوب منها فأن هنالك صفات كمية ونوعية يجب ان تؤخذ بنظر الأعتبار إذ تعد عملية انتاج الأشطاء او التفرعات

Tillering التي تحدث خلال مدة النمو الخضـــري للحنطة من تطور النبات من الصـــفات المميزة للنبات النجيلي (عطية ووهيب ،1989) وتعد القابلية العالية للتفرع صـــفة مرغوبة في محاصـــيل الحبوب لزيادة الحاصل (Banbelkacem وآخرون ،1984).

اما بالنسـبة للورقة فهي عضـو النبات الرئيس الذي تحدث فيه جميع فعاليات التمثيل الضـوئي وتعد ورقة العلم هي الورقة التي تسـاهم في حاصـل الحبوب في الحنطة من بقية الأوراق حوالي 80% في امتلاء الحبة خلال مدة من التزهير لحين النضـــج الفســـيولوجي (Blouet وآخرون ،1991 و Stahli وآخرون ،1995).

إن حبوب الحنطة والشـعير تصـل اقصـى محتوى لها من المادة الجافة بمسـتوى رطوبي 37 % إذ يتوقف تراكم المزيد من المادة الجافة مما يدل على نضـــجها (Mitchell وآخرون ،1980) .اما نســـبة البروتين في الحبوب فتعتمد على العوامل البيئية والوراثية وتتراوح نسبة البروتين في حبوب الحنطة من-15% 11 كما أن نظام ادارة المحصـــول في الحقل قد يكون له تأثير في تحديد محتوى الحبوب من البروتين (اليونس وآخرون ،1987).

ذكر Dunlap وMass (1989) ان معدل التمثيل الضـوئي في الورقة يرتبط بكمية الاشـعة الممتصـة التي تتأثر بكمية الاشعة الضوئية الواصلة ومقدار الانعكاس الحاصل لها خارج الورقة وداخلها وكذلك محتوى الورقة من الصـبغات النباتية لاسيما صـبغة الكلوروفيل لذلك من المعروف ان انتاجية المحصـول تعتمد على كفاءة التمثيل الضـوئي التي تنظم بواسطة المساحة الورقية وطول مدة بقائها خضـراء ومحتواها من الصـبغات النباتية ومن ثم فأن المعاملات التي تتضـــمن تحوير مورفولوجية الورقة او زيادة تكوين صـــبغات الكلوروفيل سوف تؤدي الى تحسين عملية التمثيل الضوئي وزيادة الإنتاج .

وتعد السـنابل وعدد الحبوب في السـنبلة ووزن الف حبة من مكونات الحاصـل ترتبط ارتباطاً موجباً مع حاصل الحبوب للحنطة (Nerson ،1980) ويتحدد عدد السنابل بمعدل نمو البراعم الجانبية وهو يعتمد على النوع والصـــنف وقوة البذور وعمق البذار والكثافة النباتية وعوامل بيئية مختلفة مثل الفترة الضـــوئية ودرجة الحرارة وتوفر الرطوبة والمواد المُغذية خلال مدة إنتاج الاشطاء (Langer وHanfi ،1973).

يعتمد الحاصل الأقتصادي الذي يتم حصادهُ في محاصيل الحبوب على كل من إنتاج المادة الجافة الكلية التي ينتجها النبات (الحاصل الحيوي او البايولوجي) ونسبة المادة الجافة التي تؤلف الجزء المحصود (دليل الحصاد) (Thomas ،1982) ،كما يمكن زيادة الغلة للمحصول بزيادة الحاصل الحيوي او البايولوجي (Austin ،1978).

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods :

1-3: المواد Materials :

1-1-3: الأجهزة Apparatus :

جدول (1) الأجهزة التي استعملت لإجراء التجارب التي تضمنتها الدراسة :

ت	نوع الجهاز	ماركة الجهاز	بلد المنشأ
1	المؤصدة Autoclave	Lab Tech	كوريا
2	حمام مائي Water bath	FANEM	البرازيل
3	الطرد المركزي Centrifuge	Hettich Zentrifueen	المانيا
4	حاضنة Incubator	Memmert	المانيا
5	غرفة العزل Laminar flow hood	Lab Tech	كوريا
6	فرن كهربائي Electric Oven	Memmert	المانيا
7	مجهر ضوئي Light microscope	Olympus	اليابان
8	جهاز تقطير المياه Water Distillation		
9	ميزان حساس Sensitive balance	Denver	المانيا
10	خلاط مغناطيسي ذو مسخن حراري سطحي Magnetic Stirrer hotplate	Lab Tech	كوريا
11	مقياس التوصيل الكهربائي EC meter	WTW	المانيا
12	مقياس درجة التفاعل pH meter	WTW	المانيا
13	المطياف الضوئي Spectrophotometer	OPTIZEN	اليابان
14	جهاز قياس اللهب Flame photometer	OPTIZEN	اليابان
15	جهاز المايكروكلدال Micro kldal	Lab Tech	كوريا
16	وحدة الهضم Fume hood	Lab Tech	كوريا
17	ثلاجة Refrigerator	Concord	لبنان
18	خلاط Vortex mixer	LAB- LINE	امريكا

2-1-3: الأوساط الزرعية والكواشف والمحاليل Culture Media and Reagents:

جدول (2) الأوساط الزرعية التي استعملت لإجراء التجارب التي تضمنتها الدراسة :

ت	الأوساط الزرعية Culture media
1	وسط KB King's B medium
2	وسط الحركة Motility medium
3	وسط مرق أحمر المثيل –فوكس بروسكار Methyl red-Voges proskauer broth medium
4	وسط النشأ Starch agar medium
5	وسط اختزال النترات السائل Nitrate reduction broth
6	وسط تربتوفان السائل Tryptophan broth medium
7	وسط سترات سايمون Simmon citrate medium
8	وسط ثلاثي السكريات الحديدي Triple sugar iron agar medium
9	وسط الجيلاتين Gelatin medium
10	وسط اليوريا Urea agar
11	وسط الأدامة Maintenance medium
12	وسط المرق المغذي Nutrient broth
13	وسط المغذي الصلب Nutrient agar
14	وسط ترايبتيك الصويا Tryptic Soya broth
15	آكار آكار Agar agar

جدول (3) الكواشف والمحاليل التي استعملت لإجراء التجارب التي تضمنتها الدراسة :

ت	اسم الكاشف او المحلول	
1	كاشف الكاتليز	Catalase reagent
2	كاشف الأوكسيديز	Oxidase reagent
3	كاشف فوكس بروسكاور	voges –proskuer reagent
4	كاشف المثيل الأحمر	Methyl Red (MR) reagent
5	كاشف لوكال	Logal’s reagent
6	كاشف أختزال النترات	Nitrate reduction
7	كاشف الفنيل الأحمر	Red vinyl reagent
8	عدة ملون كرام	Gram stain set
9	صبغة السفرانين	Safranin stain

2-3: طرائق العمل Methods:

1-2-3: جمع عينات التربة :

تم جمع عينتين من التربة من منطقة الرايزوسفير من حقول مزروعة بنبات الجت والشعير لغرض عزل بكتريا الزوائف الومضائية منها وذلك ضمن الرقعة الجغرافية لمحافظة المثنى وقد تم جمع العينة المركبة من خلال جمع العينات من الحقل الواحد والمحصـــول المحدد ومن ثم خلطها مع بعضـــها لتقليل نســـبة الخطأ وتجانسها لتكوين عينة ممثلة للحقل قدر المستطاع ،وضـعت العينتين في اكياس نايلون معقمة وحفظت في الثلاجة لحين استعمالها والجدول رقم (4) يبين ارقام العينتين واسماء المنطقة والحقل التي جمعت منها.

جدول (4) ارقام العينتين واسم المنطقة والحقل التي جمعت منه :

رقم النموذج	اسم المنطقة	المحصول المزروع
1	السماوة - آل بندر	شعير
2	السماوة – ام العكف	جت

2-2-3: عزل بكتريا الزوائف *Pseudomonas*:

حضرت سلسلة تخافيف عشرية لعينتي التربة اعلاه وذلك بأضافة 10غم من كل عينة تربة الى 90 مل من الماء المعقم في دورق زجاجي سعة 250 مل ومزجت جيداً ثم أجريت لها تخافيف متسلسلة وذلك بنقل 1 مل من عالق التربة إلى انبوب اختبار يحتوي 9 مل من الماء المعقم وكررت العملية لحين الوصول الى التخفيف 10^{-6} ثم أخذ 1مل من كل تخفيف ولقحت انابيب اختبار تحتوي على 9 مل من الوسط King B broth بواقع ثلاث مكررات لكل تخفيف ثم حضنت الانابيب هوائيا على درجة حرارة 28مْ ،ولمدة 48ساعة ،فحصت الانابيب لملاحظة تكوين غشاء رقيق أبيض على السطح والذي يكون مؤشر لنمو بكتريا الزوائف, اخذ 0.1 مل من الانابيب التي أعطت مؤشر موجب ونشرت على سطح طبق بتري يحتوي على الوسط King B agar الصلب وحضنت الاطباق على درجة حرارة 28مْ لمدة 48 ساعة ,اعيد زراعة البكتريا النامية بطريقة التخطيط وذلك للحصول على مستعمرات نقية من البكتريا .بعدها تم الحصول على مستعمرات ذات لون اصفر مخضر تم عزلها بصورة نقية على وسط King B agar لحين اكمال بقية الاختبارات التشخيصية عليها.

3-2-3: تحضير الأوساط الزرعية المستعملة في عزل وتشخيص بكتريا الزوائف الومضائية *P. fluorescens*:

- **وسط King's B agar** :

حُضر الوسط بأضافة 20غم ببتون ،2.5غم فوسفات البوتاسيوم الثنائية K_2HPO_4 ،6غم كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4 .7H_2O$ ،9غم آكار و15مل كليسرول. وأُذيبت مكونات الوسط في لتر من الماء وضبط الرقم الهيدروجيني PH على 7.2 وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م^0 وضغط 15 باوند/انج^2 (Stephane وJacques ،2000).

- **وسط أختبار الحركة Motility test medium** :

حُضر بأضافة 4غم من مسحوق الآكار الى 20غم من مسحوق Nutrient broth وأُذيبت المحتويات في لتر من الماء المقطر ،عقم بالمؤصدة على درجة حرارة 121م^0 وضغط 15 باوند/إنج^2 ثم تم وضع الأنابيب بصورة عمودية ،يستعمل للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة (Collee وآخرون ،1996).

- **وسط مرق أحمر المثيل–فوكس بروسكار Methyl red-Voges proskauer broth medium :**

حُضـر بإذابة 5غم ببتون مع 5غم من الكلوكوز مع 5غم من فوسـفات البوتاسـيوم الأحادية في 900 مل من الماء المقطر وأكمل الحجم الى اللتر وضبط الرقم الهيدروجيني PH على 7.5 ،تم توزيعه في أنابيب اختبار بمقدار 5مل لكل انبوب ،عقم بالمؤصدة على درجة حرارة 121م^0 وضـغط 15 باوند / انج^2، يستعمل للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج الحامض من تخمر الكلوكوز (Godber ،1989).

- **وسط آكار النشأ Starch agar medium :**

حُضـر الوسط بأذابة 2 % نشأ Soluble Starch واضـيف الى الوسط المغذي الصـلب Nutrient agar ،يُســتعمل هذا الوســط لأختبار قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم الأميليز amylase الذي يعمل على تحليل النشأ (الذهب ،1998).

- **وسط اختزال النترات السائل Nitrate reduction broth :**

حُضر الوسط من أذابة 0.2غم من نترات البوتاسيوم و5غم ببتون في 1لتر من الماء المقطر ووزع في أنابيب أختبار بمقدار 5مل لكل أنبوب ثم عقم بالمؤصـدة على درجة حرارة 121م^0 وضـغط 15 باوند / انج^2، حسب ما موصوف ،يستعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتيريا على اختزال النترات إلى نتريت (Collee وآخرون ،1996).

- **وسط تربتوفان السائل Tryptophan broth medium :**

حُضــر بإذابة 10غم تربتوفان و 5غم ملح كلوريد الصــوديوم في1 لتر ماء مقطر وضــبط الرقم الهيدروجيني على 7.5 ثم وزع الوسـط في أنابيب اختبار وعقم بالمؤصـدة على درجة حرارة 121م^0 وضـغط 15 باوند / انج^2 ،يُستعمل هذا الوسط للكشف عن تكوين حلقة الأندول (Harrigan و McCance،1976).

- **وسط سترات سايمون Simmon citrate medium :**

حُضـر حسـب تعليمات الشـركة المجهزة Biolife ويُسـتعمل لأختبار قابلية البكتريا على اسـتهلاك السترات بوصفه مصدرا وحيدا للكاربون (بلازيفيك وادرر،1983).

- **وسط اكار ثلاثي السكريات الحديد Triple sugar iron agar medium :**

حُضــر حســب تعليمات الشــركة المجهزة (Himedia) ووزع في أنابيب اختبار بشــكل مائل ولقح بالتخطيط والطعن ،يُستعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا في تخمير كل من سكر الكلوكوز واللاكتوز والسكروز وانتاج H_2S و CO_2 (Collee وآخرون ، 1996b).

- **وسط الجيلاتين Gelatin liquid faction medium :**

حُضر هذا الوسط من أضافة 12غم جيلاتين الى 1 لتر من المرق المغذي ووزع بواقع 5مل في أنابيب اختبار وعقم بالمؤصـــدة على درجة حرارة 121م^0 وضـــغط 15 باوند / انج^2 ،يُســـتعمل للتعرف على قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم Gelatinase (Collee وآخرون ،1996).

- **آكار اليوريا Urea agar :**

حُضر هذا الوسط بأذابة 4.6غم من مسحوق وسط اليوريا الأساس في 195مل ماء مقطر معقم بعدها عقم بالمؤصدة على درجة حرارة 121م^0 وضغط 15 باوند / انج^2 الوسط ثم برد الى درجة حرارة 50مْ وبعدها أضيف 10مل من محلول اليوريا 4% المعقم بالترشيح في الوسط ثم وزع الى أنابيب أختبار معقمة ،يستعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز (Collee وآخرون ،1996).

- **وسط الأدامة Maintenance medium :**

حُضـر هذا الوسـط بإضـافة الكلسـيرول بتركيز 15% إلى وسـط المرق المغذي Nutrient broth ،يُستعمل هذا الوسط لحفظ العزلات البكتيرية (Feltham وآخرون ،1978).

4-2-3: تحضير الكواشف والصبغات :

- **كاشف فوكس بروسكاور voges –proskuer reagent :**

حُضر الكاشف من محلولين : محلول A – أذيب 5غم من مادة α–naphthal في 90مل كحول أثيلي 99% ثم أكمل الحجم الى 100مل استعمل للكشف عن قابلية البكتريا على تخمير الكلوكوز ومحلول B – أذيب 50غم هيدروكسيد البوتاسيوم في 90مل ماء مقطر ثم أكمل الحجم الى 100مل يستعمل للكشف عن قابلية البكتريا على تخمير الكلوكوز (Collee وآخرون ،1996).

- **كاشف المثيل الاحمر Methyl Red (MR) reagent :**

حُضر من اذابة 0.1غم من صبغة احمر المثيل Methyl Red في 300مللتر كحول اثيلي ومن ثم اكمل الحجم الى 500مللتر بالماء المقطر (Collee وآخرون ،1996) .

- **كاشف لوكال Lugol's reagent :**

حُضـر بأذابة 2غم يوديد البوتاسـيوم KI في 100مل من الماء المقطر ثم أذيب 1غم من اليود في المحلول السـابق وأكمل الحجم الى 300 مل من الماء المقطر ،يسـتعمل للتحري عن قابلية البكتريا على تحليل النشأ (Buxton و Frase، 1977).

- **كاشف أختزال النترات Nitrate reduction reagent :**

حُضر الكاشف من محلولين :

A- حامض السلفانلك Sulfanilic acid حضر بإذابة 8غم من حامض السلفانلك في 1لتر حامض الخليك Acetic acid .

B- محلول الفا نفثول 5% α–naphthal حضر بإذابة 5غم من صبغة الفانفثول في 100مل حامض الخليك 40% (Cowan ،1977).

- **كاشف الفنيل الاحمر :**

حضر باضافة 0.2غم من صبغة الفنيل الاحمر في 1لتر من الماء المقطر .

- **عدة ملون كرام Gram stain set :**

تتكون من البلور البنفسجي Crystal violet ،آيودين Iodine ،ايثانولEthanol والسفرانين Sofranin (Atlas وآخرون ،1995).

5-2-3: التنقية Purification :

لغرض الحصول على مستعمرات نقية من عزلات البكتريا *P. fluorescens* أختبرت عدد من المستعمرات المنفردة التي أعطيت صفات مورفولوجية مشابه لحد ما لبكتريا *P. fluorescens* استعملت طريقة التخطيط Streaking لغرض الزرع على سطح الوسط الزرعي King's B agar في الأطباق بأشكال متعددة بأستعمال الناقل (Loop) وتحت ظروف التعقيم ،حُضنت الأطباق لمدة (24–48) ساعة لحين ظهور مستعمرات منفردة ،لغرض أجراء الفحص المجهري والأختبارات الكيموحيوية لها.

6-2-3: تشخيص العزلات البكتيرية :

لغرض تشخيص العزلات البكتيرية فقد اجريت عليها فحوصات زرعية ومجهرية واختبارات كيموحيوية وبالأعتماد على المصادر العلمية المعتمدة في التشخيص وكالآتي:

1-6-2-3 : الصفات الزرعية:

تمت ملاحظة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على الوسط الزرعي الاكار المغذي والتي شملت شكل ولون وسطح المستعمرة ووجود روائح مميزة ولمعان وحافة وشفافية وقوام هذه المستعمرات (Blak ،1965).

2-6-2-3 : الفحص المجهري المباشر:

تم فحص العزلات البكتيرية مجهريا وذلك بأخذ مسحة من المستعمرات البكتيرية وتثبيتها وتصبيغها بملون كرام لملاحظة أشكال وترتيب الخلايا البكتيرية وتفاعلها مع الصبغة (موجبة أو سالبة).

3-6-2-3 : الأختبارات الكيموحيوية Biochemical tests:

- **أختبار إنتاج أنزيم الكاتاليز :**

أجرى هذا الأختبار بأخذ جزء من المستعمرة البكتيرية النامية على الوسط الزرعي ووضعه على شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة ثم أضيفت لها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين وقد عد تحرر فقاعات مباشرة خلال ثوانٍ دليلاً على قدرة هذه العزلة على إنتاج انزيم الكاتاليز (Baron و Fingold ،1990).

- **أختبار إنتاج أنزيم الأوكسديز Oxidase test :**

تم ترطيب قطعة من ورق الترشيح بقطرات من محلول كاشف الاوكسيديز (Tetra methyl –p-Phenylene dimine dihyrochloride) تم نقل جزء من المستعمرات البكتيرية المطلوب تشخيصها بواسطة عيدان خشبية معقمة الى ورق الترشيح المرطب بمحلول الكاشف عند وظهور اللون البنفسجي خلال (10–60) ثانية نتيجة موجبة لإنتاج انزيم الاوكسيديز (Atlas وآخرون ،1995).

- **أختبار الحركة Motility test :**

لقحت انابيب الاختبار الحاوية على وسط الآكار المغذي شبه الصلب بالبكتريا بطريقة الطعن وبعد التحضين على درجة حرارة 37 مْ لمدة 24ساعة فقد عد أنتشار النمو خارج خط الطعن دلالة على إيجابية اختبار قدرة هذه البكتريا على الحركة (Collee وآخرون ،1996).

- **أختبار أختزال النترات Nitrate reduction test :**

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط النترات السائل بالعزلات البكتيرية وحضنت لمدة 96 ساعة على درجة حرارة 37مْ ،ثم أضيف لها 0.1 مل من كاشف اختزال النترات ،عد ظهور اللون الأحمر خلال عدة دقائق على ايجابية الأختبار (Collee وآخرون ،1996).

- **أختبار إنتاج أنزيم اليوريز Urease test :**

تم تخطيط وسط أكار اليوريا المائل بالبكتريا المراد تشخيصها وحضنت لمدة24 ساعة على درجة حرارة 37مْ ،وقد دل تغيير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي الأحمر على قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز (Collee وآخرون ،1996).

- **اختبار المثيل الاحمر Methyl Red test :**

لقحت الانابيب الحاوية على وسط Methyl Red-Voges proskauer broth بالبكتريا المطلوب تشخيصها و حضنت على درجة حرارة 37مْ لمدة 24-48ساعة ،ثم اضيفت 5 قطرات من كاشف المثيل

الاحمر وقد تحول لون الوســـط إلى اللون الاحمر وهي نتيجة موجبة لهذا الأختبار(Collee وآخرون ،1996).

- **اختبار الفوكس بروسكاور Voges proskauer test :**

لقحت الانابيب الحاوية على وســط Methyl Red-Voges proskauer broth بالبكتريا المطلوب تشــخيصــها و حضــنت على درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ســاعة ،ثم اضــيف لها 1مل من كاشــف فوكس بروسـكاور وقد دل ظهور اللون الأحمر بعد 5 دقائق على النتيجة الموجبة لهذا الأختبار (Collee وآخرون ،1996).

- **فحص الأندول Indol test :**

لقح وســـط تربتوفان الســـائل Tryptophan broth الموزع في أنابيب اختبار بالبكتريا المراد أجراء الأختبار لها ،حضـنت المزارع البكتيرية على درجة حرارة 25 ± 2مْ لمدة ثلاثة أيام وبعد انتهاء مدة التحضـين أضـيف لكل أنبوبة عدة قطرات من كاشـف كوفاك ،ان ظهور حلقة حمراء على سـطح الوسـط المزروع تأكيد على ايجابية الأختبار (Harrigan و McCance ،1976).

- **أختبار تحلل النشأ Starch hydrolysis test :**

نشـر 0.1 مل من العالق البكتيري على سـطح آكار النشـأ ،حضـنت الأطباق على درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة وعندما لوحظت المستعمرات المحاطة بهالة شفافة ،أضيف اليها 1مل من محلول Logul's iodine ،أن تلون الوسط باللون الأزرق عدا المناطق الشفافة المحيطة بالمستعمرات يعني أن النتيجة موجبة أي أن البكتريا محللة للنشأ (Baron وFingold ،1990).

- **أختبار الجلاتين Gelatin hydrolysis test :**

لقحت انابيب وسـط الجلاتين بالعزلات البكتيرية النقية بطريقة الطعن وحضـنت عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24-48 ساعة .ثم وضـعت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 مْ لمدة نصـف ساعة .ان تحول الوسـط الى الحالة الســائلة وبقاءه كذلك حتى عند وضــعه في الثلاجة يدل على قدرة البكتريا على انتاج انزيم الجيلاتنيز (Cowan ،1977).

- **أختبار أستهلاك السترات Citrate utilization test :**

لقحت موائل اكار سترات سايمون Simmon Citrate agar بمستعمرة عمرها 24 ساعة من المزارع البكتيرية ثم حضــنت عند درجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ســاعة وقد دل تغير لون الوســط بعد التحضــين من الاخضر الى الازرق على النتيجة الموجبة (Collee وآخرون ،1996).

- **أختبار النمو بدرجة حرارة 42 مْ و 4 مْ :**

تم تخطيط العزلات على الاكار المغذي بمكررين لذات المستعمرات ،حضنت أحدهما على درجة حرارة 42 مْ والاخرى على درجة حرارة 4 مْ ولمدة 24 ســـاعة ، ولوحظت قابلية النمو في كلتا درجتي الحرارة (Lennette وآخرون ،1985).

- **أختبار النمو على وسط آكار ثلاثي السكريات الحديد**

:Triple sugar iron agar (TSI)

لقحت أنابيب وسط TSI المائل بالعزلات البكتيرية النقية بطريقة التخطيط على سطح الوسط والطعن عند القعر وحضنت عند درجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة .أن اختلاف تغير لون الوسط الى الاصفر يدل على النتيجة الموجبة ،فضلاً عن تكوين راسب أسود من كبريتيد الحديدوز FeS دلالة على النتيجة الموجبة.

3-2-7: التجارب المختبرية :

تجربة التحري عن قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي:

تم تنمية عزلات بكتريا *T. thioparus* و*P. fluorescens* في انابيب اختبار تحتوي على 10مل من وسط Tryptic soya broth والذي حضر حسب تعليمات الشركة المنتجة (oxoid) من اذابة 30غم من الوسط في 1لتر من الماء المقطر ثم عقم بالموصدة بدرجة حرارة 121م° وضغط 15 باوند/انج^{2} لمدة 20 دقيقة وكذلك نميت نفس العزلات البكتيرية في انابيب تحتوي على وســط المرق المغذي وبعد التحضــين تم قياس سمك الغشاء الحيوي بأستعمال المسطرة ثم سكبت محتويات الأنابيب واضيف لها 10مل من صبغة السفرانين التي تركيزها 0.1% وتركت لمدة دقيقة واحدة ثم سكبت الصبغة إذ ان ظهور الحلقة الحمراء دلالة على تكوين الغشاء الحيوي (Christesen وآخرون ،1982).

3-2-8: تجميع الغشاء الحيوي البكتيري:

تم تنمية العزلات البكتيرية الخاصـــة بكتريا *T.thioparus* و*P. fluorescens* في انابيب اختبار تحتوي على 50مل من وســط Tryptic soya broth وحضــنت الانابيب على درجة حرارة 28م°،تم جمع الغشــاء الحيوي المتكون من الانابيب تحت ظروف معقمة ووضــع في انابيب Scrow tubes يحتوي على محلول(PBS) Phosphate Buffer Saline الذي حضر بإضافة 8غم من NaCl و0.2غم من KCL و0.2غم من KH_2PO_4 و1.5غم من NaH_2PO_4 و7.2 pH وبعدها وضع الغشاء الحيوي في الفرن على درجة حرارة 50 لمدة ثلاث ايام وتم حفظه في الثلاجة لحين الأستعمال (الركابي ،2017).

تم الحصـــول على (15.8 و13)غم من الغشـــاء الحيوي لكل من بكتريا *T.thioparus* و *P. fluorescens* على التتابع تم الاحتفاظ بالأغشية الحيوية في الثلاجة لحين الاستعمال في التجربة.

3-2-9: التجربة الحقلية:

صـــممت تجربة حقلية لدراســة تأثير التلقيح بالغشــاء الحيوي لبكتريا *P. fluorescens* وبكتريا *T. thioparus* وتداخلهما بالأضافة للتداخل مع مستويات من المادة العضوية وقد تم تلقيح بذور حنطة صنف إباء٩٩ بالغشاء الحيوي.

صـــممت التجربة وفق تصـــميم القطاعات العشـــوائية الكاملة (RCBD) وتمت الزراعة في محطة الأبحاث والتجارب الزراعية الثانية التابعة لكلية الزراعة–جامعة المثنى في منطقة (آل بندر) بعد حراثة الأرض بشــكل متعامد تمت بعدها عمليتي التســوية والتنعيم وبعد ذلك قُســمت الأرض الى وحدات تجريبية وكانت مســـاحة كل وحدة تجريبية 3 م٢ (2 م×1.5 م) وكان عدد خطوط الزراعة 7خط والمســـافة بين لوح وآخر 60 ســـم وبين الألواح الرئيســـية 1 م٢ وذلك لتجنب تداخل المعاملات بتأريخ 2020/11/26 وذلك بأستعمال عاملين للتجربة وكما مبين في الآتي :

عوامل التجربة الحقلية:

العامل الاول :

اضافة الغشاء الحيوي البكتيري Biofilm بأربعة مستويات ورمز له بالرمز B :

المستوى الأول: بدون اضافة ورمز لهُ بالرمز B_0.

المستوى الثاني: اضافة الغشاء الحيوي لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* ورمز لهُ بالرمز B_1.

المستوى الثالث: اضافة الغشاء الحيوي لبكتريا *Thiobacillus thioparus* ورمز لهُ بالرمز B_2.

المستوى الرابع: اضافة الغشاء الحيوي لكل من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Thiobacillus thioparus* ورمز لهُ بالرمز B_3.

العامل الثاني:-

اضافة المادة العضوية Organic matter بثلاثة مستويات ورمز لها بالرمز O :

المستوى الأول: بدون اضافة ورمز لهُ بالرمز O_0.

المستوى الثاني: اضافة 0.5% مادة عضوية ورمز لهُ بالرمز O_1.

المستوى الثالث: اضافة 1% مادة عضوية ورمز لهُ بالرمز O_2.

تم تنفيذ التجربة بثلاثة مكررات : عدد الوحدات التجريبية = 3×4×3 = 36 وحدة تجريبية .

زُرعت التربة بحبوب حنطة صـــنف إباء٩٩ المُلقحة بالغشـــاء الحيوي لكل من بكتريا*P. fluorescens* و*T. thioparus* وحسب المعاملات المذكورة اعلاه بمعدل 5.14 غم حبوب لكل خط بتاريخ 2020/11/26. تم اضـافة الاسـمدة وحسـب المعاملات بتوصـية سـمادية كاملة لكل من الأسـمدة النتروجينية على شكل يوريا

(N%46) بواقع دفعتين الاولى عند الزراعة والثانية في مرحلة الاســـتطالة بيوم واحد علماً ان التوصـــية السمادية هي 100% كغمNهـ$^{-1}$ ،كما اضيف السماد الفوسفاتي بدفعة واحدة قبل الزراعة على شكل سماد سوبرفوسفات الثلاثي (P%20) علماً ان التوصية السمادية 75% كغمPهـ$^{-1}$ واجريت عملية التسميد البوتاسي بدفعة واحدة عند الزراعة على شكل كبريتات البوتاسيوم (K_2O%50) علماً ان التوصية السمادية 100% كغمKهـ$^{-1}$ (جدوع وصالح ،2013) كما تم اضافة مستوى 0.5% مادة عضوية ومستوى 1% مادة العضوية من مخلفات الأبقار المُخمرة ،اما عدد مرات التعشـــيب اليدوي كانت مرتين إذ كانت الأدغال الموجودة القرط وتم حصاد المحصول بعد اكتمال النضج بتاريخ 2021/4/30.

3-2-10: الصفات المدروسة لنبات الحنطة :

- **الصفات المظهرية (قياسات النبات) :**

1- ارتفاع النبات: تم تقديره عند التزهير من قاعدة النبات الملامسة لسطح التربة الى قمة السنبلة الرئيسية لعشرة نباتات من كل وحدة تجريبية.

2- مساحة ورقة العلم (سم^{٢}): حُسبت من معدل عشرة اوراق علم لكل وحدة تجريبية حسب المعادلة الآتية: مساحة ورقة العلم=طول ورقة العلم×عرضها عند المنتصف×معامل التصحيح (0.95).

3- وزن 1000 حبة (غم): معدل وزن 1000 حبة أخذت عشوائياً من حاصل حبوب كل معاملة والموزونة بميزان كهربائي حساس.

4- حاصل الحبوب (ميكاغرام هـ$^{-1}$): حسب من معدل حاصل خطين وسطيين لكل وحدة تجريبية بعد تنقية الشوائب وزنت بميزان كهربائي حساس.

5- الحاصل الحيوي (ميكاغرام هـ$^{-1}$): حسبت من معدل وزن خطين وسطيين لكل وحدة تجريبية بعد تجفيف النباتات هوائياً ثم وزنت كاملةً ويضم الحاصل الحيوي الوزن الجاف الكلي (سيقان،اوراق وسنابل) فوق سطح التربة.

- **الكمية الممتصة للعناصر من قبل النبات (تحليل النبات) :**

طحنت العينات النباتية المتضمنة الجزء الخضري (الأوراق والساق) والمؤخذة في مرحلة 50% تزهير بعد تجفيفها بأستعمال طاحونة كهربائية وبعد ذلك هضمت العينات النباتية المطحونة بأستعمال حامض الكبريتيك وحامض البيروكلوريك بنسبة 1:1 وفقاً للطريقة الموصوفة من قبلGresser وآخرون (1979) وتم تقدير :

1- النتروجين الممتص في الجزء الخضري (ملغم غم$^{-1}$): تركيز النتروجين بأستعمال جهاز المايكروكلدال حسب الطريقة الموضحة من قبل (Bremner ، 1965).

2- الفسفور الممتص في الجزء الخضري (ملغم غم$^{-1}$): تم تقدير الفسفور بأستعمال مولبيدات الأمونيوم وحامض الأسكوربيك في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على الطول الموجي 882 نانوميتر (Page وآخرون ،1982).

3- البوتاسيوم الممتص في الجزء الخضري (ملغم غم$^{-1}$): تم تقدير تركيز البوتاسيوم بأستعمال جهاز Flame-photometer وحسب الطريقة الواردة في (Haynes ،1980).

3-2-11: تحاليل التربة :

تم طحن عينة التربة المجففة هوائياً ثم مررت من منخل قطر فتحاته 2 ملم لإجراء التحاليل للعينة قبل الزراعة علماً ان تحاليل النتروجين والفسفور والبوتاسيوم والكبريت الجاهز في التربة بعد الحصاد كانت بنفس آلية التحاليل من مواد واجهزة قبل الزراعة:

1. الرقم الهيدروجيني: تم قياس الرقم الهيدروجيني للتربة في معلق تربة :ماء بنسبة 1:1 بأستعمال جهاز pH - meter وحسب ما وصف في (Page وآخرون ،1982).
2. الأيصالية الكهربائية (EC): تم قياس الايصالية الكهربائية (EC) في مستخلص عجينة التربة المشبعة باستعمال جهاز التوصيل الكهربائي (EC-meter) وحسب ما وصف في (Richards ،1954).
3. المادة العضوية: قُدرت المادة العضوية حسب طريقة Walkely and Black وحسب ما جاء في (Black ، 1965).
4. النتروجين الجاهز(الأمونيوم والنترات): المستخلص بمحلول كلوريد البوتاسيوم وقدر بجهاز المايكروكلدال حسب الطريقة الموضحة في (Black، 1965).
5. الفسفور الجاهز : استخلص الفسفور الجاهز بواسطة محلول بيكاربونات الصوديوم 0.5 مولاري و pH 8.5 وطور اللون بواسطة محلول مولبيدات الأمونيوم وحامض الأسكوربيك وفقاً لطريقة Olsen وتم

التقدير بأستعمال جهاز المطياف Spectrophotometer وعند طول موجي 882 نانوميتر كما ورد في (Page وآخرون ، 1982).

6. المغنسيوم والكالسيوم: قدر الذائب في راشح العجينة المشبعة بطريقة التسحيح بال Na_2EDTA (Richarrds،1954) .
7. الصوديوم والبوتاسيوم: قدر الذائبين في راشح العجينة المشبعة المستخلص بمحلول خلات الأمونيوم بطريقة جهاز اللهب الـ Flam Photometer (Page وآخرون ،1982) .
8. الكبريتات: قدرت الكبريتات بطريقة الترسيب بواسطة كلوريد الباريوم كما ورد في (Rhoades ، 1982).
9. الكاربونات والبيكاربونات: قدرت بالتسحيح مع 0.02 عياري من حامض الكبريتيك حسب الطريقة الموصوفة في (Jackson ،1958).
10. الكلوريد: قدرت ايونات الكلوريد بطريقة التسحيح مع نترات الفضة 0.03 عياري حسب الطريقة الموصوفة في (Jackson ،1958).
11. الكاربونات الصلبة الكلية: قدرت بالطريقة الوزنية بأستعمال حامض الهايدروكلوريك HCl عياري وفقاً لما جاء (Richards ،1954).
12. السعة التبادلية للآيونات الموجبة (CEC): قدرت حسب (Polemio وRhoades ، 1977).
13. نسجة التربة: قدرت نسجة التربة بطريقة الماصة Pipette method الواردة في (Black ، 1965).
14. رطوبة التربة: قدرت النسبة المئوية لرطوبة التربة عند الشد 3/1 بار (33 كيلو باسكال) بأستعمال جهاز Pressure membrane وفقا للطرق الواردة في (Richards ،1954).
15. البكتريا الكلية: استعملت طريقة التخفيف والعد بالأطباق لحساب عدد البكتريا الكلية في التربة بأستعمال وسطSoil Extract Agar وحسب الطريقة في (Allen ،1953).

جدول (5) :بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية والحيوية لتربة الدراسة قبل الزراعة :

الصفة	الوحدات	القيمة
الأس الهيدروجيني pH		7.5
التوصيل الكهربائي ECe	dsm^{-1}	3.8
Ca^{+2}	سنتيمول لتر$^{-1}$	24.7
Mg^{+2}		14.13
Na^{+}		3.50
$CO3^{2-}$		Nil
$HCO3^{-}$		4.12
CL^{-}		28.70
$SO4^{2-}$		1923
المادة العضوية	%	0.93
N الجاهز	ملغم كغم$^{-1}$	19.3
P الفسفور	ملغم كغم$^{-1}$	16.03
K البوتاسيوم	ملغم كغم$^{-1}$	180
الرمل	غم كغم$^{-1}$تربة	208
الغرين		436
الطين		356
النسجة		مزيجية غرينية
البكتريا الكلية	$Cfug^{-1}soil$	0.37×10^{5}

12-2-3: التحليل الأحصائي:

تم تحليل البيانات احصـائياً بأسـتعمال برنامج Genstat للتجربة بتصـميم القطاعات العشـوائية الكاملة (RCBD) وتم مقارنة النتائج وفق أقل فرق معنوي (L.S.D) عند مسـتوى المعنوية 0.05 (الراوي وخلف الله ،2000).

4- النتائج والمناقشة Results and discussion:

4-1: عزل وتشخيص بكتريا *P. fluorescens* :

4-1-1 الصفات الزرعية والمجهرية:

يبين الجدول (6) بعض الصفات الزرعية والمجهرية للعزلتين البكتيريتين التي تم الحصول عليهما من التربة والرايزوسفير لمحصول حقلي اذ وجد ان معظم المستعمرات متوسطة الحجم ،وكانت المستعمرات البكتيرية ذات سطح ناعم Smooth ،محدب Convex ،لونها اصفر مخضر greenish yellow ومضائية fluorescent كما ان الصبغة الصفراء كانت واضحة الظهور بمرور الوقت في حين بينت نتائج فحص الشرائح المصبوغة بملون كرام ان خلاياها ذات اشكال عصوية مستقيمة سالبة لملون كرام ،غالبا ما تكون على شكل ازواج وبناءً على الصفات الزرعية والمجهرية لهذه العزلة فقد وجد أنها تتطابق صفاتها لحد كبير مع الصفات الزرعية والمجهرية لبكتريا الزوائف *Pseudomonas* (Migula ،1900).

جدول (6) الصفات الزرعية والمجهرية للعزلات البكتيرية :

رقم العزلة	التربة المعزول منها	الوصف الزرعي والمجهري للعزلات البكتيرية
1	**حقل شعير**	مستعمرات خضراء مصفرة ،دائرية ،متوسطة الحجم ،غير شفافة ،متحركة ،سالبة لملون كرام.
2	**حقل جت**	مستعمرات بيضاء ملساء ،دائرية ،صغيرة الحجم ،متموجة الحافة ،متحركة ،سالبة لملون كرام.

4-1-2 الأختبارات الكيموحيوية:

اعتمدت العديد من الاختبارات الكيميوحيوية لغرض تشخيص العزلتين البكتيريتين بصورة دقيقة ،اما في الجدول (7) فقد اظهر الفحص المجهري بأستعمال العدسة الزيتية أن العزلتين كانتا سالبة لملون كرام واظهرت العزلتين نتيجة سالبة لأختبار انزيمي الأوكسديز والكتاليز وأختبار الفوكس–بروسكاور وسالبة لأختبار التحلل المائي للنشأ بينما كانت العزلتين موجبة لأختبار احمر المثيل واختبار انزيم الجلاتينيز واختبار اختزال النترات كما اظهرت العزلة نتيجة موجبة لفحص الأندول (Holt و Krieg ،1994 و Collee وآخرون، 1996 و Macfaddin ،2000). ولكن العزلتين البكتيريتين لن تتمكن من النمو عند درجة حرارة 4م° بينما عزلة واحدة *P. fluorescens* تمكنت من النمو عند درجة حرارة 42م° (Iglewski ،2002).

جدول (7) نتائج الأختبارات الكيميوحيوية للعزلة البكتيرية *P. flourescens* :

ت	الأختبارات		النتائج	
			1	2
1	استجابة الخلايا لملون غرام	Gram stain	–	–
2	فحص الحركة	Motility test	+	+
3	اختبار فوكس–بروسكاور	Voges proskauer test	–	–
4	التحلل المائي للنشأ	Starch hydrolysis test	–	–
5	اختبار اختزال النترات	Nitrate reduction	+	+
6	النمو عند درجة حرارة 4 مْ	Growth in 4c	–	–
7	النمو عند درجة حرارة 42 مْ	Growth in 42c	–	+
8	فحص الأندول	Indol test	+	+
9	اختبار انزيم الأوكسديز	Oxidase	–	–
10	اختبار انزيم الكاتاليز	Catalase	–	–
11	اختبار انزيم اليوريز	Urease test	+	+
12	اختبار أحمر المثيل	Methyl Red	+	+
13	اختبار انزيم الجلاتينز	Gelatin hydrolysis test	+	+
14	استهلاك السترات	Citrate Vitalization test	–	–

4–2 :الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية لبكتريا *P. fluorescens* وبكتريا *T. thioparus* على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm:

اظهرت نتائج الأختبار بأستعمال طريقة الأنابيب للتحري عن الغشاء الحيوي وجود هذا الغشاء على شكل طبقة سميكة في اعلى الأنبوب للوسط السائل سواء على وسط Tryptic soya acid broth ووسط Nutrient broth وقد تم الكشف عن قدرتها على انتاج الغشاء الحيوي من خلال اضافة صبغة السفرانين بعد

سكب محتويات الأنابيب وقد كان هنالك تباين بسيط في ظهور حلقة ذات اللون الأحمر للعزلات البكتيرية مابين اللون الأحمر الفاتح والغامق (Christensen وآخرون ،1982).

جدول (8) يبين قدرة العزلات البكتيرية التابعة لبكتريا *P. flourescens* وبكتريا *T. thioparus* المستعملة في الأختبار على إنتاج الغشاء الحيوي بأستخدام الوسطين المستعملين للأختبار وهذه النتيجة تتفق مع ماوجده Ude وآخرون (2006) اذ اشاروا الى ان اغلب بكتريا*P. Fluorescens* و *P. Putida* المعزولة من التربة لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي.

جدول (8) نتائج قدرة عزلات بكتريا *P.flourescens* و *T. thioparus* لتكوين الغشاء الحيوي على نوعين من الأوساط الزرعية

نوع البكتريا	رقم العزلة	الوسط الزرعي	
		Tryptic soya broth	Nutrient broth
Pseudomonas flourescens	P.f	+++	+++
Thiobacillus thioparus	T.t	++	++

\+ لون الحلقة احمر فاتح

++ لون الحلقة احمر فاتح – غامق

+++ لون الحلقة احمر غامق

4-3: التجربة الحقلية:

4-3-1: ارتفاع النبات (سم):

أشارت نتائج التحليل الإحصائي في ملحق (2) عدم وجود تأثير معنوي لمعاملات الغشاء الحيوي ومستويات السماد العضوي والتداخل بينهما في صفة ارتفاع النبات (سم).

جدول(9) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في ارتفاع النبات(سم)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	102.37	112.53	108.23	107.71
B_1	116.07	113.77	109.47	113.10
B_2	109.93	108.17	111.83	109.98
B_3	107.33	112.33	112.23	110.63
المعدل	108.92	111.70	110.44	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	N.S	N.S	N.S	

4-3-2: مساحة ورقة العلم (سم٢):

أشارت نتائج التحليل الإحصائي في ملحق (2) عدم وجود تأثير معنوي لمعاملات الغشاء الحيوي ومستويات السماد العضوي والتداخل بينهما في صفة مساحة ورقة العلم (سم٢).

جدول (10) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في مساحة ورقة العلم(سم٢)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	37.82	38.20	36.34	37.45
B_1	42.88	30.04	41.51	38.14
B_2	40.52	39.12	43.23	40.96
B_3	38.70	36.36	41.37	38.81
المعدل	39.98	35.93	40.61	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	N.S	N.S	N.S	

4-3-3: وزن 1000 حبة (غم):

اظهرت نتائج جدول (11) عدم وجود فروق معنوية بين معاملات الغشاء الحيوي Biofilm المنفردة او المزدوجة ومعاملة المقارنة في صفة وزن 1000 حبة إذ سجلت معاملة B_2 اعلى معدل بلغ 47.48غم بنسبة زيادة بلغت 12.9% عن معاملة المقارنة التي سجلت اقل معدل بلغ 42.02غم وتلتها معاملة اللقاح المزدوج B_3 إذ سجلت معدل بلغ 47.27غم بنسبة زيادة بلغت 12.5% من معاملة المقارنة التي سجلت 42.02غم وقد يعود السبب في ذلك لدور الغشاء الحيوي المنفرد او المزدوج لبكتريا *T. thioparus* +بكتريا *P. flourescens* في توفير البيئة الميكروبية المثالية لزيادة افراز الأحماض العضوية من قبل الأحياء

المجهرية المكونة له مما يساعد في زيادة تمعدن العناصر المغذية وهذا يتفق مع ما وجدهُ (seneviratne وjayasinghearachi ، 2005).

جدول (11) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في وزن 1000 حبة(غم)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	38.90	44.10	43.05	42.02
B_1	41.58	42.40	43.44	42.47
B_2	47.66	46.08	48.70	47.48
B_3	51.23	43.33	47.25	47.27
المعدل	44.84	43.98	45.61	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	4.076	N.S	N.S	

4-3-4: حاصل الحبوب (ميكاغرام.هـ$^{-1}$):

يبين جدول (12) ان نتائج تأثير الغشاء الحيوي في حاصل الحبوب اظهرت فرق معنوي أذ تفوقت معاملتي الغشاء الحيوي المنفرد لبكتريا *T. thioparus* وبكتريا *P. flourescens* على معاملتي الغشاء الحيوي المزدوج ومعاملة المقارنة إذ سجلتا معدلات بلغت (4.74 ميكاغرام.هـ$^{-1}$ و4.69 ميكاغرام.هـ$^{-1}$) بالتتابع وبنسبة زيادة بلغت(49% و47%) بالتتابع من معاملة المقارنة التي سجلت اقل معدل بلغ 3.19 ميكاغرام.هـ$^{-1}$ ،وقد يعود السبب في ذلك الى دور الغشاء الحيوي في توفير بيئة مثالية للأحياء المجهرية عن طريق زيادة

إفراز الأحماض العضوية من قبل الأحياء المجهرية المكونة لهُ مما يساعد في زيادة معدنة العناصر المغذية وهذا يتفق مع ما وجدهُ (seneviratne وjayasinghearachi ، 2005).

كما بينت نتائج الجدول (12) تفوق معنوي لمعاملات التداخل الثنائي بين الغشاء الحيوي البكتيري ومستويات من المادة العضوية (B_3O_0, B_1O_0, B_1O_2, B_2O_2, B_1O_2, B_2O_0, B_1O_1) على معاملة المقارنة إذ سجلت معدلات حاصل الحبوب (5.35، 4.85، 4.74، 4.64، 4.43، 4.29، 4.18) ميكاغرام.هـ$^{-1}$ بالتتابع بينما سجلت معاملة المقارنة اقل معدل بلغ 2.17 ميكاغرام.هـ$^{-1}$، وربما يعود سبب ذلك الى مساهمة التسميد الحيوي الذي يوفر جزء من العناصر المُغذية وبدورها تؤثر بصورة مباشرة او غير مباشرة على نمو النبات خلال موسم النمو وزيادة كفاءة العمليات الحيوية للنبات مما يزيد من نمو المجموع الجذري والخضري للنبات وهذا يجعل النبات اكثر حيوية في امتصاص العناصر المُغذية ومن ثم نقلها الى اماكن تخزينها وهي الحبوب وهذا يتفق مع ما وجدهُ (Buddhika وآخرون ،2012).

جدول (12) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في حاصل الحبوب(ميكاغرام.هـ$^{-1}$)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	2.17	3.57	3.82	3.19
B_1	4.29	5.35	4.43	4.69
B_2	4.85	4.74	4.64	4.74
B_3	4.18	2.78	3.81	3.59
المعدل	3.87	4.11	4.17	
	B	O	B*O	
L.S.D. 0.05	0.739	N.S	1.280	

4-3-5: الحاصل الحيوي (ميكاغرام.هـ$^{-1}$):

اظهرت نتائج جدول (13) عدم وجود فروق معنوية بين معاملات الغشاء الحيوي Biofilm المنفردة او المزدوجة ومعاملة المقارنة في صفة الحاصل الحيوي لنبات الحنطة ميكاغرام.هـ$^{-1}$ اذ سجلت معاملة الغشاء الحيوي المزدوج لبكتريا *T. thioparus* + بكتريا *P. flourescens* اعلى معدل بلغ 7.93 ميكاغرام.هـ$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت 26.1% عن معاملة المقارنة التي سجلت 6.29 ميكاغرام.هـ$^{-1}$ وهذا قد يعود الى دور الغشاء الحيوي المزدوج في التداخل الأيجابي بين الأحياء المجهرية المكونة للأغشية الحيوية من خلال توفير متطلبات النمو نتيجة لتكوين او تحطيم الجزيئات من قبل احد الأحياءالمجهرية المكونة للأغشية الحيوية التي لا يمكن للعوامل الآخرى انتاجها وحدها مما يشجع نموها وزيادة اعدادها وهذا يتفق مع ما وجدهُ (Frases وآخرون ،2006 ،Frases وآخرون ،2007).

جدول (13) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في الحاصل الحيوي(ميكاغرام.هـ$^{-1}$)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	6.08	6.78	6.00	6.29
B_1	7.47	8.03	6.41	7.30
B_2	7.34	8.44	7.48	7.76
B_3	8.31	6.87	8.59	7.93
المعدل	7.30	7.53	7.12	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	1.163	N.S	N.S	

4-3-6: الكمية الممتصة من النتروجين في المجموع الخضري %:

اظهرت نتائج جدول (14) ان لأضافة الغشاء الحيوي بأنواعه المختلفة تأثيراً معنوياً في الكمية الممتصة من النتروجين في المجموع الخضري لنبات الحنطة مقارنة بعدم اضافة الغشاء الحيوي إذ اعطت معاملة الغشاء الحيوي B_2 اعلى معدل بلغ 2.8% بدون فروق معنوية مع معاملة B_3 التي سجلت معدل بلغ 2.73% بينما سجلت معاملة المقارنة اقل معدل نتروجين ممتص بلغ 1.96% وقد يعزى ذلك الى دور الغشاء الحيوي الذي يعمل على تنظيم وزيادة كفاءة إنتاج منظمات النمو ومنها IAA والجبرلينات مما يزيد نمو المجموع الجذري وبدوره يزيد من جاهزية امتصاص النتروجين والعناصر المُغذية الآخرى من التربة وزيادة تركيزها داخل النبات وهذا يتفق مع ما وجدهُ (Bandara وآخرون ،2006).

جدول (14) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في الكمية الممتصة من النتروجين في المجموع الخضري %

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	1.65	2.16	2.07	1.96
B_1	2.54	2.62	2.48	2.54
B_2	2.56	3.02	2.82	2.80
B_3	2.87	2.58	2.73	2.73
المعدل	2.40	2.59	2.52	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	0.2341	N.S	N.S	

4-3-7: الكمية الممتصة من الفسفور في المجموع الخضري % :

يبينت النتائج في جدول (15) تأثير نوع الغشاء الحيوي Biofilm في الكمية الممتصة من الفسفور في المجموع الخضري إذ تفوقت المعاملتين B_2,B_1 على معاملة المقارنة إذ سجلتا معدلات بلغت(0.81، 0.99)% بنسبة زيادة بلغت(35،65)% من معاملة المقارنة التي سجلت اقل معدل بلغ 0.60 وهذا قد يعود الى دور نوع الغشاء الحيوي اذ تقوم الميكروبات المكونة للغشاء الحيوي بإنتاج الهرمونات النباتية التي تحفز نمو النبات والجذور والذي بدوره يزيد امتصاص المغذيات لاسيما الفسفور (Bandera واخرون 2006 ،).

من جانب آخر تشير النتائج المبينة في جدول (15) الى تأثير نوع الغشاء الحيوي ومستوى التسميد العضوي في الكمية الممتصة من الفسفور في المجموع الخضري لنبات الحنطة إذ تفوقت معاملة التداخل الثنائية B_2O_2 على بقية المعاملات إذ سجلت معدل بلغ 1.35 % بنسبة زيادة بلغت 150% من معاملة المقارنة التي سجلت اقل معدل بلغ 0.54 % ، وربما يعزى هذا إلى أن الاغشية الحيوية تعمل على زيادة الحموضة نتيجة تنظيم إنتاج اندول حامض الخليك IAAs وكذلك زيادة الاحماض العضوية التي من شأنها زيادة جاهزية الفسفور المتحرر من مركبات الفوسفات (Jayasinghearachchi وSeneviratne ، Seneviratne.; 2006a وIndrasena ، 2006).

جدول (15) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في الكمية الممتصة من الفسفور في المجموع الخضري %

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	0.54	0.68	0.53	0.60
B_1	0.89	0.87	0.68	0.81
B_2	0.81	0.80	1.35	0.99
B_3	0.73	0.72	0.76	0.73
المعدل	0.74	0.77	0.84	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	0.1534	N.S	0.2657	

4-3-8: الكمية الممتصة من البوتاسيوم في المجموع الخضري % :

ان النتائج المبينة في جدول (16) توضح تأثير اضافة مستويات من السماد العضوي في الكمية الممتصة من البوتاسيوم في المجموع الخضري لنبات الحنطة فقد تفوق المستوى الثاني للسماد العضوي O_1 على معاملة المقارنة وبدون فروق معنوية مع المستوى O_2 إذ سجل معدل بلغ 1.42% بنسبة زيادة بلغت 43.3% بينما سجل المستوى O_2 معدل بلغ 1.24% ،وربما يعود الى دور المادة العضوية بتجهيز النبات بالعناصر المُغذية من خلال دورها في تحسين خواص التربة الفيزيائية والكيميائية وزيادة اعداد ونشاط الأحياء المجهرية فيها والتي تعمل على معدنة العناصر وتجهيزها للنبات وهذا يتفق مع ما وجدهُ (Tejada وآخرون ،2006).

جدول (16) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في الكمية الممتصة من البوتاسيوم في المجموع الخضري %

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	0.63	1.27	1.44	1.11
B_1	1.07	1.47	1.04	1.19
B_2	1.27	1.55	1.27	1.37
B_3	1.00	1.38	1.19	1.19
المعدل	0.99	1.42	1.24	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	N.S	0.2300	N.S	

4-3-10: اعداد بكتريا *P. flourescens* ($\times 10^5$ CFu gm^{-1} soil):

أشارت نتائج التحليل الإحصائي في ملحق (3) عدم وجود تأثير معنوي لمعاملات الغشاء الحيوي ومستويات السماد العضوي والتداخل بينهما في صفة اعداد بكتريا *Pseudomonas flourescens* لنبات الحنطة $\times 10^5$ CFu gm^{-1} soil.

جدول (17) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في اعداد بكتريا *P. flourescens* ($\times 10^5$ CFu gm^{-1} soil)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	0.18	0.18	0.32	0.23
B_1	0.15	0.21	1.37	0.57
B_2	0.18	0.24	0.25	0.22
B_3	0.20	0.27	0.26	0.24
المعدل	0.18	0.22	0.55	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	N.S	N.S	N.S	

4-3-11: اعداد بكتريا *T. thioparus* ($\times 10^4$ CFu gm^{-1} soil):

اظهرت النتائج في جدول (18) وجود فروق معنوية بين معاملة مستوى التسميد العضوي O_1 ومعاملة المقارنة O_0 في صفة اعداد بكتريا *T. thioparus* إذ سجلت معدل بلغ 0.23×10^4 CFu gm^{-1} soil بنسبة زيادة بلغت 27.8% من معاملة المقارنة التي سجلت اقل معدل بلغ 0.18×10^4 CFu gm^{-1} soil ،ويعود سبب ذلك الى ما تحتويه المادة العضوية من عناصر مُغذية تكون مصدراً مهماً لتجهيز الأحياء المجهرية بالعناصر المُغذية والطاقة مما يزيد من النشاط البكتيري بأفراز الأنزيمات ،المادة العضوية ،درجات الحرارة والتوازن البايلوجي وهي من اهم العوامل التي تساهم في انتشار وتوزيع ونشاط البكتريا المختزلة للكبريت وهذا يتفق مع ما جاء به (Westrich و Berner،1988).

جدول (18) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في اعداد بكتريا *T. thioparus* ($\times 10^4$ CFu gm^{-1} soil)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	0.14	0.20	0.23	0.19
B_1	0.19	0.28	0.16	0.21
B_2	0.17	0.24	0.24	0.22
B_3	0.21	0.21	0.21	0.21
المعدل	0.18	0.23	0.21	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	N.S	0.03981	N.S	

4-3-6: محتوى النتروجين الجاهز في التربة (ملغم N كغم تربة$^{-1}$):

اظهرت النتائج الموضحة في جدول (19) ان لأضافة الغشاء الحيوي تأثيراً معنوياً في تركيز نتروجين التربة إذ اشارت النتائج الى تفوق معاملات الغشاء الحيوي على معاملة المقارنة وبغض النظر عن نوع اللقاح الحيوي وبدون فروق معنوية بين معاملات التلقيح إذ سجلت معاملة B2 اعلى معدل بلغ 54.27 ملغم N كغم تربة$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت 45.7% من معاملة المقارنة التي سجلت 37.24 ملغم N كغم تربة$^{-1}$ وتلتها معاملتي B3,B1 إذ سجلتا معدلات بلغت (54.24 ،54.11) ملغم N كغم تربة$^{-1}$ وربما يعود السبب الى دور التسميد الحيوي في رفع معدل التحرر البطيء للعناصر المغذية وهذا يؤدي إلى خفض الكمية المغسولة منها ولاسيما النتروجين وهذا يتفق مع ما وجدهُ (Shafeek وآخرون ،2014).

من جهة اخرى بينت نتائج الجدول (19) تأثير اضافة المادة العضوية في صفة محتوى النتروجين الجاهز في التربة إذ اشارت النتائج الى تفوق مستوى التسميد العضوي O_2 على معاملتي O_1,O_0 إذ سجلت معدل بلغ 55.09 ملغم N كغم تربة$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت 26.2% من معاملة المقارنة التي سجلت معدل بلغ 43.66 ملغم N كغم تربة$^{-1}$ بينما سجلت المعاملة O_1 معدل بلغ 51.15 ملغم N كغم تربة$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت 17.2% من معاملة المقارنة وربما يعود سبب ذلك الى دور المادة العضوية في زيادة محتوى التربة من النتروجين الجاهز عند اضافتها وبذلك سوف تحصل زيادة بأمتصاص النتروجين من قبل النبات ويعد دالة للنتروجين الجاهز في التربة وهذا يتفق مع ما وجدهُ (Cooper ،2008).

النتائج الموضحة في جدول (19) تشير للتداخل بين الغشاء الحيوي والمادة العضوية إذ تفوقت المعاملات ($B_2O_2,B_3O_2,B_3O_1,B_1O_2$) معنوياً على باقي معاملات التداخل إذ سجلت معدلات بلغت (59.40،58.80،58.37،58،30) ملغم N كغم تربة$^{-1}$ بالتتابع بينما سجلت معاملة المقارنة (B_0O_0) اقل معدل بلغ 30.17 ملغم N كغم تربة$^{-1}$ وقد تعود الزيادة إلى أن استعمال الغشاء الحيوي المزدوج قد يؤدي إلى استعمار منطقة الرايزوسفير وزيادة حموضة التربة حيث يصل تركيز H^+ المفرز الى اربعة اضعاف مقارنة مع اللقاح المفرد (Senerivatne وآخرون 2009) وزيادة الحموضة في المواقع الدقيقة القريبة من الشعيرات الجذرية يؤدي الى زيادة تركيز NH^+4 في محلول التربة (Xu وآخرون ، 1997).

جدول (19) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في محتوى النتروجين الجاهز في التربة(ملغم N كغم تربة$^{-1}$)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	30.17	37.70	43.87	37.24
B_1	49.57	54.47	58.30	54.11
B_2	49.33	54.07	59.40	54.27
B_3	45.57	58.37	58.80	54.24
المعدل	43.66	51.15	55.09	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	1.072	0.929	1.857	

4-3-7: محتوى الفسفور الجاهز في التربة (ملغم P كغم تربة$^{-1}$):

تشير معطيات جدول (20) الى تأثير اضافة الغشاء الحيوي في محتوى الفسفور الجاهز في التربة إذ اضهرت النتائج حصول زيادة معنوية في محتوى الفسفور في معاملتي B_1,B_3 إذ سجلتا معدلات بلغت (25.57، 24.33) ملغم P كغم تربة$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت (25.2% ،19.1%) بالتتابع من معاملة المقارنة التي سجلت 20.43 ملغم P كغم تربة$^{-1}$ بينما سجلت المعاملة B_2 اقل معدل في محتوى الفسفور في التربة بلغ 18.33 ملغم P كغم تربة$^{-1}$ ، وقد يعود السبب الى دور الغشاء الحيوي للأحياء المجهرية المذيبة للفوسفات تقوم بإنتاج أنواع مختلفة من الأحماض العضوية منها حامض الستريك والأوكزاليك والتي تعمل على اذابة مركبات الفوسفات غير الذائبة فضلاً عن دورها في منافسة الفوسفات على موقع الأمتزاز ذات الطاقة العالية والتي تزيد في جاهزية الفوسفات كما ينتج من تحرير الأحماض العضوية انخفاض في pH

وخاصة في منطقة الرايزوسفير والذي يؤدي الى زيادة جاهزية الفسفور بسبب الأذابة الحاصلة له من مركباته غير الذائبة وهذا يتفق مع ما وجدهُ (راهي وآخرون ،1994).

كما اوضحت النتائج المبينة في جدول (20) حصول زيادة معنوية في صفة محتوى التربة من الفسفور عند مستوى التسميد العضوي O_2 إذ سجل معدل بلغ 26.20 ملغم P كغم تربة$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت 27.2% من معاملة المقارنة التي سجلت 20.59 ملغم P كغم تربة$^{-1}$ بينما سجل المستوى O_1 اقل معدل بلغ 19.69 ملغم P كغم تربة$^{-1}$ ، وربما يعود السبب الى دور المادة العضوية حيث تعمل على تقليل تكوين قشرة غير مسامية عند سطح التربة وذلك بزيادة تماسك حبيبات التربة وتقليل تفرقها الذي قد يحدث نتيجة لتساقط الأمطار وزيادة بعض العناصر المُغذية للنبات مثل الفسفور والعناصر الأخرى كما تخفض المادة العضوية من الكثافة الظاهرية للتربة فتزيد من مساميتها وعندئذ تصبح بيئة التربة أكثر صلاحية لتغذية النبات ونموه وتحقيق إنتاج جيد وهذا يتفق مع ما وجدهُ (Havlin وآخرون، 2005 ونسيم ،2005).

اظهرت نتائج التداخل الثنائي بين الغشاء الحيوي والسماد العضوي فرقاً معنوياً في صفة محتوى الفسفور في التربة فأعلى قيمة كانت عند التداخل بين المعاملة B_1 ومستوى التسميد العضوي الثالث O_2 إذ بلغت 33.26 ملغم P كغم تربة$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت 67.6% من معاملة المقارنة التي سجلت 19.84 ملغم P كغم تربة$^{-1}$وتلتها معاملة التداخل B_3O_2 إذ سجلت معدل بلغ 29.64 ملغم P كغم تربة$^{-1}$ بينما سجلت معاملة التداخل B_0O_1 اقل معدل بلغ 17.53 ملغم P كغم تربة$^{-1}$.

جدول (20) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في محتوى الفسفور الجاهز في التربة(ملغمP كغم تربة$^{-1}$)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	19.84	17.53	23.91	20.43
B_1	24.56	18.88	33.26	25.57
B_2	18.25	18.71	18.02	18.33
B_3	19.73	23.63	29.64	24.33
المعدل	20.59	19.69	26.20	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	3.252	2.816	5.632	

4-3-8: محتوى البوتاسيوم الجاهز في التربة (ملغم K كغم تربة$^{-1}$):

أشارت نتائج التحليل الإحصائي في ملحق (4) عدم وجود تأثير معنوي لمعاملات الغشاء الحيوي ومستويات السماد العضوي والتداخل بينهما في صفة محتوى البوتاسيوم الجاهز في التربة لنبات الحنطة (ملغم K كغم تربة$^{-1}$).

جدول (21) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في محتوى البوتاسيوم الجاهز في التربة(ملغم K كغم تربة$^{-1}$)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	117.73	150.93	195.67	154.66
B_1	192.87	153.23	170.77	172.29
B_2	124.83	185.73	170.23	160.27
B_3	163.90	153.13	111.56	142.86
المعدل	149.74	160.76	162.06	
L.S.D. 0.05	B	O	B*O	
	N.S	N.S	N.S	

4-3-9: تركيز الكبريت الجاهز في التربة (ملغم S كغم تربة$^{-1}$):

اظهرت نتائج الجدول (22) ان للتلقيح بالغشاء الحيوي تأثيراً معنوياً في محتوى الكبريت الجاهز في التربة مقارنة بعدم اضافة الغشاء الحيوي ،فقد اشارت نتائج الجدول الى تفوق معاملة B_2 إذ سجلت اعلى معدل لمحتوى الكبريت في التربة بلغ 3131.39 ملغم S كغم تربة$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت 48.7% من معاملة المقارنة التي سجلت 2106.27 ملغم S كغم تربة$^{-1}$ ،وقد يعود السبب الى ان التلقيح بالبكتريا المؤكسدة للكبريت يؤدي الى زيادة جاهزية الكبريت في التربة اذ انها تؤكسد مركبات الكبريت غير تام الأكسدة الى الكبريتات (Soaud وآخرون ،2011).

كما بينت النتائج في جدول (22) التأثير الواضح لمستويات التسميد العضوي في محتوى الكبريت في التربة إذ تم الحصول على فروق معنوية بين مستويات السماد العضوي المضاف ابتداءاً من معاملة المقارنة

O_0 وحتى اعلى مستوى O_2 إذ سجلت معاملة التسميد العضوي بالمستوى الثالث O_2 نسبة زيادة بلغت 10.5% من معاملة المقارنة ،كما تفوق مستوى التسميد العضوي الثاني O_1 على معاملة O_0 إذ سجل معدل بلغ 2641.76 ملغم S كغم تربة$^{-1}$ وقد يعود السبب الى دور المادة العضوية التي تزداد بزيادة محتوى الكبريتات الجاهزة في التربة وذلك بسبب تحول صور الكبريت المعدني الى العضوي بالتربة بفعل الأحياء التربة المجهرية.

من جهة اخرى يتبين من الجدول وجود فروق معنوية بين معاملات التداخل الثنائي بين الغشاء الحيوي والسماد العضوي في صفة محتوى الكبريت في التربة إذ سجلت معاملة B_2O_2 اعلى معدل بلغ 3326.87 ملغم S كغم تربة$^{-1}$ بنسبة زيادة بلغت 67% من معاملة المقارنة التي سجلت اقل معدل بلغ 1992.49 ملغم S كغم تربة$^{-1}$.

جدول (22) تأثير الغشاء الحيوي Biofilm ومستويات المادة العضوية والتداخل بينهما في محتوى الكبريت الجاهز في التربة (ملغم S كغم تربة$^{-1}$)

المادة العضوية / الغشاء الحيوي	O_0	O_1	O_2	المعدل
B_0	1992.49	2060.48	2265.84	2106.27
B_1	2560.38	2638.01	2710.18	2636.19
B_2	2944.75	3122.54	3326.87	3131.39
B_3	2572.59	2746.01	2821.73	2713.45
المعدل	2517.55	2641.76	2781.15	
	B	O	B*O	
L.S.D. 0.05	51.95	44.99	89.98	

5- الأستنتاجات والمقترحات Conclusions and Proposals:

5-1: الأستنتاجات Conclusions:

1. قدرة عزلات بكتريا *P. flurescens* وبكتريا *T. thioparus* على انتاج الأغشية الحيوية Biofilms بدرجات متباينة.
2. إن استخدام الغشاء الحيوي سجلَ تأثيراً معنوياً (0.05) واضحاً في الصفات المدروسة للحنطة (حاصل الحبوب ،وزن 1000 حبة ،الكمية الممتصة من النتروجين والفسفور في المجموع الخضري ،محتوى النتروجين وتركيز الكبريت في التربة).
3. ان استعمال المادة العضوية 1% يعد مناسباً لنمو نبات الحنطة إذ تفوق معنوياً في (محتوى النتروجين والفسفور وتركيز الكبريت في التربة).

5-2 :المقترحات Proposals:

1. اجراء المزيد من البحوث العلمية حول جدوى صناعة اسمدة حيوية مدعمة بالأغشية الحيوية في تحفيز نمو وزيادة الحاصل للنبات.
2. تقييم دور الأغشية الحيوية لوحدها كسماد حيوي عند اضافتها للبذور او التربة لكونها تحفز نمو الأحياء المجهرية النافعة في التربة.
3. التوسع في مجال البحوث المختصة بالبكتريا المكونة للغشاء الحيوي واختبار عدة اجناس بكتيرية مهمة اخرى في هذا المجال.

6-المصادر References :

6-1 المصادر العربية :

ابوضاحي ، يوسف حمد ومؤيد احمد اليونس .(1988). دليل تغذية النبات . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي . العراق.

البحراني، ايمان قاسم محمد . (2015) . تأثير البكتريا المذيبة للفوسفات وحامض الهيومك في اتزان الفسفور وجاهزية المغذيات و حاصل الذرة الصفراء(*Zea mays* L) . أطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة بغداد .

بلازيفيك ، دوناج ، كريسي ماري ادرر (1983) . مبادى الاختبارات الكيميائية الحيوية في علوم الاحياء المجهرية التشخيصي . ترجمة صائب نظمي السخن ، مطبعة جامعة الموصل (160 صفحة) .

البلخي ,مصطفى . (1990) .الاسمدة الحيوية واهميتها في الزراعة النظيفة .جامعة دمشق- كلية الزراعة .

الذهب، ازهار عمران لطيف . (1998) . الفعالية التضادية لمستخلصات نباتات عراقية في بعض البكتريا الممرضة . رسالة ماجستير . كلية العلوم –جامعة بابل .

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله . (2000) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . كلية الزراعة . جامعة الموصل . الطبعة الثانية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جمهورية العراق .

الربيعي ،شذى ماجد (1995). تقويم جاهزية البوتاسيوم في التربة العراقية باستخدام معايير الثرموديناميكية .رسالة ماجستير .كلية الزراعة –جامعة دمشق.

الركابي ،صوفيا جبار (2017). تأثير غشاء حيوي فطري بكتيري كسماد حيوي في في نمو وحاصل الحنطة .اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة –جامعة بغداد.

العسافي,ادهام علي عبد واحمد شاكر وسيف الدين عبد الرزاق.(2013).عزل وتشخيص البكتريا المؤكسدة والمختزلة للمياه الكبريتية في منطقة الكيلو 70 في صحراء الانبار الغربية.مجلة الانبار للعلوم الزراعية.11 (2):1992-1979.

الفضلي ، جواد طه محمود ، (2011) تأثير التسميد العضوي والمعدني في نمو وحاصل البطاطا (*Solanumtublersum*L.) أطروحة دكتوراه/كلية الزراعة. جامعة بغداد.

الكرخـــي ، عنـــاء داودخمـــاس .(2001). تـــأثير بعـــض العوامـــل الفزيائيـــة والكيميائيـــة والحياتيـــة علـــى نمـــو ســـلالة بكتريـــا *Psudomonas fluorescens CHAO* وكفاءتهـــا التثبيطيـــة للفطـــر (*Rzoctonin solani kuhu*) المســـبب لمـــوت بـــادرات الطماطة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة البصرة.

الكرطـــاني، عبـــدالكريم عريبـــي ســـبع و حســـن ، عبـــدالله عبـــدالكريم و يوســـف، هبـــة محمـــد . (2018) . اختبـــار كفـــاءة بكتريـــا *Pseudomonas fluorescens* فـــي تحفيـــز نمـــو نبـــات الـــذرة الصـــفراء *Zea mays* L واســـتحثاث مقاومتـــه الجهازيـــة ضـــد مـــرض الـــتعفن الفحمـــي. مجلـــة جامعـــة تكريـــت للعلـــوم الزراعيـــة المجلـــد (18) العـــدد (1) : 137-149 .

اللامـــي ، صـــبيحة حســـون كـــاظم (2004). تأثيرمعـــدلات البـــذار ومســـتويات النتـــروجين وخلـــيط مبيـــدي ادغـــال فـــي نمـــو وحاصـــل حنطـــة الخبـــز . *Triticum aestivum* L. اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة الموصل.

المحمـــدي، عمـــر هاشـــم مصـــلح(2009). اســـتخدام الأســـمدة الحيوانيـــة والشـــرش كأســـلوب للزراعـــة العضـــوية وتأثيرهـــا فـــي نمـــو وإنتـــاج البطاطـــا. أطروحـــة دكتـــوراة، كليـــة الزراعة ،جامعة بغداد.

النعيمي,ســـعد الله نجـــم عبـــد الله . (1987).تقيـــيم طـــرق اضـــافة المـــادة العضـــوية علـــى جاهزيـــة الفسفور لنبات الطماطة .رسالة ماجستير.كلية الزراعة.جامعة بغداد.

اليـــونس ، عبـــد الحميـــد احمـــد ، محفـــوظ عبـــد القـــادر زكـــي عبـــد اليـــاس . (1987) . محاصـــيل الحبوب . مديرية دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل . العراق .

بـــو عيســـى ، عبـــد العزيـــز ؛علـــوش غيـــاث .(2005).خصـــوبة التربـــة وتغذيـــة النبـــات (الجـــزء النظري). منشورات جامعة تشرين .كلية الزراعة .301 صفحة.

جـــدوع ،خضـــير عبـــاس وحمـــد محمـــد صـــالح (2013) . تســـميد محصـــول الحنطـــة . وزارة الزراعـــة . البرنـــامج الـــوطني لتنميـــة زراعـــة الحنطـــة فـــي العـــراق . نشـــرة ارشـــادية . رقم :2.

جـــديع ,اســـماعيل عبـــاس وحيـــدر رشـــيد حســـن وليـــث جاســـم محمـــد وشـــيماء عبـــد اللطيـــف موســـى ، (2009) أســـتخدام البكتريـــا *Pseudomonas fluorescence* كمخصـــب حيـــوي لتحســـين نمـــو وأنتاجيـــة نبـــات الحنطـــة . مجلـــة الزراعـــة العراقيـــة (عدد خاص مجلد 14 عدد 7) .

خليل، خليل خالد و الكرطاني، عبدالكريم عريبي سبع .(2018). عزل وتشخيص بكتريا الزوائف *Pseudomonas* المشجعة لنمو النبات من المنطقة المحيطة بجذور بعض النباتات النامية في ترب جبسية في محافظة صلاح الدين. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد (18) العدد (1) : 124-136 .

دعبول،جورج طلال (2008). تأثير بعض الاسمدة العضوية في أنتاجية صنفي العنب البلدي والحلواني .أطروحة دكتوراه .كلية الزراعة-جامعة دمشق.

راهي، حمد الله سليمان وظافر فخري الراوي . (1994) . مقارنة كفاءة الاسمدة الفوسفاتية في تجهيزها للفسفور لنبات الذرة الصفراء . مجلة العلوم الزراعية العراقية . المجلد(25) العدد الاول .

زكي، لبنى نوح أمين ومحمد محمود عبد الحليم (2007). أستخدم الكائنات الحية الدقيقة النافعة في الزراعة (EM1) . 47 ص.

سعيد، فالح حسن(2015). الادارة المتكاملة للأسمدة الكيميائية والعضوية والاحيائية وتأثيرها في نمو وانتاجية بعض التراكيب وراثية لنبات الخيار.أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة –جامعة بغداد.

سلوم,محمد عبيد وسلام زكي علي .(2011). تاثير مستويات الكبريت الزراعي في جاهزية الفسفور ونمو نبات القرنابيط .*Brassica oleracea* L تحت ظروف الري السطحي والتنقيط .مجلة ديالى للعلوم الزراعية .3 (2): 457-467.

عبد العزيز , عاطف (2006) . اساليب رفع خصوبة التربة تحت نظام الزراعة العضوية . المؤتمر و المعرض الدولي الثاني عشر – الاتجاهات الواقع والمستقبل في انتاج وتصنيع وتسويق النباتات الطبية والعطرية – الجمعية المصرية لمنتجي ومصدري النباتات الطبية والعطرية (اسماب) . . ص 51-50.

عطية ,حاتم جبار وكريمة محمد وهيب .(1989). فهم انتاج المحاصيل .الجزء الثاني .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .جامعة بغداد ع. ص:483 .

علي ، نور الدين شوقي علي وحمد الله سليمان راهي و عبد الوهاب عبد الرزاق شاكر(2014).خصوبة التربة .جامعة بغداد. دار الكتب العلمية للطباعة والنشر والتوزيع.

علي ،نور الدين شوقي وشفيق جلاب سالم (2012). كيمياء التربة .مترجم عن Garrison Edition 2nd.مطبعة دار الكتب العلمية .كلية الزراعة .جامعة بغداد.وزارة التعليم العالي .جمهورية العراق.

عمـــران ، محمـــد الســـيد (2005) . خصـــوبة الأراضـــي وتغذيـــة النبـــات . الـــدار العربيـــة للنشـــر والتوزيع .

فـــارس، فـــاروق صـــالح. (1998). الـــدورة التدريبيـــة المحليـــة حـــول تحســـين الخصـــائص الكيميائيـــة والفيزيائيـــة للتربـــة بواســـطة أضـــافة المحســـنات العضـــوية وغيـــر العضوية. مسقط – سلطنة عمان.3-1998/10/7.

قاســم,غياث محمــد ومضــر عبــد الســتار علــي .(1989).علــم احيــاء التربــة المجهريــة, مطبعــة جامعة الموصل.

قنديل، نبيل(2009). ندوة حول الآثـــار البيئية للإسراف في الأسمدة الكيماوية. معهد

كومـــار، فيفـــك(2010).محاضـــرة حـــول مخصـــبات النبـــات الحيويـــة البـــديل الأمثـــل للأســـمدة الكيماوية ،الهيئة العامة لشؤون الزراعة، الكويت. جريدة القبس، العدد 13464

نسيم، ماهر جوجي.(2005). خصوبة الأراضي والأسمدة. كلية الزراعة –جامعة الاسكندرية .ع. ص. 215.

2-6 المصادر الأجنبية :

Abdel GhanyT.M., M.M. Alawlaqi and M.A. Al Abboud.(2013). Role of biofertilizers in agriculture: a brief review. Mycopath (2013) 11(2): 95-101.

Abdel-Mawgoud AMR, El-Bassiouny AM, Ghoname A, Abou-Hussein SD (2011) foliar application of amino acids and micronutrients enhance performance of green bean crop under newly reclaimed land conditions. Aust J Basic Appl Sci. 5(6): 51-55.

Adesemoye,A.O.;Torbert, H.A. and Klopper,J.W.(2008). Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system .Can .J. Microbiol .,54:876-86.

Akbari, P., Ghalavand, A., Modarres Sanavy, A.M. and M. Agha Alikhani (2011). The effect of biofertilizers, nitrogen fertilizer and farmyard manure on grain yield and seed quality of sunflower (*Helianthus annus* L.). Journal of Agricultural Technology 2011 Vol. 7(1): 173-184.

Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology. 2nd (ed.), bJohn Wiley and Sons.New York.

Allen, O.N. (1953). Experiments in soil bacteriology. Burgress Publishing Co. Minneapolis, Minnoesota.

Al-Shamma, Utoor Hussam Al-Deen (2013). Integration effect of nitrogen fixing bacteria isolated from soil and sub recommended rates of chemical fertilizers on growth and yield of wheat *Triticum aestivum* L. Msc.Thesis, College of Science Univ.of Baghdad.

Altomare and lyanka, T. (2011). Beneficial Soil Microorganisms, an Ecological Alternative for Soil Fertility Management. Sustainable Agriculture Reviews Volume 7: 161-214.

Amara, M.A.; Rabie, K.E. and Talkhan, F.N. (1996). Activity of *pseudomonas fluorescens* mutant in relation to growth production and biologyical control in tomato plant Annals of Agrisci .Cairo, 41:111 124, (Astir).

Amiri, M.E. (2008). Impact of Animal Manures and Chemical Fertilizers on Yield Components of Saffron (*Crocus sativus* L.).

Anonymous. (2005). EM Application Manual for APNAN Countries. The Third Edition. PP: 91.

Artursson, V.; Finlay, R.D. and Jansson, J.K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. Environmental Microbiology 8, 1–10.

Atee, A. S., and F. H. AL-Sahaf. (2007). Potato production by organic farming: 1- role of organic fertilizer on soil physical properties and microorganism number. The Iraqi journal of agricultural sciences -38(4):36-51.

Atlas, R.M.; Brown, A.E. and Parks, L.C. (1995). "Experimental Microbiology Laboratory Manual". McGraw-Hill Companies, Mosby Company, St. Louis, pp. 400-402.

Austin, R.B. (1978). Actual and potential yields of wheat and barley in the United Kingdom .ADAS. Quarterly Review.29:76-87.

Badawy, A.A. (2008). Effect of water stress and some conditioners on the productivity of peanut crop and water relation in sandy soil.J. Biol. Chem. Environ. Sci., 3(1):445-454.

Baldock, J.A. and P.N. Nelson.2000 . Soil Organic Matter. In M.E Sumner. (Ed) (2000) HandBook of Soil Science .CRC Press pp D18-D38.

Banbelkacem ,A.;Mekin ,M.S. and Rasmusson ,D ,C.(1984) . Breeding for high tiller number and yield in wheat .Crop Sci .24:968 -972.

Bandara, W. M. M. S.; G. Seneviratne and S. A. Kulasooriya (2006). "Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials". J. Biosci. 31: 645-650.

Barakat,M.R.J Yehia , T.A and sayed , B.M. (2012) Response of New hall Naval orange to Bio-organic fertilization under newly reclaimed area conditions livegetative growth and nutrition status. Journal of Horrticultural science and Ornam ental plants, 4(1):18-25.

Barker A. V. and D. J. Pilbeam. (2007). Plant Nutrition. Taylor and Francis group, Boca Raton London New Yourk. pp 613.

Barker, A.V. and M. Bryson. (2007) . Nitrogen .in A.V. Barker, and D.J. Pilbeam, (Ed)" Handbook of Plant Nutrition". CRC Taylor & Francis Group.

Baron, E. J. and Finegold, S. M. (1990). Diagnostic Microbiology. 8th ed. C. V. Mosby Company. USA.

Bashan, Y .and Levanony, H. (1988). Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cdto quartz sand and to a light-textured soil by protein bridging. J GenMicrobiol; 134:2269–79.

Bashan, Y. (1986). Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. J. Gen. Microbiol. 132: 3407–3414.

Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances16, 729–770.

Beech I.B, and Gaylarde C.C. (1989). Adhesion of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* to mild steel surfaces. J Appl Bacterial; 67:2017.

Bergeyes Manual of Determaniative Bacterio Logy. (1957). Breed, R.S.; Murrey, E.G.D.; Smth, N.R.and Contributors, N.F.U.S.A.

Besharati, H. A. K. and Hatami, S. (2007). Biosuper asaphophate fertilizer in a calcareous soil with low available phosphorus.African J. of Biotechnology .6(11):1325-1329.

Bianciotto, V; Andreotti, S.; Balestini, R.; Bonfante, P.and Perotto, S. (2001). Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased abilityin biofilm formation on mycorrhizal andnonmycorrhizal carrot roots. Mol. Plant- Microbe Interact. 14:255–60

Biró, B.; Köves-Péchy, K.; Vörös, I., Takács, T.; Eggenberger, P. and Strasser R.J. (2000). Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. Applied Soil Ecology 15, 159–168.

Black. C.A. (1965). Methods of soil analysis, Amer. Soc. of Agron. Inc.USA.

Blouet,A.;Perrissin-Fabert,D.;Arissian,M.and uckert,A.(1991). Role of Imazquin inAC4447:effects on roots and flag leaves of winter Wheat .Brighton crop protection conference-weeds.973-980.

Bot, A. and J. Benites. (2005). the importance of soil organic matter Key to drought-resistant soil and sustained food and production.food and agriculture organization of the united nations Rome fao .pp.78.

Bottini, R.; F. Cassan; P. Piccoli. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. Applied Microbiology and Biotechnology, 65: 497-503.

Branda, S.S.; Vik, S.; Friedman, L.and Kolter, R. Biofilms: The matrix revisited. Trends Microbiol. (2005), 13, 20–26.

Bremner, I. M. (1965). Inorganic forms of nitrogen. In C. A. Black (1965) Methods of soil analysis. Soc. Of Agron. Inc. U.S.A.

Buchanan, R.E. and Gibbons, M.E. (1974). Bergeỳs Manual of determinative Bactriology .8th ed.Williams and Wilkins Co, Baltimore, Maryland.

Buddhika, U.V.A.; Seneviratne, G. and Abayasekara, C.L. (2012). Biofilmed Biofertilizers for Maize (*Zea mays* L.): Effect on Plant Growth under Reduced Doses of Chemical Fertilizers. Proceedings of the Abstracts of Jaffna University International Research Conference (JUICE-2012).

Bullitt, R.and Makowski, L. (1995). Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. Nature; 373:164–7

Burmolle, M.; Webb, J.S.; Rao, D.; Hansen, L.H.; Sørensen, S.J. and Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. Applied and Environmental Microbiology 72, 3916–3923.

Buxton, A. and Frase, G. (1977). Animal microbiology vol (1) Black well scientific publication, 145.17.

Campbell, C. and A. Zentner.(1993). Soil organic matter as Cao, Y., X.R influenced by crop rotation and Fertilization Soi.Sci. Soc.Amr.J.57:1034- 1040.

Characklis, W.G.; Mcfeters, G.A. and Marshall, K.C (1990) .Physiological ecology biofilm system .In Characklis WG, Marshall KC (Eds) Biofilm .Wiley, New York, pp341-393.

Chen, M., and Alexender, M. (1973). Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. Soil Biol. Biochem. 5:213-220.55:85-90.

Chien, S. H. (1977). Dissolution rates of phosphate rocks .Soil Sci.Soc.Am.J.41:656-657.

Choudhari, A.B., Phirlce, N.V, Patil, M.G, Talegaonkar, S.K, and R.M. Kothari (2008). Bio fertilizers and soil conditioner for organic farming .IN Biofertilizer.Pointer Publishers. Jaipur 302003(Raj) India P: 41.

Choudhary Seema and P.C**.Trivedi. (2008)**. Bio fertilizer: boon for Agriculture .In bio fertilizer .Pointer publishers. Jaipur 302003(Raj) India P: 1-35.

Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Bison, A.L.and Beachey, E.H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces .Infect Immum; 37:318-26.

Collee, J. G.; Miles, R. S. and Watt, B. (1996). Tests for the Identification of Bacteria. In: Practical Medical Microbiology 14th ed. Ed. by J. Gerald Collee, Barrie, P, Marmion, Andrew, G.; Fraser and Anthony Simmons. Churchill Livingstone. New York. P. 132 – 149.

Cooper, J**., (2008)** Soil tests and their valueas indices of N availability to crops. In: Ir.G.L vander Burgt and Iv.B.Timmernans (eds.) soil nitrogen: Reseavch and extension. Lois Bolk INST. The Nethertands.

Corpe, W.A. (1980). Microbial surface components involved in adsorption ofmicroorganisms onto surfaces. In: Bitton G, Marshall KC, editors.Adsorption of microorganisms to surfaces. New York: John Wiley &Sons; p. 105–44.

Costerton, J. W.; and Lappin-Scott, H. M. (1995). Introduction to microbial biofilms, p. 1–11. *In* H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), Microbial biofilms. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Costerton, J. W.; Geesey, G. G. And Cheng, G. K. (1978). How bacteria stick. Sci. Am. 238:86–95.

Costerton, J.W.; Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.

Cowan, S.T. (1977). Cown and steel manual for the identification of medical bacteria .2nded Cambridge University Press, Cambridge.

Curtis, B.C. (1982). Potential for yield increase in wheat .In: Proc .wheat Research Conf .Washington.5-19.

Devai, I. and R.D. Delaun. (2000). Emissions of reduced gaseous sulfur compound from west water sludge. Eviron.Eng.Sci.17 (1)1-8.

Dunlap, J .R. S. and Mass J. (1989) .Reflectance transmittance and absorptance of light by normal etiolated and albino corn leaves .Agron J.81:105-110.

Elia, A.; P. Santamaria and F. Serio. (1998) Nitrogen Nutrition, yield and quality of spinach. J. Sci. Food Agric. 76:341-346.

El-Komy, H.M.A. (2005). Co-immobilization of A.lipoferum and B.megaterium for plant nutrition .Food Technol Biotech.43 (1): 19-27.

Emky,H.;Valdebebenito,R.;Tamora,C.A.;Lesile,E.A.;Nathaly,M.R.T.; Katherine ,E.S.;German,E.A.and Homero,E.U.(2010).Thiosulphate oxidation by thiobacillus thioparus and Halothiobacillus neapolitonus strains isolated from the petrochemical industry.Electronic J. of Biotecnology.12:0717-3458.

Espinosa-Urgel, M.; Kolter, R.and Ramos, J. L. (2002). Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. Microbiology 148:341-343.

Fankem H., Nwaga D., Deubel A., Dieng L., Merbach W.and Etoa F.S. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree rhizosphere in Cameroon. Afr J. Biotech. 5: 2450-2460.

Feltham, K. A.; Power, A. K.; Pell, P. A. and Sneath, P. H. (1978). Asimple method for the strorage of bacteria. J. App. Bacteriol. 44,313-316.

Flemming, H.C.; Wingender, J.and Griegbe, Mayer C. (2000). Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. P 19-34.

Flugg, C. (1886). Die Mikroorganismen, 2. Aufl Leipzing: F.C.W.Vogel. (CF Luzzan A.Z.1976).

Frases, S.; Chaskes, S.; Dadachova, E. and A. Casadevall. (2006). Induction by *Klebsiella aerogenes* of a melanin-like pigment in *Cryptococcus neoformans*. Appl. Environ. Microbiol. 72:1542–1550.

Frases, S.; Salazar, A.; Dadachova, E. and A. Casadevall. (2007). *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 73:615–621.

Fravel, D.R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease .Rev. Phytopathology 78:75-91.

Freney, J.R. and Steveson (1966). Organic sulfur transfor matron in soil. Soil Sic. 101; 307-316.

Frommel M. I, Nowak J. And Lazarovits G. (1993). Treatment of Potato Tubers with a Growth Promoting *Pseudomonas* sp.: Plant Growth Responses and Bacterium Distribution in the Rhizosphere, '' Plant and soil, Vol. 150: 51-60.

Gadd, G. M. (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radio nuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycological Research, 111:3-49.

Ghosh SC, PK Omanwar, RS Sachen and RB Sharma. (1981). Reserves of organic and total phosphorus in cultivated and Brorested mothosols.J. Indian Soc. Soil Sci.., 29: 332-336

Gijsman, A.J., (1990) Soil water content as akey factor determining the source of nitrogen (NH^{+}_{4} or NO_3) absorbeo by Douglas_fir (pseudotsu gamen zieii).

Gilbert, P.; Das, J.and. (1997). Foley, I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.*, *11*, 160–167.

Godber, G. E. (1989). The bacteriological examination of water supplies, Department of health and social security, London.

Greeser, M. S. and J. W. Parson. (1979). Sulfunic perchloric acid digestion of plant material of determentation of nitrogen, phosohorus, potassium, calcium and magnesium, Analytical chemical Acta. 109:43:1-436.

Gregory, P. (2006) Plant Roots. Black Well Pub. Ltd., Oxford, UK: P. 318.

Guthrie, H. A. (1989). Introductory Nutrition. Missouri: Times mirro/ Mosby College Publishing, 1989. Hall, Ross Hume. Food Nought-The decline in nutrition Maryland: Harper & Row, (Chapter: Lifeless bread).

Harrigan, W.F .and McCance, D. (1976). Laboratory method in food and dairy. Academic Press, London, New York, San Freancisco.362PP.

Hasan, H.A. (2002). Gibberellin and auxinindole production by plant rootfungi and their biosynthesis undersalinitycalacium interaction .Acta.Microbiol .Immunol .Hung.49 (1):105-118.

Hass D., Defago G., (2005). Biological control of soil born pathogen by *Pseudomonas fluorescens* .nature Rev. microbial. 3:307-319.

Hassan T.U.I ,and A. Bano .(2015) . The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)on soil health and physiology of wheat .Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 15(1),190-201.

Havlin, J.L.; J.D. Beaton; S.L. Tisdale; W.L. Nelson. (2005) . Soil fertility and fertilizers, An Introduction to Nutrient Management, 7th Ed, Upper Saddle River New Jersey. USA. pp.515.

Haynes, R.J. (1980). Acomparison of two modified kjeldahl digestion techniques for multi – element plant analysis with conventional wet digestion and dry ashing method .Communications in soil & plant analysis.11 (5):459-467.

Herath H.M.L.I.; Senanayeke D.M.N.; Seneviratne G, and Bandara D.C (2013). Variation of biochemical expressions of developed fungal-bacterial. Biofilms over their monocultures and its effect on plant growth. Trop Agric. Res. 24: 186–192.

Herath, H. M. L. I.; MenikdiwelaK. R.; IGalavithanaA. D.and SeneviratneG. (2015). Developed Fungal-Bacterial Biofilms Having Nitrogen Fixers: Universal Biofertilizers for Legumes and Non-Legumes.See discussions, stats, and author profiles for this publicationat:https://www.researchgate.net/publication/283119922

Heredia, W.; P. Peirano; C Borie and M. Zuilera. (2002) Soil organic matter-metal interaction in chileen volcanic soil.

Hinsa, S.M.; Espinosa-Urgel, M.; Ramos, J.L., and O'Toole, G.A. (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. Mol Microbiol 49: 905–918.

Holt, J. G.; Kreig, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual for Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins U.S.A. P.93, 151-155.

Hussain, M.; Wilcox M.H.and White P.J. (1993). The slime of coagu-lase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. FEMS Microbiol Rev; 104:191-208.

Iglewski, B. (2002). Reat- time identification of *Pseudomonas aeruginosa* direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction. J. Clin. Lab. Anal. 15: 131-137.

Iglewski, B. H. (1997). *Pseudomonas*. From Internet explorer. Google. Com http: // www. Iglewski. Com / pubs / pseuare / 1997.

Ingale, **M. G. and N. V. Phirke. (2017)** Study of Nitrifying Bacteria from Arid Soil of Purna Basin of Vidarbha Region Maharashtra, India. Emer Life Sci Res - 3(1): 32-37.

Jackson,M.L.(1958). Soil chemical analysis Prentice Hall.Inc.Englewood cliffs,N.J.USA.P.558.

James, G. A.; Beaudette, L. and Costerton, J. W. (1995). Interspecies bacterial interactions in biolims. *J Ind Microbiol* 15, 257±262.

Janzen, H .H, Larney F.J. and Olson, B.M. (1992). Soil quality factors of problem soil in Alberta .pages 17-28 in proceedings of 29th Annual Alberta soil science workshop, Lethbridge, Alta., Canada.

John, G. H. ; Krieg, N. R. ; Sneath, H. A. ; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994) Bergey 's manual of determinative bacteriology , 9th edition, Williams and Wilkins, U. S. A.

Kader M.A.; Main M.H and Hoque M.S. (2002). Effect Azotobacter inoculant on the yield and nitrogen uptake by wheat .J.Biol .Sci2:259-261.

Kantachote, D. and Innuwat, W. (2004).Isolation of Thiobacillus sp. For use in treatment of rubber sheet wastewater.Songklanakarin J.Sci.Technol, 26(5):649-657.

Keshavarz, A.; N. M. Roshan; M. Moraditochaee; E. Azarpour and A. S. Fekr. (2012). Study Effects of Biological, Manure and Chemicals Nitrogen Fertilizer Application under Irrigation Management in Lentil Farming on Physiochemical Properties of Soil. J. Basic. Appl. Sci. Res., 2(7)6483-6487.

Khan,s.;Haq,F.;Hasan,F.;Saeed,K.Ullan,R.(2012). Growth and Biochemical Activities of Acidithiobacillus thiooxidans Colledected from Black Shale.J.of Microbiology Research ,2(4).78-83.

Kirov, S.M; Webb, J.S. and Kjelleberg, S. (2005). Clinical significance of seeding dispersal in biofilm .Microbiology. 151:3452-3453.

Klausen, M.; Heydorn, A.; Ragas, P.; Lambertsen, L.; Aaes-Jørgensen, A.; Molin, S.; Tolker-Nielsen, T.(2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol. Microbiol. 48, 1511–1524.

Kloepper, J.W and Beauchamp C.J.(1992) .A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria .Can J. microbial .38:1219-1232.

Klopper J. W.; Lifshitz R. and Zablotowicz R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology. 7: 39-44.

Klopper, J.W.; Schroth, M.N. and Miller, T.D. (1988). Effect of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield phytopathol. 70: 1078-1082.

Korber D.R.; Lawrence J.R.; Sutton B.and Caldwell D.E. (1989). Effect of laminar flowvelocity on the kinetics of surface recolonization by Mot+ and Mot-*Pseudomonas fluorescens*. Microb Ecol 1989; 18:1–19.

Kumar Kaushal, U. N. Shukla, Dharmendra Kumar, Anil Kumar Pant and S.K. Prasad K. Prasad. (2013). Bio-Fertilizers for Organic Agriculture Fertilizers for Organic Agriculture Fertilizers for Organic Agriculture. Volume -1.

Langer, R.H and Hanfi, M. (1973).A study of floret development in wheat .Can .J. Plant Sci.72:35-44.

Lata, Saxena AK, Tilak KVBR, (2002). Biofertilizers to augment soil fertility and crop production. In Soil Fertility and Crop Production Science Publishers, USA. Edited by Krishna KR, 279–312.

Lennette, E.H.; Ba; ows, A.; Hausler, W.J. and Shadomy, H.J. (1985). "Manual of Clinical Microbiology". 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 350-372.

Leriche V.; Sibille P.and Carpentier B. (2000). Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. Appl Environ Microbiol; 66:1851-6.

Lewandowski, Z. (2000). Structure and function of biofilms. In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 1-17.

Liderman, W.C.; Abarto, J.J.; Haffiner, W.and Bono, A.A. (1991). Effect of sulfur on sulfur oxidation .Soil Sci.Soc.Am.j.

Lugtenberg BJJ, Dekkers LC, 1999. What makes Pseudomonas bacteria rhizosphere competent? EnvironmentalMicrobiology, 1 (Suppl 1): 9–13.

Lugtenberg, B.J.J.; Kravchenko L.V. and Simons, M. (1999) . Tomatoseed and root exudate sugars: Composition, utilisation byPseudomonas biocontrol strains and role in rhizospherecolonisation. Environ. Microbiol. 1: 439–446

Mabuhay, J.A. N, Nakagoshi, and Y, Isagi. Microbial responses to organic and inorganic amendments in eroded soil. Land Degrade. Dev. 17:321-332.

Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical Bacteria .3rd –Ed.-

Marshall, K. C. (1976). Interfaces in microbial ecology, p. 44-47. Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Mayer, C.; Moritz, R.; Kirschner, C.; Borchard, W.; Maibaum, R.; Wingender, J. and Flemming, H. C. (1999). The role of intermolecularinteractions: studies on model systems for bacterialbio®lms. *Int J Biol Macromol* 26, 3±16.

McEldowney, S.and Fletcher M. (1988) Effect of pH, temperature, and growth conditions on the adhesion of gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene. Microb Ecol 16:183-195.

Mehnaz S, Weselowski B, Aftab F, Zahid S, Lazarovits G, Iqbal J, (2009). Isolation, characterization, and effect of fluorescentpseudomonads on micropropagated sugarcane. Canadian Journal of Microbiology, 55 (Suppl 8): 1007–1011.

Michael ,T.; Madigan ,John.; Martinko, M.; Kelly , S. Bender ,Daniel .;Buckley, H. and David, Stahl A. (2015). Brock Biology Of Micro Orga Nisms.

Migula, W. (1900) System der Bakterien, Vol. 2. Jena, Germany: Gustav Fischer.

Mitchell, B.; Armsrong, C.; Black M. and J.Chapman. (1980). Physiological aspects of sprouting and in developing wheat grains .Seed production .Butter worths: 339-356.

Moinuddin , Tariq Ahmad Dar, Sajad Hussain , M. Masroor Akhtar Khan , Nadeem Hashmi , Mohammad Idrees , Mohammad Naeem and Akbar Ali (2014). Use of N and P biofertilizers together with phosphorus fertilizer Improves growth and physiological attributes of chickpea. Vol. 2 (3), pp. 168-174, October, 2014. Global Science Research Journals**.**

Muneshwar, S., V.P. Singh, K.S. Reddy and M. Singh. (2001). Effect of integrated use of fertilizer nitrogen and farmyard manure or green manure on transformation of N, K and S and productivity of rice-wheat system on a Vertisol. J. Indian Soc. Soil Sci., 49: 430-435.

Nerson, H. (1980) . Effects of population density and number of ears on wheat yield and its component .Field crop Res .3:225-235.

Nguyen, V.K.and Lee, J.U. (2015). Effect of sulfur concentration on microbial removal arsenic and heavy matals from mine tailings using mixed culture of Acidithiobacillus spp.J.of geochemical exploration.148:241-248.

Okoroafor, I.B.; E.O. Okelola; O.N. Edeh; V.C. emehute; C.N. Onu; T. C. Nwaneri and, G. I. Chinaka. (2013). Effect of Organic Manure on the Growth and Yield Performance of Maize in Ishiagu, Ebonyi State, Nigeria. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science. 5(4), pp 28-31.

Olaniyi JO. And Ajibola AT, (2008) the effects of inorganic and organic fertilizers application on the growth, fruit yield and quality tomato (Lycopersicon lycopersicum). Journal of Applied Biosciences 8(1): 236-242.

Ortas, I. (2002). Biological, degradation. In: Lal, R. (ed.), Encyclopedia of Soil Science. Marcel Dekker, USA, pp. 264–267.

Osip,C.; A. Ballescas; L.P. Osip; N.L. Besarino; A.D. Bagayna; and C.B. Jumalon (2000). Philippine council for Agr. Forestry and Natural Resources. Research and Technology. 134: 17-18.

Page, A. L.; Miller, R.H. and Keeney, D. R. (1982). Methods of soil analysis. Part2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd. ed. am. Soc. Agron. , Inc., Soil Sci. Soc. Am., Inc. Madison, Wisconsin. U.S.A.

Polemio, M. and Rhoades, J.D. (1977). Determining cation exchange capacity. A new proced. Ure for caleareous and Gypsi ferous soils. Soil. Sci. Soc. Amer. 1941: 524-528.

Raad, I.I.;Sabbagh, M.F.; Rand, K.H.and Sherertz, R.J. (1992) Quantitative tip culture methods and the diagnosis of central venous catheter-related infection .Diage Microbiol Infect Dis 15:13-20.

Rhoades, J.D. (1982). Soluble salts. In A.L. Page et al., (Ed) Methods of soil analysis, Agronomy No. 9 part 2. 2nd edition.

Richards, L.A. **(1954).** Diagnosis and improvement of saline and alkaline soils. USDA. Hand book 60 USDA. Washington DC. USA.

Roberts M.E. and Stewart P.S. (2005). Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. Microbiology 51, 75–80.

Rodney M. Donlan and J. William Costerton Sutherland I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and stickyframework. Microbiology 2001; 147:3-9.

Rodney M. Donlan; Whipps, J. M. (2002). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52:487–511.lms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases, 881-890.

Rokhzadi A, Asgharzadeh A, Darvish F, Nour-Mohammadi G, Majidi E, (2008). Influence of plant growth promoting Rhizobacteria on dry matter accumulation of Chickpea (*Cicer arietinum* L) under field conditions. Journal of Agriculture and Environmental Sciences, 3 (Suppl 2): 253-257.

Rosas, S.B., Avanzin, G., Carlier, E., Pasluosta, C., Pastor, N., Rovera, M. (2009). Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. Soil. Biol. Biochem. 41, 1802–1808.

Rosenberg, M.; Kjelleberg, S. (1986). Hydrophobic interactions in bacterial adhesion Advances in Microbial Ecology; 9:353–93.

Rovira, A.B. and sands, D.C. (1971). *Fluorescent Pseudomonas* aresidual Component in the soil microflora .J.Appl-Bacteriol. 34: 252-25.

Salim,E.M.;Elsirafy,Z.M and Taha,A.A.(2010). Effect of irrigation methods and N-applications on the utilization of nitrogen by s*ugar* beet grown under arid condition .Aus.J.of Basi.and App.Sci.4(7):2114-2124.

Saravanan P., Kumar, S. S. and Lgnesh. A. (2013).Effect of organic manures and chemical fertilizers on the yield and macronutrient concentrations of green gram. International Journal of Pharmaceutical Science Invention. ISSN (Print): 2319 – 670X, pp18-20.

Sauer, K; Camper, A.K.; Ehrlich, G.D.; Costerton, J.W.and Davies, D.G. (2002).*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm .J Bacteriol .184:1140-1154.

Seneviratne, G, A.P.D.A.; Jayasekara, M.S.D.L; De Silva, c. and Abeysekera, U.P. (2011). Developed microbial biofilms can restore deteriorated conventional agricultural soils. Soil Biology & Biochemistry 43 (2011) 1059-1062.

Seneviratne, G. (2008). Biological nitrogen fixation: potential biotechnological applications beyond biofertilizers. Curr Sci 95:7

Seneviratne, G. (2009). Collapse of beneficial microbial communities and deterioration of soil health: a cause for reduced crop productivity. Curr Sci 96:633.

Seneviratne, G. and Andresen, I.K. (2006). Nitrogen fixation in lichens is important for improved rock weathering. J Biosci 31:639–643.

Seneviratne, G. and Jayasinghearachchi, H.S. (2005). A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. Soil Biology and Biochemistry 37, 1975–1978.

Seneviratne, G.; Jayasekara, A.; De Silva, M.S.D.L.and Abeysekera, U.P. (2011). Developed microbial biofilms can restore deteriorated conventional agricultural oils. Soil Biol. Biochem. 43: 1059–1062.

Seneviratne, G.; Thilakaratne, R.M.M.S.; Jayasekara, A.P.D.A, Seneviratne, K.A.C.N.; Padmathilake, K.R.E.and De Silva M.S.D.L. (2009). Developing beneficial microbial biofilms on roots of non-legumes: a novel biofertilizing technique. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J. editors, Microbial Strategies for Crop Improvement. Berlin Heidelberg; Springer-Verlag. pp. 51–62.

Seneviratne, G.; Zavahir, J.S.; Bandara, W.M.M.S. and Weerasekara M.L.M.A.W. (2007). Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(6), 739–743.

Seneviratne, G.; Zavahir, J.S.; Bandara, W.M.M.S.; Weerasekara, M.L.M.A.W. (2008) . Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. World J Microbiol Biotechnol24:739–743.

Shafeek, M.R.; Faten S. Abdel-Al and Aisha H. Ali, (2004). The productivity of broad bean plant as affected by chemical and/or natural phosphorus with different bio-fertilizer. J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 29 (5): 2727-2740.

Shafeek, M.R.; Magda M.Hafez; Asmaa R.Mahmoud. And Aisha .Ail. (2014). Comparative Effect on N-fixing Bacterial with Fliar Application of Amino Acid Mixed on Growth and Yield of Pea Plant (*Pisum sativum* L)Middle East Journal of Applied Sciences ,4(3):755-761,2014 ,ISSN:2077-4613.

Smith F. A., Jakobsen I., Smith S. E. (2000). Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. New Phytol. 147, 357–366. 10.1046/j.1469-8137.2000.00695.

Soaud,A.A.;Al-Darwish,F;Saleh,M.E.;EL-Tarabily,K.A.;Azirun,M.S. and Rahman,M.M.(2011). Effect of element sulfur, phosphorous, micronutrient and paracoccus versutus on nutrient availability of calcareous soils. Aus.J.Cro.Sci. 5(5):611-619.

Sposito, G. (2008) the chemistry of soils. Oxford University Press.

Stahli ,D.;Perrissian –Fabbert ,D,;Bloet ,A. and Guckert ,A.(1995). Contribution of wheat (*Triticum aestivum* L.) flag leaf to grain yield in response to plant growth regulators .Plant growth regal .16:293-297.

Stephane, P .and Jacques, L. (2000). Specific of biovars of Ralstonia solanacearum in plant tissues by Nested .PCR RELP. Euripen J.Plant Pathology 106:255-265.

Stoodley ,P.;Sauer,K;avies ,DG.;Costerton,JW.(2002). Biofilm as complex differentiated communities .Annual Reviews in Microbiology56,187-209.

Stoodley, P.; Boyle, J.D.; DOdds, I and Lappin-Scott, H.M (1997). Consensus model of biofilm structure .In: Biofilm: community interactions and control. Third meeting of the British Biofilm Club, Gregynog Hall, 1-9.

Sutherland, I. W. (1990). Biotechnology of Exopolysaccharides.Cambridge: Cambridge University Press.

Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology; 147:3-9.

Syiem, Mayashree B. (2005). Entrapped cyanobacteria: Implications for biotechnology .Indian journal biotechnology.Vol.4 (2).P 209-215.

Tahir, M. and M. A. Sarwar. (2013). A Budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. Pak. J. Life Soc. Sci. 11 (1): 1-7.

Tejada, M., Hernandez, M.T., Garcia, C., (2006). Application of two organic amendments on soil restoration: effects on the soil biological properties. Journal of Environmental Quality 35, 1010-1017.

Thomas, G.W. (1982) . Cation Exchangble: In Page .A.L., R.H. Miller and D.R .Kenny (Ed).Methods of Soil Analysis Part (2).2nd Ed Agronomy 9Am.Soc. Agron .Madison Wisconsion.

Thorneyles, M.J. (1960). The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl .Backteriol.1:37-32.

Tisdale, S.L., W.L.Nelson, J.D.Beaton and J.L Havlin. (1997).soil Fertility and Fertilizers. Prentice- Hall of India, New York.

Toljander, J.F.; Artursson, V.; Paul, L.R.; Jansson, J.K. and Finlay R.D. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. FEMS Microbiology Letters 254, 34–40.

Tran Van V, Bergo O, Ke SN, Balandreau J, Heulin T .(2000). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of Burkholderia vietnamiensis on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. Plant Soil 218:273-284.

Ude, S.; Arnold, D.L.; Moon, C.D.; Timms-Wilson, T.and Spiers, A.J. (2006). Biofilm formationand cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. Environ. Microbiol8:1997–2011.

Uppal, M. and Srinivas, C. R. (2004). Wheat induced urticarial. Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology (I JDVL), 70(5): 298-299.

Van de Mortel, M.and Halverson, L.J. (2004). Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. Mol. Microbiol., 52, 735–750.

Vande Broek, A.; Lambrecht, M. and Vanderleyden, J. (1998). Bacterial chemotactic motility is important for the initiationof wheat root colonisation by *Azospirillum brasilense*. Microbiology144: 2599–2606.

Vessey JK .(2003). Plant growth promoting rhizobacteria as bio fertilizers. Plant Soil 255:571-586.

Vidyalakshmi, R.; Paranthaman, R.and Bhakyaraj, R. (2009). Sulphur Oxidizing Bacteria and Pulse Nutrition-A Review.World J. of Agr. Sci. 5(3):270-278.

Vidyalaksmi and Sridar. (2007). Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria.J. Of culture collections.5:73-77.

Violante, A. and L. Gianfreda. (1993). Competition in Adsorption between Phosphate and Oxalate on an Aluminum Hydroxide and Montmorillonite Complex. Soil Sci. Soc. Am. J., 57: 1235-1241.

Weger D.E., L.A.; B.Schippers, and B. Lugtenberg, (1987). Plants Growth stimulation by Biologcal Interference in Iron Metabolism in the Rhizosphere. In Winkle Mann, G.; Van der Helm, D.; Neilands .J.B. (Editors). Iron Transport in microbes, plants and Animals VCH verlagsgesellshaft mbh, Weinheim, Germany. (P.p.387-400).

Wei, L., Y. S. Hai, Z.X. Zhong; W.J. Long and N. J. Feng. (2010). Effects of different modifiers on improvement of acid soils. Journal of Hunan Agricultural University, 36(1): 77-81.

Westrich j, Berner R.A, (1988). The effect of temperature on rates of sulfate reducation in marine sediments, Geomicrobiol. J.99 ,6-117.

Williams, V.and Fletcher, M. (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. Appl Environ Microbiol; 62:1004.

Wu, S.C., Z.H. Cao, Z.G. Li, K.C. Cheung, M.H. Wong. 2005. Effects of bio fertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Geoderma 125 (2005) 155–166.

Wyszkowska, J; Kucharski and Benedycka. (2001). Phsicochemical properties and enzymatic activity of sulfur-acidified horticultural.Soil.J.Enviro.Stu. 10(4):293-296.

Xu, J.M.; Cheng, H.H.; Koskinen, W.C.and Molina, J.A.E. (1997). Characterization of potentially bioreactive soil organic carbon and nitrogen by acid hydrolysis. Nutr Cycl Agroecosyst49:267–271.

Yadav, J.; S. Yadav and S. G. Singh (2011). Plant growth promotion in wheat crop under environmental condition by PSB as Bio-fertilizer. *Research Journal of Agricultural Sciences*. 2(1): 76-78.

Yong, K. K.; Hoom, H.; Dong, P. R.; Young, S. K.; Woong, K. Y.; Ki, P. B. And Bhupathi, K. H. (2002). 2-Ketogluconic Acid Production and Phosphate Solubilization by Enterobacter intermedium. 17th WCSS, August 2002, Thailand, Symposium No. 6.

Yousefi, Abdol amir and Abdol Rahman Barzegar. (2014). Effect of *Azotobacter* and *Pseudomonas* bacteria inoculation on wheat yield under field condition. International Journal of Agriculture and Crop Sciences.Available online at IJACS/2014/7-9/616-619, ISSN 2227-670X c2014 IJACS Journal.

Zhang, X. Q.; Bishop, P. L. and Kupferle, M. J. (1998). Measurementof polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. Water Sci Technol 37, 345±348.

7- الملاحق Appenixes :

ملحق (1) يمثل مخطط تصميم التجربة

R3	R2	R1
B_0O_2	B_2O_0	B_3O_1
B_2O_0	B_3O_2	B_2O_1
B_3O_1	B_1O_0	B_0O_2
B_3O_2	B_2O_2	B_1O_1
B_0O_0	B_2O_1	B_2O_2
B_1O_2	B_0O_1	B_3O_0
B_1O_0	B_3O_1	B_1O_2
B_2O_2	B_3O_0	B_0O_1
B_1O_1	B_0O_2	B_2O_0
B_2O_1	B_0O_0	B_3O_2
B_3O_0	B_1O_2	B_1O_0
B_0O_1	B_1O_1	B_0O_0

*يرمز للمكررات R1, R2, R3

*يرمز للغشاء الحيوي B

*يرمز للمادة العضوية O

ملحق (2) جدول تحليل التباين ممثلاً بمتوسطات المربعات (M.S) للصفات المدروسة

مصادر الأختلاف S.O.V	درجات الحرية D.F	ارتفاع النبات	مساحة ورقة العلم	وزن 1000 حبة	حاصل الحبوب	الحاصل الحيوي
المكررات	2	867.68	326.11	22.46	0.3360	4.554
الغشاء الحيوي B	3	44.23	20.65	79.31	5.5520	4.884
المادة العضوية O	2	23.17	77.47	8.01	0.3052	0.507
الغشاء الحيوي × المادة العضوية	6	41.08	35.54	23.09	1.5495	1.902
الخطأ التجريبي	22	34.64	34.98	17.38	0.5712	1.415

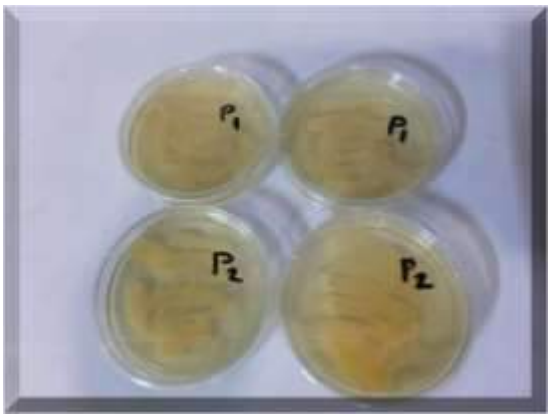
ملحق (3) جدول تحليل التباين ممثلاً بمتوسطات المربعات (M.S) للصفات المدروسة

مصادر الأختلاف S.O.V	درجات الحرية D.F	الكمية الممتصة من النتروجين في المجموع الخضري	الكمية الممتصة من من الفسفور في المجموع الخضري	الكمية الممتصة من البوتاسيوم في المجموع الخضري	اعداد بكتريا *P. flourescens*	اعداد بكتريا *T. thioparus*
المكررات	2	0.00600	0.11067	0.05564	0.3569	0.000175
الغشاء الحيوي B	3	1.30892	0.24026	0.10370	0.2676	0.001321
المادة العضوية O	2	0.11077	0.02952	0.54571	0.4919	0.009100
الغشاء الحيوي × المادة العضوية	6	0.11625	0.10866	0.12312	0.3208	0.004685
الخطأ التجريبي	22	0.05735	0.02462	0.07379	0.2851	0.002211

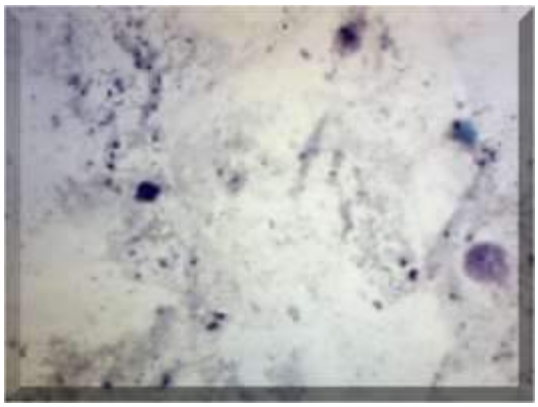
ملحق (4) جدول تحليل التباين ممثلاً بمتوسطات المربعات (M.S) للصفات المدروسة

مصادر الأختلاف S.O.V	درجات الحرية D.F	محتوى النتروجين الجاهز في التربة	محتوى الفسفور الجاهز في التربة	محتوى البوتاسيوم الجاهز في التربة	محتوى الكبريت الجاهز في التربة
المكررات	2	6.323	7.15	1122	5778
الغشاء الحيوي B	3	647.462	102.04	1346	1594661
المادة العضوية O	2	404.766	149.47	549	208688
الغشاء الحيوي × المادة العضوية	6	13.208	38.06	3520	9178
الخطأ التجريبي	22	1.203	11.06	1959	2824

صور التجربة



صورة (1) بكتريا *P. fluorescens* على وسط King's B



صورة (2) بكتريا *P. flourescens* تحت المجهر الضوئي

صورة (3) تكون Biofilm على وسط Nutrient broth

صورة (4) قابلية تكوين بكتريا *P. flourescens* و*T. thioparus* للغشاء الحيوي

صورة (5) تخطيط الأرض الى الواح بعد حراثتها

صورة (6) مرحلة البادرات

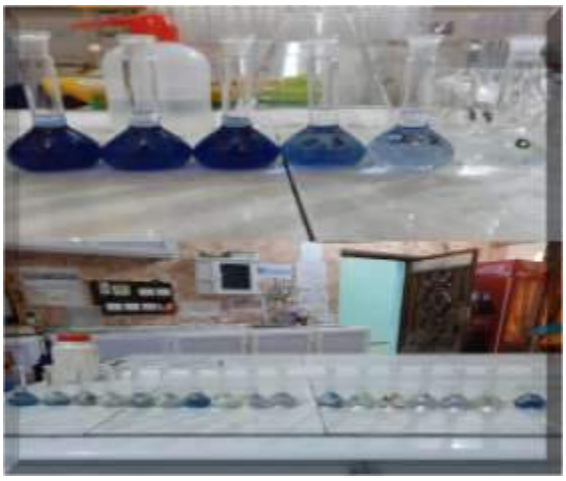
صور التجربة

صورة (7) مرحلة الأستطالة

صورة (8) مرحلة التزهير

صورة (9) مرحلة النضج التام

صورة (10) حاصل الحبوب



صورة (11) قياس محتوى الفسفور في التربة

صورة (12) قياس محتوى النتروجين في التربة

Abstract:

This study was carried out to evaluate the efficiency of bio-fertilizer consisting of biofilms produced from local isolates of *Pseudomonas flourescens* and *Thiobacillus thioparus*, in addition to three levels of organic fertilizer (zero, 0.5, and 1%) in growth and yield of wheat.

Two samples of rhizosphere soil for the crops of jet and barley were collected from fields in Al-Muthana Governorate for the purpose of isolating *Pseudomonas flourescens* bacteria, while the isolation of *Thiobacillus thioparus* was obtained from the Graduate Studies Laboratory, College of Agriculture-University of Al-Muthana.

From the results of the diagnosis and the biofilm estimation experiment, one isolate belonging to *P. flourescens* was selected as the most efficient isolate for use in the field experiment in addition to that of *T. thioparus*.

A field experiment was carried out using a randomized complete block design (RCBD) with three replications to evaluate the use of a binary biofilm consisting of two sexes of bacteria or one of them using three levels of organic fertilizer and the complete fertilizer recommendation (100, 75, 100) kg e^{-1} for nitrogen, phosphorous and potassium.

A- The results of laboratory experiments showed the following:

1- Two isolates of *P. flourescens* were identified.

2- The above mentioned bacterial isolates showed their ability to produce biofilm.

B- The results of the field experiment:

1- The addition of biofilm had a significant effect on most of the studied traits of wheat plant.

2- The biofilm treatment B_2 recorded a significant superiority in the characteristics of the absorbed amount of nitrogen in the vegetative system and the concentration of ready sulfur in the soil, as rates were recorded (2.8%, 3131.39 mg S kg $soil^{-1}$), and treatment B_2 recorded 4.74 mcg. 0.99% of the grain yield and the amount of phosphorous uptake in the vegetable group sequentially and without significant differences with treatment B_1, which recorded 4.69 $mcg.h^{-1}$, 0.81%.

3- The field experiment showed a discrepancy in the results of the levels of organic fertilization, as the level of O_1 outperformed in the two characteristics of the absorbed amount of potassium in the vegetative system and the number of *T. thioparus* bacteria in the soil, as it recorded rates of 1.42%, x 104 CFu gm^{-1} soil0.23 sequentially. While the treatment of O_2 level recorded the superiority of the nitrogen and phosphorous content in the soil 55.09 mg N kg $soil^{-1}$, it amounted to 26.20 mg P kg $soil^{-1}$, respectively.

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Muthana - Faculty of Agriculture

Effect of adding biofilms and different levels of organic matter on some different soil properties and growth and yield of wheat *Triticum aestivum* L.

A Thesis Submitted

To the Council of College of Agriculture University of Al-Muthana in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of Master of Science

In Agricultural Department of plant production

By

Hanen Aqeel Jasem Al-Ramahy

Supervised by

Asst. Prof. Dr. Abdallah Kreem Jbar Al-Jebory

2022A.D. **1443A.H.**