

دراسة تأثير معدلات مختلفة من المبيدين بينوميل و أبامكتين في نمو وأعداد خلايا البكتيريا المثبتة للنيتروجين الجوي (*Burkholderia* و *Azotobacter* spp)

ميرفت الطاهر بن محمود*⁽¹⁾ وإيمان علي الفرجاني⁽¹⁾

(1). قسم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، طرابلس، ليبيا.

(*المؤلف المعني بالمراسلة: د. ميرفت الطاهر بن محمود. البريد الإلكتروني:

dr.mbenmahmoud@yahoo.com

تاريخ القبول: 2017/06/08

تاريخ الاستلام: 2017/04/04

الملخص

أجريت تجربة مخبرية باستخدام تصميم القطاعات الكاملة العشوائية (RCBD)، لدراسة تأثير ثلاثة معدلات من المبيد الفطري (بينوميل 50%) والمبيد الأكاروسي الحشري (أبامكتين Abamectin) (الموصى بها وأقل وأعلى من الموصى) في نمو ومتوسط أعداد خلايا نوعين من الأجناس البكتيرية المثبتة للنيتروجين الجوي (*Burkholderia* و *Azotobacter*)، باستخدام ثلاثة تراكيز من اللقاح البكتيري هي: 10^{-4} و 10^{-5} و 10^{-6} لكل جنس بكتيري ولأربع فترات مختلفة من الحضانة 3 و 7 و 14 و 21 يوماً. تشير نتائج النمو ومتوسط أعداد الخلايا البكتيرية أن أدنى تركيز مثبط (MIC) للمبيد الفطري بينوميل في التخفيف 10^{-4} هو 1.22 غ/لتر، وفي التخفيفات 10^{-5} و 10^{-6} هو 0.5 غ/لتر عند فترة الحضانة 21 يوم لكل الجنس *Burkholderia* و *Azotobacter*، وكان أقل تركيز مثبط (MIC) للمبيد الأكاروسي الحشري أبامكتين 0.88 مل/لتر عند 7 و 14 و 21 يوماً من الحضانة لبكتيريا *Azotobacter* و 14 و 21 يوماً لبكتيريا *Burkholderia*. اختلف تأثير المبيدين (بينوميل وأبامكتين) في نمو ومتوسط أعداد الخلايا البكتيرية لكل من *Burkholderia* و *Azotobacter* حسب تركيزهما وفترات الحضانة المختلفة، إذ كان كلا الجنسين أكثر تحملاً لتراكيز المبيدات في التخفيف 10^{-4} مقارنة بالتخفيفات الأخرى 10^{-5} و 10^{-6} .

الكلمات المفتاحية: *Burkholderia*، *Azotobacter*، المبيد الفطري بينوميل، المبيد الأكاروسي الحشري أبامكتين.

المقدمة:

لا يكاد النظام البيئي يخلو من الميكروبات وبالأخص البكتيريا، فيتأثر بها وتتأثر به، فبكتيريا *Burkholderia* و *Azotobacter* شائعة الوجود في التربة والمياه الجوفية ومرتبطة بالنبات (بن محمود، 1998؛ McArthur et al., 1988)، وهي من الأجناس حرة المعيشة، وتمتلك هذه الكائنات تنوعاً طبيعياً واسعاً ليس فقط في الجانب التصنيفي ولكن أيضاً في الجانب البيئي. تمتلك هذه البكتيريا منافع زراعية عديدة ومهمة، حيث تعمل على تعزيز نمو النبات وتحسين إنتاجية المحاصيل (Trân Van et al., 2002, Papic, 2000) إضافة إلى إنتاجها العديد من منظمات النمو مثل: حمض الجبرليك والسايبتوكينات والأوكسينات، منها IAA (Salmeron et al., 1990؛ Abbas, 1993). تعد بكتيريا *Burkholderia* و *Azotobacter* من الكائنات ذاتية التغذية لها القدرة على أكسدة بعض المركبات العضوية الموجودة في التربة كمصدر للطاقة، وإنتاج مركبات تعمل على تثبيط نمو البكتيريا والفطريات الممرضة للنبات phytopathogens (Aoki et al., 1993؛ Sharma et al., 198)، كما أن لبعض سلالاتها القدرة على التحلل البيولوجي للملوثات البيئية (Gillis, et al., 1995)، كما تقوم بتثبيت النيتروجين الجوي في التربة بالطريقة اللاتكافلية (Nonsymbiotic Nitrogen Fixation) مما يزيد من خصوبة التربة (Ben Mahmoud, 2008)؛ الزغبى وآخرون (2007)، والتي انتشر استخدامها في مجال التسميد الحيوي.

إن استخدام هذه البكتيريا كسماد حيوي يعتبر أحد الأسباب المهمة للتخفيف من مشاكل التلوث البيئي التي تسببها استخدام الأسمدة الكيميائية (Hammad, 1998). يعد استخدام المبيدات الكيميائية بغرض الحد من انتشار الآفات ومقاومة مسببات المرضية إحدى طرق مكافحة الحقول الزراعية، إلا أن استخدام المبيدات بصورة مفرطة ومتكررة ولمدة طويلة، لها تأثيرات سلبية، منها ظهور مشاكل التلوث البيئي، التي انعكست سلباً على صحة الإنسان والحيوان والنبات، وظهرت أيضاً تأثيراتها السلبية في أحياء التربة الدقيقة (Riley, 1991). تعد هذه البكتيريا *Burkholderia* و *Azotobacter* من الأجناس الحساسة لإضافة المبيدات، لذا فمن الضروري معرفة الاستعمال الأمثل للمبيدات من حيث تركيزها الفعال وكذلك طريقة ووقت إضافة المبيد، لهذا يجب دراسة ومعرفة أنواع الأحياء الدقيقة في التربة عامة والبكتيريا خاصة التي لها القدرة والكفاءة في مقاومة المبيدات، ودرجة نشاطها وحساسيتها لها. يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير معدلات مختلفة من المبيدين بينوميل وأبامكتين في نمو وأعداد البكتيريا المثبتة للنيتروجين الجوي (*Burkholderia* و *Azotobacter*) بالطريقة اللاتكافلية وتحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا (MIC)، لما لها من أهمية في هذا المجال.

مواد البحث وطرقه:

أجريت تجربة مخبرية اتبع في تنفيذها تصميم القطاعات الكاملة العشوائية (RCBD) لاختبار تأثير نوعين من المبيدات الكيميائية في نمو وأعداد البكتيريا المثبتة للنيتروجين الجوي *Burkholderia* و *Azotobacter* في فترات مختلفة من النمو، لتحديد أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا (MIC) Minimum Inhibitory Concentration (التميمي، 2005). اشتملت التجربة على 144 قطعة تجريبية نتجت من تداخل جنسين من البكتيريا عند ثلاث تخفيفات 10^{-4} و 10^{-5} و 10^{-6} لكل جنس بكتيري ونوعين من المبيدات وثلاثة تراكيز من كل مبيد (C1 التركيز الأدنى و C2 التركيز الموصى به و C3 التركيز الأعلى)، بالإضافة لمعاملة الشاهد C0 بدون مبيد وبثلاثة تكرارات.

استخدم في هذه التجربة نوعين من المبيدات الكيميائية، المبيد الأول مبيد فطري (بينوميل Benomyl) وهو مبيد جهازى ذو تأثير فعال على الأمراض الفطرية التي تصيب المحاصيل الزراعية ويضاف بمعدل 0.5 غ/لتر، والمبيد الثاني مبيد أكاروسي حشري (Abamectin) وهو مبيد غير جهازى فعال في القضاء على الآفات الزراعية التي تصيب الخضروات والمحاصيل الحقلية، كالطماطم (بندورة) والبطاطا وغيرها ويضاف بمعدل 1.8 مل/لتر.

جمعت عينات التربة على عمق (0 - 40 سم)، من مناطق مختلفة من منطقة جذور (الرايزوسفير) بعض النباتات والأشجار المزروعة بها، وتم خلطها مع بعضها لضمان التجانس في أخذ العينات لتكون عينة ممثلة للحقل. عزلت بكتيريا spp *Burkholderia* و *Azotobacter* من هذه التربة، باستخدام 10 غرام من التربة في 1 لتر من المحلول الغذائي الخالي من النيتروجين Burke's media كونه وسطاً ملائماً لنمو بكتيريا *Burkholderia* (بن محمود، 2016) و Sucrose mineral salts agar كوسط ملائم لنمو بكتيريا *Azotobacter*، ثم عدلت درجة حموضة المحلول pH عند 7.0 و رجّت بواسطة الرجّاج لمدة ساعة، ثم حصّنت ثلاثة أيام تقريباً على درجة حرارة 30 مئوية لاختبار نموها في تراكيز مختلفة للمبيدين (التميمي، 2005)؛ سهيل وآخرون، 2009).

تم تحضير بيئة المانيتول Manitol لبكتيريا *Azotobacter* وبيئة Burke's media لبكتيريا *Burkholderia* الخاليتين من النيتروجين مع إضافة 15 غ من الآجار، ثم أضيف لها المبيدين بثلاثة تراكيز C1، C2، C3 لكل مبيد و كل تركيز على حدى بالإضافة لمعاملة الشاهد C0 بدون مبيد. و من ثم تم تعقيمها باستخدام المرشح البكتيري (Seitz filter) قبل تصليبها. وخطت البكتيريا بواسطة إبرة التلقيح بثلاثة تكرارات لكل تركيز ولكل عذلة، وحصّنت الأطباق المخططة على درجة حرارة 30 درجة مئوية لفترات مختلفة 3، 7، 14 و 21 يوماً. سجّلت نموات للعزلات البكتيرية خلال فترات التحضين المختلفة، وتم عد المستعمرات النامية لكل تخفيف للجنسين في الأطباق خلال فترات التحضين المحددة.

النتائج و المناقشة:

أظهرت النتائج أن متوسط أعداد الخلايا البكتيرية في التخفيف 10^{-4} تفوق معنوياً على 10^{-5} و 10^{-6} لكلا الجنسين *Burkholderia* و *Azotobacter* وتوقفت متوسط أعداد الخلايا في التخفيف 10^{-5} تفوقاً معنوياً على المتوسط 10^{-6} بغض النظر عن إضافة المبيد الفطري (بينوميل) وفترة التحضين (الجدول (a, b) 3 ، (a, b) 2).

تبين النتائج الموضحة في الجدول (2a) أن متوسط أعداد الخلايا البكتيرية في معاملة الشاهد C0 لجنس *Azotobacter* قد زادت بشكل معنوي في فترة التحضين 3 و 7 أيام، كما زادت أعداد الخلايا البكتيرية للجنس *Burkholderia* زيادة معنوية خلال فترة التحضين 7 و 14 يوم في التخفيف 10^{-4} و 10^{-6} ، ولم يحدث نمو في أعداد الخلايا البكتيرية للجنس *Burkholderia* في فترة الحضانة الأولى (3 أيام)، كما هو موضح في الجدول (2b). انخفضت أعداد البكتيريا معنوياً عند فترة التحضين 21 يوم لكلا الجنسين في التراكيز الثلاثة 10^{-4} ، 10^{-5} ، و 10^{-6} حيث كانت الزيادة ظاهرية في متوسط أعداد الخلايا البكتيرية في التخفيف 10^{-5} في فترة التحضين 7 و 14 يوم، وانخفضت أعدادها بشكل معنوي عند 21 يوم. أظهرت النتائج أن أعلى زيادة في أعداد البكتيريا كانت عند التخفيف 10^{-4} لكل من الجنس *Azotobacter* في 3 و 7 أيام من الحضانة و 7 و 14 يوم للجنس *Burkholderia*. سُجّل في المعاملات C0 (بدون إضافة المبيد) أعلى نمو وزيادة في متوسط أعداد الخلايا البكتيرية *Azotobacter* عند 3 أيام في التخفيف 10^{-4} ، إذ كانت ($10^4 \times 60$) CFU /مل وزيادة غير معنوية في 7 أيام من الحضانة، ثم انخفضت معنوياً عند 14 و 21 يوم فبلغت أعدادها ($10^4 \times 68$ ، $10^4 \times 15$ ، $10^4 \times 10$) CFU /مل على التوالي. أما بكتيريا *Burkholderia* فقد سجّلت أعلى أعداد لها عند 7 أيام من الحضانة، وهو $10^4 \times 58$ CFU /مل، ثم انخفضت انخفاضاً بسيطاً في اليوم الرابع العاشر من التحضين، حيث بلغت أعدادها $10^4 \times 52$ CFU /مل، أما في اليوم 21 إنخفضت أعداد البكتيريا انخفاضاً معنوياً حتى وصلت أعدادها إلى $10^4 \times 18$ CFU /مل.

تفوق متوسط أعداد الخلايا البكتيرية للجنس *Azotobacter* معنوياً على متوسط أعداد الخلايا البكتيرية للجنس *Burkholderia* عند فترات التحضين المختلفة. إن ارتفاع أعداد الخلايا البكتيرية للجنس *Azotobacter* في ثلاث أيام الأولى من التحضين دليل على سرعة نموها مقارنة ببكتيريا *Burkholderia* وارتفاع أعدادها لكلا الجنسين في اليوم السابع وانخفاضها في الأيام الأخرى قد يعزى لتوفر العناصر الغذائية اللازمة لنموها في الوسط الغذائي خلال هذه الفترة من التحضين، ثم انخفضت أعدادها نتيجة زيادة نموها في الفترات السابقة واستنزافها للعناصر الغذائية من الوسط وكذلك لتراكم الفضلات والمواد السمية وانخفاض نسبة الأكسجين وهو من أكثر المواد المستنزفة شيوعاً، فيصبح الوسط غير ملائم لها وعنده يتوقف النمو الخلايا أو ربما يكون بسبب مرور البكتيريا بطور الموت (Death Phase) (الشرابي و آخرون، 2004).

أدت زيادة تركيز المبيد الفطري من (الصفير) C0 إلى التراكيز C1، C2، C3 إلى انخفاض معنوي في متوسط النمو ومتوسط أعداد الخلايا البكتيرية لجميع التخفيفات المستعملة 10^{-4} ، 10^{-5} ، و 10^{-6} بغض النظر عن فترات الحضانة وعند زيادة تركيز المبيد حدث انخفاضاً معنوياً في متوسط الأعداد في التخفيف 10^{-4} ، وكان غير معنوي في التخفيف 10^{-5} ، 10^{-6} للجنس *Azotobacter* كما أشار (Abulkalam, 1995) إلى وجود تثبيط في نمو *Azotobacter* بعد إضافة المبيد الفطري (Tridemorph). انخفض متوسط أعداد البكتيريا معنوياً في التخفيف 10^{-4} ، و 10^{-5} وكان غير معنوي في التخفيف 10^{-6} للجنس *Burkholderia* عند التراكيز C1، C2، و C3 في 7 أيام من التحضين وهذا قد يرجع إلى امتصاص البكتيريا للمبيد وارتباطه على المواقع الفعالة على جدار الخلايا، بحيث يؤدي إلى إيقاف عمل الأنزيمات وبالتالي إيقاف عمليات الأيض ومن ثم إيقاف النمو (Anderson, 1983). إن زيادة النمو خلال فترات التحضين التالية 14، 21 يوم قد يعزى إلى مرور البكتيريا في طور السكون والتأقلم (Lag phase) وتكيفها مع ظروف الوسط في وجود المبيدات عند الفترات التحضين الأولى، إذ إن نسبة عالية من الخلايا البكتيرية لا تستطيع النمو في الأوساط الجديدة التي تنتقل إليها فتموت، مما يؤدي إلى انخفاض أعدادها عند فترات التحضين 3 و 7 أيام الأولى، ثم يحدث تأقلم لنمو البكتيريا بحيث تتكيف مع الوسط الجديد وتتعود على ظروف الوسط والاستفادة من مكونات الوسط الجديد وقيامها ببناء

أنزيمات جديدة ومعاودة لنشاطها الحيوي، فنلاحظ زيادة في أعداد البكتيريا ونموها عند 14 و 21 يوم من التحضين، وقد يعزى ذلك إلى نشاط البكتيريا وتحليلها لجزيئات مركب المبيد وتقليل درجة سميته واستخدامها كمصدر للغذاء والطاقة كما وضّحه Turco, (1990) بأنّ هناك أنواعاً عديدة من الميكروبات لها القدرة على إفراز أنزيمات محلّلة للمبيدات ولها القدرة على القيام بنشاطها ولو كانت أعدادها قليلة جداً، وهذا يفسر أيضاً زيادة نمو وأعداد الخلايا البكتيرية.

لم يحدث أي نمو للخلايا البكتيرية للجنسين *Burkholderia* و *Azotobacter* عند التركيز C3 لجميع التخفيفات المستعملة 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} عند 21 يوم، وقد فسّر (Alexander, 1982) أن انخفاض أعداد البكتيريا وانعدامها بالكامل عند التراكيز العالية من المبيدات، قد يرجع إلى نفاذ المبيد، ومن ثم نفاذ العناصر الغذائية الناتجة من تحلل المبيد و تراكم النواتج السامة مما أدى إلى نقص الكبير في أعداد البكتيريا وانعدامها في بعض الأحيان ويعتقد في هذه الحالة أن البكتيريا يكون لها القدرة على تحويل المبيد إلى نواتج سامة للنوع نفسه من الميكروبات التي تؤثر في المركب الأصلي.

تبين النتائج في الجداول (3a، 3b) عدم وجود فروق معنوية بين متوسطات الأعداد البكتيرية لكلا الجنسين *Burkholderia* و *Azotobacter* عند استخدام التخفيفين 10^{-4} و 10^{-5} ، وظهور فروق معنوية بين التخفيفين 10^{-4} و 10^{-5} والتخفيف 10^{-6} حيث تفوق التخفيفان 10^{-4} ، 10^{-5} معنوياً على التخفيف 10^{-6} بغض النظر عن إضافة المبيد الحشري (Abamectin) و فترات التحضين.

عند إضافة المبيد الحشري في التركيزات المستخدمة عند المستويات C1، C2، و C3 انخفض متوسط أعداد الخلايا البكتيرية بشكل معنوي في جميع التخفيفات المستخدمة 10^{-4} ، 10^{-5} ، و 10^{-6} عند جميع فترات التحضين 3، 7، 14، و 21 يوم، حيث انخفضت أعداد البكتيريا معنوياً بزيادة فترة التحضين وكان الانخفاض غير معنوي عند 21 يوم من الحضانة لكل التراكيز المستخدمة. سجّلت أعلى أعداد للبكتيريا *Azotobacter* في التخفيف 10^{-5} عند 3 أيام من الحضانة وأعلى قيمة لبكتيريا *Burkholderia* في التخفيف 10^{-5} عند 7 أيام من الحضانة وهذا ما وضّحه أيضاً (Pozo, et al., (1995) بأن المبيدات الحشرية مثل Profenfos خفّضت أعداد الميكروبات المثبتة للنتروجين الجوي.

لوحظ أيضاً أن متوسط أعداد البكتيريا في التخفيف 10^{-4} في المعاملة الشاهد C0 سجّلت أعلى قيم عند 3 أيام من فترة الحضانة للبكتيريا *Azotobacter* فبلغت 77×10^4 CFU/مل، ثم انخفضت الأعداد انخفاضاً غير معنوياً عند 7 أيام من الحضانة ومعنوياً عند 14، و 21 يوم، وسجّلت أعدادها (65×10^4 ، 19×10^4 ، 11×10^4) CFU/مل في كل من 7، 14، و 21 يوماً من التحضين على التوالي، كذلك سجلت متوسط الأعداد البكتيرية لجنس *Burkholderia* أعلى قيم لها عند 7 أيام من التحضين فبلغت 59×10^4 CFU/مل، ثم انخفضت الأعداد انخفاضاً معنوياً عند 14، و 1 يوماً وسجّلت أعدادها (25×10^4 ، 12×10^4) CFU/مل) في 14، و 21 يوماً على التوالي.

أظهرت النتائج بأن متوسط أعداد البكتيريا في التخفيفين 10^{-5} ، و 10^{-6} كانت الأعلى في 7 أيام من التحضين لبكتيريا *Azotobacter*، حيث سجّلت (58×10^5 ، 40×10^6) CFU/مل، أما بالنسبة لبكتيريا *Burkholderia* فكانت (68×10^5 ، 30×10^6) CFU/مل، ثم انخفضت أعدادها معنوياً عند، و 21 يوم وسجلت أقل قيمة لها عند 21 يوم من الحضانة لكلا الجنسين.

أدّت إضافة المبيد الحشري للخلايا البكتيرية وزيادة تركيزه من الصفر C0 إلى التراكيز C1، C2، و C3 عند فترة التحضين 3 و 7 أيام للبكتيريا *Azotobacter* و *Burkholderia* إلى خفض معنوي في متوسط أعداد الخلايا البكتيرية في جميع التخفيفات المستخدمة على التوالي.

تفوق متوسط أعداد الخلايا في التخفيف 10^{-5} على التخفيفات الأخرى 10^{-4} ، و 10^{-6} و لجميع التراكيز المضافة، بمعنى لا يوجد تركيز مثبط عند 3 و 7 أيام الأولى من الحضانة وذلك لنمو البكتيريا في جميع التركيزات المضافة و يرجع السبب في ذلك إلى قدرة البكتيريا *Burkholderia* و *Azotobacter* على مقاومة وتحليل المبيد المضاف كما وضّحه مظلاه (2006) بأن الأحياء الدقيقة المعزولة من التربة لها القدرة على تحلّل المبيدات الحشرية وإزالة تأثيرها السام، إذ تحتاجها كمصدر للطاقة والتغذية.

إن زيادة متوسط أعداد الخلايا البكتيرية ونموها في 3 أيام للبكتيريا *Azotobacter* و 7 أيام للبكتيريا *Burkholderia* وانخفاضها بعد ذلك، قد يرجع إلى مرور الخلايا البكتيرية بمراحل منحنى النمو البكتيري، وهي مرورها بطور السكون والتأقلم Lag phase التي لا يوجد بها نمو للخلايا، و من ثم مرورها بطور النمو اللوغاريتمي Exponential Phase الذي تكون فيه سرعة النمو أقصاها، ثم مرورها بطور النمو الثابت Stationary Phase نتيجة زيادة الظروف السيئة وقلة العناصر الغذائية في الوسط وارتفاع أعداد الخلايا البكتيرية الميتة تمر الخلايا البكتيرية بطور الموت Decline (Death) Phase، حيث تكون فيه قيمة سرعة النمو سالبة (الشرابي وآخرون، 2004).

إن انخفاض متوسط نمو وأعداد البكتيريا لكلا الجنسين عند 21 يوم من التحضين بغض النظر عن نوع المبيد أو تركيزه، قد يعزى إلى أن البكتيريا مرت بطور الموت، حيث تكون عندها أعداد الخلايا الميتة أعلى من عدد الخلايا الحية ونتيجة نفاذ العناصر الغذائية الناتجة من تحلل المبيدات وتراكم المخلفات والفضلات يصبح الوسط غير ملائم، ويتوقف عندها النمو (الشرابي وآخرون، 2004)، أو قد يكون للبكتيريا القدرة على تحويل المبيدات إلى مواد ونواتج سامة للنوع نفسه من الميكروبات.

إن مقاومة البكتيريا لمضاد أو لمبيد معين قد يرجع إلى تغير في تسلسل القواعد النيتروجينية للحامض النووي (DNA) للخلايا البكتيرية، الذي يؤثر بدوره في عمليات الأيضية وبالتالي تؤثر في نمو البكتيريا من حيث الزيادة أو النقصان، وفي كفاءة تثبيت النيتروجين الجوي (Elzawahry, 1976)، وقد تملك بعض أنواع من البكتيريا القدرة على مقاومة تأثير المبيد مقاومة ذاتية وفي بعض الأحيان تكون لها القدرة على المقاومة المكتسبة والتي تؤدي إلى ظهور سلالات جديدة مقاومة للتأثير المضاد للمبيد (Atlas, 1995).

تبين النتائج بوضوح اختلاف تأثير المبيدات المستخدمة في هذه التجربة (المبيد الفطري بينوميل Benomyl والمبيد الحشري الأكاروسي Abamectin) في نمو ومتوسط أعداد الخلايا البكتيرية *Burkholderia* و *Azotobacter* حسب تركيزها و فترات التحضين المختلفة، يتضح أيضاً بأن التخفيف المستخدم تأثر بتراكيز المبيدات، إذ كانت البكتيريا في التخفيف 10^{-4} أكثر تحملاً لتراكيز المبيدات المضافة من التخفيفات 10^{-5} ، و 10^{-6} .

تشير نتائج متوسط نمو وأعداد الخلايا البكتيرية في الجدول (4) أن أدنى تركيز مثبط (MIC) للمبيد الفطري بينوميل في التخفيف 10^{-4} هو 1.22 غ /لتر وفي التخفيفات 10^{-5} ، و 10^{-6} هو 0.5 غ /لتر عند فترة الحضانة 21 يوم لكلا الجنسين *Burkholderia* و *Azotobacter*، إذ لم يسجل أي نمو في أي تركيز، وقد يرجع السبب في انخفاض أعداد البكتيريا وانعدامها عند التراكيز المرتفعة من المبيد في فترة 21 يوم من الحضانة إلى نفاذ المبيد عند تلك الفترة من الحضانة ونفاذ العناصر الغذائية الناتجة من تحلل المبيد وتراكم النواتج السمية أو قد يكون للبكتيريا القدرة على تحويل المبيد نفسه إلى مواد سامة يفتك بها. تبين أن أقل تركيز مثبط (MIC) للمبيد أبامكتين هو 0.88 مل/لتر عند 7، 14، و 21 يوماً من الحضانة لبكتيريا *Azotobacter* و 14، و 21 يوماً لبكتيريا *Burkholderia*، و تبين أيضاً أن البكتيريا كانت أكثر حساسية للمبيد الحشري مقارنة بالمبيد الفطري وإضافته بكميات عالية تؤدي إلى قتل البكتيريا وميكروبات التربة عامة.

إن اختلاف النتائج المتحصل عليها في هذه التجربة المخبرية مع نتائج نفس التجربة تحت ظروف مختلفة في الحقل (الغزي، 2006) يعود لوجود تداخل عوامل طبيعية عديدة في الحقل تؤدي إلى تقليل التركيز الفعال للمبيد و توجد أنواع مختلفة من ميكروبات التربة في الحقل لها القدرة على تحلل وتكسير المبيدات للحصول على مصدر للطاقة والكربون والنيتروجين وإبطال سميتها (Radosevich, et al., 1995)، بالإضافة لوجود عوامل أخرى منها نسبة الطين والمادة العضوية التي تعمل على ادمصاص المبيد على سطوحها.

الجدول 1. أنواع المبيدات المستخدمة و تراكيزها

التراكيز المستخدمة			نوع المبيد	اسم المبيد
C3	C2	C1		
1.22	0.5	0.3	فطري	بينوميل Benomyl غ / لتر
3.6	1.8	0.88	أكاروسي حشري	أبامكتين Abamectin مل/لتر

(C1 التركيز الأدنى و C2 التركيز الموصى به و C3 التركيز الأعلى)

الجدول 2a. تأثير المبيد الفطري بينوميل في أعداد بكتيريا *Azotobacter* لمختلف التخفيفات وفترات التحضين

أعداد بكتيريا (<i>Azotobacter</i> CFU/مل)												تركيز المبيد
21 يوم			14 يوم			7 أيام			3 أيام			
10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	
3 ^r	5.5 ⁱ	10 ^h	6.5 ^g	8 ^b	20 ^f	42 ^e	50 ^b	68 ^a	30 ^c	49 ^b	60 ^a	C0
1.5 ^w	1.5 ^w	2 ^r	3.5 ^y	5 ⁱ	15 ^v	17 ^t	21 ^u	40 ^j	12 ^z	17 ^v	35 ^m	C1
0 ^w	0 ^w	1.5 ^w	2.5 ^r	3 ^r	9 ^b	15 ^v	17 ^u	30 ^x	13 ^z	15 ^v	25 ⁿ	C2
0 ^w	0 ^w	0 ^w	1.5 ^y	2 ^r	3 ^r	10.5 ^t	15 ^u	25 ^q	10 ^z	12 ^v	14 ^s	C3

المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة لا توجد بينها فروقات معنوية عند مستوى ثقة LSD (0.01)

الجدول 2b. تأثير المبيد الفطري بينوميل في أعداد بكتيريا *Burkholderia* لمختلف التخفيفات وفترات التحضين

أعداد بكتيريا (<i>Burkholderia</i> CFU /مل)												تركيز المبيد
21 يوم			14 يوم			7 أيام			3 أيام			
10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	
9 ^s	11 ^c	18 ^f	39 ^d	45 ^b	52 ^a	30 ^c	48 ^b	58 ^a	0 ^k	0 ^k	0 ^k	C0
4 ^m	6 ^m	8 ^s	9 ^s	11 ^c	12 ^c	11 ^c	20 ^f	35 ^z	0 ^k	0 ^k	0 ^k	C1
0 ^k	0 ^k	3 ⁿ	5 ^m	8 ^s	9 ^s	9 ^s	13 ^c	25 ^t	0 ^k	0 ^k	0 ^k	C2
0 ^k	0 ^k	0 ^k	1.5 ^m	5 ^m	3 ^j	7 ^s	8 ^s	15 ^r	0 ^k	0 ^k	0 ^k	C3

المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة لا توجد بينها فروقات معنوية عند مستوى ثقة LSD (0.01)

الجدول 3a. تأثير المبيد أبامكتين في أعداد بكتيريا *Azotobacter* لمختلف التخفيفات وفترات التحضين

أعداد بكتيريا (<i>Azotobacter</i> CFU/مل)												تركيز المبيد
21 يوم			14 يوم			7 أيام			3 أيام			
10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	
4 ^u	7.5 ^u	11 ^r	6 ^u	15 ^t	19 ^v	40 ^x	58 ^z	65 ^s	33 ^j	60 ^f	77 ^b	C0
0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	30 ^j	45 ^g	40 ^c	C1
0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	22 ^m	39.5 ^h	32 ^d	C2
0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	17.5 ⁿ	28 ^k	21 ^e	C3

المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة لا توجد بينها فروقات معنوية عند مستوى ثقة (0.01) LSD

الجدول (3b) تأثير المبيد أبامكتين في أعداد بكتيريا *Burkholderia* لمختلف التخفيفات وفترات التحضين

أعداد بكتيريا (<i>Burkholderia</i> CFU/مل)												تركيز المبيد
21 يوم			14 يوم			7 أيام			3 أيام			
10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	
3.5 ^h	9 ^g	12 ^h	8 ^g	18 ^f	25 ^e	30 ^d	68 ^c	59 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	C0
0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	15 ^v	38 ^k	25 ^e	0 ^a	0 ^a	0 ^a	C1
0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	10 ^g	9 ^g	11 ^h	0 ^a	0 ^a	0 ^a	C2
0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1 ^z	2.5 ^h	3 ^h	0 ^a	0 ^a	0 ^a	C3

المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة لا توجد بينها فروقات معنوية عند مستوى ثقة (0.01) LSD

الجدول (4) أدنى تركيز مثبت (MIC) للمبيدات في أعداد البكتيريا لمختلف التخفيفات وفترات التحضين

بكتيريا <i>Burkholderia</i>		بكتيريا <i>Azotobacter</i>			التخفيفات البكتيرية
أبامكتين مل/لتر	بينوميل غ/لتر	أبامكتين مل/لتر	بينوميل غ/لتر	بينوميل غ/لتر	
21 يوم	14 يوم	21 يوم	14 يوم	7 يوم	
0.88	1.22	0.88	1.22	1.22	10 ⁻⁴
	0.5		0.5	0.5	10 ⁻⁵
	0.5		0.5	0.5	10 ⁻⁶

المراجع

- التميمي، فارس محمد سهيل (2005). تأثير التدخلات بين المبيدات الحيوية والكيميائية والتسميد الحيوي على نبات القمح. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق.
- الشرابي، نجم الدين ومنير هابيل ومصطفى البلخي (2004). الأحياء الدقيقة. كلية الزراعة، منشورات جامعة دمشق. دمشق، سورية.
- الغزي، أسعد كاظم عبدالله (2006). تأثير مبيد الرونستار في نمو بكتيريا الأزوتوباكتر. أطروحة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

بن محمود، ميرفت الطاهر (1998). تأثير معاملة حبوب القمح ببكتيريا تثبيت النيتروجين الجوي جنس *Azotobacter* Spp على الإنتاجية. أطروحة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة طرابلس، طرابلس، ليبيا.

بن محمود، ميرفت الطاهر (2016). تأثير التلقيح ببكتيريا *Burkholderia* Spp مع معدلات مختلفة من التسميد النيتروجيني في إنتاجية نبات الطماطم. المجلة السورية للبحوث الزراعية. 3(2):235-242.

سهيل، فارس محمد وعلاء حسن فهمي (2009). تحديد أدنى تركيز مثبط من المبيدات الكيميائية في أعداد بكتيريا الأزوتوباكتري تحت مدد حضن مختلفة. المؤتمر العلمي الأول لكلية الزراعة جامعة ديالى 15 - 16 / 3 / 2009. العراق.

مظلاه، حيدر على أحمد (2006). المبيدات الحشرية وعلاقتها بتلوث البيئة في اليمن. كلية التربية، جامعة عدن، عدن، اليمن.

Abbas, Z. and Y. Okon (1993). Plant growth promotion by *Azotobacter Paspail* in the rhizosphere. Soil. Biol. Biochem. 25: 1075- 1083.

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

Alexander, M. (1982). Interoduction to soil microbiology. John Wiley and Sons. Inc New York.

Anderson.W.P. (1983). Weed science principles. West Publishing company st . Paul. New York. Los angles. San Francisco.

Aoki, M.; K. Uehara; K. Tsuji; K. Ono; and M. Iijima (1993). Large-scale culture and preservation methods of *Pseudomonas cepacia* B5 for biological control against wilt disease. Biosci. Biotechnol. Biochem., 57: 668-669.

Atlas, R.M. (1995). Principles of microbiology. 1st ed. mosby –Year Book. Inc.

Ben Mahmud, M. (2008). The effect of *Burkholderia* as biofertiliser on cereal productivity. Ph.D. Dissertation, Biotechnology and Environmental Biology (School of Applied Sciences) RMIT University, Melbourne, Australia.

El- Zawahry, Y.A. (1976). Studies on the effect of gamma radiation on growth and activity of *Rizobium Legumiosarm* . Ph.D.Thesis, University of Cairo. Egypt.

Gillis, M.; T. Trân Van; R. Bardin; M. Goor; P. Herbar; A. Willems; P. Segers; K. Kersters; T. Heulin; and M.P. Fernandez (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and preposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov., for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. Int J Syst Evol Microbiol., 45: 274-289.

Hammad, A.M.M. (1998). Evaluation of alginate encapsulated *Azotobacter chroocccum* as a phage-resistant and effective inoculum. J. Basic Microbiol., 38: 9-16.

McArthur, J. V.; D.A. Kovacic; and M.H. Smith (1988). Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 85: 9621-9624.

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

Salmeron, V.; Mv. Martinez Toledo; and J. Gonzalezlopez (1990). Nitrogen fixation and production of auxins, gibberllins and cytokinin by an *Azotobacter chroococcum* strain isolated from root of zea mays in presence of insoluble phosphate. Chemosp- here., 20 : 417-422 .

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

Radosevich, M.; S.J. Traina; Y. Hao; and O.H. Tourinen (1995). Degradation and mineralization

- atrasine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:297- 302.
- Riley, D. (1991). Using soil residue data to assess the environmental safety of pesticides In: *Pesticides in Soil and water: current perspectives*, (A.Walker-Ed). BCPC Monograph. No. 47 Lavenham press Ltd. Lavenham. Pp 11-20.
- Sharma, P.K.; S.K. Dey; and V.P. Chahal (1986). In vitro introduction between phytopathogens and two *Azotobacter* species. *Ind, Phytopath.*, 39: 117-119 .
- Turco, R.F.; and A. Konopka (1990). Response of microbe population to carbon furan in soils enhanced for degradation. In: *Enhanced degradation of pesticides in the environment*. (Racke, K.D; and J.R. Coats, Eds). America chemical Society. Washington D.C. Pp 153-166.
- Trân Van, V.; O. Berge; S. Ngo Ke; J. Balandreau; and T. Heulin (2000). Reproducible 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.

**The Effect of Different Rates of Two Pesticides (Benomyl and Abamectin)
on Growth and Number of N₂ Fixation Bacteria Cells
(*Azotobacter* and *Burkholderia* spp)**

Merfat T. Ben Mahmud^{*(1)} and Eman A. AL Ferjani⁽¹⁾

(1). Department of Soil and Water, Faculty of Agriculture, Tripoli University, Tripoli, Libya.
(*Corresponding author: Dr. Merfat Ben Mahmoud. Email: dr.mbenmahmoud@yahoo.com).

Received: 04/04/2017

Accepted: 08/06/2017

Abstract

A laboratory experiment was carried out with Randomized Completely Block Design (RCBD), to study the effect of two chemical pesticides: fungicide (Benomyl 50%) and Acaro-Insecticide (Abamectin) with three rates for each treatment, on growth and number of *Azotobacter* and *Burkholderia*. Three dilution of inoculation bacteria (10^{-4} , 10^{-5} , and 10^{-6}) with four periods of incubation (3, 7, 14, and 21) days were used for measuring (MIC) of bacteria cells number. The results showed that the minimum (MIC) value of Benomyl fungicide with dilution of (10^{-4}) was (1.22 g/L), and (0.5 g/L) for each dilution of (10^{-5} and 10^{-6}), after twenty-one days of incubation for *Azotobacter* and *Burkholderia*. The minimum value of (MIC) for Abamectin insecticide was (0.875 ml/L) for the periods of (7, 14 and 21 days) of incubation with all dilution inoculations of *Azotobacter* and (14 and 21 days) of incubation for *Burkholderia*. The results concluded that Benomyl and Abamectin had a different effect on growth and number of the studied bacteria according to their concentrations, and incubation periods. Also *Azotobacter* and *Burkholderia* were more tolerance for the dilution of 10^{-4} of pesticides as compared with other concentrations 10^{-5} , 10^{-6} .

Key words: *Azotobacter*, *Burkholderia*, Benomyl fungicide, Abamectin insecticide.