الدرس العملى الثامن

إعداد اللقاحات الميكروبية
المستخدمة فى تحضير الأسمدة الحيوية

التسميد الحيوي عبارة :

عن استغلال أنواع معينه من الميكروبات وما يرتبط بها من نشاط ميكروبي في توفير عنصر أو أكثر مهم لغذاء النبات وبالتالي نموه وما نحصل علية من محصول أو غلة وذلك في وجود الظروف البيئية المناسبة التي تشجع ذلك النشاط ، إما عن طريق تحلل المخلفات العضوية ذات الأصل النباتي أو الحيواني المضافة إلي التربة ، أو عن طريق المشاركة المباشرة أو غير المباشرة بين النبات والميكروب .

الأسمدة الحيوية Biofertilizers
(اللقاحات الميكروبية Microbial inoculants)

تعمل علي زيادة الاستفادة من عملية تثبيت النيتروجين الجوي وتثير الفوسفات في التربة كما انه تفرز مواد منشطه لنمو النباتات ، علاوة علي أنها تفرز أيضا الكثير من المضادات الحيوية التي تحبط نمو الميكروبات الممرضة مما يزيد من إنبات البذور ونمو البادرات والنباتات عموما.

من أمثلة الاسمدة الحيوية ذات الفائدة الاقتصادية الكبيرة وللانتاج الزراعي

- اللقاحات المثبتة للنيتروجين الجوي ومنها لقاحات الريزوبيا للبقوليات (العقدين) ولقاح الازوتوبكتر (الازوتوباكترين) ولقاح الازوسبيريللم للنجيليات ولقاح الفرنكيا لغير البقوليات ولقاحات الطحالب الخضراء المزرقة والازولا لمزارع الأرز .
- اللقاحات المذيبة للفوسفات ومنها لقاح البكتريا (فوسفو باكترين) ولقح فطريات الميكورايزا

لقد اهتمت كثير من دول العالم بتحضير الأسمدة الحيوية علي النطاق الصناعي وبكميات كبيرة كي تواكب التقدم الملموس في الزراعة الحديثة ، خصوصا تلك التي تعمل علي تثبيت نيتروجين الهواء الجوي وذلك بعد أن ارتفع ثمن البترول ، الأمر الذي رفع أسعار الأسمده النيتروجينة المعدنية بدرجه كبيرة . كذلك لتلافي اثر التسميد المعدني النيتروجيني في تلوث البيئة وانسياب النترات إلي ماء الترع والمصارف والمياه الجوفية وأثرها السيئ علي صحة الإنسان والحيوان.

خطوات إعداد الأنواع المختلفة من اللقاحات الميكروبية المستخدمة فى تحضير الأسمدة الحيوية

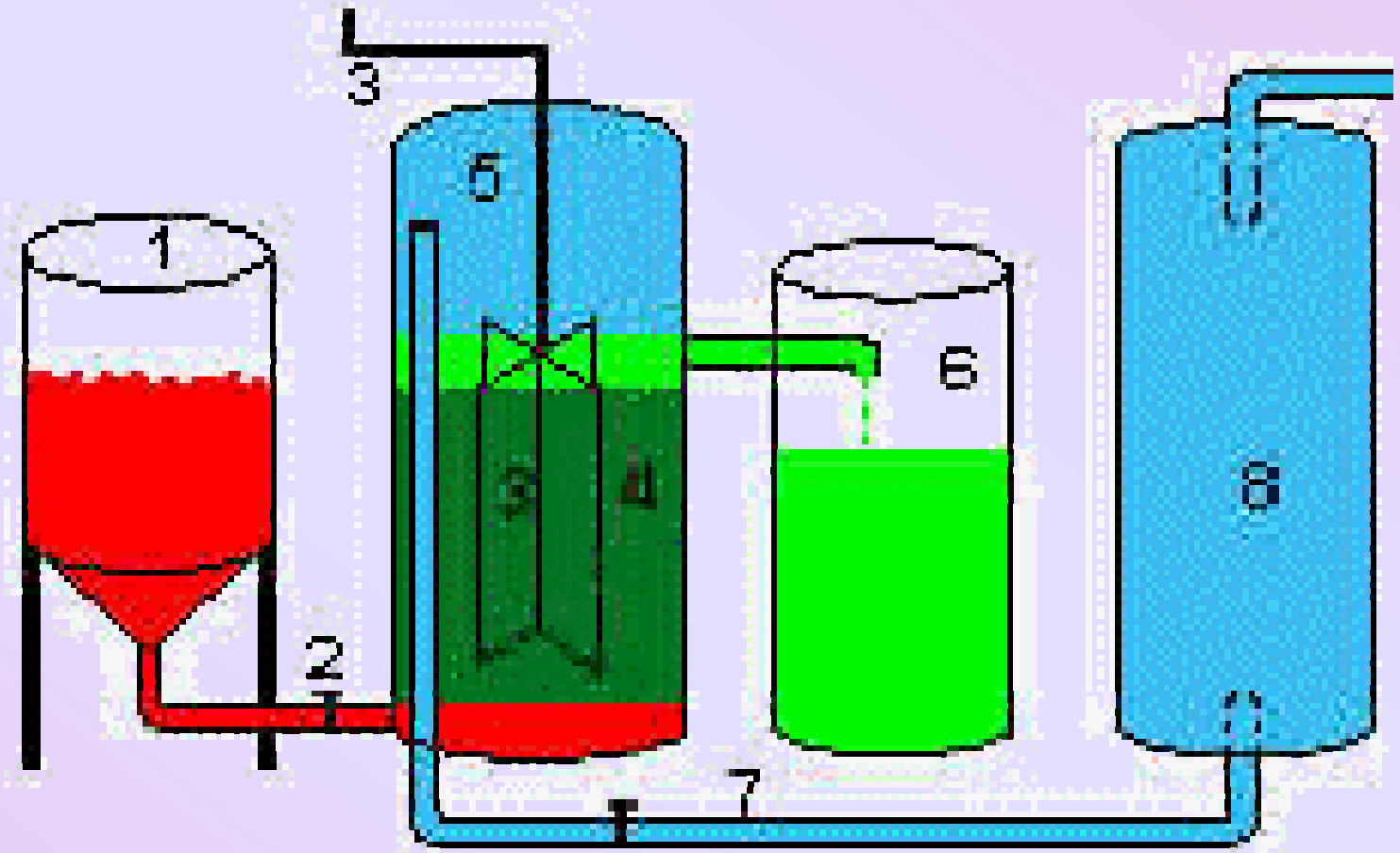
أولاً : تحضير مزارع الريزوبيا المستخدمة فى إعداد السماد الحيوى (العقدين) :

تقوم بكتريا العقد الجذرية التابعة لجنس الرايزوبيم ***Rhizobium*** بتثبيت الازوت الجوي بطريقه تكافلية وذلك بالاشتراك مع جذور النباتات البقوليه . ونتيجه لمعيشه الرايزوبيم علي جذور النباتات تظهر علي البذور عقدا مختلفة الشكل والحجم هي عبارة عن نموات من البذور تحوي بداخلها خلايا البكتريا (البكترويدات) . ولهذه العلاقة أهمية من الناحية الزراعية حيث أنها تؤدي إلي زيادة خصوبة التربة وبالتالي زيادة إنتاجية المحاصيل البقولية (بما فيها محاصيل الاعلاف البقولية) . علاوه علي انها توفر علي المزارع القيام تسميد المحاصيل البقولية بالاسمده الازوتيه وتضاف اللقاحات البكتيرية بالاسمده الازوتية .

ولتحضير لقاح الرايزوبيم واستخدامة يجب توفر الاتي :-

١- مزارع نقيه من الرايزوبيا .
٢- بيئة مانيتول مستخلص الخميرة (YEM)
٣- مخمر أو زجاجات مخروطية سعة لتر ورجاج ميكانيكي .
٤- حامل CARRIER معقم مثل (الدبال – سماد عضوي صناعي (حماد ١٩٦٨) – الطين المتخلف عن المرشحات في صناعه قصب السكر Filter mud– قصرة بذره القطن المتوفرة في مصانع الزيت – مصاصة قصب السكر – الردة – نخاع عيدان الذره – ساس القطن – الفحم النباتي مع الطمي) .
٥- ماده لاصقة للميكروب علي سطح البذور مثل الصمغ العربي – الجير lime- اللبن الفرز – كربوكسي ميثيل سليلوز.
٦- بيئة مانيتول مستخلص الخميرة

مخمر يعمل بطريقة التخمر المستمر



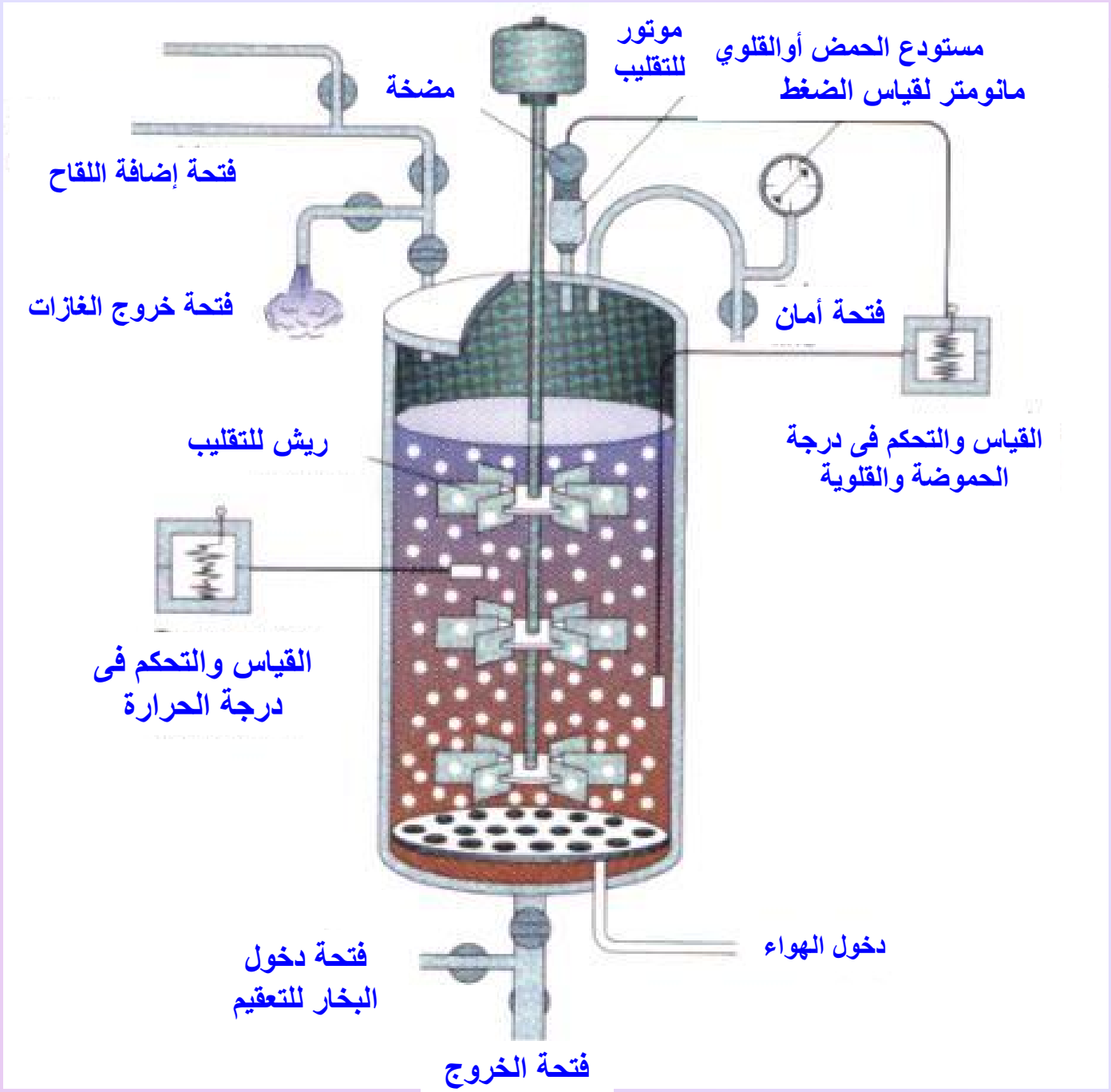
١- البيئة المعقمة ٢- صمام تحكم ٣- مقلب ٤- ريش التقليب

٥- الفراغ الرأسى ٦- المزرعة بعد تمام النمو ٧- صمام ٨- ماء ساخن رفع درجة الحرارة

طريقة تحضير العقدين :

١- تعزل بكتريا العقد الجزريه الرايزوبيم من عقد النباتات البقوليه .
٢- تنمي الريزوبيا المعزولة علي بيئة مانيتول مستخلص الخميرة حتي نحصل علي السلالة نقية وفعالة.
٣- يلقح زجاجات تحتوي علي البيئة السابقة المعقمة (٠.٥ لتر) وتسمي هذه المزرعة بالبادئ starter culture
٤- تحضن المزرعة علي درجه ٣٠ ° م لمدة ٤ -٩ أيام
٥- تنقل المزرعة إلي المخمر سعته ٥ لتر - حيث ينمى الميكروب لمدة ٤-٩ ايام ميكروب علي درجه حرارة ٣٠ °م ومنها تلقح مخمرات الإنتاج بواقع ١% وتتم عملية التهوية بضخ هواء معقم فى البيئة أو باستعمال المقلب الموجود فى قاع المخمر ومن المهم جدا الوصول إلى أعلى كمية ميكروب فى ١سم٣ فى اقصر مدة ممكنة.

رسم تخطيطى يبين الأجزاء المختلفة للمخمر



يتوقف الوصول إلى أعلى كمية ميكروب فى ١سم٣ فى أقصر مدة ممكنة على

١- حجم البيئة فى المخمر
٢- نوع البكتريا
٣- حجم اللقاح
٤- درجة الحرارة
٥- التهوية

المخمرات المستخدمة على النطاق المعملى

٦- تصب المزرعة على الحامل المعقم . وإذا كان الحامل المستخدم عبارة عن دبال فإنه يجب طحنه جيدا ثم تعقيمه بالحرارة أو أشعة جاما ثم بعد ذلك يضاف إليه كربونات كالسيوم حتى يصل الرقم الأيدروجينى إلى ٦.٨ وتصل الرطوبة إلى ٣٥-٤٠ %

يصل عدد الميكروبات في الدبال المشبع بالميكروب فى صوانى فى حجرة معقمة إلى ٣٠٠ مليون ميكروب لكل جرام وذلك فى مدة ٢-١٠ أيام على درجة ٢٢ ْم .

ويعتبر اللقاح المحمول على الدبال والذي يعرف عالميا بالبيت هو أكثر صور لقاح بكتيريا العقد الجذرية كفاءة واستخداما .

٧- يطحن المنتج ويعبأ في أكياس بولي إيثلين حيث تتكاثر الريزوبيا التي قد تصل إلى ٢٥ ألف مليون خلية لكل جرام دبال في حوالي ٤ أسابيع وذلك في حالة ريزوبيا البرسيم الحجازي فقد تصل إلى نفس العدد في خلال أسبوعين . وعموما تكون هذه العبوات صالحة للاستعمال خلال ٦شهور من تاريخ التصنيع

صورة لأحد المخمرات الضخمة

استخدام اللقاح :

عند تلقيح البذور يجب إضافة كمية مناسبة من الماء تكفى لإلتصاق اللقاح بالبذور ولا بأس من إضافة عامل يساعد على الإلتصاق مثل محلول السكر أو محلول الصمغ العربي أو غيره من المواد اللاصقة .

ويجب التأكد من أن البذور غير معاملة بالمواد الكيميائية مثل المبيدات الحشرية والفطرية التي ربما تقضى على البكتريا المستخدمة في اللقاح . وفى حالة معاملة البذور بتلك المواد يجب غسلها عدة مرات بالماء قبل التلقيح ،أو استخدام أكبر قدر ممكن من اللقاح حتى يكون هناك عدد كاف من البكتريا الحية .

ويوصي بزراعه البذور الملقحة في الصباح الباكر أو بعد وقت وذلك لأنه في مثل هذه الأوقات تكون درجه حرارة التربة منخفضة ولا تؤثر علي اللقاح .كما يوصي أيضا بالري مباشرة بعد الزراعة مع تجنب غمر الارض بمياه الري حتي لا تصبح غدقه مما يقلل من فاعلية اللقاح بسبب إنعدام أو نقص التهوية .

في كثير من الاحيان يفضل تلقيح التربة قبل زراعتها مباشره بدلا من تلقيح البذور وذلك تحت الاحوال التالية :

١- عند معاملة بذور البقوليات بالمبيدات الحشرية والفطريه التي ربما تقضي علي الريزوبيا عند التلقيح.
٢- عند الزراعه في المناطق الحارة والجافة .
٣- عندما تحتوي التربة علي أعداد كبيرة من بكتريا العقد الجزرية غير النشيطة في تثبيت النيتروجين الجوي .
٤- في حالة النمو الجيد للبقوليات في مراحلها الاولي وعدم تكوينها للعقد الجذرية في المراحل المتوسطه .

ثانياً : تحضير مزارع الأزوتوباكتر المستخدمة فى إعداد السماد الحيوى (الأزوتوباكترين) :

يعمل التلقيح بميكروبات الازوتوباكتر علي زيادة الحاصلات الزراعية زيادة معنوية خصوصا في الأراضي المستصلحة حديثا ، ولا يرجع ذلك لكون هذه الميكروبات مثبته للنيتروجين فقط ولكن لكونها منتجة للكثير من مواد النمو وتؤدي إلي زيادة المحصول .

تحضير لقاح الازوتوباكترين :

١- تعزل بكتريا الازوتوباكتر من التربة الزراعية . ثم تنمي في البيئة السائلة سواء في زجاجات مخروطية .
٢- تصب المزرعة علي الحامل المناسب المعقم سواء بالحرارة أو باشعه جاما . ويتم الخلط جيدا بحيث تصل الرطوبة الي حوالي ٤٠%.
٣- يترك الحامل المشبع بالميكروب في صواني في حجره مقعمة لمدة ٢ -٥ أيام علي درجه حرارة ٣٠°م يعبا اللقاح في أكياس من البولي إيثيلين .

إستخدام اللقاح :

١- عند تلقيح البذور يتم مثل المتبع في الرايزوبيا

- عند تلقيح البادرات فإنه يمكن :

٢- غمس جذور البادرات في اللقاح الممزوج بالماء (عجينه سائلة) لمدة ١٠-٣٠ دقيقة كما في حالة البادرات التي تشتل مثل الأرز والكرنب والقرنبيط .

٣- صب اللقاح بعد وضعه في الماء حول الجذور كما في حالة قصب السكر والذرة الرفيعة .

٤- يمكن خلط اللقاح مع السماد البلدي ثم يضاف إلي التربة وبعد ذلك تروي التربة جيدا .

ثالثاً : تحضير لقاح البكتيريا المذيبة للفوسفات المستخدمة فى إعداد السماد الحيوى (الفوسفوباكترين)

يمكن تنمية بكتريا

Bacillus megaterim* var. *phosphaticum

وغيرها من الميكروبات ذات الكفاءة العالية في إذابة الفوسفات (الثلاثية) الغير قابله للذوبان علي نطاق كبير علي نطاق كبير في المخمرات أو في زجاجات مخروطية علي رجاج ميكانيكي.

رابعاً : إعداد لقاح الأزوسبيريللا :

بعد تحضير البيئة يتم تلقيحا بميكروب الازوسبيريللا ثم تحفظ علي درجة حرارة ٣٥ °م علي جهاز الرج الميكانيكي في حجره التحضين لمدة ٣ أيام . بعد ذلك تصب البيئة علي الحامل المعقم الذي يتكون من سماد عضوي صناعي وتربة خصبة بنسبة ١:١ ثم تخلط وتعبا في أكياس من البولي إيثيلين.

خامساً : إعداد لقاح الطحالب الخضراء المزرقة :

تقوم بعملية التمثيل الضوئي للحصول علي احتياجاتها من المواد الكربوهيدراتية . بينما تحصل علي احتياجاتها من المواد النيتروجينيه عن طريق تثبيت النيتروجين الهواء الجوي . أما الأملاح المعدنية والماء فتحصل علية من الوسط المحيط بها . وقد وجد أن الطحالب الخضراء المزرقة تستطيع تثبيت نبتروجين الهواء الجوي في حقول الأرز بواقع ٢٥- ٣٠ كجم أزوت / هكتار في السنة . وبناء علي ذلك يمكن توفير كمية من الأسمدة النيتروجينية للأرز عند تسميده حيويا بالطحالب الخضراء المزرقة . وهذا علاوة علي ما تفرزه هذه الطحالب من فيتامينات ومنشطات النمو ذات الأهمية في نمو وزيادة محصول الأرز.

طرق تحضير لقاح الطحالب الخضراء المزرقة :

الطريقة الأولي :-

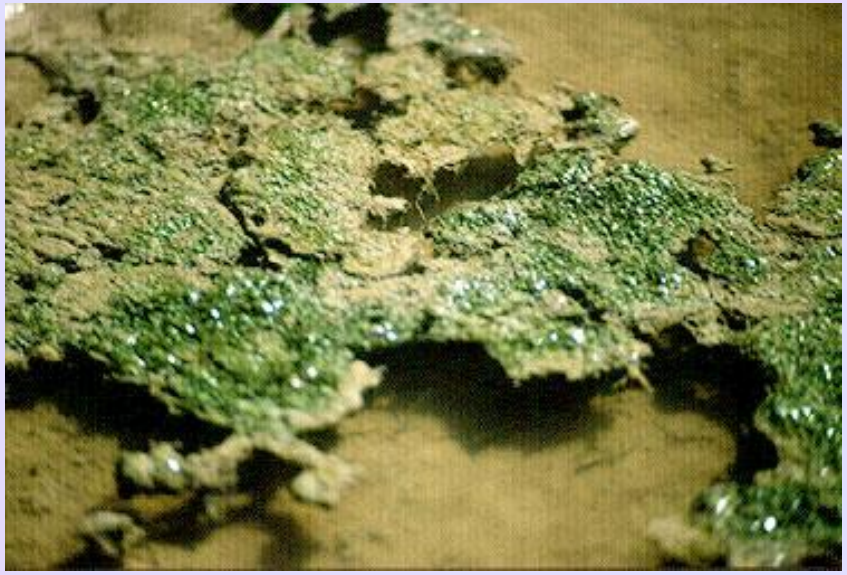
يمكن تحضير اللقاح بطريقة بسيطة عن طريق تنمية الطحالب الخضراء المزرقة في مشتل الأرز ويتم ذلك بأن يقوم المزارع بحجز ٣٢٠ متر مربع من الأرض كمشتل للأرز ثم يضيف بجوارها ٤٠ م٢ لتنمية الطحالب وعندما تصبح بادرات الأرز جاهزة للشتل فانه يتكون حوالي ١٥-٢٠ كجم من الطحالب تكون جاهزة لتلقيح ١٠٥ هكتار . وبالتالي يمكن زراعه المشتل وأيضا الـ٤٠م٢ المخصصة لتنميه الطحالب وبذلك لا يفقد المزارع أي أرض باستخدام هذه الطريقة البسيطة .

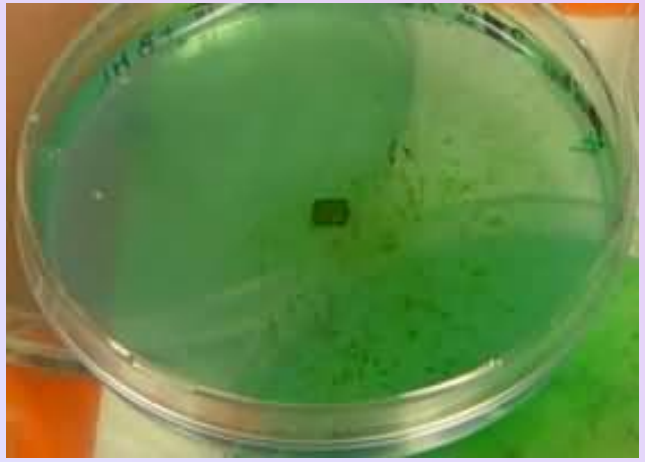
الطريقة الثانيه :

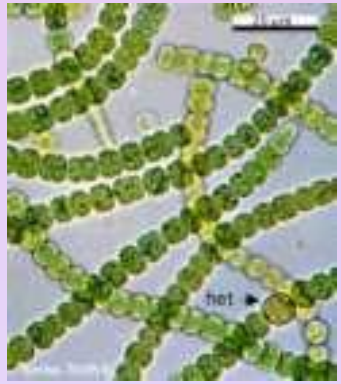
يمكن لتنمية الطحالب الخضراء المزرقة في أحواض كبيرة مزودة بالاضاءه الصناعية وتحتوي علي بيئة سائلة مكونه من أملاح معدنية وجلوكوز. وتوضع الأحواض في صوبات زجاجية خاصة. ثم تضاف البيئة وما بها من الطحالب الخضراء المزرقة بعد اكتمال نموها إلي حوامل مناسبة عبارة حصى مسامي أو صخور إسفنجية .

الطريقة الثالثة :

وتستخدم هذه الطريقة علي نطاق واسع حيث تستخدم صواني كبيرة واسعة من حديد غير قابل للصدأ أو أحواض أسمنتية واسعة تبني في الصوبات أو في العراء ويوضع بها ١٠ كجم تراب تربة و٢٠٠ جرام سوبر فوسفات وبعد ذلك تغمر بالمياه إلي عمق ٢ – ٦ بوصات علما بان الرقم الايدروجيني لهذا المخلوط متعادل . ثم تنثر نشارة الخشب علي التربة بعد رسوبها في القاع وبعد ذلك تلقح بمزارع من الطحالب الخضراء وتترك في الشمس لمدة ٧-١٠ أيام حيث يتكون بعد هذه المدة طبقة سميكة من الطحالب الخضراء المزرقة النامية علي السطح . ثم تكشط هذه الطبقة بعد تمام جفاف الماء منها وتعبا في أكياس من البولي إيثيلين وتخزن لحين الاستعمال .







خطوات تنمية الطحالب الخضراء المزرقة فى أحواض

سادساً : إعداد لقاح الميكوريزا

تقوم الميكوريزا بدور هام في حياة بعض النباتات خاصة أشجار الغابات وكثير من النباتات الاقتصادية ، وهي عبارة عن حاله تعاون بين الفطريات وجذور بعض النباتات الراقية مثل النجيليات والموالح وأيضا الأبصال المختلفة مثل البصل والثوم ، حيث تقوم الميكوريزا بعمل الشعيرات الجذرية علي جذور البنات العائل وبالتالي تساعد النبات علي امتصاص الماء والغذاء والأملاح المعدنية مثل الفوسفور والبوتاسيوم والكالسيوم والحديد والنحاس والزنك ، بينما تأخذ الميكوريزا احتياجاتها الغذائية المعقدة من الكربوهيدرات والأحماض الامينيه والفيتامينات (مثل فيتامين B) من النبات العائل .

والميكوريزا تزيد من جهازية الفسفور أو عن طريق إفرازها لإنزيمات الفوسفاتيز أو عن طريق تشجيعها لجذور العائل لإفراز الأحماض وغاز ثاني أكسيد الكربون التي تزيد من ذوبان الفوسفات .

وتلعب الميكوريزا دورا هاما في مجال الإنتاج الزراعي للمناطق الاستوائية وتحت الاستوائية لأن كثيرا من أراضي هذه المناطق خاصة القلوية منها تعرف بقدرتها على تثبيت الفوسفور في الصورة الغير قابلة للامتصاص وبالتالي الغير صالحه لتغذيه النباتات .

وطبقا لطبيعة المعيشة التعاونية بين الميكوريزا والعائل وأيضا طريقة التغذية فإنه يوجد قسمان من الميكوريزا وهما ميكوريزا خارجية Ectomycorrhiza وميكوريزا داخلية Endomycorrhiza.

والميكروريزا الداخلية تعيش تعيش بالاشتراك مع جذور النبات . حيث ينمو الفطر بصفة رئيسيه داخل منطقة القشرة لجذور العائل .

لا يمكن زراعة الميكوريزا الداخلية في حالة غياب جذور النبات العائل .

حتى الآن لم يمكن عزلها علي البيئة الصناعية وذلك يسبب صعوبة كبيرة في تلقيح الأراضي بها . خاصة الأراضي البكر .

ونظرا لذلك فإنه عند تلقيح هذه الأراضي يجب أن ينقل إليها أرض سبق زراعتها بالنباتات المصابة بالميكوريزا ولتفادي التلوث ببذور الحشائش والنياتودا وأيضا الأمراض الفطرية أو البكتيرية أو الفيروسية التي يمكن أن تنقل إلي الأراضي الجديدة .

يمكن تربية الميكوريزا والعائل النباتي في مشتل نظيف خال من الإمراض وتنتج جراثيم الميكوريزا للعائل مثل الذرة أو الثوم أو البصل ثم تنقل الجذور وما عليها من جراثيم الميكوريزا إلي هذه الأراضي .

وتلقح الميكوريزا في الأراضي المنزرعة بالموالح والذرة والبصل والثوم وفي المشاتل وغيرها ويتم بناء تربة بواقع طن للهكتار (٢.٤ فدان) أي أن الفدان يلزمه حوالي ٤٠٠ كيلو جرام تقريبا .

وعموما عند جمع محاصيل الذرة والبصل فأنة يتم نزع جذورها ثم تقص الجذور بما عليها من التربة وتكوم مع التربة من نفس الحقل وبعدها تنقل للتلقيح . ويجب أن نعلم أن الميكوريزا غير متخصصة في إصابتها بعكس الرايزوبيا .

طريقه أخذ العينة النباتية:

تؤخذ العينة النباتية باحتراس بحيث لا يحدث تمزق للمجموع الجذري وخصوصا الشعيرات الجذرية .ويقلع المجموع الجذري وما حوله من منطقة التربة المحيطة بالجذر .

طريقه حفظ العينة النباتية:

توجد طريقتان لحفظ المجموع الجذري حتى يتم صبغة وهما

- بعد أخذ العينة النباتية يتم حفظ الجزر مباشره في الثلاجة علي ٥ °م لمدة ١٥ يوم وذلك لتجنب تحللة.
- يحفظ الجذر في محلول حفظ (FAA) وهو يتكون من ٥ % فورمالين ، ٥% حمض الخليك ، ٥٤ % كحول الايثايل و٣٦ %ماء مقطر .

طريقة استخلاص الجراثيم :

تستخدم طريقة الغربلة المبتلة لاستخلاص جراثيم الميكوريزا

وهذه الطريقة تتلخص في الآتي :-+

١- يؤخذ من التربة القريبة من المجموع الجذري للعينة النباتية المتحصل عليها حوالي ١-٢ كيلو جرام تربه وتوضع في جردل بلاستيك ثم يملأ بالماء مع تقليب التربة باستمرار ، وتترك العينة لبضعة دقائق حتى تترسب البقايا النباتية وحبيبات التربة ذات الحجم الكبير في القاع .

٢- يؤخذ الجزء الطافي ويمرر على مجموعة من المناخل ذات أحجام من ٣٨-٢٥٠ فتحة في المليمتر المربع .

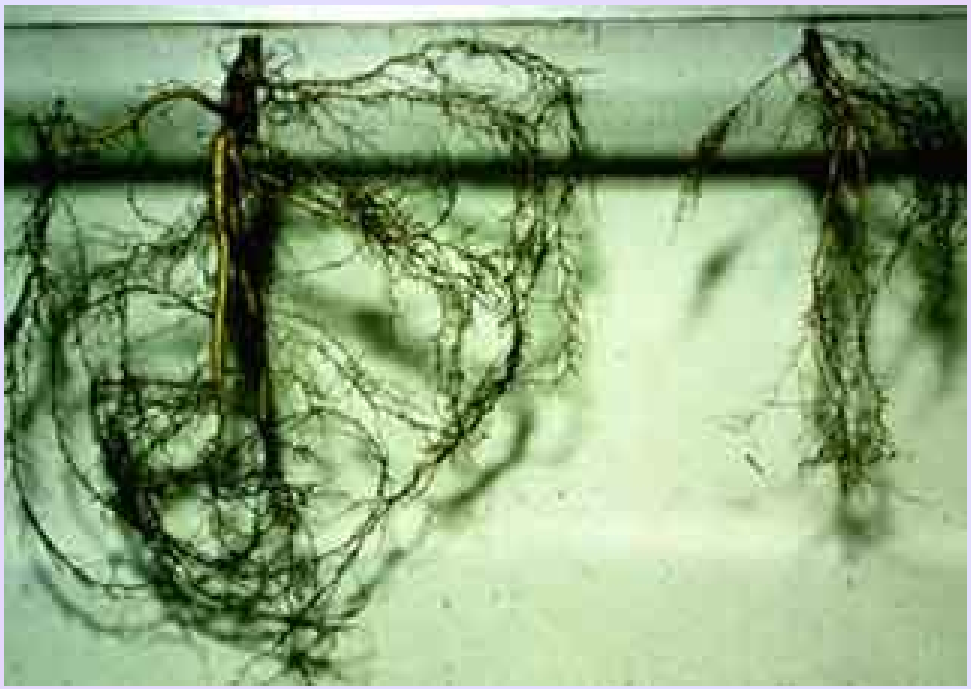
٣- تجمع الجراثيم وحبيبات التربة من على سطح المناخل وتوضع في زجاجات عينات في صورة معلق ثم توضع فى الثلاجة على ٥°م إلى أن يتم فصلها .

٤- يؤخذ ١ملل من عينة معلق الجراثيم وتوضع على ورق ترشيح مع مراعاة شفط الماء باستعمال مضخة ماء ، ثم يتم عد الجراثيم على الورق وذلك باستخدام ميكروسكوب ، ويحسب عدد الجراثيم فى الجرام الواحد من التربة .

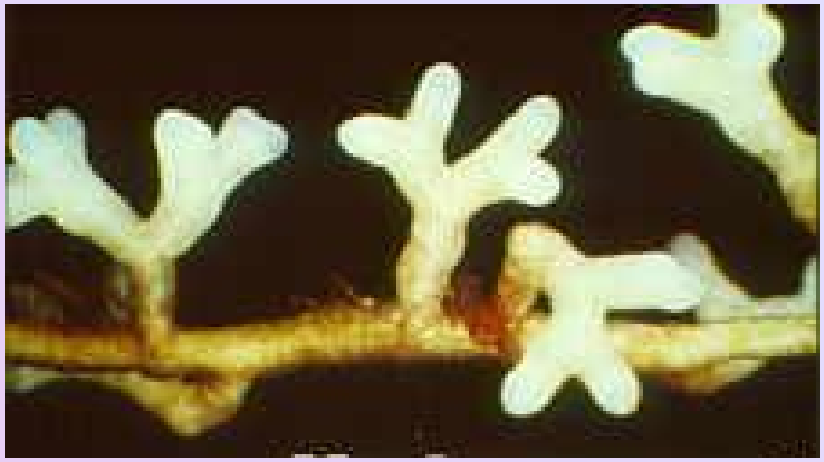
الغرابيل المستخدمة فى إستخلاص جراثيم الميكوريزا

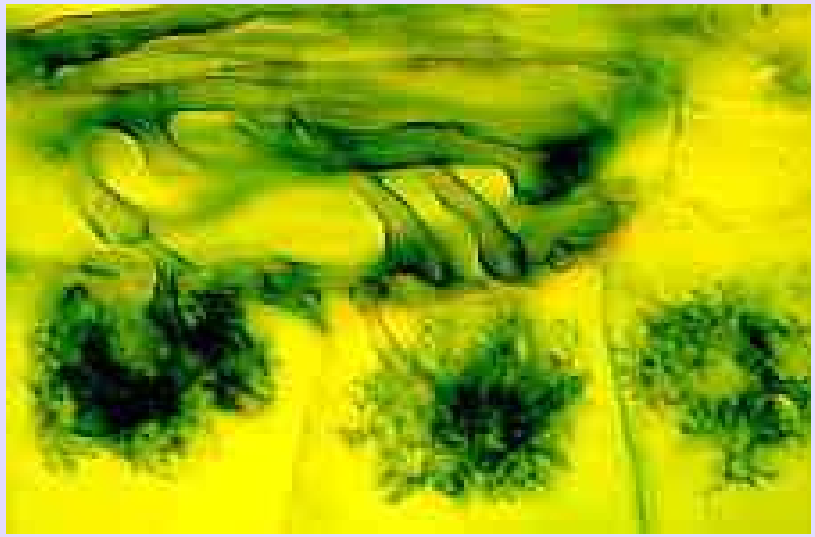
وضع التربة فى جرادل مملوئة بالماء مع التقليب المستمر

فصل الجراثيم على سطح الغرابيل



نبات غير ملقح
بالميكوريزا وآخر ملقح





تقوم الميكوريزا بعمل الشعيرات الجذرية على جذور النبات العائل

المراجع :

http://www.reproductionresources.com/cgi-bin/quikstore.cgi?category=Equine_Breeding
www.alibaba.com/catalog/.../Disposable_Products.html
http://www.uvsc.edu/eath/photoGallery/envtMgmt/slide6.html
http://faculty.maryvillecollege.edu/Kneas/CHEM121L/lab_equipment.htm
http://www.apsnet.org/education/LabExercises/Microscopes/#comp1
http://www.mycolog.com/chapter17.htm
http://www.microbelibrary.org/
http://www.denniskunkel.com/index.php?cPath=3
http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age4660/lect/lect_21/f15_5.JPG
http://www.labx.com/v2/b.cfm?a=794
http://structbio.vanderbilt.edu/wetlab/fermentor.phtml
http://czbiom.ecn.cz/index.shtml?x=148446