

492

2000-2002

תקופת המחקר:

416-0483-02

קוד מחקר:

Subject: COMBINED SYNERGISTIC EFFECT
BETWEEN FUNGISTATS AND BACTERIOCINES TO
CONTROL MOLDS IN AGRICULTURAL PRODUCTS
AND FOODS

Principal investigator: NATAN GOLLOP

Cooperative investigator: YAIR ERNER, NIRIT
BERNSTEIN, JIFTACH BEN ASHER

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

שם המחקר: צמצום הדישון בחנקות במטעים
המושקים במים שפירים ומי קולחין ע"י ביקטור
בחיידקים מקבעי חנקן, פרנקיה

חוקר ראשי: נתן גולופ

חוקרים שותפים: יאיר ארנר, נירית ברנשטיין,
יפתח בן אשר

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן
50250

תקציר

רקע - דרישתם הגבוהה של מטעים לחנקן זמין מצריכה דישון. עודפי דשן יכולים לנוע מאזורי הדישון אל מי התהום. לכן יש חשיבות מרובה למצוא תחליפים לדישונים מוגברים ובעיקר בחנקות הדרושות לצמחי חקלאות בכמות גבוהה והנעות בקלות בתוך הקרקע. פרנקיה הוא חיידק ממשפחת האקטינומיצטי המסוגל לקבע חנקן חופשי החיידק מקבע חנקן בסימביוזה עם שורשיהם של מעל 200 מיני צמחים-דו פסיגיים שונים.

הממצאים - במחקר זה העמדנו את השיטה לבודד חיידקי פרנקיה וסרקנו מעל חמישים עצים חקלאות למצוא את החיידק בקרקעות ישראל. מאחר של הצלחנו לבודד מצמחי חקלאות בודדנו חיידקי פרנקיה מקווארינות שידועות כסימביונטים של פרנקיה. הדבקת חיידקי הפרנקיה אשר בודדו בישראל בצמחי חקלאות והדרים בעיקר לא צלחה. גם שימוש בחיידקי פרנקיה שנרכשו במאגרי חיידקים בחו"ל להדבקת צמחי חקלאות בישראל לא צלחה.

צמצום הדישון בהנקות במטעים המושקים במים שפירים ומי קולחין ע"י ביקטור בחיידקים מקבצי חנקן, פרנקיה.

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

נתן גולופ, המחלקה למדעי המזון, מרכז וולקני, מינהל המחקר החקלאי
ברנשטיין נירית, המחלקה לפיסיקה סביבתית והשקיה, מרכז וולקני, בית דגן
יאר ארנר, המחלקה לעצי פרי, מרכז וולקני, בית דגן

Naatn Gollop, Dept of Food Science, The Volcani Center, ARO. P.O.Box 6 Bet-Degan 50250. E-mail: ngoollop@Volcani.agri.gov.il

Nirit Bernstein Dept of Environmental Physics The Volcani Center, ARO. P.O.Box 6 Bet-Degan 50250. E-mail: nirit@Volcani.agri.gov.il

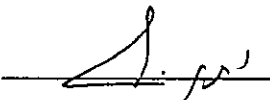
Erner Yair Department of Fruit Tree Sciences The Volcani Center, ARO. P.O.Box 6 Bet-Degan 50250. E-mail: yerner@Volcani.agri.gov.il

מרץ 2003

אדר תשס"ד

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

 התימת החוקר

הקציד

דרישתם הגבוהה של מטעים לחנקן זמין מצריכה דישון. עודפי דשן יכולים לנוע מאיזורי הדישון אל מי התהום. לכן יש חשיבות מרובה למצוא תחליפים לדישונים מוגברים ובעיקר בחנקות הדרושות לצמחי חקלאות בכמות גבוהה והנעות בקלות בתוך הקרקע. פרנקיה הוא חיידק ממשפחת האקטינומיצטי המסוגל לקבע חנקן חופשי החיידק מקבע חנקן בסימביוזה עם שורשיהם של מעל 200 מיני צמחים דו פסגיים שונים.

במחקר זה העמדנו את השיטה לבודד חיידקי פרנקיה וסרקנו מעל חמישים עצים חקלאות למצוא את החיידק בקרקעות ישראל. מאחר של הצלחנו לבודד מצמחי חקלאות בודדנו חיידקי פרנקיה מקווארניות שידועות כסמביונטים של פרנקיה. הדבקת חיידקי הפרנקיה אשר בודדו בישראל בצמחי חקלאות והדרים בעיקר לא צלחה. גם שימוש בחיידקי פרנקיה שנרכשו במאגרי חיידקים החו"ל להדבקת צמחי חקלאות בישראל לא צלחה.

יש, לציין שהתקציב המצומצם ביותר שעליו התרענו מראשית המחקר לא איפשר לנו לפתח את כל המחקר כפי שהינו רוצים לראותו ולהביא לסיומו המוצלח יותר.

רשימת פרסומים

עדיין אין.

דוח לתוכנית מחקר מספר 02-0483-416

צמצום הדישון בחנקות במטעים המושקים במים שפירים ומי קולחין ע"י ביקטור בחיידקים מקבעי חנקן, פרנקיה.

נתן גולופ, המחלקה למדעי המזון, מרכז וולקני, מינהל המחקר החקלאי
ברנשטיין נירית, המחלקה לפיסיקה סביבתית והשקיה, מרכז וולקני, בית דגן
יאר ארנר, המחלקה לעצי פרי, מרכז וולקני, בית דגן

א. רקע

חנקן הוא אלמנט ההזנה החשוב ביותר לצמח לאחר אור מים ופחמן דו חמצני. צמחים יכולים לקבל חנקן ע"י ספיגתו מהקרקע או על ידי חיידקים מקבעי חנקן הנמצאים באסוציאציה עם שורשי הצמח. על מנת להעשיר את הקרקע בחנקן נהוג בחקלאות המודרנית לדשן בחנקן אי-אורגני כדי להעשיר את הקרקע בחנקן. חנקן זה נוטה להישטף משכבת בית השורשים זמן קצר לאחר מתן הדשן ועלול להצטבר במי התהום ולגרום לזיהום בניטריטים.

צמחים מסויימים כמו קטניות ועצים דו פסגיים מסוגלים לקשור חנקן אטמוספרי בעזרת חיידקים קושרי חנקן. מערכות אלו הן בעלות פוטנציאל להחליף דישון חנקתי.

צמחים ממשפחת הקטניות שורשיהם מודבקים בחיידק קרקע קושר חנקן *Rhizobium* הם המקור העיקרי לקיבוע חנקן במערכות חקלאיות. סמציפיות ההכרה בין חיידק *Rhizobium* לקיטנית המאחסנת היא גבוהה ביותר. חיידק נוסף הקושר חנקן אטמוספרי הוא ה-*Azospirillum* החי באסוציאציה הדוקה עם שורשי דגנים ולמרות שיעילות הקשירה שלו היא נמוכה מזו המתבצעת על ידי חיידקי ריזוביום בקטניות הרי שהשפעתם רבה על ביקטור צמח הדגן.

דווחים אודות קיומם של פקעיות בשורשי עצים שונים החלו להופיע בספרות כבר במאה הקודמת. דווח כי עצים כמו אלנו (*Alnus*) עץ השמן (*Elaeagnus*) ושרדיה (*Shepherdia*) מסוגלים דגדול במצעים חסרי חנקן, עובדה המצביעה על קיום מערכת קיבוע חנקן אטמוספרי. רק בשנת 1987 הצליחו לבודד חיידק החי בסימביוזה עם עצים אלו והמסוגל לקבע חיידק. *Frankua* זוהי כחיידק מקבע חנקן ממשפחת האקטינומיצטים והוא ועד היום ידועים למעלה מ-200 זני עצים שונים של דו-פסגיים מ-8 משפחות שונות היכולים לחיות בסימביוזה עם חיידק *Frankua* ולקבע חנקן אטמוספרי. בחיידק ה-*Frankua* אינו ספציפי לזן אחד של צמחים אלא מסוגל לחיות בסימביוזה עם מספר צמחים ועצים ולקבע חנקן.

חנקן בהדרים כמו בצמחים אחרים הוא מרכיב עקרי ברקמות הצמחים ולכן נצרך בכמות רבה בהשוואה ליסודות הזנה אחרים. חוסר חנקן אפילו לתקופות קצרות עשויות לגרום לתופעות שליליות בהדרים. מחסור בזמן הפריחה והחנטה עשוי להקטין מאוד את היבול. כיום, על מנת לספק את דרישות החנקן של

ההקרים מדשנים את הקרקע בניטרט ולא באמון מאחר וחיידקי הקרקע מחמצנים אמון לניטרט. עודפי הניטרט עלולים להישטף ולהגיע ולזבם את מי התהום.

צמצום מקורות המים השפירים העומדים לרשות החקלאים בישראל מחייב ניצול מים שוליים על מנת למנוע הקטנת שטחי החקלאות. מי קולחין המטוהרים חלקית מכילים כמות גדולה של חנקן ולא היה צורך הדישון גוסף מאידך השימוש במים אלו אסורים ואילו מים שעברו תהליך טיהור שניוני יקר יחסית מכילים כמות קטנה של יחסית של חנקן. ניסיונות לגידול שתלי הדורים במצע חול והשקייתם במי שפדן שאיכותם טובה ביותר ורמת החנקן בהם נמוכה מאד ללא תוספת דשן חנקתי לא נחלו הצלחה השתילים הראו מחסור קיצוני בחנקן.

עדות ישירה דגבי השקיה בקולחין על הסמביוזה שך פרנקיה למאחסן דווח על ידי (Ramirez-1989) Saad and aldes. החוקרים מצאו כי השקיית קוזורארינה במי קולחין משפרת את הסימביוזה בין המאחסן, העץ וחיידק הפרנקיה ומגבירה את צימוח העץ והתפתחותו. במחקר זה העמדנו את השיטה לגידול ובידוד חיידקי פרנקיה. בבדיקה של 50 שורשי עצים לא נמצאה כל נוכחות של חיידק הפרנקיה. ניסיונות הדבקה של הדורים הזן פרנקיה שבודד בחול ורכש מאוסף חיידקים הגרמניה לא עלו יפה ולא נצפתה כל יצית פקעיות ולא קיבוע חנקן.

ב. חומרים ושיטות

זני החיידקים

על מנת לפתח שיטת הגידול של חיידקי פרנקיהון DSM 44263 נרכשו מאוסף החיידקים של גרמניה Braunschweig, DSZM חיידקים אלו בודדו מ-Comptonia peregrina

חומר צמחי

נסקרו שטחי מטעים שונים ברחבי הארץ לקיום סמביוזה בין שורשי העצים לחיידקי פרנקיה.

אזורים שנבחנו:

- פרדסים בערבה
- תמרים ומגו בערבה
- פרדסים בנגב
- נשירים בבקעת ערד
- כרם בבקעת ערד
- נשירים בגליל
- אבוקדו בגליל

- נשירים בגולן
- פרדסים בעמק
- נשירים בעמק

כמו כן נבחנו שורשי קזואריות

- בעמק
- במרכז וולקני
- ובנגב המערבי בסביבות פרדסים

גידול חיידקי פרנקיה

חיידקי פרנקיה הם ממשפחת האקינומיצטס וזמן דור שלהם הוא כ-10 שעות החיידקים גודלו נבחנו מצעים שונים לגידול חיידקי הפרנקיה החיידקים גודלו ב28 מעלות סלציום בטלטול איטי או בצלחות אגר מעקב אחר גידול החיידקים נעשה ע"י עליה בעכירות המצע. במידה והחיידקים גודלו על מצע מוצק הוסף למצע 1.5% אגר

מצע A שהכיל

sodium propionate	0.48 g l ⁻¹
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g l ⁻¹
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02 g l ⁻¹
NH ₄ Cl	0.27 g l ⁻¹
Na ₂ Fe ₃ + EDTA	0.007 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1.36; pH 6.8 g l ⁻¹
H ₃ BO ₃	2.86 mg l ⁻¹
MnCl ₂ · H ₂ O	1.81 mg l ⁻¹
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 mg l ⁻¹
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08 mg l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025 mg l ⁻¹
CoSO ₄ · 4H ₂ O	0.001 mg l ⁻¹
thiamine	10 mg l ⁻¹
pyridoxine HCl	50 mg l ⁻¹
folic acid	10 mg l ⁻¹
D-pantothenic acid hemicalcium salt	10 mg l ⁻¹
nicotinic acid	50 mg l ⁻¹
d-biotin	22.5 mg l ⁻¹
riboflavin	10 mg l ⁻¹

מצע DPM (737) שהכיל

KH ₂ PO ₄	1.000 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.100 g

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.010 g
Na-propionate	1.200 g
Chelated iron solution (see below)	1.800 ml
Trace element solution (see below)	1.000 ml
Distilled water	1000.000 ml

Chelated iron solution:

FeSO ₄ x 5 H ₂ O	5.540 g
Na ₂ -EDTA	7.560 g
Distilled water	1000.000 ml

Trace element solution:

CoCl ₂	0.025 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.080 g
H ₃ BO ₃	2.860 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1.810 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.025 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.220 g
Distilled water	1000.000 ml

מצע DSM N-Z-anine (737) לפי המלצת

Glucose	10.0 g
Starch, soluble	20.0 g
Yeast extract	5.0 g
N-Z-Amine	5.0 g
CaCO ₃	1.0 g
Distilled water	1000.0 ml
pH 7.2	

בידוד החיידקים משורשי צמחים

- השורשים נשטפו במי ברז מרגבי העפר.
- השרשים נטבלו בתמיסת אסמיום טטרה אוקסיד 3% , או 1% אקונומיקה מסחרית, לפרקי זמן של 1 – 4 דקות על מנת להרוג את כל החיידקים אשר על גבי השורשים.
- חתיכות של 5 מ"מ שורשים הונחו על גבי המצע.
- מצע המכיל רק 0.8% אגר בטמפרטורה של 42 מעלות נשפך על צלחות הפטרי המכילות את השורשים.
- הצלחות נאטמו בפרפילים למנוע התאדות.
- אינקובציה למשך 35 יום ב- 30 מעלות.

הדבקת שורשי צמחים בפרנקה

תמיסה של חיידקים פרנקה שגדלה במעבדתנו (חיידקים טריים) הוספה לתמיסת הדיגול של הצמחונים. תמיסת הוגלנר מאווררת בריכוז 0.5 בוריאציה המכילה ניטרט בלבד ולא אמון. תהליך ההדבקה נעשה 3 פעמים ולאחר מכן הצמחונים נבדקו כל שבוע להתפתחות פקעיות.

ג. תוצאות

בחירת מצע הגידול לחיידקי פרנקה

מאחר שבספרות יש מספר מצעים אשר מומלצים לגידול פרנקה בחרנו לבחון שלש מצעים שונים למרות שניתן לראות כי יש בניהם דמיון רב. חיידקי הפרנקה נזרעו למצעים נוזליים וגם על גבי מצעים מוצקים. מטבלה מספר 1 ניתן לראות כי חיידקי הפרנקה גדלו על שני המצעים המורכבים יותר ואילו על המצע N-Z-Amine החיידקים לא גדלו. הוחלט להמשיך לבדוד ולגדל את החיידקים במצע DPM.

טבלה מספר 1 גידול חיידקי פרנקה DSM 44263 על מצעי גידול שונים הניסוי נערך במצעים נוזליים והזריעה הייתה 1% מתרבית במצב העמיד שלה.

מצע	A	DPM	N-Z-Amine
	++	+++	-

בידוד חיידקי פרנקה

שורשי עצי פרי

השורשים שנדגמו בשדה הובאו למעבדה ונשמרו בקירור עד הטיפול בהם. לאחר השטיפה במי ברז הם נבחנו להימצאות פקעיות. לא נמצאו פקעיות בשורשים שנבדקו ולמרות זאת נמשך תהליך בידוד החיידק. לא נמצא גידול של חיידקי *Frankia* או כל מושבה אחרת בשורשים שחוטאו באוסמיום – טטרה – אוקסיד. לעומת זאת נמצאו הרבה מאוד מושבות מסוגים שונים בשורשים אשר חוטאו באקטנומיקה מסחרית.

שורשי עצי קוואריבה

השורשים שנדגמו בשדה הובאו למעבדה ונשמרו בקירור עד הטיפול בהם. לאחר השטיפה במי ברז הם נבחנו להימצאות פקעיות. נמצאו מעט פקעיות בשורשים ונמשך מהן תהליך בידוד החיידק. נמצא גידול של חיידקי actinomycetes שצבע המושבות היה אדמדם חום המצביע על המצאות מולקולות דמויות

המגלובין האופייניות לחיידקים מקבעי חנקן. חיידקים אלו נבחנו תחת מיקרוסקופ פזות וצורתם היתה דומה לצורת חיידקי פרנקיה.

הדבקת צמחוני הדלים בפרנקיה

למרות הניסיונות להדביק את שורשי ההדרים בחיידקי פרנקיה לא הצלחנו מגלל חוסר אמצעים כספים ניסיונות ההדבקה לא נערכו במספר גדול של צמחים ובריכוזים שונים של חיידקים.

ד. סיכום

לא נמצאו חיידקי *Frankia* בשורשי עצי פרי ברחבי הארץ. בדינו כיום בידוד של חיידקי *Frankia* משורשי קזוארינה הידועה כפונדקאי נפוץ לחיידק. בידוד זה דורש הגדרה סופית.

הדבקות של שורשי עצי פרי בחיידקי פרנקיה לא צלחו

א. בגלל שלא בודד חיידק מתאים לסמביוזה עם ההדרים

ב. ישנה אפשרות שונים שבודדו חשורשי צמחים אחרים יכולים להדביק בתנאים מבוקרים את שורשי הפרנקיה.

להערכתנו, לאור חשיבות הנושא וזיהום מי התהום יש צורך להשקיע כספים נוספים ולהרחיב את המחקר בעיקר בנושא של הדבקת חיידקים ממקורות שונים להדבקת עצי פרי.

ה. פרסומים מדעיים שנבעו מביצוע המחקר

עדיין אין.