عزل البكتريا المنتجة لإنزيم اليوريز من مصادر بيئية مختلفة في محافظة الأنبار ودراسة أهم العوامل المؤثرة في نشاطه

آمال داود عبود* أ.د. أدهام علي عبد[1] أ.م.د. أحمد محمد تركي[2]

[1]جامعة الأنبار/ كلية الزراعة

[2]جامعة الأنبار/ كلية العلوم

تاريخ الاستلام: 2012/1/30

الخلاصة

تم عزل وتشخيص البكتريا المحللة لليوريا والمنتجة لإنزيم اليوريز من مصادر مختلفة شملت ترب الزراعية وحظائر الحيوانات ومياه النهر ومياه الصرف الصحي من مواقع مختلفة في محافظة الأنبار وعينات الأدرار لمرضى مستشفى الرمادي التعليمي و دراسة تأثير درجات الحرارة و الكلس ($CaCO_3$) والجبس($CaSO_4$) والنيكل على معدل نشاط البكتريا المحللة لليوريا، شخصت العزلات المنتجة لإنزيم اليوريز البالغة نسبة تواجدها في مجمل العينات 58.3 % كونها تابعة للبكتريا المحللة لليوريا ، انتخب خمسة عزلات بكتيرية على أنها الأكفأ في تحلل اليوريا وهي *Bacillus* KS4 و*Ochrobacter anthropi* RM30 و *Raoultella planticola* WR43 و*Enterobacter cloacae* RW47 و *Proteus mirabilis* U70 أظهرت النتائج أن أفضل نشاط للبكتريا المحللة لليوريا والمنتجة لإنزيم اليوريز عند درجة حرارة (35و40) مْ بينما أنخفض النشاط عند حضنها في درجة حرارة 15 و50 مْ وتوقف نشاط العزلات عن تحليل مركب اليوريا عند حضنها في درجة الحرارة 60 مْ ، كما أزداد معدل نشاط العزلات بزيادة نسبة الكلس لحد 4 و5 % في الوسط بينما انخفضت فعالية ونشاط العزلات في تحلل مركب اليوريا مع أستعمال نسب متزايدة من املاح الجبس عن نسبة 1% وعند استعمال نسبة الجبس 5 % شهد نشاط العزلات أنخفاض شديد، و أدى أستعمال 0.01 % Ni في الوسط الى زيادة فعالية العزلات بينما سجلت العزلات أنخفاض في فعاليتها عند نسبة 0.02 % .

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

Isolating Urease producing Bacteria from Different ecological Sources and Studying Some Factors Influencing its Activity

Aamal D. Abood [1]Idham A. Abed [2]Ahmed M. Turky
[1]University of Anbar / College of Agriculture
[2]University of Anbar / College of Science

Abstract

The present research paper has been carried out to isolate and determine urea degenerating and urease producing bacteria from different sources including agriculture soils, animal yards, river water and health drainage from varies locations in Anbar province and patients divresis samples of Ramad Educational Hospital. Also, it tries to study the effect of temperatures,($CaCO_3$) ,($CaSO_4$) and Nickel on the rate of the activity of urea degenerating bacteria, Isolates producing Urease enzyme have been identified as belonging to urea degenerating bacteria with a dominant rate of 58.3% in all isolates. Five bacterial isolates have been elected as the most efficient in urea degenerating, namely; *Bacillus* KS4, *Ochrobactor anthropi* RM30, *Raoultella planticola* WR43, *Enterobacter cloacae* Rw47 and *Proteus mirabilis* U70. Results have shown that the best activity of urea degenerating and Urease producing bacteria was at 35 and 40 c° temperatures. The activity decreased when incubated at 15 and 50 c° temperatures and stopped when incubated at 60 c°. The activity rate of isolates increased when increasing the percentage of gypsum in the medium to 4 and 5%, while the activity in degenerating urea compound decreased when using increasing amounts of gypsum above 1%. When using 5% of gypsum, the activity of isolates severely decreased. The use of 0.01% of Ni in the medium has led to increasing the isolates activity,whereas their activity decreased at 0.02% of Ni.

المقدمة

تستعمل مركبات اليوريا كمصدر نتروجيني لنمو مختلف الكائنات الحية ذات القدرة على أنتاج أنزيم اليوريز المحلل لمركب اليوريا، وقد تزايد استعمال هذه المركبات في السنوات الأخيرة خاصة في المحاصيل الزراعية ،أذ يصل معدل المضاف منها إلى بيئة التربة 500.000 طن.سنة$^{-1}$ في أراضي المملكة العربية السعودية (20). شهد العالم توسعاً كبيراً في استخدامها لسهولة الاستعمال وانخفاض ثمنها إضافة لمحتواها العالي من النتروجين (46% N) ، وبلغت خلال أعوام 2008 و2009 معدلات إضافة 67,146,000 طن (11) وأن هذة الكمية معرضة للزيادة خاصة مع الرغبة بزيادة الرقعة الزراعية والحاصل لما تعطيه أسمدة اليوريا من دور مهم في زيادة نمو النبات والحاصل ، وأن الكميات المضافة من هذه المركبات تكون غير جاهزة للنبات إلا بعد تعرضها لإنزيم اليوريز المنتج من بعض الميكروبات وخلايا بعض النباتات حسب المعادلة :-

$$(NH_2)_2CO---NH_2COOH + NH_3----CO_2 + 2NH_3---H_2CO_3 + 2NH_3$$

من جانب أخر أكدت بعض الدراسات أن تحلل مركب اليوريا من نوع الممتص للحرارة لذلك عند استعماله في المواسم التي تنخفض بها درجات الحرارة يؤدي إلى خفض نسب الإنبات وبطء في جاهزيته للنبات وأضرار للبذور والبادرات النباتية الفتية. كما يتعرض نشاط إنزيم اليوريز إلى أنخفاض مع زيادة نسبة الكلس في التربة وقلة الكثافة النباتية مع زيادة نسبة الاملاح وأنخاض نسبة المادة العضوية، إلا انه يزداد مع زيادة تركيز اليوريا (6)، وتنتشر الأحياء المجهرية المنتجة لإنزيم اليوريز في الطبيعة بشكل كبير وتختلف في قابليتها على تحلل مركب اليوريا وان زيادة فعالية اليوريز في التربة يدل على نشاط تلك الأحياء ألمجهرية في أنتاج اليوريز (3).

يقوم عدد كبير من الأحياء المجهرية المتواجدة في بيئة التربة بأنتاج إنزيم اليوريز في التربة الذي يؤدي دوره في تحلل مركبات اليوريا لتصبح جاهزة للنبات ، ولكن عند تعرض الأحياء المنتجة لهذا الإنزيم إلى العوامل التي تقلل من الفعالية أو تزيدها ستؤدي إلى خفض في كمية النتروجين الجاهزة للنبات أو زيادة كمية الامونيوم في بيئة التربة الذي يؤدي إلى مشاكل بيئية أخرى (12) . لغرض مواجهة الأضرار الناجمة من زيادة ألاستعمال لهذه المركبات والتي أصبحت تصل إلى البيئة من مصادر مختلفة ، يجب العمل على تواجد العزلات المنتجة لإنزيم اليوريز في البيئة بكميات كافية ومتوازنة مع الكميات المضافة.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 120 عينة من مصادر مختلفة شملت 20 عينة تربة زراعية و20 عينة ترب حظائر و 20 عينة مياه صرف صحي و20 عينة مياه نهر شملت مواقع مختلفة من مياه نهر الفرات في محافظة الأنبار، و جمعت 40 عينة أدرار من المرضى المراجعين لمستشفى الرمادي التعليمي ، الذين يعانون من أعراض التهاب القناة البولية ، أنجزت عملية الجمع من بداية شهر تموز إلى نهاية تشرين الثاني 2010.

عزل وتنقية العزلات البكتيرية .

لقح وسط الاكار المغذي ووسط ماكونكي اكار من محلول تخافيف العينات وحضنت النماذج بدرجة حرارة 28 مْ لمدة 24 ساعة عدا عينات الادرار حضنت بدرجة حرارة 37 مْ بعدها زرعت المستعمرات البكتيرية على وسط urea agar base وأخذت النتيجة بعد 24 و 48 ساعة أذ عد تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي دلالة على ايجابية الفحص إما بقاء اللون الوسط اصفر فعد سالبا.

الكشف النوعي لانزيم اليوريز

لقح وسط مرق اليوريا urea broth بالعزلات البكتيرية التي حصل عليها من مصادر العزل المختلفة وللتأكد من عدم تداخل عوامل اخرى تؤدي إلى رفع قيم الرقم الهيدروجيني للوسط، حضر وسط مرق اليوريا بدون اضافة اليوريا كأنبوب سيطرة اول (control 1) مع وجود أنبوب سيطرة ثان ترك بدون تلقيح (control 2) للتاكد من عدم تأثير درجة حرارة الحاضنة ومدة الحضانة في كاشف احمر الفينول. كذلك أستخدمت سيطرة موجبة وسيطرة سالبة بتلقيح الوسط من بكتيريا *E.coli* حصل عليها من مختبر الأحياء المجهرية في مستشفى الرمادي التعليمي نميت العزلات الجرثومية بدرجة حرارة 37 مْ بينما نميت العزلات التي مصدرها تربة بدرجة حرارة 28 مْ ولمدة 24 و48 و 72ساعة تم الحصول على 70 عزلة متباينة في قدرتها على تحليل اليوريا (16).

تشخيص العزلات

أجريت الفحوصات المجهرية والكيموحيوية للعزلات المنتخبة وأعتماداً على المصادر العلمية المتبعة لتشخيص عزلات البكتريا (4) و(10) و(1).

تأثير درجة الحرارة في نشاط العزلات المحللة لليوريا المنتجة لإنزيم اليوريز

درس تأثير درجات الحرارة (15 و25 و35 و40 و50 و60) مْ في نشاط العزلات المحللة لليوريا والمنتجة لأنزيم اليوريز لتحديد درجة الحرارة المثلى لتحلل اليوريا وانتاجها لإنزيم اليوريزفي الوسط urea broth الحاوي على اليوريا بتركيز 200 ملغم .لتر$^{-1}$ وبحجم 10 مل ولقح بالعزلات البكتيرية بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة KS 4 و WR43 و RM30 و U70 و RW47 وحضنت بالدرجات الحرارية أعلاه خلال 24 ساعة بعدها تم قياس الشدة اللونية للوسط (17).

تاثير الجبس$CaSO_4$ في نشاط العزلات المحللة لليوريا المنتجة لإنزيم اليوريز

لغرض اختبار تاثير الجبس في نشاط العزلات المحللة لليوريا تم اضافة الجبس بنسب (1 %و2 % و3%و 4% و5 %) بعدها تم اضافة مكونات وسط urea broth الحاوي على اليوريا بتركيز 200 ملغم .لتر$^{-1}$ بطريقتين الأولى ترك دون تعديل pH الوسط عند أضافة مركب الجبس ليصل(4.3) والثانية ضبط pH الوسط الى 6.8 ، بعدها لقح الوسط بحجم 10 مل بالعزلات البكتيرية بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة *KS* 4 و WR43 و RM30 و RW47 و U70 وحضنت بدرجة حرارة 28 مْ وخلال 24 ساعة ، قيست الشدة اللونية للوسط وقدرت اليوريا المتبقية في الوسط بالطرح(17).

تأثير الكلس $CaCO_3$ في نشاط العزلات المحللة لليوريا المنتجة لإنزيم اليوريز

لغرض اختبار تاثير نسب مختلفة من لكلس في نشاط العزلات المحللة لليوريا تم اضافة الكلس بنسب(1 %و2 % و3%و 4% و5 %) بعدها تم اضافة مكونات وسط urea broth الحاوي على اليوريا بتركيز 200 ملغم .لتر$^{-1}$ ، وضبط pH الى 6.8 لقح الوسط بحجم 10 مل بالعزلات البكتيرية بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة (KS 4 و WR43 و RM30 و RW47 و U70) وحضنت بدرجة حرارة 28 مْ وخلال 24 ساعة ثم قيست الشدة اللونية للوسط وقدرت اليوريا المتبقية في الوسط بالطرح (17).

تأثير النيكل في نشاط العزلات المحللة لليوريا المنتجة لإنزيم اليوريز

لغرض اختبار تاثير النيكل في نشاط العزلات المحللة لليوريا تم اضافة كلوريد النيكل بنسب (0.01 % و0.02 % و0.03 % و0.04 %) مع اضافة مكونات وسط urea broth الحاوي على اليوريا بتركيز 200 ملغم .لتر$^{-1}$ وضبط pH الوسط الى 6.8 بعدها لقح الوسط بحجم 10 مل بالعزلات البكتيرية بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة *KS* 4 و WR43 و*RM30* و RW47 و HW55 و U63 و U65 و U67 و U70 و U 59, وحضنت بدرجة حرارة 28 مْ وخلال 24 ساعة ثم قيست الشدة اللونية للوسط وقدرت اليوريا المتبقية في الوسط بالطرح (17).

النتائج والمناقشة

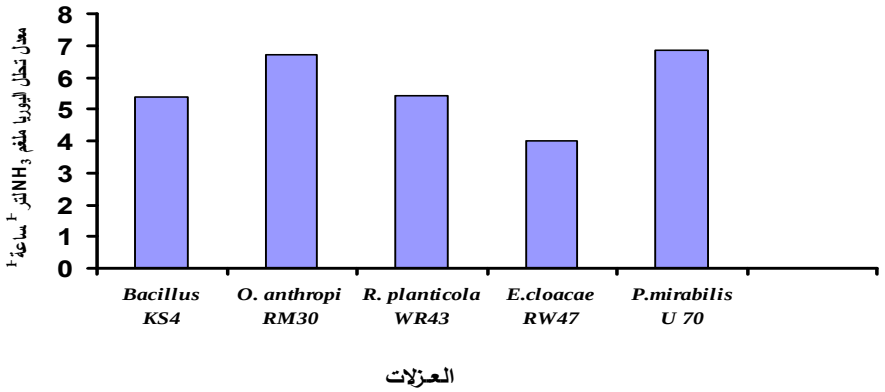
تواجد وانتشار العزلات المحللة لليوريا

تم الحصول على 70 عزلة منتجة لإنزيم اليوريز ومحللة لليوريا من مجموع 120 عينة شملت 20 عينة ترب الزراعية و20 عينة ترب حظائر حيوانات و 20 عينة مياه نهر و20 عينة مياه صرف صحي ، وأنتخبت خمس عزلات أعتماداً على خصائصها في تحليل اليوريا وبينت نتائج التشخيص أنها تعود إلى

Bacillus KS 4 و *Ochrobacter anthropi* RM30 و *Raoultella planticola* WR43 و *Enterobacter cloacae* RW47 و *Proteus mirabilis* U 70 .

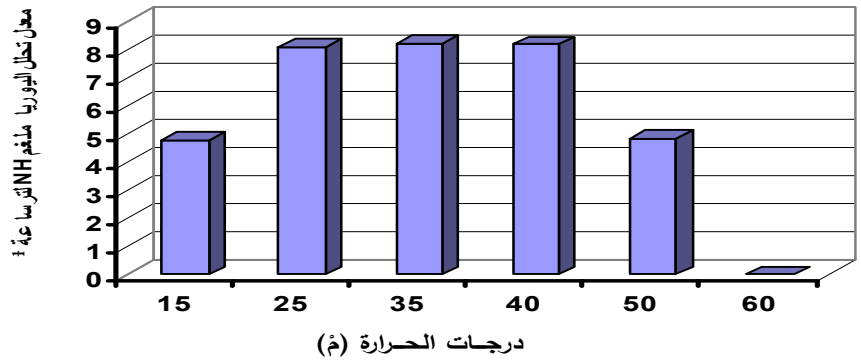
تاثير درجات الحرارة على نشاط العزلات المستعملة لتحلل اليوريا

يبين الشكل (1) تباين نشاط العزلات المستعملة لتحلل مركب اليوريا تحت أختلاف درجات الحرارة أذ حققت العزلات *O. anthropi* RM30 و *P.mirabilis* U70 أفضل فعالية معنوية (p=0.05) تراوحت بين 6.87 و 6.73 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ بينما أنخفض نشاط العزلات معنويا(p=0.05) *E.cloacae* RW47 و *Bacillus* KS4 و *R. planticola* WR43 ليتراوح بين 3.99 الى 5.44 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ وهذا يعود إلى أختلاف اجناس العزلات المستعملة وقدرتها على تحليل مركب اليوريا.



شكل1. معدل تباين تشاط العزلات المستعملة في تحلل مركب اليوريا بدرجات حرارة مختلفة

يلاحظ من الشكل (2) أن أفضل معدل (P=0.05) لنشاط معنوي للعزلات البكتيرية تحقق عند حضنهما في درجة حرارة حضن (35 و40) مْ أذ بلغ 8.21 و8.18 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$على التتابع ، تلاهما معدل النشاط عند درجة حرارة 25 مْ أذ بلغ 8.08 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ ، بينما أنخفض معدل النشاط عند أستعمال درجة حرارة 15 مْ ليصل 4.79 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ ثم أنخفض ليصل 4.85 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ عند درجة حرارة 50 مْ وتوقف نشاط العزلات عن تحليل مركب اليوريا مع استعمال درجة الحرارة 60 مْ.



شكل2. تأثير درجات الحرارة المختلفة على نشاط العزلات البكتيرية المستعملة في تحلل اليوريا.

أظهر التحليل الاحصائي للبيانات في جدول (1) التداخل بين أنواع العزلات المستعملة ودرجات الحرارة ان جميع العزلات حققت أفضل نشاط لتحلل اليوريا عند حضنها في درجات الحرارة(35) مْ بينما لم تبدي العزلتين*E.cloacae* RW47 و *Bacillus* KS4 اي نشاط في تحلل اليوريا عند درجة حرارة (15) مْ وانخفاض فعالية بقية العزلات عند هذه الدرجة ، ويعود السبب في انخفاض انتاجية البكتريا من الأنزيم عند درجات الحرارة المنخفظة الى بطيء نموها وتأخر تخليق الانزيم (7) ، وتميزت العزلات *E.cloacae* RW47 و*R. planticola* WR43 بفقدان نشاطها عند درجة حرارة 50 مْ ويعلل ذلك أن درجة الحرارة العالية تؤثر في سرعة التفاعلات الانزيمية داخل الخلية ، فضلا عن تأثيرها في بعض العوامل المساعدة لنمو العزلات البكتيرية كانخفاض نسبة الأوكسجين الذائب وتثبيط البروتين (7). بينما توقف نشاط جميع العزلات عن تحلل مركب اليوريا مع استعمال درجة حرارة 60 مْ .

جدول 1. تأثير درجات الحرارة على نشاط العزلات المستعملة في تحلل اليوريا خلال 24 ساعة

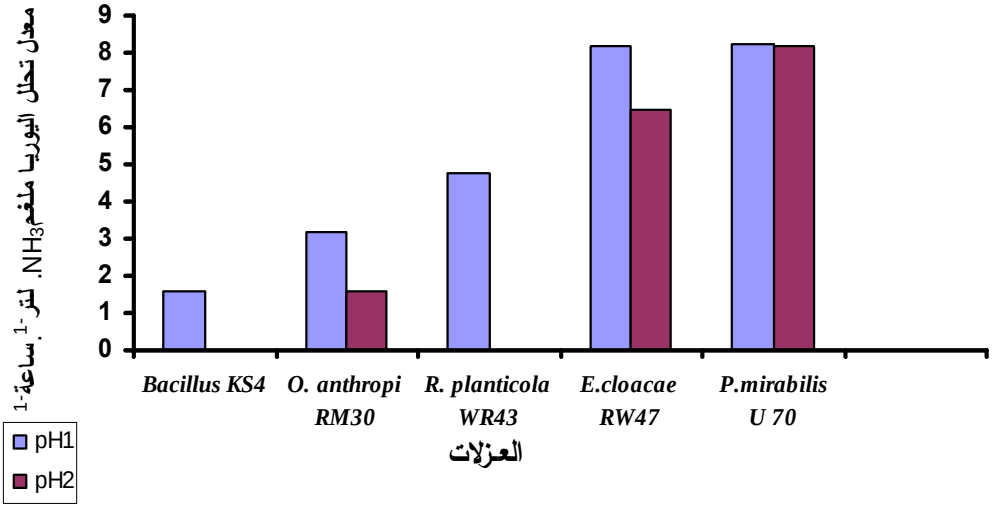
أرقام العزلات	معدل تحلل اليوريا ملغم NH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$						
	درجات الحرارة(مْ)						
	15	25	35	40	50	60	المعدل
Bacillus KS4	0.00	7.85	8.26	8.25	8.08	0.00	5.40
O. anthropi RM30	7.88	8.05	8.25	8.24	7.96	0.00	6.73
R. planticola WR43	7.87	8.25	8.26	8.27	0.00	0.00	5.44
E.cloacae RW47	0.00	8.05	8.06	7.88	0.00	0.00	3.99
P.mirabilis U 70	8.22	8.24	8.26	8.27	8.25	0.00	6.87
المعدل	4.79	8.08	8.21	8.18	4.85	0	
L.S.D P =0.05; Iso=0.178,Tem =0.138 ,Iso .Tem=0.138							

تتفق النتائج مع ما توصل إلية (13) أذ وجدو زيادة بعلاقة خطية في فعالية انزيم اليوريز في التربة مع ازدياد درجة الحرارة بين 15-45 مْ ، كما تتفق مع (9) الذي ذكر بان فعالية انزيم اليوريز تستمر بالزيادة فوق درجة 37 مْ. وأن فعالية انزيم اليوريز تكون على أقصاها بمدى من 35- 40 درجة سيليزية [15]، وهذا يشير الى أن زيادة درجة الحرارة ادت الى زيادة في الطاقة الحركية للانزيم والمادة الأساس و تزيد من تكوين معقد ارتباط الانزيم بالمادة الأساس وبذلك يزيد من تحفيز التفاعل وسرعته [23]. كما أن زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية المرافقة لارتفاع درجات الحرارة يعود لكثرة التصادمات بين جزيئات الانزيم والمادة الأساس الناجمة عن زيادة الطاقة الحركية للجزيئات المتفاعلة ، بعدها تبدأ الفعالية الانزيمية بالهبوط بسبب مايحدث للانزيم من مسخ (denaturation) نتيجة لتأثير الحرارة في تركيب الانزيم مما يؤدي الى فقدان فعاليته.يتوافق هذا مع ما وجد عند درجة حرارة 60 مْ توقف نشاط جميع العزلات عن تحلل مركب اليوريا وإنتاجها لأنزيم اليوريز [22] و[21]، بينما يعود سبب الانخفاض الى حصول مسخ للبروتين نتيجة تأثير الحرارة في التركيب الثلاثي للبروتين، وتغير تركيب الموقع الفعال للانزيم مما يؤدي الى عدم ملائمته للارتباط والتفاعل مع المادة الأساس (21).

تاثير الجبس و الرقم الهيدروجيني للوسط على نشاط العزلات المستعملة في تحلل اليوريا

يوضح شكل (3) تباين قدرة العزلات المستعملة في تحلل اليوريا بدون تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط أو بعد تعديل الرقم الهيدروجيني تحت نسب مختلفة من الجبس في الوسط وأظهرت العزلة *P.mirabilis* U 70, اعلى معدل تحلل بلغ 8.21 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ على التتابع، تلتهما عزلة رقم *E.cloacae* RW47 بمعدل تحلل بلغ7.31 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$.

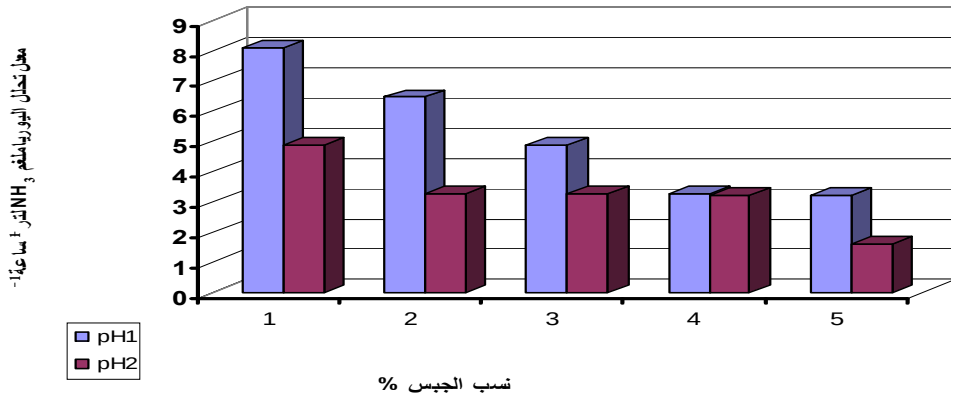
بينما أنخفض معدل التحلل للعزلتان *O. anthropi* RM30 و *R. planticola* WR43 لحد 2.37 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ ، كذلك كان لعملية تعديل الرقم الهيدروجيني (الذي تغير بفعل أضافة مركب الجبس للوسط) تأثير معنوي (p=0.05) في نشاط العزلات بتحلل مركب اليوريا أذ بلغ اعلى معدل للتحلل 5.18 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ عند تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط الى 6.8 بينما بلغ 3.24 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ ، وعند بقاء الرقم الهيدروجيني بدون تعديل (4.3) ، حققت العزلتين *P.mirabilis* U70 و *E.cloacae* RW47 معدل تحلل بلغ 8.25 و 8.16 ملغم NH_3.لتر$^{-1}$. ساعة$^{-1}$ عند تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط على التتابع كما حققت العزلة *P.mirabilis* U70 معدل تحلل بلغ 8.18 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$عند عم تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط وانخفض معد التحلل للعزلة *E.cloacae* RW47 ليصل 6.47 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$.



شكل3. معدل نشاط العزلات في تحلل اليوريا تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط

أدى استعمال نسب متزايدة من الجبس كما يتضح من الشكل(4) الى خفض فعالية ونشاط العزلات في تحلل مركب اليوريا أذ بلغ معدل التحلل 8.09 ملغم NH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ عند نسبة (1 %) وانخفض تدريجيا مع زيادة نسبة الجبس في الوسط ليصل 3.24 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ عند استعمال نسبة الجبس 5% وذلك مع تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط ، أما مع عدم تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط فقد أدى استعمال نسب متزايدة من الجبس الى خفض فعالية ونشاط العزلات في تحلل مركب اليوريا و بلغ معدل التحلل 4.87 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ عند نسبة جبس(1%) وانخفض تدريجيا مع زيادة نسبة الجبس إلى5 % في الوسط ليصل 1.61 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$. وان تفاعل الجبس مع الماء ممتص للحرارة الأمر الذي يؤثر على تحلل

اليوريا ونشاط أنزيم اليوريز بالتنافس على الحرارة حيث المركب الأكثر سرعة وأكثر تركيز وحاصل الأذابة وهذا ما يتميز بة مركب الجبس مما ينعكس على أذابة مركب اليوريا.



شكل 4. تأثير نسب الجبس وتعديل الرقم الهيدروجيني على تحلل اليوريا.

أظهر الجدول (2) التداخل الثنائي لتأثير نسب الجبس وتعديل الرقم الهيدروجيني على نشاط العزلات المختلفة في تحلل اليوريا وتبين أن أفضل معدل تحلل معنوي (p=0.05) تحقق عند استعمال العزلة *P.mirabilis*, U70 عند جميع نسب الجبس المستعملة ، ومع تعديل الرقم الهيدروجيني أو بدون تعديل وتراوح بين 8.18 الى8.25 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ ،أما بقية العزلات فقد شهدت انخفاض حاد في قابليتها على تحلل اليوريا مع استمرار تزايد نسب الجبس المستعملة ، ومع تعديل الرقم الهيدروجيني أو بدون تعديل بينما لم تستطيع العزلتي *Bacillus* KS4 و *R. planticola* WR43 من تحقيق أي زيادة معنوية لمعدل التحلل وكان لتعديل الرقم الهيدروجيني للوسط (الذي تغير عند اضافة مركب الجبس للوسط)تاثير في نشاط العزلات أذ تميزت العزلات *E.cloacae* RW47 و *P.mirabilis*, U70 ، بأفضل معدل تحلل معنوي (p=0.05) في جميع نسب الجبس المستعملة، بينما تميزت جميع العزلات بالقدرة على تحلل اليوريا مع تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط عند نسبة جبس (1%) ،أما بقية العزلات فقدت قابليتها على تحلل اليوريا تدريجيا مع زيادة نسب الجبس لحد نسبة 5 %.

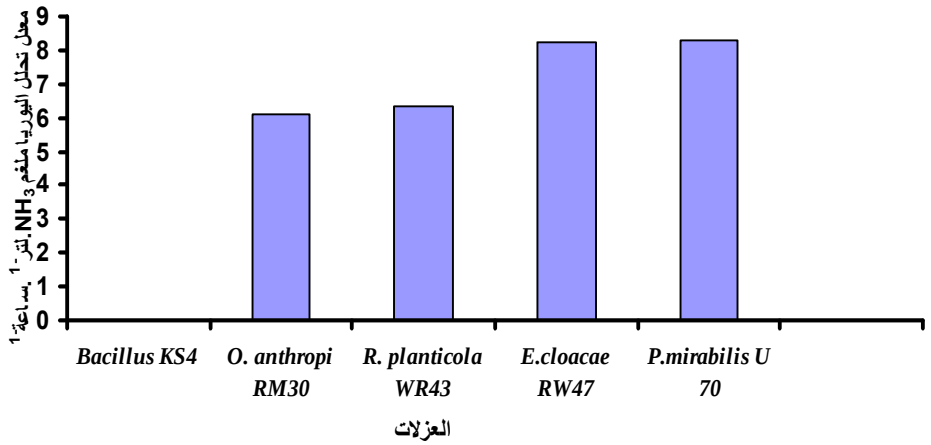
جدول 2. تاثير الجبس وتعديل الرقم الهيدروجيني على نشاط العزلات في تحليل اليوريا

ارقام العزلات	معدل تحلل اليوريا ملغم NH_3.لتر$^{-1}$. ساعة$^{-1}$									المعدل العام
	الجبس عند pH 6.8 (%)					الجبس عند pH 4.3 (%)				
	% 1	% 2	% 3	% 4	% 5	% 1	% 2	% 3	% 4	% 5
***Bacillus*KS4**	7.87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.78
***O. anthropi* RM30**	8.05	7.87	0.00	0.00	0.00	7.88	0.00	0.00	0.00	0.00	2.37
***R. planticola*WR43**	8.05	7.89	7.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.37
***E.cloacae* RW47**	8.24	8.26	8.25	8.05	8.01	8.24	8.22	8.05	7.87	0.00	7.31
***P.mirabilis* U70**	8.28	8.28	8.26	8.24	8.19	8.25	8.22	8.20	8.17	8.08	8.21
معدل عام Ph	5.18					3.24					
L.S.DP=0.05 Is =0.20, $CaSO_4$ =0.14, pH= 0.19 , pH. Is = 0.02 $CaSO_4$ .Is =0.45, pH , $CaSO_4$=0.28 , pH. Is $CaSO_4$=0.64											

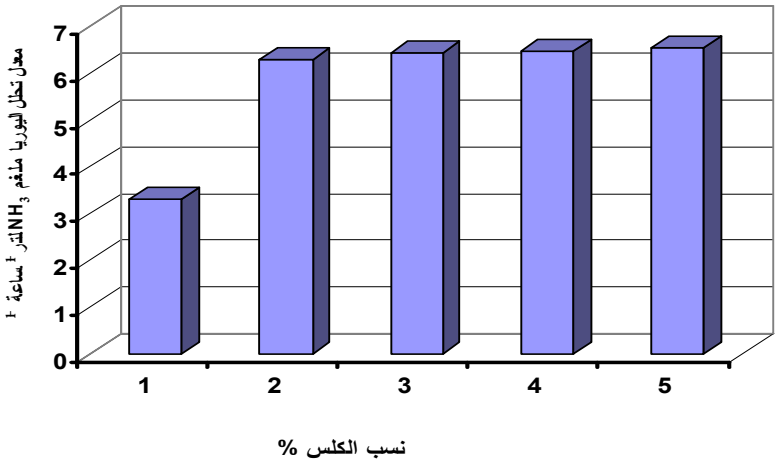
فسر(5) هذا الانخفاض في فعالية إنزيم اليوريز الى تأثير الايونات في تركيب الانزيم او في الموقع الفعال، اذ يمكنها أن تنافس ايونات النيكل في هذا الموقع وتكوين معقدات تؤدي الى إعاقة ارتباط الانزيم بالمادة الأساس .كما أشار (19) الى ان أي معدن يحل محل ايون النيكل سيؤدي ال خفض او تثبيط نشاط الانزيم، وان تثبيط عمل انزيم اليوريز بالمثبطات الفعالة مثل المركبات الكيميائية التي تتداخل اما مع المادة الأساس (اليوريا) وتعمل على غلق ايوني النيكل في الموقع الفعال للانزيم، وان فعالية إنزيم اليوريز المنخفضة تقلل من قدرة النباتات في استخدام النتروجين عند استخدام اليوريا كسماد.

تأثير الكلس على نشاط العزلات المستعملة في تحلل مركب اليوريا

يبين الشكل (5) تباين قدرة العزلات المستعملة لتحليل مركب اليوريا وقد اختلف معدل الفعالية في تحلل اليوريا بغض النظر عن نسب الكلس المستعملة اذ تميزت قدرت العزلات *P.mirabilis*U70 و *E.cloacae* RW47 بأفضل معدل تراوح بين 8.28 و8.26 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ ، بينما سجلت العزلتان *O. anthropi* RM30 و *R. planticola* WR43 معدل نشاط منخفض بلغ 6.12 و6.35 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ وتوقف نشاط العزلة *Bacillus* KS4 تماما. يبين الشكل(6) زيادة معدل نشاط العزلات بزيادة نسبة الكلس من 1 % الى 5 % في الوسط وبلغ اعلى معدل 6.45 و6.53 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ مع استعمال نسب الكلس 5 % و4 % وانخفض معدل نشاط العزلات مع أستعمال نسب الكلس 1 % و2 % و3% ليتراوح بين 3.29 و6.43ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$.



شكل 5. تباين نشاط العزلات البكتيرية في تحلل اليوريا بنسب كلس مختلفة



شكل 6. تاثير نسب كلس على معدل نشاط العزلات البكتيرية في تحلل اليوريا

أظهر الجدول (3) تأثير التداخل الثنائي لنسب الكلس والعزلات المستعملة على معدل نشاط العزلات في تحلل اليوريا وأن أفضل معدل للتحلل تحقق من استعمال العزلات*E.cloacae* RW47 ,*P.mirabilis* U70 , أذ ازدادت فعاليتها مع ازدياد نسبة الكلس في الوسط وبلغت أقصى فعالية لها مع استعمال نسبة كلس 5 % أذ تراوحت فعاليتها بين8.26 و8.28 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$، بينما انخفضت الفعالية باستعمال العزلتين *O. anthropi* RM30 و *R. planticola* WR43 عند نسب الكلس 1 % و2 %و3 % وزادت فعاليتها قليلا مع زيادة نسب الكلس.توقف نشاط العزلة *Bacillus* KS4 تماما في جميع نسب الكلس المستعملة. نتيجة حصول تأثير عكسي أي تثبيط نمو لخلايا البكتريا وبالتالي انخفاض إنتاجية الانزيم .

جدول 3. تاثير نسب الكلس المختلفة على نشاط العزلات في تحلل اليوريا لمدة 24 ساعة.

ارقام العزلات	معدل تحلل اليوريا ملغم NH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$					
	نسب الكلس % $caco_3$					
	%1	%2	%3	%4	%5	المعدل
Bacillus KS4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
O. anthropi RM30	0.00	7.07	7.80	7.87	7.89	6.12
R. planticola WR43	0.00	7.80	7.85	7.87	8.25	6.35
E.cloacae RW47	8.20	8.24	8.25	8.25	8.26	8.24
P.mirabilis U 70	8.23	8.26	8.27	8.27	8.28	8.26
المعدل	3.29	6.27	6.43	6.45	6.55	
L.S.D ISOLATE 0.05= 0.38 ,L.S.D $CaCO_3$ 0.05=0.27 ,L.S.D ISOLATE.$CaCO_3$ 0.05= 0.86						

وجد ان اضافة كاربونات الكالسيوم الى التربة المسمدة ادى الى زيادة معدل تحلل اليورياو علل ذلك (2) إلى ارتفاع pH التربة مع زيادة نسب الكلس في التربة والذي زاد من سرعة تحلل كاربونات الامونيوم مؤديا إلى زيادة كمية NH_3 المتكونة . يتفق ذلك مع النتائج التي حصلنا عليها اذ زادت قابلية العزلات البكترية المستعملة على تحلل اليوريا وانتاج انزيم اليوريز مع الاضافات المتزايدة للكلس. أن اضافة كاربونات الكالسيوم الى التربة بنسب

تزيد عن8 % يقلل من فعالية انزيم اليوريز الى حد كبير، وبين (8) ان زيادة نسبة كاربونات الكالسيوم في التربة من 2.9 إلى 4.1 % أدت إلى زيادة النسبة المئوية لتحرر الأمونيا من 1.6 % إلى 23.3%.

تأثير النيكل على نشاط العزلات المحللة لليوريا والمنتجة لإنزيم اليوريز

أظهر الجدول (4) تأثير التداخل الثنائي لنسب النيكل والعزلات المستعملة على معدل نشاط العزلات في تحلل اليوريا أذ تميزت العزلة U 70 *P.mirabilis* بمعدل نشاط 9.93 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$بينما شهدت العزلات البقية زيادة طفيفة مع أستعمال نسبة 0.01 % من النيكل بينما أنخفضت الفعالية قليلاً لنفس العزلة مع أستعمال النسبة 0.02 % ثم أستمرت الفعالية بالأنخفاض مع زيادة نسب النيكل لجميع العزلات وتوقف نشاط العزلات RM30 *O. anthropi* و KS4 *Bacillus* و RW47 *E.cloacae* مع استعمال نسبة 0.04 %.

جدول 4. تأثير النيكل على نشاط العزلات في تحلل اليوريا مركب اليوريا لمدة

أرقام العزلات	معدل تحلل اليوريا ملغم . لتر$^{-1}$. ساعة$^{-1}$					
	النيكل Ni					
	Control	%0.01	% 0.02	% 0.03	% 0.04	المعدل
Bacillus KS4	8.10	8.54	7.23	5.12	0	5.79
O. anthropi RM30	8.06	8.11	7.87	0	0	4.80
E.cloacae RW47	7.75	7.97	7.87	0	0	4.71
R. planticola WR43	8.05	8.23	6.23	5.23	0	5.54
P.mirabilis U70	8.26	9.93	8.22	8.12	5.66	8.03
المعدل	8.04	8.55	7.48	3.69	1.13	
L.S.D (P= 0.05) =Iso =0.089, Iso.Ni = 0.089 , Iso. Cons .Ni 0.20						

أشار عدد من الباحثين الى أهمية النيكل في بناء اليورييز وإظهار نشاطه في معظم انواع البكتريا اذ وجد ان النيكل يرتبط بالموقع الفعال اثناء مرحلة بناء الانزيم (Apoenzyme) ليشكل بذلك انزيماً كاملاً وفعالاً (Holoenzyme) (18) وأن هناك ضرورة إضافة ايونات النيكل الى الوسط الزرعي الخاص لإنتاج اليورييز، وقد اختلفت تراكيز النيكل المضافة الى الأوساط الزرعية الخاصة بإنتاج اليورييز لإظهار نشاطه في أنواع البكتريا المختلفة فمثلاً ، استعاد الانزيم نشاطه بعد اضافة 0.011% من النيكل الى وسط زرع بكتريا *P.mirabilis* ، في حين بلغ تركيز النيكل المضاف الى وسط زرع بكتريا *K.aerogenes* 0.023% وقد بلغ تركيزه 0.01% لتنشيط اليورييز في بكتريا *Staphylococcus saprophyticus* (14).

المصادر

1- جاد الله ، نزار فؤاد . الغرام ، عقاب . شاعر ، عبد المجيد . المنسي ، عوسان .(1994).الأحياء الدقيقة العملية سلسلة الطرائق العملية ،المستقبل للنشر والتوزيع عمان.

2 - عواد، كاظم مشحوت (1987).التسميد وخصوبة التربة.مديرية دار الكتب للطباعة والنشر.جامعة الموصل.51-121.

3--Askin, T and Kizilkaya, R. (2005). The spatial variability of urease activity of surface agricultural soil within an urban area. Journal Central European Agriculture, 6 (2): 161-166.

4- Baron ,E.J. and Finedgold , S.M. (1990). Diagnostic microbiology . 8th ed . Mosby –Year – Book . Inc. Missouri . USA.

5- Brayman, T.G. and Hausinger, R.P. (1996). Purification, Characterization, and functional analysis of atruncated *Kelbsiella aerogenes* UreE urease accessory protein lacking the histidin- rich carboxyl terminus. J. Bacteriol. 178 (18) : 5410-5416.

6- Bremner,J.M. and R.L.Mulvaney .(1978) . Urease activity in soils In : soil Enzymes (Ed ,Burns ,R .G.) Academic press, London, 149-196.

7-Davies,R.(1963).Microbial extracellular enzyme their uses and some factors affected their formation In :biochemistry of industrial microorganism ,(eds Rainbow ,and Rose,A.H.,) Academic press , New York.

8- Fleisher, Z., A.Kericy,I. Ravina and J.Haging .(1987).Model of ammonia volatilization from calcaeous soils.Plant and Soil . 142: 205-212.

9- Gould, W.D.; Cook ,F.D. and Webster, G.R.. (1973) .Facters affecting urea hydrolysis in several Albert soils .plant soil .38:393- 401.

10- Holt , J.G. ; Krieg , N.R. ; Sneath ,P.H.; Staley , J.T.and Williams , S.T. (1994) .Bergy's manual of determinative Bacteriology .9th ed William and Wikins co. Baltimore. London.

11- Suchada ,C. and Neelawan, P.(2011)Environmental parameters affecting urease production and amonification in Phaseolus Valgolis-Nodulating Rhizobia and Vigna rodiata- nodulating Rhizobia.International J. of Microbiological Res.,2(3):222-232.

12-Killham,K.(1994).Soil ecology, . 1ST ed Cambridge university press.

13- Kumar,D.,V. Kumar and A. Swarup,(2000). Effect of temperature on kinetics of urea hydrolysis and ammonia volatilization losses in submerged alkali soil .Fert.News.45:57-60

14- Lee, S.G. and Calhoun, D.H. (1997). Urease from apotentially pathogenic coccoid isolate: Purification, characterization, and comparison to other microbial urease. Inf. Immun. 65 (10): 3991-3996.

15Maia,D.M.;Vasconcelos,E.A.D.;Maia,P.F.;Maciel,J..;Cajueiro,K.R.;Silva,M.D..;Jr, E.F..;Dutra,R.A..;Freire,V.N.andFilho,J.L.(2007).Immobilization of urease on vapour phase stain etched porous silicon.Process Biochemistry. 42:429-433.

16- Mobley, H. L. T.; Cortesia, M. J.; Rosenthal, L. E. and Jones, B. D. (1988). Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 26 (5): 831-836.

17-Mobley, H. L. T.; Jones B. D. and Jerse, A. E. (1986). Cloning of urease gene sequences from *Providencia stiurtiti*. Infect.Immun. 54:161-169.

18- Moncrief, M.B.C. and Hausinger, R.P. (1996). Purification and activation properties of UreD-Ure-F urease apoprotein complexes. J. Bacteriol. 178 (18): 5417-5421.
19- Park, L.S. and Hausinger, R.P. (1995). Evidence for the presence urease a poprotein complexes containing UreD, UreF UreG in the cell that are competent for in vivo enzyme activation. J. Bacteriol., 177: 1947-1951.
20- Peters ,E.; Rafi ,M.; Bakall, M.; Shamas,A.; Baroudi ,M. and Dawood, M..(1997).Urease enzyme activity in some Saudi soils .Abstracts of the first Saudi symposium on Agricultural scince . 29.
21- Segal, I.H. (1976). Biochemical calculation. (2nd ed.) John Wiley and Sons, Inc. New York.
22- Whitaker, J.R. (1972). Principles of enzymology for the food sciences. Marcel dekker, Inc. New York.
23- Whitaker, J. R. and Bernard, R. A. (1972). Experimental for An introduction to enzymology. Department of Food Science and Technology University of California. The Whiber Press. Davis. California. p. 11.