إنتاج منظم النمو اندول حامض الخليك (IAA) البكتيري باستعمال أوساط محلية واختبار قدرة العزلات باذلبة مركبات الفوسفات وتثبيت النتروجين

ادهام علي عبد العسافي ، عبود محمد هزيم الجميلي ،
جمال صالح حمود الكبيسي و مصطفى صبحي عبد الجبار
كلية الزراعة/ جامعة الأنبار

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص عزلات بكتيرية لانتاج منظم النمو Indole acetic acid (IAA) باستعمال اوساط محلية وتقييم كفاءته ، وتحقيقاً لهذا الهدف عزلت اعداداً من العزلات البكتيرية (عقدية وغير عقدية) واختبرت قدرتها على انتاج الاندول باستعمال اوساط حضرت محلياً من المسحوق الجاف لبذور الباقلاء واللوبيا وفول الصويا والحليب المجفف اختبر ايضاً قدرة العزلات المنتخبة على انتاج المركبات الخالبة للحديد واذابة الفوسفات وتثبيت النتروجين حيوياً في الوسط ، كما تضمنت الدراسة اجراء تجربة بايلوجية لتقييم كفاءة الاندول المنتج مقارنة بالاندول الصناعي واثر ذلك على انبات بعض البذور .

أظهرت النتائج الحصول على 18 عزلة قادرة على انتاج الاندول (من مجموع العزلات البالغة 30 عزلة) كانت 14 عزلة منها بكتيرية عقدية .اختبرت 8 عزلات ذات كفاءة عالية في انتاج الاندول كان منها 6 عزلات تعود لجنس *Rhizobium* وعزلتين لجنس *Pseudomonas* ، وفي عملية غربلة لاحقة باستعمال اوساط زرعية تحت ظروف بيئية مختلفة انتخبت العزلتين $Pssp_2S$ و Rsp_8RA وهي الاكفأ في انتاج الاندول اذ بلغ انتاجهما النهائي 42.8 و 41.9 ملغم IAA / لتر على التوالي .

اثبتت الدراسة قدرة العزلات المنتخبة على انتاج المركبات الخالبة للحديد بدليل قدرة رواشحها من تغيير لون الدليل (CAS) الازرق الى اللون الوردي خلال مدة لم تتجاوز 4.5 و 5.8 دقيقة للعزلتين $Pssp_2S$ و Rsp_8RA على التوالي ، كما تبين ان لهذه العزلات القدرة على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط وبمعدل قطر اذابة 11.73 و 6.25 ملم على التوالي وتمكنت العزلة Rsp_8RA من تثبيت النتروجين في الوسط بمعدل 3.65 غم N / لتر في حين لم تتمكن العزلة $Pssp_2S$ من ذلك .

اوضح اختبار تاثير درجة حرارة ومدة خزن راشح العزلات في نسبة وسرعة الانبات لبذورالقطن والباذنجان تفوق فعالية رواشح العزلات المحفوظة بدرجتي حرارة 4 ، 25ْ م لمدة يوم واحد والمحفوظة بدرجة حرارة 4ْ م لمدة 45 يوم على معاملة خزن الراشح بدرجة حرارة 25ْ م لمدة 45 يوم ومعاملة الاندول الصناعي ، وحققت رواشح العزلات عموماً زيادة في نسبة وسرعة الانبات بلغت 10 – 20 % وبفارق زمني قدره 3 – 5 أيام على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة.

Bacterial Indole acetic acid (IAA) production by using local media and test isolates ability to solibal P and Nfixation

M. S. Abed-Al-Gapar[*] , I. A. A. Assaffii[**] and J. S. H. Al-Kubaisy[*]
College of Agriculture/ University of Al-Anbar
College of Science/ University of Al-Anbar

Abstract

This study was included isolation and identification of bacterial isolates for growth promoter production by application of local culture and evaluate its efficiency .According to this perpoute bacterial isolates were collected and examined for their ability to indol production, by used local culture included dry powder of legume, bean, soyabean, seed and milk powder, periods of storge to increase production efficincy. The ability of selection isolate for iron chelating natural, phosphate disolveing , Nitrogen fexation were tested.

Applied biological expermints has been done in order to evalution the efficincy of indol production in compantion with industrial indol and this study have the following results:

18 isolates were obtain cupable for them indol production (30 from total isolates) 14 isolats were nodulan bacteria .8 isolates which have high efficancy in indol production were tested six isolates tended to *Rhizopium* and two isolate to *Pseudomonus* in next screening used culture with special condation, two isolates $Pssp_2S$, Rsp_8RA were selected to be used in the following epperinets. When we used 10% of local culture prepared from dry powder of legumes, bean, soyabean seed, milk powder led to increased of indol production significantly ranged from (30-50%).

This study improved the ability of selection isolates to alchelating compouned CAS from blue to pink colum with 4.5–5.8 min. of $Ps.sp_2S$ and Rsp_8RA respictivly, their isolates have ability to phosphate dissolved in the medium with diametr range dissolving 6.25–11.75 mm respectively, and the, Rsp_8RA isolate has ability to nitrogen fixation in the medium with avarge of 3.65 N/ L whil the $Ps.sp_2S$ doesn't able to nitrogen fixation.

Effect of temperature and period of filterated isolates storge on speed of seed germination increased efficancy filterated isolates that stored at 4C and 25C for one day and that stored at 4°C for45 days .When it compared with treatment filtrated storge at 25°C for 45 days and treatment of industrial indol .The filterated isolates achived in commonly increase in speed and percentage of germination was reached 10–20% in temporal differences 3–5 day respectively when compare with control treatment.

المقدمة

امتلكت بعض العزلات البكتيرية قدرات متنوعة في انتاج الاندول وتثبيت النتروجين واذابة الفوسفات فقد توصل (1) الى عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لنبات *Mirnosa pudica* وتمكنت من انتاج 24 ملغم / لتر من IAA .و اشار (2) ان لمركب الاندول (IAA) دوراً مهماً في تطور نظام الجذور في النبات، ادى استعماله الى زيادة في طول الجذور بنسبة تراوحت بين 35 –50 % مقارنة بمعاملة السيطرة . كذلك ادى الى زيادة في اعداد العقد الجذرية المتكونة على الجذور. كذلك وجد (3) ان سلالات من بكتريا الرايزوبيا ادى الى انتاج كمية من منظم النمو (IAA) بحدود 45.6 ملغم / لتر ادى استعماله الى زيادة قابلية

النبات في تكوين اكبر عدد من العقد الجذرية ، وذكر (4) ان عزلات من بكتريا *Ps.fluorescens* و *B.megaterium* و *Az.vinelandii* استطاعت انتاج كميات من IAA تراوحت بين 17.7 – 22.7 ملغم / لتر وتبين ان تجهيز الوسط بالتربتوفان والكلوكوز قد ادى الى تحسن انتاج الاندول من قبل بكتريا *Ps.putida* باستعمال معاملات للوسط جهز فيها التربتوفان بمعدل 200 ملغم / لتر والكلوكوز بمعدل 10 ملغم / لتر وقد كان لزيادة معدل التربتوفان والكلوكوز اثرا كبيرا في زيادة انتاج الاندول من قبل البكتريا وبلغ اعلى معدل انتاج 45 ملغم IAA / لتر بعد 48 ساعة من الحضن. وجد (5) ان بكتريا من نوع *Ps.pudia* المنماة على وسط يحتوي 4.54 ملي مول من التربتوفان و 5.56 ملي مول من الكلوكوز و 22.5 ملي مول فركتوز و 8.35 ملي مول بنزوات ، قد اعطت انتاجا من الاندول بلغ 38.4 ملغم IAA / لتر . ولاحظ (6) ان مجموعة عزلات من البكتريا *Azotobacter* و *Pseudomonas* قد انتجت كميات كبيرة من الاندول وصلت الى 32.2 ملغم / لتر عند تنميتها على وسط المرق المغذي (Broth) المدعم 0.2 – 0.5 % من مسحوق بذور نبات فول الصويا مصدراً للتربتوفان . واستطاع (7) من انتخاب ثلاثة عزلات منتجة للاندول من مجموع 106 عزلة حصل عليها من التربة وكانت العزلات المنتجة هي *B.cereus* و *Ps.putido* و *Az. Chrococcum* وكانت انتاجها من الاندول (IAA) 7.41 و 4.5 و 1.38 ملغم / لتر على التوالي وتعد درجة الحرارة من العوامل البيئية المهمة والمحددة لنمو وتكاثر الكائنات المجهرية وقد اجريت بعض الدراسات لمعرفة مدى تأثير تخزين راشح العزلات في درجة حرارية معينة لغرض استعماله في التجارب الزراعية واثر ذلك على انتاج الاندول، بعد تخزينها بدرجتي حرارة 6 و 18 ْم ولمدة 45 يوم واثر ذلك على انبات ونمو بذور نبات *Lactuca Sativa* ووجدوا انه لم يظهر فرق معنوي بين الراشحين المخزنين بدرجة حرارة 6 ْم من حيث نسبة وسرعة الانبات ، اما عند التخزين بدرجة حرارة 18 ْم فقد ادى ذلك الى تميز راشح العزلة *B.cereus* فقد اظهرت نتائج الزرع والعد البكتيري ان راشح هذه العزلة تميز باعلى محتوى ميكروبي ، وعزوا ذلك الى قدرة هذه العزلة على تكوين سبورات في الراشح مما سمح لها عند توفر الظروف باعادة تكوين الخلايا وتجديد نشاطها وانتاج الاندول.

اما (8) فقد درس تأثير تخزين الراشح لمدة 30 يوم في درجة حرارة (5 و 35 ْم) لراشحي عزلتين من البكتريا (*Azospirillum* و *B.cereus*) على انتاج الاندول بوساطة هاتين العزلتين بعد خزن الراشح يلاحظ ان خزن الراشح بدرجة 5 ْم لم يتأثر كثيراً ولكلا العزلتين فقد كانت كمية الاندول في الراشح الاصلي لعزلة *Azospirillum* 15.2 ملغم / لتر ، وقد اشار (9) ان التركيب الكيميائي لهذه المركبات يختلف باختلاف الاحياء المجهرية المنتجة له، وبين (6) ان عزلات من بكتريا *Pseudomonas* قد قامت بانتاج مركبات السايدروفور في الوسط الخالي من الحديد ولكن عند تجهيز الوسط بتركيز (1.36 ملغ / لتر) من كلوريد الحديديك ($FeCl_3$) فان انتاج مركبات السايدروفور قل .

اما (10) فقد لاحظا ان بكتريا *Pseudomonas* المنتجة لمنظمات النمو (IAA) قد عملت على اذابة مركبات الفوسفات 206 و 502 ملغم P / لتر من المصدرين هايدروكسي ابتايت و فوسفات الكالسيوم على التوالي ، مما عمل على زيادة في مساحة الجذور بنسبة (43 – 200 %) لنبات الفلفل الاسود الملقح بها ، وكذلك زيادة الحاصل والفسفور المأخوذ من قبل النبات وفي دراسة (11) حصل على 42 عزلة بكتيرية مذيبة للفوسفات من ترب في مواقع مختلفة لمحافظة الانبار انتخب فيها 4 عزلات بكتيرية تميزت بكفاءة عالية في اذابة الفسفور وذكر ان التباين الواضح بين العزلات في القدرة على اذابة مركبات الفوسفات يعود الى مدى قدرتها على انتاج الاحماض العضوية وطبيعة ونوع الحامض العضوي المنتج اذ تراوحت تراكيز الاحماض العضوية المنتجة للعزلات المنتخبة بين (3.4 – 8.1) غم / لتر لأحماض الستريك والاوكزاليك والسكسنيك .

كما وجد (12) ان تاثير منظمات النمو في نمو النبات يكون متوافق مع عملية تثبيت النتروجين الحيوي ، اذ تزداد عملية التثبيت بزيادة منظمات النمو التي تحسن قابلية النبات على تكوين العقد الجذرية كما ذكروا ان الهرمونات المرتبطة بالشعيرات الجذرية تزيد من قابلية النبات على اخذ المغذيات من محيط التربة ، ولاحظوا ان النباتات الملقحة بعزلات من بكتريا الرايزوبيا قد حسنت نمو نبات الرز اذ زادت كمية الحاصل والوزن الجاف بنسبة (8 – 22 %) و (4 – 19 %) على التوالي. وقد اثبتوا نتيجة استعمال النتروجين المشع N^{15} ان زيادة كمية النتروجين في النبات والتربة قد اتت من تظافر مشترك بين منظمات النمو التي تنتجها البكتريا في بيئة الجذور وكذلك العقد الجذرية التي تقوم بتثبيت النتروجين الجوي.اما (4) فقد حصل على معدل تثبيت للنتروجين تراوح بين (3.2– 16.5) ملغم N / لتر لمجموعة من عزلات من *Azotobacter* التي كانت تنتج الاندول ايضا وبتراكيز تراوحت بين (17.7 – 22.7) ملغم / لتر ، وكان هناك ترابط بين انتاج الاندول وتثبيت النتروجين في الوسط .وعند تلقيح نباتات القمح بهذه العزلات زادت كمية النتروجين في النبات والحاصل مقارنة مع النباتات غير الملقحة .

وقد استطاع (7) من انتخاب ثلاث عزلات منتجة للاندول هي الاكفأ من مجموع 106 عزلة حصلوا عليها من التربة وتتمثل العزلات المنتخبة بـ *Pseudomonas putida* و *Bacillus cereus* و *Azotobacter chroococcum* وقد ادى استخدام خليط العزلات الثلاثة كلقاح حيوي الى حصول زيادة معنوية في المجموع الجذري والمجموع الخضري بنسبة 23 % مما اثر ايجابياً على زيادة انتاج نبات الخس . ، وحين خزنت رواشح هذه العزلات بدرجات حرارة 6 ± 2 و 18 ± 2 ْم فقد تبين ان راشح العزلة *B.cereus* قد تميز باعلى محتوى ميكروبي بعد توفر الظروف الملائمة .لذلك يهدف البحث الحصول على عزلات منتجة للانول باستعمال المواد المحلية وذات قدرات في اذابة مركبات الفوسفات وتثبيت النتروجين للنبات.

المواد وطرائق العمل

جمع نماذج جذور النباتات البقولية لعزل البكتريا العقدية

اختبرت اربعة مناطق تشتهر بزراعة النباتات البقولية تقع ضمن محافظة الانبار وهي مناطق الخالدية (Ka) والصوفية (So) والعامرية (Am) والكرمة (Kr) وذلك للتحري عن تواجد وعزل البكتريا العقدية المنتجة لمركبات الاندول . اذ اختيرت 5 نباتات بقولية من النباتات النامية بشكل جيد. رطبت التربة حول النبات قبل عملية القلع لتقليل التأثيرات الميكانيكية على الجذور بعدها ازيلت التربة المحيطة بالمجموع الجذري بتعريضها لتيار مائي معتدل السرعة لتسهيل عملية الحصول على العقد الجذرية ، ثم قطعت اجزاء الجذور المحتوية على العقد الفعالة ذات اللون الوردي والكبيرة الحجم ثم نقلت الى اكياس معقمة. سجلت عليها المعلومات المطلوبة ووضعت في مكان مبرد بعدها نقلت الى المختبر لإكمال عملية العزل.

عزل بكتريا الرايزوبيا

اتبعت الطريقة المبينة من قبل (13) في عزل البكتريا من العقد الجذرية ، بعدها نقيت على وسط جديد من (Yeast extract manetol agar (YEMA ثم حضرت مزارع مائلة من المستعمرات النقية لاستخدامها في الاختبارات اللاحقة . ولغرض معرفة كفاءة العزلات المنتجة للاندول اتبعت طريقة (14) .

قدرة العزلات المنتخبة على انتاج مركبات الاندول باستعمال اوساط محضرة محلياً

نظراً لكون بعض المواد النباتية او الحيوانية ذات محتوى جيد من الحامض الاميني التربتوفان (Tryptophan) الذي تؤدي عملية ايضه المايكروبي تؤدي الى تكوين حامض الاندول حضر المسحوق الجاف من بذور الباقلاء واللوبيا وفول الصويا والحليب المجفف (نوع بديع) اذ مرر كل مكون من منخل قطر فتحاته 0.2 ملم . وحضر منه مستخلص مائي دافيء (50 م) وبتركيزين 5 و 10 غم / 100 مللتر ماء مقطر ، بعد مدة نقع 24 ساعة رشحت المحاليل بالطرد المركزي (3000 د / د ، ثم عقمت بالترشيح من خلال مرشح قطر فتحاته 0.45 ملي مايكرون. وزعت الاوساط في قناني زجاجية معقمة حجم 250 مل وبمقدار 100 مل / قنينة ، بعدها لقحت من العزلات المنشطة في المرق المغذي بمعدل 2 مل / 100 مل وسط (4.2×10^6 cfu / ml) ، وحضرت المعاملات بثلاثة مكررات حضنت في حاضنة هزاز بسرعة 120 دورة / دقيقة وبدرجة 28 ± 2 م لمدة 48 ساعة . وحسبت كمية الاندول المنتجة .

فحصت قدرة العزلات في انتاج المركبات المرتبطة بالحديد Sidrophores واتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (15) بطريقة Chrome Azurel Sulfonate (CAS) .كما فحصت قدرة العزلات على اذابة مركبات الفوسفات بأستعمال وسط بيكو فسكايا (16). واتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (17) باستعمال الوسط الزرعي (YEM) لمعرفة قدرة العزلات على تثبيت النتروجين في الوسط وقدر النتروجين الكلي (18).

تأثير درجة الحرارة ومدة خزن راشح العزلات في فعالية الاندول :

لغرض تحديد مدة خزن الراشح ودرجة الحرارة المثلى. خزن الراشح المنتج في درجة حرارة 4 و 25 م لحفظ الراشح قبل استعماله ولمدة زمنية 1 و 45 يوم بعد الانتاج واجريت عملية طرد مركزي للمزارع بسرعة 3000 دورة / د دقيقة وحفظ راشح العزلات في قناني محكمة ومعقمة في ثلاجة (4 م) وحاضنة (25 م) وحسب المدد الزمنية المحددة اعلاه ، ثم فحص دور الرواشح في التاثير على نسبة وسرعة الانبات لبذور نباتات كل من الباذنجان والقطن مقارنة باستعمال الاندول الصناعي بتركيز 45 ملغم / لتر وماء الحنفية. اذ تم نقع بذور النباتات المذكورة المتجانسة في الحجم والخالية من الكسور والاصابة في الماء الاعتيادي لمدة 20 دقيقة ثم نقلت الى رواشح العزلات المحضرة ومحلول الاندول (تركيز 45 ملغم / لتر) المحضر في اطباق بتري وتركت لمدة ساعتين ثم نقلت الى اطباق بتري اخرى (كل طبق مجهز بورقة ترشيح مرطبة بالماء المقطر) ، وقد استعملت 10 بذور لكل نبات في الطبق الواحد وسجلت نسبة الانبات خلال عشرة ايام .

النتائج والمناقشة

قدرة العزلات على انتاج الاندول

أظهرت نتائج جمع العزلات البكتيرية العقدية من جذور النباتات البقولية المختلفة النامية في حقول متباينة الموقع في محافظة الانبار وامكن الحصول على 15 عزلة من بكتريا العقد الجذرية *Rhizobioum* تعود 3 عـــزلات *R.trifolii* ، و 4 عـــزلات ء *R.fababean* و 3 عـــزلات *R.leguminosorum* و2 عزلـــة *R.meliloti* وعزلـة واحـدة *R.vignacatiang* وعزلـة واحـدة *R.archishypog* و *R.japonicum* ، وقـد تباين تكوين العقد الجذرية في النباتات البقولية من عائل لاخر ومن موقع لاخر وهذا ما اكدته الدراسات السابقة ، وهذا يؤكد تباين قدرات العزلات المحلية في قابليتها لاحداث الاصابة نظراً لامتلاكها ميكانيكيات مختلفة في مقاومة الظروف المحيطة وقدرتها على المقاومة ولفترات الاصابة (19).

واظهرت نتائج اختبار قدرة العزلات المستعملة في الدراسة على انتاج الاندول في وسط ماء الببتون 1% ان 9 عزلة (بنسبة 60% من مجموع العزلات) قادرة على انتاج الاندول ، في حين لم تتمكن 6عزلة (نسبة 40 %) .

دور الاوساط المحضرة محلياً في تحسين انتاج الاندول للعزلات المنتخبة

اظهر جدول 1 ان الوسط المحضر من بذور فول الصويا اعلى قدرة في انتاج الاندول معنوياً بمعدل بلغ 13.31 ملغم / لتر تلاه الوسطين المحضرين من بذور الباقلاء والحليب بمعدلي انتاج 12.19 و 11.59 ملغم / لتر على التوالي. بينما كان الوسط المحضر من بذور اللوبيا هو الادنى في انتاج الاندول اذ بلغ 8.26 ملغم / لتر. كما وجد ان زيادة تركيز الوسط من المواد المحلية المحضرة من 5 % الى 10 % قد ساهم بزيادة الانتاج ، وظهر ذلك بشكل معنوي مع استعمال الوسطين المحضرين من بذور فول الصويا وبذور الباقلاء. اذ ازداد معدل الانتاج فيهما من 11.36 و 9.68 ملغم / لتر ليصل الى 15.26 و 14.7 ملغم / لتر على التوالي مع زيادة تركيز الوسط من 5 الى 10 % ، أي ان نسبة الزيادة بلغت 34.3 % و 51.8% على التوالي .

من جهة اخرى اظهر استعمال العزلات Rsp_2Kr و Rsp_8RA و $Pssp_2S$ معدلات انتاج تراوحت بين (13.6 – 12.76) ملغم / لتر. في حين وجد ان افضل تداخل للمعاملات ادى الى زيادة الانتاج تحقق مع المعاملات المكونة باستعمال الوسط المحضر من بذور الباقلاء بتركيز 10 % مع العزلة Rsp_2Kr اذ بلغ معدل انتاج الاندول 27.1 ملغم / لتر ، تلتها المعاملة المكونة من استعمال الوسط المحضر من بذور فول الصويا بتركيز 10 % مع العزلة Rsp_8RA بمعدل انتاج قدره 26.1 ملغم / لتر كذلك حققت العزلة $Pssp_2S$ عندما نميت في وسط الحليب تركيز 10 % انتاجاً قدره 23.0 ملغم / لتر من الاندول.

وهذا يؤكد اهمية المواد المرتبطة مع الحامض الاميني التربتوفان في هذه المواد وقابلية البكتريا على استعمالها كمصادر كاربونية تمكن الاحياء المجهرية المستعملة من انتاج الانزيمات الخاصة بايض الحامض الاميني التربتوفان . فقد ذكر (20) ان التربتوفان يعد حامضاً امينياً اساسياً في انتاج IAA ويتواجد هذا الحامض الاميني في كثير من المواد مثل الحليب والموز وبذور النباتات البقولية وان استعمال مثل هذه المواد في الوسط يحسن من انتاج IAA بوساطة البكتريا وهذا ما أكدت عليه (6) الذي وجد ان انتاج بكتريا *Azotobacter* و *Pseudomonas* قد وصل الى 32.2 ملغم / لتر عند استعمال وسط البروث المدعم بمسحوق من بذور نبات فول الوصويا وبنسبة (0.2 – 0.5 %) . كما وجد (21) ان انتاج البكتريا للاندول يختلف باختلاف اجناس البكتريا والأوساط المستعملة في تنميتها.

جدول (1) كمية الاندول(ملغم / لتر) المنتج من العزلات باستعمال اوساط محلية

رمز العزلة	نوع الوسط المستعمل	المعدل

	مسحوق باقلاء		مسحوق لوبيا		مسحوق فول الصويا		حليب جاف		
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
Rsp_2Kr	13.6	27.1	7.8	9.4	13.4	18.5	8.6	10.4	13.60
Rsp_8RA	9.6	16.5	8.4	9.6	16.7	26.1	9.0	10.0	13.23
$Pssp_2S$	9.8	12.6	8.7	9.5	10.1	12.8	16.5	23.0	12.76
$Pssp_1S$	7.6	8.9	5.6	8.4	8.4	10.3	10.8	11.6	8.95
Rsp_4So	7.8	8.4	6.6	8.6	8.2	8.6	7.6	8.4	8.02
معدل التركيز	9.68	14.7	7.42	9.1	11.36	15.26	10.5	12.68	
معدل الوسط	12.19		8.26		13.31		11.59		

LSD P> 0.05 Is .= 2.10, Med. =2.31, Cons.= 1.35 , Is. Cons. Med. = 3.65

قدرة العزلات على انتاج لمركبات الخالبة

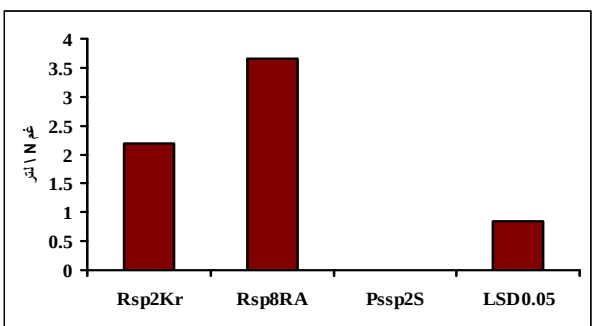
اظهرت نتائج العزلات المنتخبة المستخدمة في انتاج الاندول الموضحة في جدول 2 قدرتها على انتاج المركبات الخالبة للحديد ، فقد غيرت رواشح هذه العزلات لون الدليل CAS الازرق خلال مدة تراوحت بين سرعة عالية في تحويل لون الكاشف بمدة لم تتجاوز 4.5 دقيقة مع عزلة $Pssp_2S$ وتلتها عزلتي البكتريا العقدية Rsp_2Kr و Rsp_8RA بمعدل 5.8 و 6 دقائق على التوالي ، ويعد انتاج هذه المركبات من عزلات الرايزوبيا مهمة لمساعدتها في الحصول على عنصر الحديد الذي يعد ضرورياً فهو احد عناصر انزيم النتروجينيز المسؤول عن التثبيت الحيوي للنتروجين من الهواء الجوي (22) ، والذي يكون ذوبانه ضعيف تحت ظروف الرقم الهيدروجيني المتعادل في التربة المتعادلة والقاعدية.

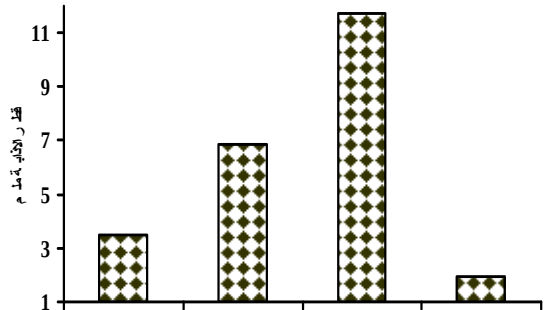
جدول (2) قدرة العزلات على تثبيت النتروجين واذابة الفوسفات وانتاج مركبات السايدروفور

رمز العزلة	كمية N ملغما لتر	قطر منطقة اذابة الفوسفات ملم	انتاج مركبات السايدروفور
Rsp_2Kr	2.20	3.50	++
Rsp_8RA	3.65	6.85	++
$Pssp_2S$	0.00	11.73	+++
LSD P>0.05	0.850	1.95	

قدرة العزلات المنتخبة على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط

تبين النتائج في الجدول (2) والشكل (1) قدرة العزلات المستتخدمة في انتاج الاندول على اذابة مركبات ثلاثي فوسفات الكالسيوم (TCaP) في الوسط وتباينت قدرتها في الاذابة وبمعدل قطر اذابة بلغ 11.73 ملم للعزلة $Pssp_2S$ تلتها العزلة Rsp_8RA بمعدل قطر اذابة 6.85 ملم. ويعود تباين العزلات الواضح في قطر منطقة الاذابة الى قدرتها على انتاج الاحماض العضوية ، وطبيعة ونوع الحامض العضوي المنتج (11) ، ويعد تواجد مثل هذه الاحياء في التربة وزيادة فعاليتها امراً مهما لقابليتها على اذابة مركبات الفوسفات وجعلها جاهزة للنبات ، وقد استطاع (23) من استعمال بعض عزلات من الرايزوبيا والسيدوموناس التي كانت مذيبة لمركبات الفوسفات كلقاحات حيوية بامداد نبات فول الصويا بحاجته من الفسفور الذائب .





شكل (1) أ- تثبيت النتروجين ب- قدرة العزلات على إذابة الفوسفور

قدرة العزلات في تثبيت النيتروجين في الوسط

تبين النتائج الموضحة في الجدول (2) والشكل (1) قدرة عزلتي البكتريا العقدية في تثبيت النتروجين الحيوي في الوسط الخالي من النيتروجين ، وبلغ اعلى معدل تثبيت 3.65 غم N / لتر من قبل العزلة Rsp_8RA تلتها العزلة Rsp_2Kr بمعدل قدره 2.2 غم N / لتر في حين لم تتمكن العزلة $Pssp_2S$ من تثبيت النتروجين في الوسط وذلك لعدم قدرتها على النمو في الوسط وتعود قدرة عزلتي البكتريا العقدية على تثبيت النتروجين الحيوي في الوسط الى امتلاكها لانزيم النيتروجنيز المسؤول عن تثبيت النتروجين ، وان تباين العزلتين في القدرة على تثبيت النتروجين يعود الى كفاءة وفعالية انزيم النتروجنيز المنتج في تثبيت النتروجين ، اما عدم قدرة بكتريا $Pssp_2s$ على تثبيت النتروجين فذلك يعود الى عدم امتلاكها لنظام انزيم النتروجنيز، وجد (4) ان عزلات من بكتريا *Azotobacter* ثبتت النتروجين بمعدل تراوح بين (3.2 – 16.5) ملغم N / لتر وانتجت الاندول بتراكيز بين (17.7 – 22.7) ملغم / لتر واشار ان هناك ترابطاً بين انتاج الاندول وتثبيت النتروجين في الوسط .

تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات في فعاليته

اوضحت نتائج حساب نسب الانبات وسرعته الموضحة في الجدول (3) تفوق فعالية رواشح العزلات المحفوظة بدرجة حرارة 4 و 25 م لمدتين مختلفتين (1 و 45) يوم مقارنة باستعمال الاندول الصناعي ومعاملة السيطرة وتباينت الفروقات في التاثير للمعاملات حسب نوع النبات وكالاتي :

1- بذور القطن (*Gossypium hirsutum*) : اظهر استعمال راشح العزلة $Pssp_2S$ المخزون ليوم واحد في درجة حرارة 4 و 25 م اعلى معدل في نسبة الانبات بلغت 100% في اليوم الخامس للزراعة ، بينما ادى استعمال راشح العزلة Rsp_8RA المخزون في درجة حرارة 4 م لمدة يوم واحد و 45 يوم وكذلك الراشح المخزون في 25°م لمدة يوم واحد الى تحقيق معدل في نسبة الانبات 100 % بلغت في اليوم السادس . في حين اعطى راشح العزلة Rsp_2Kr المخزون ليوم واحد بدرجة حرارة 4 م او 25 م نسبة انبات 100 % في اليوم السادس ، من جهة اخرى حقق استعمال الاندول الصناعي نسبة انبات 100 % في اليوم الثامن للزراعة جدول (12) وبذلك حقق استعمال رواشح العزلات زيادة في نسبة الانبات بلغت 10 % مقارنة بمعاملة السيطرة وبفارق زمني تراوح معدله من 4 الى 5 ايام .

2- بذور الباذنجان (*Solanum melongena*) : ادى استعمال راشح العزلة $Pssp_2S$ المخزون ليوم واحد في درجة حرارة 4 م و 25 م الى تحقيق معدل نسبة انبات قدرها 100 % في اليوم السادس ، كما ادى استعمال راشح العزلة Rsp_2Kr المخزون في 4 م لمدة يوم واحد من تسجيل نسبة انبات قدرها 100 % في اليوم السابع مماثلاً لما حصل عليه من استعمال الاندول الصناعي. من جهة اخرى اظهر استعمال الرواشح الاخرى الى حصول نسبة انبات تراوحت بين (80 و 90 %) خلال اليوم السابع للزراعة ،

وبذلك حقق استعمال رواشح العزلات المستعملة الى زيادة في معدل نسبة الانبات بلغت 20 % مقارنة بمعاملة السيطرة وبفارق زمني قدره 3 ايام .

ان دور منظمات النمو في زيادة نسبة وسرعة الانبات ياتي من خلال عملها على تحفيز نمو الجنين واستطالة الخلايا وانقسامها الذي يكون نتيجة لزيادة ليونة جدران الخلايا وزيادة الذائبات الازموزية للخلية وتقليل لزوجة السايتوبلازم مما يزيد من نشاط الخلايا (24 و 25) . كما لاحظ (26) ان منظمات النمو المنتجة من قبل ثلاثة اجناس من البكتريا وهي *Pseudomonas* و *Bacillus* و *Mycobacterium* قد عملت على زيادة نسبة انبات بذور الذرة المخزنة بنسب تراوحت بين (20 – 50 %) مقارنة بمعاملة السيطرة . ويتضح من خلال التجارب ان تخزين الراشح لمدة طويلة وبدرجة حرارة عالية نسبياً فانه يفقد فعاليته وفي دراسة قام بها (7) اختبر فيها مدى تاثير راشحي عزلتين من البكتريا *Ps.putida* و *B.cereus* بعد خزنه بدرجة حرارة 6 ْم و 18 ْم ولمدة 45 يوم في انبات بذور نبات الخس *Loctuca sativa* اذ لم يظهر فرق بين الراشحين المخزونين بدرجة حرارة 6 ْم من حيث نسبة وسرعة الانبات اما التخزين بدرجة حرارة 18 ْم فقد ادى الى تمييز راشح العزلة *B.cereus* اذ تبين نتائج الزرع والعد البكتيري ان راشح هذه العزلة تميز باعلى محتوى ميكروبي وعزى ذلك لقدرة هذه العزلة على تكوين سبورات في الراشح مما سمح لها عند توفر الظروف باعادة تكوين الخلايا وانتاج الاندول.

جدول (3) يوضح تاثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات على نسبة وسرعة الانبات

الأيام	السيطرة	IAA	Rsp_2kr				Rsp_8RA				$Pssp_2S$				النبات
			4 مْ		25 مْ		4 مْ		25 مْ		4 مْ		25 مْ		
			1	45	1	45	1	45	1	45	1	45	1	45	

	يوم	يوم	يوم	يوم	يوم	يوم	يوم	يوم	يوم	يوم	يوم	يوم			
قطن	4	8	7	9	3	6	6	5	-	5	5	4	-	-	4
	9	10	9	10	8	9	9	8	7	7	8	8	-	-	5
	9	-	9	-	8	10	10	10	8	10	10	9	6	-	6
	9	-	9	-	8	-	-	-	8	-	-	9	9	4	7
	9	-	9	-	8	-	-	-	8	-	-	9	10	6	8
	9	-	9	-	8	-	-	-	8	-	-	9	-	9	9
	-	-	9	-	8	-	-	-	8	-	-	9	-	9	10
باذنجان	-	5	3	4	-	3	-	3	-	-	-	-	-	-	4
	6	8	8	8	3	6	4	7	-	7	4	6	5	-	5
	8	10	9	10	6	9	8	9	6	9	7	9	8	-	6
	8	-	9	-	8	9	9	9	8	9	9	10	10	6	7
	8	-	-	-	8	9	9	9	8	9	9	-	-	8	8
	8	-	-	-	8	9	9	9	8	9	9	-	-	8	9
	8	-	-	-	8	9	9	9	8	9	9	-	-	8	10

المصادر

1-Shikha , C. ; Kamlesh , C. ; Ramesh , D and Dinesh , K. (2007) . Rhizosphere competent meso *Rhizobium loti* induces root hair carling and enhances growth of Indian mustard (Brassica compestris). Braz. J. Micro.38(1) : 122 – 130 .

2- Chery L. P. ; Bernard R. G. (2002). Role of *pseudomonas putida* Indoleacetic acid in development of plant . A E M (Appl. Envi. Micro) 68 (8) : 3795 – 3801 .
3- Ghosh, A.C , Basu, P.S.(2002). Growth behaviour and bio production of IAA by a *Rhizobium sp.* isolated from root nodules of a leguminous tree Dalber gia Lan ceol aria Indian j. Ex. Bio logy ,Vol. 40 P. 796 – 801 .
4-Jong,S. J.; Sang, S. L; Hyoun,Y.K.; Tae,S.A. and Hong,G.S.(2003).Plant growth promotion is Soil by inoculated Micro–organisms.J.Micro.41(4): 271–276.
5- Leveau J. H. J. and S. E. Lindow (2005) . Utilization of the plant hormone Indole – 3 – acetic acid for growth by *pseudomonas putida* strain 1290. Applied and Environmental Microbiology AEM. Vol. 71 No. 5 P 2365 – 2371.
6- Maria, G.T ; Sandra, A.V. ; Jaime, B.C. ; and patricia, M.N.(2000). Isolation of entrobacteria , *Azotobacter sp*. and *psendomonas sp.*, producers of IAA and siderophores ,from Colombian rice rhizosphere, Rev.Lat. Micro.42:171 – 176 .
7- Almonacid, S.; Quintero, N. ; martinez, M. and Vela, M. (2000). Determination of quality parameters of bacterium inocula based on liquid formulation elaborated with strains producing IAA. Phytopathology 97 : 462 – 468.
8-Berge , O. J. (1990). Effect of inoculation with *Bacillus circulans* nd *Azospirillum lipoferum* on crop – yield in field grown maize. Symbiosis 9 : 259 – 266 .
9- Neilands , J. B. (1993) . Prespective in biochemistry and biophysics , siderophores Archives. Bio che. bio phy. 302 : 1 – 3 .
10- Diby , P. and Sarma , Y. R. (2006). Plant growth promoting Rhizobacteria mediated root prolife ration in black pepper.

11–العسافي ، ادهام علي عبد (2002) . استخدام تقنية ميكروبية لزيادة جاهزية الفسفور وعناصر اخرى من الصخر الفوسفاتي . رسالة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة الانبار .

12- Biswas, J. C.; Ladha, J K. and Dazzo, F.B.(2000). *Rhizobial inoculation* improves nutrient uptake and growth of lowland rice . Soil. Sci. Soc. Am. J. 64 : 1644–1650 .
13- Beck , D. P. ; Materon , L. A. and Afandi , F. (1993). Practical *Rhizobium legumetechnology* manual. Technical manual No. 19. ICARDA.
14- Patten, C. L. , Glick B. R. 2002. Role of *pseudomonas putida* indoleeacetic acid in development of the host plant root system A E M. Vol. 68. No. 8 P. 3795 – 3801 . Subba – Rao , N. S. (1980). Phosphate solubilizing by soil microorganisms inadvancin agricultural microbiology . Ed. Butter worth. Scientific. London. Bosten. Sing apor. Toronto . P. 295 – 303 .
15- Schwyno, B.; Neilands, J. B. and Alexander, D. (1992). Universal chemical assay for the determination of sidrophores. Anal. Biochem. 160: 47 – 56.
16- Subba – Rao , N. S. (1980). Phosphate solubilizing by soil microorganisms inadvancin agricultural microbiology . Ed. Butter worth. Scientific. London. Bosten. Sing apor. Toronto . P. 295 – 303 .
17- Harold, J.; Benson, W. and Graw, M. (1998). Microbiological applications laboratory manual in general microbiology 7th. Ed.
18- Bremner,J.M.(1965).Total nitrogen in methods of soil analysis.Am.Soc.of Agr.

19–القيسي ، ايناس خالد 2005 . تقييم كفاءة بعض العزلات المحلية من البكتريا العقدية (*Rhizobium*) في تثبيت النتروجين الجوي ونمو نبات الماش تحت مستويات مختلفة من الملوحة . رسالة ماجستير مقدمة الى قسم التربة والمياه – كلية الزراعة جامعة الانبار .

20- Jan , K. A. (2000). The tryptophan story JAMA. 360 (3) : 103– 107.

21- Kittell , B. L. , Helinski , D. R and Ditta , G. S. (1989) . Aromatic amino trans ferase activity and IAA production in *Rhizobium meliloti.* J. Bacteriol. 171 (10) : 5458 – 5466 .

22- Braun, V. and Hantke, K. (1991). Genetics of bacterial iron transport. Hand book of microbial iron chelates. Boca. Raton. CRC. Pp. 365 – 370.

23- Backing, H. S. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Bio- Adv. 17 (4 – 5): 319 – 339.

24- Moore , T. C. 1979 . Biochemistry and physiology of plant hormones. New York. Springer verlag. 3rd . Ed. Pp 512.

25- Fullick , W. (2000) . The effect of different concentrations of the plant growth suhstace IAA on the growth of roots and shoots. Scl – Journal. Vol. 27. No. 9 P. 212 – 217 .

26-Dilfuza, E. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maiza in two different Soils. App. Soil. Eco.36(3) 184–189 .