تحضير لقاح متحمل للملوحة من *Bradyrhizobium japonicum* المتخصصة لفول الصويا وتحميلها على مادة مناسبة

ادهام علي العسافي ، ياس خضير حمزة ، جمال صالح الكبيسي و دينا ثامر حمودي
قسم التربة والمياه- كلية الزراعة/ جامعة الانبار

الخلاصة

تؤدي الاسمدة الحيوية دوراً مهماً وحيوياً في تعويض نقص المغذيات والتي تستعمل بفعالية لدعم الزراعة المستدامة، واجريت محاولة لعزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لجذور نبات فول الصويا من حقول مختلفة في محافظتي الانبار وبغداد، ثم فحصت العزلات وشخصت البكتريا وكشف عن العزلات المتحملة للملوحة باستعمال تقنية الطبق متدرج التركيز من ملح كلوريد الصوديوم، اختبرت قدرتها على اذابة مركبات الفوسفات وقدرتها وانتاج مركب حامض الاندول والمواد الخالبة للحديد. اضيفت الى خمسة مواد محلية مختلفة لاستعمالها حوامل Carriers واستعمل سكر الكلوكوز لتدعيم المادة المنتخبة، كذلك اختبرت فعالية اللقاح المحمل على تثبيت النتروجين وتحمل الملوحة بعد مدة حفظ 30 يوم بدرجتي حرارة 4 و 25–30 م°.

أظهرت النتائج الحصول على 15 عزلة تعود *B. japonicum* من العقد الجذرية واعطيت العزلات التي نمت بكثافة ++ بتركيز NaCl (3–5)% مع تغيير لون المستعمرات الى اللون البني المصفر الرموز المحلية Kd2 وKr3 وKr2.واظهرت العزلة Kd2 تفوق معنوي في اذابة مركبات الفوسفات وبمعدل قطر اذابة على وسط بيكوفسكايا الصلب 11.6 ملم و تمكنت من انتاج حامض (IAA) في الوسط بكمية 13.60 و 11.51 ملغم .لتر $^{-1}$ قبل وبعد التطبع على التوالي.كما اظهرت العزلتان Kd2A وKr2A قدرة في تحمل مادتي التعفير الدايثين والكيتولايت بعد التطبيع للملوحة بتركيز 0.1%. اعطت مادة مسحوق نوى التمر اعلى معدل لتحميل خلايا العزلة Kd2A بمعدل 7.66 Logcfu/ml، وادت عملية التدعيم 5% سكر الكلوكوز الى زيادة الكثافة العددية بمعدل 8.86 Logcfu/ml مع استعمال حجم لقاح 3 مللتر لكل 5 غم مادة تحميل.

اظهرت درجة حرارة الخزن لحفظ لقاح العزلة في 4 م° لمدة 30 يوم امكانية بقاء خلايا العزلة نشطة واسترجاعها بكثافة بلغت 6.96 Logcfu/ml وحافظت العزلة على صفة القدرة على النمو في تركيز ملحي 4.82 ديسي سيمنز .م $^{-1}$ وتثبيت النتروجين بمعدل 2.71 و 2.49 ملغم N.لتر $^{-1}$ تحت مستوى ملوحة 3.82 و4.82 ديسي سيمنز.م $^{-1}$.

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الرابع

Preparation *Bradyrhizobium japonicum* Inoculum's tolerance the salinity and develop suitable carrier material

Idham A. Assaffii , Yass K. Hamzaa , Jamal S. Alkobaisy and Dyna T. Hmodii
College of Agriculture/ University of Al- Anbar

Abstract

Biofertilizer play avital role offsetting the deficit produced by nutrients loss and has great contribution in supporting the continuous agriculture effectively. thus an attempt to isolate rhizobium bacteria from soybean plant roots from different field in Baghdad and Anbar governorates was carried out and identified as *Bradyrhizobium japonicum*.These isolates were tasted for salinity tolerance, ability to dissolve phosphate compounds, producing Indol acetic acid , producing sidrophore, thin 5 different local materials as a carriers were added to the selected isolates, Glucose sugar was also added to support the selected material, Inoculation efficiency for nitrogen fixation and salinity tolerance were carried out after 30 days of storage period at different temperature .

Results showed the following :15 isolates belong to *B. japonicum* were obtained .Isolates Kd2, Kr3, Kr2 showed there intensive ability of growth (+++) at salt concentration of NaCl (3-5)% with change in color of colonies to yellowish brawn.Isola Kd2 showed significantly in superiority in dissolving phosphate compounds rate diameter of 11.6 mm on solid media.and able to produced indole acetic acid (IAA) in media by amount of 13.60 and 11.5 mg /L before and after salinity adaptation .

Isolates Kd2A and Kr2A showed ability in resisting toxic effect of Dithen and Kitolite materials after salinity adaptation with 0.1% concentration of salt. Powdered dates nuclear showed highest rate in loading isolates cell Kd2A isola with density 7.66 Log cfu/ml the process of 5% glucose support resulted in increase in numerical density rate 8.86 Log cfu/ml with using 3 ml volume of inocula par 5 gm carrier.4 C storage temperature for 30 days period showed the possibility of isola cell remaining active and reproducing them back with density of 6.96 Logcfu/ml. the isola kept its ability to grow at salinity concentration of rate 4.82 ds/m and nitrogen fixation at rate 2.71 and 2.49 mg N/L under salinity level of 3.82 and 4.82 ds/m.

المقدمة

تعتمد تقانات الاسمدة الحيوية في الزراعة الحديثة على اضافة اللقاحات الحيوية الى وسط نمو النبات، لاستفادة النبات من فعاليتها ونشاطها وبالتالي زيادة الحاصل بجودة عالية.ان احد المشاكل المهمة التي تواجه زراعة نبات فول الصويا تتمثل في عدم تكوين العقد الجذرية وتعد الترب البيئة الطبيعية الجيدة لبكتريا *R. japonicum*، وتبقى بحالة جيدة لمدة خمس سنوات على اخر موسم لزراعة نبات فول الصويا، ثم يفرض على المزارع اضافة لقاح حاوي على هذه البكتريا لضمان نجاح المحصول (1) ، وعليه تكون عملية تلقيح التربة بسلالة او خليط من السلالات الكفوءة في تثبيت النتروجين من احدى المقومات المهمة في انجاح زراعته وزيادة وتحسين انتاجه. ولاجل المحافظة على اللقاح المنتج تستعمل كثير من المواد المتوفرة محليا كمواد حاملة للقاحات لتسهيل حفظها واستعمالها في الحقل منها البذور والفحم اذ تهيأ لتكون حاملا مناسبا حسب نوع الاحياء المجهرية التي سيحملها، وتكمن اهمية هذه المواد باعتبارها مصدراً مغذياً للرايزوبيا اثناء المدة ما بين تحضير

اللقاح واستعماله، واستعمل (2) مواد تحميل مختلفة شملت النشارة ومحلول سكري والرمل والفحم المنشط لتحميل اللقاح الحيوي لبكتريا الرايزوبيا *R. legaminosarum* وقد وجدوا ان النشارة تفوقت على بقية المواد المستعملة في تحميل اللقاح من ناحية حفاظها على كثافة مايكروبية عالية وتوفير البيئة الملائمة لاستمرار فعالية الرايزوبيا حتى بعد تخزينها لمدة 6 اشهر.ويجب ان تزود خلايا الرايزوبيا بمصدر طاقة وكاربون عضوي وأن السكروز هو مصدر الكاربون للمجموعة سريعة النمو ، كما يفضل بعض المنتجين المانتول والكليسرول اما البكتريا بطيئة النمو فتفضل خماسي البنتوز والسكريات السداسية (3).

يحضر لقاح الرايزوبيا بشكل نشط وبشكل ملائم لاضافته مع البذور او التربة ليُضمن تكوين العقد وتجهيز النتروجين للعملية الانتاجية، لذلك يجب ان تكون عملية اضافته سهلة وممكنة، وهذا يتأتى من طريقة التحضير والمواد المستعملة في اعداد اللقاح وحفظه(4).ان عملية عزل الاحياء المجهرية التي تستعمل كلقاحات مكلفة وتأخذ وقت طويل ولاسيما اذا تمت عملية العزل بشكل عشوائي، وان عمليات الانتاج الزراعي يفترض ان تكون مستمرة وتحتاج الى اعداد لقاحات بشكل حيوي يحوي اكبر عدد من الخلايا الحية وخالى من التلوث، لذلك يتطلب ايجاد افضل الوسائل لحفظ اللقاحات ومزارع الرايزوبيا لتجنب عمليات العزل المتكرر التي تكون مكلفة، وقد لا تضمن الحصول على نفس النوعية لكل حالة عزل(5). ولاهمية محصول فول الصويا اقتصاديا جاءت الحاجة للبحث عن اساليب جديدة لادخال بكتريا *B. japonicum* المتخصصة عليه ضمن ظروف محيطه الجذري وبكثافة كافية لاحداث الاصابة لذلك جاءت دراستنا بهدف عزل وتشخيص البكتريا المتخصصة على فول الصويا *Bradyrhizobium japonicum* من ترب سبق وان زرع فيها نبات فول الصويا ، وتنمية العزلات وتطبيعها على اوساط ملحية من كلوريد الصوديوم واختبار العزلة الكفؤة في تحمل الملوحة العالية ثم انتخاب مادة تحميل لقاح العزلة المنتخبة واختبارها.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات والعزل والتشخيص للعزلات

اختيرت ثمانية مناطق مزروعة بمحصول فول الصويا ستة منها ضمن محافظة الانبار وهي الكرمة والصقلاوية والرمادي والعامرية والخالدية والجزيرة، واثنان ضمن محافظة بغداد، ابو غريب والرضوانية وذلك لعزل البكتريا العقدية المتخصصة على نبات فول الصويا، تم اختيار عشر نباتات لفول الصويا نامية بشكل جيد وبعمر (35-50) يوم لكل منطقة (عدد العينات 80 عينة)، رطبت التربة حول النباتات قبل قلعها لتقليل التاثيرات الميكانيكية على الجذور بعدها ازيلت التربة المحيطة بالمجموع الجذري، بتعريضها لتيار ماء معتدل لتسهيل عملية فصل العقد الجذرية ونقلت العينات من الجذور الحاوية على العقد الجذرية الى المختبر لغرض عزل بكتريا الرايزوبيا. واتبعت الطريقة الموصوفة من (6) في عزل البكتريا من العقد الجذرية وحفظت المزارع البكتيرية في الثلاجة لحين استعمالها في التجارب اللاحقة، وتم الحصول على 15 عزلة اعطيت الرموز Ga1 و Rt1 و Rt2 و Rt3 و Kr1 و Kr2 و Kr3 و Am2 و Sg1 و Kd2 و Kd1 و Ra2 و Ra1 و Ab1 وAb2.اجريت بعض الاختبارات للتاكد من ان العزلات تعود الى الجنس Rhizobium وتضمنت الاختبارات اختبار ملون كرام وفحص دليل البروموثايمول الازرق.

اختبار قدرة بكتريا الرايزوبيا على تحمل الملوحة

حضر وسط YEMA بتركيز 10% NaCl وضبط الرقم الهيدروجيني للوسط على 7 وصب بمعدل 12 مllيتر.طبق وترك ليتصلب بشكل مائل، ثم اكمل حجم الوسط في الطبق الى 24 مlليتر من الوسط YEMA الاعتيادي لتحضير طبق متدرج التركيز وترك ليتصلب (7) بعدها نقلت البكتريا بوساطة ابرة الزرع الى اطباق YEMA الصلب، وزرعت بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق على درجة حرارة 28 ± 2 مْ لمدة (3–5) ايام، بعدها اجري الكشف عن نمو بكتريا الرايزوبيا، اذ عدت مستعمرات البكتريا النامية في التراكيز الملحية العالية بانها متحملة للملوحة (8).

اختبار قدرة العزلات على انتاج المركبات الخالبة للحديد و حامض الاندول واذابة مركبات الفوسفات

اجريت هذه التجربة لمعرفة قدرة العزلات على انتاج المركبات المرتبطة بالحديد واتبعت الطريقة الموصوفة من (9) بطريقة Chrome Azurel Sulfonate (CAS) وذلك بزرع العزلات بوسط IDCM (Iron deficient culture medium) عند تغير لون الكاشف من الازرق الداكن الى اللون الوردي خلال مدة (2–5) دقائق عد اختبار موجب (+++) (6–10) دقائق (++) وان العزلة منتجة للمركبات الخالبة للحديد. فحصت قابلية العزلات على انتاج حامض الاندول باتباع الطريقة المبينة من قبل (10).حضر وسط بيكوفسكايا (11) في اطباق بتري ولقح بعزلات Kd2 و Kr2 بعد وقبل التطبيع واستدل على قدرة العزلات باذابة مركبات الفوسفات من الهالة الشفافة المحيطة بمنطقة التلقيح في الوسط. واعتمد قطر الهالة في التمييز بين قابلية العزلات على اذابة مركبات الفوسفات.

تاثير مادتي التعفير الدايثين وكيتولايت في العزلتين

لغرض دراسة قابلية العزلتين Kd2 و Kr2 قبل وبعد التطبيع في مقاومة التأثير الضار لهذه المادتين عند اضافة اللقاح مع البذور في التربة. حضر وسط YEMA ولقح بطريقة التخطيط من العزلات Kd2 و Kr2 قبل وبعد التطبيع ، ثم نقعت اقراص ورقية معقمة وشبعت بمحلول محضر بنسب 0.1% و 0.2% و 0.3% لكل من مادتي الدايثين وكيتولايت وثبتت بعد 2 ساعة من التلقيح في مواقع من الطبق لكل تركيز وحضنت في درجة حرارة 28 ± 2 مْ لمدة 24 ساعة ثم سجلت اقطار التثبيط للمادتين.

انتخاب مادة التحميل الملائمة للعزلة المطبعة *B.japonicum – Kd2A*

لغرض تحميل لقاح العزلة *B.japonicum – Kd2A* على مواد يمكن ان تزيد من سهولة حفظ واستعمال اللقاح، اختبرت بعض المواد المحلية شملت نشارة الخشب والفحم المنشط ومسحوق طين البنتونايت ونخالة الحنطة ومسحوق نوى التمر، وحضرت بطحنها ونخلها بمنخلين 2 و4 ملم واستعملت المواد المتجمعة بين المنخلين، وضعت 5 غم من كل مادة في حاويات زجاجية، رطبت باضافة 2 مل من الماء المقطر وعقمت بالموصدة ثم لقحت من العزلة *B.japonicum – Kd2A* بمعدل 6.0 Logcfu/ml ثم بعد تخفيف اللقاح بكمية من الماء المعقم لسهولة مزجه مع مواد التحميل المستعملة في التجربة، وخلطت بشكل جيد ثم حضنت في درجة حرارة 28 ± 2 م لمدة 72 ساعة، ثم حسبت الكثافة المكروبية للرايزوبيا في مواد.

تأثير التدعيم بالكلوكوز في مدة حفظ لقاح العزلة *B. japonicum – Kd2A* في حامل نوى التمر

حضرت مادة مسحوق نوى التمر في قناني زجاجية حجم 50 مل لاختبار قابليتها في الاحتفاظ باعلى كثافة ميكروبية للعزلة *B.japonicum – Kd2A* بعد اضافة 5 مل من محلول سكر الكلوكوز بتركيز 2.5% و5 % مع ترك معاملة سيطرة باضافة 5 مل من الماء المقطر، عقمت المادة بالموصدة ثم بردت واضيف لها لقاح العزلة بمقدار 2 مل (بمحتوى 4.305 Log cfu/ml) او 3 مل (5.305 Log cfu/ml) حيث حضرت المعاملات بستة مكررات وحضنت في 28 ± 2 م لمدة 72 ساعة، ثم حسبت الكثافة المكروبية للرايزوبيا ،ثم

قسمت كل معاملة الى معاملتين ، اذ حفظت المجموعة الاولى بدرجة حرارة الغرفة (25–30) م ° اما المجموعة الثانية فحفظت في الثلاجة بدرجة حرارة (1–4) م ° ولمدة 30 يوم ثم حسبت الكثافة المكروبية *B.japonicum – Kd2A*.

قدرة العزلة *B.japonicum – Kd2A* على تحمل الملوحة بعد الحفظ

اجريت تجربة مختبرية باستعمال وسط محضر من مستخلص تربة رملية مزيجة 1:1 ودعم بمقدار 5 غم كلوكوز، ثم عدلت ملوحة مستخلص التربة الى 3.86 و4.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ باستعمال الماء المقطر ، وزع الوسط في انابيب اختبار بمعدل 10 ملليتر وعقم بالموصدة ثم لقح باستعمال لقاح العزلة *B .japonicum – Kd2A* المحمل على مسحوق نوى التمر المدعم بمحلول سكري 5% والذي تميز باعلى محتوى ميكروبي بعد مدة الحفظ بدرجة حرارة 4 و (25–30) م° وذلك باستعمال 1 مل من التخفيف الخامس لغرام واحد من مادة التحميل المحفوظة بدرجة 4 م ° و1 مل من التخفيف الثاني من مادة التحميل المحفوظة بدرجة (25–30) م °، كما لقحت انابيب من وسط YEM ذو الملوحة 1.05 و3.86 و4.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ باستعمال NaCl حضنت بثلاثة مكررات لكل معاملة في درجة حرارة 28 ± 2 م ° لمدة 72 ساعة و بسرعة رج 100 دورة . دقيقة$^{-1}$ ثم حسبت الكثافة لخلايا العزلة بدلالة الكثافة الضوئية.

قدرت الصفات الاتية حسب (12).وشملت :النسبة المئوية لحجوم دقائق التربة الايصالية الكهربائية للتربة والاوساط والنتروجين الكلي والفسفور الجاهز والذائب ،اجري التحليل الاحصائي حسب ما ورد في Statistical analysis Sec. Edt. وباستعمال قيمة اقل فرق معنوي بين المتوسطات L.S.D عند مستوى معنوية 0.05 باستعمال برنامج Genstat 332.

النتائج والمناقشة

تواجد وانتشار بكتريا الرايزوبيا في العينات

اظهرت نتائج فحص العينات التي جمعت من ثمان مناطق تقع اثنان منها في محافظة بغداد وستة في محافظة الانبار لعزل بكتريا الرايزوبيا من جذور نبات فول الصويا ،ان بكتريا الرايزوبيا تواجدت واصابت جذور النبات بنسبة 18.61% حيث حصل على15 عزلة من العينات وتباينت نسب الاصابة حسب المناطق اذ بلغت الاصابة نسبة 30 % في حقول منطقتي الرضوانية والكرمة تلتها نسبة اصابة 20 % في كل من حقول ابو غريب والخالدية والرمادي بينما بلغت 10 % لكل الحقول الاخرى (جدول1). وقد اوضحت النتائج ان تواجد وانتشار العزلات ارتبط مع استعمال اللقاح الرايزوبي في الحقل قبل سنتين او ثلاثة او مع زراعة الحقل بمحصول فول الصويا قبل عام (جدول1) ان عملية استعمال اللقاحات البكتيرية ذات تأثير على تواجدها واحداث الاصابة في جذور النباتات، كذلك ادت زراعة الحقل بالنبات العائل لسنوات سابقة ادت الى تواجد بكتريا الرايزوبيا في التربة والتي سببت اصابة للمحصول في السنة اللاحقة بنسبة 10%، وتؤكد هذه النتائج على ضرورة استعمال اللقاح الرايزوبي عند زراعة محصول فول الصويا في الحقل بعد دورتين زراعية على الاقل لضمان تواجد البكتريا بكثافة تمكنها من اصابة جذور المحصول الجديد وتكوين العقد الجذرية وهذا اقل مما وجدته (1) ويعود ذلك لاختلاف ظروف التربة . واظهرت الفحوصات الميكروبية التي اجريت ان جميع العزلات سالبة لملون كرام وغيرت لون الوسط YEMA مع دليل البروموثايمول من الازرق المخضر الى اللون الاصفر ، وتراوح لون المستعمرات بين الحليبي والحليبي المصفر والتبني، وقد يعود هذا التباين في اللون الى الصفات التي تمتلكها

العزلات، كما وجدت المستعمرات بمظهر شفاف وبعض الخلايا كانت بلون وردي باهت وهذا دليلا ان العزلات تعود لجنس بكتريا *Rhizobium* (6).

جدول (1) الصفات الكيميائية و الفيزيائية و الدورة الزراعية لمناطق جمع العينات

المنطقة	الرمز	عدد العزلات ونسب تواجدها	EC ديسي سيمنز.م $^{-1}$	النسجة	الدورة الزراعية
ابو غريب	Ab	2(20%)	3.15	طينية مزيجة	بور –بصل– فول الصويا
الرضوانية	Rt	3(30%)	3.65	مزيجية	بور –بطاطا– فول الصويا
الكرمة	Kr	3(30%)	3.61	مزيجية	ذرة – بور – فول الصويا
العامرية	Am	1(10%)	3.82	مزيجية رملية	فول الصويا – بور – فول الصويا
الصقلاوية	Sg	1(10%)	3.68	رملية مزيجية	فول الصويا – بور – فول الصويا
الخالدية	Kd	2(20%)	3.25	طينية مزيجية	جت – جت – فول الصويا
الرمادي	Rm	2(20%)	3.81	مزيجية	خضر – بور – فول الصويا
الجزيرة	Ga	1(10%)	3.61	طينية	فول الصويا –خس – فول الصويا

تحمل عزلات الرايزوبيا للملوحة

اظهرت جميع عزلات الرايزوبيا قدرتهاعلى النموّ+++ في الوسط عند تركيز تراوح بين (1–2) % NaCl (جدول 2)، اما عند تركيز (2–3) % حافظت العزلات Ab1 وAb2 وKr2 وKr3 وKd1 وKd2 على مستوى نمو بكثافة (+++) NaCl، اما العزلات Rt1 وRt3 وKr1 وAm2 كان نموها اقل كثافة وبمستوى (++)، الا ان العزلات Rt2 و Ra2و Ra1 Sg1 و Ga1 كان نموها بكثافة قليلة (+).

وابدت العزلات Kr2 وKr3 وKd1 اكثر تحملا لزيادة التركيز(3–5) % الملحي ونمت (++).

ومما تجدر الاشارة اليه ان المستعمرات التي حافظت على كثافة نمو متوسطة (++) بعد زيادة التركيز الملحي اظهرت تغيراً في لون مستعمراتها وقوامها اصبح اكثر لزوجة وتغير لون المستعمرات Ab1 و Ab2 و Kr1من اللون الحليبي الى اللون التبني المصفر، وهذه التغيرات التي تطرأ على الصفات المظهرية للبكتريا تكون نتيجة للتغيرات في الغشاء الخلوي وانتاجها للصبغات وزيادة البروتين الخام والمواد التي تقوم الخلية بافرازها والاليات التي تعمل من خلالها البكتريا على حماية خلاياها تحت الظروف المتطرفة، وبرهن ذلك من خلال نتائج فحوصات الخلايا من زيادة نسبة البروتين الخام والمادة النووية بعد تطبيعها للنمو في التراكيز الملحية (8).

جدول (2) قدرة تحمل عزلات الرايزوبيا للملوحة

NaCl%	**حالة النمو**			
	– لا يوجد	**+ قليل**	**++ متوسط**	**+++ عالي**
2-3	--	Rt2, Sg1, Ra1, Ra2, Ga1 (5)	Rt1, Rt3, Kr1, Am2, (4)	Ab1, Ab2, Kr2, Kr3, Kd1, Kd2(6)
3-5	Rt2,Rt3, Am2, Sg1, Ra1, Ra2, Ga1(6)	Ab1,Ab2, Rt1, Kr1, Kd1(5)	Kr2, Kr3, Kd2(3)	--

تأثير مادتي التعفير دايثين وكيتولايت على نمو العزلتين Kd2A وKr2A

يتبين من النتائج الموضحة في الجدول (3) ان مادتي دايثين وكيتولايت المستعملة لتعفير البذور تؤدي الى تثبيط نمو بكتريا الرايزوبيا ويزداد معدل قطر التثبيط مع زيادة التركيز المستعمل من المادتين في الوسط، مع وجود تأثير اكبر لمادة الكيتولايت على معدل قطر التثبيط، وقد اظهرت العزلتان بعد التطبيع قدرة على النمو في التركيز 0.1 % لمادة الدايثين وبمعدل قطر تثبيط بلغ 0.0 ملم كذلك اظهرت العزلة Kd2A قدرة على النمو في 0.1% كيتولايت وبدون تثبيط.وبشكل عام استطاعت العزلتان المطبعتان مقاومة تأثير المادتين بشكل اكبر من العزلتين قبل التطبيع اذ انخفض معدل قطر التثبيط اكثر من 50% مع تركيز 0.2% للمادتين المستعملتين اذ بلغ 2.15 و3.16 ملم للعزلتين Kd2A وKr2A لمركب الدايثين 0.2% مقارنة بمعدل قطر 5.21 و6.12 ملم قبل التطبيع ، وقد تعزى هذه الاسباب الى التحويرات التي اجريت في العزلتين بعد التطبيع بسبب طفرة قد حدثت اثناء التطبيع. وهذا ما اكد عليه (14) حيث وجد ان الرايزوبيا تستجيب للجهد وتجمع عدد من المواد الاخرى للتغلب على الضغط الناتج حولها، ومن هذه المواد tetrahydropyrimidine , sorbitol ectione .

جدول (3) تأثير تركيز مادتي الدايثين وكيتولايت على قطر تثبيط نمو العزلتين Kd2 وKr2 (ملم)

العزلات	الدايثين%			كيتولايت%		
	0.1	**0.2**	**0.3**	**0.1**	**0.2**	**0.3**
Kd2	3.00	5.21	8.32	3.1	6.21	9.25
Kr2	3.10	6.12	10.05	4.21	8.31	10.31
Kd2A	0.0	2.15	5.21	0.0	4.22	7.14
Kr2A	0.0	3.16	7.17	2.13	6.31	8.26

L.S.D P >0.05 P = 1.05 tSC = 1.36 tS,P = 1.03 C =1.95 tS,P,C =2.15 ts = 0.530 PC =1.46

قدرة العزلات المنتخبة على اذابة مركبات الفوسفات وانتاج الاندول ومركبات السايدوفور

اظهرت نتائج اختبار العزلتين على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط الصلب تميز العزلة Kd2 بتحقيق اعلى معدل لقطر الاذابة بلغ 11.60 ملم، تلتها العزلة Kr2 بمعدل قطر اذابة بلغ 10.70 ملم(جدول 4) في حين بلغ معدل قطر الاذابة 10.2 ملم للعزلة Kd2A وانخفض قطرالاذابة ليصل 9.8 ملم مع العزلة Kr2A، وبلغ انخفاض قدرة العزلتين المطبعتين على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط نسبة 12.06% و8.4% عن قدرتهما قبل التطبيع على التوالي(15) الذي اكد ان البكتريا المذيبة للفوسفات قد اذابت كميات من الفسفور الذائب وبواقع 185 ملغم . لتر $^{-1}$ من الصخر الفوسفاتي وسماد السوبر فوسفات الذي كان يعاني تثبيتا بواسطة كاربونات الكالسيوم في الترب القاعدية.ان قدرة البكتريا على اذابة الفوسفات في الوسط تعود الى قدرتها على انتاج بعض الاحماض العضوية مثل احماض اللاكتيك والستريك والاوكزاليك والسكسنيك والاحماض غير العضوية مثل الكبريتيك والنتريك كذلك انتاجها لغاز ثاني اوكسيد الكاربون الذي يذوب في الماء مكونا حامض الكاربونيك فضلا عن انتاج بعض الانزيمات التي تحرر الفسفور من بعض مركباته العضوية، اذ وجد (16) ان هناك تباين واضح بين قدرة العزلات على الاذابة، وعزى ذلك الى مدى قدرة العزلات على انتاج الاحماض العضوية وطبيعة ونوع الحامض المنتج.

جدول (4) معدل قطر الاذابة لمركبات الفوسفات (ملم)

العزلات	قطر الاذابة (ملم)	IAA ملغم/لتر	Sidrophores

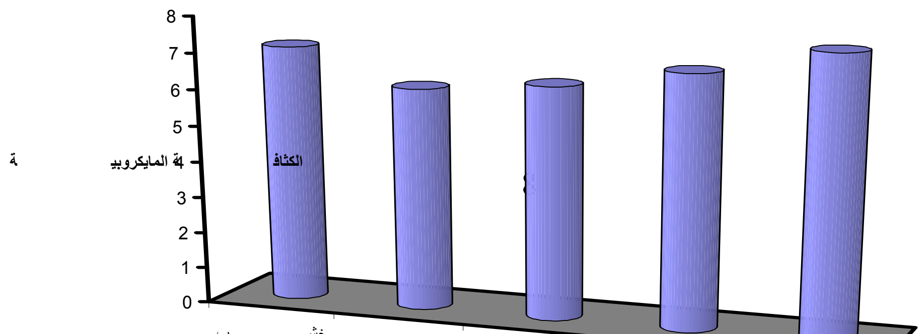
Kd2	11.60	13.60	+ + +
Kr2	10.70	12.50	+ + +
Kd2A	10.20	11.51	+ +
Kr2A	09.80	8.52	+ +
L.S.D P> 0.05	1,05	2.15	دقيقة (5-10) + + ، + + +(2-5)

ويوضح الجدول (4) قدرة العزلتين Kd2 وKr2 على انتاج حامض (IAA) الاندول وتفوقت العزلة Kd2 على العزلة Kr2 في انتاج الاندول قبل وبعد التطبيع، اما كمية الاندول المنتجة فقد قلت بعد التطبيع مع الحفاظ على تقدم العزلة Kd2 على العزلة Kr2 في كمية الاندول المنتج وبلغت 13.6 و11.51 ملغم IAA/ لترللعزلة Kd2 و12.5 و8.52 ملغم IAA.لتر $^{-1}$ للعزلة Kr2 قبل وبعد التطبيع على التوالي. وان التباينفي كمية الاندول بين عزلات الرايزوبيا قد يعود الى اسباب وراثية تتعلق بالمادة النووية المخصصة لانتاجه (17).

كما اظهرت النتائج في جدول (4) قدرة العزلات على انتاج المركبات الخالبة للحديد اذ تغير لون الدليل CAS الازرق خلال مدة (2-5) دقيقة مع العزلتين Kd2 وKr2 قبل التطبيع، وتعد سرعة عالية ناتجة عن زيادة تركيز مركبات السايدرفور في الوسط (+++) اما بعد التطبيع فقد استغرق تغير لون الدليل مدة (5-10) دقائق وتعد سرعة متوسطة ناتجة عن انخفاض مركبات السايدروفور في الوسط (++)، وتتفق نتائج هذه التجربة مع دراسات أكدت على قدرة عزلات الرايزوبيا على إنتاج مركبات خالبة يطلق عليها Sidrophores، والتي تمثل جزيئات ذات اوزان جزيئية قليلة تنتجها البكتريا لتساعدها على خلب الحديد عند اذابته من الاملاح المرتبط بها، وتمثل اهمية هذه المركبات في مساعدتها لبكتريا الرايزوبيا في الحصول على عنصر الحديد الذي يعد ضروريا لعملية تثبيت النتروجين، فهو يدخل في تكوين البروتين الثاني لمعقد إنزيم النتروجينيز المسؤول عن عملية تثبيت النتروجين من الهواء الجوي (18).

الكثافة الميكروبية في مواد التحميل

يبين الشكل (1) قدرة العزلة Kd2A المنتخبة في قابليتها على النمو على مواد التحميل المستعملة، اذ اظهرت مادة مسحوق نوى التمر اعلى محتوى معنوي من الكثافة الميكروبية لخلايا العزلة بلغ 7.66 Log cfu/ml بعد 72 ساعة حضن تلاه معدل الكثافة لكلا معاملتي نشارة الخشب ونخالة الحنطة بمعدل كثافة خلايا بلغت 7.01 و6.96 Log cfu/ml خلال 72 ساعة حضن (شكل 1)، بينما وجد ان اقل محتوى للخلايا في مادتي مسحوق طين البنتونايت والفحم المنشط بمعدل كثافة 6.21 و6.05 Log cfu/ml على التوالي. ويمكن ان تعزى قابلية العزلة Kd2A على تحقيق اعلى معدل نمو في وسط مسحوق نوى التمر لمحتوى هذه المادة من العناصر التي يحتاجها الكائن المجهري.



شكل (1) الطاقة الميكروبية في مواد التحميل

تاثير حجم اللقاح وتدعيم مادة التحميل بالكلوكوز على الكثافة المايكروبية للعزلة Kd2A

لغرض زيادة الكثافة العددية للخلايا في الوسط تم زيادة حجم اللقاح الى 3 مللتر كما دعم الوسط بمحلول سكر الكلوكوز بتركيز 2.5 و5.0 % كلوكوز، ويبين الجدول (5) وجود زيادة معنوية في معدل عدد الخلايا في مادة التحميل عند زيادة حجم اللقاح من 2 مل الى 3 مل اذ بلغت 8.08 و8.34 Log cfu/g، كذلك وجد ان تدعيم الوسط بالكلوكوز قد زاد من معدل الكثافة العددية للخلايا معنويا في الوسط ليصل 8.15 و8.64 Log cfu/g عند مستويات التدعيم بالكلوكوز (2.5 و5.0 %) على التوالي، كما وجد ان افضل معاملة من التداخل المتحقق بين حجم اللقاح وتركيز التدعيم بالكلوكوز في الوسط كانت مع استعمال حجم لقاح 3 ملليتر وتدعيم 5.0% كلوكوز اذ بلغت الكثافة لعدد الخلايا 8.86 Log cfu/g، وهذا يتفق ما جاء به (2) حيث اشار الى ان اضافة سكر الكلوكوز الى اللقاح بعد مدة الخزن يؤدي لتنشيط خلايا الرايزوبيا وفعاليتها وبقائها لمدة اطول.

جدول (5) تأثير حجم اللقاح والتدعيم بالكلوكوز على كثافة العزلة Kd2A *B. japonicum* في مسحوق نوى التمر

حجم اللقاح مللتر	نسبة التدعيم بسكر الكلوكوز % لمادة نوى التمر			
	0.00	2.5	5 %	المعدل
2	7.65	7.93	8.42	8.08
3	7.87	8.31	8.86	8.34
المعدل	7.76	8.15	8.64	

L.S.D P >0.05 V= 0.38 C = 0.18 CV = 0.81

تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن على كثافة خلايااللعزلة Kd2A في مستخلص التربة

لغرض معرفة قدرة خلايا العزلة Kd2A المحملة على مادة مسحوق نوى التمر المدعمة 5.0 % كلوكوز والمحفوظة بدرجتي حرارة 4 م و(25–30) م° لمدة 30 يوم على النمو تحت ظروف ملحية 3.82 و4.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ في وسطي ESM وYEM، حيث اجريت هذه التجربة وبينت نتائجها الموضحة في جدول (6) اذ احتفضت خلايا العزلة بقدرتها على النمو في وسط YEM بمعدلات كثافة عددية بلغت 6.64 و6.15 و5.14 Log cfu/ml تحت ملوحة وسط 1.05 و3.82 و4.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ على التوالي. كذلك تمكنت من النمو في وسط مستخلص التربة (ESM) ذو الملوحة 3.82 و4.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ بمعدل كثافة بلغت 6.07 و5.05 Log cfu/ml على التوالي.كما وجد ان تلقيح وسط YEM من لقاح العزلة Kd2A

المحمل على مادة مسحوق نوى التمر المدعمة 5% كلوكوز ومحفوظة لمدة 30 يوم بدرجتي حرارة 4 م° و(25–30) م° قد بلغ معدل كثافتها 5.81 و5.48 Log cfu/ml على التوالي. بينما بلغت كثافة نموها في وسط مستخلص التربة ESM لنفس الظروف معدل كثافة 5.74 و5.37 Log cfu/ml على التوالي .

جدول (6) تأثير درجة الحرارة و مدة الخزن على كثافة الخلايا للعزلة Kd2A في مستخلص التربة تحت ظروف ملحيةLogcfu/ml

درجة الحرارة	ملوحة وسط ESM ديسي سيمنز. م$^{-1}$		المعدل	ملوحة وسط YEM ديسي سيمنز م$^{-1}$.			المعدل
	3.82	**4.82**		**1.05**	**3.82**	**4.82**	
4 م	6.28	5.21	5.74	6.96	6.28	5.35	5.81
25–30 م	5.86	4.89	5.37	6.32	6.03	4.94	5.48
المعدل	6.07	5.05		6.64	6.15	5.14	

L.S.D P>0.05 Tem=0.20 M=0.341 EC=0.301 Tem-M=0.22 Tem-EC=0.212 EC-M=0.231 Tem-EC-M=0.246

بينما تحققت افضل كثافة لنمو خلايا العزلة Kd2A 6.96 Log cfu/ml في الوسط YEM ذو الملوحة 1.05 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ الملقح من المادة المحفوظة بدرجة حرارة 4 م كذلك وصلت كثافة خلايا العزلة Kd2A 6.28 Log cfu/ml في وسطي ESM وYEM ذو الملوحة 3.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ الملقح من المعاملة نفسها وكذلك حصل على نفس العدد تقريبا للخلايا في الوسط YEM ذو ملوحة 1.05 و3.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$. ويمكن القول ان نسبة انخفاض عدد الخلايا في وسطي ESM وYEM عند زيادة تركيز الملوحة للوسطين من 3.82 الى 4.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ هي 16.4% و 16.8% على التوالى.

بينما بلغت نسبة انخفاض كثافة الخلايا 6.44% و 7.52 % عند تلقيح الوسطين ESM وYEM من لقاح العزلة المحفوظ بدرجتي حرارة 4 و(25–30) م° بعد مدة خزن 30 يوم على التوالى وهذا يتفق مع ما جاء به (2) حيث اشار الى ان الرايزوبيا ضلت محتفظة بكثافة عالية بعد مدة حفظ 6 اشهر عند درجة حرارة 4 م° والمحملة على نشارة الخشب.

تأثير درجة حرارة ومدة الخزن على الكثافة المايكروبية في الحامل

يبين الجدول (7) ان الحفظ بدرجة حرارة 4 م° هو الافضل اذ بلغ معدل الكثافة الميكروبية 6.56 Log cfu/ml، بينما انخفض معدل الكثافة عند الحفظ بدرجة حرارة (25–30) م° لتصل 4.34 Log cfu/ml اما حجم اللقاح المستعمل 2 و3 مللتر فلم يؤدِ الى التأثير معنوياً على كثافة الخلايا في مسحوق نوى التمر بعد 30 يوم.الا ان عملية التدعيم بسكر الكلوكوز قد ادت الى زيادة كثافة الخلايا بالوسط لتصل 5.61 و6.18 Log cfu/ml عند التدعيم 2.5 و5.0 من سكر الكلوكوز، واظهر التداخل بين المعاملات ان افضل معاملة احتفظ فيها الوسط بافضل عدد من الخلايا بلغ 7.43 Log cfu/ml بعد 30 يوم حفظ عند درجة حرارة 4 م° والتدعيم بالكلوكوز 5 % واستعمال حجم لقاح 3 ملليتر، تلته معاملة استعمال 2 مل تحت نفس الظروف ليصل عدد الخلايا 7.16 Log cfu/ml، بينما كانت افضل معاملة عند الحفظ بدرجة حرارة (25–30) م° هي باستعمال حجم لقاح 2 مللتر والتدعيم 5 % كلوكوزلتعطي كثافة مايكروبية 5.11 Log cfu/ml تلتها المعاملة باستعمال حجم لقاح 3 مللتر تحت نفس الظروف بمعدل كثافة للخلايا قدرها 5.04 Log cfu/ml.وتبين النتائج المتحصل عليها من هذه التجربة ان درجة حرارة الحفظ ذات تأثير كبير على حيوية الخلايا وبقائها في مادة التحميل اذ

انخفضت بنسبة 33.8% مع استعمال درجة حرارة للحفظ (25–30) م° مقارنة بدرجة 4 م° وتدل هذه النتائج ان نمو الخلايا بكثافة في بداية الحفظ بلغت معدل 8.08 Log cfu/ml جدول (5) انخفض ليصل بمعدل كثافة 6.56 Log cfu/ml اي بنسبة انخفاض بلغت 18.2 %، وقد يعزى ذلك الى ان الحفظ بدرجة حرارة (25–30) م° يؤدي الى استمرار في نمو الخلايا ونشاطها، مما يؤدي الى نفاذ المواد الغذائية في مادة التحميل خلال مدة الحفظ، وهذا يسبب موت بعض الخلايا خلال مدة الحفظ 30 يوم مما ينعكس ذلك في انخفاض عدد الخلايا في المادة الحاملة.

جدول (7) تأثير درجة حرارة الحفظ ومدة الخزن على الكثافة المايكروبية في الحامل حسب حجم اللقاح ونسبة التدعيم بالكلوكوز Log cfu/ml

درجة حرارة الحفظ م°	حجم اللقاح مل	نسبة التدعيم بالكلوكوز% 0.0	2.5	5.0	معدل الكثافة الميكروبية	معدل درجة الحرارة م°
4	2	5.43	6.82	7.16	6.47	6.56
	3	5.60	6.95	7.43	6.66	
30–25	2	3.61	4.31	5.11	4.34	4.34
	3	3.63	4.36	5.04	4.34	
معدل الكثافة الميكروبية		4.56	5.61	6.18		

L.S.DP>0.05 Tem=1.21 Glu=0.85 Vl=1.12 Tem-Glu=1.15 Tem-Vl=1.22 Glu-Vl=1.165 Glu-Tem=1.350

بلغت نسبة الانخفاض في عدد الخلايا 14.96% عند الحفظ بدرجة حرارة 4 م° وحجم لقاح 2 مل لمدة 30 يوم عن كثافة الخلايا المتحققة بعد 72 ساعة حضن تحت نفس الظروف، ويعزى هذا الى دور الكلوكوز المضاف 5.0% لمادة التحميل في تجهيز الخلايا باحتياجاتها الغذائية وقدرة الخلايا على بناء مكونات الخلايا بشكل جيد، وقد يوفر الحماية الافضل للخلايا مع انخفاض درجة الحرارة، وبناءً على نتائج هذه التجربة يفضل حفظ لقاح العزلة Kd2A المحملة على مادة نوى التمر المدعم 5.0 % كلوكوز لمدة 30 يوم على درجة حرارة 4 م°.

نستنتج من هذه الدراسة يمكن تطبيع عزلات الرايزوبيا لمحصول فول الصويا على تحمل الظروف الملحية باستعمال تراكيز ملحية متدرجة (2–5)% NaCl ويمكن استعمال مادة مسحوق نوى التمر المدعم 5% سكر الكلوكوز كمادة حاملة Carrier للقاح المنتج.ويحفظ اللقاح المنتج للعزلة Kd2A والمحملة على مادة مسحوق نوى التمر مدعم 5% سكر الكلوكوز بدرجة حرارة 4 م° لمدة شهر بعد انتاجه.وأحتفظ اللقاح المنتج Kd2A على مقاومة الملوحة 4.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$.

المصادر

1.القيسي ، ايناس خالد صفر (2005). تقييم كفاءة بعض العزلات المحلية للرايزوبيا المتخصصة على الماش في تثبيت النتروجين تحت مستويات ملحية مختلفة . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة الانبار.

2. Arora, N. K. ; R. Naraia and D. K. Maheshwari (2008). Sawdust as a superior carrier for production of multipurpose bioinoculant using plant growth promoting rhizobial and pseudomonad strains and their impact on productivity of Trifolium repense Gurukula Kangri University Hardwar 249- 44, India.
3. Meiser, C.A. and H.D. Gross (1980). Some guidelines for the evaluation of the need for and response to inoculation of tropical legumes. Tech. Bull. 265. North Carolina Agr. Res. Service(Microbiol. Dept .N.C.State Univ.,Raleigh, N.C.)
4. Brockwell, J. (1977). Application of legume seed inoculants. p. 277-310. In R.N.F. Hardy and A. H .
5. Hoben, H. J. and P. Somasegaran (1982). Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of Rhizobium spp. in inoculants made f rom presterilized peat. Appl. and Environ . Microbiol. 44:1246-1247 .
6. Beck, D. P. ; Materon, L. A. and Afandi ,F .(1993) .Practical Rhizobium legumetechnology manual. Technical manual No. 19.ICARDA.
7. Balatti, A.P. (1982). Culturing Rhizobium in large scale fermentors. P. 127-132. In P.H. Graham and S.C.Karris (eds) BNF Technology for Tropical Agriculture. CIAT, Cali, Colombia .
8. -Mohammed, R.M. Khavan, MA. Camphell, W.F. Rumbagh, M.D. (1991). Identification of salt and drought tolerant Rhizobium meliloti L. strains. Plant and soil. 134:271-276.
9. Schwyno, B., Neilands, J. B. and Alexander, D. (1992). Universal chemical assay for the determination of sidrophores. Anal. Biochem. 160: 47-56 .
10. Patten, C. L. ; Glick B. R. 2002 . Role of pseudomonas putida sinoleeacetic acid in development of the host plant root system A E M.Vol.68.No.8P.3795-3801.
11. Subba Rao, N. S. (1982). phosphate solubilising by soil microorganisms in advancing agricultural microbiology . Ed . B. utter worth . Scientific . London . Boston . Singapore . Toronto . P : 205-303.
12. Page, A.L. ; R.H.Miller and DR. Keeny .1982. Methods f soil analysis part 2 , 2 nd (ed) Argon , 9 , publisher , Mdison Wisconsin, USA.
13. Bouhmuch, I.; F.Brhada ; A.Maltouf and J.Aurag (2001). Selection of osmotolerant and effective strains of Rhizobiaceae for inoculation of common bean (phasedus vulgaris) in Moroccan saline Soils. Agronomie . 21:591-599.
14. Tate, R.L. (1995). Soil Microbiology Johan Wiley and sons. NewYork .
15. Ponmurugan,P.& Gopi,C.(2006).In vitro production of growth regulators & phosphataase activity by phosphate solubilizing bacteria. Afrcan.J.Bio. 5 348-
16. العسافي ، ادهام علي عبد (2002) . استخدام تقنية ميكروبية لزيادة جاهزية الفسفور وعناصر اخرى من الصخرالفوسفاتي . اطروحة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة الانبار .
17. الكبيسي , جمال صالح حمود (2008) . انتاج منظم النمو IAA بوساطة البكتريا باستعمال اوساط محلية و اختبار كفاءته . اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة الانبار.
18. Kendal, I. A. (2000).Investigating the mechanism of sidrophores driven fe release from mineral surfaces using conical laser scanning microscopy. Blacks-bury.V.A., 24061.