جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار – كلية الزراعة

# إنتاج منظم النمو اندول حامض الخليك ( IAA ) بوساطة البكتريا باستعمال أوساط محلية واختبار كفاءته على نبات فول الصويا

أطروحة دكتوراه مقدمة
الى مجلس كلية الزراعة في جامعة الانبار
وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في العلوم الزراعية
علوم التربة والمياه ( أحياء التربة المجهرية )

من قبل
جمال صالح حمود الكبيسي

إشـــراف

د. ادهام علي عبد
استاذ

د. حماد نواف فرحان
استاذ

ربيع الاول 1429 آذار 2008

بسم الله الرحمن الرحيم

( تِلْكَ الدَّارُ الآخِرَةُ نَجْعَلُهَا لِلَّذِينَ لا
يُرِيدُونَ عُلُوّاً فِي الأَرْضِ وَلا فَسَاداً
وَالعَاقِبَةُ لِلْمُتَّقِينَ )

( سورة القَصَصْ الآية 83 )

## إقرار المشرفين على الاطروحة

نشهد بأن إعداد هذه الأطروحة جرى تحت إشرافنا في كلية الزراعة – جامعة الانبار وهي جزء من متطلبات درجة الدكتوراه في العلوم الزراعية – التربة والمياه ( احياء التربة المجهرية ) .

**المشرفان**

الدكتور
**إدهام علي عبد العسافي**
أستاذ
كلية العلوم – جامعة الانبار

الدكتور
**حماد نواف فرحان**
أستاذ مساعد
كلية التربية – جامعة الانبار

بناءاً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الأطروحة للمناقشة .

**الدكتور**
**مثنى خليل الراوي**
**رئيس لجنة الدراسات العليا**
**قسم علوم التربة والمياه**

# بسم اللّه الرحمن الرحيم

## إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقييم والمناقشة بأننا قد اطلعنا على أطروحة طالب الدراسات العليا **جمال صالح حمود جلال الكبيسي** والموسومة **إنتاج منظم النمو اندول حامض الخليك (IAA) بوساطة البكتريا باستعمال أوساط محلية واختبار كفاءته على نبات فول الصويا** في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة الدكتوراه في العلوم الزراعية/علوم التربة والمياه– أحياء التربة المجهرية.

**د. حميد خلف السلماني**
استاذ
جامعة بغداد / كلية الزراعة
رئيساً

**د. ظافر فخري عبد القادر**
أستاذ مساعد
جامعة الانبار/ كلية التربية
عضواً

**د. بشير حمد عبد الله الصولاغ**
أستاذ مساعد
جامعة الانبار/ كلية الزراعة
عضواً

**د. سلمان علي احمد**
أستاذ مساعد
جامعة النهرين /كلية العلوم
عضواً

**د.إبراهيم عبد الكريم العاني**
أستاذ مساعد
جامعة الانبار / كلية الطب البيطري
عضواً

**د. ادهام علي عبد**
أستاذ
جامعة الانبار /كلية العلوم
عضواً / المشرف

**د. حماد نواف فرحان**
أستاذ مساعد
جامعة الانبار / كلية التربية
عضواً / المشرف

**صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة / جامعة الانبار**

الأستاذ المساعد الدكتور
**طارق محمد عبد الفهداوي**
عميد كلية الزراعة

# الإهداء

إلى النبي الأمي معلم البشرية محمد (صلى الله عليه وسلم)

والرحمة المهداة الذي بددت رسالته الظلاما

إلى الذين يخشون الله من طلبة العلم والعلماء العاملين

وإذا خاطبهم الجاهلون قالوا سلاما

إلى الذين لا يريدون علواً في الأرض ولا فسادا

ولهم الدار الآخرة حَسُنت مستقراً ومقاما

إلى الذين جبلت على محبتهم أهلي وعائلتي

ومن علموني وأحسنوا إلي أولئك القوم الكراما

اهدي جهدي المتواضع

جمال صالح الكبيسي

## شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه ، القائل في كتابه ( يرفع الله الذين امنوا منكم واللذين أوتوا العلم درجات ) المعين الأول لي في إتمام دراستي ، والصلاة والسلام على رسوله محمد وعلى اله وصحبه الذي كان يدعوا بقوله ( اللهم انفعنا بما علمتنا وعلمنا ما ينفعنا وزدنا علماً )

يشرفني ويطيب لي أن أتقدم بخالص شكري وتقديري وعظيم امتناني لأستاذي الفاضل الاستاذ الدكتور إدهام علي عبد الذي اقترح موضوع الاطروحة واشرف عليها ورعاها واعانني منذ اللحظات الاولى ولغاية انجازها واكمال مستلزماتها ، واتقدم بالشكر والتقدير للدكتور حماد نواف الذي شاركنا ولم يبخل بعلمه واستشاراته جزاهما الله عني خيراً وكتبها لهما في صحائف اعمالهم الصالحة انه سميع مجيب .

كما اتقدم بالشكر والتقدير للاساتذة الافاضل وجهدهم رئيس واعضاء لجنة المناقشة الذين اخذت من وقتهم وجهدهم لتفضلهم بقراءة الاطروحة ومناقشتها وابداء الملاحظات القيمة عليها .

اتقدم بالشكر والتقدير إلى عمادة كلية الزراعة ورئاسة قسم علوم التربة والمياه اساتذة ومنتسبين لتهيئة فرصة الدراسة .

شكري وتقديري الخالصين إلى جميع اساتذة ومنتسبي قسم علوم الحياة في كلية العلوم واخص منهم بالذكر الاخوة الدكتور ابراهيم عبد الكريم والدكتور ليث مصلح والدكتور علي حازم والاخ عمر محمد حسن الذين لم يبخلوا علي بتوفير جهاز او مادة او مساعدة طيلة فترة الدراسة .

اتقدم بالشكر للاخ الدكتور جاسم محمد عباس الذ ساعد على الحصول على بذور فول الصويا وبعض المراجع وللاخ حسان مثنى النوري الذي ساعد في ترتيب وطباعة الاطروحة.

وارى من الواجب ان ادعوا برحمة من الله نازلة على روح المرحوم الدكتور امل نعوم يوسف الذي ساعد في الحصول على بعض العزلات البكتيرية الجاهزة .

واخيراً وليس اخراً اقدم شكري وتقديري لكل من رافقني واعانني واستخدمت مراجعه من الذين ذكرهم القلب ونسيهم القلم فجزى الله الجميع خيراً والحمد لله رب العالمين .

**جمال صالح الكبيسي**

**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 ماء الببتون واجريت عليها سلسلة من التجارب المختبرية تضمنت فحص قدرة العزلات المنتخبة على انتاج الاندول باستعمال اوساط حضرت محلياً من المسحوق الجاف لبذور الباقلاء واللوبيا وفول الصويا والحليب المجفف ( اوساط ذات محتوى عالي من التربتوفان الذي يعتبر الاساس في تكوين الاندول ) . ثم اختبر تاثير تدعيم هذه الاوساط بالتربتوفان والمرق المغذي والكلوكوز والنتروجين والفسفور في انتاج الاندول ، ومن اجل زيادة كفاءة الانتاج حددت الظروف البيئية المثلى ، وشملت الرقم الهيدروجيني ومعدل التهوية وسرعة التحريك وحجم اللقاح ومدة الحضن وتأثير درجة حرارة ومدة خزن الراشح للعزلات ، اختبر ايضاً قدرة العزلات المنتخبة على انتاج المركبات الخالبة للحديد واذابة الفوسفات وتثبيت النتروجين حيوياً في الوسط ، كما تضمنت الدراسة اجراء تجربة بايلوجية تطبيقية لتقييم كفاءة الاندول المنتج مقارنة بالاندول الصناعي وكفاءة العزلتين المنتخبتين وراشحيهما واثر ذلك على انبات بعض البذور ونمو نبات فول الصويا الذي يعاني من ضعف تواجد وانتشار الرايزوبيا العقدية الخاصة به في الترب العراقية .

وقد اظهرت نتائج الدراسة الاتي :

1- الحصول على 18 عزلة قادرة على انتاج الاندول ( من مجموع العزلات البالغة 30 عزلة ) كانت 14 عزلة منها بكتيرية عقدية .

2- 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 .

3- ادى استعمال تركيز 10 % من الاوساط المحلية المحضرة من مسحوق بذور الباقلاء وفول الصويا والحليب المجفف الى تحسين انتاج الاندول معنوياً بوساطة العزلات المنتخبة وبنسب تراوحت من 30 – 50 % .

4- ان تدعيم الاوساط المحلية بالببتون والمرق المغذي والكلوكوز والنتروجين والفسفور زاد من قدرة العزلات على انتاج الاندول معنوياً بنسب تراوحت بين 40 – 65 % .

5- اظهرت نتائج دراسة الظروف البيئية المثلى في تحسين انتاج الاندول ان افضل انتاج تحقق باستعمال العزلة $Rsp_8RA$ مع الرقم الهيدروجيني ( 7.0 ) اذا بلغ الانتاج 39.41 ملغم IAA / لتر ، وان افضل سرعة تحريك 200 رجة / د مع عدم تهوية الوسط للعزلة $Pssp_2S$ وبلغ انتاجها 42.2 ملغم IAA / لتر ، وكان افضل تداخل بين حجم اللقاح ومدة الحضن عند استعمال 3 مل لقاح / 100 مل وسط بعد مدة حضن 24 ساعة اذ بلغ الانتاج 42.8 ملغم / لتر للعزلة $Pssp_2S$ وبكثافة ميكروبية 8.41 ml / Log cfu .

6- 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 mm 11.73 و 6.25 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 .

7- اوضح اختبار تاثير درجة حرارة ومدة خزن راشح العزلات على نسبة وسرعة الانبات لبذور فول الصويا والقطن والفلفل والباذنجان تفوق فعالية رواشح العزلات المحفوظة بدرجتي حرارة 4 ، 25 م لمدة يوم واحد والمحفوظة بدرجة حرارة 4 م لمدة 45 يوم على معاملة خزن الراشح بدرجة حرارة 25 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.

8- اظهرت نتائج التجربة البايلوجية التطبيقية تفوق معاملة خليط العزلتين $Rsp_8RA$ و $Pssp_2S$ مع راشحيها مقارنة بمعاملة خليط العزلتين فقط وراشحيهما فقط او معاملة الاندول الصناعي ، وحققت تفوق في :

أ- صفات المجموع الخضري اعطت اعلى معدل للافرع 4.37 ولطول النبات 81.2 سم وللمساحة الورقية 78.4 دسم$^2$ ولنسبة الكلوروفيل 39.6 % وللوزن الجاف للمجموع الخضري 51.2 غم ولحاصلي النتروجين والفسفور في النبات 1020 و 491 ملغم / نبات على التوالي.

ب- صفات المجموع الجذري اعطت اعلى معدل لعدد العقد الجذرية للنبات 56.3 عقدة ولمعدل العقد الفعالة 46.4 عقدة وللوزن الجاف للمجموع الجذري 10.4 غم .

جـ- صفات التربة بعد الزراعة اعطت اعلى معدل للنتروجين والفسفور المتبقيين في التربة بعد الزراعة اذ بلغا 166 و 18.4 ملغم / كغم تربة على التوالي واعلى كثافة ميكروبية في التربة 7.85 Log cfu / ml .

## المحتـويات ( Contents )


| العنـــوان | الصفحة |
|---|---|
| الفصل الاول: المقدمة | 1 |
| الفصل الثاني: مراجعة المصادر | 4 |
| 2-1 منظمات النمو | 5 |
| 2-1-1 تعريف الهرمونات النباتية ومنظمات النمو | 5 |
| 2-1-2 بعض الهرمونات النباتية المهمة | 6 |
| 2-1-3 الاوكسينات | 6 |
| 2-1-4 الاوكسينات المصنعة | 8 |
| 2-1-5 تواجد الاوكسينات وانتقاله في النبات | 9 |
| 2-1-6 دور الاوكسينات في نمو النبات | 10 |
| 2-1-7 دور منظمات النمو في الانبات | 12 |
| 2-1-8 دور منظمات النمو في المجموع الجذري والعقد الجذرية | 12 |
| 2-1-9 دور منظمات النمو في النمو الخضري للنبات | 15 |
| 2-1-10 دور منظمات النمو في النمو الثمري والحاصل | 16 |
| 2-1-11 تقليل الاثر الضار للملوحة على النبات | 17 |
| 2-1-12 تقليل الاصابة بالامراض والحشرات | 18 |
| 2-2 دور الاحياء المجهرية في انتاج منظمات النمو | 19 |
| 2-3 العوامل المؤثرة في انتاج منظمات النمو من قبل الاحياء المجهرية | 21 |
| 2-3-1 نوع وتركيز المصدر الكاربوني | 21 |
| 2-3-2 تاثير نوع الكائن المجهري وكثافته في انتاج IAA | 23 |
| 2-3-3 تاثير التهوية وسرعة التحريك في انتاج الاندول | 24 |
| 2-3-4 تاثير الرقم الهيدروجيني pH في انتاج الاندول | 24 |
| 2-3-5 مدة الحضن وتاثيرها في انتاج الاندول | 25 |
| 2-3-6 تاثير الملوحة في انتاج IAA | 26 |
| 2-3-7 تاثير المادة العضوية في انتاج منضمات النمو في التربة | **28** |
| 2-3-8 تاثير درجة الحرارة في انتاج منظمات النمو البكتيري | 29 |

| العنـــوان | الصفحة |
|---|---|
| 2-3-9 تاثير تدعيم الوسط بالنتروجين في انتاج الاندول | 31 |
| 2-3-10 تاثير تدعيم الوسط بالفسفور في انتاج الاندول | 31 |
| 2-3-11 تاثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات في فعاليته | 33 |
| 2-4 قدرة البكتريا المنتجة للاندول في انتاج مركبات خالبة للحديد | 34 |
| 2-5 قدرة البكتريا المنتجة للاندول في اذابة الفسفور في الوسط | 35 |
| 2-6 قدرة البكتريا المنتجة للاندول في تثبيت النتروجين في الوسط | 37 |
| 2-7 استخدام لقاحات حيوية متعددة العزلات مع رواشحها | 39 |
| 2-8 فول الصويا واهمية التسميد الحيوي له | 41 |
| الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل | 44 |
| 3-1 الاجهزة المستعملة | 45 |
| 3-2 الطرائق المستعملة في البحث | 45 |
| 3-2-1 جمع نماذج النباتات البقولية لعزل البكتريا العقدية | 45 |
| 3-2-2 عزل بكتريا الرايزوبيا | 46 |
| 3-2-3 العزلات الجاهزة | 47 |
| 3-2-4 فحص دليل البروموثايمول الازرق | 49 |
| 3-2-5 اختبار انتاج الاندول | 49 |
| 3-2-6 تقدير كمية الاندول المنتج | 49 |
| 3-2-7 قدرة العزلات المنتخبة على انتاج الاندول في وسط المرق المغذي | 50 |
| 3-2-8 قدرة العزلات المنتخبة على انتاج مركبات الاندول باستعمال اوساط محضرة محلياً | 50 |
| 3-2-9 تأثير تدعيم الاوساط المحلية من الببتون والمرق المغذي على انتاج الاندول | 51 |
| 3-2-10 تأثير تدعيم الوسط الكلوكوز على انتاج حامض الاندول | 51 |
| 3-2-11 تاثير تدعيم الوسط بمصدري النايتروجين والفسفور على انتاج الاندول | 52 |
| 3-2-12 تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط على انتاج الاندول | 52 |

| العنـــوان | الصفحة |
|---|---|

| | |
|---|---|
| 3-2-13 تأثير معدل التهوية وسرعة التحريك للوسط على انتاج الاندول | 52 |
| 3-2-14 تأثير حجم اللقاح ومدة الحضن على انتاج الاندول | 53 |
| 3-2-15 اختبار قدرة العزلات على انتاج المركبات الخالبة للحديد Sidrophores | 53 |
| 3-2-16 قدرة العزلات البكتيرية المنتخبة على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط | 54 |
| 3-2-17 فحص قدرة العزلات المنتخبة على تثبيت النتروجين حيوياً في الوسط | 54 |
| 3-2-18 تاثير درجة الحرارة ومدة خزن راشح العزلات في فعالية الاندول | 54 |
| 3-3 التجربة البايلوجية التطبيقية | 55 |
| الفصل الرابع : النتائج والمناقشة | 59 |
| 4-1 نتائج جمع العزلات | 60 |
| 4-2 قدرة العزلات على انتاج الاندول | 61 |
| 4-3 غربلة العزلات الكفوءة في انتاج الاندول | 63 |
| 4-4 تحسين انتاج العزلات للاندول باستعمال وسط المرق المغذي | 64 |
| 4-5 دور الاوساط المحضرة محلياً في تحسين انتاج الاندول للعزلات المنتخبة | 65 |
| 4-6 تحسين انتاج الاندول بتدعيم الاوساط المحلية من الببتون والمرق المغذي | 67 |
| 4-7 تاثير تدعيم الاوساط بالكلكوز في انتاج الاندول | 68 |
| 4-8 تاثير التدعيم بمصدري النتروجين والفسفور في انتاج الاندول | 69 |
| 4-9 دور الظروف البيئية المثلى في تحسين انتاج الاندول | 71 |
| 4-9-1 تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط في تحسين انتاج الاندول | 71 |
| 4-9-2 تاثير معدل التهوية وسرعة التحريك للوسط في انتاج الاندول | 72 |
| 4-9-3 تأثير مدة الحضن وحجم اللقاح في انتاج الاندول والكثافة المكروبية | 74 |
| 4 – 10 قابلية العزلات المنتخبة في انتاج مركبات خالبة للحديد | 77 |
| 4- 11 قدرة العزلات المنتخبة في اذابة مركبات الفوسفات في الوسط | 78 |
| 4- 12 قدرة العزلات في تثبيت النيتروجين في الوسط | 80 |
| 4-13 تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات في فعاليته | 81 |
| **العنـــوان** | **الصفحة** |

| | |
|---|---|
| 4-14 التجربة البايلوجية التطبيقية | 85 |
| 4-14-1 صفات النمو الخضري | 85 |
| 4-14-2 صفات النمو الجذري | 90 |
| 4-14-3 كمية النتروجين والفسفور في النبات | 94 |
| 4-14-4 صفات التربة بعد الزراعة | 96 |
| الفصل الخامس : الاستنتاجات والتوصيات | 100 |
| الفصل السادس : المصادر | 103 |
| 6-1 المصادر العربية | 104 |
| 6-2 المصادر الاجنبية | 107 |
| الملاحق | 117 |
| المستخلص باللغة الانكليزية | |


## فهرست الجداول


| رقم الجدول | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| 1 | انواع النباتات والحقول المستعملة لعزل البكتريا العقدية | 47 |
| 2 | نوع ومصدر العزلات الجاهزة | 48 |
| 3 | المعاملات المستعملة في التجربة البايلوجية التطبيقية | 56 |
| 4 | بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية للتربة المستعملة في الدراسة | 57 |
| 5 | اختبار انتاج الاندول والبكتريا العقدية | 62 |
| 6 | كمية الاندول المنتج من العزلات | 63 |
| 7 | كمية الاندول المنتج من العزلات باستعمال الببتون والمرق المغذي | 64 |
| 8 | كمية الاندول المنتج من العزلات باستعمال اوساط محلية | 66 |
| 9 | تاثير تدعيم الاوساط المحلية في كمية الاندول المنتج من العزلات | 67 |
| 10 | تاثير معدل التهوية وسرعة التحريك للاوساط المحلية في كمية الاندول المنتج | 74 |
| 11 | قدرة العزلات على تثبيت النتروجين واذابة الفوسفات وانتاج مركبات السايدروفور | 78 |
| 12 | تاثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات في الانبات وسرعة النمو | 84 |
| 13 | تاثر المعاملات في النمو الخضري وبعض صفاته | 86 |
| 14 | تاثير المعاملات في النمو الجذري وبعض صفاته | 93 |
| 15 | تاثير المعاملات في حاصل النيتروجين والفسفور في النبات والمتبقي في التربة والكثافة الميكروبية | 95 |


## قائمة الاشكال


| رقم الشكل | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| 1 | تاثير تركيز سكر الگلوكوز للوسط في كمية الاندول المنتج | 69 |
| 2 | تاثير التدعيم بالنتروجين والفسفور للوسط على كمية الاندول المنتج | 70 |
| 3 | تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط في كمية الاندول المنتج | 72 |
| 4 | تاثير حجم اللقاح ومدة الحضن في كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة $Rsp_2Kr$ | 76 |
| 5 | تاثير حجم اللقاح ومدة الحضن في كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة $Rsp_8RA$ | 76 |
| 6 | تاثير حجم اللقاح ومدة الحضن في كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة $Pssp_2S$ | 77 |
| 7 | قدرة العزلات على اذابة الفسفور | 79 |
| 8 | قدرة العزلات على تثبيت النتروجين في الوسط | 81 |


## قائمة الصور


| رقم الصورة | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | صورة لنباتات التجربة البايلوجية | 87 |
| 2 | صورة للعقد الجذرية للنبات | 92 |


## قائمة الملاحق


| رقم الملحق | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| 1 | التصنيف الحديث للرايزوبيا | 118 |
| 2 | مكونات وسط مستخلص الخميرة – المانيتول YEM | 119 |
| 3 | المنحنى القياسي لتقدير الاندول في المزارع | 119 |
| 4 | وسط IDCM ( Iron deficient culture medium ) | 120 |
| 5 | تاثير معدل حجم اللقاح ومدة الحضن في كمية الاندول المنتج من العزلات | 120 |
| 6 | تاثير معدل حجم اللقاح ومدة الحضن في الكثافة الميكروبية في الوسط (Log. cfu/ ml.) | 121 |
| 7 | تاثير التدعيم للوسط المحلي بمصدري النيتروجين والفوسفور في كمية الاندول امنتج من العزلات ( ملغم \ لتر) | 121 |
| 8 | تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط المحلي على كمية الاندول امنتج من العزلات ( ملغم \ لتر) | 121 |
| 9 | تاثير التدعيم للوسط المحلي بسكر الكلوكوز في كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم \ لتر) | 122 |

## فهرست الجداول


| رقم الجدول | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | انواع النباتات والحقول المستعملة لعزل البكتريا العقدية | 46 |
| 2 | نوع ومصدر العزلات الجاهزة | 47 |
| 3 | المعاملات المستعملة في التجربة البايلوجية التطبيقية | 55 |
| 4 | بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية للتربة المستعملة | 56 |
| 5 | اختبار انتاج الاندول والبكتريا العقدية | 61 |
| 6 | كمية الاندول المنتج من العزلات | 62 |
| 7 | كمية الاندول المنتج من العزلات باستعمال البيتون والمرق المغذي | 63 |
| 8 | كمية الاندول المنتج من العزلات باستعمال اوساط محلية | 65 |
| 9 | تاثير تدعيم الاوساط المحلية على كمية الاندول المنتج من العزلات | 66 |
| 10 | تاثير معدل التهوية وسرعة التحريك للاوساط المحلية على كمية الاندول المنتج | 72 |
| 11 | قدرة العزلات على تثبيت النتروجين واذابة الفوسفات وانتاج مركبات السايدروفور | 77 |
| 12 | تاثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات على الانبات وسرعة النمو | 83 |
| 13 | تاثر المعاملات على النمو الخضري وبعض صفاته | 85 |
| 14 | تاثير المعاملات على النمو الجذري وبعض صفاته | 89 |
| 15 | تاثير المعاملات على حاصل النيتروجين والفسفور في النبات والمتبقي في التربة والكثافة الميكروبية | 91 |

## قائمة الاشكال


| رقم الشكل | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | تاثير تركيز سكر الگلوكوز للوسط على كمية الاندول المنتج | 68 |
| 2 | تاثير التدعيم بالنتروجين والفسفور للوسط على كمية الاندول المنتج | 69 |
| 3 | تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط على كمية الاندول المنتج | 71 |
| 4 | تاثير حجم اللقاح ومدة الحضن على كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة $R.sp_2Kr$ | 74 |
| 5 | تاثير حجم اللقاح ومدة الحضن على كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة $R.sp_8RA$ | 75 |
| 6 | تاثير حجم اللقاح ومدة الحضن على كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة $Ps.sp_2S$ | 75 |
| 7 | قدرة العزلات على اذابة الفسفور | 78 |
| 8 | قدرة العزلات على تثبيت النتروجين في الوسط | 79 |

## قائمة الملاحق


| رقم الملحق | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | مكونات وسط مستخلص الخميرة – المانيتول YEM | 115 |
| 2 | المنحنى القياسي لتقدير الاندول في المزارع | 115 |
| 3 | وسط IDCM ( Iron deficient culture medium ) | 116 |
| 4 | تاثير معدل حجم اللقاح ومدة الحضن على كمية الاندول المنتج من العزلات | 116 |
| 5 | تاثير معدل حجم اللقاح ومدة الحضن على الكثافة الميكروبية في الوسط (Log. cfu/ ml.) | 117 |
| 6 | تاثير التدعيم للوسط المحلي بمصدري النيتروجين والفوسفور على كمية الاندول امنتج من العزلات ( ملغم \ لتر) | 117 |
| 7 | تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط المحلي على كمية الاندول امنتج من العزلات ( ملغم \ لتر) | 117 |
| 8 | تاثير التدعيم للوسط المحلي بسكر الكلوكوز على كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم \ لتر) | 118 |

## قائمة المختصرات

| المفصول | المختصر |
|---|---|
| الجبرلين | $GA_3$ |
| المرق المغذي | NB |
| السايتوكاربينات | CA |
| اندول حامض البيوتاريك | IBA |
| نفثالين حامض الخليك | NAA |
| رجة بالدقيقة | رجة/ د |
| التصميم العشوائي الكامل | CRD |

# الفصل الاول

## 1- المقدمة Introduction

اصبح جلياً منذ اواسط القرن العشرين ان هناك مواد ذات اهمية كبيرة غير المغذيات يحتاجها النبات لنموه وتطوره تتمثل بمركبات عضوية خاصة تقوم بادوار معينة مهمتها ربط نمو احد اجزاء النبات بنمو اجزاءه الاخرى بامكانها ان تحفز او تثبط او تحور الفعاليات الفسيولوجية للنبات ، تلك التي يطلق عليها الهرمونات او منظمات النمو النباتية والتي ينتجها النبات بتراكيز قليلة جداً الا انها ذات تاثير فعال على النمو من حيث تحفيزها لاستطالة وانقسام الخلايا وانبات البذور وتطور الجذور ونمو البراعم وتكوين الازهار ونضج الثمار ونقل المواد الحيوية فضلاً عن فعاليات حيوية وفسلجية اخرى مهمة في النبات ( Fullick , 2000 ). وتعد الاوكسينات وفي مقدمتها منظم النمو اندول حامض الخليك ( IAA ) اول انواع الهرمونات النباتية المكتشفة واهمها تاثيراً ( Leopold , 1955 ). وكان يعتقد ان النباتات وحدها تنتج هذا الهرمون ولكن اتضح ان لبعض الانواع من ميكروبات التربة مثل البكتريا العقدية القدرة على انتاجه طبيعياً ، وان للاندول تأثيراً واضحاً في تكوين العقد الجذرية اذ ان عملية الاصابة للشعيرة الجذرية تحدث في منطقة مشبعة بالاندول وتكون مستعدة للانقسام المرستيمي والتضاعف بفعل هرمونات النمو المنتجة بكتيرياً ( الخفاجي , 1990 ) ، علماً ان هناك محاصيل مهمة مثل فول الصويا الذي يعاني من مشكلة تكوين العقد الجذرية بسبب ضعف تواجد وانتشار الرايزوبيا الخاصة به في التربة ، لذلك يمكن استعمال اللقاحات البكتيرية ( خاصة المنتجة للهرمونات ) لمعالجة هذه المشكلة اضافة لما لهذه اللقاحات من فوائد اخرى في تحسين خواص التربة وزيادة جاهزية العناصر الغذائية فيها وتطور نمو النبات ، واذا علمنا ان البكتريا يمكنها انتاج كميات كبيرة من منظم النمو (IAA ) تفوق كثيراً ما ينتجه النبات عند توفر الظروف البيئية للانتاج ، والوسط الملائم الذي يجب ان يحتوي على مصدر كاربوني غني بالحامض الاميني التربتوفان الذي يعد منشأ البناء الحيوي للاندول اذ تختلف المركبات العضوية في محتواها من التربتوفان حسب طبيعة هذه المركبات ، لذا فقد استهدفت هذه الدراسة انتاج حامض الاندول باستعمال عزلات بكتيرية قادرة على انتاجه في اوساط كاربونية محلية واثر ذلك على نمو النبات وتطوره وكما ياتي :

1- عزل وتشخيص عزلات بكتيرية كفوءة في انتاج مركبات الاندول .
2- استعمال مصادر كاربونية محلية كأوساط غذائية لانتاج مركبات الاندول ميكروبياً .
3- دراسة تدعيم الاوساط المحلية بمواد وعناصر يمكن بواسطتها زيادة نمو ونشاط البكتريا وتحسين انتاجها للاندول .

4- تحديد الظروف الملائمة للانتاج الامثل من حيث مدة الحضن ، الكثافة الميكروبية ، الرقم الهيدروجيني للوسط ، درجة الحرارة والتهوية وسرعة التحريك للوسط .

5- اختبار كفاءة الاندول المنتج بكتيرياً مقارنة بالاندول الصناعي وكفاءة العزلات المنتخبة ورواشحها في تجارب بايولوجية تطبيقية على بعض النباتات .

# الفصل الثاني

# 2- مراجعة المصادر Literature review

## 2- 1 منظمات النمو

### 2-1-1 تعريف الهرمونات النباتية ومنظمات النمو

يعرف الهرمون النباتي على انه مادة عضوية غير غذائية تنتج اساسا في الانسجة النباتية النشطة بتراكيز قليلة جدا وتعمل هذه التراكيز القليلة على التحكم والتاثير في عمليات فسيولوجية معينة كما انها تنتقل غالبا من مكان انتاجها الى مكان تاثيرها ، وتتحكم الهرمونات النباتية في نمو وتطور الاعضاء النباتية المختلفة ولا يقتصر تاثيرها على عمليات التمثيل الغذائي ، بل يتعداه الى كثير من العمليات الفسيولوجية المتخصصة . وتبعاً لطبيعة التاثير فان الهرمونات النباتية تنقسم الى مجموعتين اساسيتين ( كاظم و الريس 1987 ) و ( Moore , 1979 ) :

أ – مواد منشطة للنمو Growth Regulators

ب – مواد مثبطة للنمو Growth Inhibitors

ولا يمكن ان نضع تعريفاً محدداً لهما وذلك لان التأثير المنشط او المثبط يعتمد على التركيز المستعمل لكل هرمون نباتي. كما تختلف الاعضاء النباتية للنبات الواحد في استجابتها لهرمون نباتي معين ، فبينما ينشط ذلك الهرمون النمو الخضري نجد انه يثبط نمو الجذور لنفس النبات وقد ينشط هرمون معين الازهار في نبات النهار الطويل في حين انه يمنع الازهار في نبات النهار القصير ( عبدول 1987 ) و ( Fullick, 2000 ). اما منظم النمو فهو يطلق على المواد المخلقة صناعيا والتي تسبب تاثيرا مشابهاً لتأثيرات الهرمونات النباتية وهي مركبات عضوية ( غير المواد الغذائية ) والتي لها القدرة على التأثير بتراكيز ضئيلة ( كمواد منشطة او مثبطة ) وهذا التاثير يشمل تعديل او تحوير في العمليات الفسيولوجية للنبات ويلعب التركيب البنائي دوراً مهماً في تصنيع منظمات النمو ، فاذا تشابه تركيبها الكيمياوي مع ذلك الخاص باحد هرمونات النمو وضعت هذه المادة مباشرة في مجموعة هذا الهرمون منشطاً كان ام مثبطاً ويختبر تأثير هذه المادة على استطالة وانقسام الخلية دليلان للنمو ( محمد ويونس , 1991 ). تأخر اكتشاف الهرمونات النباتية كثيراً لانها كما ذكر ان تأثيراتها تحدث بتراكيز منخفضة جداً ،

علماً ان الهرمونات النباتية تتركز غالباً في الاغماد والبراعم والقمم النامية للسيقان والجذور وكذلك البذور وحبوب اللقاح والبويضة (Davies , 1955 ).

**2-1-2 بعض الهرمونات النباتية المهمة**

تعد الاوكسينات (Auxins ) والجبرلينات ( Gibberellins ) و السايتوكاينينات ( Cytokinins ) و الاثيلين ( Ethylene ) من انواع الهرمونات النباتية الاساسية والمهمة والتي يعد استعمالها بتراكيز معينة من منشطات النمو في حين تتدرج الفينولات (Phenols ) وحامض الابسسك ( Abscisic acid ) ضمن الهرمونات النباتية التي تعد من مثبطات النمو ( Mauseth , 1991 ) .

**2-1-3 الاوكسينات**

تعد الاوكسينات من اول الهرمونات النباتية اكتشافاً عام 1933 من قبل العالم Kogel والتي من اهمها Indol Acetic Acid ( IAA ) ذو الوزن الجزيئي 175 دالتون الذي يوجد طبيعياً في النبات ، وتنتج هذه المواد عندما تكون الظروف البيئية ملائمة من قبل بعض النبات اذ ينحصر تكوينها في المناطق المرستيمية والانسجة النشطة واجنة البذور (Raven واخرون , 1992 ).

كما تقوم بعض الاحياء المجهرية بانتاجها بكميات مختلفة عند توفر الظروف الملائمة في بيئتها ، فقد ذكر Rasul ( 1999 ) ان بكتريا *Pseudomonas* انتجت كميات كبيرة من IAA تجاوزت 35 ملغم / مل في وسط حاوي على التربتوفان وقد اختلف الانتاج باختلاف الظروف البيئية ومراحل النمو .

يتم بناء مركبIAA من ايض الحامض الاميني Tryptophan عن طريق بعض الانزيمات التي تختزل مجموعتي الامين والكاربوكسيل ثم الكاربوسليز لمجموعة المثيل الطرفية لينتج الاندول كما في المخطط الموضح من (Zimmer واخرون , 1991 ) و (Devlin , 1975 ).

**المخطط**

اشار التقرير المقدم من Jan ( 2000 ) ان التربتوفان يتواجد كحامض امينـي اساسـي في كثير من الاطعمة مثل الحليب والموز وكثير من بذور النباتات البقولية ، كما وجد ان بعض العزلات البكتيرية تنتج كميات من التربتوفان في مراحل طور التطبع ثم لا تلبث ان تستهلك معظمها او تختفي من الوسط باستغلالها في المسارات الحيوية لانقسام وتكاثر البكتريا في الطور اللوغارتمي . ومع بناء الاوكسين فهنالك عمليات يتم فيها ايضا هدم الاوكسين أما عن طريق الاكسدة الضوئية او الاكسدة الانزيمية وفي الحالة الاولى يعتقد ان الضوء يؤثر على هدم الاوكسين عن طريق تنشيطه لصبغة الفلافين ، وقد ثبت ان مركبي 2- oxindole 3- methylene و Indolaldehyde من اهم نواتج الهدم الضوئي وهما من المركبات النشطة ، لذلك من الممكن ان يعزى تثبيط النمو بالضوء اساساً الى تكوين هذين المركبين في الانسجة Fullick ( 2000 ). اما الهدم الانزيمي فيتم عن طريق الانزيمات التي يدخل في تركيبها الحديد مثل انزيمات البيروكسيديز ويعتقد البعض انه يدخل في تركيبها النحاس اذ ان معظم النباتات تحتوي على النظام الانزيمي المعروف IAA oxidase والذي يعمل وسطاً كيميائياً لهدم الاوكسين الطبيعي ( IAA ) مع انطلاق ثاني اوكسيد الكاربون واستهلاك الاوكسجين ، مع وجود الفينولات كعامل مساعد في عملية الهدم (Basu , 1996 ) و ( Sanjay و Jeffery , 1999 ) ، فضلاً عن عمليات الهدم التي يتعرض لها الاوكسين فقد يتحول IAA في النبات الى مشتقات خاملة هرمونيا (IAA arabinose ) ، (Indole acetyl aspartate ) و (Indole ethyl acetate ) او المرتبطة مع مكونات السايتوبلازم نتيجة امتصاصه على اسطح البروتين (Moore , 1979 ) و ( Raven واخرون 1992 ).

**2-1-4 الاوكسينات المصنعة**

نظراً للاهمية الكبيرة التي تتمتع بها الاوكسينات من حيث قابليتها على تحسين نمو النبات واستعمالاتها الاخرى فقد كثفت الجهود لانتاج وتصنيع عدد من المركبات الصناعية والتي تشبه في فعلها وتأثيراتها الفسيولوجية للاندول الطبيعي وتقسم الاوكسينات الصناعية عموماً الى خمسة مجاميع رئيسية ( Moore 1979 ) وهي :

1- مجموعة حوامض الاندول Indol acids و Indole buturic acid ( IBA ) .

2- مجموعة حوامض النفثالين Naphthalene acids

3- مجموعة حوامض الكلوروفينوكسي Chlorophenoxy acids

مثل ( 2 , 4 – D) 2 , 4 – Dichloro phenoxy acids acids و( 2 , 4 , 5 – T ) 2 , 4 , 5 – Trichloro phenoxy acetic .

4- مجموعة حوامض البنزويك Benzoic acids

مثل ( 2 , 4 , 6 – T ) Trichloro benzoic acids– 2 , 4 , 6 .

5- مجموعة حوامض البيكلونك Picolinic acids

مثل Trichloropicolinicacids – 3 , 5 , 6 .

وبالنسبة للمجاميع الثلاثة الاخيرة فهي مبيدات اعشاب بالتراكيز العالية ومنظمات نمو بالتراكيز الواطئة . علماً انه لابد من توافر متطلبات جزيئية معينة في أي مركب لكي يظهر تأثيراً مشابهاً للاوكسينات (Prinsen واخرون , 1993 ) ، وهذه المتطلبات هي ان يكون المركب حلقي ويوجد في الحلقة على الاقل رابطة زوجية غير مشبعة ، كما يرتبط بالحلقة سلسلة جانبية تنتهي بمجموعة كربوكسيل او بها مجموعة يسهل تحويلها الى مجموعة كربوكسيل ، وضرورة وجود ذرة كربون واحدة على الاقل بين الحلقة ومجموعة الكربوكسيل إضافة الى ان يكون له ترتيب بنائي محدد بين السلسلة الجانبية والحلقة يسمح له باجراء التفاعل .

**2-1-5 تواجد الاوكسين وانتقاله في النبات**

توجد الاوكسينات في النباتات الراقية بكميات تتفاوت من وقت الى اخر ومن مكان الى اخر وحسب نوع النبات فقد قارن Schuider واخرون ( 1970 ) هذه المركبات في نباتي الشعير والطماطة ، فوجدوا ان كمية الاوكسين في المجموع الخضري للطماطة اكثر منه في الشعير ، كما يتواجد الاندول بكميات كبيرة نسبيا في نباتات فول الصويا ودرنات البطاطا والاناناس وترتفع نسبتة في البادرات النامية في الظلام واوراق اللهانة . وتنتقل الاوكسينات من اماكن انتاجها في الاغماد والبراعم الطرفية والانسجة المرستيمية الحديثة والبذور والازهار الى اماكن اخرى حيث يظهر تاثيرها. وهناك اراء عديدة في عملية انتقال الاوكسينات منها ، ان الاوكسينات تنتقل بحركة قطبية من القمة الى القاعدة في حين ان هناك من يعتقد بان حركتها تتحدد بحالة التفاعلات الحيوية في الخلية ، اذ تتطلب طاقة ( ATP ) اذ ان الظروف غير الهوائية تبطئ حركة الاوكسين ، كما وجد ان الاوكسين ينتقل في النباتات مع عصارة المواد الغذائية في الخشب واللحاء اذ يمكن انتقاله عن طريق الجذور . علماً ان انتقال الاوكسينات داخل النبات يحدث بمعدلات عالية وان سرعة الانتقال تختلف باختلاف النوع النباتي والظروف المحيطة ، فهي عموماً تتراوح بين 4 – 6 ملم / ساعة وقد تصل احيانا الى 26 ملم / ساعة بالنسبة للاوكسين المنتج داخل انسجة النباتات . في حين ان سرعته تزداد لتصل من ( 20 – 60 ملم / ساعة ) عندما يضاف الاوكسين خارجياً للنبات اذ يكون الانتقال عن طريق الاوعية النباتية ( الخشب او اللحاء ) ( Suckstorff و Bery , 2003 ).

**2-1-6 دور الاوكسينات في نمو النبات**

للاوكسينات تأثيرات فسيولوجية عديدة على النبات وهي بالتالي تلعب دوراً مهماً في نمو وتطور النبات وانتاجه ومن اهم هذه التأثيرات الفسيولوجية :

1- تحفيز استطالة الخلايا عن طريق زيادة ليونة جدران الخلايا وزيادة الذائبات الازموزية للخلية وتقليل لزوجة السايتوبلازم وترفع من القوة الازموزية للخلايا ( Agrios , 1997 ) و ( Fullick , 2000 ) ويتبع ذلك تحفيز الاوكسين لانقسام الخلايا خاصة في الانسجة المرستيمية الحديثة التي يرتفع فيها الاوكسين ، وهذا يساعد ايضا على تكوين الكالس عند تعرض العضو النباتي للقطع وهذا يفيد في حماية النبات من المؤثرات الخارجية وتقليل فقدان الماء من النبات ( Moor , 1979 ) و ( Fullick , 2000 ) .

2- ابتداء تكوين الجذور : ان اضافة الاوكسين بتراكيز عالية نسبياً يقلل نمو واستطالة الجذر الرئيسي في حين يسبب زيادة التفرعات وتكوين الجذور الجانبية بسبب زيادة انقسام الخلايا في الدائرة المحيطية علماً ان الجذور تكون حساسة للتراكيز العالية من الاوكسين عكس الساق (Moore , 1979 و زهوي وديوب , 2005 ) ، ووجد شريف ( 1994 ) ان عقل نبات المطاط قد استجابت معنوياً للتجذير باستعمال تراكيز من حامض الاندول تراوحت بين ( 250 – 1000 ) ملغم / لتر وكانت قدرتها على التجذير تزداد بزيادة التراكيز المستعملة .

3- السيادة القمية ونمو البراعم الجانبية : من المعروف ان البراعم الطرفية تسود في نموها على البراعم الجانبية وقد فسر ذلك بسبب تأثير الحالة الغذائية للنبات ، اذ لوحظ ان المواد الغذائية تنتقل وتتجمع في الاماكن ذات التركيز العالي من الاوكسين والمتمثلة بالبراعم النهائية والمناطق المرستيمية. كما ان انتقال الاوكسين خلال الساق يثبط الارتباطات الوعائية بين البراعم الجانبية والساق نفسه مما يؤدي الى قابلية البراعم في الحصول على المواد الغذائية بوساطة الانسجة الوعائية الناقلة ( Gregory و Veale , 1957 و Fullick , 2000 ) .

4- تحفيز نمو الثمرة وتكوين الثمار العذرية : ان معاملة مياسم الازهار بالاندول يؤدي الى تكوين الثمار العذرية علماً ان كل من عملية التلقيح ونمو انبوب اللقاح والاخصاب تؤدي الى تكوين الاوكسين الذي يحفز نمو وتطور الثمار ( Gustafson , 1936 ) وكذلك ( Archana و Patricia , 2004 ) .

5- تثبيط السقوط ( الانفصال ) : لوحظ ان السويق منزوع النصل يسقط بعد مدة قصيرة حتى لو كانت الورقة حديثة التكوين لكن عند معاملة سويق الورقة منزوعة النصل

بالاوكسين بتركيز معين فان ذلك يؤدي الى تاخير انفصال سويق الورقة ، من ذلك يتضح ان IAA الذي يتكون داخل نصل الورقة الفتية وينتقل خلال السويق الى الساق يمنع سقوط تلك الاوراق. لذلك لوحظ ان محتوى الاوكسين عالياً في الاوراق الفتية مقارنة بالاوراق القديمة مما يعرض الاخيرة للانفصال عن الساق . ( Rubinstein و Leopold , 1963 ) و ( Brandl و Lindow , 1998 ).

6- تحفيز الاوكسين لنقل المواد الحيوية : ان التجارب الحديثة التي استعملت فيها العناصر المشعة تؤكد تحفيز الاوكسين لنقل المواد الحيوية (Koga واخرون 1992).

7- زيادة التنفس : لقد ثبت من خلال التجارب ان الاوكسين يزيد من معدل التنفس ، ويعتقد ان تأثير الاوكسين على التنفس يأتي من خلال زيادة ADP نتيجة استهلاك الطاقة ATP من خلال توسع ونمو الخلايا والفعاليات الحيوية ( محمد ويونس , 1991 ) و ( French و Beevers , 1953 ) .

8-الاوكسين كمبيد عشبي : ان التراكيز العالية من الاوكسين تثبط النمو ، وتؤدي الى تشوهات في النبات كتغير شكل الورقة والساق والجذر او تغير لون الاوراق ، فيموت النبات نتيجة لاختلاف عمليات الايض في المناطق المرستمية الحديثة ( الشحات , 1990 ) و ( Heller , 1982 ) .

9- تأثير الاوكسين على الاحساس والحركة في النبات : ان للاوكسين دوراً مهماً في استجابة نمو النبات وحركته باتجاه محفز الجاذبية في العملية المسماة الانتحاء الارضي ( Geotropism ). ويلعب الاوكسين دوراً مهما في استجابة نمو واتجاه الساق والاوراق والجذور نحو الضوء في عملية Phototropism وللاوكسين دوراً في انواع اخرى من الاحساس والحركة في النبات مثل عملية التفاف السيقان والحوالق بسبب مؤثر اللمس ( محمد ويونس, 1991 ) و ( Fullick , 2000) .

10- ان النباتات النامية في ترب كلسية ذات محتوى عالي من الكالسيوم تتصلب فيها جدر الخلايا وتعمل الاوكسينات على التقليل من صلابة هذه الجدران عن طريق تفكيك بكتات الكالسيوم والايونات المعدنية المسؤولة عن الصلابة ، وهذا ضمان لاستطالة الخلايا وانقسامها وزيادة النمو ، كما تعمل الاوكسينات على زيادة نفاذية الاغشية الخلوية وبذلك زيادة انتشار المواد العضوية فترفع بذلك الضغط الازموزي للخلايا ، مما يزيد من امتصاص الماء والغذاء ومقاومة النبات للظروف البيئية المحيطة ( Fullick , 2000 ).

**2-1- 7 دور منظمات النمو في الانبات**

لمنظمات النمو دوراً اساسياً في عملية انبات البذور خاصة بالنسبة للبذور التي تعاني من مشاكل في عمليات الانبات بسبب الظروف البيئية او الوراثية او بسبب طول مدة السكون فقد وجد Ramazan واخرون ( 2007 ) ان نسبة انبات بذور الشعير قد ازدادت بحوالي 17.9 – 32.1 % مقارنة مع معاملة السيطرة ( Control ) . كما بحث سلامة واحمد ( 2005 ) مدى تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم وثلاثة هرمونات نباتية ( اندول حامض الخليك والجبرلين والكاينتين ) على انبات بذور القمح والفاصوليا ، اذ اظهرت النتائج ان الملوحة ادت الى خفض نسبة الانبات في كلا النباتين ، وكان تأثيرها على الفاصوليا اكثر من الحنطة ، كما ادى نقع البذور في محاليل الهرمونات النباتية الثلاثة الى زيادة معنوية في النسبة المئوية للانبات لكلا النباتين تراوحت بين 30 – 70 % مقارنة بمعاملة السيطرة .

وفي دراسة اجراها Dilfuza ( 2007 ) على نبات الذرة وجد 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 مع معاملة السيطرة . كما وجد Shikha واخرون ( 2007 ) ان منظم النمو IAA المنتج من قبل بكتريا العقد الجذرية ادى الى زيادة الانبات لنبات اللهانة ( *Brassica Campestris* ) اذ بلغت نسبة الانبات 72 – 75 % مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت فيها نسبة الانبات 54 % بعد مرور 15 يوم على الزراعة . كما لاحظ Jong واخرون ( 2003 ) ان بكتريا *Ps.fluoresens*. تنتج كمية من IAA والذي عمل على زيادة انبات البذور لنبات السفرجل والخباز والجزر والحنطة .

**2-1-8 دور منظمات النمو في المجموع الجذري والعقد الجذرية**

تكون الجذور عموماً اكثر حساسية للتراكيز العالية نسبياً من منظمات النمو مقارنة مع المجموع الخضري ، ومع ذلك فأن التراكيز المناسبة من هذه المنظمات تكون ضرورية لنمو وتطور الجذور وتكوين العقد الجذرية ، فقد ذكر الباسط واخرون ( 2006 ) ان منظمات النمو ( اندول حامض الخليك واندول حامض البيوتاريك وحامض الجبرليك ) المنتجة من قبل بكتريا الرايزوبيا والازوتوبكتر قد ادت الى زيادة نمو المجموع الجذري وتكوين العقد الجذرية وزيادة في نشاط انزيم النيتروجينيز. كما وجد Fauzia واخرون ( 2006 ) ان تلقيح نبات القمح ببكتريا الرايزوبيا قد ادى الى انتاج كميات عالية من منظم النمو IAA مما زاد الوزن الجاف لجذور نباتات القمح الملقحة مقارنة بالنباتات غير الملقحة . قد اشار Cheryl و Bernard ( 2002 ) 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. وفي دراسة للباحثين زهوي وديوب ( 2005 ) حول تأثير تركيز وموعد استعمال حامض اندول بيوتاريك IBA في تجذير نبات الطماطة ، اظهرت النتائج ان استعمال 20 ملغم / لتر من IBA خلال شهر كانون الاول ادت الى زيادة نسبة التجذير الى 94 % ، في حين لم تتجاوز هذه النسبة 20 % في معاملة السيطرة . كما وجد Martin واخرون ( 1989 ) ان استعمال IAA المنتج من قبل البكتريا وكذلك الاندول الصناعي قد ادى الى زيادة عدد الشعيرات الجذرية وطول الجذر لنبات القمح كذلك ادى الى زيادة عدد العقد الجذرية المتكونة في نبات العدس وقد اعطى كل من الاندول البكتيري والاندول الصناعي نفس النتائج . وحصل شاهين واخرون ( 2004 ) على اعلى نسبة تجذير ومتوسط عدد الجذور في زراعة الانسجة لنبات المانگو باستعمال وسط يحتوي 4 ملغم / لتر من اندول حامض الخليك ( IAA ). بالاضافة الى الادنين والسكروز . ووجد Mao واخرون ( 2007 ) ان استعمال ( IAA ) منظماً لنمو نبات الطماطة ادى الى زيادة الوزن الجاف للمجموع الجذري عن طريق زيادة طول وتفرعات الجذور .

كما ذكر Hoflich واخرون ( 1995 ) ان تواجد بكتريا الرايزوبيا وبقائها في منطقة الرايزوسفير مع النباتات غير البقولية يحدد بالظروف البيئية وترتبط قدرتها على احداث الاصابة بكمية الهرمونات التي تنتجها لتعمل انحناء في الشعيرات الجذرية للنبات . وأشارت الدراسات التي قام بها كل من Glick ( 1995 ) و Vincent ( 1970 ) وكذلك Weller و Cook ( 1983 ) الى ان جذور النباتات البقولية غالباً ما تصاب ببكتريا العقد الجذرية وان عملية الاحتكاك والاستيطان لبكتريا الرايزوبيا على القمم النامية للشعيرات الجذرية يكون بسبب الانحناء للشعيرات الجذرية تجاه المواد المنتجة من البكتريا العقدية المتمثلة بمنظمات النمو ، والذي يعد الخطوة الاولى لحدوث الاستيطان والاصابة لتكوين العقد الجذرية.

كذلك وجد Basu و Chosh ( 2006 ) 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 ، واشار الى ذلك الباحثان Barbieri و Galli ( 1993 ) بأن بكتريا *Azosprillium* انتجت منظم النمو ( IAA ) والذي ادى الى تطور نظام الجذور بصيغة عدد العقد الجذرية المتكونة على الجذور.

اوضحت الدراسات ان التشوهات التي تحصل في الشعيرات الجذرية المصابة ببكتريا الرايزوبيا ناتجة عن الكربوهيدرات البكتيرية التي تكون حاوية على بعض الاحماض النووية ومنظمات النمو ، كما لوحظ ان عملية الاصابة للشعيرة الجذرية لاتحدث في كل المناطق وانما في مناطق خاصة يطلق عليها البقعة الزجاجية Hylaine spot التي تكون مشبعة بالاندول وتكون مستعدة للانقسام المرستيمي والتضاعف بفعل هرمونات النمو ( الاوكسينات

والسايتوكاينينات ) المنتجة بكتيرياً ( الخفاجي , 1990 ) والتي ذكرت ايضاً انه ليست جميع انواع الرايزوبيا يمكنها ان تكون العقد الجذرية التي تثبت النتروجين ، اذ ان هناك انواع يمكنها تكوين عقد جذرية لكنها لا تستطيع تثبيت النتروجين او قد تثبت كميات قليلة منه ويطلق عليها بالعقد غير الفعالة عكس العقد النشطة في التثبيت والتي يطلق عليها بالعقد الفعالة. وذكر المصلح والحيدري ( 1990 ) انه كلما كانت البكتريا قادرة على انتاج الاوكسينات ومنظمات نمو اخرى استطاعت تكوين ما يطلق عليه Bacteriods لقدرة هذه المواد على تشجيع انقسام الخلايا وزيادة قابلية الاختراق لخلايا النبات . علماً ان العقد الفعالة تكون كبيرة الحجم وذات لون وردي لاحتوائها على بروتين احمر يشبه الهيموغلوبين يسمى legham – globin وله دور في عملية تثبيت النتروجين.

اما العقد غير الفعالة فتكون غير نشطة صغيرة الحجم بيضاء او معتمة وتسمى بالعقد الكاذبة . ويشير Okon و Kapulnik ( 1986 ) الى ان الجذور النباتية تحتاج الى تراكيز من IAA تتراوح من 40 – 100 ملغم / لتر وقد يصل التركيز اللازم لتجذير عقل بعض الاشجار الى 300 ملغم / لتر. ويمكن زيادة التركيز على ان تتعرض العقل لمدة اقل بحيث لا تتجاوز الساعة.

من جهة اخرى اشار Brandle و Lindow ( 1986 ) ان بكتريا *Erwinia herbicola* تنتج كميات كبيرة من IAA وصلت الى 92 ملغم / لتر مما ادى استعمال الرواشح الى انخفاض معنوي في طول الجذير لنبات الفاصوليا ، كما ذكر Loper و Schroth ( 1986 ) ان هنالك علاقة ارتباط خطية ومعنوية بشكل واضح في تثبيط استطالة الجذور لنبات البنجر السكري مع زيادة كمية الاندول المنتج من قبل ***Rhizobacteria***. اما ( Fullick , 2000 ) فقد وجد ان التراكيز العالية من الاندول تثبط نمو واستطالة الجذور وعزى ذلك الى ان الجذور تكون نامية في الظلام لذلك فهي تحتاج الى تراكيز واطئة من الاندول لتشجيع النمو لانها اصلاً تحتوي على تراكيز عاليه منه . في حين ذكر الشرنوبي ( 2005 ) ان التراكيز المنخفضة من الاوكسينات ( 1 ملغم / لتر ) لكل من اندول حامض الخليك ونفثالين حامض الخليك اعطت افضل نمو للجذور مع تقليل موت النسيج في تجارب زراعة الانسجة .

### 2-1-9 دور منظمات النمو في النمو الخضري للنبات

تلعب منظمات النمو دوراً مهما في صفات المجموع الخضري للنبات من خلال تاثيرها على عمليتي انقسام واستطالة الخلايا ، وكذلك من خلال تاثيرها على صلابة جدر الخلايا اذ تعمل منظمات النمو على ازالة بكتات الكالسيوم والايونات المعدنية المسؤولة عن الصلابة ، كما

انها تؤثر على بعض المركبات العضوية وتؤدي الى تحللها مثل البكتين والهيموسيليلوز ( انصاف السليلوز ) ، فضلاً عن ذلك فان منظمات النمو تعمل على زيادة نفاذية الاغشية خاصة طبقة الفوسفولبيدات مما يؤدي الى زيادة انتشار المواد العضوية وايونات الهيدروجين والمعادن الاخرى فيزيد ذلك الضغط الازموزي للخلايا والقدرة على امتصاص الماء والغذاء Fullick ( 2000 ) .

وجد Suckstorff و Berg ( 2003 ) ان بكتريا *Stenotrophomonas* التي لقح بها نبات الفراولة ادت الى تطور الافرع الهوائية وزيادة الكلوروفيل في النبات ، قد اتى ذلك من زيادة في انتاج منظم النمو IAA. وأشار Fullick ( 2000 ) الى ان اكثر منظمات النمو شيوعاً هو IAA المنتج طبيعيا في النبات ومن قبل البكتريا والذي ادى ضمن تركيز يتراوح بين ( 10 – 30 ) ملغم / لتر الى زيادة النمو الخضري لنبات الرشاد وعزى ذلك الى زيادة استطالة وانقسام الخلايا. كما ذكر Chabot واخرون ( 1996 ) ان الزيادة الحاصلة في وزن المادة الجافة لنباتي الذرة والخس قد اتت من انتاج هرمون النمو IAA من قبل بكتريا الرايزوبيا .وذكر سلامة واحمد ( 2005 ) ان استعمال منظمات النمو وهي IAA و $GA_3$ و Kietin ادت الى زيادة مقياس النمو والسكريات الذائبة لنباتي القمح والفاصوليا.

واشار كل من Estelle ( 1992 ) و Zhao واخرون ( 2005 ) و Ostin واخرون ( 1998 ) و Pahen و Glick ( 1996 ) ان الاوكسينات مهمة جداً في عمليات انقسام الخلايا واستطالتها وتطور المجموع الخضري وزيادة نسبة الكلوروفيل في النبات وتشجيع نمو البراعم الجانبية وهذا ينعكس على الحاصل بالنسبة للنبات. كما وجد Ramazan واخرون ( 2007 ) ان بكتريا الرايزوبيا التي انتجت هرمون النمو IAA ادى الى زيادة التفرعات لاشجار التفاح الحديثة وزيادة النمو والطول لتلك الاشجار اذ زاد طول النبات بمعدل تراوح بين 18.3 – 59.2 % مقارنة بالاشجار التي لم تعامل بالبكتريا. ووجد ايضاً Newaj واخرون ( 2002 ) ان رش الاندول بتراكيز 300 و 600 و 900 ملغم / لتر على اوراق نبات الموز ادى الى زيادة معنوية في طول النبات وعدد التفرعات وعدد الاوراق والوزن الجاف الكلي والمساحة الورقية ومعدل سرعة النمو واعطى التركيز 600 ملغم / لتر زيادة معنوية للقياسات السابقة جميعا مقارنة بالمعاملات الاخرى .

وفي دراسة اجراها El – Nabarawy ( 2001 ) حول تاثيرات منظمات النمو على نسبة الكلوروفيل في أوراق نبات الاگلونيما *( Aglaonema commutatum )* عند وضعه في الظلام اذ لاحظ ان الاوراق بقيت خضراء بعد ان وضعت في الظلام لمدة 16 يوم عند معاملتها بمنظمات النمو حيث تم رشها على النبات بتراكيز تراوحت بين 10 – 30 ملغم / لتر من اندول حامض الخليك وحامض الجبرليك والسايتوكانين ولم تفقد الاوراق ألا 12 % من محتواها من

الكلوروفيل . وقد اشار Rasul ( 1999 ) الى قدرة عزلة بكتريا *Azospirillum* الى انتاج ما يقارب من 35 ملغم IAA / لتر وادى استعماله الى زيادة الوزن الجاف لنبات الرز وكذلك زيادة نسبة الكلوروفيل والمساحة الورقية وارتفاع النبات .اما شاهين ( 2003 ) فقد لاحظ زيادة في طول سيقان نباتات الداليا وكذلك زيادة الافرع الجانبية عند رش النباتات الصغيرة بتراكيز 100 – 200 ملغم / لتر من IAA و GA3 . ووجد Marcos واخرون ( 1994 ) ان منظمات النمو المنتجة من قبل بكتريا الرايزوبيا قد ادت الى زيادة الوزن الجاف لنبات الطماطة وكذلك زيادة التفرعات للنبات ونسبة الكلوروفيل في الاوراق .

**2-1-10 دور منظمات النمو في النو الثمري والحاصل**

تلعب منظمات النمو دورا هاما في النمو الثمري والحاصل ابتداءً من تكوين الازهار وتحديد جنسها وتفتحها وحتى عقد الثمار ونموها وتطورها ومن ثم نضجها ، وكذلك تكوين الثمار العذرية التي تحدث بدون عملية الاخصاب . فقد وجد شاهين ( 2003 ) ان رش نباتات الداليا بتركيز 100 – 200 ملغم / لتر بالاندول والجبرلين مرتين اثناء النمو الخضري ادى الى تبكير الازهار وزيادة عددها وحجمها . كما ذكر Brand و Lindow ( 1998 ) ان استعمال راشح المزرعة لبكتريا *Erwinia herbicola* التي انتجت كميات كبيرة من الاندول رشاً على اشجار الكمثرى والتي رشت بتراكيز الراشح الاصلي في وقت تكوين البراعم الزهرية ادى الى زيادة بلغت 95 % في تفتح الازهار وتقليل نسب تساقط الثمار ، بينما ادى استعمال الراشح المخفف بنسبة 1 : 1 عن طريق خلطه بالماء المقطر المعقم الى تحقيق نسبة 62 % في تفتح الازهار ، كما ادى الى تقليل نسب تساقط الثمار ومعدل نضج متجانس مقارنة مع معاملة السيطرة . ولاحظ Arehana و Particia ( 2004 ) ان البكتريا المعزولة من تورمات في سيقان التوت والتي تنتج هرمون ( IAA ) قد ادى استعمالها للقاحات حيوية الى زيادة نسبة الازهار وعقد الثمار ونضج متجانس للثمار .

في حين وجد Ramzan واخرون ( 2007 ) ان تلقيح اشجار التفاح بواسطة بكتريا الرايزوبيا المنتجة للاندول سبب زيادة انتاج الفاكهة بنسبة تراوحت من 73 – 137 % مقارنة بالاشجار غير الملقحة. كما اشار Loper و Schorth ( 1986 ) الى ان الاندول المنتج بوساطة بكتريا الرايزوبيا والذي عومل به نبات البنجر السكري حفز النبات لتكوين محتوى من السكر بنسبة 20 % اعلى من معاملات المقارنة. ذكر Ann واخرون ( 1999 ) ان بكتريا *Azospirillum* قادرة على انتاج كمية من الاندول ادت الى رفع نسبة عقد الثمار وزيادة الحاصل لبعض اشجار الحمضيات ( البرتقال ) التي تعاني من سقوط كمية من الازهار والثمار حديثة العقد . وفي دراسة قام بها شبانه واخرون ( 1998 ) لمعرفة تاثير منظم النمو NAA

على موعد نضج وصفات ثمار النخيل حيث عوملت ثمار النخيل بتركيز 50 و 100 ملغم / لتر لاشجار نخيل بعمر 8 سنوات فوجد ان كلا التركيزين عملا على تاخير النضج لاكثر من شهرين وخاصة التركيز 100 ملغم / لتر ، كما ادت الى زيادة في الحجم والوزن والجزء اللحمي للثمار ، وذكروا ان التاخير في موعد النضج ذو فائدة اقتصادية اذ يبقى الثمر في مرحلة الرطب الى وقت متاخر من السنة وبذلك يباع باسعار مجزية . علما ان لهرمونات النمو وخاصة الاوكسينات دوراً مهما في انتاج الثمار العذرية وهي الثمار التي تتكون بدون اخصاب للمبيض وبذلك تنتج ثمار بدون بذور ، ويمكن تشجيع انتاج الثمار العذرية عن طريق رش الاوكسينات على النبات ( Arteca 1996 ) .

**2-1-11 تقليل الاثر الضار للملوحة على النبات**

ثبت من خلال الدراسات ان منظمات النمو تقوم بتقليل الاثر الضار للملوحة على النبات ، اذ وجد المشيلح وقواس ( 2003 ) في دراسة تاثير منظمات النمو والملوحة على انبات ونمو بذور الخريزة ( الساليكو رنيا ) ان نسبة الانبات قد انخفضت من 88 الى 26 % عند زيادة تركيز المحلول الملحي من 704 الى 39500 ملغم / لتر الا ان اضافة منظمات النمو ( IAA و GA3 ) ادت الى زيادة الانبات بنسبة تتراوح بين 10 – 15 % كما ادت اضافة هذه المنظمات الى زيادة سرعة الانبات بنسبة 31 % بعد الاسبوع الاول وبنسبة 39% بعد الاسبوع الثاني . كما ذكر سلامة واحمد ( 2005 ) ان منظمات النمو المتمثلة باندول حامض الخليك وحامض الجبرليك والكاينتين ، قد ادت الى تقليل الاثر الضار للملوحة على نباتي الحنطة والفاصوليا اذ رفعت نسبة الانبات ومقياس النمو والسكريات الذائبة التي قلت مع التراكيز العالية من الملوحة .

وفي دراسة اجراها Mayak واخرون ( 2004 ) حول استعمال منظمات النمو التي تنتجها البكتريا واثرها في نبات الطماطة النامية تحت الشد الملحي اذ وجد ان البكتريا المنتجة للاندول IAA قد اعطت زيادة معنوية في الوزن الجاف والطري لنبات الطماطة النامية في تركيز ملحي زاد عن 172 ملي مول من NaCl بالاضافة الى انها زادت من امتصاص الفسفور والبوتاسيوم وكفاءة استعمال الماء .

كما ذكر غروشة واخرون ( 2005 ) ان رش نباتات القمح بمنظمات النمو IAA و GA3 قد اثر تاثيرا واضحا في اختزال الاثر الضار للملوحة على قياسات النمو الخضرية والمتمثلة بطول النبات والمساحة الورقية والمحصول ( وزن السنابل ووزن مئة حبة ) وبعض المكونات الفسيولوجية للنبات النامي تحت تراكيز مختلفة من ملوحة ماء البحر ( 0 – 10 – 30 – 60 % ).

كما لاحظ Abdel – Rahman و Abdel – Hadi ( 1984 ) ان استعمال تراكيز من IAA ( 4 – 51 – 87 ملغم / لتر ) مع نبات البزاليا النامي في تربة ملحية ( 7 دسي سيمينز / م ) قد ادى الى زيادة محتوى الاوراق من الماء وزاد من محتوى الاوراق من النتروجين والفسفور والبوتاسيوم وزاد من طول النبات وعدد الاوراق مقارنة مع معاملة السيطرة التي انخفضت فيها القياسات المذكورة تحت الظروف الملحية. بين Wotik واخرون ( 2005 ) ان استعمال بكتريا *Bacillus* المنتجة لمنظمات النمو مع نبات الطماطة النامية تحت الظروف الملحية ( 4.5 و 7.4 دسي سيمنز / م ) قد ادى الى زيادة محتوى الانسجة من العناصر الغذائية ( NPK ) مقارنة مع معاملة السيطرة ، كما ادى زيادة في نمو الجذور والمجموع الخضري والحاصل .

**2-1-12 تقليل الاصابة بالامراض والحشرات**

وجد من خلال الدراسات التي اجريت على استعمال منظمات النمو ان لها تاثيرات جيدة في تقليل الاصابة بالامراض والحشرات ففي دراسة قام بها خضر ( 2005 ) على نبات البطاطا لمدة ثلاثة سنوات ( 2002 – 2005 ) باستعمال منظمات النمو IAA و GA و CA وتمكن من انتاج درنات بطاطة خالية من الفيروسات. ولاحظ Lindow واخرون ( 1997 ) ان البكتريا المنتجة للاندول النامية كمستعمرات على اغصان واوراق بعض الاشجار قد ساهمت في منع اصابة الثمار بالحشرات الضارة وبذلك استحدث اضافة رواشحها على الاشجار مما سبب ظهور نتائج معنوية في مكافحة الاصابة بالحشرات لاشجار التفاح وتقليل تساقط الازهار والثمار وادى الى تحول اللون الخمري للثمار بوقت متقارب . واشار Agrios ( 1997 ) ان اضافة منظمات النمو الصناعية او المنتجة من قبل النباتات او الاحياء المجهرية تؤدي الى سيطرة بايولوجية على الامراض النباتية والميكروبية والفايروسات.

استطاع Shino واخرون ( 2003 ) من اجراء تطوير وراثي لزيادة قابلية العزلة *Ps.fluorescens* على انتاج IAA من خلال زيادة قابلية العزلة بتحليل السلاسل الجانبية للحامض الاميني التربتوفان ، الامر الذي انعكس على تغير التاثيرات البايولوجية للعزلة ، وقد اوضح الباحث انه يمكن استعمال هذه العزلة في السيطرة البايولوجية لمقاومة الاصابات المرضية . وجد Shikha واخرون ( 2007 ) ان بكتريا العقد الجذرية لها القدرة على انتاج منظمات النمو وسيانيد الهيدروجين ، والتي اظهرت سيادة وسيطرة على فعاليات المجتمع الميكروبي في بيئتها ، اذ تمكنت من تثبيط بعض انواع البكتريا المرضية بنسبة 75 % مقارنة باستعمال المضاد الحيوي ستربتومايسين ، كما ادت الى تقليل تعفن الجذور بدرجة كبيرة بلغت 99 % .

كما وجد Shihui واخرون ( 2007 ) ان استعمال منظم النمو IAA في عملية التغذية الورقية قلل الاصابة بالحشرات التي تصيب الازهار والثمار مما اعطى ازهار متجانسة ونضج متجانس للثمار . وذكر الباحثان Veni و Leveau ( 2005 ) ان البكتريا المنتجة للاندول يمكن استعمالها بتكتيك واسع في معالجة الامراض والحشرات التي تصيب النبات خلال مدة نموه وكذلك تحمل الجذور للتورمات المؤذية التي تصيبها .

## 2 – 2 دور الاحياء المجهرية في انتاج منظمات النمو

تلعب الاحياء المجهرية ( خصوصاً البكتريا ) دوراً هاماً في انتاج منظمات النمو الطبيعية مثل حامض الاندول ( IAA ) . فقد حصل Leveau و Lindow ( 2005 ) على عزلات بكتيرية معزولة من اسطح النباتات لها القدرة على بناء الاندول ( IAA ) ومن هذه العزلات *Ps.putida* التي تتمكن من استعمال الاندول مصدراً كربونياً ونتروجينياً وطاقة ، كما وجد ان لهذه العزلة قدرة على انتاج الاندول في الوسط المجهز بالتربتوفان وكذلك الوسط المدعم بالتربتوفان والكلوكوز ، اذ وصل انتاجها من الاندول 32 ملغم IAA / لتر في نهاية الطور اللوغارتمي غير ان بقاء خلايا المزرعة بعد 72 ساعة ادى الى تحلل اكثر من 75 % من الاندول الى مركبات اخرى . كما ادى استعمال الراشح الذي يحتوي على الاندول مع خلايا البكتريا الى تطور واضح في جذور النباتات مقارنة بمعاملات السيطرة التي استعمل فيها ثلاثة تراكيز من الاندول الصناعي وهي 1 و 2 و 3 ملي مول /لتر. وكان Patten و Glick ( 2002 ) قد درسا دور الاندول الناتج من بكتريا *Ps.putida* في تطور نظام جذور النبات وبين ان نباتات عديدة توافق البكتريا في تطبيع وانتاج الاندول ، ولاحظ ان انتاج الاندول بواسطة البكتريا الضوئية المرضية تأخذ مسار رئيسي هو Indole – Pyruvic acid والذي يكون ضمن مسار تكوينه في النبات وعد انزيم دي كاربوكسيليز هو المفتاح لبدء هذا المسار ( IPA ) وعند ازالتة من بكتريا *Ps.putida* بطفرة لم تعد قادرة على انتاج الاندول في الوسط ، وادى استعمال راشح المزرعة غير المطفرة الى زيادة في طول الجذور بنسبة تراوحت بين 35 – 50 % مقارنة بمعاملة راشح العزلة المطفرة ، مما يؤكد ان لمركب الاندول في الراشح دوراً مهماً في تطور نظام الجذر.

وفي دراسة للباسط وجماعته ( 2006 ) تم عزل وانتخاب سلالات محلية عالية الكفاءة من بكتريا *Rhizobium* و *Azotobacter* و *Azospirillum* لاستخدامها كاسمده حيوية لنبات الباقلاء والقمح اذ انتخبت ( 15 ) عزلة من هذه المجاميع كانت كفائتها عالية في انتاج منظمات النمو IAA و IBA و GA3 والتي تعتبر من منظمات النمو المهمة للنبات ، كما

كان لهذه العزلات دوراً مهماً في نشاط انزيم النايتروجينيز. وذكر Jong واخرون ( 2003 ) 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 . وذكر Shikha واخرون ( 2007 ) ان بكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات *Mirnosa pudica* تمكنت من انتاج 24 ملغم / لتر من IAA ووجد Brand و Lindow (1998) ان بكتريا *Erwinia herbicola* انتجت كميات كبيرة من IAA في الوسط الزرعي المجهز بالتربتوفان بلغ 92 ملغم / لتر بحيث ان استعمال هذا التركيز بدون تخفيف ادى الى تثبيط الانبات وسرعة النمو وطول الجذير والبادرة لنبات الفاصوليا .

واستطاع Fauzia واخرون ( 2006 ) من عزل 70 عزلة لبكتريا الرايزوبيا من مواقع مختلفة من البرازيل واندنوسيا ومنغوليا والباكستان كان معظمها منتجاً للاندول وبتراكيز تراوحت بين 0.8 الى 42.1 ملغم IAA / لتر. وفي دراسة قام بها Ahmad واخرون ( 2005 ) على عزلات *Azotobacter* و *Pseudomonas* المنتجة للاندول اتضح ان انتاجها كان مرتبطاً بكمية التربتوفان في الوسط وتراوح الانتاج لكلا العزلتين بين 1.47 – 11.88 ملغم IAA / لتر في حالة عدم وجود التربتوفان في الوسط في حين بلغ 32.8 – 53.2 ملغم IAA / لتر بوجود 5 ملغم تربتوفان / مل في الوسط . ووصل الانتاج الذي حصل عليه Datta و Basu ( 1998 ) الى 190 ملغم / لتر بواسطة بكتريا الرايزوبيا بوجود التربتوفان في الوسط إضافة الى اللاكتوز وحامض الكلوتامك .

## 2- 3 العوامل المؤثرة في انتاج منظمات النمو من قبل الاحياء المجهرية

### 2-3-1 نوع وتركيز المصدر الكربوني

يعد المصدر الكاربوني من اهم العوامل التي تؤثر في عملية انتاج الاندول وان اختيار المصدر الملائم على اساس كلفة المواد الاولية ومعاملة المادة ومتطلباتها التي تؤثر في كلفة الانتاج من الامور المهمة في انتاج الاندول. ونتيجة لاختلاف الطبيعة التغذوية للاحياء المجهرية تعد نوع المصدر الكربوني وتركيزه اهمية كبيرة في انتاج منظمات النمو وخاصة حامض الاندول ( IAA ) الذي يعتمد تكوينه على ايض الحامض الاميني التربتوفان. وبذلك فان وجود هذا الحامض الاميني في المصدر الكربوني بتراكيز معينة ومناسبة هو الذي يحدد

استعماله لانتاج حامض الاندول ( IAA ) ، فقد وجد Bonner ( 1933 ) بان نوع من الفطريات يزيد في انتاجه للاوكسين الطبيعي اذا ما نمي في وسط يحتوي على الببتون وكانت هذه الزيادة في الانتاج قد اتت من خلال اكسدة الاحماض الامينية للببتون .

بعدها اوضح Thimann ( 1935 ) بان بعض الفطريات يمكنها تحويل الحامض الاميني التربتوفان الى ( IAA ) ولا زال التربتوفان يعتبر المنشأ الاول لحامض الاندول ( IAA ) اذ ذكر Jan ( 1991 ) ان التربتوفان حامض اميني اساسي في انتاج ( IAA ) ويتواجد هذا الحامض الاميني في كثير من المواد مثل الحليب والموز وبذور النباتات البقولية.

وقد ذكر Robinson واخرون( 1998 ) ان نوع من الفطريات النامية في حقول الفاصوليا تنتج كميات من الاندول وعند تنمية هذه الفطريات على وسط حاوي على التربتوفان ( L.Tryp.) قد زاد انتاجها من الاندول ( IAA ) بازدياد تراكيز التربتوفان ولغاية 1.0 ملغم Try / لتر . كما تمكن الباحثان Basu و Ghosh ( 2002 ) من عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لاحد النباتات البقولية ونميت في وسط يحتوي على المانيتول و $KNO_3$ كوسط كربوني ونتروجيني على التوالي ، اذ انتجت البكتريا كمية من الاندول بلغت 22.3 ملغم / لتر عند تجهيز الوسط L.tryptophan ، تحقق افضل انتاج بزيادة 27.08 % عند تجهيز الوسط بـ 1.0 % وزن / حجم من المانيتول و 0.02 % وزن / حجم من الحامض الاميني الاسبرجين و 1.0 مايكروغم / مل من البايوتين بالاضافة الى 2.5 ملغم / مل وسط من الحامض الاميني التربتوفان.

كما اشار Kittell واخرون ( 1989 ) الى ان انتاج الاندول البكتيري قد ارتفع باستعمال التربتوفان وان تصنيع الاندول يمر بمركبات وسطية مشتقة من ايض التربتوفان بوساطة نشاط الانزيمات الناقلة الاروماتية مع بكتريا *R.meliloti* ، وثبت ان اربع بروتينات اروماتية ناقلة تؤلف قاعدة تستعمل لانتاج تربتوفان الاحماض الامينية الاروماتية ، هي احماض الفينيل والالنين والتايروسين وكذلك الاسبارتين ، وذكروا ان انتاج البكتريا للاندول يمكن ان يتم دون تواجد هذه الاحماض ، ولكن ضمن الحدود الدنيا لكنه يزداد كثيراً ويتضاعف مع وجود مستويات من هذه الاحماض. وجد Jong واخرون ( 2003 ) ان تجهيز الوسط بالتربتوفان والكلوكوز قد ادى الى تحسن انتاج الاندول من قبل بكتريا *Ps.putida* باستعمال معاملات للوسط جهز فيها التربتوفان بمعدل 0 و 50 و 100 و 200 ملغم / لتر والكلوكوز بمعدل 0 و 0.5 و 1.0 و 2.5 و 10 ملغم / لتر وقد كان لزيادة معدل التربتوفان والكلوكوز اثرا كبيرا في زيادة انتاج الاندول من قبل البكتريا وبلغ اعلى معدل انتاج عند تركيز 200 ملغم / لتر تربتوفان و 10 ملغم / لتر كلوكوز اذ بلغ الانتاج 45 ملغم IAA / لتر بعد 48 ساعة من الحضن.

ولاحظ Maria واخرون ( 2000 ) 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 . وجد Leveau و Lindow ( 2005 ) 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 .

واشار Basu ( 1996 ) الى ان العقد الجذرية المتكونة في جذور نبات البزاليا تحتوي كميات عالية من IAA و $GA_3$ و CK في حالة تواجد التربتوفان في الوسط بكميات كبيرة وتقل هذه المنظمات كلما قل تواجد التربتوفان ، كما ذكر Cheryl و Bernard ( 2002 ) ان انتاج الاندول بواسطة بكتريا *Ps.pudita* يأخذ مسار رئيسي هو Indole – pyrufic acid والذي يكون ضمن مسار تكوينه في النبات ، وقد عد انزيم decarboxylase هو المفتاح لبدء هذا المسار وعند ازالته بطفرة من البكتريا فانها لم تعد قادرة على انتاج الاندول في الوسط . وقد وجدوا ان انتاج الاندول بوساطة هذه البكتريا قد زاد ليصل الى 26.3 ملغم / لتر عند تدعيم الوسط بالمرق المغذي ( N.B ) مقارنة مع معاملة السيطرة اذ كان الانتاج 19.6 ملغم / لتر.

وقد اشار Shihui واخرون ( 2007 ) الى ان المسارات البايوكيميائية لانتاج الاندول باستعمال بكتريا *E.chrysanthemi* يتم بتحويل التربتوفان عن طريق المسار Indolactamide ( IAM ) والذي يتم بسيطرة جينات متواجدة في البلازميد ، كذلك تتم عملية انتاج IAA عن طريق المسار الثانوي اندول بايروفيك ( Indole pyrofic ) وهو المسار الحيوي الذي يتم بسيطرة الجين المحمول على الكروموسوم ( DNA ) انتجت كميات عالية تصل الى 162 ملغم IAA / لتر في الوسط المجهز 0.5 غم تربتوفان / لتر خلال 48 ساعة حضن. وتمكن Datta و Basu ( 1997 ) من زيادة انتاج الاندول بنسبة 31.5 % بواسطة بكتريا الرايزوبيا عندما جهز الوسط بنسبة 1% من اللاكتوز و 0.001 % $NiCl_2$ و 0.4 % حامض الگلوماتيك ( glumatic acid ) و 3 ملغم / لتر تربتوفان.

### 2-3-2 تأثير نوع الكائن المجهري وكثافته في انتاج IAA

تختلف الكائنات الحية الدقيقة في قابليتها على انتاج حامض الاندول IAA فمنها مالا تستطيع انتاج هذا المركب ومنها ما تنتجه حسب نوع الكائن الحي وكثافته في الوسط . ففي دراسة اجراها الباسط واخرون ( 2006 ) لانتخاب اكفأ العزلات من بكتريا *Rhizobium* وبكتريا *Azospirillum* وبكتريا *Azotobacter spp* في انتاج حامض الاندول ونشاط انزيم النتروجيز

، فوجدوا ان بكتريا الرايزوبيا عموماً كانت اكثر كفاءة في نشاط انزيم النتروجيز وانتاج منظم النمو ، وكانت افضل عزلة فيها $R.z_{11}$ في حين كانت العزلة *As.zl* اكفأ العزلات بالنسبة لبكتريا *Azospirillum* والعزلة $ZH_{21}$ بالنسبة لبكتريا الازوتوبكتر.

وفي دراسة قام بها Zakira واخرون ( 2005 ) على ثلاثون عزلة من *Rhizobacteria* عزلت من مواقع ترب مختلفة في الباكستان واندنوسيا وتبين انها ذات قابليات مختلفة في انتاج منظم النمو ( IAA ) وتثبيت النتروجين واذابة مركبات الفسفور ، اذ كانت اغلب هذه العزلات تنتج منظم النمو ( IAA ) وتميزت العزلة PS.fulgida بافضل انتاج IAA وفي تثبيت النتروجين . اما الدراسة التي قام بها Maria واخرون ( 2000 ) على سلالات مختلفة من *A.chtoococcum* و *A.vinelandii* و *Ps.qeruginose* و *Ps.putida* و *Ps.serratia* و *K.pneumoniae* والتي حصل عليها من ترب مختلفة من كولومبيا كانت مزروعة بالرز او ضحت ان انتاج منظم النمو ( IAA ) من قبل هذه السلالات اختلف كثيراً وتراوح الانتاج من ( 3.5 – 32.2 ) ملغم IAA / مل وتحقق اعلى انتاج بواسطة *A.vinelandii* اذ تراوحت بين ( 32.2 – 21.2 ) ملغم / مل ثم *A.chtoococcum* وكانت بين ( 32.2 – 16.1 ) ملغم / مل تلتها *Ps.putida* بين ( 28.7 – 14.8 ) ملغم / مل ثم *Ps.qeruginose* فكان 21.2 ملغم / مل واخيراً *K.pneumoniae* بلغ انتاجها 15.2 ملغم / مل. وقد تمكن Sumera واخرون ( 2004 ) من عزل 12 عزلة بكتيرية من مواقع مختلفة من 4 ترب من مزارع الرز في تنزانيا تختلف في قدرتها على انتاج مركب الاندول اذ تمكنت 9 عزلات من انتاج الاندول بمعدل تراوح بين ( 20 – 90 ملغم / لتر ) وقد تميزت عزلتين بالانتاج الاعلى وهما *Bacillus sp.* و *Azo spirillum* . كما تمكنت Fauzia واخرون ( 2006 ) من عزل 70 عزلة من بكتريا *Rhizobacteria* من مواقع ترب مختلفة في البرازيل واندنوسيا ومنغوليا والباكستان تميزت بانتاجها تراكيز مختلفة من منظم النمو ( IAA ) تراوح بين ( 0.8 – 42.1 ملغم / لتر ) وقد اظهرت العزلة التي تعود *Bacillus pumilus* باعلى قابلية لانتاج الاندول اذ بلغ 42.1 ملغم / لتر . واستطاع Almonacid واخرون ( 2000 ) من انتخاب ثلاثة عزلات منتجة للاندول من مجموع 106 عزلة حصل عليها من التربة وكانت العزلات المنتجة هي *Bacillus cereus* و *Ps.putido* و *Chrococcum* و *Azotobacter* وكانت انتاجها من الاندول ( IAA ) 7.41 و 4.5 و 1.38 ملغم / لتر على التوالي .

وذكر Sanjay و Jeffery ( 1999 ) ان افضل كثافة مكروبية لبكتريا *Lactobacillus* لانتاج اعلى تركيز من منظم النمو IAA كانت $10^7$ cfu /ml واكد Kundu و Gaur (1980 ) ان اضافة اللقاحات البكتيرية بكثافة عالية تضمن الاستيطان الميكروبي

خاصة عند استعمال اللقاح للعقد الجذرية والبكتريا المذيبة للفوسفات وأوضح Lindeman و Ham ( 1979 ) ان كثافة الرايزوبيا النشطة تساعد على تحقيق الاصابة لجذور النبات مبكراً مما يزيد من عدد العقد الجذرية الفعالة.

وقد وجد Brandl و Lindow ( 1998 ) ان استخدام لقاح عزلة البكتريا *Erwinia herbicola* اعطى انتاج عالي من الاندول عند استعماله بمعدل $5 \times 10^7$ cfu / ml. كما اشار Abd – el Malek واخرون ( 1967 ) ان الكثافة الميكروبية تعد من العوامل المهمة المؤثرة على الكمية المثبتة من النتروجين حيويا وكانت افضل كثافة للتثبيت هي $10^6$ /ml cfu .

**2-3-3 تأثير التهوية وسرعة التحريك في انتاج الاندول ( IAA )**

غالباً ما تعاني الخلايا الغاطسة في المزرعة السائلة نقصاً في الاوكسجين باستمرار النمو ويتوضح النقص مع زيادة ايض السكر من قبل الخلايا العائمة فوق السطح عما يوجد داخل السائل ، وتعد طريقة استعمال الهزاز الحل النموذجي لذلك اذ انه يقوم بتوزيع مكونات الوسط في كل اتجاه ويزداد معدل نمو الخلايا وتعوض عملية سرعة التحريك احياناً عن عملية تهوية المزرعة ( Bohlman واخرون 1998 ). وان عملية التهوية والتحريك المناسبة تكون ضرورية للنمو الامثل. وتختلف الاحتياجات من كائن مجهري لاخر وحسب طبيعة نموه وحجم الكتلة الحيوية التي يكونها في الوسط والغرض من العملية الانتاجية لذلك فأنه من الضروري تزويد المزرعة بالاوكسجين بصورة مستمرة خصوصاً بالنسبة للعمليات الانتاجية التي تتطلب نسبة مرتفعة من الاوكسجين الذائب في الوسط مثل انتاج الاحماض ( الخفاجي 1990 ) . واشار Rudy واخرون ( 2004 ) الى زيادة انتاج البكتريا من الاندول عند سرعة تحريك 200 د / د في درجة حرارة 28ْ م ، مقارنة مع معاملة السيطرة كما ذكر Maria واخرون ( 2000 ) ان افضل سرعة تحريك لانتاج الاندول كانت 200 د / د كما ان جميع سرع التحريك المستعملة 100 و 150 و 250 قد تفوقت على معاملة السيطرة وهذا ما حصل عليه ايضاً Shihui واخرون ( 2007 ).

**2-3-4 تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج الاندول**

يعتبر الرقم الهيدروجيني احد المعايير المؤثرة على الفعالية الانزيمية ويظهر انه من العوامل البيئية الرئيسية التي تنظم عملية انتاج الاندول فاذا علمنا ان معظم انواع البكتريا تنشط عند الرقم الهيدروجيني المتعادل الذي يتراوح بين 6.0 – 8.0 وبالتالي فأن انتاج الاندول من قبل البكتريا سيكون افضل ضمن هذا المدى من الرقم الهيدروجيني الذي يوافق قمة نشاط البكتريا فقد

وجد Sanjay و Jeffery ( 1999 ) ان افضل رقم هيدروجيني لبكتريا *Lactobacillus* في انتاج الاندول كانت 6.5 كما ذكر Sumera واخرون ( 2004 ) عند اختبار 12 عزلة بكتيرية لانتاج الاندول ان هناك مدى واسع للرقم الهيدروجيني يمكن للبكتريا ان تنتج عنده الاندول وتراوح بين ( 4 – 8.5 ) وكان الافضل للعزلة *Azospirillum sp.* اذ بلغ معدل انتاجها 90 ملغم / لتر عند رقم هيدروجيني 7.0 .

كما وجد Jinichiro واخرون ( 1991 ) ان افضل نشاط لانزيم Indole pyruvate decarboxylase المسؤول عن تكوين IAA في راشح المزرعة *Enterobactercloaceae* كان عند رقم 6.5 – 7 . كما يعتبر الرقم الهيدروجيني للوسط او درجة تفاعل التربة عاملاً مهماً في احداث اصابة البكتريا للمجموع الجذري وفعالية الاحياء ، اذ اشار Graham واخرون ( 1994 ) ان مدى قدرة الرايزوبيا على تحمل مستويات معينة من الرقم الهيدروجيني يعتمد على قابليتها في المحافظة على الرقم الهيدروجيني داخل خلاياها والذي يتراوح بين ( 7.2 – 7.5 ) .

**2-3-5 مدة الحضن وتأثيرها في انتاج الاندول**

تعد مدة الحضن من العوامل المهمة والمؤثرة في انتاج الاندول بوساطة البكتريا وهذا محدد بالمدة التي تصل فيها البكتريا لاقصى مراحل النشاط والانتاج ، علماً ان مدة الحضن تكون مرتبطة بعوامل اخرى اهمها الكثافة المكروبية في الوسط وتوفر المصدر الغذائي للبكتريا ، فقد تمكن Ghosh و Basu ( 2002 ) من عزل بكتريا الرايزوبيا وتنميتها في وسط حاوي على التربتوفان فوصل اعلى انتاج لها 22.3 ملغم / لتر بعد 20 ساعة اذ دخلت البكتريا طور الانتاج او الاستقرار. واشار التقرير المقدم من قبل Jan ( 2000 ) ان بعض العزلات البكتيرية تنتج كميات من التربتوفان وهو الحامض الاميني الاساس في تكوين منظم النمو ( IAA ) في مراحل طور التطبع ، ثم لايلبث ان يستهلك في المسارات الحيوية لانقسام وتكاثر البكتريا في الطور اللوغارتمي. ووجد Shihui ( 2007 ) ان بكتريا من نوع 3937 – *E.chryssanthemi* انتج بواسطتها كميات عالية من الاندول وصلت 162 ملغم/لتر بعد 48 ساعة حضن .

في حين وجد Cheryl و Bernard ( 2002 ) ان بكتريا *Ps.putida* يزداد انتاجها من IAA عند اجراء عملية تكسير للخلايا خلال 42 ساعة ليصل الى 100 ملغم / لتر. وقد ذكر Johan و Steven ( 2005 ) ان بكتريا *Ps.putida* يصل انتاجها من الاندول 32 ملغم IAA / لتر نهاية الطور اللوغارتمي ، الا ان بقاء خلايا المزرعة بعد 72 ساعة ادى الى تحلل

اكثر من 25 % من الاندول الى مركبات اخرى ، ووجد ارتباطاً معنوياً بين كتلة الاحياء المجهرية في الوسط بعد 72 ساعة وكمية الاندول المحللة.

كما وجد Jinichiro واخرون ( 1991 ) ان بكتريا *EnterobacterCloaceae* التي وصل انتاجها من الاندول 36 ملغم IAA / لتر قد تكون 95 % منه بين 20 – 40 ساعة من الحضن. اما Maria واخرون ( 2000 ) فقد وجدوا ان بكتريا *A.vinelandii* قد انتجت 32.2 ملغم IAA / لتر وكان معظم انتاجها بعد 40 – 50 ساعة من الحضن . واشار Rudy واخرون ( 2004 ) ان بكتريا *Bacillus* انتجت كميات كبيرة من الاندول وصلت الى 38.5 ملغم IAA / لتر بوجود L – Trp بعد 72 ساعة من الحضن وفي حالة عدم تجهيز الوسط بالتربتوفان فان اعلى انتاج لها وصل الى 22.6 ملغم IAA / لتر بعد 48 ساعة حضن .

### 2-3-6 تأثير الملوحة في انتاج IAA

تتأثر الاحياء المجهرية ومنها البكتريا بالملوحة فكلما زادت ملوحة التربة كان لها تأثير سلبي على بعض انوع الاحياء المجهرية بصورة عامة ويمكن القول ان البكتريا تتباين في تحملها للملوحة ويمكن ان تتحمل تراكيز عالية من الملوحة نوعاً ما قد تصل الى 8 ديسي سيمينز. م $^{-1}$. فقد وجد حسن ( 2004 ) ان بكتريا العقد الجذرية المتخصصة على نبات الماش انخفض عددها بزيادة مستويات الملوحة وكان اقل معدل لكثافتها عند 9 ديسي سيمينز. م $^{-1}$ كما وجد Abd – Alla ( 1995 ) ارتباطاً سلبي معنوي بين نشاط البكتريا . وتركيز كلوريد الصوديوم في التربة ضمن مستوى ملحي من 0 – 32 ديسي سيمينز. م $^{-1}$ . واوضح Samira ( 2002 ) ان نمو بكتريا الرايزوبيا كان له علاقة عكسية مع زيادة تركيز كلوريد الصوديوم اذ انخفض نموها مع زيادة تركيز الملح ، وان النمو البكتيري كان اكثر غزارة عند التراكيز المنخفضة التي تراوحت بين 0.52 – 1.25 ديسي سيميز. م $^{-1}$ . بين El – shinnawi واخرون ( 1997 ) ان ان اعداد بكتريا الرايزوبيا كانت منخفضة في ترب معقمة ملقحة بالرايزوبيا واضيف لها كلوريد الصوديوم بتركيز 200 ملي مول مقارنة مع نفس التربة غير المضاف لها ذلك الملح .

ولاحظ Sumera واخرون ( 2004 ) ان 12 عزلة من البكتريا المعزولة من 4 مواقع لترب حقول الرز في تنزانيا انها تحملت تركيز ملحي وصل لحد 200 ملي مول ، الا ان نمو البكتريا ونشاطها وانتاجها للاندول قد ازداد مع انخفاض التراكيز الملحية ، ففي الوقت الذي كان انتاجها للاندول 20 ملغم / لتر عند التراكيز الملحية العالية الا انه زاد حتى وصل الى 90 ملغم / لتر في التراكيز المنخفضة ( 20 ملي مول ) . وذكر Wotike واخرون ( 2005 ) ان زيادة ملوحة التربة من 2 ديسي سيميز.م$^{-1}$ الى 5.4 و 7.4 ديسي سيميز. م $^{-1}$ ادى الى تقليل

انتاج منظم النمو IAA من قبل البكتريا كما ادى الى تقليل الحاصل ، لنبات الطماطة وان استخدام بكتريا *B.subtilis* قد ادى الى تقليل الاثر الضار للملوحة على النبات ورفع كمية الحاصل وعزى ذلك الى قدرة البكتريا لانتاج منظم النمو ( IAA ) .

وقد وجد Mayak واخرون ( 2004 ) ان بكتريا الرايزوبيا قللت التأثيرات الضارة لزيادة الملوحة في التربة التي تصل الى 172 ملي مول عن طريق انتاجها لمنظمات النمو IAA و GA3 الا ان الانتاج عموماً قل بوجود الاملاح وان الاملاح قللت من انتاج البكتريا لمنظمات النمو في المستويات العالية من الملوحة ، في حين لم تتأثر كثيراً بالمستويات الواطئة من الملوحة ( 43 ملي مول ) . وفي دراسة اجراها شرف واخرون ( 2006 ) لبحث اثر تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم ( 0.5 – 14 % ) على نمو ثلاثة سلالات من بكتريا الرايزوبيا التي لقح بها نبات فول الصويا والتي اظهرت نتائجها ان سلالتان من بكتريا الرايزوبيا وهي $uf_{201}$ ، $uf_{305}$ المستخدمة قد تحملت تراكيز عالية من كلوريد الصوديوم وصلت الى 10 – 12 % انعكس تأثير ذلك على نمو نبات فول الصويا في التربة الملحية اذ ادت السلالتان الى زيادة ملحوظة في النمو والعقد الجذرية وانتاج الاندول مقارنة مع النباتات التي لم تلقح بهاتان السلالتان ، في حين اظهرت السلالة الثالثة وهي $uf_{404}$ عدم فعاليتها في الترب الملحية نتيجة انخفاض كثافتها الميكروبية ومعدل انتاج الاندول وقدرتها في تكوينها للعقد الجذرية وتثبيت النتروجين مما انعكس على انتاجية النباتات الملقحة بهذه السلالة. واشار النعيمي ( 1998 ) ان عزلات بكتريا الرايزوبيا قد اختلفت في قدراتها على النمو في الوسط الزرعي السائل لمستخلص الخميرة – المانيتول الا ان اعدادها قد انخفضت مع زيادة التراكيز الملحية وبمرور مدد الحضن .

كما ذكرت القيسي ( 2005 ) ان زيادة مستوى الملوحة في الوسط الزرعي (YEM) السائل من (1.05– 8.54 ) ديسي سيميز.م $^{-1}$ قد اثر تأثيراً معنوياً في خفض كثافة نمو البكتريا العقدية وبنسبة تزيد على 70 % قد اختلفت العزلات البكتيرية ايضاً في قدرتها لتحمل الملوحة . وتبين ان الملوحة العالية في التربة تسببت في تقليل اعداد البكتريا العقدية من خلال تأثيرها في مجمل الفعاليات الفسيولوجية للنبات ، او خفض كفاءة البكتريا في اقامة العلاقة التعايشية مع النبات العائل بالاضافة الى تاثيرها في قلة انتشار المجموع الجذري مما قلل من احتمال تكوين العقد الجذرية على جذور النبات .

### 2-3-7 تأثير المادة العضوية في انتاج منظمات النمو في التربة

ان كثافة اعداد البكتريا وكتلتها في التربة تتناسب طرديا مع محتواها من المادة العضوية فالتربة الغنية بالدبال تحتوي اعدادا كبيرة من البكتريا على افتراض ملائمة العوامل الاخرى لنموها

، وعليه فان اضافة المواد الكربونية بانواع مخلفات عضوية نباتية او حيوانية سيكون لها تاثير ايجابي في زيادة اعداد البكتريا في التربة ، لذلك فان سبب زيادة اعداد الخلايا البكتيرية في الافاق السطحية من التربة والمتمثلة بطبقة الرايزوسفير يرجع الى نسبة المادة العضوية في هذه الطبقة ، والتي مصدرها بقايا النباتات او الحيوانات وكذلك افرازات الجذور للنباتات النامية من الاحماض العضوية ومنظمات النمو ، واكدت العديد من الدراسات على تحولات المادة العضوية بواسطة الاحياء المجهرية والمركبات الناتجة من تحلل هذه المادة فقد وجد كل من Yahya واخرون ( 1989 ) و Negi واخرون ( 1987 ) و Bashan ( 1999 ) عدم جدوى استعمال اللقاحات الميكروبية وحدها ما لم تكن التربة غنية بالمواد العضوية وتوصلوا الى ان التربة التي يقل محتواها من المواد العضوية عن 1.7 % يتطلب تجهيزها بمصدر عضوي لضمان نشاط الاحياء المجهرية حرة المعيشة سواء المثبتة للنتروجين او المذيبة لمركبات الفوسفات ولا سيما مع النباتات المسمدة بالصخر الفوسفاتي الذي لا يؤدي الى نتائج ايجابية مالم تجهز التربة بمصدر عضوي ليستعمل مصدر طاقة للميكروبات ليصل عددها بحدود ( $10^6 - 10^8$ ) وحدة تكوين مستعمرة / غم لضمان اداء نشاطها بنجاح . ووجد Vora و Shelat ( 1999 ) حصول زيادة في كمية الانتاج ومكونات الحاصل للنباتات المسمدة بالصخر الفوسفاتي والمجهزة بمصادر كاربونية ونيتروجينية مختلفة التي ازدادت في سرعة تحللها اعتماداً على نسبة C / N في المصدر العضوي المستعمل ، وبينوا ان افضل المصادر الكاربونية المستعملة الكلوكوز والسكروز والفركتوز .

واكد الراشدي ( 1988 ) ان هبوط النشاط المكروبي في الترب الكلسية يأتي من انخفاض محتواها من المواد العضوية ، بسبب ظروف الجفاف وقلة الغطاء النباتي وارتفاع درجة الحرارة . وتوصل Manna واخرون ( 2001 ) من خلال استخدام اللقاحات البكتيرية في دورة زراعة محصول الحنطة وفول الصويا الى انه يجب ان لاتقل نسبة C / N في المادة العضوية عن معدل يتراوح بين ( 2 : 8 الى 7 : 21 ) لضمان نشاط ودور اللقاحات في توفير العناصر الغذائية للنبات . لقد وجد Szajdak واخرون ( 2005 ) ان اضافة مخلفات المزرعة ( FYM ) الى التربة ولمدة طويلة ادى الى زيادة اعداد البكتريا في التربة وزاد اثره في انتاج منظم النمو ( IAA ) ، اذ بلغ الانتاج منه 26.96 ملغم IAA / لتر مقارنة مع معاملة السيطرة التي لم تتجاوز 10.5 ملغم IAA / لتر ، مما نتج عن استعماله زيادة في حاصل كل من البطاطا والحنطة والشعير المزروعة في تلك التربة ، وذكروا ان اعلى تواجد للبكتريا وانتاج للاندول وجد في الافق A لتربة الغابات التي تميزت بمحتواها العالي من المادة العضوية والتي بلغ معدل انتاج الاندول فيها 39.17 ملغم IAA / لتر .

كما وجد Marcos واخرون ( 1994 ) ان خلط مخلفات الابقار والدواجن والبتموس مع التربة ادى الى زيادة اعداد الاصابات المجهرية في التربة وزيادة انتاج الاندول من 23.6 ملغم IAA / لتر في معاملة السيطرة الى 41.7 ملغم IAA / لتر ، والذي انعكس على زيادة الفسفور الذائب وانتاج مركبات Siderophore وكذلك زيادة الوزن الجاف للمجموع الجذري والخضري حاصل نبات الطماطة .

و اشار Fayez واخرون ( 1991 ) الى ان اضافة الوسط الزرعي السائل (YEM ) خلاصة خميرة المانيتول الى التربة يؤدي الى تحفيز نمو البكتريا العقدية واصابة الجذور وتكوين العقد الجذرية . وذكر Mahmoud واخرون ( 1984 ) ان الافرازات الجذرية التي تتغير بشكل واضح اثناء نمو النبات تؤثر في عدد البكتريا ، واوضح ان التربة التي تحتوي على اعداد اكبر من البكتريا يرتبط تواجدها بتوفر المواد العضوية في منطقة الرايزوسفير ، كما اكد ذلك من قبل Saber واخرون ( 1977 ) الذين اوضحوا ان خصوبة التربة ومحتواها من المادة العضوية تؤثر بشكل كبير على كثافة البكتريا التي يمكن ان تحصل على احسن فعالية من خلال توفير بيئة ملائمة لنشاطها في التربة .

**2-3-8 تأثير درجة الحرارة في انتاج منظمات النمو البكتيري**

تتحكم درجات الحرارة في جميع العمليات الحيوية وهي من العوامل الاساسية التي تؤثر على البكتريا ونموها ونشاطها ، ولكل نوع من البكتريا درجة حرارة مثلى للنمو ومدى حراري اذ يقل أو يتوقف النشاط الحيوي خارج هذا النطاق . وتقع معظم بكتريا التربة ضمن المدى الحراري المتوسط ، وقد يتحقق افضل نشاط لها بين 25 – 35ْ م لكنها يمكن ان تنمو في نطاق حراري بين ( 15 – 45ْ م ) فقد ذكر Santos واخرون ( 1999 ) ان درجة الحرارة تؤثر في جميع مراحل قيام العلاقة التعايشية ونمو بكتريا الرايزوبيا وبقائها في التربة قبل اصابتها للعائل النباتي . كما وجد Hungria و Franco ( 1993 ) ان هناك انخفاض في محفزات جينات التعقد في جذور نباتات فول الصويا والفاصوليا عند درجة حرارة 39ْ م وفي حالة تكون العقد فان درجة الحرارة المرتفعة تؤثر على وظيفة العقد المتضمنة اختزال بناء الهيموكلوبين البقولي ( Leghamo – globin ) ، لذلك يعد البحث عن سلالات نامية في تربة ذات درجات حرارية مرتفعة مهما في الحصول على عزلات متحملة للحرارة وقادرة على احداث الاصابة عند استعمالها لقاحاً حيوياً ، وهذا ما حصل عليه Hungria و vargas ( 2000 ) عندما قاما بتلقيح نبات فول الصويا والفاصوليا بمثل هذه العزلات . كما بينت الدراسة التي قام بها Santck و mirc ( 1995 ) ان بكتريا الازوتوبكتر قادرة على تثبيت النتروجين بشكل جيد في درجة حرارة 30ْ م ، في حين ان تعرضها لدرجة حرارة 20 مْ فانها تقوم بتكوين

الحويصلات ( Cysts ) بشكل كثيف والتي تعد شكلاً من اشكال المحافظة على كفاءة الازوتوبكتر بتوفير مصادر طاقة احتياطية في عملية تثبيت النتروجين الجوي تحت ظروف الحرارة غير الملائمة نوعاً ما .

ولاحظ Sznjay و Jeffery ( 1999 ) ان افضل انتاج لبكتريا *Lactobacillas* من IAA كان في درجة حرارة 30ْ م اذ بلغ 26.5 ملغم IAA / لتر انخفض الانتاج قليلاً بارتفاع درجة الحرارة الى 37 ْم . وفي دراسة اجراها Sumera واخرون ( 2004 ) حول مدى تحمل 12 عزلة بكتيرية لدرجات حرارية تراوحت بين ( 10 – 40ْ م ) اذ تمكنت 9 عزلات بكتيرية من انتاج الاندول بمعدل تراوح من ( 20 – 90 ) ملغم IAA / لتر وكان الانتاج الامثل قد حصل في درجات حرارة بين ( 28 – 32ْ م ) . ووجد Jinichiro واخرون ( 1991 ) ان الانزيم المسؤول عن تكوين اندول حامض الخليك في راشح المزرعة لبكتريا *Enterobacter cloaceae* هو انزيم ( Indolepyruvate decarboxylase ) الذي يقاوم ارتفاع درجة حرارة الوسط ، الا ان افضل نشاط لهذا الانزيم تحقق في درجة حرارة ( 28 – 30ْ م ) اذ تم الحصول على اعلى انتاج بلغ 36 ملغم IAA / لتر .

اما Shihui واخرون ( 2007 ) الذين حصلوا على انتاج عالي جداً من الاندول وصل الى 162 ملغم IAA / لتر عند تحضين على درجة حرارة 30ْ م الا ان هذا التركيز العالي من الاندول كان مثبطاً لنمو جذور كثير من النباتات العشبية.

**2-3-9 تأثير تدعيم الوسط بالنتروجين في انتاج الاندول**

تحتاج اغلب الاحياء المجهرية الى وجود احد المركبات النتروجينية في الوسط باعتباره ضروريا لنموها اذ ان اهميته لا تقتصر فقط على العمليات الايضية ، وانما يعتبر جزءاً اساسيا يدخل في تكوين بروتينات الخلية والاحماض النووية ، وتتنوع المصادر النتروجينية في الطبيعة بين العضوية والمعدنية ، ويمكن لمعظم الاحياء المجهرية ان تستغل النوعين منها غير ان التاثير الاكبر يكون باستعمال مصادر النتروجين المعدنية لذلك تحتاج البكتريا الى تدعيم الوسط بالنتروجين فقد ذكر Ghosh و Basu ( 2002 ) ان اضافة نترات البوتاسيوم ( $KNO_3$ ) مصدر للنتروجين بنسبة 0.02 % الى الوسط الذي نمت عليه بكتريا الرايزوبيا ادى الى زيادة انتاج الاندول ، مما ادى استعماله الى زيادة قابلية النبات في تكوين اكبر عدد من العقد الجذرية وتحسين انتاج النبات . كما لاحظ Tsuneo و James ( 1990 ) ان انتاج الاندول يزاد بنسبة

3.5 % من قبل بكتريا الرايزوبيا عند اضافة كبريتات الامونيوم بمقدار 1.5 غم / لتر الى الوسط مصدراً للنتروجين .

وفي دراسة اجراها Biswas واخرون ( 2000 ) بعزل 6 عزلات من الرايزوبيا من حقول البقوليات لدراسة اثرها على نمو نبات الرز اذ لاحظ ان تجهيز النبات بمستويات مختلفة من السماد النتروجيني المعدني $(NH_4)_2 SO_4$ ( 0 و 30 و 60 ) ملغم / كغم تربة ادى الى زيادة في نشاط البكتريا وارتفاع معدل انتاجها من IAA والذي عمل على زيادة قدرة تثبيت النتروجين وقد عزوا ذلك الى ان زيادة منظم النمو IAA ربما حسنت من قابلية النبات على تكوين العقد الجذرية . واستعمل Lindow واخرون ( 1997 ) ثلاثة مصادر سمادية نتروجينية من كبريتات الامونيوم واليوريا ونترات الكالسيوم رشاً على النبات وبتراكيز 100 و 200 و 400 ملغم / لتر اسبوعياً لمدة ثلاثة اسابيع ، مع بدء عملية التزهير ، اذ ساهمت مركبات النتروجين المضافة بزيادة كثافة مستعمرات البكتريا المنتجة للاندول على اغصان واوراق النبات مما قلل من تساقط الازهار والثمار . واوضحت كثير من الدراسات انه يمكن اضافة مستويات واطئة من النتروجين مع اللقاح البكتيري لزيادة النشاط التعايشي للبكتريا ( الدليمي , 1982 ) .

**2-3-10 تأثير تدعيم الوسط بالفسفور في انتاج الاندول**

يؤدي عنصر الفسفور ومركباته وظائف هامة للكائنات الحية فهو يدخل في تركيب النيوكليوتيدات والاحماض النووية والعضوية التي تشكل مستودعاً عالي الطاقة تؤدي اغلب مركبات الفسفور دوراً في تنظيم الرقم الهيدروجيني للوسط بالاضافة الى انها مركبات خالبة للايونات الموجبة ، لذا فأن وجود عنصر الفسفور في الوسط ضروري جداً لنمو الكائن المجهري بالاضافة الى الدور المهم الذي تلعبه الفوسفات في انتاج مركبات الايض الثانوي . وتحتاج الميكروبات في نموها لوجود الصور الميسرة من الفسفور ، وان كمية مركبات الفسفور القابل للتمثيل في الوسط تتحكم في تكاثر الميكروبات ، وعند وجود عنصر الفسفور بكميات محدودة في الاوساط البيئية ، فان اضافته سوف تؤدي الى زيادة نشاط الكائنات الدقيقة الكسندر ( 1982 ) و ( مصلح والحيدري 1985 ) ، وذكر الجنابي ( 2001 ) و Ozan ( 1980 ) و Subbo – Rao ( 1982 ) ان اعداد الخلايا الحية لعزلات البكتريا كانت اعلى في التربة المسمدة بسماد السوبر فوسفات او المسمدة بالصخر الفوسفاتي مقارنة بالتربة غير المسمدة ، وفسروا ذلك على اساس حاجة البكتريا للفسفور كعنصر اساسي لانجاز العمليات الحيوية ولنموها وتكاثرها . كما وجد Alagwadi و Gaur ( 1988 ) ان اضافة السماد الفوسفاتي يعزز من اعداد البكتريا المذيبة للفوسفات بالتربة ، وان تاثيرات التلقيح تكون اكثر وضوحاً مع التسميد الفوسفاتي . كما اوضح Ratti واخرون ( 2001 ) ان استعمال عزلات من *Azospirillum* و

*Bacillus* لقاحات حيوية في الترب الكلسية المجهزة بأسمدة من فوسفات الكالسيوم الثلاثي مصدرا للفسفور بمعدل 200 ملغم / كغم تربة ، مكن النبات من توفير احتياجاته من عنصري الفسفور والنتروجين ، اما بغياب اللقاح البكتيري فقد عجز النبات عن توفير احتياجاته .

واشار Howieson واخرون ( 1993 ) ان لجاهزية الفسفور تأثير مهم في التصاق بكتريا الرايزوبيا بجذور النبات وقد تضاعف التصاق البكتريا وتكوين العقد الجذرية على جذور نبات الجت ثلاثة اضعاف عند زيادة مستوى الفسفور في اللقاح المضاف لحدود 200 ملي مول وعند ايصال تركيز الفسفور الى 2000 ملي مول فقد تضاعف الالتصاق الى ستة اضعاف . ودرس Sa واخرون ( 1992 ) تاثير نقص عنصر الفسفور على مواصفات النمو المختلفة لنبات فول الصويا اذ وجد ان النبات النامي في محلول يحتوي على 0.05 ملي مول من الفسفور قد عانى من انخفاض في عدد ووزن العقد الجذرية ووزن النبات الجاف وكذلك انخفاض نسبة الفسفور في الاوراق والجذور بنسبة 75 % ، والعقد الجذرية بنسبة 40 % عند المقارنة مع النبات النامي في محلول يحتوي على فسفور بتركيز 0.1 ملي مول ، وتبين ان العقد الجذرية تسلك كمخزن للفسفور وبذلك يستفيد منه النبات فسيولوجيا في تطوير العقد الجذرية حتى في حالة نقصه بالتربة. ولاحظ Tomar واخرون ( 1992 ) ان اضافة 10 و 20 و 30 ملغم P / كغم تربة ادى الى زيادة حاصل فول الصويا مع التلقيح بالرايزوبيا العقدية المتخصصة مقارنة مع النبات غير الملقح وكانت الزيادة متناسبة مع زيادة مستوى الفسفور .

اما بالنسبة لتأثيرات الفسفور على انتاج منظم النمو IAA فقد وجد Jinichiro واخرون ( 1991 ) ان اضافة الفسفور بمقدار 5 ملغم / لتر اعطى نتائج جيدة في مضاعفة انتاج الاندول في راشح المزرعة لبكتريا *Enterobacter cloaceae* كما لاحظ Biswas واخرون ( 2000 ) ان اضافة الفسفور بصيغة $KH_2PO_4$ وبواقع 2 ملغم / لتر قد ادى الى زيادة انتاج الاندول في الوسط بنسب تراوحت بين ( 5.6 – 7.5 % ) من قبل عزلات مختلفة من الرايزوبيا كما ان تلقيح النبات بهذه العزلات زاد من الوزن الجاف والحاصل للنبات . ووجد Jong واخرون ( 2003 ) ان عزلات من بكتريا *Pseudomonas* و *Bacillus* و *Azotobacter* التي نميت في وسط يحتوي على $KH_2PO_4$ و $Na_2HPO_4$ ادى الى تحسن انتاجها من الاندول اذ تراوح بين ( 17.7 – 22.7 ) ملغم / لتر وكانت هذه التراكيز من IAA في الوسط كافية وملائمة لتطور وتحسين نمو النبات.

**2-3-11 تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات في فعاليته .**

تعد 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 ، ففي دراسة قام بها Almonacid واخرون ( 2000 ) اختبروا فيها راشحي عزلتين من البكتريا *Ps.putida* و *B.cereus* 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 Berge ( 1990 ) 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 بواسطة 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 ، اما العزلة *B.cereus* فكان 22.6 ملغم / لتر وبعد التخزين بدرجة حرارة 5 ْم كان الانتاج 14.8 و 22.1 ملغم / لتر للعزلتين *Az.* و *B.* على التوالي الا ان تخزين الراشح بدرجة حرارة 35 ْم قد اثر كثيراً على انتاج الاندول حيث انخفض الى 8.9 و 18.2 ملغم/لتر للعزلتين *Az.* و *B.* على التوالي وكانت العزلة *Bacillus* اكثر مقاومة لظروف التخزين من العزلة *Az.*

## 2-4 قدرة البكتريا المنتجة للاندول على انتاج مركبات خالبة للحديد

على الرغم من ان الحديد يعد احد العناصر الغذائية الصغرى بالنسبة لنمو معظم الاحياء الدقيقة الا ان للاحياء المجهرية الموجودة في التربة دور هام في تحولات الحديد حيث يتم تحويله بسرعة عن طريق النشاط الميكروبي ، وفي معظم الاحيان تعد هذه الاحياء العامل المحدد لتجهيز هذا العنصر او عدم تجهيزه للنبات ، وقد امتلكت بعض الاحياء المجهرية نظاما لاخذ الحديد عن طريق قدرتها على افراز بعض المواد والمركبات التي تستطيع خلب هذا العنصر وادخاله الى داخل خلية البكتريا لذلك اطلق عليها المركبات الخالبة للحديد ( Iron Chelating ) وتعرف هذه المركبات بمركبات Sidrophores وقد اشار الباحثون ومنهم Neilands ( 1993 ) ان التركيب الكيميائي لهذه المركبات يختلف باختلاف اللاحياء المجهرية المنتجة لها .

وبينت عدة دراسات لعديد من الباحثين مثل Huyer و page ( 1988 ) و Fekete واخرون ( 1989 ) وكذلك Sevinc و page ( 1992 ) ان لبكتريا الازوتوبكتر القدرة

على انتاج مركبات خالبة للحديد Sidrophores عند تنميتها في وسط يحتوي على مستويات منخفضة من الحديد حيث تمكنها هذه المركبات من الحصول على الحديد الذي يعد ضروريا لنشاط البكتريا وانزيماتها الخلوية ، كما اوضحت دراسة عبد الكريم ( 2001 ) قدرة بكتريا *pseudomonas* المعزولة من التربة في محافظة الانبار على انتاج المركبات الخالبة للحديد ، وقد ثبت قدرة هذه المركبات على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات .

ووجد Chabot واخرون ( 1996 ) ان بكتريا من نوع *R.leguminosarum* التي قامت بانتاج منظم النمو ( IAA ) كان لها القدرة في انتاج مركب السايدروفور عندما كان تركيز الحديد في الوسط اقل من 3 مايكرومول بالاضافة الى ذلك فقد كان لها القدرة في توفير الحماية البايولوجية وزيادة الوزن الجاف والحاصل لنباتي الذرة الصفراء والخس .

وعزل Zakira واخرون ( 2005 ) 30 عزلة من الرايزوبيا من مواقع ترب مختلفة كان معظمها له القدرة على انتاج منظم النمو ( IAA ) واستطاعت 10 عزلات منها انتاج مركبات السايدروفور كانت كافية لتجهيز نبات الذرة بالحديد. ووجد Fauzia واخرون ( 2005 ) ان بعض عزلات الرايزوبيا قد انتجت كميات كافية من مركبات السايدروفور تراوحت بين ( 0.3 – 0.5 ) غم/ لتر. واستطاع Shikha واخرون ( 2007 ) من انتاج كمية من مركبات السايدروفور وصلت لغاية 32 ملغم / لتر بواسطة عزلة لبكتريا العقد الجذرية وهي *M.lotimp6* المعزولة من العقد الجذرية لنبات *Mimosa pudica* وقد كانت مركبات السايدروفور المنتجة تقع تحت مجموعة مركبات Hydroxamate ، وبلغ افضل انتاج بعد مدة تحضين 48 ساعة . كما اوضح Biswas واخرون ( 2000 ) ان عزلات مختلفة من الرايزوبيا قد عملت على زيادة النمو والحاصل لنبات الرز ، وكذلك زيادة واضحة في كمية الحديد الماخوذ من قبل النبات تراوحت بين ( 15 – 64 % ) حسب نوع العزلات المستخدمة وقد عزوا ذلك الى ان لهذه العزلات القدرة على انتاج مركبات السايدروفور والاحماض العضوية في بيئة جذور النبات . واشار Maria ( 2000 ) واخرون 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 قد قل بوساطة البكتريا .

## 2-5 قدرة البكتريا المنتجة للاندول على اذابة الفسفور في الوسط

تلعب الاحياء المجهرية لا سيما البكتريا دورا مهما في اذابة الفوسفات غير الذائبة في الوسط الذي تتواجد فيه ، وقد اكدت العديد من الدراسات ان قابلية الاحياء المجهرية على اذابة الفوسفات تعود الى قدرتها على تكوين بعض الاحماض العضوية ، مثل اللاكتيك والستريك

والاوكزاليك والاحماض غير العضوية مثل الكبريتيك والنتريك ، وكذلك تكوينها لغاز ثاني اوكسيد الكاربون الذي يذوب بالماء مكونا حامض الكاربونيك فضلا عن انتاج بعض الانزيمات التي تحرر الفسفور من بعض مركباته العضوية فقد وجد Gerte واخرون (2000) ان حامض الستريك والاوكزاليك يزيدان من قابلية التربة على تجهيز الفسفور ويزداد الفسفور المتحرر بعلاقة اسية مع زيادة تركيز هذه الاحماض في التربة .

وقد ذكر الكسندر ( 1982 ) ان مجموعة من الاحياء المجهرية تتميز بقابليتها على تكوين الاحماض المعدنية مثل الكبريتيك والنتريك فضلا عن الكبريت والهايدروجين عبر سلسلة من تفاعلات الاكسدة والاختزال لمركبات الكبريت والامونيوم والكاربون وتعود معظم انواع هذه المجموعات من البكتريا الى اجناس *Thiobacillus* و *Nitrosomonas* وعلى الرغم من ان هذه الاحماض تتكون بتراكيز ضئيلة في التربة الا ان لها دورا هاما في تحرير الفسفور المعدني وبعض العناصر الاخرى . وحصل Vazque واخرون ( 2000 ) على مجموعة من العزلات البكتيرية قادرة على تحرير الفسفور من الصخور الفوسفاتية كان اغلبها يعود الى اجناس *Enterobacter* و *Pseudomonas* كما حصل Dferiats واخرون 1997 على 111 عزلة بكتيرية مذيبة للفوسفات من التربة تعود لبعض الاجناس البكتيرية في التربة وهذه العزلات *Pseudomonas sp.* و *Bacillus sp.* و *Azospirillum* و *Azotobacter* واستعملوها لقاحا حيويا مذيبا للفوسفات في ترب كلسية تعاني من نقص الفسفور ، وقد ادى استعمالها الى زيادة معنوية في انتاج نبات Canola ، كما وجد الجنابي ( 2001 ) بعد حصوله على 60 عزلة بكتيرية مذيبة للفوسفات من مواقع مختلفة لترب في محافظة الانبار ان التلقيح بهذه العزلات قد اثر معنويا في زيادة جاهزية الفسفور ، وزيادة الوزن الجاف لنبات الذرة البيضاء ومحتواها من الفسفور سواء بوجود السوبر فوسفات ، او الصخر الفوسفاتي من ناحية اخرى اشار Chhonkar و Taradar ( 1984) الى الدور المهم للبكتريا المذيبة للفوسفات بتحريرها انزيمات الفوسفاتيز القاعدية والحامضية القادرة على اذابة الفسفور العضوي ، واكد على وجود علاقة معنوية موجبة بين نشاط الانزيم والكاربون العضوي والفسفور العضوي واعداد البكتريا ، كما ذكر ان الاحياء المجهرية في التربة يمكنها افراز انزيم النيوكليز الذي يمكن ان يعمل على جزيئات الاحماض النووية محررا الفوسفات الاحادية الذائبة .

وجد Han و Lee ( 2005 ) ان البكتريا من جنس *Bacillus* المنتجة لمنظمات النمو IAA و GA3 كان لها القدرة على اذابة الفوسفات في الوسط بمعدل 85 ملغم / لتر وان تلقيح بذور نبات الباذنجان بها ادى الى زيادة نمو وحاصل النبات وكذلك زيادة الفسفور الجاهز في التربة الماخوذة من قبل النبات. وقد لاحظ Ponmurugan و Gopi (2006 ) ان البكتريا المذيبة للفوسفات قد حررت كميات كبيرة من الفوسفور الذائب وبواقع 185 ملغم/ لتر من

الصخر الفوسفاتي وسماد السوبر فوسفات الذي كان يعاني تثبيتاً بواسطة كاربونات الكالسيوم في الترب القاعدية والحديد والالمنيوم في الترب الحامضية وذكروا ان البكتريا المذيبة للفوسفات قد انتجت كميات جيدة من منظمات النمو IAA و GA3 وانزيم الفوسفاتيز. وفي دراسة اجراها Ramazan واخرون ( 2007 ) على نبات الشعير تحت ظروف البيت الزجاجي وباستعمال ( 6 ) عزلات بكتيرية مذيبة للفوسفات ومنتجة للاندول ، وقد لاحظوا ان جميع العزلات التي لقح بها بذور الشعير قد ادت الى زيادة في نمو النبات وجاهزية الفسفور في التربة والفسفور الماخوذ من قبل النبات ، وكذلك زيادة في الكثافة الميكروبية مع الوقت وزيادة ملحوظة في وزن الجذور ووزن المجموع الخضري مقارنة مع معاملة السيطرة ، واوصوا باستخدام هذه العزلات كلقاح حيوي في الزراعة عموماً.

اما Diby و Sarma ( 2006 ) 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 للعسافي ( 2002 ) 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 لاحماض الستريك والاوكزاليك والسكسنيك .

## 6-2 قدرة البكتريا المنتجة للاندول على تثبيت النتروجين في الوسط

ان عملية تثبيت النتروجين حيويا تعد من اهم العمليات البايولوجية التي تحصل في التربة وتكاد تاتي في الدرجة الثانية بعد عملية التمثيل الضوئي ، وتقوم بهذه العملية مجموعة من الاحياء المجهرية تمتاز بقدرتها على افراز انزيم النيتروجيز ( Nitrogenase ) الذي يعد العامل الرئيسي في اولى خطوات التثبيت ، وهي اختزال النتروجين الجوي الى امونيا ويعد قسم من هذه الاحياء المجهرية حر المعيشة مثل مجموعة بكتريا *Azotobacter* و *Cynobacteria* اما القسم الاخر منها فهي تنمو بصورة تعايشية مع النباتات الراقية ، والتي تكون ما يسمى البكتروويد ( Bacteriod ) والتي تعود الى جنس *Rhizobium* . لقد اشار Dravon ( 1983 ) الى ان اكثر من 75 % من كمية النتروجين التي تضاف الى التربة بالطرق المختلفة يتم عن طريق

التثبيت الحيوي ، اذ يقدر ما يثبت عبر هذا المسار سنوياً من النتروجين حوالي 112 مليون طن ( Beck واخرون , 1993 ) وان 80 مليون طن من النتروجين المثبت يكون عن طريق البقوليات كما اشارت احصائيات FAO لعام 1984 والتي تؤكد ان صناعة الاسمدة النتروجينية لا تعطي في احسن احوالها سوى 50 – 60 مليون طن من النتروجين سنوياً .

استطاع الباسط واخرون ( 2006 ) من عزل 240 عزلة من بكتريا *Azospirillum* لاستخدامها كاسمدة حيوية لنبات الباقلاء والقمح ثم استخدمت اعلى العزلات كفاءة من الانواع السابقة ، واللتي اعطت اعلى قيم في تثبيت النتروجين ولوحظ ان جميع هذه العزلات المنتخبة قد انتجت كميات جيدة من منظمات النمو ( IAA ) وحامض الجبرلين ( GA3 ) واندول حامض البيوتاريك ( IBA ) في البيئات السائلة ، واوصوا باستخدام هذه العزلات كاسمدة حيوية مهمة في الزراعة . كما وجد Biswas واخرون ( 2000 ) 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.

وكان Martin واخرون ( 1989 ) قد اجروا سلسلة من التجارب لدراسة تاثير دور عزلة *Azospirillum* التي تثبت النتروجين وتنتج حامض الاندول ( IAA ) ودرسوا اثر ذلك على تطور الجذور ، كما قاموا بتقدير البكتريا المثبتة للنتروجين في محيط المنطقة الجذرية وعلى جذور النباتات باستعمال تربة حديثة غير مسمدة تحتوي على مجاميع بكتيرية طبيعية مثبتة للنتروجين ، ووجدوا ان اعداد الاحياء المجهرية المثبتة للنتروجين الملتصقة بسطوح الجذور تزيد على اعداد البكتريا المتواجدة في المنطقة الجذرية ، ولاحظوا ان تجهيز التربة بمصدر نايتروجيني معدني ( نترات الامونيوم $NH_4NO_3$ ) قد قلل عملية تثبيت النتروجين واعداد البكتريا المثبتة للنتروجين سواء على الجذور ام في المنطقة الجذرية ، وحصلوا على نتائج مشابهة عند تجهيز النتروجين المعدني رشاً على اوراق النبات ، وقد لوحظ ان بكتريا *Azospirillum* تتمتع بقابلية عالية على تثبيت النتروجين وانتاج كميات جيدة من الاندول وتقاوم الظروف الطبيعية وقد انعكس كل ذلك على تحسين انتاجية نبات القمح الملقح بها من خلال زيادة المجموع الجذري والخضري .

كما وجد Zakira واخرون 2005 ان نشاط انزيم النايتروجيز في تثبيت النتروجين من 19 عزلة من للرايزوبيا قد تراوحت بين ( 22 – 3624 ) ملغم $C_2H_4$ / لتر / ساعة وكان معظم هذه العزلات منتجاً للاندول ، في حين حصل Fauzia واخرون ( 2006 ) على نشاط لانزيم النيتروجيز تراوح بين ( 20 – 556 ) ملغم $C_2H_4$ / لتر / ساعة لـ 50 عزلة من الرايزوبيا كانت منتجة للاندول تراوح انتاجها بين ( 0.8 – 42.1 ) ملغم IAA / لتر . اما Jong واخرون ( 2003 ) 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 .

## 2-7 استخدام لقاحات حيوية متعددة العزلات مع رواشحها

توجد في الاوساط البيئية الطبيعية كثير من العلاقات المتبادلة بين انواع الكائنات الدقيقة واغلب هذه الكائنات تعيش في التربة متقاربة مع بعضها تقاربا شديدا ، مما يؤدي الى تفاعلات متبادلة بطريقة فريدة ومخالفة لما يحدث في المزارع النقية التي تدرس في المختبر ، وقد يعتمد بعض افراد الكائنات الدقيقة على بعضها الاخر للحصول على بعض المواد اللازمة للنمو ولكنها في الوقت نفسه قد تحدث تاثيرات سلبية غير مرغوبة في حالة حدوث تضاد ميكروبي. وعليه يمكن ملاحظة التاثيرات المفيدة والضارة للاستفادة منها في انتاج توليفة حيوية من عزلات الاحياء المجهرية ورواشحها واستعمالها كلقاح حيوي جيد ومتميز للاستفادة منه في التطور الزراعي. ذكر Kundu و Gaur ( 1980 ) ان اعظم فائدة من استخدام اللقاح البكتيري يمكن ان تحصل مع استعمال لقاح مختلط كاستعمال لقاح يضم بكتريا مثبتة للنتروجين مع البكتريا المذيبة للفوسفات وتوفير ظروف نجاح نشاط اللقاح في البيئة كاستعمال المواد التي تضمن استمرار نشاطه مع اضافة اللقاحات بكثافة عالية لضمان الاستيطان الميكروبي .

في دراسة قام بها Shatokhina و Khristinko ( 1996 ) اوضحا فيها ان عمل معقد من Rhizoenterine المحضر من البكتريا المثبتة للنتروجين مع البكتريا المذيبة للفسفور رمز له CBP ( Complex bacterial preparation ) والذي استعمل في تلقيح بذور الذرة قد ادى الى تقليل نسبة السماد المعدني بنسبة 50 % من غير حدوث أي انخفاض في الحاصل . واشار Elshanshoury ( 1995 ) الى ان استعمال اللقاحات الميكروبية لبكتريا *Azotobacter chroococcum* و *Azospirillum brasilense* و *Streptomyces mutabilis* بشكل

مفرد او ثنائي او ثلاثي ، قد ادى الى حدوث تاثيرات متبادلة في النبات والتربة فقد ادى استعمال اللقاحات بشكل مفرد الى زيادة في تثبيت النتروجين في الوسط واذابة مركبات الفسفور وتواجد مركبات السايدروفور وانتاج الاندول ( IAA ) ولكن بكميات قليلة بينما ادى استعمال لقاحات ثنائية من *Az.chroococcum* مع *St.mutabilis* او *As.brasilense* مع *St.mutabilis* الى تحسين قابلية العزلات في زيادة تثبيت النتروجين ، وكذلك زيادة الفسفور والمغنسيوم الذائبين ومركبات الاندول وكمية السكر المنطلقة في التربة وزيادة الكثافة الميكروبية.

في حين ادى استعمال خليط لقاح العزلتين *A.chroococcum* و *A.brasilense* الى ظهور تضاد ميكروبي وانخفاض في الاعداد والفعاليات الميكروبية في البيئة مما اثر سلباً على نبات الحنطة الملقح بها . وذكر Glick ( 1995 ) ان الهرمونات والفيتامينات تعد من العوامل التي تزيد من قدرة الكائنات الحية التنظيمية في البيئة لمقاومة الشدود الخارجية والداخلية المؤثرة على هذه الكائنات سواء اكانت نباتات ام احياء مجهرية وبما يوفر تطور نشاط احد الكائنات فائدة للكائن الاخر ، لذلك تمتلك اللقاحات الميكروبية علاقة مغلقة مع تطور الانتاج الزراعي وهي بذلك تؤدي الى حل مشاكل حفظ وتحسين خصوبة التربة . اما Curtis و Barnes ( 1993 ) فقد بينا ان عمل اللقاحات الميكروبية التي تتركز فعاليتها في المنطقة المحيطة بجذور النبات يؤدي الى توفر حماية من التاثيرات البايولوجية للبيئة على النبات . وتجرى عملية تحضير واعداد صيغ اللقاحات الميكروبية استناداً الى فعاليتها او اعدادها التي تؤثر في ايض المواد الذي ينعكس على تطور نمو النباتات ، لذا اصبح من المهم فهم صيغة إعداد اللقاحات من خلال تحديد نشاط المجاميع المفيدة التي تعمل دون تضاد في خدمة وتطور التربة التي تنعكس على الانتاج النباتي .

وقد استطاع Almonacid واخرون ( 2000 ) 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 . كما ذكروا انه يمكن استخدام رواشح هذه العزلات لتحسين الانبات والنمو ، 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 ، وعزوا ذلك الى قدرة هذه العزلة على تكوين السبورات في الراشح ، مما سمح لها عند توفر الظروف باعادة تكوين الخلايا . كما وجد Brandl و Lindow ( 1998 ) ان بكتريا *E.herbicola* التي تنتج كميات عالية من الاندول وصلت الى 92 ملغم IAA / لتر واستعمال لقاح هذه العزلة مع راشح المزرعة ، قد ادى الى انخفاض

معنوي في نسبة الانبات وسرعة النمو وطول الجذير والبادرة لنبات الفاصوليا اما عند تخفيف اللقاح والراشح بالماء المقطر وبنسبة 1 : 1 فانه اعطى نتائج ايجابية اذ زادت نسبة الانبات وطول الجذر والبادرة في حين ادى استعمال اللقاح والراشح بتركيزه الاصلي على اشجار *Epiphytic fitness* في وقت تكون البراعم الزهرية الى زيادة بلغت 95 % في تفتح الازهار وتقليل تساقط الثمار ، في حين ان تخفيف الراشح قد ادى الى تقليل نسبة تفتح الازهار فكانت الزيادة 62 % فقط مقارنة بمعاملة السيطرة ، وقد عزى الانخفاض في قيم الصفات المقدرة لنبات الفاصوليا هو عدم ملائمة التركيز 92 ملغم IAA/ لتر ، مما ادى الى تثبيط العمليات الحيوية في النبات لذلك ادت عملية التخفيف الى نتائج ايجابية في حين ان استخدام التركيز الاصلي مع الاشجار قد ادى الى نتائج ايجابية لملائمة النبات لذلك التركيز .

ووجد Hoflich واخرون ( 1995 ) ان استعمال اللقاحات الثنائية لبكتريا *Rhizobium* و *Pseudomonas* كان افضل من استخدامها بصورة مفردة في تحسين النمو وزيادة الانتاج لنباتات الفاصوليا والقمح والشعير كما ذكروا ان استعمال رواشح هذه العزلات قد عزز زيادة النمو و الانتاج وزاد الكثافة الميكروبية في منطقة الجذور . كما ذكر المصلح والحيدري ( 1984 ) ان رواشح مزارع البكتريا الرايزوبيا يمكن ان تؤدي الى تثبيط نمو اعدائها من الفطريات والفيروسات عند اضافتها للتربة ، وبذلك تشجع عملية تحقيق الاستيطان والاصابة . وقد اكد كل من Chosh و Basu ( 2000 ) و Johan واخرون ( 2005 ) و Cheryl و Bernard ( 2002 ) وكذلك Rasul (1999) و Tam و Normanly (2002) ان استعمال رواشح المزارع البكتيرية قد ادت الى تحسين نمو المجموع الجذري والمجموع الخضري وزيادة حاصل النباتات المستخدمة في دراساتهم ، وكذلك قد ساعدت في مقاومة النباتات للظروف البايولوجية والبيئية . وزادت الكثافة الميكروبية للبكتريا المستعملة رواشحها.

## 2 – 8 فول الصويا واهمية تسميده الحيوي

يعد محصول فول الصويا *Glycine max L.* من المحاصيل البقولية المهمة جداً لاحتواء بذوره على نسبة عالية من البروتين ( 30 – 50 % ) ونسبة عالية من الزيت ( 14 – 24 % ) ويحتوي على اغلب الاحماض الامينية الضرورية للتغذية والاحماض الدهنية غير المشبعة ذات الفائدة الصحية ، وبذلك تكون له قيمة غذائية عالية للانسان فضلا عن امكانية استعمال بذوره ومخلفاته كغذاء للحيوان ومحسن للتربة ، كونه محصول بقولي يمكن ان يقوم بتثبيت النتروجين في حالة زراعته وتكوينه العقد الجذرية البكتيرية مع توفر الرايزوبيا الخاصه به في التربة ، اذ يمكنه تثبيت حوالي ( 20 – 40 ) كغم N / دونم للموسم الواحد (

Hardy واخرون 1971 ) وبالنظر لضعف تواجد وانتشار الرايزوبيا الخاصة بهذا المحصول في الترب العراقية وبالتالي عدم قدرته على تكوين العقد الجذرية البكتيرية من غيرها لذلك لابد من التسميد الحيوي لهذا المحصول فقد لاحظ عجام ( 1977 ) من خلال دراسة حقلية على فول الصويا ان النباتات المعاملة باللقاح البكتيري تكون على جذورها العقد البكتيرية في حين لم تتكون هذه العقد في النباتات غير المعاملة باللقاح ، مما يشير الى عدم وجود او ضعف العزلات الرايزوبية في التربة العراقية. وقد ذكر الدليمي ( 1982 ) ان اضافة اللقاح البكتيري ادت الى تكوين العقد الجذرية وفي حالة عدم اضافة اللقاح البكتيري لم يحصل تكون للعقد الجذرية ولكلا الموسمين ( 1980 و 1981 ) كما ذكر ان اضافة النتروجين لم تؤثر معنويا على عدد العقد الجذرية واوزانها الرطبة والجافة ، في حين ان اضافة معدلات واطئة من النتروجين ادت الى زيادة النشاط التعايشي بينما ادت اضافة المعدلات العالية الى خفض النشاط التعايشي وللموسمين ( 1980 – 1981 ) . ويظهر ان مشكلة عدم تواجد الرايزوبيا الخاصة بفول الصويا لا تقتصر فقط على الترب العراقية فقد اشار Burton و curley ( 1965 ) ان استعمال اللقاح البكتيري لفول الصويا في تربة تقع في ولاية وسكونسن ادى الى زيادة في تكوين العقد الجذرية في الترب التي لم تزرع سابقاً بفول الصويا مقارنة مع النباتات التي لم تلقح باللقاح البكتيري ، والتي افتقرت لهذه العقد او انعدمت فيها . كما حصل الباحث Balasundaram ( 1975 ) في الهند على 37 عقدة جذرية / نبات فول الصويا المعامل باللقاح البكتيري وبمقدار 2.5 لتر لقاح رايزوبي لكل 25 كغم بذور ، بينما لم يحصل الا على عقدة جذرية واحدة في النبات غير المعامل باللقاح البكتيري. ولاحظ Chomchalow ( 1975 ) من خلال دراسته في تايلند ان معاملة فول الصويا باللقاح البكتيري ادى الى تكوين 91 عقدة جذرية على الجذر الرئيسي و 76 عقدة جذرية على الجذر الثانوي لنفس النبات اما النبات غير المعامل باللقاح ، فلم تتكون سوى ( 4 – 5 ) عقدة جذرية على الجذر الرئيسي و ( 3 – 4 ) عقدة على الجذر الثانوي . واوضح William ( 1989 ) ان بكتريا العقد الجذرية *Rhizobium* المتكونة على جذور نباتات فول الصويا قد انتجت كميات كبيرة من الاندول تجاوزت 35 ملغم / لتر ادى ذلك الى زيادة في المجموع الجذري والخضري حاصل النبات. كما ذكر شرف ( 2006 ) ان تلقيح نباتات فول الصويا ببكتريا الرايزوبيا قد ادى الى تكوين نسبة عالية من العقد الجذرية وزيادة في قدرة تثبيت النتروجين ونمو النبات والحاصل وهذا ما حصل عليه ايضاً Tilak واخرون ( 1982 ) و Ruschel واخرون ( 1975 ) واشار Munevar و Wollum ( 1981 ) الى ان ارتفاع درجة الحرارة من ( 28 – 40 ْم ) اثر وبشكل واضح على تكوين العقد الجذرية وفعالية انزيم النايتروجينيز في العقد المتكونة لنبات فول الصويا ، وقد ارتبط هذا التاثير بسلالة الرايزوبيا

المستعملة اذ لاحظا ان بعض السلالات كونت عقد جذرية عالية الفعالية بدرجات حرارة 33 مْ في حين فشلت سلالات اخرى بتحقيق ذلك .

اوضح Robinson ( 1969 ) بان النباتات البقولية الملقحة بالرايزوبيا المعزولة من نبات ذو عقد فعالة ادى الى تكوين عقد جذرية فعالة وبمدة زمنية اقصر من النباتات الملقحة برايزوبيا محفوظة لمدة طويلة في المختبر ، كما وجد ان اضافة بعض المنشطات مع اللقاح كبعض المستخلصات العضوية او الدم او محلول سكري زاد من فعالية اللقاح بنسب الاصابة وتكوين العقد الجذرية وعزى ذلك الى تشجيع نمو البكتريا وجذور النباتات ، الذي ينعكس بدوره على حصول الاصابة وتكوين العقد الجذرية . ووجد Lindeman و Ham ( 1979 ) ان كثافة الرايزوبيا النشيطة تساعد على تحقيق الاصابة لجذور النبات مبكراً مما تزيد من عدد العقد الجذرية التي تكون متميزة بحجمها وفعاليتها وظهر ذلك واضحاً مع رايزوبيا فول الصويا ( الذي تبدا زراعته في شهر نيسان وينضج في شهر ايلول ) الامر الذي يؤدي عند عدم اضافة اللقاح او عدم تواجد اعداد من الرايزوبيا عند الانبات والايام الاولى للزراعة بعدد كافي لتحقيق الاصابة يترتب على ذلك فشل تكوين العقد ، وان تكونت فتكون غير فعالة لتكوينها في اوقات متاخرة خلال شهري مايس وحزيران اذ ترتفع درجة الحرارة فوق 30ْ م وتكون الظروف غير ملائمة لنمو ونشاط بكتريا الرايزوبيا في تحقيق الاصابة وفعالية البكتريا. وهذا ما اشار اليه Barrios واخرون ( 1964 ) بان درجة الحرارة المثلى لحصول الاصابة هي 25 – 28ْ م في حين ان الاصابة انعدمت عند درجات حرارة 12 و 33 ْم كما لاحظوا ان الاصابة اذا لم تحصل خلال الشهر الاول من الزراعة بسبب انخفاض كثافة اللقاح في البيئة فانها تنخفض وينخفض تكوين العقد بنسبة 70 % .

# الفصل الثالث

# 3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

## 3-1 الاجهزة المستعملة Apparatus

| الجهاز | الشركة المصنعة |
|---|---|
| الموصدة Autoclave | Prestiga medical |
| الحاضنة Incubator | Memmert |
| الحاضنة الهزازة Shaking Incubator | Edison, N. J. USA |
| المطياف الضوئي Spectrophotometer | Bauscch & Lomb G. |
| مقياس الرقم الهيدروجيني pH meter | Philips |
| مقياس الايصالية الكهربائية Electrical conductivity | Philips |
| حمام مائي هزاز Shaking water bath | Memmert |
| النابذ ( الطرد المركزي ) Centerfuge | Janetzki |
| الفرن الكهربائي Oven | Memmert |
| المطياف اللهبي Flame photometer | Corning EEL |
| مجهر ضوئي Microscope | Olympus |
| الميزان الحساس Balance | Mettler pe 6000 |
| هيتر مع المحرك المغناطيسي Heater Magnetic - stirer | Stuart. |
| جهاز كلدال Keldal | Gerhardt vapodest |
| ثلاجة Refrigerate | القادسية |
| جهاز قياس الكلوروفيل Chlorophyll meteer نوع ( SPAg – 502 ) | Philips |

## 3- 2 الطرائق المستعملة في البحث

### 3-2-1 جمع نماذج جذور النباتات البقولية لعزل البكتريا العقدية Rhizobium Bacteria

اختبرت اربعة مناطق تشتهر بزراعة النباتات البقولية تقع ضمن محافظة الانبار وهي مناطق الخالدية ( Ka) والصوفية ( So ) والعامرية ( Am ) والگرمة ( Kr ) وذلك للتحري عن تواجد وعزل البكتريا العقدية المنتجة لمركبات الاندول . اذ اختيرت 5 نباتات بقولية من

النباتات النامية بشكل جيد في كل حقل يبين الجدول 1 انواع النباتات والحقول . 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 .

**3-2-2 عزل بكتريا الرايزوبيا**

اتبعت الطريقة المبينة من قبل Beck وآخرون 1993 في عزل البكتريا من العقد الجذرية ، وذلك بفصل العقد باستعمال شفرة حادة مع مراعاة قطع جزء من الجذر المتواجدة عليه العقد ، بعدها تم غسل العقدة بماء الحنفية لعدة مرات ثم غمرت بمحلول كلوريد الزئبق ( $HgCl_2$ ) تركيز 0.1 % لمدة 5 دقائق ثم نقلت في محلول من الكحول الاثيلي تركيز 70 % لمدة 3 دقائق بعدها غسلت عدة مرات بالماء المقطر المعقم ، وفي المرة الاخيرة تركت العقدة داخل طبق بتري معقم مع كمية قليلة من الماء المقطر المعقم . سحقت العقدة تحت ظروف التعقيم داخل الطبق بواسطة ملعقة وزن ، وباستعمال عروة التلقيح نقل جزء من معلق العقدة الجذرية المسحوقة تحت ظروف التعقيم وزرعت بالتخطيط على سطح الوسط Yeast extract mannitol ager ( YEMA ) مستخلص خميرة المانيتول الصلب المحضر في اطباق بتري ويوضح الملحق ( 2 ) مكونات الوسط المضاف اليه صبغة الكونغو الحمراء. حضنت الاطباق بعدها في الحاضنة بدرجة حرارة 28 ± 2 ْم لمدة 48 – 72 ساعة . فحصت المستعمرات النامية ونقل جزء من المستعمرات البكتيرية ( التي لم تاخذ الصبغة الحمراء وتلك التي ظهرت بلون احمر باهت ) والذي يعد دليلاً اوليا على انها عزلات لبكتريا عقدية ( الرايزوبيا ) . بعدها نقيت على وسط جديد من ( YEMA ) ثم حضرت مزارع مائلة من المستعمرات النقية على نفس الوسط YEMA وحضنت لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 28 ± 2 ْم. وحفظت المزارع في درجة حرارة 4 ْم لحين استخدامها في الاختبارات اللاحقة . وصل عدد العزلات البكتيرية العقدية المختارة من العقد الجذرية التي جمعت من حقول ونباتات بقولية مختلفة 15 عزلة. ويوضح الملحق ( 1 ) التصنيف الحديث للرايزوبيا.

جدول ( 1 ) انواع النباتات والحقول المستعملة لعزل البكتريا العقدية

| اسم الموقع | العائل النباتي | معدل عدد العقد في النبات | البكتريا العقدية |
|---|---|---|---|
| الخالدية ( Ka ) | البرسيم *Trifolium SP.* | 22 | *R.trifolii $Sp_1Ka$* |
| | الباقلاء *Vicia faba* | 14 | *R.fababean $SP_2Ka$* |
| | النفل *Melilotus indica* | 18 | *R.meliloti $SP_3Ka$* |
| | الجت *Medicago sativa* | 12 | *R.leguminosarum $SP_4Ka$* |
| العامرية ( Am ) | البرسيم *Trifolium SP.* | 28 | *R.trifolii $Sp_1Am$* |
| | الباقلاء *Vicia faba* | 20 | *R.fababean $SP_2Am$* |
| | النفل *Melilotus indica* | 16 | *R.meliloti $SP_3Am$* |
| | الجت *Medicago sativa* | 18 | *R.leguminosarum $SP_4Am$* |
| الصوفية ( So ) | فستق الحقل *Arachis hypogaca* | 15 | *R.arachis hypogaca $SP_1So$* |
| | الباقلاء *Vicia faba* | 28 | *R.fababean $SP_2So$* |
| | اللوبيا *Vigna catiang* | 12 | *R.Vigna catiang $SP_3So$* |
| | الجت *Medicago sativa* | 14 | *R.leguminosarum $SP_4So$* |
| الگرمة ( Kr ) | البرسيم *Trifolium SP.* | 18 | *R.trifolii $Sp_1Kr$* |
| | الباقلاء *Vicia faba* | 22 | *R.fababean $SP_2Kr$* |
| | فول الصويا *Glycine max* | 0.4 | *R.japonicum $SP_3Kr$* |

**3-2-3 العزلات الجاهزة**

حصل على مجموعة من العزلات البكتيرية غير العقدية والبكتريا العقدية المنتجة للاندول والجدول ( 2 ) يوضح مصدر ونوع العزلات

نشطت عزلات البكتريا العقدية على وسط YEMA وحضرت مزارع مائلة منها وحفظت في 4 ْم . اما العزلات غير العقدية فنشطت على وسط الاگار المغذي Nutreant agar ( NA ) وحضرت منها مزارع مائلة وحفظت في 4 ْم لحين الاستعمال .

**جدول ( 2 ) نوع ومصدر العزلات الجاهزة**

| ت | نوع العزلة | مصدر العزلة | الرمز | مصدر الحصول على العزلة |
|---|---|---|---|---|
| 1 | *R.lens culinasis – 6* | نبات العدس | R.I.$Sp_1$Ra | دائرة البحوث الزراعية – ابو غريب |
| 2 | *R.japonicum – Nitra* | نبات فول الصويا | R.a.$Sp_2$Ra | |
| 3 | *R.hupittensis – 2* | نبات السيسبان | R.h. $Sp_3$Ra | |
| 4 | *R.mongolense – 360* | نبات الجت | R.m. $Sp_4$Ra | |
| 5 | *R.trifolii – 13* | نبات البرسيم | R.t. $Sp_5$Ra | |
| 6 | *R.mungbean – 420* | نبات الماش | R.m. $Sp_6$Ra | |
| 7 | *R.Ciceri – 51* | نبات الحمص | R.c. $Sp_7$Ra | |
| 8 | *R.japonicum – 27* | نبات فول الصويا | R.a. $Sp_8$Ra | |
| 9 | *R.meliloti – 53* | نبات النفل | R.m. $Sp_9$Ra | |
| 10 | *R.trifolii – 376* | نبات البرسيم | R.t. $Sp_{10}$Ra | |
| 11 | *Azotobacter* | تربة | Az.$sp_1$S | مختبرات الاحياء المجهرية كلية العلوم – جامعة الانبار |
| 12 | *Lyzobacter* | تربة | Ly.$sp_1$S | |
| 13 | *Pseudomonas* | تربة | Ps.$sp_1$S | |
| 14 | *Pseudomonas* | تربة | Pssp$_2$S | |
| 15 | *Streptomyces* | تربة | St.$sp_1$S | |

### 3-2-4 فحص دليل البروموثايمول الازرق Bromothymol blue test

يعد هذا الفحص من الاختبارات التشخيصية المهمة في تشخيص عزلات البكتريا العقدية . تم زراعة العزلات البكتيرية العقدية على وسط المانيتول الصلب ( YEMA ) الذي اضيف اليه دليل Bromothymol blue بتركيز 0.5 % وحضر باذابة 0.16 غم من NaOH في 250 مللتر ماء مقطر واضيف له 1.25 غم من المثيل الازرق حرك بعدها تم سحب 5 مللتر منه واظيف الى لتر واحد من الوسط YEMA ، وذلك للتأكد من قابلية البكتريا العقدية في انتاج مركبات حامضية او قاعدية في الوسط الزرعي النامية عليه . وعد تغير لون الوسط من اللون الازرق المخضر الى الاصفر دليلاً ايجابيا على كون البكتريا النامية عقدية ( Beck واخرون , 1993 ) .

**3-2-5 اختبار انتاج الاندول**

لغرض الكشف عن قابلية العزلات المستحصل عليها في الدراسة في انتاج مركبات الاندول ، حضر وسط ماء الببتون 1 % ( Pepton water 1% ) حسب تعليمات الشركة Fluka ، ووزع في انابيب اختبار بحجم 5 مللتر / انبوبة ، وعقم الوسط بالموصدة بدرجة حرارة 121 ْم وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة ، ثم برد الوسط ولقح من العزلات المجموعة والبالغة 30 عزلة باستعمال عروة التلقيح ، وبمعدل ثلاثة انابيب ( 3 مكررات ) لكل عزلة وحضنت في درجة حرارة 28 ± 2 ْم ولمدة 48 ساعة لغرض تراكم الاندول المنتج . اضيف محلول كاشف كوفاكس Kovac's reagent ( المحضر باذابة 5 غم Paradimethyle amino benzaldehyde في 75 مل من الكحول المثيلي Isoamyl alcohol بعدها اضيف 25 مل من حامض الهيدروكلوريك HCl المركز ) اذ استعمل 0.5 مل من الكاشف لكل انبوبة اختبار مع تحريك المزيج بلطف وعد ظهور حلقة حمراء على سطح الوسط فحصاً موجباً ، وذلك نتيجة لايض الحامض الاميني التربتوفان ( جاد الله واخرون , 1994 ) . حددت العزلات المنتجة لمركبات الاندول والتي بلغت 18 عزلة لغرض استعمالها في التجارب اللاحقة .

**3-2-6 تقدير كمية الاندول المنتج**

لغرض معرفة كفاءة العزلات المنتجة للاندول اتبعت طريقة Weber و Gordon ( 1951 ) و Glick و Patten ( 2002 ) حيث حضر وسط ماء الببتون 1 % في انابيب اختبار بحجم 10 مللتر / انبوبة ، وعقم الوسط بالموصدة ثم لقح الوسط من العزلات المنتخبة باستعمال عروة التلقيح ( وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عزلة ) ، ثم حضنت في درجة 28 ± 2 ْم لمدة 24 ساعة بعدها قدر الاندول الناتج في المزرعة بالطريقة اللونية ، والتي تتلخص

باخذ 1 مل من المزرعة بعد تعريضها للطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة ، ثم اضيف لها 1 مل من كاشف سالوسكي ( المحضر من اذابة 12 غم من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ في 7.9 مولاري من $H_2SO_4$ ) بعدها ترك في الظلام لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 25 – 30 ْم ومن ثم قيست الامتصاصية بجهاز spectrophotometer على طول موجي nm 530 . حسبت النتائج بتحضير منحنى قياسي من مركب الاندول الصناعي وذلك بتحضير تراكيز ( 0 ، 1 ، 10 ، 20 ، 40 ، 60 ، 80 ، 100 ) ملغم IAA / لتر ( ملحق 3 ) وعوملت بالكاشف ( سالوسكي ) المذكور . انتخبت 8 عزلات متميزة في انتاج الاندول لاستعمالها في التجارب اللاحقة .

### 3-2-7 قدرة العزلات المنتخبة على انتاج الاندول في وسط NB

لغرض معرفة قدرة العزلات على انتاج مركبات الاندول في وسط المرق المغذى ( NB ) او عند تدعيم وسط ماء الببتون به فقد حضرت الاوساط الاتية :

أ. وسط المرق المغذى حسب تعليمات الشركة Fluka .

ب. وسط ماء الببتون1 % ( يذوب ا غم من الببتون في 100 مللتر ماء مقطر وضبط الرقم الهيدروجيني 7 ) .

جـ. وسط المرق المغذى المدعم بالببتون 1 % .

د . وسط الببتون المدعم 1 % من NB .

وضعت في انابيب اختبار ( حجم 25 مل ) بمقدار 10 مل من الوسط في كل انبوبة عقمت الاوساط بالموصدة ثم لقحت باستعمال عروة التلقيح من العزلات المنتخبة البالغة 8 عزلات وبثلاثة مكررات لكل عزلة ثم حضنت في درجة 28 ± 2 ْم لمدة 48 ساعة . قدرت بعدها كمية الاندول الناتجة حسب طريقة Weber و Gordon ( 1951 ) و Glick و Patten ( 2002 ) . حللت النتائج إحصائيا وفق نظام التجارب العاملية باستعمال تصميم CRD. بعدها انتخبت 5 عزلات متميزة في الانتاج وذات قدرات متباينة وتستجيب لتحسين مكونات الوسط الغذائي لاستعمالها في التجارب اللاحقة .

### 3-2-8 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 تعد عملية ايضه المايكروبي تؤدي الى تكوين حامض الاندول. هيئت المواد المدرجة ادناه ( ذات محتوى جيد من التربتوفان ) لاستعمالها اوساط غذائية في انتاج 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 ( $4.2 \times 10^6$ 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 حسب طريقة Weber و Gordon ( 1951 ) و Glick و Patten ( 2002 ) وحللت النتائج احصائيا حسب التجارب العاملية لثلاثة مكررات وفق تصميم CRD . انتخب نوع الوسط الملائم وتركيزه لكل عزلة للتجارب اللاحقة .

**3-2-9 تأثير تدعيم الاوساط المحلية بالببتون و NB في انتاج الاندول :**

لغرض تحسين انتاج العزلات ومكونات الاوساط المحلية وجعلها اكثر قدرة على انتاج الاندول دعمت الاوساط المنتخبة لكل عزلة من التجربة السابقة بتراكيز مختلفة من الببتون و NB اذ وزعت الاوساط بمقدار 100 مل / دورق حجم 250 مل ودعمت بتراكيز 1 ، 2 ، 3 ( غم / 100 مل ) من الببتون و NB . وعقمت الاوساط بالموصدة ثم لقحت من لقاح العزلات بمعدل 2 مل / 100 مل وسط وحضنت في حاضنة هزاز بسرعة 120 رجة/ د لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 28 ± 2 ْم . قدرت فيها كمية الاندول الناتجة ، حللت النتائج احصائيا وفق التجارب العاملية بثلاثة عوامل وباستعمال التصميم CRD. انتخب التركيز الملائم من مواد التدعيم لكل مادة تدعيم للعزلات المستعملة في التجارب اللاحقة .

**3-2-10 تأثير تدعيم الوسط بالكلوكوز على انتاج حامض الاندول**

لغرض معرفة دور استعمال الكلوكوز في تحسين انتاج العزلات لمركبات حامض الاندول حضرت الاوساط المنتخبة من التجارب السابقة وحسب الملائمة مع العزلات ودعمت بمقدار 1 ، 2 ، 3 ، 4 غم كلوكوز / 100 مللتر وسط ، عقمت الاوساط ولقحت بمعدل 2 مل / 100 مل وسط . وحضنت في حاضنة هزاز 120 رجة / د ودرجة حرارة 28 ± 2 ْم ولمدة 48 ساعة . قدرت كمية الاندول الناتجة وحللت النتائج احصائيا وفق التجارب العاملية باستعمال تصميم CRD . انتخب التركيز الملائم من الكلوكوز لكل عزلة في التجارب اللاحقة .

**3-2-11 تاثير تدعيم الوسط بمصدري النايتروجين والفسفور في انتاج الاندول**

على الرغم من كون الاوساط ذات محتويات جيدة من المصدر النتروجيني العضوي ، ولغرض معرفة تاثير استعمال كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ مصدراً نتروجينياً واثره على انتاج مركبات الاندول ، فقد استعمل بمعدل 2 غم / لتر ، كذلك بهدف تعزيز كمية الفسفور في الوسط استعمل $K_2HPO_4$ بمعدل 2 غم / لتر. اضافة لاستعمال معاملة المستعمرات من خليطهما لمعرفة التاثير المشترك لهما في انتاج مركبات الاندول . حضرت الاوساط المنتخبة حسب متطلبات كل عزلة في دوارق زجاجية سعة 250 مل كما ورد في التجارب السابقة وجهزت مكوناته بالمعاملات من مصدري النتروجين والفسفور ، وعقمت الاوساط بالموصدة ثم حضنت كما ذكر سابقاً . قدر الاندول بعد 48 ساعة في الوسط وحللت النتائج احصائيا حسب التجارب العاملية باستعال تصميم CRD .

### 3-2-12 تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط في انتاج الاندول

لغرض تحديد الرقم الهيدروجيني المناسب في الوسط لانتاج الاندول حضرت الاوساط المناسبة وحسب ما تحتاجه كل عزلة وفق التجارب السابقة وعدل الرقم الهيدروجيني للاوساط الى 5 ، 6 ، 7 و 8 باستعمال 0.1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم NaOH و 0.1 عياري من حامض الهيدروكلوريك وعقمت الاوساط ثم لقحت بالموصدة وحضنت كما ورد في التجارب السابقة . قدر الاندول في الاوساط بعد نهاية مدة الحضن 48 ساعة وحللت النتائج احصائيا وفق التجارب العاملية باستعمال CRD . وانتخب الرقم الهيدروجيني المناسب للوسط وللعزلات لتحضير الاوساط في التجارب اللاحقة .

### 3-2-13 تأثير معدل التهوية وسرعة التحريك للوسط في انتاج الاندول

لغرض تحديد معدل التهوية وسرعة تحريك الوسط المناسب اختبر تاثير ثلاثة معدلات لتهوية الاوساط 0.0 و 0.5 و 1.5 لتر / دقيقة مع استعمال ثلاث سرع تحريك 150 و 200 و 250 دورة / د بهدف تحسين خلط مكونات الوسط وتوفير كمية من الهواء المناسبة لانتاج الاندول في الوسط حضرت الأوساط حسب احتياج العزلات في التجارب السابقة ووزعت في دوارق زجاجية حجم 250 مل بمقدار 100 مل / دورق جهز كل دورق بانبوبين زجاجيين وضع في طرفيها العلويين قطن ( كمرشح ) أوصلت إحداهما الى قعر الدورق لتجهيز الهواء بشكل متجانس في الوسط وربطت بمضخة هواء يمكن التحكم من خلالها بكمية الهواء المجهزة حسب حاجة المعاملات ، فيما وضعت الاخرى بشكل يكون طرفها السفلي فوق سطح الوسط بمسافة 3 سم للسماح بخروج ثاني اوكسد الكاربون والهواء الزائد . عقمت الاوساط ولقحت كما ورد في التجارب السابقة. وحضنت بسرع تحريك حسب المعاملات المحددة لمدة 48 ساعة قدر الاندول

الناتج وحللت النتائج احصائيا حسب التجارب العاملية لعاملين وفق تصميم CRD واختيرت المعاملات الافضل للتجارب اللاحقة .

### 3-2-14 تأثير حجم اللقاح ومدة الحضن في انتاج الاندول

لغرض تحديد كثافة اللقاح ومدة الحضن المناسبة لانتاج الاندول في الوسط استعملت ثلاثة مستويات من حجم اللقاح 1 و 2 و 3 مللتر / 100 مل وسط يحتوي المللتر الواحد $10^7$ × 5 cfu / ml تحضر هذه اللقاحات بتنمية العزلات في وسط المرق المغذى وقدرت الكثافة المكروبية بطريقة التخافيف والصب بالاطباق وخففت عند الاستعمال بكمية من الوسط لتصبح متناوبة الكثافة الميكروبية الابتدائية وكالاتي 5.69 ، 6.0 و 6.17 Log cfu / ml للوسط واستعملت ثلاثة مدد للحضن 24 و 48 و 72 ساعة . حضرت الاوساط المناسبة حسب سلسلة التجارب الاخيرة وجهز كل منها بما يناسب العزلات المنتخبة بناءً على نتائج التجارب السابقة ولقحت بحجوم اللقاحات المعدة ثم حضنت بدرجة 28 ± 2 ْم بسرعة تحريك 200 دورة / د وللمدد الزمنية اعلاه . قدرت الكثافة الميكروبية بطريقة التخافيف ( Louw و Webley ، 1985 ) قدر الاندول لكل معاملة ثم حللت النتائج احصائيا حسب تصميم التجارب العاملية لثلاثة عوامل باستعمال تصميم CRD. انتخب حجم اللقاح والمدة الزمنية الافضل لانتاج الاندول لاستعمالهما في التجارب اللاحقة .

### 3-2-15 اختبار قدرة العزلات على انتاج المركبات الخالبة للحديد Sidrophores

اجريت هذه التجربة لمعرفة قدرة العزلات على انتاج المركبات المرتبطة بالحديد Sidrophores واتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Schwyno واخرون ( 1992 ) بطريقة Chrome Azurel Sulfonate ( CAS ) وذلك بزرع العزلات في وسط IDCM ( Iron deficient culture medium ) المبينة مواصفاته في الملحق ( 4 ) وزع الوسط في انابيب اختبار وعقمت بالموصدة ثم حضنت في حاضنة هزازة بسرعة 200 دورة / د وبدرجةحرارة 28 ± 2 ْم لمدة 48 ساعة. ثم نقلت الانابيب الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / د لمدة 20 دقيقة ، للحصول على راشح رائق ، اخذ 0.1 مل من الراشح بواسطة Micro pipate ونقلت الى Plate well ( صفيحة ذات حفر ) وضع فوقها قطرة من كاشف CAS ( المحضر باذابة 60.5 ملغم من مسحوق CAS في 50 مل من الماء المقطر ومزج 1 مل منه مع 10 مل من $MgFeCl_3 . 6H_2O$ المذاب في 1 مولاري من HCl ) وعد تغير لون الكاشف من الازرق الداكن الى اللون الوردي خلال مدة 10 دقائق بان الاختبار ايجابياً ، أي ان البكتريا منتجة للمركبات الخالبة للحديد .

**3-2-16 قدرة العزلات البكتيرية المنتخبة على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط**

استعمل لهذا الغرض وسط بيكو فسكايا ( Subb-Rao , 1980 ) المكون من 10 غم كلوكوز و 5 غم $_2(PO_4)Ca_3$ و 0.5 غم $_2SO_4(NH_4)$ و 0.5 غم $7H_2O$ . $MgSO_4$ و 0.2 غم KCl واثار من $MnSO_4$ و $FeCl_2$ و 0.5 غم من Yeast Extracte و 15 غم Agar مذابة في 1 لتر ماء مقطر . صب بعد تعقيمه في اطباق بتري ولقح الوسط بعد تصلبه في مركز الطبق من لقاح العزلات بوساطة عروة التلقيح وبثلاثة مكررات لكل عزلة حضنت بدرجة حرارة 28 ± 2 ْم لمدة 72 ساعة واستدل على قدرتها باذابة الفوسفات بتكوين هالة شفافة حول المستعمرة وسجلت اقطار الهالة ( منطقة الاذابة ) حللت النتائج احصائيا وفق تصميم CRD .انتخبت عزلتين هما $Rsp_8RA$ و $Pssp_2S$ لاستعمالهما في التجربة الحيوية التطبيقية .

**3-2-17 فحص قدرة العزلات المنتخبة على تثبيت النتروجين حيوياً في الوسط**

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Harold وآخرون ( 1998 ) باستعمال الوسط الزرعي المذابة مكوناته الاتية في لتر ماء مقطر وضبط الرقم الهيدروجيني على 7.2 ( كلوكوز 10 غم و $K_2HPO_4$ 1غم و $CaCl_2$ 0.1 غم و $7H_2O$ . $MgSO_4$ 0.2 غم و $2H_2O$ .$Na_2MO_4$ 0.001 غم و $7H_2O$ . $FeSO_4$ 0.05 غم ) عقمت ثم لقحت من لقاح العزلات المنتخبة وحضنت في حاضنة هزازة بسرعة تحريك 200 د / د لمدة 72 ساعة . قدرت كمية النتروجين في الوسط بطريقة كلدال . وانتخبت العزلة $Rsp_8RA$ في التجربة اللاحقة .

**3-2-18 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 25ْ م لحفظ الراشح قبل استعماله ولمدة زمنية 1 و 45 يوم بعد الانتاج. اذ اجريت عملية انتاج الاندول بتطبيق الظروف المثلى للانتاج بناءً على نتائج التجارب المنتخبة. واجريت عملية طرد مركزي للمزارع بسرعة 3000 دورة / د لثلاث مرات 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 و الفلفل و فول الصويا 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 استعمل 10 بذور لكل نبات في الطبق الواحد وسجلت نسبة الانبات خلال عشرة ايام .

## 3-3 التجربة البايلوجية التطبيقية

لدراسة تأثير الاندول المنتج في راشحي العزلتين $Rsp_8RA$ و $Pssp_2S$ المنتخبتين والعزلتين في التجارب السابقة. فقد صممت تجربة اصص باستعمال التصميم العشوائي الكامل وبثلاثة مكررات لدراسة المعاملات حسب ما مبين في الجدول ( 3 ) ، اذ حضرت المعاملات في بيكر زجاجي سعة 100 مل مع استعمال ماء الحنفية المعقم . وضع في كل أصيص 3.5 كغم من التربة الجافة المنخولة بمنخل 2 ملم المبينة بعض صفاتها الفيزيائية والكيميائية في الجدول ( 4 ) ، واستعملت بذور نبات فول الصويا صنف Lee الذي حصل عليه من دائرة البحوث الزراعية . سمدت التربة في الأصص حسب التوصيات السمادية لنبات فول الصويا بالسماد المركب NP 200 كغم / هكتار بمعدل ( 27 : 27 ) بواقع 27 ملغم N , P / كغم تربة. وضعت البذور بمعدل 5 بذرة لكل معاملة ، وتركت لمدة ساعة في الحاضنة على درجة حرارة 28 ± 2 ْم ثم نقلت البذور ومكونات المعاملة إلى التربة في الأصص المرطبة سابقاً بالماء المقطر تم ذلك بتاريخ 13 / 5 / 2007 اذ زرعت البذور على عمق 3- 4 سم ثم رويت رية الانبات بايصال التربة الى 75 % من السعة الحقلية على أساس الوزن الجاف واستمر تعويض النقص في الرطوبة بوزن الأصص على اساس الفقد بالوزن في الريات اللاحقة .

جدول ( 3 ) المعاملات المستعملة في التجربة البايلوجية التطبيقية

| ت | اسم المعاملة | الرمز | الكمية المستعملة ( مل ) | مكونات المعاملة | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | تركيز الاندول ملغم/لتر | كثافة البكتريا Log |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | cfu/ml |
| 1 | معاملة السيطرة Control | c | | | |
| 2 | حامض الاندول ( IAA ) | I | 50 | 45.0 | |
| 3 | راشح العزلة $R.sp_8RA$ | SR | 50 | 42.2 | |
| 4 | راشح العزلة $Pssp_2S$ | SPs | 50 | 43.4 | |
| 5 | راشح العزلتين $Pssp_2S + Rsp_8RA$ | SPs + SR | 25 + 25 | 21.1+21.7 | |
| 6 | راشح العزلة $Rsp_8RA$ + العزلة $R.sp_8RA$ | SR + R | 5 + 50 | 42.2 | 7.62 |
| 7 | راشح العزلة $Pssp_2S$ + العزلة $Pssp_2S$ | Ssp + Ps | 5 + 50 | 43.4 | 7.62 |
| 8 | العزلة $R.sp_8RA$ | R | 5 | | 7.62 |
| 9 | العزلة $Pssp_2S$ | Ps | 5 | | 7.62 |
| 10 | العزلتان $Pssp_2S + Rsp_8RA$ | R + Ps | 5 + 5 | | 7.62<br>7.62+ |
| 11 | العزلتان + راشحيهما | SPs+SR+Ps+R | 25+25+5+5 | 21.1+21.7 | 7.62<br>7.62+ |

جدول ( 4 ) بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية للتربة المستعملة

| الصفة | القيمة والقياس |
|---|---|
| الرمل sand | 330 غم / كغم |
| الغرين silt | 450 غم / كغم |
| الطين clay | 220 غم / كغم |

| نسجة التربة | مزيجية |
|---|---|
| درجة تفاعل التربة ( pH ) | 7.6 |
| درجة التوصيل الكهربائي | 2.9 ديسي سيمنز م |
| المادة العضوية | 9.5 غم/ كغم تربة |
| النتروجين الكلي | 105 ملغرام / كغم |
| الفسفور الجاهز | 12.5 ملغم / كغم |
| البوتاسيوم الجاهز | 0.81 ملي مول / لتر |
| $Ca^{++}$ | 3.7 ملي مول / لتر |
| $Mg^{++}$ | 1.9 ملي مول / لتر |
| $Na^{+}$ | 1.4 ملي مول / لتر |
| $Cl^{-}$ | 2.6 ملي مول / لتر |
| $HCO_3^{-}$ | 2.8 ملي مول / لتر |
| $SO_4^{=}$ | 1.8 ملي مول / لتر |
| $CaCO_3$ ( الكلس ) | 230 غم / كغم |

وحفضت الاصص في مكان محمي تحت الظروف الطبيعية ، واجريت عملية المراقبة وخدمة النبات طيلة مدة الدراسة . سجلت نسبة الانبات وسرعة النمو لغاية 7 ايام بعد الزراعة ، ثم خفت النباتات لحد نبات واحد بعد اليوم العاشر للزراعة اخذت القياسات للصفات المبينة بتاريخ 15 / 7 / 2007 :

1- حسبت المساحة الورقية للنباتات حسب معادلة Wiersma و Baily ( 1975 ) حيث ان

$$LA = [\ 0.624 + 0.723\ (L \cdot W)\ ]$$

LA = مساحة الوريقة ( سم$^2$ )

L = طول الورقة ( سم )

W = اقصى عرض للورقة ( سم )

ثم ضربت مساحة الورقة الكلية × عدد الاوراق التي حولت الى وحدة ( دسم$^2$ ) .

2- سجل طول النبات ( سم ) من مستوى سطح التربة وحتى القمة النامية على الساق الرئيسي .

3- تم احتساب عدد الافرع النباتية على الساق الرئيسي .

4- قياس نسبة الكلوروفيل الكلي بواسطة جهاز قياس نسبة الكلوروفيل .

5- حسب الوزن الجاف للنبات بعد حصاد النبات بعد تجفيف النباتات على درجة حرارة 70°م ولمدة 72 ساعة .

6- عدد العقد الجذرية : استخرجت جذور النباتات بعد ازالة المجموع الخضري واخذ نموذج 100 غم من التربة لغرض تقدير بعض الصفات لها . رطبت التربة بالماء لتقليل التاثير الميكانيكي على الجذور وغسلت الجذور بتيار مائي معتدل ثم حسبت العقد الجذرية وصنفت الى عقد فعالة وغير فعالة اعتماداً على لون العقدة الوردي او البيضاء المتجرثمة ، كما ميزت العقد الفعالة الى كبيرة الحجم ( قطر 5 – 10 ملم ) باستعمال مقياس القدمة ( vernia ) وصغيرة الحجم اقل من ( 5 ملم ) .

7- الوزن الجاف للجذور : جفف المجموع الجذري للنبات في درجة 70° م لمدة 72 ساعة ووزن كل مجموع جذري على حدة لكل معاملة .

8- قدر النتروجين والفسفور في المجموع الخضري للنبات والترب حسب طريقة Bremner ( 1965 ) و watanabe و olsen ( 1969 ) وحسب حاصل النتروجين والفسفور في النبات بضرب نسبة N او P في الوزن الجاف للنبات .

9- قدرت الكثافة الميكروبية في عينات التربة باستعمال طريقة التخافيف العشرية والصب بالأطباق حسب ( Louw & Webley 1958 ) .

# الفصل الرابع

# 4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

## 4-1 نتائج جمع العزلات

اظهرت نتائج جمع العزلات البكتيرية العقدية من جذور النباتات البقولية المختلفة النامية في حقول متباينة الموقع في محافظة الانبار ( جدول 1 ) انه امكن الحصول على 15 عزلة من بكتريا العقد الجذرية *( Rhizobioum )* تعود 3 عزلات منها لنبات البرسيم *R.trifolii* جمعت من مواقع الخالدية والعامرية والگرمة ، و 4 عزلات تعود لنبات الباقلاء *R.fababean* جمعت من مواقع الخالدية والعامرية والصوفية والگرمة ، و 3 عزلات تعود لنبات النفل وهما *R.leguminosorum* جمعت من مواقع الخالدية والعامرية والصوفية و2 عزلة تعود لنبات الجت هي *R.meliloti* وعزلة واحدة تعود لنبات اللوبيا هي *R.vignacatiang* وعزلة واحدة *R.archishypog* تعود لنبات فستق الحقل من موقع الصوفية بينما كانت العزلة الاكثر اهمية في البحث والتي حصل عليها بصعوبة هي *R.japonicum* تعود لنبات فول الصويا من موقع الگرمة اذ قلع اكثر من 20 نبات للحصول على نبات واحد يحمل 5 عقد جذرية فعالة ، بينما كانت اغلب نباتات فول الصويا التي تم قلعها لا تحتوي على عقد جذرية وان احتوت فهي متجرثمة غير فعالة ، على عكس النباتات الاخرى التي تراوح عدد العقد في جذورها بين ( 12 -28 ) عقدة تختلف في الحجم حسب نوع العائل النباتي ، وكان عدد العقد للنوع النباتي يتباين من حقل لاخر باختلاف ملوحة التربة ونوع التربة وعوامل خدمة المحصول ، وقد تباين تكوين العقد الجذرية في النباتات البقولية من عائل لاخر ومن موقع لاخر وهذا ما اكدته الدراسات السابقة ( القيسي 2005 )، وهذا يؤكد تباين قدرات العزلات المحلية في قابليتها لاحداث الاصابة نظراً لامتلاكها ميكانيكيات مختلفة في مقاومة الظروف المحيطة وقدرتها على المقاومة ولفترات الاصابة Brhada واخرون ( 2001 ) .

وباضافة العزلات الجاهزة التي تمكن الحصول عليها من المختبرات البحثية في دائرة البحوث الزراعية والبالغة 10 عزلات بكتيرية عقدية و 5 عزلات محلية من مختبرات كلية العلوم جامعة الانبار غير عقدية تستطيع انتاج الاندول بفحوصات اجريت عليها ضمن تجارب سابقة ، اصبح عدد العزلات المجموعة 30 عزلة خضعت لاختبارات قابليتها على انتاج الاندول. واظهر اختبار فحص دليل البروموثايمول الازرق لعزلات البكتريا العقدية البالغة 25 عزلة ان جميع العزلات المستعملة تعود للبكتريا العقدية *( Rhizobioum )* اذ اظهرت جميعها تغيراً في لون

الوسط من اللون الازرق المخضر الى الاصفر والذي يعد دليلاً ايجابياً على كونها بكتريا عقدية ( Beck واخرون 1993 ) .

## 4-2 قدرة العزلات على انتاج الاندول

اظهرت نتائج اختبار قدرة العزلات المستعملة في الدراسة على انتاج الاندول في وسط ماء الببتون 1% ان 18 عزلة ( بنسبة 60 % من مجموع العزلات ) قادرة على انتاج الاندول ، في حين لم تتمكن 12 عزلة ( نسبة 40 % ) من انتاج الاندول تحت ظروف التجربة . وتبين ان 14 عزلة من مجموع عزلات البكتريا العقدية ( 25 عزلة ) أي بنسبة 56 % قادرة على انتاج الاندول ولم تتمكن عزلة ( *Streptomycetes* ) من انتاج الاندول في الوسط. كما لوحظ ان 27.2 % من عزلات البكتريا العقدية تعود الى البكتريا *R.meliloti* المعزولة من نبات الجت ( 3 عزلة ) وتعود الاجناس الاخرى المنتجة للاندول الى نباتات العدس والحمص والسيسبان وفستق الحقل ( جدول 5 ) .

وقد استبعدت العزلات غير المنتجة للاندول لنحصل على 18 عزلة منتخبة استعملت في التجارب اللاحقة ، ويعزى تباين عزلات الرايزوبيا العقدية او العزلات الاخرى المنتجة للاندول الى قدرتها الانزيمية في ايض الحامض الاميني التربتوفان وتحويله الى حامض الاندول في الوسط ومن الطبيعي ان تتباين قدرات هذه العزلات في انتاج الاندول اذ اشار ( Maria ) واخرون ( 2000 ) الى وجود عدد من عزلات الرايزوبيا غير المنتجة للاندول ، واكد ذلك Zakira واخرون ( 2005 ) وعزى ذلك الى ان بعض العزلات كانت غير نشطة لعدم ملائمة الظروف البيئية لبعض انواع البكتريا قيد الدراسة . بينما اكد الباسط واخرون ( 2006 ) ان اغلب عزلات الرايزوبيا كانت منتجة للاندول وان قسماً منها غير منتجة وراثياً وكانت اكثر كفاءة من عزلات *Azotobacter* و *Azospirillum* .

جدول ( 5 ) اختبار انتاج الاندول والبكتريا العقدية

| ت | نوع العزلة | الرمز | اختبار الاندول | تاكيد اختبار البكتريا العقدية |
|---|---|---|---|---|
| 1 | *R.trifolii sp$_1$Ka* | Rsp$_1$Ka | + | + |
| 2 | *R.fababean sp$_2$Ka* | R sp$_2$Ka | + | + |
| 3 | *R.meliloti sp$_3$Ka* | R sp$_3$Ka | - | + |
| 4 | *R.leguminosarum sp$_4$Ka* | R sp$_4$Ka | - | + |
| 5 | *R.trifolii sp $_1$Am* | R sp$_1$Am | + | + |
| 6 | *R.fababean sp $_2$Am* | R sp$_2$Am | + | + |
| 7 | *R.meliloti sp $_3$Am* | R sp$_3$Am | + | + |
| 8 | *R.leguminosarum sp $_4$Am* | Rsp$_4$Am | + | + |
| 9 | *R.arachishypogaea sp$_1$So* | Rsp$_1$So | - | + |
| 10 | *R.fababean sp $_2$So* | Rsp$_2$So | + | + |
| 11 | *R.vigna catiung Rsp $_3$So* | Rsp$_3$So | - | + |
| 12 | *R.leguminosarum sp $_4$So* | Rsp$_4$So | + | + |
| 13 | *R.meliloti sp $_1$Kr* | Rsp$_1$Kr | - | + |
| 14 | *R.fababean sp $_2$Kr* | Rsp$_2$Kr | + | + |
| 15 | *R.jabonicum sp $_3$Kr* | Rsp$_3$Kr | + | + |
| 16 | *R.lens culinasis sp $_1$RA* | Rsp$_1$RA | - | + |
| 17 | *R.jabonicum – Nitra sp $_2$RA* | Rsp$_2$RA | - | + |
| 18 | *R.hupittensis-2 sp $_3$RA* | Rsp$_3$RA | - | + |
| 19 | *R.mongolense-360 sp $_4$RA* | Rsp$_4$RA | - | + |
| 20 | *R.trifolii sp $_5$RA* | Rsp$_5$RA | + | + |
| 21 | *R.mungbean-420 sp $_6$RA* | Rsp$_6$RA | - | + |
| 22 | *R.ciceri-51 sp $_7$RA* | Rsp$_7$RA | - | + |
| 23 | *R.japonicum-27 sp $_8$RA* | Rsp$_8$RA | + | + |
| 24 | *R.meleloti- 53 sp $_9$RA* | Rsp$_9$RA | + | + |
| 25 | *R.trifolii- 376 sp $_{10}$RA* | Rsp$_{10}$RA | + | + |
| 26 | *Azotobacter sp$_1$S* | Asp$_1$S | + | - |
| 27 | *Lyzobacter sp$_1$S* | Lsp$_1$S | + | - |
| 28 | *Pseudomonas sp$_1$S* | Pssp$_1$S | + | - |
| 29 | *Pseudomonas sp$_2$S* | Pssp$_2$S | + | - |
| 30 | *Streptomycetes sp$_1$S* | Stsp$_1$S | - | - |

منتجة للاندول +　　بكتريا عقدية +

غير منتجة للاندول –　　بكتريا غير عقدية –

## 3-4 غربلة العزلات الكفوءة في انتاج الاندول

اظهرت النتائج الموضحة في الجدول ( 6 ) تباين قدرة العزلات في انتاج الاندول في وسط ماء البيتون ، بلغ الحد الاعلى للانتاج 14.6 ملغم / لتر باستعمال عزلة $Rsp_2kr$ المعزولة من نبات فول الصويا موقع الگرمة وبفارق معنوي ( $P \geq 0.05$ ) عن جميع العزلات ، تلتها العزلة $Rsp_8RA$ المعزولة من نبات فول الصويا ايضا بانتاج قدره 13.2 ملغم / لتر ، في حين بلغت اقل كمية انتاج للاندول 2.8 ملغم / لتر من قبل العزلة $Rsp_9RA$ التي تعود للبكتريا العقدية لنبات النفل ، والتي حصل عليها من مركز البحوث الزراعية . وقد بلغ عدد العزلات التي تراوح انتاجها بين 8 – 15 ملغم / لتر 8 عزلات ويعود تباين العزلات في انتاج الاندول الى قابلية العزلات على تحويل الحامض الاميني التربتوفان الى مركب الاندول في وسط ماء البيتون ، وبناءً على ذلك تم اختيار 8 عزلات ( جدول 6 ) هي الكفوءة في انتاج الاندول منها 6 عزلات تعود الى جنس البكتريا العقدية (*Rhizobium*) وعزلتين تعود الى جنس *Pseudomonas* ورموزها مرتبة بناءً على قدرتها الانتاجية كما يلي $Rsp_2kr$ و $Rsp_8RA$ و $Psp_2S$ و $Psp_1S$ و $Rsp_4So$ و $Rsp_3Kr$ و $Rsp_5RA$ و $Rsp_1Ka$( جدول 6 ) . وهذا يتفق مع ما جاء بهShino واخرون ( 2002 ) كذلك Elshanshoury ( 1995 ) الذين ذكروا وجود اختلافات كبيرة في كمية الاندول المنتج من قبل العزلات المستخدمة في دراساتهم وهذا ماكده Almonaacid ( 2000 ) الذي انتخب ثلاثة عزلات من مجموع 106 عزلة حصل عليها من التربة كانت منتجة للاندول وكذلك Sumera واخرون ( 2004 ) الذين عزلوا 12 عزلة بكتيرية من التربة تراوح انتاجها بين (20 – 90 ) ملغم / لتر .

جدول ( 6 ) كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم \ لتر)

| رمز العزلة | كمية الاندول | رمز العزلة | كمية الاندول | رمز العزلة | كمية الاندول |
|---|---|---|---|---|---|
| $Rsp_1Ka$ | 7.80 | $Rsp_2So$ | 4.10 | $Asp_1S$ | 4.60 |
| $Rsp_2Ka$ | 6.52 | $Rsp_4So$ | 9.60 | $Lsp_1S$ | 6.20 |
| $Rsp_1Am$ | 4.20 | $Rsp_5RA$ | 8.60 | $Pssp_1S$ | 9.80 |
| $Rsp_2Am$ | 3.10 | $Rsp_8RA$ | 13.20 | $Pssp_2S$ | 12.40 |
| $Rsp_3Am$ | 6.50 | $Rsp_9RA$ | 2.80 | $Rsp_2Kr$ | 14.60 |
| $Rsp_4Ka$ | 4.10 | $Rsp_{10}RA$ | 3.60 | $Rsp_3Kr$ | 8.60 |

LSD P> 0.05 = 2.41

## 4-4 تحسين انتاج العزلات للاندول باستعمال وسط NB

تبين النتائج الموضحة في الجدول ( 7 ) ان اعلى معدل للانتاج في الاوساط المستعملة بلغ 11.48 ملغم / لتر في وسط ماء الببتون ، والمرق المغذى ( NB ) المدعم 1% ماء الببتون قدرة مقاربة في الانتاج تراوحت بين ( 10.27 – 10.43 ) ملغم / لتر ، في حين كان اعلى معدل انتاج معنوي للاندول مع العزلة $Rsp_2kr$ التي بلغ انتاجها 14.20 ملغم / لتر تلتها العزلتين $Pssp_2S$ و $Rsp_8RA$ بمعدل انتاج قدره 13.07 و 12.67 ملغم / لتر على التوالي . وقد اظهر تداخل المعاملات ان افضل المعاملات لانتاج الاندول التي استعمل فيها وسط ماء الببتون المدعم بـ 1 % NB مع العزلة $Rsp_2Kr$ والعزلة $Rsp_8RA$ والعزلة $Pssp_2S$ اذ بلغ معدل الانتاج 16.31 و 15.10 و 14.60 ملغم / لتر على التوالي. من جهة اخرى لم تتمكن العزلات $Rsp_5RA$ و $Rsp_1Kr$ من تحسين قابليتها في انتاج الاندول . لذلك استبعدت من التجارب اللاحقة. وانتخبت العزلات التي تمكنت من زيادة انتاجها وهذا يؤكد انه لهذه العزلات القدرة على ايض مكونات المرق المغذي وزيادة انتاج الاندول وهذا ما ذكره Almonacid واخرون( 2000 ) و Shihui واخرون ( 2007 ) حيث ان هذه المركبات تجهز البكتريا بمسارات الطاقة المؤدية الى انتاج IAA . كذلك تعمل على زيادة الكثافة الميكروبية في الوسط باسرع وقت مما يزيد من انتاج الاندول .

**جدول ( 7 ) كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم \ لتر) باستعمال الببتون والمرق المغذي**

| رمز العزلة | نوع الوسط المستعمل | | | | المعدل |
|---|---|---|---|---|---|
| | NB | Pepton | NB+ 1 % P. | P + 1 %NB | |
| $Rsp_2Kr$ | 12.65 | 13.68 | 14.20 | 16.31 | 14.20 |
| $Rsp_8RA$ | 10.98 | 11.20 | 13.40 | 15.10 | 12.67 |
| $Pssp_2S$ | 14.40 | 13.20 | 12.10 | 14.60 | 13.07 |
| $Pssp_1S$ | 9.80 | 10.10 | 9.70 | 10.50 | 10.02 |
| $Rsp_4So$ | 9.60 | 9.80 | 9.60 | 10.50 | 9.86 |
| $Rsp_3Kr$ | 8.20 | 8.40 | 8.50 | 8.80 | 8.47 |
| $Rsp_5RA$ | 8.10 | 8.00 | 8.30 | 8.50 | 8.22 |
| $Rsp_1Kr$ | 7.20 | 7.80 | 7.70 | 7.90 | 7.65 |
| المعدل | 9.84 | 10.27 | 10.43 | 11.48 | -------- |

LSD P> 0.05 Is. = 1.21 , med. = 0.42 , Is. med. 3.41

## 4-5 دور الاوساط المحضرة محلياً في تحسين انتاج الاندول للعزلات المنتخبة

يتضح من النتائج المبينة في جدول ( 8 ) ان استعمال الاوساط المحضرة محلياً لانتاج الاندول باستعمال العزلات المنتخبة ان بعض الاوساط المستعملة حقق الهدف المطلوب ، اذ اظهر 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 و 12.76 ) ملغم / لتر. بينما بقى انتاج العزلتين $Ps.sp_1s$ و $R.sp_4So$ من الاندول منخفضاً ، 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 لذلك اختبرت هذه المعاملات مع التوليفات للتجارب اللاحقة ، ومن الملاحظ ان قدرة عزلتي $Rsp_8RA$ و $Pssp_2S$ تميزت باعلى انتاج مع استعمال الوسط المحضر من بذور فول الصويا وبذور الباقلاء بتركيز 10 % في حين تميزت العزلة $Pssp_2S$ بافضل انتاج على الوسط المحضر من الحليب بتركيز 10 % .

وهذا يؤكد اهمية المواد المتوفرة في فول الصويا والباقلاء لعزلتي البكترية العقدية الجذرية وربما يعزى ذلك الى ارتباط تكوين المواد في النبات بفعل التعايش لهذه البكتريا مع جذور هذه النباتات . مما يُعجل قابلية هذه البكتريا على ايض الحامض الاميني التربتوفان المتواجد في بذور هذه النباتات وتحويله الى مكونات الاندول . ولم تكن هذه المواد ملائمة لانتاج الاندول مع استعمال البكتريا $Pssp_2S$ . 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 Jan ( 2000 ) 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 بواسطة البكتريا وهذا ما أكدت عليه Maria واخرون ( 2000 ) 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 Kittell واخرون ( 1989 ) ان انتاج البكتريا للاندول يختلف باختلاف اجناس البكتريا والأوساط المستعملة في تنميتها ، وفي دراسة اجراها Antonia واخرون ( 1998 ) لاحظوا ان اضافة مستخلص اوراق النبات الى الوسط الذي نميت عليه البكتريا *Xanthomonas* زاد من انتاج الاندول بواسطة هذه البكتريا .

جدول ( 8 ) 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

## 4-6 تحسين انتاج الاندول بتدعيم الاوساط المحلية من الببتون و المرق المغذي

تشير النتائج الموضحة في الجدول ( 9 ) الى تحسن انتاج الاندول من العزلات اثر تدعيم الاوساط من الببتون او NB ، اذ اوضحت النتائج ان معدل نسبة الزيادة المتحققة بلغت 29.51 % و 28.53 % ملغم / لتر على التوالي. وادى استعمال الببتون بتركيز 3 % حصول

اعلى انتاج معنوي اذ بلغ 33.06 ملغم / لتر ، بينما كان التركيز الافضل من NB هو 2 % والذي اعطى معدل انتاج قدره 29.89 ملغم / لتر . كذلك اظهرت العزلات استجابة معنوية للتدعيم فبلغ معدل انتاجها 30.24 و 29.19 و 28.00 ملغم IAA / لتر للعزلات $Rsp_2Kr$ و $Rsp_8RA$ و $Pssp_2S$ على لتوالي . ووجد ان افضل معاملات التداخل حققت زيادة معنوية في انتاج الاندول هي المعاملات المكونة من تدعيم الوسط المحضر من بذور فول الصويا مع تركيز 3 % ببتون للعزلة $Rsp_8RA$ والتي اعطت اعلى انتاج معنوي قدره 36.4 ملغم IAA / لتر ، تلتها المعاملة المؤلفة من استعمال الوسط المحضر من بذور الباقلاء المدعم بتركيز 3 % من البتون باستعمال العزلة $Rsp_2Kr$. الا ان العزلة $Pssp_2S$ قد اعطت اعلى انتاج بلغ 32.4 ملغم IAA / لتر عند استعمال وسط الحليب المدعم بتركيز 2 % من NB . تؤكد هذه النتائج اهمية تجهيز الوسط بالمواد التي يكون ايضها سريع التحول الى IAA عند الرغبة في انتاجه . وهذا ما اكده Zimmer وآخرون (1991) وكذلك Shino ( 2002 ) وما وجده Basu ( 1996 ).

ووجد Maria واخرون ( 2000 ) ان بكتريا *Azotobacter* و *Pseudomonas* انتجت كميات كبيرة من IAA وصلت الى 32.2 ملغم / لتر عند تنميتها على وسط المرق المغذي ( Broth ) المدعم من مسحوق من بذور نبات فول الصويا . وهذا ما اكده ايضاً , Cheryl و Bernard ( 2002 ) اللذان ذكرا ان تنمية بكتريا *Ps.putida* على وسط البروث قد زاد من انتاج الاندول من ( 26.3 – 19.6 ) ملغم / لتر مقارنة بمعاملة السيطرة .

**جدول ( 9 ) تاثير تدعيم الاوساط المحلية على كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم / لتر)**

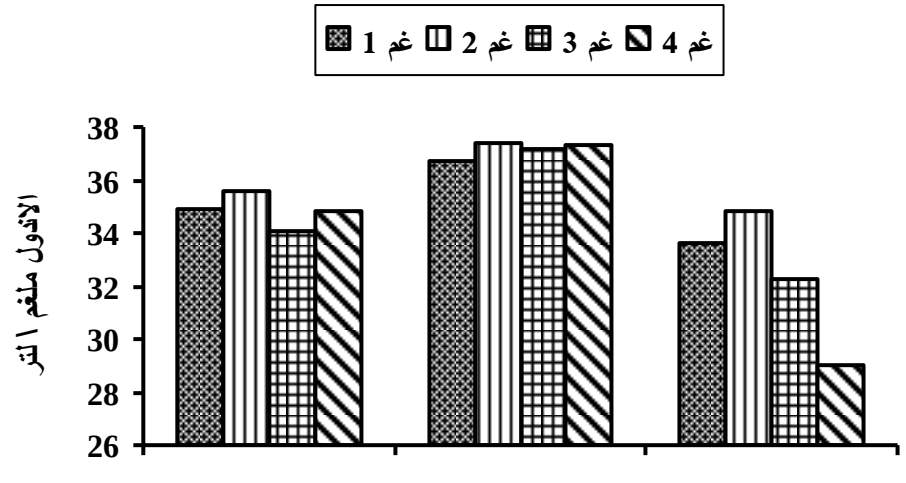
| رمز العزلة | تدعيم الوسط المحلي من الببتون غم/ 100 مل | | | تدعيم الوسط المحلي من المرق المغذي غم /100 مل | | | المعدل العزلات |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | |
| $Rsp_2Kr$ | 28.30 | 31.40 | 34.80 | 28.60 | 29.30 | 29.10 | 30.25 |
| $Rsp_8RA$ | 26.50 | 30.00 | 36.40 | 26.20 | 28.00 | 28.00 | 29.18 |
| $Pssp_2S$ | 22.80 | 27.50 | 28.00 | 26.10 | 32.40 | 31.20 | 28.00 |
| المعدل للتركيز | 25.86 | 29.63 | 33.06 | 26.96 | 29.90 | 29.43 | |
| المعدل للوسط | 29.51 | | | 28.76 | | | |

**LSD P> 0.05 Is .= 0.641 , Cons.= 2.05 , Med. ns. , Is. Cons . Med. = 2.670**

## 4-7 تاثير تدعيم الاوساط بالكلوكوز في انتاج الاندول

يوضح الشكل ( 1 ) وملحق ( 9 ) وجود تحسن في انتاج العزلات اثر تدعيم الاوساط بتراكيز مختلفة من الكلوكوز ولحد التركيز 2 غم كلوكوز / 100 مل وسط ، وبمعدل انتاج من الاندول قدره 35.93 ملغم / لتر . كذلك اظهرت العزلات استجابة متباينة لاضافات الكلوكوز في

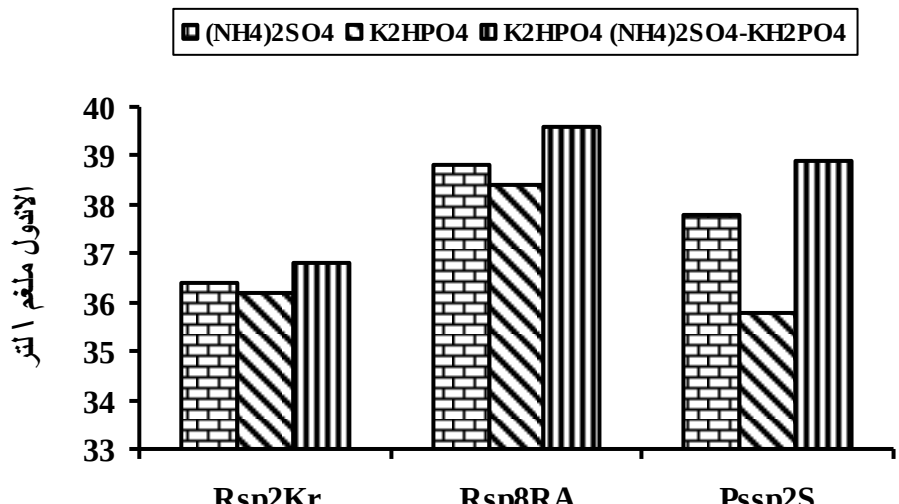
الوسط اذ تفوقت العزلة $Rsp_8RA$ بتحقيق اعلى معدل بلغ 37.16 ملغم IAA / لتر من الاندول تلتها العزلتين $Rsp_2Kr$ و $Pssp_2S$ بمعدلي انتاج قدرهما 34.85 و 32.43 ملغم / لتر على التوالي . ولوحظ ان عزلتي البكتريا العقدية قد حافظت على مستوى معدل انتاجها بزيادة تركيز الكلوكوز في الوسط فوق 2 غم كلوكوز / 100 مل دون زيادة في انتاج الاندول عكس ما حصل مع عزلة $Pssp_2S$ التي انخفض انتاجها من الاندول عند زيادة تركيز الكلوكوز عن 2 غم كلوكوز / 100 مل . ووجد ان افضل معاملات التداخل مع استعمال التركيز 2 غم كلوكوز / 100 مل وسط من الاوساط المنتخبة للعزلات والتي اعطت افضل معدلات في انتاج الاندول البالغة 37.4 و 35.6 و 34.8 ملغم IAA / لتر مع العزلات $Rsp_8RA$ و $Rsp_2Kr$ و $Pssp_2S$ على التوالي . وعلى الرغم من ان العزلة $Pssp_2S$ تاثر انتاجها مع زيادة تركيز الكلوكوز عن 2 غم كلوكوز / 100 مل ، في الوسط الا انها حققت افضل نسبة زيادة في انتاج الاندول مقارنة بالتجارب السابقة اذ بلغت 6.89 % في حين بلغت نسبة الزيادة مع العزلتين العقدية $Rsp_8RA$ و $Rsp_2Kr$ 2.67 و 2.24 % على التوالي ملحق ( 9 ). ان الكلوكوز من السكريات الاحادية ووحدته صغيرة جداً بحيث يمكن لاي كائن حي ان ياخذه مباشرة الى داخل الخلية من الوسط الذي يعيش فيه سواء كان بيئة غذائية ام تربة وهو ضروري جداً لاستعماله كمصدر جاهز للطاقة والكربون لجميع اجناس وانواع البكتريا ( قاسم وعلي ، 1989 ) . لذلك فان تدعيم الوسط الزرعي بالكلوكوز ولحد معين يعمل على زيادة نشاط البكتريا عن طريق توفير الطاقة وبناء الخلية فقد وجد Jong واخرون ( 2003 ) ان انتاج بكتريا *Ps.putida* قد تحسن عند اضافة مستويات من الكلوكوز وكان افضل انتاج عند مستوى تركيزه 10 ملغم كلوكوز / لتر مقارنة بمعاملة السيطرة والتراكيز 0.5 و 0.1 و 2.5 ملغم كلوكوز / لتر . كما لاحظ Leveau و Lindow ( 2005 ) ان بكتريا *Ps.putida* قد زاد انتاجها من الاندول عند تدعيم الوسط بتركيز 5.56 ملي مول من الكلوكوز وهذا ما ذكره ايضاً Datta و Basu ( 1997 ) عند اضافة 1 % من اللاكتوز الى الوسط الزرعي لبكتريا الرايزوبيا والذي ادى الى زيادة انتاج الاندول بنسبة 31.5 % مقارنة مع معاملة السيطرة .



**شكل ( 1 ) تأثير تركيز سكر الكلوكوز للوسط على كمية الاندول المنتج**

## 4-8 تاثير التدعيم بمصدري النتروجين والفسفور في انتاج الاندول

يوضح الشكل ( 2 ) تاثير تدعيم الاوساط من النتروجين والفسفور على انتاج الاندول، فقد اظهر استعمال خليط المصدرين تاثير معنوي في زيادة انتاج الاندول وبلغ معدله 38.43 ملغم / لتر ، واظهرت العزلتين $Rsp_8RA$ و $Pssp_2S$ استجابة معنوية لاضافة المصدرين ، اذ بلغ معدل انتاجهما 38.26 و 37.33 ملغم / لتر على التوالي. بينما لم يتحسن انتاج العزلة $Rsp_2Kr$ . كما يتضح ان افضل معاملات التداخل معنويا تحقق مع استعمال العزلة $Rsp-RA_8$ و خليط النتروجين والفسفور بانتاج قدره 39.6 ملغم / لتر تلاه ما تحقق من العزلة $Pssp_2S$ والبالغ انتاجها 38.9 ملغم / لتر من التدعيم بالمصدرين معاً. كما لوحظ ان استعمال المصدر النتروجيني وحده لم يؤدي الى تحسن انتاج عزلتي البكتريا العقدية بينما ادى الى تحسن انتاج العزلة $Pssp_2s$ الى انتاج قدره 37.30 ملغم / لتر. وربما يعود ذلك الى قابلية العزلتين على تثبيت النتروجين من الهواء الجوي وعدم قدرة العزلة الاخيرة على ذلك . يعد عنصري النتروجين والفسفور من العناصر الضرورية والمهمة جداً في نمو وتكاثر الاحياء المجهرية والمحافظة على نشاطها وكثافتها فهما مهمان في العمليات الايضية وتكوين الاحماض النووية والعضوية وبروتينات الخلية وبذلك فان تدعيم الوسط بهذين العنصرين سيكون له دور مهم في زيادة النشاط وانتاج الاندول . ذكر Chosh و Basu ( 2000 ) ان تجهيز الوسط بنترات البوتاسيوم ( $KNO_3$ ) كمصدر نتروجيني وبنسبة 0.02% الى وسط بكتريا الرايزوبيا ادى الى زيادة انتاج الاندول .



**شكل ( 2 ) تأثير التدعيم النيتروجين والفوسفور للوسط على كمية الاندول المنتج**

كما لاحظ Tsuneo و James ( 1990 ) ان انتاج الاندول يزداد بنسبة 3.5 % بواسطة بكتريا الرايزوبيا عند اضافة كبريتات الامونيوم بمقدار 1.5 غم / لتر الى الوسط ، وهذا ما اكده ايضاً Lindow واخرون ( 1997 ). اما Biswas واخرون ( 2000 ) فقد ذكروا ان اضافة السماد النتروجيني المعدني 30 و 60 ملغم كغم تربة قد ادى الى زيادة نشاط البكتريا وارتفاع معدل انتاجها من IAA .

كما اشار الجنابي ( 2001 ) و Ozan ( 1980 ) و Subba – Rao ( 1980 ) ان أعداد الخلايا الحية لعزلات البكتريا كانت اعلى في الترب المسمدة بسماد السوبر فوسفات او الصخر الفوسفاتي مقارنة مع التربة غير المسمدة ، وفسروا ذلك على اساس حاجة البكتريا للفسفور كعنصر مهم واساسي لنموها وتكاثرها وانجاز العمليات الحيوية ، ووجد Jinichiro واخرون ( 1991 ) ان اضافة الفسفور بمقدار 5 ملغم / لتر اعطى نتائج جيدة في مضاعفة انتاج الاندول في راشح المزرعة لبكتريا *Enterobacter Cloaceae* ، كما لاحظ Biswas واخرون ( 2000 ) ان اضافة الفسفور بصيغة $KH_2PO_4$ وبواقع 2 ملغم / لتر ادى الى زيادة الاندول في الوسط بنسب تراوحت بين ( 5.6 – 7.5 % ) بواسطة عزلات مختلفة من الرايزوبيا وذكر Jong واخرون ( 2003 ) ان عزلات بكتيرية من *Pseudomonas* و *Bacillus* و *Azotobacter* عندما نمت في وسط يحتوي $KH_2PO_4$ و $Na_2PO_4$ ادى الى تحسن انتاجها من الاندول اذ تراوح بين ( 17.7 – 22.7 ) ملغم / لتر بحيث ان هذه التراكيز كانت كافية وملائمة لتطور وتحسين نمو النبات .

## 4–9 دور الظروف البيئية المثلى في تحسين انتاج الاندول

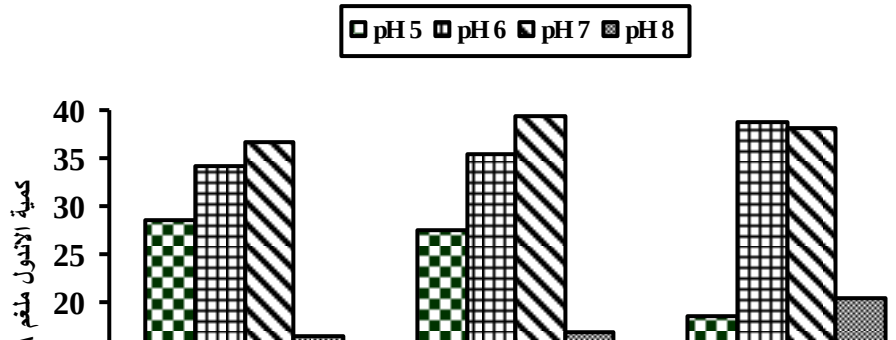
### 4–9–1 تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط في تحسين انتاج الاندول

يوضح الشكل ( 3 ) تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط على انتاج العزلات للاندول اذ حصل اعلى معدل معنوي للانتاج 38.07 ملغم / لتر مع ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند الرقم 7.0 وانخفض الانتاج قليلاً مع الرقم الهيدروجيني للوسط 6.0 ليصل الانتاج 36.10 ملغم / لتر ، في حين انخفض الانتاج بشدة مع زيادة الرقم الهيدروجيني للوسط الى 8.0 وكذلك الحال

مع خفضه الى الرقم 5.0 ملحق ( 8 ). ولم يظهر اختلاف معنوي في معدل انتاج العزلات. بينما اظهر التداخل للمعاملات ان افضل انتاج معنوي تحقق من المعاملة المؤلفة من الرقم الهيدروجيني للوسط 7.0 واستعمال العزلة $Rsp_8RA$ حيث بلغ 39.41 ملغم / لتر تلتها المعاملة المؤلفة من استعمال العزلة $Pssp_2S$ النامية في الوسط ذو الرقم الهيدروجيني 6.0 وبمعدل انتاج بلغ 38.68 ملغم / لتر من الاندول. في حين نجد ان اكثر المعاملات تأثيراً بتغير الرقم الهيدروجيني للوسط مع المعاملتين المؤلفة من عزلتي البكتريا العقدية مع استعمال الوسط ذو الرقم الهيدروجيني 8.0 اذ بلغ الانتاج 16.41 و 16.95 للعزلتين $Rsp_2kK$ و $Rsp_8RA$ على التوالي.

ويعد الرقم الهيدروجيني للوسط من العوامل البيئية الرئيسية التي تنظم عملية انتاج الاندول بواسطة البكتريا لان نشاط هذه البكتريا يكون ضمن مدى معين من الرقم الهيدروجيني والذي يتراوح عموماً بين 6.0 – 8.0 لمعظم انواع البكتريا المنتجة للاندول ومن خلال النتائج المستحصل عليها يتضح ان عزلات الرايزوبيا تفضل الرقم الهيدروجيني المتعادل في الوسط الغذائي والبيئي لذلك تنخفض فعاليتها مع زيادة او انخفاض الرقم الهيدروجيني بينما ابدت عزلة $Pssp_2S$ اكثر مقاومة لتغير الرقم الهيدروجيني للوسط اذ يصل مدى تحملها من 3 – 9 في الاوساط الغذائية .وربما ينخفض انتاج الاندول مع زيادة الرقم الهيدروجيني كون المنتج حامض مما يتاثر تكوينه بظروف الوسط . وجد Sanjay و Jeffery ( 1999 ) ان افضل رقم هيدروجيني لبكتريا الوسط *Lactobacillus* لانتاج الاندول كان 6.5 وذكر Sumera واخرون ( 2004 ) عندما اختبروا انتاج الاندول بواسطة 12 عزلة بكتيرية ان هناك مدى واسع للرقم الهيدروجيني يمكن للبكتريا ان تنتج عنده الاندول تراوح بين 4.0 – 8.5 حسب نوع البكتريا وكان افضل انتاج للعزلة *Azospirillum SP.* اذ بلغ معدل انتاجها 90 ملغم / لتر عند الرقم الهيدروجيني 7.0 ، وهذا ما اكده ايضاً Jinichiro واخرون ( 1991 ) الذين ذكروا ان افضل نشاط لانزيم Indole Pyruvate decarboxylase المسؤول عن تكوين IAA في راشح المزرعة لبكتريا *Enterobacter cloaceae* كان عند رقم هيدروجيني 6.5 – 7.

ويعد الرقم الهيدروجيني او درجة تفاعل التربة مهم جداً في فعالية الاحياء واحداث اصابة البكتريا للمجموع الجذري فقد اشار Graham واخرون ( 1994 ) الى ان مدى قدرة الرايزوبيا على تحمل مستويات معينة من pH يعتمد على قابليتها في المحافظة على الرقم الهيدروجيني داخل خلاياها والذي يتراوح بين (7.2 – 7.5 ) .



**شكل ( 3 ) تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط على كمية الاندول المنتج في الوسط**

### 4-9-2 تاثير معدل التهوية وسرعة التحريك للوسط على انتاج الاندول

يلاحظ من الجدول ( 10 ) ان معدل انتاج الاندول قد انخفض بزيادة كمية الهواء المجهزة للوسط وبشكل معنوي اذ بلغ المعدل عند عدم تجهيز الوسط بالهواء 39.72 ملغم / لتر ، في حين انخفض الى 35.4 ملغم / لتر عند تجهيز الوسط بمعدل 1.5 لتر / د. الا انه وجد بزيادة سرعة التحريك ادت الى زيادة الانتاج لحد سرعة تحريك 200 دورة / د وبلغ اعلى مستوى انتاج 40.53 ملغم / لتر مع عدم تجهيز الوسط بالهواء .في حين وجد ان الانتاج بلغ اعلى مستوى له 39.83 ملغم / لتر مع سرعة تحريك 150 دورة / د عند تجهيز الوسط بمعدل 0.5 لتر هواء / د .

من جهة اخرى يوضح الجدول ( 10 ) ان استجابة العزلات في انتاج الاندول مع التهوية وسرعة التحريك قد تباينت ، وحصلت افضل استجابة معنوية مع العزلة $Pssp_2S$ التي بلغ معدل انتاجها 39.79 ملغم IAA / لتر تلتها العزلة $Rsp_8RA$ وبمعدل انتاج قدره 38.03 ملغم / لتر . كما اظهرت النتائج ان التداخل بين المعاملات قد حقق افضل معدل انتاج معنوي تحت المعاملة المؤلفة من استعمال العزلات $Pssp_2S$ و $Rsp_8RA$ مع استعمال سرعة تحريك للوسط 200 دورة / د وعدم تهوية الوسط ، والتي بلغت 42.2 و 41.4 ملغم IAA / لتر على التوالي .

كما ان جميع المعاملات قد انخفض انتاجها بزيادة سرعة التحريك الى 250 دورة /د. ومعدل تهوية 1.5 لتر / د ، وهذا ربما يؤدي الى تغير مسارات ايض الحامض الاميني الى غير انتاج الاندول مع زيادة كمية الاوكسجين في الوسط الذي ربما يزيد من اكسدة بعض المركبات الوسطية قبل تكوينها للاندول غير الدور الذي تلعبه سرعة التحريك في زيادة الانتاج وتوفر مصادر الكاربون وجعلها اكثر جاهزية للعزلات وخلط مكونات الوسط بشكل افضل مما يعني زيادة المساحة السطحية المعرضة للايض الميكروبي التي انعكست على انتاج الاندول . فغالباً

ما تعاني الخلايا الغاطسة في المزرعة السائلة نقصاً في الاوكسجين باستمرار ويتوضح النقص مع زيادة ايض السكر من قبل الخلايا العائمة فوق السطح عما يوجد داخل السائل وتعد طريقة استعمال الهزاز الحل الامثل لذلك اذ يقوم بتوزيع مكونات الوسط في كل اتجاه ويزداد معدل نمو الخلايا . ذكر Bohlman واخرون ( 1998 ) ان عملية التحريك تعوض احياناً عن عملية لتهوية المزرعة وان عملية التهوية والتحريك المناسبة تكون ضرورية للنمو الامثل .

تختلف احتياجات الكائنات المجهرية للتهوية حسب نوع الكائن المجهري وطبيعة نموه وحجم الكتلة الحيوية التي يكونها في الوسط والغرض من العملية الانتاجية واشارت الخفاجي ( 1990 ) انه من الضروري تزويد المزرعة بالاوكسجين بصورة مستمرة خصوصاً بالنسبة للعمليات الانتاجية التي تتطلب نسبة مرتفعة من الاوكسجين الذائب في الوسط كانتاج الاحماض . وأشار Rudy واخرون ( 2004 ) الى زيادة انتاج البكتريا من الاندول عند سرعة تحريك 200 د / د في درجة حرارة 28ْ م مقارنة مع معاملة السيطرة كما لاحظ Maria واخرون ( 2000 ) ان افضل سرعة تحريك لإنتاج الاندول كانت 200 د / د وان جميع سرع التحريك المستعملة ( 100 و 150 و 250 د / د ) قد تفوقت على معاملة السيطرة وهذا ما اكده Shihui واخرون ( 2007 ) .

**جدول ( 10 ) تاثير معدل التهوية وسرعة التحريك للاوساط المحلية على كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم / لتر)**

| رمز العزلة | 0.0 لتر هواء\ دقيقة | | | 0.5 لتر هواء\ دقيقة | | | 1.5 لتر هواء\ دقيقة | | | المعدل العزلات |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 150 | 200 | 250 | 150 | 200 | 250 | 150 | 200 | 250 | |
| $Rsp_2Kr$ | 36.6 | 38.21 | 38.3 | 38.7 | 37.8 | 36.5 | 35.5 | 32.4 | 32.2 | 36.24 |
| $Rsp_8RA$ | 39.35 | 41.4 | 40.2 | 39.8 | 38.6 | 38.2 | 36.4 | 35.1 | 33.3 | 38.03 |
| $Pssp_2S$ | 38.61 | 42.2 | 41.8 | 41.0 | 40.2 | 38.6 | 38.5 | 37.8 | 37.6 | 39.79 |
| المعدل للتحريك | 38.18 | 40.53 | 40.17 | 39.8 | 37.76 | 38.1 | 36.8 | 35.1 | 34.36 | |
| المعدل للتهوية | 39.72 | | | 38.93 | | | 35.40 | | | |

**LSD P> 0.05 Is .= 1.62 Ear =1.81 , Igat=2.05 , Is. Ear Iag. = 2.141**

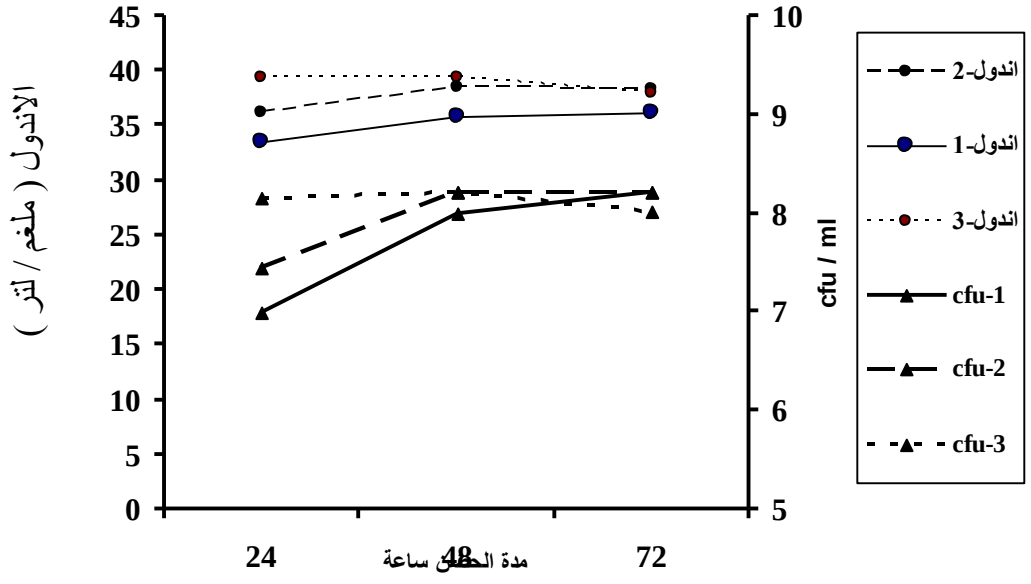
### 4-9-3 تأثير مدة الحضن وحجم اللقاح على انتاج الاندول والكثافة المكروبية

توضح الاشكال ( 4 و 5 و 6 ) ان معدل الكثافة الميكروبية يزداد في الوسط مع زيادة حجم اللقاح ويعد هذا امراً طبيعيا لنمو العزلات اذ بلغ معدل الكثافة 7.72 و 8.06 و 8.26 Log cuf / ml بزيادة حجم اللقاح في الوسط من 1 الى 2 و 3 مل / 100 مل وسط ( ليضمن زيادة الكثافة الابتدائية في الوسط من 5.69 الى 6.0 ثم 6.17 Log cuf / ml للوسط ) والذي اعطى انتاج متزايد بلغ 34.8 و 39.6 و 39.3 ملغم / لتر على التوالي . بينما نجد ان معدل انتاج العزلات للاندول تراوح بين 37.2 و 38.38 ملغم / لتر. الا ان تاثير مدة الحضن قد اظهر تأثيرا متباينا على انتاج الاندول باختلاف تاثير حجم اللقاح اذ تبين الاشكال انه بزيادة مدة الحضن ازداد انتاج الاندول ؛ عند استعمال حجم اللقاح 1 مللتر/100 مل وسط ولجميع العزلات اذ بلغ اعلى معدل انتاج للاندول 35.7 ملغم / لتر بعد 72 ساعة مع وصول معدل للكثافة الميكروبية 8.22 Log cuf / ml. الا ان ذلك تغير عند استعمال حجم اللقاح 2 مل / 100 مل وسط اذ بلغ اعلى معدل لانتاج الاندول 40.7 ملغم / لتر مع معدل كثافة مكروبية 8.28 Log cuf / ml عند مدة حضن 48 ساعة اما عند استعمال حجم اللقاح 3 مل / 100 مل وسط فقد وصل اعلى معدل لانتاج الاندول 41.3 ملغم / لتر وبمعدل كثافة مكروبية 8.27 بعد مدة حضن 24 ساعة . الا ان افضل تداخل للمعاملات قد حصل مع استعمال حجم لقاح 3 مل / 100 مل وسط للعزلتين $Pssp_2S$ و $Rsp_8RA$ عند مدة حضن 24 اذ بلغ انتاجهما من الاندول 42.8 و 41.9 ملغم / لتر وبكثافة مكروبية للعزلات في الوسط 8.41 و 8.25 ml / Log cuf. تعتبر مدة الحضن من العوامل المهمة والمؤثرة على انتاج الاندول بواسطة البكتريا اذ يمكن تقدير المدة التي تصل فيها البكتريا لاقصى مراحل النشاط والانتاج وهذا مرتبط ايضاً بالكثافة الميكروبية وتوفر مصدر الطاقة في الوسط .

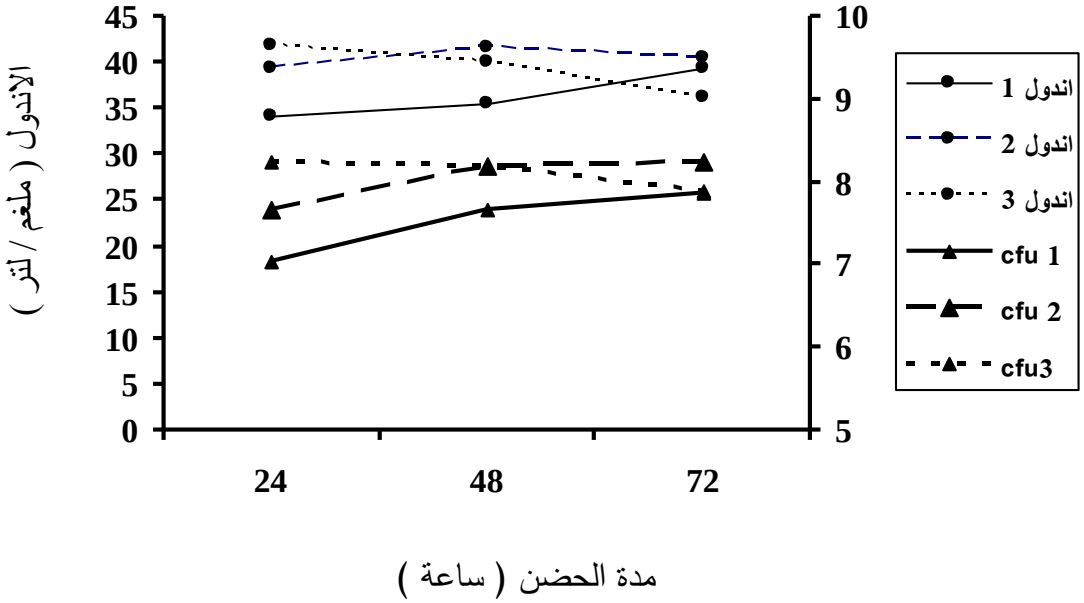
ذكر Ghosh و Basu ( 2002 ) ان بكتريا الرايزوبيا انتجت اكبر كمية من الاندول 22.3 ملغم / لتر عند تنميتها على وسط غني بالتربتوفان بعد مدة حضن 20 ساعة اذ دخلت البكتريا طور الانتاج والاستقرار وكان Jan ( 2000 ) قد اشار الى ان بعض العزلات البكتيرية تنتج كميات من التربتوفان ( الحامض الاميني الاساس في تكوين الاندول ) في مراحل طور التطبيع ثم لايلبث ان يستهلك في المسارات الحيوية لانقسام وتكاثر البكتريا في الطور اللوغارتمي واستطاع Mao واخرون ( 2007 ) من انتاج كميات عالية من الاندول وصلت 162 ملغم / لتر بواسطة بكتريا *E.chryssanthemi* بعد 48 ساعة من الحضن ، في حين وجد Cheryl و Bernard ( 2002 ) ان بكتريا *Ps.putida* ازداد انتاجها من IAA عند اجراء عملية تكسير للخلايا بعد مدة حضن 42 ساعة ليصل الى 100 ملغم / لتر ، ولنفس النوع من البكتريا *(Ps.putida)* ذكر Johan و Steven ( 2005 ) ان انتاجها من الاندول يصل 32 ملغم / لتر نهاية الطور اللوغارتمي ، الا ان بقاء خلايا المزرعة بعد 72 ساعة ادى الى تحلل اكثر من

25 % من الاندول الى مركبات اخرى ، ووجد ارتباطاً معنوياً موجباً بين كتلة الاحياء المجهرية في الوسط بعد 72 ساعة وكمية الاندول المحللة . كما وجد Jinichiro واخرون ( 1991 ) ان 95 % من انتاج الاندول بواسطة بكتريا *Enterobacter* حصل في المدة ( 20 – 40 ) ساعة من التحضين اما بكتريا *A.vinelandii* ، فقد اشار Maria واخرون ( 2000 ) الى ان معظم انتاجها من الاندول البالغ 32.2 ملغم / لتر كان ضمن المدة 40 – 50 ساعة من الحضن وقد اختلف ذلك مع بكتريا *Bacillus* الذي اختبرها Rudy واخرون ( 2004 ) اذ وصل انتاجها من الاندول 38.5 ملغم / لتر بعد 72 ساعة حضن .

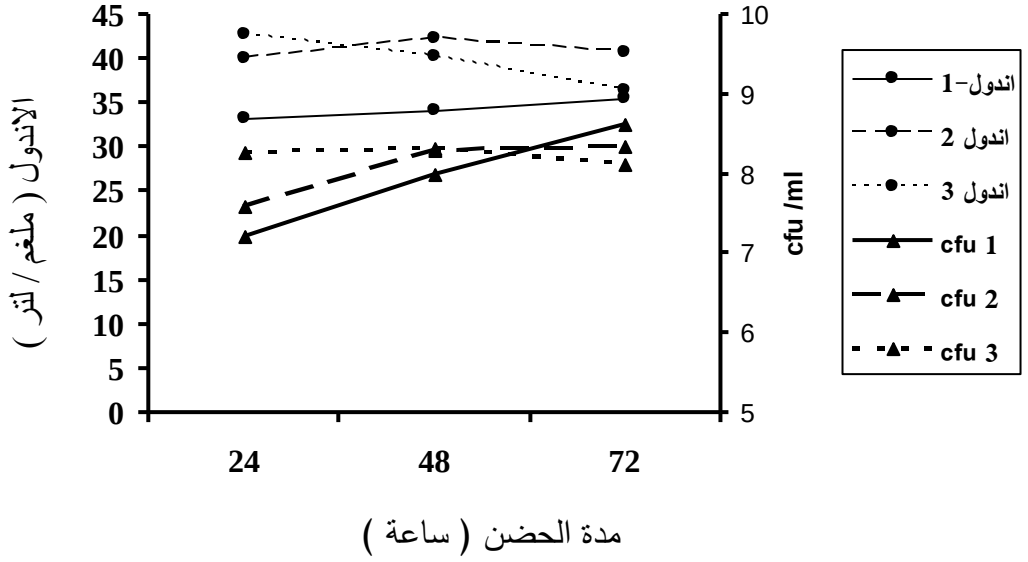
وذكر Sanjay و Jeffery ( 1999 ) ان افضل كثافة مكروبية لبكتريا *Lactobacillus* ولانتاج اعلى تركيز من منظم النمو IAA كانت ( $10^7$ cfu / ml ) ووجد Brandl و Lindow ( 1998 ) ان استخدام لقاح عزلة بكتريا *Erwinia herbicola* اعطى انتاج عالي من الاندول عند استعماله بمعدل ( $5 \times 10^7$ cfu / ml ) واشار Abd – elmalek واخرون ( 1967 ) ان الكثافة الميكروبية تعد من العوامل المهمة والمؤثرة على الكمية المثبتة من النتروجين حيوياً ، وكانت افضل كثافة لتثبيت للنتروجين هي $10^6$ cfu / غم تربة .



**شكل ( 4 ) تأثير حجم اللقاح ومدة الحضن في كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة Rsp2Kr**




**شكل ( 5 ) تأثير حجم اللقاح ومدة الحضن في كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة $Rsp_8RA$**




**شكل ( 6 ) تأثير حجم اللقاح ومدة الحضن على كمية الاندول والكثافة الميكروبية للعزلة $Pssp_2S$**

## 4 – 10 قابلية العزلات المنتخبة في انتاج مركبات خالبة للحديد

اظهرت نتائج العزلات المنتخبة المستخدمة في انتاج الاندول الموضحة في جدول 11 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 ، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج عديد من الباحثين الذين اكدوا قدرة عزلات الرايزوبيا و *Pseudomonas* المنماة في وسط فقير بمحتواه من الحديد على انتاج المركبات الخالية التي يطلق عليها Sidrophores والتي تمثل جزيئات ذات اوزان جزيئية قليلة تنتجها البكتريا لكي تساعدها على خلب الحديد من الوسط عند اذابته من الاملاح المرتبط بها ( 2001 ، Kendal ) ويعد انتاج هذه المركبات لعزلات الرايزوبيا مهمة لمساعدتها في الحصول على عنصر الحديد الذي يعد ضرورياً فهو احد عناصر انزيم النتروجينيز المسؤول عن التثبيت الحيوي للنتروجين من الهواء الجوي ( Hantke 1991 و Braunt ) ، والذي يكون ذوبانه ضعيف تحت ظروف الرقم الهيدروجيني المتعادل في التربة المتعادلة والقاعدية .

واوضحت دراسة عبد الكريم ( 2001 ) قدرة بكتريا *Pseudomonas* المعزولة من التربة في محافظة الانبار على انتاج مركبات خالبة للحديد وقد كان لهذه المركبات القدرة على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات . ووجد Chabot واخرون ( 1996 ) ان بكتريا الرايزوبيا المنتجة للاندول كان لها القدرة على انتاج مركبات السايدروفور عندما قل تركيز الحديد في الوسط عن 3 مايكرو مول . ولاحظ Zakira واخرون ( 2005 ) ان 10 عزلات من مجموع 30 عزلة من بكتريا الرايزوبيا قد انتجت مركبات خالبة للحديد وكانت كافية لتجهيز نبات الذرة بالحديد . اما Fauzia واخرون ( 2005 ) فقد ذكروا ان عزلات من الرايزوبيا انتجت ( 0.3 – 0.5 ) غم / لتر من مركبات السايدروفور .

واستطاع Shikha واخرون ( 2007 ) انتاج كميات من المركبات الخالبة للحديد وصلت 32 ملغم / لتر بواسطة بكتريا الرايزوبيا وكانت هذه المركبات تقع تحت مجموعة ( Hydroxamate ) واشار Maria واخرون ( 2000 ) الى ان عزلات من بكتريا *Pseudomonas* قد انتجت كميات من المركبات الخالبة للحديد في الوسط الخالي منه الا ان تجهيز الوسط بتركيز 1.36 ملغم / لتر من كلوريد الحديديك ادى الى تخفيض واحياناً تثبيط انتاج هذه المركبات .

**جدول ( 11 ) قدرة العزلات على تثبيت النتروجين في الوسط ( ملغم N \ لتر) واذابة الفوسفات ملم وانتاج مركبات السايدروفور**

| رمز العزلة | كمية N ملغم\ 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 | |

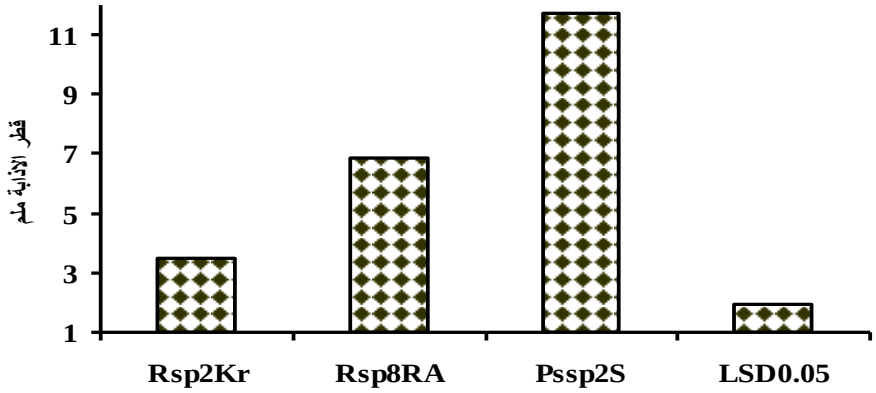
**4- 11 قدرة العزلات المنتخبة على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط**

تبين النتائج في الجدول ( 11 ) والشكل ( 7 ) قدرة العزلات المستعملة في انتاج الاندول على اذابة مركبات ثلاثي فوسفات الكالسيوم ( T - Ca - P ) 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 ( العسافي 2002 ) ، ويعد تواجد مثل هذه الاحياء في التربة وزيادة فعاليتها امراً مهما لقابليتها على اذابة مركبات الفوسفات وجعلها جاهزة للنبات ، وقد استطاع Backing ( 1999 ) من استعمال بعض عزلات من الرايزوبيا والسيدوموناس التي كانت مذيبة لمركبات الفوسفات كلقاحات حيوية بامداد نبات فول الصويا بحاجته من الفسفور الذائب .

ووجد Han و Lee ( 2005 ) ان بكتريا *Bacillus* التي تنتج منظمات النمو IAA و GA3 كان لها القدرة على اذابة الفوسفات في الوسط بمعدل 85 ملغم / لتر وان تلقيح بذور نبات الباذنجان بها ادى الى زيادة نمو وحاصل النبات والفسفور الجاهز في التربة والماخوذ من قبل النبات . كما لاحظ Ponmurugan ( 2006 ) ان البكتريا المذيبة للفوسفات قد حررت كميات من الفسفور الذائب وبواقع 185 ملغم / لتر من الصخر الفوسفاتي وسماد السوبر فوسفات الذي كان يعاني تثبيتاً بواسطة كربونات الكالسيوم في الترب القاعدية والحديد والالمنيوم في الترب الحامضية . واشار Diby و Sarma ( 2006 ) الى ان بكتريا *Pseudomonas* المنتجة للاندول استطاعت من اذابة مركبات الفوسفات بتراكيز 206 و 502 ملغم P / لتر من المصدرين هايدروكسي اباتايت وفوسفات الكالسيوم على التوالي .

ان قدرة البكتريا على اذابة الفوسفات في الوسط تعود الى قدرتها على تكوين بعض الاحماض العضوية مثل اللاكتيك والستريك والاوگزاليك والسكسنيك والاحماض غير العضوية مثل الكبريتيك والنتريك وكذلك تكوينها لغاز ثاني اوكسيد الكاربون الذي يذوب في الماء مكوناً

حامض الكاربونيك فضلا عن انتاج بعض الانزيمات التي تحرر الفسفور من بعض مركباته العضوية ، فقد وجد العسافي ( 2002 ) ان 4 عزلات بكتيرية منتخبة تميزت بكفاءة عالية في اذابة الفسفور في الوسط وكان هناك تباين واضح بين قدرة العزلات على الاذابة ، وعزى ذلك الى مدى قدرة هذه العزلات على انتاج الاحماض العضوية وطبيعة ونوع الاحماض اذ تراوحت تراكيز الاحماض العضوية المنتجة للعزلات المنتخبة بين ( 3.4 – 8.1 ) غم / لتر لاحماض الستريك والاوكزاليك والسكسنيك .



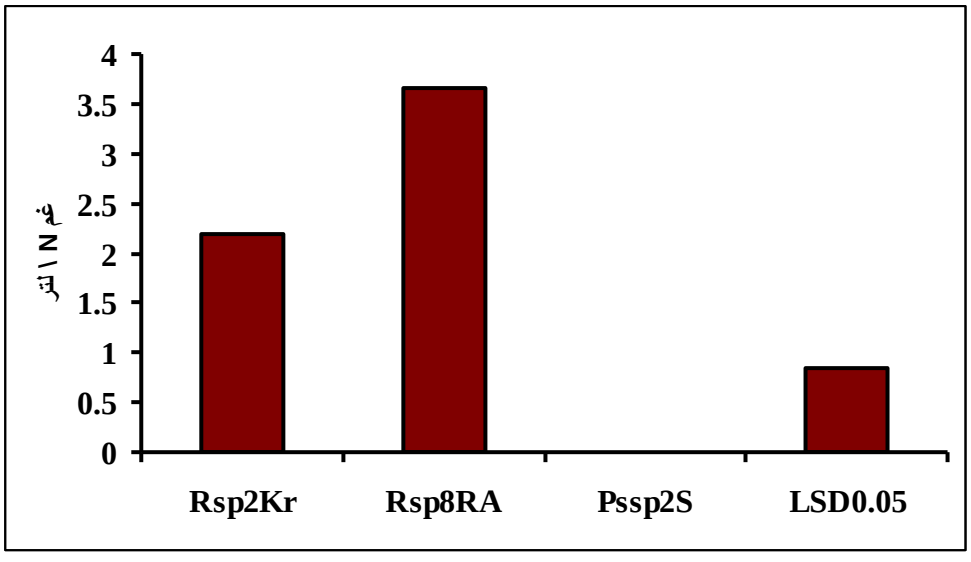

شكل ( 7 ) قدرة العزلات على إذابة الفوسفور – قطر منطقة الإذابة ملم

**4- 12 قدرة العزلات في تثبيت النيتروجين في الوسط**

تبين النتائج الموضحة في الجدول ( 11 ) والشكل ( 8 ) 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 ( لعدم احتواء الوسط على مصدر للنتروجين ) 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( Martin واخرون ، 1989 ) وكذلك Elshanshoury ( 1995 ) واشار Biswas واخرون ( 2000 ) الى ان عملية تثبيت النتروجين تزداد بزيادة منظمات النمو التي تحسن قابلية النبات على تكوين العقد الجذرية وقد اثبتوا باستعمال النتروجين المشع $N^{15}$ ان زيادة كمية النتروجين في النبات والتربة قد حصلت من

تظافر مشترك بين منظمات النمو المنتجة من قبل البكتريا في بيئة الجذور والعقد الجذرية التي تقوم بتثبيت النتروجين الجوي .

كما وجد Martin واخرون ( 1989 ) ان بكتريا *Azospirillum* المنتجة للاندول لها القدرة على تثبيت النتروجين في الوسط وذكروا ان تجهيز التربة بالنتروجين المعدني ( نترات الامونيوم ) قد قلل عملية تثبيت النتروجين واعداد البكتريا المثبتة للنتروجين في التربة ، وحصلوا على نتائج متشابهة عند رش نترات الامونيوم على اوراق النبات . وقدر Zakira واخرون ( 2005 ) نشاط انزيم النتروجينيز لعدد ( 19 ) عزلة من الرايزوبيا اذ تراوح بين ( 22 – 3624 ) ملغم $C_2H_4$ / لتر.ساعة ، حسب نوع العزلات وكانت جميع العزلات منتجة للاندول اما Fauzia واخرون ( 2006 ) فقد حصلوا على نشاط لانزيم النتروجينيز بين ( 20 – 556 ) ملغم $C_2H_2$ / لتر.ساعة . من عزلة الرايزوبيا التي كان انتاجها من الاندول بين ( 0.8 – 42.1 ) ملغم / لتر ووجد Jong وآخرون (2003) 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 .




**شكل ( 8 ) قدرة العزلات على تثبيت النيتروجين في الوسط غم N\ لتر**

**13-4 تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات على فعاليته**

اوضحت نتائج حساب نسب الانبات وسرعته الموضحة في الجدول ( 12 ) تفوق فعالية رواشح العزلات المحفوظة بدرجة حرارة 4 و 25ْ م لمدتين مختلفتين ( 1 و 45 ) يوم مقارنة باستعمال الاندول الصناعي ومعاملة السيطرة وتباينت الفروقات في التاثير للمعاملات حسب نوع النبات وكالاتي :

1- بذور فول الصويا ( *Glycine max L.* ) : تحققت اعلى نسبة انبات100 % للبذور خلال اليوم الرابع للزراعة مع استعمال راشح العزلة $Rsp_8RA$ والمخزون ليوم واحد في درجة حرارة 4ْ م و 25ْ م. كما حصل على نفس النتيجة لنسبة الانبات في اليوم الخامس للزراعة مع استعمال راشح العزلة $Rsp_2Kr$ المخزون ليوم واحد في درجتي حرارة 4 و 25ْ م ، كذلك اعطى راشح العزلة $Pssp_2S$ المخزون في 25ْ م لمدة يوم واحد نسبة انبات 100 % في اليوم الخامس للزراعة ( جدول 12 ) في حين اعطى راشح العزلة نفسها المخزون في 4ْ م لمدة يوم واحد نسبة انبات 100 % في اليوم السادس ، وادى استعمال راشح العزلتين $Rsp_2Kr$ و $Rsp_8RA$ المخزون لمدة 45 يوم في 4ْ م الى اعطاء نسبة انبات 100 % في اليوم السادس للزراعة ( جدول 12 ) . الا ان فعالية راشح العزلات انخفضت عند خزنه لمدة 45 يوم بدرجة حرارة 25ْ م اذ وصلت نسبة الانبات 80 % خلال اليومين الخامس والسادس ، في حين انها لم تختلف عما تحقق عند استعمال الاندول الصناعي الذي اعطى نسبة انبات 80 % في اليوم الخامس وازدادت الى 90 % في اليوم السادس ( جدول 12 ). بينما وصلت نسبة الانبات في معاملة السيطرة الى 80 % في اليوم السابع للزراعة. وبذلك فان استعمال رواشح العزلات قد حقق زيادة في نسبة وسرعة الانبات بلغت 20 % مقارنة بمعاملة السيطرة وبفارق ثلاثة ايام .

2- بذور القطن ( *Gossypium hirsutum* ) : اظهر استعمال راشح العزلة $Pssp_2S$ المخزون ليوم واحد في درجة حرارة 4 و 25ْ م اعلى معدل في نسبة الانبات بلغت 100% في اليوم الخامس للزراعة ، بينما ادى استعمال راشح العزلة $Rsp_8RA$ المخزون في درجة حرارة 4ْ م لمدة يوم واحد و 45 يوم وكذلك الراشح المخزون في ْ25م 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 4ْ م او 25ْ 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 .

3- بذور الباذنجان ( *Solanum melongena* ) : ادى استعمال راشح العزلة $Pssp_2S$ المخزون ليوم واحد في درجة حرارة 4ْ م و 25ْ 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 تحسن زيادة في معدل نسبة الانبات بلغت 20 % مقارنة بمعاملة السيطرة وبفارق زمني قدره 3 ايام .

4- بذور الفلفل ( *Capsicum annuum* ) : ادى استعمال راشحي العزلتين $Rsp_2Kr$ و $Rsp_8RA$ المخزون ليوم واحد في درجتي 4 ْم و 25 ْم الى حصول نسبة انبات 100% خلال اليوم 6 ، بينما تراوحت نسب الانبات بين ( 80 – 90 % ) في اليوم 7 . من جانب اخر ادى استعمال الاندول الصناعي الى حصول نسبة انبات 100 % في اليوم 7. وبذلك ادى استعمال رواشح العزلات المشار اليها الى زيادة في نسبة الانبات بلغت 20% وبفارق زمني قدره 4 ايام عن معاملة السيطرة .

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 ( 1979 , Moor وكذلك Fullick , 2000 ) . ان هذه النتائج تتفق مع ما جاء به Ramazan واخرون ( 2007 ) الذين ذكروا ان نسبة انبات بذور الشعير قد زادت حوالي ( 17.9 – 32.1 ) % مقارنة مع معاملة السيطرة عند استخدام منظمات النمو النباتية مثل IAA و GA3 . كما لاحظ Dilfuza ( 2007 ) 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 . وفي دراسة اجراها Shikha واخرون ( 2007 ) على منظم النمو IAA المنتج بواسطة بكتريا الرايزوبيا لاحظوا ان الاندول قد ادى الى زيادة نسبة وسرعة الانبات لنبات اللهانة ( *Brassica campestris* ) حيث ارتفعت نسبة الانبات من 54 % في معاملة السيطرة الى 75 % عند استعمال منظم النمو ( IAA ) . ويتضح من خلال التجارب ان تخزين الراشح لمدة طويلة وبدرجة حرارة عالية نسبياً فانه يفقد فعاليته وفي دراسة قام بها Almonacid واخرون ( 2000 ) 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. اما Berg ( 1990 ) فقد لاحظ انه من خلال تخزين راشحي العزلتين *Azospirillum* و *Bacillus* درجة حرارة 5 و 35ْ م ولمدة 30 يوم واثر ذلك على انتاج الاندول وجد ان عزلة *Bacillus* قد تفوقت عموماً بالانتاج على عزلة *Azospirillum* ولم يكن هناك فرقاً معنوياً في الانتاج عند تخزين الراشح بدرجة 5ْ م مقارنة بالانتاج الاولي بينما انخفض انتاج الاندول عند التخزين بدرجة حرارة 35ْ م ولكلا العزلتين الا ان العزلة *Bacillus* كانت اكثر مقاومة لظروف التخزين وافضل انتاجاً للاندول من العزلة *Azospirillum* .

**جدول ( 12 ) يوضح تاثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات على نسبة وسرعة الانبات**

| النبات | $Pssp_2S$ | | | | $Rsp_8RA$ | | | | $Rsp_2kr$ | | | | IAA | السيطرة | الأيام |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 25 مْ | | 4 مْ | | 25 مْ | | 4 مْ | | 25 مْ | | 4 مْ | | | | |
| | 45 يوم | 1 يوم | 45 يوم | 1 يوم | 45 يوم | 1 يوم | 45 يوم | 1 يوم | 45 يوم | 1 يوم | 45 يوم | 1 يوم | | | |
| فول الصويا | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 6 | 2 | 6 | 0 | 2 | - | 2 | - | - | 3 |
| | 2 | 6 | 5 | 5 | 4 | 10 | 6 | 10 | 2 | 7 | 6 | 7 | 4 | - | 4 |
| | 7 | 10 | 9 | 9 | 8 | - | 9 | - | 6 | 10 | 9 | 10 | 8 | 4 | 5 |
| | 8 | - | 9 | 10 | 8 | - | 10 | - | 8 | - | 10 | - | 9 | 6 | 6 |
| | 8 | - | 9 | - | 8 | - | - | - | 8 | - | - | - | 9 | 8 | 7 |
| 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 |
| فلفل | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 4 |
| | - | - | - | - | - | 8 | - | 6 | - | 8 | 5 | 8 | 4 | - | 5 |
| | - | 5 | - | 6 | 5 | 10 | 6 | 10 | 4 | 10 | 8 | 10 | 9 | - | 6 |
| | 8 | 8 | 6 | 9 | 9 | - | 9 | - | 8 | - | 9 | - | 10 | - | 7 |
| | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | - | 9 | - | 8 | - | 9 | - | - | 4 | 8 |
| | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | - | 9 | - | 8 | - | 9 | - | - | 6 | 9 |
| | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | - | 9 | - | 8 | - | 9 | - | - | 8 | 10 |

## 4-14 التجربة البايلوجية التطبيقية

### 4-14-1 صفات النمو الخضري

**أ- نسبة وسرعة الانبات**

تبين النتائج الموضحة في الجدول ( 13 ) ان اعلى معدل لنسبة انبات لبذور فول الصويا بلغ 100 % خلال اليوم 4 بعد الزراعة عند استعمال معاملة خليط العزلتين $Rsp_8RA$ و $Pssp_2S$ وراشحيهما ومعاملة خليط لقاح العزلتين ، تلتها معاملة لقاح العزلة $Rsp_8RA$ وراشحها بنسبة انبات 95 % في اليوم 4 بعد الزراعة. وقد ادى ذلك الى تحقيق زيادة في نسبة الانبات قدرها 25 % و 20 % وبفارق زمني قدره يومين مقارنة بمعاملة السيطرة . كذلك تحققت زيادة في معدل نسبة الانبات قدرها 14 و 9 % مقارنة باستعمال معاملة الاندول الصناعي . ان هذه النتائج تؤكد تحقيق نسبة انبات قدرها 100 % مع استعمال راشح العزلتين ، وهذا يؤكد اهمية هذه الرواشح ودورها في تحفيز الخلايا على النمو لما تحتويه من الاندول الفعال والمركبات الاخرى. واتفقت هذه النتائج مع ما ذكره Almonacide واخرون ( 2000 ) من ان استعمال رواشح عزلات البكتريا ادى الى تحسين الانبات والنمو لنبات الخس . ووجد Brandel و Lindow ( 1998 ) ان استعمال راشح العزلة *E.herbicola* المخفف بنسبة 1 : 1 بالماء المقطر عمل على زيادة نسبة الانبات وطول الجذير والبادرة لنبات الفاصوليا .

وفي دراسة اجراها Dilfuza ( 2007 ) وجد ان منظمات النمو المنتجة بواسطة ثلاثة اجناس من البكتريا هي *Pseudomonas* و *Bacillus* و *Mycobacteirum* قد عملت على زيادة نسبة انبات بذور الذرة المخزنة بنسب تراوحت بين ( 20 – 50 % ) مقارنة مع معاملة السيطرة . وهذا ما اكده Shikha واخرون ( 2007 ) بان منظم النمو IAA المنتج من قبل الرايزوبيا ادى الى حصول نسبة انبات لنبات *Brassica campestris* تراوحت بين ( 72 – 75 % ) مقارنة بمعاملة السيطرة ( 54 % ) بعد مرور 15 يوم من الزراعة . كما اكدت هذه النتائج بلوغ اعلى سرعة انبات خلال اليوم 4 مع استعمال رواشح العزلات ايضاً والاندول الصناعي ، الا انها تاخرت الى اليوم 5 مع استعمال العزلات من غير رواشحها والى اليوم 6 في معاملة السيطرة ، وتعد سرعة الانبات وظهور البادرات في وقت واحد وبأعلى نسبة انبات مهمة في العمليات الزراعية ، اذ يساعد في اجراء عمليات خدمة المحصول باوقات مبكرة كما تكون النباتات ذات معدلات نمو متجانسة في الحقل ، مما يسهل عمليات المكافحة والحصاد وتوفير كمية البذور المستعملة عند ضمان نسب انبات عالية في الحقل .

**جدول ( 13 ) تاثير المعاملات على النمو الخضري وبعض صفاته**

| المعاملات | نسبة الانبات | سرعة الانبات يوم بعد الزراعة | عدد الافرع | طول النبات سم | المساحة الورقية دسم $^2$ | الكلوروفيل % | الوزن الجاف غم/ نبات |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| الراشحين + $Rsp_8RA$+ $Pssp_2S$ | 100 | 4 | 4.33 | 81.2 | 78.4 | 39.6 | 51.2 |
| $Rsp_8RA$+ $Pssp_2S$ | 85 | 4 | 4.00 | 76.4 | 73.9 | 37.2 | 46.4 |
| الراشح+$Rsp_8RA$ | 95 | 4 | 3.66 | 72.6 | 69.9 | 36.5 | 42.1 |
| الراشح+ $Pssp_2S$ | 90 | 4 | 3.66 | 66.8 | 60.4 | 28.4 | 41.35 |
| $Rsp_8RA$ | 80 | 5 | 3.33 | 65.3 | 68 | 31 | 36.16 |
| $Pssp_2S$ | 80 | 6 | 3.33 | 61.9 | 54 | 26.4 | 34.22 |
| IAA | 86 | 4 | 3.00 | 61.1 | 49 | 30.1 | 32.5 |
| خليط الراشحيين | 100 | 4 | 3.50 | 60.3 | 50.8 | 29.7 | 32.7 |
| راشح - $Rsp_8RA$ | 90 | 4 | 2.66 | 58.2 | 48.2 | 26.2 | 26.5 |
| راشح - $Pssp_2S$ | 90 | 4 | 2.66 | 42.9 | 36.1 | 24.1 | 24.6 |
| Control | 75 | 6 | 2.33 | 36.5 | 29.3 | 21.8 | 24.3 |
| LSDP>0.05 | - | 0.21 | 0.77 | 2.96 | 2.23 | 1.45 | 2.88 |

**ب : ارتفاع النبات**

يتضح من النتائج الموضحة في الجدول ( 13 ) ان اعلى معدل معنوي لطول النبات بلغ 81.2 سم عند استعمال معاملة خليط العزلتين وراشحيهما ، تلاهما استعمال خليط العزلتين وبمعدل طول بلغ 76.4 سم بينما بلغ معدل طول النبات مع استعمال الاندول الصناعي

ومعاملة السيطرة بمعدل 61.1 و 36.5 على التوالي . في حين تراوح معدل طول النبات بين 72 و 62 سم عند استعمال لقاح كل عزلة مع راشحها او اللقاح لوحده ، كما ادى استعمال خليط راشح العزلتين الى حصول معدل لطول النبات 60 سم. بينما بلغ معدل طول النبات 58.2 و 42.9 عند استعمال راشحي العزلتين $Rsp_8RA$ و $Pssp_2S$ كلاً على انفراد وعلى التوالي . وتتفق هذه النتائج مع ما اشار اليه Ostin واخرون ( 1998 ) و Zhao واخرون (2005 ) و Ramazan واخرون ( 2007 ) الذين ذكروا ان استعمال العزلات البكتيرية ورواشحها تؤدي الى زيادة اطوال النباتات المستخدمة في تجاربهم .

## صورة للنبات

**جـ – المساحة الورقية**

تبين من خلال الجدول ( 13 ) ان اكبر مساحة ورقية مقدرة في النبات بلغت 78.4 دسم$^2$ عند استعمال خليط لقاح العزلتين وراشحيهما ، تلتها معاملة خليط لقاح العزلتين بمعدل 73.9 دسم$^2$ وتوافقت نتائج المساحة الورقية مع الزيادات الحاصلة في قياسات ارتفاع النبات ، الا انها اختلفت مع استعمال معاملتي الاندول الصناعي والسيطرة لتصل الى معدل مساحة ورقية 49 دسم$^2$ و 29.3 دسم$^2$ على التوالي . في حين تراوح معدل المساحة الورقية ( 69.9 – 54 ) دسم$^2$ عند استعمال العزلتين كل على انفراد او لقاح كل عزلة مع راشحها. بينما ادى استعمال خليط راشحي العزلتين او الراشحين كل على انفراد الى معدل مساحة ورقية تراوح من 50.8 الى 36.1 دسم$^2$ . وهذا ما اكده Chabot واخرون ( 1996 ) ، ووجد Newaj ( 2002 ) ان رش الاندول على اوراق الموز وبتركيز 600 ملغم / لتر ادى الى زيادة معنوية في المساحة الورقية لنبات الموز كما وجد Rasul ( 1999 ) ان الاندول المنتج بواسطة بكتريا *Azospirillum* عمل على زيادة المساحة الورقية والوزن الجاف لنبات الرز .

**د – عدد الافرع**

يبين الجدول ( 13 ) ان اعلى معدل لعدد الافرع النباتية المتكونة في النبات بلغ 4.33 فرع/ نبات مع المعاملة المضاف اليها خليط لقاح العزلتين وراشحيهما ، تلتها معاملة لقاح العزلتين وبمعدل 4.0 فرع / نبات . في حين تساوى معدل عدد الافرع بمعدل 3.66 فرع عند

اضافة لقاح كل عزلة مع راشحها. كذلك انخفض معدل عدد الافرع مع استعمال لقاح كل عزلة على حدة الى معدل 3.33 فرع / نبات. وتساوى معدل عدد الافرع عند استعمال خليط الراشحين مع عدد الافرع عند استعمال الاندول الصناعي فبلغ 3 فرع / نبات وانخفض ايضاً ليصل معدل 2.66 فرع / نبات مع استعمال راشح كل عزلة على حدة. وبلغ ادنى معدل له مع معاملة السيطرة اذ بلغ 2.33 فرع / نبات .

اكد Estelle ( 1992 ) ان الاوكسينات مهمة جداً في عمليات انقسام الخلايا واستطالتها وتطور المجموع الخضري وتشجيع نمو البراعم الجانبية ، ولاحظ شاهين (2003) زيادة الافرع الجانبية عند رش نباتات الداليا الصغيرة بتراكيز تراوحت بين ( 100 – 200 ملغم / لتر ) من IAA و GA3 . كما وجد Fullick ( 2000 ) ان استعمال منظم النمو IAA المنتج طبيعياً بواسطة البكتريا وبتراكيز ( 10 – 30 ملغم / لتر ) زاد النمو الخضري والتفرعات لنبات الرشاد وقد عزى ذلك الى زيادة استطالة وانقسام الخلايا . اما Suckstorff و Berg ( 2003 ) فبين ان بكتريا *Stenoterophomonas* التي لقح بها نبات الفراولة ادت الى زيادة وتطور الافرع الهوائية في النبات نتيجة لانتاج الاندول بواسطة هذه البكتريا .

**هـ – الكلوروفيل**

اوضحت النتائج المبينة في الجدول ( 13 ) ان اعلى معدل لنسبة الكلوروفيل في اوراق النبات بلغت 39.6 % مع استعمال خليط لقاح العزلتين وراشحيهما ، تلتها معاملة خليط العزلتين ثم عزلة $Rsp_8RA$ مع راشحها اذ بلغ معدل نسبة الكلوروفيل 37.2 % و 36.5 % على التوالي. وانخفضت نسبة الكلوروفيل معنوياً في المعاملات التي استعمل بها لقاح عزلة $Rsp_8RA$ و IAA الصناعي وخليط الراشحين اذ تراوحت النسبة بين 31.1 و29.7 % الا انها ازدادت في الانخفاض المعنوي لتصل بين 26.4 و 24.1 مع استعمال معاملات لقاح بكتريا $Pssp_2S$ لوحدها او مع راشحها ، في حين بلغت نسبة الكلوروفيل ادنى مستوى لها 21.8 % مع معاملة السيطرة. والكلوروفيل هو الصبغة الخضراء في النبات واكثرها اهمية وفعالية في خطوات عملية التركيب الضوئي هذه العملية التي هي اساس الحياة ، والتي بواسطتها يتحول ضوء الشمس الى طاقة كيميائية بتفاعلات ضوئية كيميائية حيوية ( كاظم والريس 1987 ) . ذكر Ostin واخرون ( 1998 ) ان لمنظمات النمو دوراً هاماً في زيادة نسبة الكلوروفيل في النبات والذي ينعكس ايجابياً على الحاصل .ولاحظ El -Nabaraway ( 2001 ) ان منظمات النمو ومنها IAA قد زادت نسبة الكلوروفيل في النبات كما ان رش النبات بمنظمات النمو يحافظ على نسبة الكلوروفيل في النبات حتى وان وضعت في الظلام لفترة معينة . ووجد Rasul ( 1999 ) ان بكتريا *Azospirillum* التي انتجت 35 ملغم IAA / لتر زادت

نسبة الكلوروفيل في اوراق نبات الرز وكان Marcos واخرون (1994) قد بينوا ان منظمات النمو المنتجة بواسطة بكتريا الرايزوبيا ادت الى زيادة نسبة الكلوروفيل في اوراق نبات الطماطة .

**و – الوزن الجاف للمجموع الخضري**

حصل اعلى معدل للوزن الجاف 51.2 غم / نبات عند استعمال معاملة خليط العزلتين وراشحيهما ( جدول 13 ) تلتها معاملة خليط العزلتين بمعدل 46.4 غم / نبات. بينما كان معدل الوزن الجاف للنبات هو 32.5 و 22.3 غم / نبات عند استعمال الاندول الصناعي ومعاملة السيطرة على التوالي . واقترب الوزن الجاف في معاملتي استعمال كل عزلة مع راشحها ، بمعدل الوزن الجاف تراوح بين 41.35 و 42.10 غم / نبات . في حين انخفض معدل الوزن الجاف عند استعمال لقاح العزلتين كل على حدة وبدون الرواشح فبلغ 36.16 و 34.22 غم / نبات . اظهر استعمال خليط راشحي العزلتين نتائج مماثلة لاستعمال معاملة الاندول الصناعي فبلغ الوزن الجاف 32.7 و 32.5 غم / نبات على التوالي . اما عند استعمال راشح العزلتين كل على انفراد انخفض معدل الوزن الجاف للنبات معنوياً ليصل الى 26.5 و 24.6 غم / نبات .

ويأتي تطور المجموع الخضري بواسطة منظمات النمو من خلال تأثيرها على عمليتي انقسام واستطالة الخلايا وتليين جدران الخلية وزيادة ضغطها الازموزي وبالتالي زيادة قدرة الخلايا على امتصاص الماء والغذاء ، فقد ذكر سلامة واحمد ( 2005 ) ان استعمال منظمات النمو ( IAA و GA3 و Kietin ) ادت الى زيادة مقاييس النمو الخضري والسكريات الذائبة لنباتي القمح والفاصوليا كما اشار Patten و Glick ( 1996 ) . ان الاوكسينات مهمة جداً في عمليات انقسام الخلايا واستطالتها وتطور المجموع الخضري وهذا ما اكده ايضاً Newja واخرون ( 2002 ) من ان رش الاندول على اوراق الموز ادى الى زيادة معنوية في الوزن الجاف للمجموع الخضري ومعدل سرعة النمو ، وكان التركيز 600 ملغم / لتر هو الاكثر ملائمة من بين التراكيز 300 و 900 ملغم / لتر ووجد كل من Rasul ( 1999 ) و Marcos واخرون ( 1994 ) ان منظمات النمو المنتجة من قبل البكتريا ادت الى زيادة الوزن الجاف لنباتي الشعير والطماطة .

**4-14-2 صفات النمو الجذري**

**أ – عدد العقد وحجمها وفعاليتها**

يوضح الجدول ( 14 ) تأثير المعاملات المستعملة في اعداد العقد الجذرية المتكونة على المجموع الجذري لنبات فول الصويا فقد اظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين المعاملات اذ بلغ متوسط اعداد العقد الجذرية 56.3 عقدة / نبات مع استعمال معاملة خليط

لقاح العزلتين وراشحيهما بنسبة 82.4 % منها عقد فعالة تميزت بلون وردي محمر وجدار شفاف كما تراوح معدل قطر 18.4 عقدة منها بين ( 10 – 5 ملم ) . كما بلغ معدل عدد العقد الجذرية المتكونة في الجذور 48.4 عقدة / نبات تحت معاملة استعمال لقاح العزلة $Rsp_8RA$ وراشحها نسبة 67 % للعقد الفعالة فيها كما ووصل معدل عدد العقد ذات القطر (10 – 5 ملم ) 13.5 عقدة / نبات ، وبلغ معدل عدد العقد الجذرية المتكون في جذور النبات الملقح من خليط لقاح العزلتين 33.2 عقدة / نبات ، كانت نسبة العقد الفعالة فيها 61.74 % ، وقد وصل معدل عدد العقد ذات القطر ( 10 – 5 ملم ) الى 8.4 عقدة ، في حين وصل معدل عدد العقد الجذرية 20.2 عقدة / نبات مع استعمال خليط راشحي العزلتين بنسبة 70 % للعقد الفعالة كان منها 7 عقده / نبات بقطر 10 – 5 ملم . في حين ادى استعمال معاملة الاندول الصناعي الى تكون 18 عقدة على جذور النبات كان 67.2 % منها فعالة وبلغ عدد العقد ذات القطر 10 – 5 ملم 3.1 عقدة / نبات .

من جهة اخرى لم يظهر تكون للعقد الجذرية على جذور النبات في معاملة السيطرة ورغم تكون بعض العقد الجذرية باستعمال لقاح العزلة $Pssp_2S$ الا انها لم تكن فعالة . ان لمنظمات النمو دوراً هاماً في تكوين العقد الجذرية وحجمها وفعاليتها فقد ذكر Hoflich واخرون ( 1995 ) ان تواجد بكتريا الرايزوبيا وبقائها في منطقة الرايزوسفير مع النبات غير البقولية يحدد بالظروف البيئية وترتبط قدرتها على احداث الاصابة بكمية الهرمونات التي تنتجها لتعمل انحناء في الشعيرات الجذرية للنبات واشارت الدراسات التي قام بها Glick ( 1995 ) و Vincent ( 1970 ) و Weller و Cook ( 1983 ) الى ان جذور النباتات البقولية غالباً ما تصاب ببكتريا العقد الجذرية ، وان عملية الاحتكاك والاستيطان لبكتريا الرايزوبيا على القمم النامية للشعيرات الجذرية يكون بسبب الانحناء للشعيرات الجذرية تجاه المواد المنتجة من البكتريا العقدية المتمثلة بمنظمات النمو والذي يعد الخطوة الاولى لحدوث الاستيطان والاصابة لتكوين العقد الجذرية . ووجد كل من Ghosh و Basu ( 2002 ) و Barbieri و Galli ( 1993 ) ان بكتريا الرايزوبيا وبكتريا *Azospirillum* انتجت كميات من الاندول الذي كان له الدور الهام في تكوين اكبر عدد من العقد الجذرية الفعالة .

وذكرت الخفاجي ( 1990 ) ان عملية الاصابة للشعيرات الجذرية لاتحدث الا في مناطق خاصة يطلق عليها البقعة الزجاجية التي تكون مشبعة بالاندول ، والتي تكون مستعدة للانقسام المرستيمي والتضاعف بفعل الهرمونات المنتجة بكتيرياً وذكرت ايضاً ان ليس جميع انواع الرايزوبيا يمكنها ان تكون عقد جذرية تثبت النتروجين ، اذ ان هناك انواع يمكنها تكوين عقد جذرية لكنها لا تستطيع تثبيت النتروجين او تثبت كمية قليلة منه يطلق عليها بالعقد غير الفعالة ، وهذا ما اكده المصلح والحيدري ( 1990 ) بانه كلما كانت البكتريا قادرة على انتاج

الاوكسينات ومنظمات النمو الاخرى ، واستطاعت تكوين البكتروبد ( Bacteroids ) لقدرة هذه المواد على تشجيع انقسام الخلايا وزيادة قابلية الاختراق لخلايا النبات .

صور العقد الجذرية

**جدول ( 14 ) تاثير المعاملات على النمو الجذري وبعض صفاته**

| المعاملات | عدد العقد/نبات | عدد العقد الفعالة | عدد العقد حسب القطر سم | | الوزن جذور غم/ نبات |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 5 -10 | 2 - 5 | |
| الراشحين + $Rsp_8RA$+ $Pssp_2S$ | 56.3 | 46.4 | 18.4 | 28 | 10.4 |
| $Rsp_8RA$+ $Pssp_2S$ | 33.2 | 20.5 | 8.4 | 12.1 | 7.33 |
| الراشح+$Rsp_8RA$ | 48.4 | 32.4 | 13.5 | 13.9 | 8.2 |
| الراشح+ $Pssp_2S$ | 12.3 | 8.3 | 5.2 | 3.1 | 6.84 |
| $Rsp_8RA$ | 18.2 | 11.2 | 4.2 | 7 | 6.9 |
| $Pssp_2S$ | 6.2 | 0 | 0 | 0 | 5.61 |
| IAA | 18 | 12.1 | 3.1 | 9 | 5.01 |
| خليط الراشحيين | 20.2 | 14.2 | 7 | 7.2 | 5.01 |
| راشح - $Rsp_8RA$ | 18.6 | 12.8 | 7.1 | 5.7 | 4.12 |
| راشح - $Pssp_2S$ | 12.5 | 5.2 | 2.5 | 2.7 | 4.31 |
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.61 |
| LSDP>0.05 | 3.64 | 2.05 | 1.34 | 2.38 | 1.65 |

**ب – الوزن الجاف للمجموع الجذري**

يتضح من ملاحظة النتائج المبينة في الجدول ( 14 ) تفوق وزن المجموع الجذري الجاف معنوياً للنباتات باستعمال المعاملة المكونة من خليط لقاح العزلتين وراشحهما مقارنة بالمعاملات الاخرى ، اذ بلغ معدل الوزن الجاف لجذورها 10.4 غم / نبات تلتها معاملة العزلة $Rsp_8RA$ مع راشحها بمعدل وزن جاف لجذورها بلغ 8.2 غم / نبات ، ثم معاملة خليط لقاح العزلتين وبمعدل وزن جذري قدره 7.33 غم / نبات. في حين بلغ ادنى معدل لوزن الجذور مع معاملة السيطرة اذ بلغ 2.61 غم / نبات ، كما تماثل معدلي وزن الجذور المتحقق من استعمال خليط راشحي العزلتين مع معاملة استعمال الاندول الصناعي بوزن جذري جاف قدره 5.04 و 5.01 غم / نبات على التوالي .

ان التراكيز المناسبة من منظمات النمو تكون ضرورية لنمو وتطور الجذور ، فقد ذكر الباسط واخرون ( 2006 ) ان منظمات النمو المتمثلة باندول حماض الخليك واندول حامض البيوتاريك وحامض الجبرليك المنتجة من قبل بكتريا الرايزوبيا والاوزوتوبكتر ادت الى زيادة نمو المجموع الجذري وتكوين العقد الجذرية ونشاط انزيم النتروجينيز ووجد Fauzia واخرون ( 2006 ) ان تلقيح نبات القمح ببكتريا الرايزوبيا المنتجة للاندول ادى زيادة الوزن الجاف لجذور نبات القمح الملقحة مقارنة بالنباتات غير الملقحة . واشار Cheryl و Bernard ( 2002 ) الى ان لمنظم النمو IAA دوراً هاماً في تطور نظام الجذور في النبات ، وادى استعماله الى زيادة طول الجذر وبنسبة تراوحت بين ( 35 – 50 % ) مقارنة بمعاملة السيطرة .

ولاحظ Mao واخرون ( 2007 ) ان استعمال IAA لنبات الطماطة ادى الى زيادة الوزن الجاف للمجموع الجذري عن طريقة زيادة طول وتفرعات الجذور ، اما Okon و Kapulink ( 1986 ) اشار الى ان الجذور النباتية تحتاج الى تراكيز من IAA تتراوح بين 40 – 100 ملغم / لتر وقد يصل التركيز اللازم لتجذير عقل بعض الاشجار الى 300 ملغم / لتر ؛ في حين ذكر الشرنوبي ( 2005 ) ان التراكيز المنخفضة من الاوكسينات ( 1 ملغم / لتر ) لكل من اندول حامض الخليك ونفثالين حامض الخليك اعطت اعلى نمو للجذور مع تقليل موت النسيج في تجارب زراعة الانسجة .

**4-14-3 كمية النتروجين والفسفور في النبات**

**1- حاصل النتروجين**

يتضح من الجدول ( 15 ) ان لاستعمال اللقاح البكتيري اثرا معنويا في زيادة كمية النتروجين في النبات اذ بلغ اعلى متوسط لكمية النتروجين في الجزء الخضري بمعدل 1020 ملغم N / نبات عند استعمال معاملة خليط لقاح العزلتين وراشحيهما ، بينما انخفضت كمية النتروجين في النبات بنسبة 41.3 % عند استعمال خليط العزلتين بدون راشحي العزلتين لتصل 598 ملغم N / نبات. وادى استعمال لقاح البكتريا العقدية $Rsp_8RA$ مع راشحها الى امتصاص كمية من النتروجين بلغت 768 ملغم N / نبات. اما عند استعمال نفس العزلة بدون راشحها انخفضت الكمية الممتصة بنسبة 31.9 % لتصل 523 ملغم N / نبات. وقد بلغ اقل معدل للكمية ممتصة عند معاملة السيطرة فوصلت 130 ملغم N / نبات ، في حين بلغت كمية النتروجين الممتصة عند استعمال معاملة الاندول الصناعي 387 ملغم N / نبات. كما بلغت 384 ملغم N / نبات عند استعمال خليط راشحي العزلتين.

كما اظهر استعمال العزلة $Rsp_8RA$ تفوقاً معنوياً في كمية النتروجين في النبات مقارنة مع استعمال العزلة $Pssp_2S$. ان لاستعمال منظمات النمو والبكتريا المثبتة للنتروجين اثراً واضحاً في زيادة حاصل النتروجين في النبات وهذا ياتي من خلال زيادة كمية النتروجين الميسرة للنبات في التربة فقد اثبت Biswas واخرون ( 2000 ) عند استعمال النيتروجين المشع $N^{15}$ ان زيادة كمية النتروجين في النبات والتربة قد حصلت نتيجة تظافر مشترك بين منظمات النمو التي تنتجها البكتريا في بيئة الجذور والعقد الجذرية التي تقوم بتثبيت النتروجين الجوي ، وذكروا ان الهرمونات المرتبطة بالشعيرات الجذرية تزيد قابلية النبات على تكوين العقد الجذرية وبنفس الوقت تزيد قابليته على اخذ المغذيات من محيط التربة ، ووجد Jong وآخرون ( 2003 ) ان بكتريا *Azotobacter* التي تثبت النتروجين وتنتج الاندول قد زادت من كمية النتروجين والحاصل لنبات الحنطة .

**جدول ( 15 ) تاثير المعاملات و حاصل النيتروجين والفوسفور في النبات والمتبقي في التربة والكثافة المكروبية**

| المعاملات | حاصل النيتروجين ملغم \ نبات | حاصل الفوسفور ملعم \ نبات | ملغم \كغم N متبقي | ملغم \كغم P متبقي | كثافة ميكروبية Log cfu/ml |
|---|---|---|---|---|---|
| الراشحين $Rsp_8RA+ Pssp_2S+$ | 1020 | 491 | 166 | 18.4 | 7.85 |
| $Rsp_8RA+ Pssp_2S$ | 598 | 380 | 142 | 16.8 | 7.14 |
| الراشح$Rsp_8RA+$ | 768 | 294 | 152 | 14.1 | 6.15 |
| الراشح$Pssp_2S+$ | 373 | 334 | 88 | 14.8 | 6.93 |
| $Rsp_8RA$ | 523 | 238 | 102 | 11.5 | 5.15 |
| $Pssp_2S$ | 272 | 249 | 72 | 12.8 | 6.16 |
| IAA | 387 | 208 | 80 | 10.6 | 5.68 |
| خليط الراشحيين | 384 | 192 | 82 | 10.5 | 6.56 |
| راشح - $Rsp_8RA$ | 397 | 155 | 76 | 10 | 6.32 |
| راشح- $Pssp_2S$ | 212 | 168 | 70 | 10.9 | 6.41 |
| Control | 130 | 90 | 66 | 8.6 | 4.12 |
| LSDP>0.05 | 12.65 | 9.85 | 8.75 | 2.12 | 1.02 |

**2- حاصل الفسفور**

يتضح من النتائج المبينة في الجدول ( 15 ) تأثير اللقاح البكتيري في زيادة كمية الفسفور المأخوذ من قبل النبات اذ بلغ اعلى معدل 491 ملغم P / نبات عند استعمال خليط العزلتين وراشحيهما. تلتها معاملة استعمال خليط العزلتين وبمعدل 380 ملغم P / نبات. واعطى لقاح عزلة $Pssp_2S$ وراشحها معدل امتصاص بلغ 334 ملغم P / نبات بينما انخفضت الكمية الماخوذة من الفسفور من قبل النبات مع استعمال لقاح العزلة $Rsp_8RA$ وراشحها بنسبة 40 % لتصل 294 ملغم P / نبات. وأظهرت معاملتي استعمال الاندول الصناعي وراشح العزلتين

معدلات امتصاص لعنصر الفسفور بلغت 208 و 192 ملغم P / نبات على التوالي ، كما تفوق استعمال معاملتي العزلة $Pssp_2S$ وراشحها او لقاح العزلة بدون راشحها في التاثير على الكمية الماخوذة من الفسفور في النبات مقارنة بمثيلاتها عند استعمال معاملتي عزلة الرايزوبيا -$Rsp_8RA$ ( جدول 15 ) كما بلغت اقل كمية ماخوذة من الفسفور في النبات 90 ملغم P / نبات مع معاملة السيطرة .

ان زيادة حاصل الفسفور الماخوذ من قبل النبات نتيجة استعمال اللقاح البكتيري يأتي اولاً من قدرة البكتريا على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط وجعله ميسراً للنبات وثانياً نتيجة لانتاج منظمات النمو بواسطة البكتريا والتي تعمل على زيادة وتطور المجموع الجذري والخضري ، وهذا بدوره يزيد من نشاط النبات وقدرته على امتصاص المغذيات من التربة . وياتي دور البكتريا في اذابة مركبات الفوسفات من خلال انتاجها لمجموعة من الاحماض العضوية مثل اللاكتيك والستريك والاوگزاليك والكاربونيك والسكسنيك وكذلك الاحماض غير العضوية مثل الكبريتيك والنتريك ( Gerte واخرون 2000 ) و ( الكسندر 1982 ) .

ولاحظ الجنابي ( 2001 ) ان تلقيح نبات الذرة البيضاء بالبكتريا المذيبة للفوسفات ادى الى زيادةى جاهزية الفسفور والوزن الجاف ومحتوى النبات من الفسفور كما وجد Han و Lee ( 2005 ) ان بكتريا من جنس *Bacillus* المنتجة لمنظمات النمو IAA و GA3 كان لها القدرة على اذابة الفوسفات في الوسط بمعدل 85 ملغم / لتر ؛ وان تلقيح الباذنجان بها ادى الى زيادة نمو وحاصل النبات والفسفور الجاهز في التربة والمأخوذ من قبل النبات . ان تفوق معاملة العزلة $Pssp_2S$ وراشحها او بدون راشحها على معاملتي العزلة $Rsp_8RA$ يعود الى انها اكثر قدرة على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط جدول ( 15 ) .

### 4-14-4 صفات التربة بعد الزراعة

#### 1- النتروجين الكلي

وجد ان اعلى تركيز لعنصر النتروجين في التربة عند استعمال معاملة خليط لقاح العزلتين وراشحهما اذ بلغ 166 ملغم N / كغم تربة ( جدول 15 ). تلتها كمية N الموجودة في التربة عند استعمال معاملة لقاح بكتريا $Rsp_8RA$ وراشحها ثم معاملة خليط لقاح العزلتين بمعدل قدره 152 و 142 ملغم N / كغم تربة على التوالي. بينما انخفض تركيز النتروجين في التربة عند استعمال معاملة لقاح الرايزوبيا ليصل 102 ملغم N / كغم تربة. وتراوحت كمية النتروجين في التربة في المعاملات الاخرى بين 70 و 88 ملغم N / كغم تربة عدا معاملة السيطرة ، اذ انخفض فيها الى 66 ملغم N / كغم تربة يلاحظ ان استخدام اللقاح البكتيري مع الراشح خاصة بالنسبة لبكتريا الرايزوبيا قد ادى الى زيادة كبيرة في النتروجين الكلي في التربة ،

وهذا يعود الى دور بكتريا الرايزوبيا في تثبيت النتروجين الجوي وهذا يتضح من خلال زيادة عدد العقد ونسبتها الفعالة ( جدول 15 ) فضلاً عن ذلك دور البكتريا في انتاج منظمات النمو التي تحسن الكثافة الميكروبية والعلاقات التعايشية في التربة فقد ذكر Dravon ( 1983 ) الى ان اكثر من 75 % من كمية النتروجين التي تضاف الى التربة يتم عن طريق التثبيت الجوي ، اذ يقدر ما يثبت عبر هذا المسار حوالي 112 مليون طن من النتروجين سنوياً.

ووجد الباسط واخرون ( 2006 ) ان عزلات من بكتريا الرايزوبيا *Azospirillum* التي تنتج منظمات النمو IAA و $GA_3$ و IBA قامت بتثبيت كميات عالية من النتروجين واستعملت اسمدة حيوية لنباتي الباقلاء والقمح . ولاحظ Martin واخرون ( 1989 ) ان بكتريا *Azospirillum* المنتجة للاندول تتمتع بقابلية عالية على تثبيت النتروجين وقد انعكس ذلك على زيادة انتاج نبات القمح الملقح بها من خلال زيادة المجموع الخضري والجذري والعقد الجذرية على الجذور . وقد حصل Jong ( 2003 ) على معدل تثبيت للنتروجين تراوح بين 3.2 – 16.5 ملغم N / لتر لمجموعة من عزلات *Azotobacter* التي انتجت الاندول ايضاً اما Zakira واخرون ( 2005 ) و Fauzia واخرون ( 2006 ) ونتيجة لتجاربهم على بكتريا الرايزوبيا المنتجة للاندول فقد وجدوا ان نشاط انزيم النتروجينيز في تثبيت النتروجين تراوح بين ( 22 – 3624 ) و ( 20 – 556 ) ملغم $C_2H_4$ / لتر / ساعة .

**2- الفسفور الجاهز**

يلاحظ من الجدول ( 15 ) زيادة في تركيز الفسفور الجاهز في التربة عند استعمال معاملة خليط لقاح العزلتين وراشحيهما اذ وصل معدل تركيز الفسفور الى 18.4 ملغم P / كغم تربة ، تلتها معاملتي خليط العزلتين او خليط كل عزلة على انفراد مع راشحها اذ بلغت تراكيز الفسفور في التربة 16.8 و 14.1 و 14.8 ملغم P / كغم تربة على التوالي. بينما تراوحت تراكيز الفسفور في ترب المعاملات الاخرى بين ( 12.8 – 10.0 ) ملغم P / كغم تربة عدا معاملة السيطرة اذ انخفض تركيز الفسفور في تربتها ليصل 8.6 ملغم P / كغم تربة. ان زيادة الفسفور الجاهز في التربة ياتي من خلال قدرة عزلتي البكتريا على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط نتيجة انتاج بعض الاحماض العضوية وغير العضوية وبعض الانزيمات بواسطة البكتريا وهذا ما اكده Grete واخرون ( 2000 ) و Vazque واخرون ( 2000 ) و Dferiats واخرون ( 1997 ) والجنابي ( 2001 ) والعسافي ( 2002 ) .

**3- الكثافة الميكروبية**

تبين النتائج الموضحة في الجدول ( 15 ) زيادة الكثافة الميكروبية بشكل معنوي تحت استعمال خليط لقاح العزلتين وراشحيهما اذ وصل معدل كثافة الميكروبات 7.85 log cfu / ml علاوة على تكون 56.3 عقدة جذرية على جذور النبات بلغ منها 46.4 عقدة فعالة تحتوي الاف الخلايا لعزلة بكتريا الرايزوبيا $Rsp_8RA$ (جدول 15 ). كذلك تميز محتوى التربة من الميكروبات عند استعمال خليط لقاح العزلتين بمحتوى مكروبي بلغ 7.14 cfu / ml Log علاوة على وجود 33.2 عقدة بكتيرية على جذور النبات منها 20.5 عقدة فعالة ، وظهر في التربة التي عوملت من لقاح العزلة $Pssp_2S$ محتوى مكروبي قدره 6.93 cfu / ml Log. كما ادى استعمال خليط راشح العزلتين او راشح كل عزلة على انفراد الى معدل محتوى للكثافة الميكروبية تراوح بين ( 6.41 – 6.56 ) Log cfu / ml وبقيت اعداد الميكروبات اقل من المطلوب (6.0 Log cfu / ml ) عند استعمال لقاح عزلة الرايزوبيا $Rsp_8RA$ او معاملة الاندول الصناعي اذ بلغ معدل كثافة الميكروبات 5.15 و 5.68 Log cfu / ml على التوالي الا انه زاد على محتوى تربة معاملة السيطرة التي بلغ محتواها 4.12 Log cfu / ml .

تعيش الكائنات الدقيقة في التربة متقاربة مع بعضها تقارباً شديداً مما يؤدي الى تفاعلات متبادلة بطريقة فريدة يعتمد فيها بعض افراد هذه الكائنات على بعضها الاخر للحصول على بعض المواد اللازمة للنمو الا انه في بعض الاحيان قد تحدث بعض التاثيرات السلبية غير المرغوبة عند حدوث تضاد ميكروبي ، لذلك يجب ملاحظة التأثيرات المفيدة والضارة لانتاج توليفة حيوية من عزلات الاحياء المجهرية ورواشحها لاستعمالها كلقاح حيوي مفيد في التطور الزراعي .

لقد كان اثر اللقاح لعزلة *Pseudomonas* واضحاً في زيادة الكثافة الميكروبية خاصة عند استخدام لقاح العزلتين وراشحيهما ذكر Kunda و Gaur ( 1980 ) ان اعظم فائدة من استخدام اللقاح البكتيري يمكن ان تحصل مع استعمال لقاح مختلط من لقاح يضم بكتريا مثبتة للنتروجين مع بكتريا مذيبة للفوسفات وتوفير ظروف نجاح نشاط اللقاح في البيئة ، واستعمال المواد التي تضمن استمرار نشاطه مع اضافة اللقاحات بكثافة عالية لضمان الاستيطان الميكروبي كما وجد Elshanshoury ( 1995 ) ان استخدام لقاحات ثنائية من بكتريا *Streptomyces* و *Azospirillum* او مع *Azotobacter* ادى الى تحسين قابلية العزلات في زيادة تثبيت النتروجين وزيادة الفسفور والمغنسيوم الذائبين ومركبات الاندول وكمية السكريات المنطلقة في التربة وزيادة الكثافة الميكروبية .

وتمكن Almonacid واخرون ( 2000 ) من استعمال خليط ثلاث عزلات من بكتريا *Ps.putida* و *B.cereus* و *Az.chroococcum* كلقاح حيوي لنبات الخس ادى الى زيادة المجموع الجذري والخضري بنسبة 23 % مما زاد الانتاج ، وذكروا ان استخدام رواشح هذه

العزلات زاد نسبة الانبات والنمو وحين خزنت رواشح العزلات بدرجة حرارة 6 و 16ْ م تبين ان راشح العزلة *B.cereus* قد تميز باعلى محتوى ميكروبي بعد توفر الظروف الملائمة، وعزوا ذلك الى قدرة هذه العزلة على تكوين السبورات في الراشح مما سمح لها عند توفر الظروف باعادة تكوين الخلايا ووجد Hoflich واخرون ( 1995 ) ان استعمال اللقاحات الثنائية لبكتريا *Rhizobium* و *Pseudomonas* افضل من استخدامها بصورة مفردة في تحسين النمو وزيادة إنتاج الفاصوليا والقمح والشعير وذكروا ان استعمال رواشح هذه العزلات قد عزز زيادة النمو والانتاج وزاد الكثافة الميكروبية في منطقة الجذور كما ذكر المصلح والحيدري ( 1985 ) ان رواشح مزارع بكتريا الرايزوبيا يمكن ان يؤدي الى تثبيط نمو أعدائها من الفطريات والفيروسات عند اضافتها للتربة ، تشجيع عملية تحقيق الاستيطان والاصابة . وهذا ما اكده Johan واخرون ( 2006 ) و Tam و Normahy ( 2002 ) من ان استعمال رواشح المزارع البكتيرية ادى الى تحسين نمو المجموع الجذري والخضري وزيادة الحاصل للنباتات المستعملة كما ساعد في مقاومة النبات للظروف البيئية والبايولوجية وزاد الكثافة الميكروبية للانواع التي استخدمت رواشحها .

واوضح Lindeman و Ham ( 1979 ) ان كثافة الرايزوبيا النشطة تساعد على تحقيق الاصابة لجذور النبات مبكراً مما يزيد من عدد العقد الجذرية الفعالة . وذكر Shikha واخرون ( 2007 ) ان بكتريا الرايزوبيا المنتجة 24 ملغم / لتر من الاندول سببت زيادة الكثافة الميكروبية في المنطقة الجذرية الملقحة بها ، كما اظهرت سيادة وسيطرة على فعاليات المجتمع الميكروبي في بيئتها اذ تمكنت من تثبيط 75 % لعزلة *S.sclerotiorum* المرضية للنبات مقارنة باستعمال مضاد Streptomycin .

# الفصل الخامس

## 5- الاستنتاجات والتوصيات

## Conclusions and Recommendations

1 – تم الحصول على ثمان عزلات بكتيرية ذات كفائة عالية في انتاج الاندول وانتخب منها عزلتان $Ps.sp_2S$ , $R.sp_8RA$ وهما ألاكفأ في الانتاج الذي بلغ 42.8 و 41.9 ملغم IAA / لتر على التوالي .

2 – حققت الاوساط المحلية المحضرة من مسحوق بذور الباقلاء وفول الصويا والحليب المجفف زيادة في انتاج الاندول البكتيري بنسبة ( 30 – 50 % ) .

3 – ادى تدعيم الاوساط المحلية بالببتون والمرق المغذي والكلوكوز والنيتروجين والفسفور الى تحسين انتاج الاندول وبزيادة قدرها ( 40 – 65 % ) .

4 – حقق الرقم الهيدروجيني 7.0 مع سرعة تحريك 200 د / د وحجم لقاح 3 مل / 100 مل وسط بعد مدة حضن 42 ساعة افضل كثافة ميكروبية بلغت 8.41 Log cfu / ml واعلى انتاج للاندول وصل 42.8 ملغم / لتر .

5 – حققت العزلات المنتخبة قدرة على اذابة مركبات الفوسفات في الوسط بقطر اذابة تراوح بين ( 3.5 – 11.73 ) ملم ، وانتاج مركبات خالية للحديد ، كما تمكنت العزلة $R.sp_8RA$ من تثبيت النيتروجين في الوسط بمقدار 3.65 ملغم N / لتر.

6 – حققت رواشح العزلات زيادة في نسبة وسرعة الانبات للبذور المستعملة بلغت ( 10 – 20% ) وبفارق زمني تراوح من ( 3 – 5 ايام ) .

7 – اعطت العزلتان المنتخبتان وراشحيهما زيادة معنوية في صفات المجموع الخضري والمجموع الجذري وعدد العقد الجذرية لنبات فول الصويا ، وكذلك العقد الفعالة وحاصل النتروجين والفسفور في النبات والمتبقي منها في التربة والكثافة الميكروبية .

وبناءاً على هذه التجربة وفي ظروفها نوصي بما يلي :

1 – تطبيق استعمال الاندول المنتج على محاصيل اخرى ذات مردود اقتصادي.

2 – تنقية الاندول المنتج مع امكانية زيادة وتطوير قابلية العزلات في الانتاج باستخدام التطفير الوراثي .

3 – استعمال ظروف بيئية مغايرة في انتاج الاندول.

4 – تطبيق استعمال الاندول المنتج في الاراضي الملحية ومعرفة مدى دوره في تحسين الانتاج في مثل هذه الاراضي .

5- استعمال مواد اخرى كاوساط محلية لنمو البكتريا المنتجة للاندول واختبار كفاءتها خاصة بالنسبة للمواد التي تمثل فضلات بعض المعامل .

6- انتاج كميات من الاندول وعلى المستوى التجاري باستعمال المخمرات .

7- دراسة امكانية انتاجمنظمات نمو اخرى غير الاندول مثل الجبرلينات والسايتوكاينينات بواسطة عزلات ميكروبية اخرى .

# الفصل السادس

# 6- المصادر References

## 6-1 المصادر العربية


**الباسط ، علي سلامة وسالم ، علي سمير و الزامك فاطمة ابراهيم ولبيب ، هويدا محمد ( 2006 )** . عـزل وانتخـاب سـلالات محليـة عاليـة الكفـاءة مـن بكتريـا الرايزوبيـوم والازوسبيرلم والازوتوبكتر من اراضي بمحافظة الشرقية . المجلة الزراعية – جامعة الزقازيق مجلد 35 عدد 16 ص 20 – 25 .

**جاد الله ، نزار فؤاد. عقاب العزام . عبد المجيد الشاعر وعرسان المنسي ( 1994 ).** الاحياء الدقيقة العملية . سلسلة الطرائق الاساسية العملية – عمان .

**الجنابي ، حمدي عبد الله نايف ( 2001 )** . عزل وتشخيص البكتريا المذيبة للفوسفات من تربة محافظة الانبار ودراسة كفاءتها . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة الانبار .

**حسن ، علاء عيدان ( 2004 )** . تاثير الملوحة في كفاءة بكتريا الـ *( Brady rhizobium spp.)* في نبات الماش . اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة جامعة بغداد .

**خضر ، علاء الدين سيد ( 2005 )** . دراسة تكنلوجية حيوية على نبات البطاطس . رسالة دكتوراه . قسم النبات – كلية العلوم – جامعة القاهرة .

**الخفاجي ، زهرة محمود . ( 1990 )** . التقنية الحيوية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – مطابع جامعة بغداد .

**الدليمي ، حمادة مصلح مطر ( 1982 )** . تاثير اللقاح البكتيري والسماد النتروجيني على حاصل فول الصويا ونوعيته . رسالة ماجساير – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

**الراشدي ، راضي كاظم ( 1988 ).** احياء التربة المجهرية – الطبعة الاولى جامعة البصرة .

**زهوي ، نزار وسمير ديوب ( 2005 )** . دراسة تاثير تركيز وموعد استخدام حامض اندول البيوتاريك ( IBA ) في تجذير فروع البندورة لانتاج الشتول واثر ذلك في الانتاج . مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية – سلسلة العلوم البايلوجية المجلد ( 27 ) العدد ( 1 ) .

**سلامة فوزي محمد وسيد عاشور احمد ( 2005 )** . الانبات والمحتوى المائي والنمو والسكريات الذائبة في بادرات القمح والفاصوليا تحت تاثير الملوحة والهرمونات النباتية . نشرة بحثية – كلية العلوم – قسم النبات . جامعة اسيوط – مصر .

**شاهين ، محمد فتحي ووفاء حسنين وعبد العظيم الحمادي وليلى فؤاد ( 2004 )** . الاكثار المعملي لبعض اصناف المانجو وحيدو ومتعددة الاجنة . مجلة المركز القومي للبحوث مجلد 35 العدد 4 . القاهرة – مصر .

**شبانة ، حسن عبد الرحمن وراشد محمد خلفات ومنصور ابراهيم منصور ( 1998 )** . دراسة تاثير منظم النمو .N.A.A على موعد نضج وصفات ثمار النخيل . محطة الابحاث والتجارب الزراعية نشرة 65 العدد – 3 – الحمرانية – الامارات العربية المتحدة .

**الشحات ، نصر ابو زيد ( 1990 )** . الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية ز القاهرة – مكتبة مدبولي . ص 607 .

**شرف ، محمد سعيد وسونية حمودة وحسن ابراهيم وشوقي محمود ( 2006 ).** تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة على نمو الرايزوبيا وإنتاج اندول حامض الخليك نشرة ( 5 ) معهد بحوث الاراضي والمياه – مركز البحوث الزراعية . مصر – الجيزة .

**شريف ، هيثم محي ( 1994 )** . تاثير موعد الزراعة وتركيز حامض الاندول بيوتاريك على تجذير عقل المطاط ficus nitidathumb المؤتمر العلمي الاول – كلية الزراعة – جامعة الانبار .

**الشرنوبي ، محمد ايهاب ( 2005 )** . تاثير اشعة جاما والمطفرات الكيميائية على انتاج السلوك الوراثي لنبات سباثيفلم بزراعة الانسجة . نشرة – 25 – مركز الشرق الاوسط الاقليمي للنظائر المشعة . الجيزة – جمهورية مصر العربية .

**عبد الكريم ، عبير يوسف ( 2001 )** . دراسة مايكروبيلوجية عن بكتريا الـ *pseudomonas* المعزولة من التربة من حالات مرضية في محافظة الانبار ومقاومتها لمضادات حيوية وانتاجها لمركبات siderophores . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة الانبار .

**عبدول ، كريم صالح ( 1987 )** . منظمات النمو النباتية – الجزء الاول كلية الزراعة – جامعة صلاح الدين – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .

**عجام ، قاسم عبد الامير ( 1977 )** . مقاييس انتخاب الجبلة الوراثية لفول الصويا . رسالة ماجستير . كلية الزراعة – بغداد .

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

**غروشة ، حسين ومبارك باقع ومهاريد سو**ريال **( 2005 )** . حامض الاندول استيك وحامض الجبرليك والتداخل بينهما على النمو وبعض المكونات الفسيلوجية لنباتات القمح النامية تحت الظروف الملحية . المركز القومي للبحوث ص 60 – 65 . القاهرة – مصر .

**قاسم ، غياث محمد ومضر عبد الستار علي ( 1989 )** . علم احياء التربة المجهرية . جامعة الموصل – وزراة التعليم العالي والبحث العلمي .

**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 .

**كاظم ، عبد العظيم و عبد الهادي الريس ( 1987 )** . الفسلجة النباتية – الجزء الاول . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة بغداد .

**الكسندر ، مارتن ( 1982 )** . مقدمة في مايكروبايلوجيا التربة . الطبعة الثانية . دارجون وايلي والولاده . نيويورك .

**محمد ، عبد العظيم كاظم ويونس ، مؤيد احمد ( 1991 )** . اساسيات فسيلوجيا النبات – الجزء الثالث – كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة العليم العالي والبحث العلمي – دار الكتب والوثائق .

**المصلح ، رشيد محجوب ونظام كاظم الحيدري ( 1985 )** . علم احياء التربة المجهرية ، جامعة بغداد – التعليم العالي والبحث العلمي . مطبعة جامعة بغداد .

**المشيلح ، عبد الرحمن ومحيي الدين قواس ( 2003 )** . تاثير منظمات النمو والملوحة على انبات بذور الخريزة ( الساليكورنيا ) . المجلة العلمية لجامعة الملك فيصل ( العلوم الاساسية والتطبيقية ) – المجلد ( 4 ) – العدد ( 2 ) ص 32 – 49 .

**النعيمي ، ليث مصلح ( 1998 )** . تاثير الملوحة والفسفور على كفاءة ونمو بكتريا العقد الجذرية الرايزوبيا . رسالة ماجستير مقدمة الى كلية العلوم – جامعة الانبار .

## 6-2 المصادر الاجنبية


**Abd – el Malek , Y. ; Monib , M. ; Abd – el Salam , M. A. and El. Hudidy , T. 1967.** Factor affecting efficiency of nitrogen fixation in the Ras – El – Hekma calcareous Soil . Bull. Ints. Desert. Egypte 37 ( 1 ) 107 – 130 .

**Abd – Alla , M. H. ( 1995 ) .** Survial of *Rhizobium legumino* sarum biover viceae subjected to heat , drought and salinity in Soil. Bio. Plant. 37 ( 1 ) 131 – 137 .

**Abdel – Rahman , A. M. and Abdel – Hadi , A. H. ( 1984 ) .** Possibilites to reduce adverse effects of salinity by Indole – 3 acetic acid. Bio. Plant. 26 ( 2 ) 81 – 87 .

**Agrios , G. N. ( 1997 ) .** Plant pathology . Academic press. New York , USA.

**Ahmad , F. ; Ahmad , I. and Khan , M. ( 2005 ).** Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *pseudomonas* in the presence and absence of trypto phan – Turk . J. Biol , 29 ( 1 ) : 29 – 34 .

**Alagwadi , A. R. and Gaur , A. C. ( 1988 ) .** Associative effect of *Rhizobium* and phosphate . solubilizing bacteria on the yield ond nutrient uptake of chickpea. Plant and soil. 105: 241 – 246 .

**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.

**Almonacid, S.; Quintero, N.; Martinez, and vela, M. (2000).** Determination of quality parameters of bacterium inocula based on liquid for mulation elaborated with strains producing IAA. Phytopathology. 97: 462 – 468.

**Ann , V. B. ; Mark , L. ; Kristel , E. and Jos , V. ( 1999 ) .** Auxins upregulate Expression of in *Azospirillum arasilense*. J. Bact. 181 ( 4 ) 1338 – 1342 .

**Antonia , C. ; Paulo , M. and Yoko B. R. ( 1998 ).** Indole – 3 – acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* Pv. Citri is increased in the presence of plant leaf extracts. FEMS. Micro. Letters. 159 ( 2 ) 215 – 220 .

**Archana , V. ; Particia , S. M. ( 2004 ) .** Indole – 3 – Acetic acid – producing bacteria are associated with cranberry stem Gall. Am. Phyto. Soc. Vol. 94. No. 11 P. 1164 – 1171 .

**Arteca , R. ( 1996 ) .** Plant Growth substances : principles and application. New York. Chapman , Hall .

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

**Baily. S. M. and wiersma, N. (1975).** Calculation of leaves area by equation. Plant. Ag. 54: 103 – 106.

**Barbieri , P. and Galli , F. ( 1993 ) .** Effect of wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole – 3 acetic acid production Res. Micro. 144 ( 1 ) : 69 – 75 .

**Basu , P. S. ( 1996 ) .** Content of different phyto hormones and IAA metabolism. J. Ba. Micro. V. 36 No. 5 P. 299 – 304 .

**Barrios , S. ; Raggio , N. and Baggio , M. ( 1964 ).** Effect of temperature on infection of isolated bean roots by *Rhizobium* . plant . phys. 38 : 171 – 174 .

**Balasudaram , V. R. ( 1975 ).** Irrigation cum high dose of inoculum for better nodulation and establishment of soyabean. Sci. cult. 41 ( 7 ) 350 – 351 .

**Bashan , Y. ( 1999 ).** Interaction of *Azospirillum sp.* Soil. Biol. Fert. 29 : 246 – 256 .

**Berge , O. J. ( 1990 ).** Effect of inoculation with *Bacillus circulans* nd *Azospirillum lipoferum* on crop – yield in field grown maize. Symbiosis 9 : 259 – 266 .

**Beck , D. P. ; Materon , L. A. and Afandi , F. ( 1993 ).** Practical *Rhizobium legumetechnology* manual. Technical manual No. 19. ICARDA.

**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 .

**Bohlmaun , J.T; Caueselle, C., Nunez, M. J. and Lewa, J. M. ( 1998 ).** Optimization of Fermenttation with milk whey as carbon source. Bioprocess Engineering . 19 ( 5 ) : 337 – 342 .

**Bonner , J. 1933**. The action of the plant growth hormones . J. Gen. Physiol. 17 : 63.

**Brandl , M. T. ; Lindow , S. E. ( 1998 ).** Contribution of Indole – 3 acetic acid production of the epiphytic fitness of Erwinia herbicla . A E M . 46 ( 9 ) : 3256 – 3263 .

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

**Bremner, J. M. (1965).** Total nitrogen in methods of soil analysis. Amr. Soc. Of Agr. inc.

**Brhada , F. ; Poggi M. C. ; Sype G. V. and Rudulier , D. L. ( 2001 ).** Osmoprotection mechanism in Rhizobia isolated from vicia fata var. major and cic. Agron. 21 : 583 – 590 .

**Burton , J. C. and curley R. L. ( 1965 ) .** Comparative efficieney of liquid and peat – Base inoculants on field – Growth soyabean. Agron. J. 57 : 379 – 381 .

**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 .

**Chomchalow , S. ( 1975 ).** Rhizobium – soybean symbiotic relationships . J. Agr. Sci. 8 ( 3 ) 119 – 129 .

**Chabot , R. ; Antoun , H. and Cescas , M. P. ( 1996 ).** Growth promoting of maize and lettuce by phosphate – solublizing *Rhizobium leguminosaseum* . biovar phaseoli . plant soil 184 : 311 – 321 .

**Chhonkar , P. K. and Taradar , J. C. ( 1984 ).** Accumulation of phosphatases in soil. J. Ind. Soc. Soil Sci. 32 : 366 – 372.

**Cummings, S. P.; Humphry, D. R. and Ander, M. (2001).** Areview of the current taxonomy of symbiotic rhizosphere and bulk N-fixing bacteria. Plant. Micro. int. Uk. Pp: 5 – 18.

**Curtis , H. and Barnes , N. ( 1993 ) .** Biologia quintaediction . Buenos aires. Argentina. Editorial medica panamericana .

**Davies , P. J. ( 1955 ).** Plant Hormones : physiology , Biochemistry and moleculer Biology. Dordrecht : kulwer Pp. 305 – 308 .

**Datta , C. and Basu , P. S. ( 1997 ) .** Production of IAA in root nodules and culture by a Rhizobium sp. from root nodules of the fodder legume melilotus alba DESR. Acta – Biotechnologica. 18 ( 1 ) 53 – 62 .

**Devlin . R. M. 1975.** Plant physiology. 3 rd. ed. Reinohold Co. , New York .

**Dfreitas , J. R. ; Banerjee , M. R. and Germiya , J. J. ( 1997 ) .** Phosphate – solubilizing *Rhizobacterium* enhance the growth and yield but not phosphorus . up take of canola. Bio. Fert. Of soil. 24 ( 4 ) : 358 – 364 .

**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 .

**Diby , P. and Sarma , Y. R. ( 2006 ).** Plant growth promoting Rhizobacteria mediated root prolife ration in black pepper.

**Drevon , J. J. ( 1983 ) .** Various organisms that fix nitrogen . In . technioul hand book on symbiotic nitrogen fixation , legumel *Rhizobium* Pp, 1 – 4 food and agriculture organisation of the united nation .

**El – Shinnawi , M. ; Elsaify , N and Waly ; T. ( 1997 ) .** Influence of the ionic from the meniral sails on growth of faba bean and *Rhizobium Leguminosarum* . Egy. S. Micro. 25 ( 1 ) 51 – 62 .

**El – nabarawy , M. A. ( 2001 ) .** The combined effects of some growth kegulators on leaf senescence of Aglaonema commutatum during darkness . J. Agr. Sci. 26 ( 8 ) : 4865 – 4859 .

**El – shanshoury , A. R. ; ( 1995 ) .** Interaction of Azotobacter chroococcum *Azospirillum Brasilense* and streptomyces mutabilis in relation to their effect on wheat development . J. Agro. Crop. Sci. 75 ( 2 ) : 119 – 127 .

**Estelle , M. ( 1992 ).** The plant hormone auxin . In . sight Bio. ( 14 ) : 439 – 444.

**Fauzia , Y. H. ; Sumera , Y. Dini , A. ; Mehboob , R. Yusuf , Z. and Zauser A. M. 2006 .** Plant growth – promoting bacteria as biofertillizer. Agron. Sustian. Dev. 26 : 143 – 150 .

**Fayez, M. ; Hassan , ME ; Ghalab , NM. and Zahra , MT. ( 1991 ).** Survial of Brady *Rhizobium japanicum* As affected by soil texture Nacl concentration Egyption . J. Microbiol. 25 ( 1 ) : 63 – 75 .

**Fekete , F.A. ; Lanzi , R.A. ; Hayes , R. N. and Mabbot , G. A. (1989 ) .** Isolation and preliminary characterization of hydroxamic acid fromed by nitrogen fixing. A E M V. 55 ( 2 ) 298 – 305 .

**French , R. C. , Beevers , H. 1953.** Respiratpry and growth responses induced by compounds. Am. J. Bot. 40 : 660 .

**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 .

**Gerte , J. ; Beissner , L. and Romer , W. ( 2000 ).** The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate aniors on uptake by single root . J. plant . Nut. and soil. Sci. 163 : 207 – 212 .

**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 .

**Glick , J. K. ( 1995 ) .** The enhancement of plant growth by free – livig bacteria can. J. Micro. 41 : 109 – 117 .

**Gordon, S. A. and weber R. P. (1951).** Colorimetric estimation of indolacetic acid. Plant. Phys. 26: 192 – 195.

**Graham , P. H. ; Draeger, K. J. ; Ferrey , M. L. ; Conroy , M. J. ; Hammer , B. E. ; Martinez , E. ; Aavovans , S. R. and Quinto , C. ( 1994 ) .** Acid pH tolerance in strains of Rhizobium and brady *Rhizobium* , and initial studies on the basis for acid toleran of *Rhizobium tropici* UMR 1899. Can. J. Micr. 40 : 198 – 207 .

**Gregory F. C. ; Veale , J. A. 1957.** Areasswssment of the problem of apical dominance. Symp. Soc. Exp. Biol. 11 : 1 .

**Gustafson , F. G. 1936.** Inducement of fruit development by growth – promoting chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 22 : 628 .

**Han , H. S. and Lee , K. D. ( 2005 ) .** Phosphate on mineral uptake , soil availability and growth of egg plant . Res. J. Agr. And Bio. Sci. 1 ( 2 ) : 176 – 180 .

**Hardy , R. W. ; Burns , R. C. and Jakson , E. K. ( 1971 ) .** Biological nitrogen fixation natural and Aricultural Habitats. Pio. Soil. Sps. 8 : 561 – 570 .

**Harold, J.; Benson, W. and Graw, M. (1998).** Microbiological applications laboratory manual in general microbiology 7th. Ed.

**Heller , R. ( 1982 ) .** Physiolog of plant and Development . 3 rd. addition. Paris. P. 225 .

**Hoflich , G. ; Wiehe , W. and Buchnolz , C. H. ( 1995 ) .** Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *pseudomonas* and *phizobium bacteria*. Micro. Res. 150 : 139 – 147.

**Howieson , JG. ; Robson , AD. and Ewing , MA. ( 1993 ).** External phosphate and calicium conc. and pH. But not the products of Rhizobial nodulation genes , effected the attachment of *Rhizobium meliloti* to roots of annual medicus . soli and Biol. Bioch. 125 ( 5 ) 567 – 573 .

**Huyer , M. ; Page , W. J. ( 1988 ) .** Increse siderophore production in Azotobacter. A E M. 54 ( 11 ) : 2625 – 2631 .

**Hungria , M. and Franco , A. A. ( 1993 ).** Effect of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by phaseolus vulgaris . plant and soil. 149 : 95 – 102 .

**Hungria , M. and Varags , M. A. T. ( 2000 ).** Environmental factors affecting $N_2$ fixation in grain legumes in the tropics with an emphasion . Bra. Field. Crop. Res. 65 : 151 – 146 .

**Jinichiro , K. ; Takashi , A. and Hidemass H. 1991.** Durification and characterization of indole pyrovate decar boxy lase a novel anzyme for IAA Biosynthesis in *Eterobacia cloaceae*. J. of Bio. Chem. 267 ( 22 ) : 15823 – 15828.

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

**Johan , H. J. ; Steven , E. L. ( 2005 ).** Utillization of the plant hormone Indole – 3 acetic acid for growth by *pseudomonas putida*. A E M . 7 / ( 5 ) : 2365 – 2371 .

**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 .

**Kendal, I. A. (2001).** Investigating the mechanism of sidrophores driven fe release from mineral surfaces using conical laser scanning microscopy. Blacks – bury. V. A. , 24061.

**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 .

**Koga , J , Adachi , T and Hidaka. H. ( 1992 ) .** Purification and characterization of Indole pyruvate Decarboxylase. J. Bio. Chem. Vol. 267 No. 22 PP. 15823 – 15828 .

**Kundu , BS , Gaur , Ac. ( 1980 ) .** Estoplish – ment of nitrogen fixing & phosphate – solubilising bacteria in Rhizosphere and their affect on yield & nutrient uptake of wheat crop. Plant and Soil 122 ( 1 ) 223 – 320 .

**Leopold , A. C. ( 1955 ).** Auxins and plant growth. Mc Grow – Hill Book company. 2nd edition. New york. Pp 687.

**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 .

**Loper, J. E. and Schroth, M. N. (1986).** Influence of bacterial sources of indole – 3 – acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathology 76: 386 – 389.

**Lindow , S. E. ; Berkeley , G. and Mc Gourty , U. C. 1997.** Control and exploitation of exogenous bacteril IAA production to reduce pesticide inputs to tree crops. Fert. Biol. 33 ( 8 ) : 520 – 527 .

**Lindeman , W. C. ; Ham , G. E ( 1979 ) .** Soybeen plant growth , nodulation and nitrogen fixation as affected by root temperatwre. Soil. Sci. Am. J. 43 : 1134 .

**Louw , H. A. and Webley D. M. ( 1958 ).** A plant method for estimatins the numbers of phosphate dissolving and acid – productivity bacteria in soil nature . lonb. 182 : 1317 – 1318 .

**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 .

**Mauseth , J. D. ( 1991 ).** Botany : An Introduction to plant Biology. Philadelphia : saunders. Pp. 348 – 354 .

**Martin , P. ; Glatzle , A ; Kolb , W. Omay , H. and Schmidt , W. ( 1989 ) .** N – fixing bacteria in the rhizosphere : Quantifi – cation and hormonal effect on root development. Ziet. Plant. Boden. 152 ( 2 ) 237 – 245 .

**Mao , X. ; Feng , H. ; Bryan , G. ; Chen , X. and Liu , M. ( 2007 ).** Do bacterial – feeding nematodes stimulate root proliferation through hormonal effects. Soil. Bio. Chemst. 39 ( 7 ) : 1816 – 1819 .

**Mayak , S.** ; **Tirosh , T. ; Glick , B. 2004 .** Plant growth – promoting bacteria confer resistance in tomto plants to salt stress. Pl. Phy. Bio. 42 ( 6 ) : 565 – 572 .

**Mahmoud , S. A. Z ; Thabet , F. M. ; Ramadan , E. and Mokhater , T. ( 1984 ) .** Microbial and biochemical changes in soil and rhizospher of tomto and commor bean plants . zbi Microbiol. 139 : 219 – 228 .

**Manna , MC. ; Chosh , PK. and Singh , K. N. ( 2001 ) .** Comparative effectiveness of phosphate – enriched compost and single super phosphate on yield , uptake of nutrients and soil quqlity under soybean – wheat rotation. J. Agric. Sci. 137 : 45 – 54 .

**Marcos , A. ; Brito , A. ; Sergy , G. and Hani , A. ( 1994 ) .** Effect of compost on *Rhizosphere microflora* of the tomato and on the incidence of plant growth – promoting *Rhizobacteria* . A E M. 61 ( 1 ) : 194 – 199 .

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

**Muncrvar , F. and Wollum , A. G. ( 1981 ).** Growth of *Rhizobium japonicum* strains at temperature above 27° C. AEM. 42 ( 2 ) : 272 – 276 .

**Neilands , J. B. ( 1993 ) .** Prespective in biochemistry and biophysics , siderophores Archives. Bio che. bio phy. 302 : 1 – 3 .

**Negi , M. ; Sadasivam , K. V. and Tilak , K. ( 1987 ) .** Establishment of *Azotobacter* and *Azospirillcum* in the rhizospheral bariey inorganic amended Soil. Zentraibl mikrobiol 142 : 149 – 154 .

**Newaj, M. V. (2002).** Effect of IAA on growth and yield of banana. Pakistan. J. Bio. Sci. 5 (9): 891 – 899.

**Okon , Y. ; Kapulnik , Y. ( 1986 ).** Development and function of *Azospirillum* – inoculated roots. Plant Soil 90 : 3 – 16 .

**Ostin , A. ; Kowalyezk , M. ; Bhalerae , R. P. and Sandbery , G. ( 1998 ) .** Metabolism of I – 3 AA . in Arabidopsis . plant. Phys. 118 : 285 – 296 .

**Ozan , P. G. ( 1980 ).** Phosphate nutricion of plant , ageneral treatise in the role of phosphorus in agriculture . chapter 20 . P 559 .

**Patten, C. L. , Glick B. R. 2002.** Role of *pseudomonas putida* sindoleeacetic acid in development of the host plant root system A E M. Vol. 68. No. 8 P. 3795 – 3801 .

**Patten , C. L. and Glick , B. R. ( 1996 ).** Bacterial biosynthesis of I – 3 AA . Gan. J. Micro. 42 : 207 – 220 .

**Ponmurugan , P. and Gopi , C. ( 2006 ).** In vitro production of growth regulators and phosphataase activity by phosphate solubilizing bacteria . African. J. Bio. 5 ( 4 ) : 348 – 350 .

**Prinsen E. , Michiels , K. ; Vanderieyden , J. ( 1993 ) .** Indole – 3 – acetic acid biosynthesis by bacteria evidence for tryptophan dependent path way . Mol. Plant – Microbe Interact ; 6 : 609 – 615 .

**Ramazan , C. ; Mesude , F. and Erdoan , u ( 2007 ).** The effect of plant growth promoting on Barley seedling Growth , nutrient uptake and some Soil properties. Turk. J. Argic : 31 : 189 – 199.

**Rasul , G. ( 1999 ) .** Production of growth hormones nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. Thesis of Ph. D. Higher Education commission. H – 9 – Islamabad.

**Raven , P. H. ; Evert , R. F. and Eich horn , S. E. ( 1992 ).** Biology of plants . New York : worth . Pp. 545 – 572 .

**Ratti . H. N. ; Kmar , S. ; Verma , H. N. and Gautam , S. P. ( 2001 ).** Improvement in bioavall – ability of tricalcium phosphate to cymbopogon martini Var. Motia by *Rhizobacteria* AMF and *Azospirillum* inoculation. Micro. Res. 156 ( 2 ) : 145 – 149 .

**Robinson , M. , Riov , J. and Sharon , A. ( 1998 ) .** Indole – 3 – acetic acid biosynthesis in colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschymonene. A E M. Vol. 64. No. 12 P. 5030 – 5032 .

**Robison , A. C. ( 1969 ) .** Host selection foe effective *Rhizobium* by red clover and subterranean clover in the field. Aust. J. Agric. Res. 20 : 1053 – 1060 .

**Rudy , M. ; Sefi, H. ; Hagit, L. and Amir S. ( 2004 ) .** In planta production of Indole – 3 acetic acid by bacteria . A E M . Vol. 70 , No. 3 P 1852 – 1854 .

**Rubisntein , B. Leoplod , A. C. 1963.** Anaiysis of the auxin control of bean leaf abscission. Plant physiol. 38 : 262.

**Ruschel , A. P. ; suhet , A. R. ; Viani , R. and Almeida , D. L. ( 1975 ).** Effect of different nitrogen source and inoculation on yield of soybean. Bras. Agro. 10 ( 11 ) 19 – 23 .

**Sanjay , G. Jeffery R. B. 1999.** Tryptophan catabolism by *lactobacillus* casei and *lactobacillus* helveticus cgeese flavor Adjuncts.

**Saber , M. ; Youry , M. and Kabesh. M. O. 1977.** Effect of manganese application on the activity of phosphate – dissolving bacteria in acalcareouse soil cultivated with peaplants . Plant and Soil. 47 : 333 – 334 .

**Santck , B. and Mirc , V. ( 1995 ) .** Temperature and dissolved oxygen concent rations as parameters of *Azotobacter chroococcum* cultivation for use in biofertilizers . Bio. Lett. 17 ( 4 ) . 453 – 458 .

**Santos , M. A ; Vargas , M. A. and Hungria , M. ( 1999 ) .** Charaterization soybean. Brady – thizobium adapted to the Brazilian Savanna. Micro. Eco. 30 : 261 – 272 .

**Sa , T. M. ; Lim , S. U. and Robesnon , DM. ( 1992 ).** The effect of phosphate stress on the energy status and bacteroid content in soybean nodules. J. Kora. Agr. Chemi. 35 ( 6 ) : 449 – 456 .

**Schuider , E. A. ; Gibson , R. A. and Wiyhtman , F. ( 1970 ).** Pathway of auxin biosynthesis in the shoots of higher plants. Proc. inter. couf. Australia.

**Schwyno, B.; Neilands, J. B. and Alexander, D. (1992).** Universal chemical assay for the determination of sidrophores. Anal. Biochem. 160: 47 – 56.

**Seaman, J.; Alexander, D. and loeppert, R. (1992).** The availability of iron from various sources to asidrophores producing J. plant. N. 15 (10): 2221 – 2233.

**Sevinc , M. S. and Page , W. J. ( 1992 ) .** Generation of Azotobacter strains defective in sidrophore production . Soc. Gene. Micro. 138 ( 3 ) : 587 – 596 .

**Shatokina , SF and Khristenko , SI. ( 1996 ) .** Effect of different fertilizer system and seed inoculation on the microflora biochemical and agrochemical charactertics of typical chernozen , corn yield and quality of silage . Eurasian soil. Sci. 29 ( 8 ) : 956 – 962.

**Shihui , Y. ; Qin , Z. ; Jianhua , G. ; Charkowski , R. ; Glick , A. M. ( 2007 ) .** Global effect of IAA Biosynthesis on multiple factors of Erwinia chrysanthemi 3973 . Apl. Env. Micro. 73 ( 4 ) 1079 – 1088.

**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 .

**Shino, S.; yuxi, H. and hiroshi, o. (2002).** Indole acetic acid production in *pseudomonas* and its association with supprsssion of creeping bentgrass brown patch. J. Cur. Micro. 47 (2): 138 – 143.

**Sumera , Y ; Bakar, M. ; Kausar , A. M. 2004 .** Isolation , characterization and beneficial effect of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar Soils. J. B. Micro. Vol. 44 No. 3 P 241 – 252 .

**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 .

**Suckstoff , I. and Berg , G. ( 2003 ).** Evidence for dose – dependent effects on plant growth by *stenotrophomonas* strains from different origins . J. Appl. Micro. ( 95 ) : 656 – 663 .

**Szajdak , L. ; Kuldkepp , P. ; Leedu , E. ; Teesalu T. ; Toonsoo , A , and Kolli , R. ( 2005 ) .** Some biochemical spects of fragi – stagnic Albeluvisols' organic matter – Agro. Res. 3 ( 1 ) 99 – 110 .

**Tam, Y. and normaly, W. (2002).** Over expression of bacterial IAA hydrolase in arabidopsis thaliana. Phy. Plant. 12: 115 – 120.

**Thiman , K. V. 1935 .** In the plant growth hormone produced by Rhizopus suinus. J. Biol. Chem. 109 : 279 .

**Tilak , K. V. ; singh , C. S. ; Roy , N. K. and subbarao , N. S. ( 1982 ).** Azotobactre inoculum effect on yield of soybean. soil. Biol. Bioch. 12 : 334 – 337 .

**Tomar , R. K. S. ( 1998 ) .** Effect of phosphate. Solubilizing bacteria and FYM on the yield of blackgram. Indian . J. Agr. Sci. 68 ( 2 ) : 81 – 83 .

**Tomar , R. ; Raghum , J. ; Yadaf , L. and Ghuraya , RS. ( 1992 ) .** effect of phosphorus , Rhizobium inoculation and zinc on the yield of soybean . Int. J. trop. Agri. 9 ( 3 ) : 211 – 214 .

**Tsuneo , K. and James , J. N. ( 1990 ).** Brady *rhizobium japonicum* subspecies characterized by fixed – nitrogen uptake and symbiotic IAA production . Curr. Micro. 20 ( 6 ) : 381 – 385 .

**Vazque , ZP. ; Holguin , G. ; Puente , M. E. and ashan , Y. ( 2000 ).** Phosphate solubilizing microorganisms associates in semirid coastal lagoon. Bio and fert. Soil. 30 ( 5 – 6 ) : 460 – 468 .

**Veni , G. and Leveau. J. H. J. ( 2005 ).** Bacterial manipulation of the plant hormone system. Neth. Org. Sci. Res. 52 : 1221 – 1227 .

**Vincent , J. M. ( 1970 ).** Amanul for the practical study of the root nodule bacteria IPB Hand book. No. 5. Black well scientific publication , oxford.

**Vora , M. S. and Shelat , H. N. ( 1999 ) .** Impact of addition of different carbon and nitrogen sources on solubilizing of rockphosphate by phosphate solubilizing microorganism . Indian . J. Agri. Sci. 68 ( 6 ) : 292 – 294 .

**Watanabe, F. S. and olsen, S. R. (1969).** Test of anascorbic acid methods for determing phosphorus in water and $NaHCO_3$ extract from soil. Soil sci. Soc. Am. Proc. 29: 677 – 678.

**Weller , D. M. ; cook , R. J. ( 1983 ) .** Suppresion of take – all the wheat by seed treat ment with floure scent *pseudomonas*. Phyto phathol. 23 : 43 – 54 .

**William , J. H. ( 1989 ).** Indole – 3 – acetic production by bacteroids from soybean root nodules . phys. Plant. 76 ( 1 ) : 31 – 36 .

**Wotike , M.** ; **Hunge , Hunge , H. and Schnitzler ( 2005 ) .** *Bacillus subtilis* as growth promoter in hydroponically Grown tomatoes under saline conditions. Int. Soc. Hort. Sci. Vol. 38 ( 7 ) : 659 – 6636 .

**Yahya , A. I. ; Salih , H. M. ; Munom , B. H. and Abdul – Rhem ; A. M. ( 1989 ) .** Availability of super phosphate to sorgum plant as affected by phosphate solubilizing fungi and their inoculation Tiam . Pros. Sth. Sci. Cont. ISRC. Iraq . Baghdad 7 – 11 oct. 1 ( 2 ) : 176 – 184 .

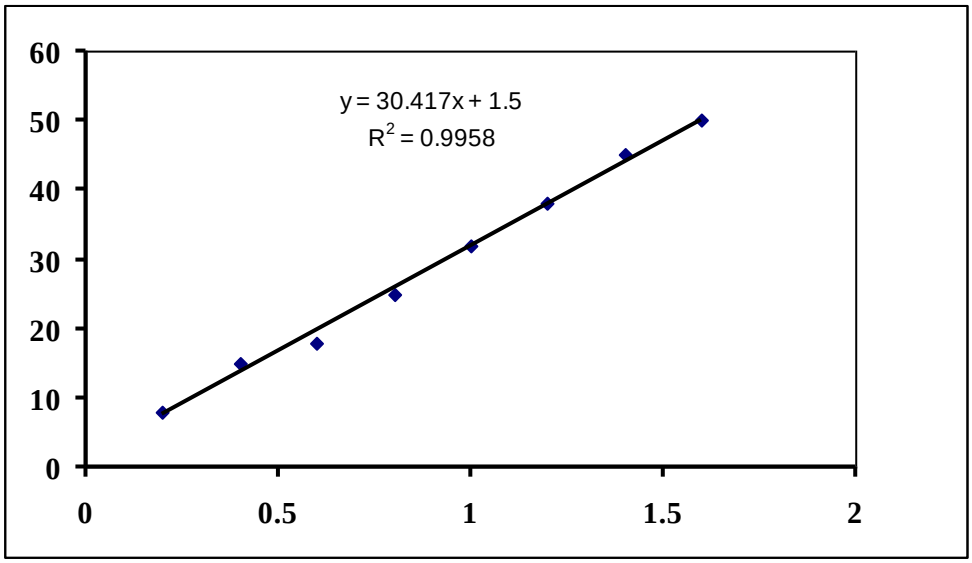
**Zakira , N.; Sumera ,Y.; Sohail, H., Malik, K. A. 2005.** Characterization and screening of bacteria from Rhizosphere of maize grown in Indonesian and Pakistani Soil . NIBGE . Vol. 45 No . 6 p 447 – 459 .

**Zhao, Y.; Hull, A. and celenza, J. (2005). Tryp – dependent and development. Genes. Dev. 16: 3100 – 3112.**

**Zimmer , W. , Aparicio , C. and Elmerich , C ( 1991 ) .** Relation ship between tryptophan biosynthesis and IAA production. MGG. Vol. 229 . No. 1 P. 41 – 51 .

**ملحق ( 2 ) مكونات وسط مستخلص الخميرة – المانيتول YEMA**

| المكونات | الوزن |
|---|---|
| Mannitol | 10.0 gm |
| $K_2HPO_4$ | 0.5 gm |
| $MgSO_4 – 7H_2O$ | 0.2 gm |
| Yest extract | 0.5 gm |
| NaCl | 0.1 gm |
| Agar | 15.0 gm |
| Distilled water | 1.0 litter |
| مع ضبط pH عند 7.0 ( Beck واخرون , 1993 ). | |




**ملحق ( 3 ) المنحنى القياسي لتقدير الاندول في المزارع**

**ملحق ( 4 ) وسط IDCM ( Iron deficient culture medium )**

| المكونات | الوزن |
|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 6 gm |
| $KH_2PO_4$ | 6 gm |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 3 gm |
| $MgSO_4 - 7H_2O$ | 1 gm |
| Succinic acid | 0.1 gm |
| Agar | 4 gm |
| Distilled water | 1.0 litter |
| مع ضبط pH عند 7.0 ( Seaman واخرون , 1992 ). | |

**ملحق ( 5 ) تاثير معدل حجم اللقاح ومدة الحضن في كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم لتر)**

| رمز العزلة | Log 5.7. cfu/ ml. | | | Log 6.0 cfu/ ml. | | | Log 6.17 cfu/ ml. | | | المعدل العزلات |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 | |
| $Rsp_2Kr$ | 33.4 | 35.8 | 36.2 | 36.2 | 38.4 | 38.2 | 39.4 | 39.3 | 38.0 | 37.20 |
| $Rsp_8RA$ | 34.2 | 35.6 | 35.4 | 39.4 | 41.6 | 40.5 | 41.9 | 40.0 | 36.2 | 38.30 |
| $Pssp_2S$ | 33.2 | 34.2 | 35.6 | 40.1 | 42.2 | 40.6 | 42.8 | 40.3 | 36.5 | 38.38 |
| المعدل للتركيز | 33.6 | 35.2 | 35.7 | 38.5 | 40.7 | 39.7 | 41.3 | 39.8 | 36.9 | |
| المعدل للوسط | 34.8 | | | 39.6 | | | 39.3 | | | |

LSD P> 0.05 Is .= ns. VI= 1.52 , Time =0.85 , Is. VI Tim= 2.12

**ملحق ( 6 ) تاثير معدل حجم اللقاح ومدة الحضن في الكثافة الميكروبية في الوسط ( Log. cfu/ ml.)**

| المعدل العزلات | Log 6.17 cfu/ ml. | | | Log 6.0 cfu/ ml. | | | Log 5.7. cfu/ ml. | | | رمز العزلة |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 72 | 48 | 24 | 72 | 48 | 24 | 72 | 48 | 24 | |
| | 8.01 | 8.21 | 8.15 | 8.20 | 8.21 | 7.45 | 8.20 | 7.89 | 6.98 | $Rsp_2Kr$ |
| | 7.98 | 8.20 | 8.25 | 8.20 | 8.20 | 7.66 | 7.86 | 7.66 | 7.03 | $Rsp_8RA$ |
| | 8.53 | 8.53 | 8.41 | 8.62 | 8.43 | 7.58 | 8.61 | 7.98 | 7.20 | $Pssp_2S$ |
| | 8.17 | 8.31 | 8.27 | 8.34 | 8.28 | 7.56 | 8.22 | | 7.07 | المعدل للتركيز |
| | 8.25 | | | 8.06 | | | 7.72 | | | المعدل للوسط |

LSD P> 0.05 Is .=0.25. VI= 1.21 , Time =0.214 , Is. VI Tim= 0.361

**ملحق ( 7 ) تاثير التدعيم للوسط المحلي بمصدري النيتروجين والفوسفور في كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم \ لتر)**

| **المعدل العزلات** | **$(NH4)_2SO_4 + K_2HPO_4$** | **$K_2HPO_4$** | **$(NH4)_2SO_4$** | **رمز العزلة** |
|---|---|---|---|---|
| **36.46** | **36.80** | **36.20** | **36.4** | **$Rsp_2Kr$** |
| **38.26** | **39.60** | **38.40** | **36.8** | **$Rsp_8RA$** |
| **37.33** | **38.90** | **35.80** | **37.3** | **$Pssp_2S$** |
| | **38.43** | **36.82** | **36.81** | **المعدل** |

**LSD P> 0.05 Is .= 0.651 , Sors.= 0.530 , Is. Sors.= 1.21**

**ملحق ( 8 ) تاثير الرقم الهيدروجيني للوسط المحلي في كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم \ لتر)**

| المعدل العزلات | 8 | 7 | 6 | 5 | رمز العزلة |
|---|---|---|---|---|---|
| 28.97 | 16.41 | 36.75 | 34.22 | 28.5 | $Rsp_2Kr$ |
| 29.89 | 16.94 | 39.41 | 35.41 | 27.6 | $Rsp_8RA$ |
| 28.93 | 20.41 | 38.05 | 38.68 | 18.6 | $Pssp_2S$ |
| | 17.92 | 38.07 | 36.10 | 24.9 | المعدل الرقم الهيدروجيني |

LSD P> 0.05 Is .= ns , pH = 2.51 , Is. pH= 3.451

**ملحق ( 9 ) تاثير التدعيم للوسط المحلي بسكر الكلوكوز على كمية الاندول المنتج من العزلات ( ملغم \ لتر)**

| رمز العزلة | 1 غم\100 مل | 2 غم\ 100 مل | 3 غم\ 100 مل | 4 غم\ 100 مل | المعدل العزلات |
|---|---|---|---|---|---|
| $Rsp_2Kr$ | 34.9 | 35.60 | 34.10 | 34.80 | 34.85 |
| $Rsp_8RA$ | 36.75 | 37.40 | 37.20 | 37.30 | 37.16 |
| $Pssp_2S$ | 33.65 | 34.80 | 32.30 | 29.0 | 32.76 |
| المعدل للتركيز | 35.1 | 35.93 | 34.53 | 33.70 | |

LSD P> 0.05 Is .= 2.41 , Gluco..=2.16 , Is. Gluco.=3.81

## Summary

This study was included isolation and identification of bacterial isolates for growth promoter production ( Indol Acetic Acid ) by application of local culture and evaluate its efficiency .

According to this perpoute bacterial isolates were collected ( nodulan and non nodulen) and examined for their ability to indol production , by used peptone, water , and then serial labrotory experiments were converted to examine ability of selective isolatesfor indol production.The local culture used included dry powder of legume, bean ,soyabean , seed and milk powder ( The culture have high level of treptophans ) . Its also was tested the effect of edition of supplements to the culture such as treptophan ,N. broth , glucose , N and P on indol production optimum condition was included such as pH speed of shaking , Inoculum volume , incubation time ,tempreture , 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 also the efficincy for the selection isolates and their filteration the effect on the implantation of sow seed and groth of soyabeen which suffering from the prescence and distribution of Rhizopia espelially from lraqi soil .

This study have the following results :

1- 18 isolates were obtain cupable for them indol production ( 30 from total isolates) 14 isolats were nodulan bacteria .
2- 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 .
3- 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% ).
4- Local culture supplements with peptone , NB , glucose, N and P increased the ability of isolates to indol production(40-65%) significantly .
5- The results of optimum condition study showded the best indol production acharied with R. $sp_8RA$ isolat with pH 7.0 ( 39.41 mg IAA / ml and the best shaking speed at 200 / min without erration of media 42.2 mg IAA / ml , the best interaction between the inoculation volume with incubation time with 3 ml / 100 ml of media at 24 hr of incubation ( 42.8 mg IAA / ml ) in microbial population 8.41 Log cfu / ml.

6- 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.$sp_2$S and $Rsp_8$RA respictivly , their isolates have ability to phosphate dissolved in the medium with diametr range dissolving 6.25 – 11.75 mm respectively , and the ,$Rsp_8$RA isolate has ability to nitrogen fixation in the medium with avarge of 3.65 N / L whil the Ps.$sp_2$S doesn't able to nitrogen fixation .

7- 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 .

8- Result of applied biological experiment showed an increased treatment of two isolates mixture $Rsp_8$RA , Pss$P_2$S with their filterated in compare with treatment of isolates mixture only and filtreated only or industrial indol and achaived inclues in :

A-Characters of vegetative group that achaived high avarge for branching ( 4.37 ) height of plant ( 81.2 cfu/ ml and leaf area 78.4cm ) ,persente of chlorophyll ( 39.6% ), dry weight (51.2 g) Nitrogen and Phosphours yield in plant ( 491, 1020 mg ) respectively .

B- Root characters were achaived high avarge the number of noduls (56.3 noduli) . weight of root group ( 10.4 gm ).

c- Soil characters after sowing were achaived high average of nitrogen and phosphorus in soil (166 – 18.4 mg / kg soil) respectively and high microbial population in soil ( 7.82 Log cfu/ ml ).

MINISTRY OF HIGHER EDUCATION
AND RESEARCH SCIENTIFIC SEARCH
UNIVERSITY OF AL-ANBAR
COLLEGE OF AGRICULTURE

# Indole acetic acid ( IAA ) Production by bacteria using local media and test its efficiency on soyabean plant

by

*Jamal Salih Hmood Al- Kubaisy*

THESIS SUBMITTED TO THE COLLEGE OF AGRICULTURE - UNIVERSITY OF AL-ANBAR IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE PH.D. DEGREE OF SOIL SCIENCE IN SOIL MICROBIOLOGY

*March, 2008* *Rabee (1), 1429*