ISSN: 1991-8941

إنتاج منظم النمو اندول حامض الخليك (IAA) بوساطة البكتريا باستعمال أوساط محلية

جمال صالح الكبيسي*، حماد نواف فرحان**، طارق طلال خلف*** ادهام علي العسافي*
*جامعة الأنبار – كلية الزراعة
*جامعة الأنبار – كلية التربية – القائم
*جامعة الأنبار – كلية العلوم

تاريخ الاستلام: ٢٠٠٩/١/١٥ تاريخ القبول:٢٠٠٩/٨/١٩

الخلاصة: تضمنت الدراسة عزل وتشخيص عزلات بكتيرية لإنتاج منظم النمو Indole acetic acid(IAA) باستعمال أوساط محلية وتقييم كفاءته، وقد عزلت أعداداً من العزلات البكتيرية واختبرت قدرتها على إنتاج الاندول وأجريت عليها سلسلة من التجارب المختبرية تضمنت فحص قدرة العزلات المنتخبة على إنتاج الاندول باستعمال أوساط حضرت محلياً من المسحوق الجاف لبذور الباقلاء واللوبيا وفول الصويا والحليب المجفف، ثم اختبر تأثير تدعيم هذه الأوساط بالتربتوفان والمرق المغذي والكلوكوز والنتروجين والفسفور في إنتاج الاندول، ومن اجل زيادة كفاءة الإنتاج حددت الظروف البيئية المثلى، وشملت الرقم الهيدروجيني ومعدل التهوية وسرعة التحريك وحجم اللقاح ومدة الحضن وتأثير درجة حرارة ومدة خزن الراشح للعزلات، اختبر أيضاً قدرة العزلات المنتخبة على إنتاج المركبات الخالبة للحديد وإذابة الفوسفات وتثبيت النتروجين حيوياً في الوسط. وأظهرت النتائج الحصول على ١٨ عزلة قادرة على إنتاج الاندول (من مجموع العزلات البالغة ٣٠ عزلة) كانت ١٤ عزلة منها بكتيرية عقدية. اختبرت ٨ عزلات ذات كفاءة عالية في إنتاج الاندول كان منها ٦ عزلات تعود لجنس Rhizobium وعزلتان لجنس Pseudomonas، وفي عملية غربلة لاحقة باستعمال أوساط زرعية تحت ظروف بيئية مختلفة انتخبت العزلتين Pseudomonas ذات الرقم المحلي ٢ (Pssp2S) وRhizobium ذات الرقم المحلي ٨ (Rsp8RA) وهي الأكفأ في إنتاج الاندول إذ بلغ إنتاجهما النهائي ٤٢.٨ و٤١.٩ ملغم IAA/ لتر على التوالي. وأدى استعمال تركيز ١٠ % من الأوساط المحلية المحضرة من مسحوق بذور الباقلاء وفول الصويا والحليب المجفف إلى تحسين إنتاج الاندول معنوياً بوساطة العزلات المنتخبة وبنسب تراوحت من ٣٠ – ٥٠ %. وان تدعيم الأوساط المحلية بالببتون والمرق المغذي والكلوكوز والنتروجين والفسفور زاد من قدرة العزلات على إنتاج الاندول معنوياً بنسب تراوحت بين (٤٠ –٦٥%).أظهرت نتائج دراسة الظروف البيئية المثلى في تحسين إنتاج الاندول ان أفضل إنتاج تحقق باستعمال العزلة Rsp8RA مع الرقم الهيدروجيني (٧.٠) إذا بلغ الإنتاج ٣٩.٤١ ملغم IAA / لتر، وان أفضل سرعة تحريك ٢٠٠ درجة/ د مع عدم تهوية الوسط للعزلة Pssp2S وبلغ إنتاجها ٤٢.٢ ملغم IAA/ لتر، وكان أفضل تداخل بين حجم اللقاح ومدة الحضن عند استعمال ٣ مل لقاح/ ١٠٠ مل وسط بعد مدة حضن ٢٤ ساعة إذ بلغ الإنتاج ٤٢.٨ ملغم / لتر للعزلة Pssp2S وبكثافة ميكروبية ٨.٤١ Log cfu / ml. أوضح اختبار تأثير درجة حرارة ومدة خزن راشح العزلات على نسبة وسرعة الإنبات لبذور فول الصويا والفلفل تفوق فعالية رواشح العزلات المحفوظة بدرجتي حرارة ٤ ، ٢٥ م لمدة يوم واحد والمحفوظة بدرجة حرارة ٤ م لمدة ٤٥ يوم على معاملة خزن الراشح بدرجة حرارة ٢٥ م لمدة ٤٥ يوم ومعاملة الاندول الصناعي، وحققت رواشح العزلات عموماً زيادة في نسبة وسرعة الإنبات بلغت (١٠ – ٢٠ %) وبفارق زمني قدره (٣ – ٥) أيام على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة.

كلمات مفتاحية: إنتاج ، اندول حامض الخليك ، البكتريا ، أوساط محلية

المقدمة: تتمكن بعض البكتريا من إنتاج كميات كبيرة من منظم النمو (IAA) تفوق كثيراً ما ينتجه النبات عند توفر الظروف البيئية للإنتاج والوسط الملائم الذي يجب ان يحتوي على مصدر كاربوني غني بالحامض الاميني التربتوفان الذي يعد منشأ البناء الحيوي للاندول وتختلف الكائنات الحية الدقيقة في قابليتها على إنتاج حامض الاندول IAA فمنها مالا تستطيع إنتاج هذا المركب ومنها ما تنتجه حسب نوع الكائن الحي وكثافته في الوسط. ففي دراسة أجراها (١) لانتخاب أكفأ العزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Azospirillum وبكتريا Azotobacter spp في إنتاج حامض الاندول ونشاط

إنزيم النتروجيز، فوجدوا ان بكتريا الرايزوبيا عموماً كانت أكثر كفاءة في نشاط إنزيم النتروجيز وإنتاج منظم النمو، واستطاع (٢) من انتخاب ثلاثة عزلات منتجة، Pseudomonas putido و Chrococcum و Azotobacter وكانت إنتاجها من الاندول (IAA) ٧.٤١ و٤.٥ و١.٣٨ ملغم/ لتر على التوالي. وذكر (٣) ان عزلات من بكتريا Ps.fluorescens و B.megaterium و Az.vinelandii استطاعت إنتاج كميات من IAA تراوحت بين ١٧.٧ – ٢٢.٧ ملغم/ لتر. ووجدوا ان تجهيز الوسط بالتربتوفان والكلوكوز قد أدى إلى تحسن إنتاج الاندول من قبل بكتريا Ps.putida باستعمال معاملات للوسط جهز فيها التربتوفان بمعدل ٠ و٥٠ و١٠٠ و٢٠٠ ملغم/ لتر والكلوكوز بمعدل ٠ و٠.٥ و١.٠ و٢.٥ و١٠ ملغم/ لتر وقد كان لزيادة معدل التربتوفان والكلوكوز أثرا كبيرا في زيادة إنتاج الاندول من قبل البكتريا وبلغ أعلى معدل إنتاج عند تركيز ٢٠٠ ملغم/ لتر تربتوفان و١٠ ملغم/ لتر كلوكوز إذ بلغ الإنتاج ٤٥ ملغم IAA/ لتر بعد ٤٨ ساعة من الحضن.

لاحظ (٤) ان مجموعة عزلات من البكتريا Azotobacter و Pseudomonas قد أنتجت كميات كبيرة من الاندول وصلت إلى ٣٢.٢ ملغم/ لتر عند تنميتها على وسط المرق المغذي المدعم ٠.٢ – ٠.٥ % من مسحوق بذور نبات فول الصويا مصدراً للتربتوفان. وتبين ان بكتريا من نوع Ps.pudia المنماة على وسط يحتوي ٤.٥٤ ملي مول من التربتوفان و٥.٥٦ ملي مول من الكلوكوز و٢٢.٥ ملي مول فركتوز و٨.٣٥ ملي مول بنزوات، قد أعطت إنتاجا من الاندول بلغ ٣٨.٤ ملغم IAA/ لتر.

تعد طريقة استعمال الهزاز حلاً نموذجياً إذ انه يقوم بتوزيع مكونات الوسط في كل اتجاه ويزداد معدل نمو الخلايا وتعوض عملية سرعة التحريك أحيانا عن عملية تهوية المزرعة(٥). وتوصل (٦) ان أفضل سرعة تحريك لإنتاج الاندول كانت ٢٠٠ د/ د كما ان جميع سرع التحريك المستعملة ١٠٠ و١٥٠ و٢٥٠ قد تفوقت على معاملة السيطرة تمكن (٧) من عزل بكتريا الرايزوبيا وتنميتها في وسط حاوي على التربتوفان فوصل أعلى إنتاج لها ٢٢.٣ ملغم/ لتر بعد ٢٠ ساعة إذ دخلت البكتريا طور الإنتاج أو الاستقرار. وأشار التقرير المقدم من قبل (٨) ان بعض العزلات البكتيرية تنتج كميات من التربتوفان وهو الحامض الاميني الأساس في تكوين منظم النمو (IAA) في مراحل طور التطبع، ثم لا يلبث ان يستهلك في المسارات الحيوية لانقسام وتكاثر البكتريا في الطور اللوغارتمي. وقد ذكر (٩) ان بكتريا Ps.putida يصل إنتاجها من الاندول ٣٢ ملغم IAA/ لتر نهاية الطور اللوغارتمي، إلا ان بقاء خلايا المزرعة بعد ٧٢ ساعة أدى إلى تحلل أكثر من ٢٥ % من الاندول إلى مركبات أخرى، ووجد ارتباطاً معنوياً بين كتلة الأحياء المجهرية في الوسط بعد ٧٢ ساعة وكمية الاندول المحللة. أما (٤) فقد وجدوا ان بكتريا A.vinelandii قد أنتجت ٣٢.٢ ملغم IAA/ لتر وكان معظم إنتاجها بعد ٤٠ – ٥٠ ساعة من الحضن. وفي دراسة أجراها (١٠) حول مدى تحمل ١٢ عزلة بكتيرية لدرجات حرارية تراوحت بين (١٠ – ٤٠ْم) إذ تمكنت ٩ عزلات بكتيرية من إنتاج الاندول بمعدل تراوح من (٢٠ – ٩٠) ملغم IAA/ لتر وكان الإنتاج الأمثل قد حصل في درجات حرارة بين (٢٨ – ٣٢ْم). كما ذكر (٧) ان إضافة نترات البوتاسيوم (KNO3) مصدر للنتروجين بنسبة ٠.٠٢ % إلى الوسط الذي نمت عليه بكتريا الرايزوبيا أدى إلى زيادة إنتاج الاندول، مما أدى استعماله إلى زيادة قابلية النبات في تكوين اكبر عدد من العقد الجذرية وتحسين إنتاج النبات. كما لاحظ (١١) ان إضافة الفسفور بصيغة KH2PO4 وبواقع ٢ ملغم/ لتر قد أدى إلى زيادة إنتاج الاندول في الوسط بنسب تراوحت بين (٥.٦ – ٧.٥ %) من قبل عزلات مختلفة من الرايزوبيا كما ان تلقيح النبات بهذه العزلات زاد من الوزن الجاف والحاصل للنبات.

وجد (١٢) ان تخزين راشح عزلتين من البكتريا (Azospirillum و B.cereus) لمدة ٣٠ يوم في درجة حرارة (٥ و٣٥ْم) لم يتأثر كثيراً ولكلا العزلتين عند درجة حرارة ٥ْم فقد كانت كمية الاندول في الراشح الأصلي لعزلة Azospirillum ١٥.٢ ملغم/ لتر، أما العزلة B.cereus فكان ٢٢.٦ ملغم/ لتر، وبعد التخزين بدرجة حرارة بدرجة حرارة ٣٥ْم انخفضت الفعالية إلى ٨.٩ و١٨.٢ ملغم/لتر للعزلتين Az. و B. على التوالي وكانت العزلة Bacillus أكثر مقاومة لظروف التخزين من العزلة Az. وجد (١٣) ان منظم النمو IAA المنتج من قبل بكتريا العقد الجذرية أدى إلى زيادة الإنبات لنبات اللهانة (Brassica Campestris) إذ بلغت نسبة الإنبات ٧٢ – ٧٥ % مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت فيها نسبة الإنبات ٥٤ % بعد مرور ١٥ يوم على الزراعة.

استهدفت الدراسة إنتاج حامض الاندول باستعمال عزلات بكتيرية قادرة على إنتاجه في أوساط كاربونية محلية ودراسة تدعيم الأوساط المحلية بمواد وعناصر يمكن بواسطتها زيادة نمو ونشاط البكتريا وتحسين إنتاجها للاندول وتحديد الظروف الملائمة للإنتاج الأمثل من حيث مدة الحضن، الكثافة الميكروبية، الرقم الهيدروجيني للوسط، درجة الحرارة والتهوية وسرعة التحريك للوسط.

المواد وطرائق العمل

– جمع نماذج جذور النباتات البقولية لعزل البكتريا العقدية.

اختيرت أربعة مناطق تشتهر بزراعة النباتات البقولية تقع ضمن محافظة الأنبار الخالدية (Ka) والصوفية (So) والعامرية (Am) والكرمة (Kr) للتحري عن تواجد وعزل البكتريا العقدية المنتجة لمركبات الاندول. واختيرت ٥ نباتات بقولية من النباتات النامية بشكل جيد في الحقل. رطبت التربة حول النبات قبل عملية القلع لتقليل التأثيرات الميكانيكية على الجذور بعدها أزيلت التربة المحيطة بالمجموع الجذري بتعريضها لتيار مائي معتدل السرعة لتسهيل عملية الحصول على العقد الجذرية، ثم قطعت أجزاء الجذور المحتوية على العقد الفعالة ذات اللون الوردي والكبيرة الحجم ثم نقلت إلى أكياس معقمة.

اتبعت الطريقة المبينة من قبل (١٤) في عزل البكتريا من العقد الجذرية، حددت العزلات المنتجة لمركبات الاندول والتي بلغت ١٨ عزلة لغرض استعمالها في التجارب اللاحقة. ولغرض معرفة كفاءة العزلات المنتجة للاندول اتبعت طريقة(١٥). لغرض معرفة قدرة العزلات على إنتاج مركبات الاندول في وسط المرق المغذى (NB) أو عند تدعيم وسط ماء البيتون به فقد حضرت وسط المرق المغذى ووسط ماء البيتون١ % ثم دعم وسط المرق المغذى بالبيتون ١ % ودعم وسط البيتون بنسبة ١ % من المرق المغذي. وضعت في أنابيب اختبار (حجم ٢٥ مل) بمقدار ١٠ مل الوسط وعقمت بالموصدة ثم لقحت من العزلات المنتخبة البالغة ٨ عزلات، ثم حضنت في درجة ٢٨ ± ٢ْ م لمدة ٤٨ ساعة. قدرت بعدها كمية الاندول الناتجة وانتخبت ٥ عزلات متميزة في الإنتاج.

– قدرة العزلات المنتخبة على إنتاج مركبات الاندول باستعمال أوساط محضرة محلياً.

نظراً لكون بعض المواد النباتية أو الحيوانية ذات محتوى جيد من الحامض الاميني التربتوفان (Tryptophan) الذي تؤدي عملية ايضه المايكروبي إلى تكوين حامض الاندول حضر المسحوق الجاف من بذور الباقلاء واللوبيا وفول الصويا والحليب المجفف (نوع بديع) إذ مرر كل مكون من منخل قطر فتحاته ٠.٢ ملم. وحضر منه مستخلص مائي دافئ (٥٠ْ م) وبتركيزين ٥ و١٠ غم/ ١٠٠ مللتر ماء مقطر، بعد مدة نقع ٢٤ ساعة رشحت المحاليل بالطرد المركزي (٣٠٠٠ د/ د)، ثم عقمت بالترشيح من خلال مرشح قطر فتحاته ٠.٤٥ ملي مايكرون. وزعت الأوساط في قناني زجاجية معقمة حجم ٢٥٠ مل وبمقدار ١٠٠ مل/ قنينة، بعدها لقحت من العزلات المنشطة في المرق المغذي بمعدل ٢ مل/ ١٠٠ مل وسط (٤.٢ × ١٠٦ cfu / ml)، وحضرت المعاملات بثلاثة مكررات حضنت في حاضنة هزاز بسرعة ١٢٠ دورة/ دقيقة وبدرجة ٢٨ ± ٢ْ م لمدة ٤٨ ساعة. وحسبت كمية الاندول المنتجة.

– تأثير تدعيم الأوساط المحلية بالبيتون والمرق المغذي في إنتاج الاندول.

لغرض تحسين إنتاج العزلات ومكونات الأوساط المحلية وجعلها أكثر قدرة على إنتاج الاندول دعمت الأوساط المنتخبة لكل عزلة من التجربة السابقة بتراكيز مختلفة من البيتون والمرق المغذي إذ وزعت الأوساط بمقدار ١٠٠ مل/ دورق حجم ٢٥٠ مل ودعمت بتراكيز ١، ٢، ٣ (غم/ ١٠٠ مل) من البيتون وNB. وعقمت الأوساط بالموصدة ثم لقحت من لقاح العزلات بمعدل ٢ مل/ ١٠٠ مل وسط وحضنت في حاضنة هزاز بسرعة ١٢٠ رجة/ د لمدة ٤٨ ساعة بدرجة حرارة ٢٨ ± ٢ْ م. قدرت فيها كمية الاندول الناتجة، انتخب التركيز الملائم من مواد التدعيم لكل مادة تدعيم للعزلات المستعملة في التجارب اللاحقة.

– تأثير تدعيم الوسط بالكلوكوز على إنتاج حامض الاندول.

لغرض معرفة دور استعمال الكلوكوز في تحسين إنتاج العزلات لمركبات حامض الاندول حضرت الأوساط المنتخبة من التجارب السابقة وحسب الملائمة مع العزلات ودعمت بمقدار ١، ٢، ٣، ٤ غم كلوكوز/ ١٠٠ مللتر وسط، عقمت الأوساط ولقحت بمعدل ٢ مل/ ١٠٠ مل وسط. وحضنت في حاضنة هزاز ١٢٠ رجة/ د ودرجة حرارة ٢٨ ± ٢ْ م ولمدة ٤٨ ساعة . قدرت كمية الاندول الناتجة انتخب التركيز الملائم من الكلوكوز لكل عزلة في التجارب اللاحقة(٥).

– تأثير تدعيم الوسط بمصدري النايتروجين والفسفور في إنتاج الاندول.

على الرغم من كون الأوساط ذات محتويات جيدة من المصدر النتروجيني العضوي ، ولغرض معرفة تأثير استعمال كبريتات الامونيوم (NH4)٢ SO4 مصدراً نتروجينياً وأثره على إنتاج مركبات الاندول، فقد استعمل بمعدل ٢ غم/ لتر، كذلك بهدف تعزيز كمية الفسفور في الوسط استعمل K2HPO4 بمعدل ٢ غم/ لتر. علاوة على استعمال معاملة المستعمرات من خليطهما لمعرفة التأثير المشترك لهما في إنتاج مركبات الاندول. حضرت الأوساط المنتخبة حسب متطلبات كل عزلة في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل كما ورد في التجارب السابقة وجهزت مكوناته بالمعاملات من مصدري النتروجين والفسفور، وعقمت الأوساط بالموصدة ثم حضنت كما ذكر سابقاً. قدر الاندول بعد ٤٨ ساعة في الوسط.

– تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط في إنتاج الاندول.

لغرض تحديد الرقم الهيدروجيني المناسب في الوسط لإنتاج الاندول حضرت الأوساط المناسبة وحسب ما تحتاجه كل عزلة وفق التجارب السابقة وعدل الرقم الهيدروجيني للاوساط إلى ٥،

٦، ٧ و٨ ثم لقحت وحضنت وقدر الاندول في الأوساط بعد مدة ٤٨ ساعة.

– تأثير معدل التهوية وسرعة التحريك للوسط في إنتاج الاندول.

لغرض تحديد معدل التهوية وسرعة تحريك الوسط المناسب اختبر تأثير ثلاثة معدلات لتهوية الأوساط ٠.٠ و٠.٥ و١.٥ لتر/ دقيقة مع استعمال ثلاث سرع تحريك ١٥٠ و٢٠٠ و٢٥٠ د/ د بهدف تحسين خلط مكونات الوسط وتوفير كمية من الهواء المناسبة لإنتاج الاندول في الوسط حضرت الأوساط حسب احتياج العزلات في التجارب السابقة ووزعت في دوارق زجاجية حجم ٢٥٠ مل بمقدار ١٠٠ مل/ دورق جهز كل دورق بأنبوبين زجاجيين وضع في طرفيها العلويين قطن (كمرشح) أوصلت إحداهما إلى قعر الدورق لتجهيز الهواء بشكل متجانس في الوسط وربطت بمضخة هواء يمكن التحكم من خلالها بكمية الهواء المجهزة حسب حاجة المعاملات، فيما وضعت الأخرى بشكل يكون طرفها السفلي فوق سطح الوسط بمسافة ٣ سم للسماح بخروج ثاني اوكسيد الكاربون والهواء الزائد. عقمت الأوساط ولقحت كما ورد في التجارب السابقة. وحضنت بسرع تحريك حسب المعاملات المحددة لمدة ٤٨ ساعة قدر الاندول الناتج.

–تأثير حجم اللقاح ومدة الحضن في إنتاج الاندول

لغرض تحديد كثافة اللقاح ومدة الحضن المناسبة لإنتاج الاندول في الوسط استعملت ثلاثة مستويات من حجم اللقاح ١ و٢ و٣ مللتر/ ١٠٠ مل وسط يحتوي المللتر الواحد ١٠٧ × ٥ cfu /ml حضرت اللقاحات بتنمية العزلات في وسط المرق المغذى وقدرت الكثافة المكروبية بطريقة التخافيف والصب بالأطباق وخففت عند الاستعمال بكمية من الوسط لتصبح متناوبة الكثافة الميكروبية الابتدائية وكالاتي ٥.٦٩، ٦.٠ و٦.١٧ Log cfu / ml للوسط واستعملت ثلاثة مدد للحضن ٢٤ و٤٨ و٧٢ ساعة. حضرت الأوساط بما يناسب العزلات المنتخبة بناءً على نتائج التجارب السابقة ولقحت، ثم حضنت بدرجة ٢٨ ± ٢ْ م بسرعة تحريك ٢٠٠ دورة/ د للمدد المحددة. وقدر الاندول وانتخب حجم اللقاح والمدة الزمنية الأفضل لإنتاج الاندول، وحسبت الكثافة حسب (١٦).

– تأثير درجة الحرارة ومدة خزن راشح العزلات في فعالية الاندول.

لغرض تحديد مدة خزن الراشح ودرجة الحرارة المثلى. خزن الراشح المنتج في درجة حرارة ٤ و٢٥ْ م لحفظ الراشح قبل استعماله ولمدة زمنية ١ و٤٥ يوم بعد الإنتاج وأجريت عملية طرد مركزي للمزارع بسرعة ٣٠٠٠ دورة/ د لثلاثة مرات وحفظ راشح العزلات في قناني محكمة ومعقمة في ثلاجة (٤ْ م) وحاضنة (٢٥ْ م) وحسب المدد الزمنية المحددة أعلاه، ثم فحص دور الرواشح في التأثير على نسبة وسرعة الإنبات لبذور نباتات كل من الباذنجان والفلفل وفول الصويا والقطن مقارنة باستعمال الاندول الصناعي بتركيز ٤٥ ملغم/ لتر وماء الحنفية. إذ تم نقع بذور النباتات المذكورة المتجانسة في الحجم والخالية من الكسور والإصابة في الماء الاعتيادي لمدة ٢٠ دقيقة ثم نقلت إلى رواشح العزلات المحضرة ومحلول الاندول (تركيز ٤٥ ملغم/ لتر) المحضر في أطباق بتري وتركت لمدة ساعتين ثم نقلت إلى أطباق بتري أخرى، وقد استعمل ١٠ بذور لكل نبات في الطبق الواحد وسجلت نسبة الإنبات خلال عشرة أيام، وحللت النتائج إحصائياً(١٧).

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج جمع العزلات البكتيرية العقدية من جذور النباتات البقولية المختلفة النامية في حقول متباينة الموقع في محافظة الأنبار انه أمكن الحصول على ١٥ عزلة من بكتريا العقد الجذرية Rhizobioum تعود ٣ عزلات منها لنبات البرسيم R.trifolii و٤ عزلات تعود لنبات الباقلاء R.fababean و٣ عزلات تعود لنبات النفل وهما R.leguminosorum و٢ عزلة تعود لنبات الجت هي R.meliloti وعزلة واحدة تعود لنبات اللوبيا R.vignacatiang وعزلة واحدة R.archishypog تعود لنبات فستق الحقل وحصل على عزلة واحدة R.japonicum تعود لنبات فول الصويا. وقد تباين تكوين العقد الجذرية في النباتات البقولية من عائل لآخر ومن موقع لآخر، وهذا يؤكد تباين قدرات العزلات المحلية في قابليتها لإحداث الإصابة نظراً لامتلاكها ميكانيكيات مختلفة في مقاومة الظروف المحيطة وقدرتها على المقاومة ولفترات الإصابة (١٨).

وتم الحصول على عزلات جاهزة من المختبرات البحثية في دائرة البحوث الزراعية والبالغة ١٠ عزلات بكتيرية عقدية و٥ عزلات محلية من مختبرات كلية العلوم جامعة الأنبار غير عقدية تستطيع إنتاج الاندول بفحوصات أجريت عليها ضمن تجارب سابقة، ليصبح عدد العزلات ٣٠ عزلة. واظهر اختبار فحص دليل البروموثايمول الأزرق لعزلات البكتريا العقدية البالغة ٢٥ عزلة ان العزلات المستعملة تعود للبكتريا العقدية (Rhizobioum) إذ أظهرت جميعها تغيراً في لون الوسط من اللون الأزرق المخضر إلى الأصفر والذي يعد دليلاً ايجابياً على كونها بكتريا عقدية (١٤).

– قدرة العزلات على إنتاج الاندول.

أظهرت نتائج اختبار قدرة العزلات المستعملة في الدراسة على إنتاج الاندول في وسط ماء الببتون ١% ان ١٨ عزلة (بنسبة ٣٠ % من مجموع العزلات) قادرة على إنتاج الاندول،

وتبين ان ١٤ عزلة من مجموع عزلات البكتريا العقدية (٢٥ عزلة) أي بنسبة ٥٦ % قادرة على إنتاج الاندول (جدول ١). ويعزى تباين عزلات الرايزوبيا العقدية أو العزلات الأخرى المنتجة للاندول إلى قدرتها الإنزيمية في ايض الحامض الاميني التربتوفان وتحويله إلى حامض الاندول في الوسط ومن الطبيعي ان تتباين قدرات هذه العزلات في إنتاج الاندول إذ أشار (٤) إلى وجود عدد من عزلات الرايزوبيا غير المنتجة للاندول، وذكر (١) ان اغلب عزلات الرايزوبيا كانت منتجة للاندول وان قسماً منها غير منتجة وراثياً وكانت أكثر كفاءة من عزلات Azotobacter و Azospirillum.

- غربلة العزلات الكفوءة في إنتاج الاندول.

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (١) تباين قدرة العزلات في إنتاج الاندول في وسط ماء البيتون، بلغ الحد الأعلى للإنتاج ١٤.٦ ملغم/ لتر باستعمال عزلة Rsp2kr المعزولة من نبات فول الصويا، تلتها العزلة Rsp8RA المعزولة من نبات فول الصويا أيضا بإنتاج قدره ١٣.٢ ملغم/ لتر، في حين بلغت اقل كمية إنتاج للاندول ٢.٨ ملغم/ لتر من قبل العزلة Rsp9RA. وهذا يتفق مع ما توصل إليه (١٩) بوجود اختلافات كبيرة في كمية الاندول المنتج من قبل العزلات المستخدمة في دراساتهم وهذا ما أكده (٢) الذي انتخب ثلاثة عزلات من مجموع ١٠٦ عزلة حصل عليها من التربة كانت منتجة للاندول.

- تحسين إنتاج العزلات للاندول باستعمال وسط والمرق المغذى.

تبين النتائج الموضحة في الجدول (٢) ان أعلى معدل للإنتاج في الأوساط المستعملة بلغ ١١.٤٨ ملغم/ لتر في وسط ماء البيتون والمرق المغذى المدعم ١% ماء البيتون قدرة مقاربة في الإنتاج تراوحت بين (١٠.٢٧ – ١٠.٤٣) ملغم/ لتر، في حين كان أعلى معدل إنتاج معنوي للاندول مع العزلة Rsp2kr التي بلغ إنتاجها ١٤.٢٠ ملغم/ لتر تلتها العزلتان Pssp2S و Rsp8RA بمعدل إنتاج قدره ١٣.٠٧ و ١٢.٦٧ ملغم/ لتر على التوالي. وقد اظهر تداخل المعاملات ان أفضل المعاملات لإنتاج الاندول التي استعمل فيها وسط ماء البيتون المدعم بـ ١ % NB مع العزلة Rsp2Kr والعزلة Rsp8RA والعزلة Pssp2S إذ بلغ معدل الإنتاج ١٦.٣١ و ١٥.١٠ و ١٤.٦٠ ملغم/ لتر على التوالي. وهذا يؤكد انه لهذه العزلات القدرة على ايض مكونات المرق المغذي وزيادة إنتاج الاندول وهذا ما ذكره (٨) و(٦) حيث ان هذه المركبات تمكن البكتريا من الدخول بمسارات الطاقة المؤدية إلى إنتاج IAA. كذلك

- تحسين إنتاج الاندول بتدعيم الأوساط المحلية من البيتون والمرق المغذي.

تعمل على زيادة الكثافة الميكروبية في الوسط بأسرع وقت مما يزيد من إنتاج الاندول.

- دور الأوساط المحضرة محلياً في تحسين إنتاج الاندول للعزلات المنتخبة.

يتضح من النتائج المبينة في جدول (٣) ان استعمال الأوساط المحضرة محلياً لإنتاج الاندول باستعمال العزلات المنتخبة ان بعض الأوساط المستعملة حقق الهدف المطلوب، إذ اظهر الوسط المحضر من بذور فول الصويا أعلى قدرة في إنتاج الاندول معنوياً بمعدل بلغ ١٣.٣١ ملغم/ لتر تلاه الوسطين المحضرين من بذور الباقلاء والحليب بمعدلي إنتاج ١٢.١٩ و ١١.٥٩ ملغم/ لتر على التوالي. كما وجد ان زيادة تركيز الوسط من المواد المحلية المحضرة من ٥ % إلى ١٠ % قد ساهم بزيادة الإنتاج، وظهر ذلك بشكل معنوي مع استعمال الوسطين المحضرين من بذور فول الصويا وبذور الباقلاء. إذ ازداد معدل الإنتاج فيهما من ١١.٣٦ و ٩.٦٨ ملغم / لتر ليصل إلى ١٥.٢٦ و١٤.٧ ملغم/ لتر على التوالي مع زيادة تركيز الوسط من ٥ إلى ١٠ %، أي ان نسبة الزيادة بلغت ٣٤.٣ % و٥١.٨% على التوالي. وجد ان أفضل تداخل للمعاملات أدى إلى زيادة الإنتاج تحقق مع المعاملات المكونة باستعمال الوسط المحضر من بذور الباقلاء بتركيز ١٠ % مع العزلة Rsp2Kr إذ بلغ معدل إنتاج الاندول ٢٧.١ ملغم/ لتر، تلتها المعاملة المكونة من استعمال الوسط المحضر من بذور فول الصويا بتركيز ١٠ % مع العزلة Rsp8RA بمعدل إنتاج قدره ٢٦.١ ملغم/ لتر كذلك حققت العزلة Pssp2S عندما نميت في وسط الحليب تركيز ١٠ % إنتاجا قدره ٢٣.٠ ملغم/ لتر من الاندول. وهذا يؤكد أهمية المواد المتوفرة في فول الصويا والباقلاء لعزلتي البكتريا العقدية الجذرية وربما يعزى ذلك إلى 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 إلى مكونات الاندول. فقد ذكر (٣) ان التربتوفان يعد حامضاً أمينياً أساسياً في إنتاج IAA ويتواجد هذا الحامض الاميني في كثير من المواد مثل الحليب والموز وبذور النباتات البقولية وان استعمال مثل هذه المواد في الوسط يحسن من إنتاج IAA بواسطة البكتريا وهذا ما أكدت عليه (٤) الذي وجد ان إنتاج بكتريا Azotobacter و Pseudomonas قد وصل إلى ٣٢.٢ ملغم/ لتر عند استعمال وسط البروث المدعم بمسحوق من بذور نبات فول الوصويا وبنسبة (٠.٢ – ٠.٥%)

تشير النتائج الموضحة في الجدول (٤) إلى تحسن إنتاج الاندول من العزلات اثر تدعيم الأوساط من البيتون أو المرق

المغذي، إذ أوضحت النتائج ان معدل نسبة الزيادة المتحققة بلغت ٢٩.٥١ % و٢٨.٥٣ % ملغم/ لتر على التوالي. وأدى استعمال البيتون بتركيز ٣ % حصول أعلى إنتاج معنوي إذ بلغ ٣٣.٠٦ ملغم/ لتر، بينما كان التركيز الأفضل من المرق المغذي هو ٢% والذي أعطى معدل إنتاج قدره ٢٩.٨٩ ملغم/ لتر. كذلك أظهرت العزلات استجابة معنوية للتدعيم فبلغ معدل إنتاجها ٣٠.٢٤ و٢٩.١٩ و٢٨.٠٠ ملغم IAA/ لتر للعزلات Rsp2Kr و Rsp8RA و Pssp2S على التوالي.

ووجد ان أفضل معاملات التداخل حققت زيادة معنوية في إنتاج الاندول هي المعاملات المكونة من تدعيم الوسط المحضر من بذور فول الصويا مع تركيز ٣ % ببتون للعزلة Rsp-8RA والتي أعطت أعلى إنتاج معنوي قدره ٣٦.٤ ملغم IAA/ لتر، تلتها المعاملة المؤلفة من استعمال الوسط المحضر من بذور الباقلاء المدعم بتركيز ٣% من البتون باستعمال العزلة Rsp2Kr. إلا ان العزلة Pssp2S قد أعطت أعلى إنتاج بلغ ٣٢.٤ ملغم IAA/ لتر عند استعمال وسط الحليب المدعم بتركيز ٢% من المرق المغذي. تؤكد هذه النتائج أهمية تجهيز الوسط بالمواد التي يكون ايضها سريع التحول إلى IAA عند الرغبة في إنتاجه(١٩).

-تأثير تدعيم الأوساط بالكلوكوز في إنتاج الاندول

يوضح الشكل (١) وجود تحسن في إنتاج العزلات اثر تدعيم الأوساط بتراكيز مختلفة من الكلوكوز ولحد التركيز ٢ غم كلوكوز/ ١٠٠ مل وسط، وبمعدل إنتاج من الاندول قدره ٣٥.٩٣ ملغم/ لتر. كذلك أظهرت العزلات استجابة متباينة لإضافات الكلوكوز في الوسط إذ تفوقت العزلة Rsp8RA بتحقيق أعلى معدل بلغ ٣٧.١٦ ملغم IAA/ لتر من الاندول تلتها العزلتين Rsp2Kr و Pssp2S بمعدلي إنتاج قدرهما ٣٤.٨٥ و٣٢.٤٣ ملغم/ لتر على التوالي. ولوحظ ان عزلتي البكتريا العقدية قد حافظت على مستوى معدل إنتاجها بزيادة تركيز الكلوكوز في الوسط فوق ٢ غم كلوكوز/ ١٠٠ مل دون زيادة في إنتاج الاندول عكس ما حصل مع عزلة Pssp2S التي انخفض إنتاجها من الاندول عند زيادة تركيز الكلوكوز عن ٢ غم كلوكوز/ ١٠٠ مل. ووجد ان أفضل معاملات التداخل مع استعمال التركيز ٢ غم كلوكوز/ ١٠٠ مل وسط من الأوساط المنتخبة للعزلات والتي أعطت أفضل معدلات في إنتاج الاندول البالغة ٣٧.٤ و٣٥.٦ و٣٤.٨ ملغم IAA/ لتر مع العزلات Rsp8RA و Rsp2Kr و Pssp2S على التوالي، ووجد (٣) ان إنتاج بكتريا Ps.putida قد تحسن عند إضافة مستويات من الكلوكوز وكان أفضل إنتاج عند مستوى تركيزه ١٠ ملغم كلوكوز/ لتر، كما لاحظ (٢٠) ان بكتريا Ps.putida قد زاد إنتاجها من الاندول عند تدعيم الوسط بتركيز ٥.٥٦ ملي مول من الكلوكوز.

- تأثير التدعيم بمصدري النتروجين والفسفور في إنتاج الاندول.

يوضح الشكل (٢) تأثير تدعيم الأوساط من النتروجين والفسفور على إنتاج الاندول، فقد اظهر استعمال خليط المصدرين تأثيراً معنوياً في زيادة إنتاج الاندول وبلغ معدله ٣٨.٤٣ ملغم/ لتر، وأظهرت العزلتان Rsp8RA و Pssp2S استجابة معنوية لإضافة المصدرين، إذ بلغ معدل إنتاجهما ٣٨.٢٦ و ٣٧.٣٣ ملغم / لتر على التوالي. بينما لم يتحسن إنتاج العزلة Rsp2Kr. كما يتضح ان أفضل معاملات التداخل معنويا تحقق مع استعمال العزلة Rsp8RA وخليط النتروجين والفسفور بإنتاج قدره ٣٩.٦ ملغم/ لتر تلاه ما تحقق من العزلة Pssp2S والبالغ إنتاجها ٣٨.٩ ملغم/ لتر من التدعيم بالمصدرين معاً. كما لوحظ ان استعمال المصدر النتروجيني وحده لم يؤدي إلى تحسن إنتاج عزلتي البكتريا العقدية بينما أدى إلى تحسن إنتاج العزلة Pssp2s إلى إنتاج قدره ٣٧.٣٠ ملغم/ لتر. وربما يعود ذلك إلى قابلية العزلتين على تثبيت النتروجين من الهواء الجوي وعدم قدرة العزلة الأخيرة على ذلك. وبذلك فان تدعيم الوسط بهذين العنصرين سيكون له دور مهم في زيادة النشاط وإنتاج الاندول. ذكر (٧) ان تجهيز الوسط بنترات البوتاسيوم (KNO_3) كمصدر نتروجيني وبنسبة ٠.٠٢% إلى وسط بكتريا الرايزوبيا أدى إلى زيادة إنتاج الاندول. ولاحظ (١١) ان إضافة الفسفور بصيغة KH_2PO_4 وبواقع ٢ ملغم/ لتر أدى إلى زيادة الاندول في الوسط بنسب تراوحت بين (٥.٦ – ٧.٥ %) بواسطة عزلات مختلفة من الرايزوبيا، وذكر (٣) ان عزلات بكتيرية من Pseudomonas و Bacillus و Azotobacter عندما نمت في وسط يحتوي KH_2PO_4 و Na_2PO_4 أدى إلى تحسن إنتاجها من الاندول إذ تراوح بين (١٧.٧ – ٢٢.٧) ملغم/ لتر بحيث ان هذه التراكيز كانت كافية وملائمة لتطور وتحسين نمو النبات.

- دور الظروف البيئية المثلى في تحسين إنتاج الاندول.

١ -الرقم الهيدروجيني للوسط.

يوضح الشكل (٣) تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط على إنتاج العزلات للاندول إذ حصل أعلى معدل معنوي للإنتاج ٣٨.٠٧ ملغم/ لتر مع ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند الرقم ٧.٠ وانخفض الإنتاج قليلاً مع الرقم الهيدروجيني للوسط ٦.٠ ليصل الإنتاج ٣٦.١٠ ملغم/ لتر، بينما اظهر التداخل للمعاملات ان أفضل إنتاج معنوي تحقق من المعاملة المؤلفة من الرقم الهيدروجيني للوسط ٧.٠ واستعمال العزلة Rsp-

8RA حيث بلغ ٣٩.٤١ ملغم/ لتر تلتها المعاملة المؤلفة من استعمال العزلة Pssp2S النامية في الوسط ذو الرقم الهيدروجيني ٦.٠ وبمعدل إنتاج بلغ ٣٨.٦٨ ملغم/ لتر من الاندول. وربما ينخفض إنتاج الاندول مع زيادة الرقم الهيدروجيني كون المنتج حامض مما يتأثر تكوينه بظروف الوسط. وذكر (١٠) ان هناك مدى واسع للرقم الهيدروجيني يمكن للبكتريا ان تنتج عنده الاندول تراوح بين ٤.٠ – ٨.٥ حسب نوع البكتريا. وهذا ما أكده أيضاً (٢١) الذين ذكروا ان أفضل نشاط لإنزيم Indole Pyruvate decarboxylase المسؤول عن تكوين IAA عند رقم هيدروجيني ٦.٥ – ٧. ويعد الرقم الهيدروجيني أو درجة تفاعل التربة مهماً جداً في فعالية الأحياء وإحداث إصابة البكتريا للمجموع الجذري فقد أشار (٢٢) إلى ان مدى قدرة الرايزوبيا على تحمل مستويات معينة من pH يعتمد على قابليتها في المحافظة على الرقم الهيدروجيني داخل خلاياها والذي يتراوح بين (٧.٢ – ٧.٥).

٢ – معدل التهوية وسرعة التحريك للوسط

يلاحظ من الجدول (٥) ان معدل إنتاج الاندول قد انخفض بزيادة كمية الهواء المجهزة للوسط وبشكل معنوي إذ بلغ المعدل عند عدم تجهيز الوسط بالهواء ٣٩.٧٢ ملغم/ لتر، إلا انه وجد بزيادة سرعة التحريك ٢٠٠ دورة/ د أدت إلى زيادة الإنتاج إلى ٤٠.٥٣ ملغم/ لتر مع عدم تجهيز الوسط بالهواء. من جهة أخرى وجدت استجابة للعزلات في إنتاج الاندول مع التهوية وسرعة التحريك، وحصلت أفضل استجابة معنوية من نتائج التداخل بين المعاملات تحت المعاملة المؤلفة من استعمال العزلات Pssp2S و Rsp8RA مع استعمال سرعة تحريك للوسط ٢٠٠ دورة/ د وعدم تهوية الوسط، والتي بلغت ٤٢.٢ و ٤١.٤ ملغم IAA/ لتر على التوالي. وهذا ربما يؤدي إلى تغير مسارات ايض الحامض الاميني إلى غير إنتاج الاندول مع زيادة كمية الأوكسجين في الوسط الذي ربما يزيد من أكسدة بعض المركبات الوسطية قبل تكوينها للاندول غير الدور الذي تلعبه سرعة التحريك في زيادة الإنتاج وتوفر مصادر الكاربون وجعلها أكثر جاهزية للعزلات وخلط مكونات الوسط بشكل أفضل مما يعني زيادة المساحة السطحية المعرضة للايض الميكروبي التي انعكست على إنتاج الاندول. فغالباً ما تعاني الخلايا الغاطسة في المزرعة السائلة نقصاً في الأوكسجين باستمرار ،وتعد طريقة استعمال الهزاز الحل الأمثل لذلك إذ يقوم بتوزيع مكونات الوسط في كل اتجاه ويزداد معدل نمو الخلايا. ذكر (٥) ان عملية التحريك تعوض أحياناً عن عملية لتهوية المزرعة وان عملية التهوية والتحريك المناسبة تكون ضرورية للنمو الأمثل.

٣– مدة الحضن وحجم اللقاح.

يوضح الجدولان (٧ و٨) ان معدل الكثافة الميكروبية يزداد في الوسط مع زيادة حجم اللقاح إذ بلغ معدل الكثافة ٧.٧٢ و ٨.٠٦ و ٨.٢٥ Log cuf /ml بزيادة حجم اللقاح في الوسط من ١ إلى ٢ و ٣ مل / ١٠٠ مل وسط ، والذي أعطى إنتاج متزايد بلغ ٣٤.٨ و ٣٩.٦ و ٣٩.٣ ملغم/ لتر على التوالي واظهر تأثير مدة الحضن على الإنتاج، انه بزيادة مدة الحضن ازداد إنتاج الاندول؛ عند استعمال حجم اللقاح ١ مللتر/١٠٠ مل وسط ولجميع العزلات إذ بلغ أعلى معدل إنتاج للاندول ٣٥.٧ ملغم/ لتر بعد ٧٢ ساعة مع وصول معدل للكثافة الميكروبية ٨.٢٢ Log cuf /ml. واختلف الأمر عند استعمال حجم اللقاح ٢ مل/ ١٠٠ مل وسط إذ بلغ أعلى معدل لإنتاج الاندول ٤٠.٧ ملغم/ لتر مع معدل كثافة مكروبية ٨.٢٨ Log cuf /ml عند مدة حضن ٤٨ ساعة أما عند استعمال حجم اللقاح ٣ مل/ ١٠٠ مل وسط فقد وصل أعلى معدل لإنتاج الاندول ٤١.٣ ملغم/ لتر وبمعدل كثافة مكروبية ٨.٢٧ بعد مدة حضن ٢٤ ساعة. إلا ان أفضل تداخل للمعاملات قد حصل مع استعمال حجم لقاح ٣ مل/ ١٠٠ مل وسط للعزلتين Pssp2S و Rsp8RA عند مدة حضن ٢٤ إذ بلغ إنتاجهما من الاندول ٤٢.٨ و ٤١.٩ ملغم/ لتر وبكثافة مكروبية للعزلات في الوسط ٨.٤١ و ٨.٢٥ Log cuf / ml. وكان (٨) قد أشار إلى ان بعض العزلات البكتيرية تنتج كميات من التربتوفان (الحامض الاميني الأساس في تكوين الاندول) في مراحل طور التطبيع ثم لا يلبث ان يستهلك في المسارات الحيوية لانقسام وتكاثر البكتريا في الطور اللوغارتمي وذكر (٩) ان إنتاجها من الاندول يصل ٣٢ ملغم/ لتر نهاية الطور اللوغارتمي.

٤– تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات على فعاليته.

أوضحت النتائج في الجدول (٨) تفوق فعالية رواشح العزلات المحفوظة بدرجة حرارة ٤ و٢٥م لمدتين مختلفتين (١ و٤٥) يوم مقارنة باستعمال الاندول الصناعي ومعاملة السيطرة وتباينت الفروقات في التاثير للمعاملات حسب نوع النبات.

بذور فول الصويا (Glycine max L.) تحققت أعلى نسبة إنبات ١٠٠ % للبذور خلال اليوم الرابع مع استعمال راشح العزلة Rsp8RA والمخزون ليوم واحد في درجة حرارة ٤ م و٢٥م. كما حصل على نفس النتيجة لنسبة الإنبات في اليوم الخامس مع استعمال راشح العزلة Rsp2Kr المخزون ليوم واحد في درجتي حرارة ٤ و٢٥ م، كذلك أعطى راشح العزلة Pssp2S المخزون في ٢٥ م لمدة يوم واحد نسبة إنبات ١٠٠% في اليوم الخامس. لم تختلف عما تحقق عند استعمال الاندول الصناعي الذي أعطى نسبة إنبات ٨٠% في اليوم الخامس وازدادت إلى ٩٠% في اليوم السادس وبذلك فان استعمال رواشح العزلات قد حقق زيادة في نسبة وسرعة الإنبات بلغت ٢٠ % مقارنة بمعاملة السيطرة وبفارق ثلاثة أيام.

بذور الفلفل (Capsicum annuum) أدى استعمال راشحي العزلتين Rsp2Kr و Rsp8RA المخزون ليوم واحد في درجتي ٤ م و٢٥ م إلى حصول نسبة إنبات ١٠٠% خلال

اليوم ٦، بينما تراوحت نسب الإنبات بين (٨٠ – ٩٠ %) في اليوم ٧. من جانب آخر أدى استعمال الاندول الصناعي إلى حصول نسبة إنبات ١٠٠% في اليوم ٧. وبذلك أدى استعمال رواشح العزلات المشار إليها إلى زيادة في نسبة الإنبات بلغت ٢٠% وبفارق زمني قدره ٤ أيام عن معاملة السيطرة. ان دور منظمات النمو في زيادة نسبة وسرعة الإنبات يأتي 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 (٢٣ و ٢٤)، أما (١٢) فقد لاحظ انه من خلال تخزين راشحي العزلتين Azospirillum و Bacillus درجة حرارة ٥ و٣٥ ْم ولمدة ٣٠ يوم واثر ذلك على فعالية الاندول.

جدول (١) 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

جدول (٢) 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	١٤.٢٠
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	١١.٤٨	--------

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

جدول (٣) كمية الاندول (ملغم/ لتر) المنتج من العزلات باستعمال أوساط محلية

رمز العزلة	نوع الوسط المستعمل								المعدل
	مسحوق باقلاء		مسحوق لوبيا		مسحوق فول الصويا		حليب جاف		
	%٥	%١٠	%٥	%١٠	%٥	%١٠	%٥	%١٠	
Rsp_2Kr	١٣.٦	٢٧.١	٧.٨	٩.٤	١٣.٤	١٨.٥	٨.٦	١٠.٤	١٣.٦٠
Rsp_8RA	٩.٦	١٦.٥	٨.٤	٩.٦	١٦.٧	٢٦.١	٩.٠	١٠.٠	١٣.٢٣
$Pssp_2S$	٩.٨	١٢.٦	٨.٧	٩.٥	١٠.١	١٢.٨	١٦.٥	٢٣.٠	١٢.٧٦
$Pssp_1S$	٧.٦	٨.٩	٥.٦	٨.٤	٨.٤	١٠.٣	١٠.٨	١١.٦	٨.٩٥
Rsp_4So	٧.٨	٨.٤	٦.٦	٨.٦	٨.٢	٨.٦	٧.٦	٨.٤	٨.٠٢
معدل التركيز	٩.٦٨	١٤.٧	٧.٤٢	٩.١	١١.٣٦	١٥.٢٦	١٠.٥	١٢.٦٨	
معدل الوسط	١٢.١٩		٨.٢٦		١٣.٣١		١١.٥٩		

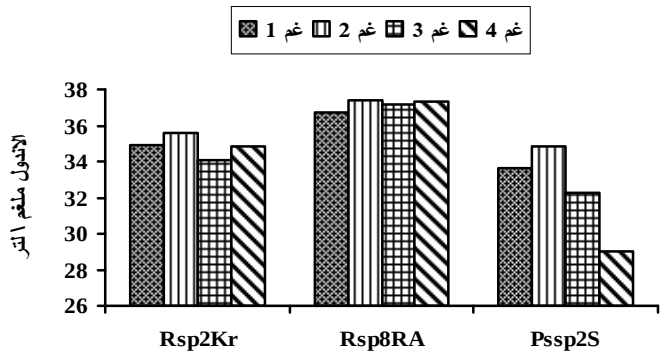
LSD P> 0.05 Is .= 2.10, Med. =2.31, Cons.= 1.35 , Is. Cons. Med. = 3.65

جدول (٤) تأثير تدعيم الأوساط المحلية على كمية الاندول المنتج من العزلات (ملغم/ لتر)

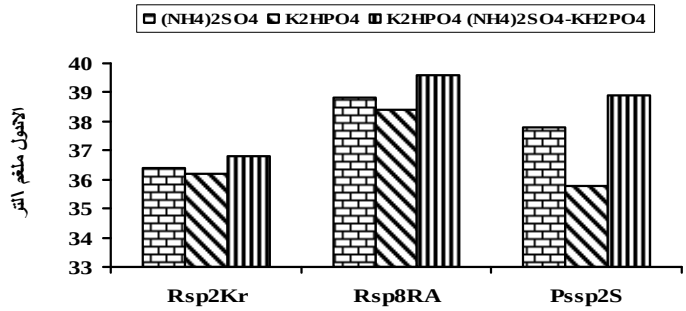
رمز العزلة	تدعيم الوسط المحلي من الببتون غم/ ١٠٠ مل			تدعيم الوسط المحلي من المرق المغذي غم /١٠٠ مل			المعدل العزلات
	1	2	3	1	2	3	
Rsp_2Kr	٢٨.٣٠	٣١.٤٠	٣٤.٨٠	٢٨.٦٠	٢٩.٣٠	٢٩.١٠	٣٠.٢٥

Rsp_8RA	٢٦.٥٠	٣٠.٠٠	٣٦.٤٠	٢٦.٢٠	٢٨.٠٠	٢٨.٠٠	٢٩.١٨
$Pssp_2S$	٢٢.٨٠	٢٧.٥٠	٢٨.٠٠	٢٦.١٠	٣٢.٤٠	٣١.٢٠	٢٨.٠٠
المعدل للتركيز	٢٥.٨٦	٢٩.٦٣	٣٣.٠٦	٢٦.٩٦	٢٩.٩٠	٢٩.٤٣	
المعدل للوسط	٢٩.٥١		٢٨.٧٦				

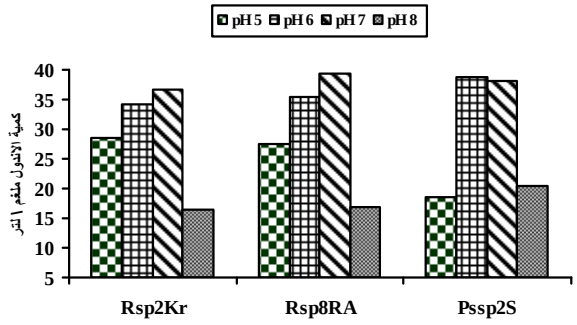
LSD P> 0.05 Is .= 0.641 , Cons.= 2.05 , Med. ns. , Is. Cons . Med. = 2.670



شكل (١) تأثير تركيز سكر الكلوكوز للوسط على كمية الاندول المنتج



شكل (٢) تاثير التدعيم النيتروجين والفوسفور للوسط على كمية الاندول المنتج



شكل (٣) تأثير الرقم الهيدروجيني للوسط على كمية الاندول المنتج في الوسط

جدول (٥) تأثير معدل التهوية وسرعة التحريك للأوساط المحلية على كمية الاندول المنتج (ملغم/ تر)

رمز العزلة	٠.٠ لتر هواءا دقيقة			٠.٥ لتر هواءا دقيقة			١.٥ لتر هواءا دقيقة			المعدل
	١٥٠	٢٠٠	٢٥٠	١٥٠	٢٠٠	٢٥٠	١٥٠	٢٠٠	٢٥٠	العزلات
Rsp_2Kr	٣٦.٦	٣٨.٢١	٣٨.٣	٣٨.٧	٣٧.٨	٣٦.٥	٣٥.٥	٣٢.٤	٣٢.٢	٣٦.٢٤

Rsp_8RA	٣٩.٣٥	٤١.٤	٤٠.٢	٣٩.٨	٣٨.٦	٣٨.٢	٣٦.٤	٣٥.١	٣٣.٣	٣٨.٠٣
$Pssp_2S$	٣٨.٦١	٤٢.٢	٤١.٨	٤١.٠	٤٠.٢	٣٨.٦	٣٨.٥	٣٧.٨	٣٧.٦	٣٩.٧٩
المعدل للتحريك	٣٨.١٨	٤٠.٥٣	٤٠.١٧	٣٩.٨	٣٧.٧٦	٣٨.١	٣٦.٨	٣٥.١	٣٤.٣٦	
المعدل للتهوية	٣٩.٧٢			٣٨.٩٣			٣٥.٤٠			

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

جدول (٦) تأثير 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
	٢٤	٤٨	٧٢	٢٤	٤٨	٧٢	٢٤	٤٨	٧٢	
Rsp_2Kr	٣٣.٤	٣٥.٨	٣٦.٢	٣٦.٢	٣٨.٤	٣٨.٢	٣٩.٤	٣٩.٣	٣٨.٠	٣٧.٢٠
Rsp_8RA	٣٤.٢	٣٥.٦	٣٥.٤	٣٩.٤	٤١.٦	٤٠.٥	٤١.٩	٤٠.٠	٣٦.٢	٣٨.٣٠
$Pssp_2S$	٣٣.٢	٣٤.٢	٣٥.٦	٤٠.١	٤٢.٢	٤٠.٦	٤٢.٨	٤٠.٣	٣٦.٥	٣٨.٣٨
المعدل للتركيز	٣٣.٦	٣٥.٢	٣٥.٧	٣٨.٥	٤٠.٧	٣٩.٧	٤١.٣	٣٩.٨	٣٦.٩	
المعدل للوسط	٣٤.٨			٣٩.٦			٣٩.٣			

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

جدول (٧) تأثير معدل حجم اللقاح ومدة الحضن في الكثافة الميكروبية في الوسط (Log. cfu/ ml.)

رمز العزلة	Log 5.7. cfu/ ml.			Log 6.0 cfu/ ml.			Log 6.17 cfu/ ml.			المعدل العزلات
	٢٤	٤٨	٧٢	٢٤	٤٨	٧٢	٢٤	٤٨	٧٢	
Rsp_2Kr	6.98	٧.٨٩	٨.٢٠	٧.٤٥	٨.٢١	٨.٢٠	٨.١٥	٨.٢١	٨.٠١	
Rsp_8RA	٧.٠٣	٧.٦٦	٧.٨٦	٧.٦٦	٨.٢٠	٨.٢٠	٨.٢٥	٨.٢٠	٧.٩٨	
$Pssp_2S$	٧.٢٠	٧.٩٨	٨.٦١	٧.٥٨	٨.٤٣	٨.٦٢	٨.٤١	٨.٥٣	٨.٥٣	
المعدل للتركيز	٧.٠٧		٨.٢٢	٧.٥٦	٨.٢٨	٨.٣٤	٨.٢٧	٨.٣١	٨.١٧	
المعدل للوسط	٧.٧٢			٨.٠٦			٨.٢٥			

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

جدول (٨) يوضح تأثير درجة الحرارة ومدة الخزن لراشح العزلات على نسبة وسرعة الإنبات

الأيام	السيطرة	IAA	Rsp_2kr				Rsp_8RA				$Pssp_2S$				النبات
			٤ مْ		٢٥ مْ		٤ مْ		٢٥ مْ		٤ مْ		٢٥ مْ		
			١ يوم	٤٥ يوم	١ يوم	٤٥ يوم	١ يوم	٤٥ يوم	١ يوم	٤٥ يوم	١ يوم	٤٥ يوم	١ يوم	٤٥ يوم	
٣	–	–	٢	–	٢	٠	٦	٢	٦	٠	٢	٠	٢	٠	فول الصويا
٤	–	٤	٧	٦	٧	٢	١٠	٦	١٠	٤	٥	٥	٦	٢	
٥	٤	٨	١٠	٩	١٠	٦	–	٩	–	٨	٩	٩	١٠	٧	
٦	٦	٩	–	١٠	–	٨	–	١٠	–	٨	٩	١٠	–	٨	
٧	٨	٩	–	–	–	٨	–	–	–	٨	٩	–	–	٨	
٤	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	فلفل
٥	–	٤	٨	٥	٨	–	٦	–	٨	–	–	–	–	–	
٦	–	٩	١٠	٨	١٠	٤	١٠	٦	١٠	٥	٦	–	٥	–	
٧	–	١٠	–	٩	–	٨	–	٩	–	٩	٩	٦	٨	٨	
٨	٤	–	–	٩	–	٨	–	٩	–	٩	٩	٩	٨	٨	
٩	٦	–	–	٩	–	٨	–	٩	–	٩	٩	٩	٨	٨	
١٠	٨	–	–	٩	–	٨	–	٩	–	٩	٩	٩	٨	٨	

المصادر :

١. الباسط، علي سلامة وسالم، علي سمير والزامك فاطمة إبراهيم ولبيب، هويدا محمد. (٢٠٠٦). عزل وانتخاب سلالات محلية عالية الكفاءة من بكتريا الرايزوبيوم

والازوسبيرلم والازوتوبكتر من أراضي بمحافظة الشرقية. المجلة الزراعية– جامعة الزقازيق مجلد ٣٥ عدد ١٦ ص ٢٠ – ٢٥.

2. 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.
3. 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. Microbiol., 41 (4): 271– 276.
4. 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. Microbiol., 42: 171 – 176.
5. 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.
6. 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.
7. 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., 40: 796– 801.
8. Jan, K. A. (2000). The tryptophan story JAMA. 360 (3): 103 – 107.
9. 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.
10. 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., 44 (3):241– 252.
11. 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.
12. Berge, O. J.(1990).Effect of inoculation with Bacillus circulans nd Azospirillum lipoferum on crop – yield in field grown maize.Symbiosis,9:259– 266.
13. 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.
14. Beck, D. P.; Materon, L. A. and Afandi, F. (1993). Practical Rhizobium legumetechnology manual. Technical manual No. 19. ICARDA.
15. Patten, C. L. and Glick, B. R. (2002). Role of pseudomonas putida sindoleeacetic acid in development of the host plant root system. A. E. M. V., 68 (8): 3795– 3801.
16. Louw, H. A. and Webley, D. M. (1958). Aplate methods for estimating the number of phosphate dissolving and acid–productively bacteria in soil nature. Lond., 182: 1317– 1318.
17. Proggram Gen. Stat. 32 v.
18. 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.
19. 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.
20. Leveau, J. H. J. and Lindow, S. E. (2005). Utilization of the plant hormone Indole – 3 – acetic acid for growth by pseudomonas putida strain 1290. Appl. and Envi. Microbiol., 71(5):2365– 2371.
21. 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.
22. 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.
23. Moore, T. C. (1979). Biochemistry and physiology of plant hormones. New York. Springer verlag. 3rd . Ed. PP. 512.

suhstace IAA on the growth of roots and shoots. Scl. J.,27 (9): 212–217.

PRODUCTION INDOLE ACETIC ACID (IAA) BY BACTERIA USING LOCAL MEDIA

J. S. AL- KUBAIS, H. N. FRAHAN, T. T. KALAF AND A. A. AL- ASSAFFII
E.mail: scianb@yahoo.com

ABSTRACT: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 and examined for their ability to indol production, and then serial labrotory experiments were converted to examine ability of selective isolates for indol production. The local culture used included dry powder of legume, bean, soybean, seed and milk powder. 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, Inoculums volume, incubation time, temperature, periods of storage to increase production efficiency.This study have the following results: 18 isolates were obtain capable for them indol production (30 from total isolates) 14 isolates were nodulan bacteria .8 isolates which have high efficancy in indol production were tested six isolates tended to Rhizopium and two isolate to Pseudomonus in next screening used culture with special condition, two isolates Pssp2S, Rsp8RA were selected to be used in the following epperinets. When we used 10% of local culture prepared from dry powder of legumes, bean, soybean seed, milk powder led to increased of indol production significantly ranged from (30-50%). Local culture supplements with peptone, NB, glucose, N and P increased the ability of isolates to indol production (40-65%) significantly.The results of optimum condition study showed the best indol production a chaired with R. sp8RA isolat with pH 7.0 (39.41 mg IAA / ml and the best shaking speed at 200/ min without aeration 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. Effect of temperature and period of filtrated isolates storage on speed of seed germination increased efficacy filtrated isolates that stored at 4C and 25C for one day and that stored at 4°C for 45 days. When it compared with treatment filtrated storage at 25°C for 45 days and treatment of industrial indol.The filtrated isolates achieved 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.