مجلة المثنى للعلوم الزراعية
www.muthjas.com

عزل وتشخيص *Pseudomonas fluorescens* و*Rhizobium leguminosarum* واختبار كفاءتها في اذابة الفوسفات وانتاج اندول حامض الخليك وتحفيز انبات الحنطة (Triticum asetivum .L)

صوفيا جبار جاسم الركابي * [1] حسن علي عبد الرضا [2]
قسم وقاية النبات / كلية الزراعة /جامعة المثنى [1] كلية الزراعة /جامعة بغداد /قسم علوم التربة والموارد المائية[2]

معلومات البحث
تاريخ استلام البحث
2016/4/12
تاريخ قبول البحث
2016/6/16
الكلمات المفتاحية
انبات الحنطة
،اذابة الفوسفات

المستخلص

نفذت هذه الدراسة لعزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas fluorescens* و*Rhizobium leguminosarum* من تربة رايزوسفير محاصيل مختلفة في حقول محافظة المثنى . استعملت الطرق الزرعية والمجهرية و فحص الحركة والاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات البكتريا تلك. لغرض تقييم كفاءة العزلات البكتيرية نفذت اربعة تجارب مختبرية تضمنت الاولى تقدير قابلية هذه العزلات على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm والثانية لتحديد كفاءة هذه العزلات في اذابة الفوسفات على وسطKing's B السائل عند تدعيمه بصخر الفوسفات اذ قدر الاس الهيدروجيني وكمية الفسفور الذائب للوسط بعد1 و2 و4و6 و10 يوم من التحضين على درجة حرارة 28 م° ، اما التجربة الثالثة فقد تضمنت تقدير تركيز اندول حامض الخليك IAA بينما شملت التجربة الرابعة دراسة تأثير جميع هذه العزلات في نسبة الانبات ومؤشر الحيوية لحبوب الحنطة. تم تشخيص ستة عزلات تحمل صفات بكتريا الزواعف الومضائية *P. fluorescens* ،و خمسة عزلات من بكتريا الرايزوبيا اثنان منها تعود الجنس *Rhizobium Leguminosarum* وثلاثة تحمل صفات الجنس *Bradyrhizobium*، اظهرت عزلات البكتريا المشار لها اعلاه تباينا في قدرتها على انتاج الغشاء الحيوي اذ تراوح سمك الغشاء 0.13 -1.43ملم للزوائف الومضائية و0.86 -2.0 ملم لبكتريا الرايزوبيا عند تنميتها على وسطي الترتك صويا او المغذي السائل اظهرت النتائج قدرة خمسة عزلات من الزوائف الومضائية على اذابة فوسفات صخر الفوسفات في الوسط الزرعي الصلب والسائل وقد اعطت العزلة التي تحمل الرمز P3 اعلى قيمة للفسفور الذائب في الوسط بلغت 24.29ملغمP لتر$^{-1}$، تباينت العزلات البكتريا المختلفة في تركيز اندول حامض الخليك الذي انتجته ،اذ اعطت نفس العزلة اعلى كمية بلغت 26.5ملغم لتر$^{-1}$ تلتها عزلة الرايزوبيا *R. leguminosarum* التي تحمل الرمز R2 بتركيز 23.0ملغم لتر$^{-1}$.

Isolation and diagnosis of *P. fluorescens* and *R. leguminosarum* and its efficiency in phosphate solubility and the production of indole acetic acid and stimulation of wheat germination

Sofia Jabbar Jasim Al-Rikabi*[1] **Hassan .A.Abdul-Rath[2]**
Dep. 0f Plant protection/ college of Agriclture/Al-Muthana University

Abstract

the purpose of This study was TO isolate and diagnosis local isolates of *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium Leguminosaru*m from rhizospher soil which callected from different crops planted in AL-Muthanna Governorate fields, Cultural ,Microscopical ,Motility and Biochemical tests were used in order to diagnosis the bacterial isolates. in order to evaluate the efficiency of these local bacterial isolates. Four laboratory experiments were carried out, the first was included testing the ability of these isolates to produce Biofilm ,the second was to determine the efficiency of these isolated to dissolve phosphate on king 's B broth medium supplemented with rock phosphate ,the soluble phosphate and pH of the medium were measured after 1,2,4,4,6 and 10 days of incubation at 28c°. the ability of these isolates to produce Indole Acetic Acid like substance were determined in the third laboratory experiment while the fourth experiment included study the effect of all these isolates on the germination percentage and bio indicator of wheat seeds. -Results of isolation showed the obtaining , six of the *Pseudomonas fluorescens* and five Rhizobium isolates ,two belong to *Rhizobium leguminosarum* while three to Bradyrhizobium, *P. fluorescens* , *R. Leguminosarum* isolates showed varied ability to produce biofilm ranged from 0.13mmto 1.43mm for *P. fluorescens* and from 0.86mm to 2.0mm for *R. Leguminosarum* when it grow on trypitc soy broth and nutrient broth. The ability of five *P.fluorescens* isolates to dissolve tricalcium phosphate on solid and broth medium ,and the isolate denote P3 gave the highest value with 24.29mgPL^{-1}, Bacterial isolates varied in the amount of Indol Acetic acid like substance that produced ,the same(*P.fluorescens)* isolate gave highest amount 26.5 mg L^{-1} followed by *R. leguminosarum*(R2) isolate with 23.0 mg L^{-1} .

*Corresponding author: E-mailsufea.jabar @yahoo.com Al- Muthanna University All rights reserved

المقدمة

الغشاء الحيوي هو تجمع من الخلايا المايكروبية التي ترتبط بخيوط دقيقة من البوليمرات الخارج خلوية على السطوح بطريقة غير رجعية هذا التجمع للخلايا الميكروبية يكون مغطى بما يشبه النسيج الغشائي الذي يتكون بشكل اساسي من السكريات المتعددة Polysaccharide والذي يعد مادة الالتصاق الطبيعية في الغشاء الحيوي (Marshall ،1976، Costeria واخرون ،1978). الذي يعد تكوينه وتطويره من الاستراتيجيات المهمة لبقاء بعض البكتريا المكونة لعناصر المخصب الحيوي على قيد الحياة وانتشارها في مجموعة واسعة من البيئات وذلك من خلال قدرة الغشاء الحيوي على تكوين حاجز يمنع انتشار المضادات الحياتية والمواد الدفاعية الاخرى من المضيف اولا، وكما يوفر حماية من عوامل الاجهادات البيئية مثل الاشعة فوق البنفسجية والتغيرات في درجة الحموضة والاجهاد الازموزي والجفاف (Gilbertواخرون،1997).وتنتشر هذه الاغشية الحيوية على نطاق واسع اذ يودي دورا مهم في العديد من البيئات ومنها بيئة التربة اذ يتباين تواجدها بين تربة الرايزوسفير الغنية بالعناصر الغذائية وافرازات الجذور مقارنة الترب الفقيرة بالنيتروجين والفسفور والماء والعناصر الاخرى(Van de و Halverson،2004). اذ يؤدي الغشاء الحيوي دورا مهم في تحسين بناء التربة ويقلل من الاجهاد المائي والذي يعود الى السكريات المتعددة خارج خلوية EPS التي تكون الغشاء الحيوي اساسا (Alami واخرون،1999) وتجديد المجاميع الميكروبية المفيدة في التربة المتدهورة نتيجة الاستعمال المكثف للمدخلات الكيميائية وزراعة المحاصيل بصورة مكثفة ،كما يضاعف من استعمار الجذور من قبل البكتريا (Hansel واخرون،2001).

البحث مستل من اطروحة الدكتوراه للباحث الاول

هنالك اجناس وانواع عديدة من البكتريا الموجودة في التربة لها القابلية على تكوين الغشاء الحيويBiofilm على اسطح الجذور ومنها الرايزوبيا وبكتريا الزوائف الومضائية سواء التي تعمل كمقاوم حيوي او المعززة لنمو النباتات (Bianciotto واخرون، 2001) .استهدفت الدراسة الحالية التحري عن قدرة *P. fluorescens* و*R. leguminosarum* التي تم عزلها من رايزوسفير بعض المحاصيل على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm ودورها في زيادة جاهزية الفسفور في الوسط الزرعي السائل المدعم بصخر الفوسفات وتقدير كفاءتها في انتاج اندول حامض الخليك وتأثير لقاح هذه العزلات في نسبة الانبات والمؤشر الحيوي لحبوب الحنطة .

المواد وطرائق العمل

جمع عينات التربة

تم جمع 10عينات من تربة منطقة الرايزوسفير من حقول مزروعة بنباتات الجت والذرة البيضاء والشعير واللوبيا والماش فضلا عن جمع الجذور الخاصة بالنباتات البقولية للحصول على العقد الجذرية لغرض عزل بكتريا الرايزوبيا منها وذلك ضمن الرقعة الجغرافية لمحافظة المثنى ،لاستعمالها في عزل البكتريا .

عزل بكتريا الزوائف *Pseudomonas*

حضرت سلسلة تخافيف عشرية لعينات التربة اعلاه وذلك بأضافة 10غم من كل عينة تربة الى 90 مل من الماء المعقم للحصول على التخفيف 10^{-1}في دورق زجاجي سعة 250 مل ومزجت جيدا ثم أجريت لها تخافيف متسلسلة وذلك بنقل 1 مل من عالق التربة الى انبوب اختبار يحتوي 9 مل من الماء المعقم وكررت العملية لحين الوصول الى التخفيف 10^{-6}ثم أخذ 1مل من كل تخفيف ولقحت انابيب اختبار تحتوي على 9 مل من الوسط King s B broth بواقع ثلاث مكررات لكل تخفيف ثم حضنت الانابيب هوائيا على درجة حرارة 28مْ ، ولمدة 48ساعة، فحصت الانابيب لملاحظة تكوين غشاء رقيق أبيض على السطح والذي يكون مؤشر لنمو بكتريا الزوائف، اخذ 0.1 مل من الانابيب التي أعطت مؤشر موجب ونشرت على سطح طبق بتري يحتوي على الوسط King s B agar الصلب وحضنت الاطباق على درجة حرارة 28مْ لمدة 48 ساعة ،اعيد زراعة البكتريا النامية بطريقة التخطيط وذلك للحصول على مستعمرات نقية من البكتريا .بعدها تم الحصول على مستعمرات ذات لون اصفر مخضر تم عزلها بصورة نقية على وسط King s B agar لحين اكمال بقية الاختبارات التشخيصية عليها. لغرض تشخيص العزلات البكتيرية فقد اجريت عليها فحوصات زرعية

ومجهرية واختبارات كيموحيوية وبالاعتماد على المصادر العلمية المعتمدة في التشخيص.

عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Beck وآخرون (1993) في عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لنباتي الماش واللوبيا.

تجربة التحري عن قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي

تم تنمية عزلات بكتريا *Rhizobium* و*P fluorescens* في انابيب اختبار تحتوي على 10مل من وسط Tryptic soya broth المعقم والذي حضر حسب تعليمات الشركة المنتجة (oxoid) وكذلك نميت نفس العزلات البكتيرية في انابيب تحتوي على وسط
(Christesenواخرون،1982) .

تجربة تقدير كمية الفسفور الذائب في الوسط السائل

تم اختبار كفاءة العزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات في بيئات غذائية سائلة، وفي دوارق زجاجية سعة 250 مل ، إذ وضع 150 مل من الوسط الغذائيKing's B Broth الخاص ببكتريا *P. fluorescens* و واضيف 1 غم من الصخر الفوسفاتي لكل دورق . لقحت الاوساط الزرعية بمقدار 1 مل من معلق بكتيري لمزرعة حديثة النمو بعمر (48) ساعة من كل عزلة بكتيرية منتجة للغشاء الحيوي ومذيبة للفوسفات . مع مراعاة استعمال دوارق بدون تلقيح لكل من بيئات البكتريا كمعاملات للمقارنة . ووضعت الدوارق في الحاضنة في درجة حرارة 30-28م° ، تمّ سحب 10 مل من المزرعة السائلة بوساطة ماصة معقمة خلال مدد مختلفة هي بعد (يوم واحد و يومين و اربعة ايام و ستة ايام وعشرة ايام) من التحضين وقدر فيها الفسفور الذائب والرقم الهيدروجيني.

تجربة الكشف عن قدرة البكتريا على انتاج مركبات اندول حامض الخليك Production of Indole Aectic Acid like substrance

حضر الوسط Tris-YMTR medium المتكون من 10غم سكر مانتول و0.15 غم كلوريد الكالسيوم المائي و 0.25غم كبريتات المغنسيوم المائية و1.21غم من TRIS (hydroxymethyl) amino methane و1.0غم casamino acidsو0.2 مستخلص الخميرة وأذيبت المكونات اعلاه في 1لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 6.8 (Biswas واخرون،2000) لقحت جميع العزلات البكتيرية المنتجة للغشاء الحيوي في انابيب تحتوي 75 مل من الوسط Tris-YMTR medium المحضر اعلاه و بعد سبعة أيام من التحضين على درجة حرارة 28م° نبذت الأوساط الزرعية بواسطة جهاز الطرد المركزي على سرعة 6000rmp لمدة 20دقيقة ثم مزج 1مل من الراشح في انابيب تحوي4 مل من الكاشف Salkovski الذي يتكون من(150مل من حامض H_2SO_4 المركز و250مل من الماء المقطر و7.5مل من $FeCl_3.6H_2O$ M(Gordon و Weber،1951) وحضن لمدة 30 دقيقة استدل على انتاج IAA من ظهور اللون الوردي ،تم قياس الامتصاصية بجهاز Spectrophotometer لغرض تقدير تركيزIAA على طول موجي 535nm اذ تم تحضير المحلول القياسي 100ملغم لتر$^{-1}$ من IAA ،الذي يحضر من اذابة 0.005غم من IAA في 50مل من محلول خلات الاثيل وسحب منها (1. 25,1,0.75,0.5,0.25) مل من المحلول ثم اضيف الى 25مل من خلات الاثيل لنحصل على التراكيز(5,4,3,2,1) IAAملغم مل$^{-1}$ على التتابع.

اختبار تأثير العزلات على الإنبات مختبريا.

عقمت حبوب الحنطة صنف رشيد في الايثانول (80%)لمدة 3 دقائق ثم وضعت في محلول هيبوكلوريت الصوديوم (50%)لمدة 15 دقيقة وغسلت جيدا بالماء المعقم لوثت بعدها هذه الحبوب بالبكتريا المنتجة للغشاء الحيوي و ، ثم وضعت الحبوب على ورق الترشيح المبللة بالماء المعقم ووضعت في اطباق بلاستكية وحضنت على درجة حرارة 28 م° ، لمدة 24ساعة وبعد ذلك تم زراعة حبوب الحنطة المعقمة بصورة دائرية عند حافة الطبق بواقع 10حبوب لكل طبق وحضنت كل الاطباق المعاملة بالبكتريا لمدة سبعة ايام ،ثم

قيست نسبة الانبات وطول كل من الجذير السويق ،وقيس مؤشر الحيوية وفق المعادلة التالية مؤشر الحيوية=(معدل طول الجذير + معدل طول السويق)×نسبة الانبات-Abdul Baki and) و Anderson ،1973).

النتائج والمناقشة

نتائج عزل تشخيص بكتريا *Pseudomonas fluorescens*

اظهرت النتائج ان معظم المستعمرات النامية متوسطة الى كبيرة الحجم دائرية ، ذات سطح ناعم و محدبة لونها اصفر مخضر ومضائية كما ان الصبغة الصفراء كانت واضحة الظهور خلاياها ذات اشكال عصوية مستقيمة سالبة لملون كرام ،وغالبا ما تكون على شكل ازواج ،وبناء على الصفات الزرعية والمجهرية لهذه العزلات ،فقد وجد ان ستة عزلات من مجموع عشرة عزلات بكتيرية صفاتها لحد كبير تتطابق مع الصفات الزرعية والمجهرية لبكتريا الزوائف *Pseudomonas* (Migula ،1900) أظهرت نتائج الاختبارات الكيميوحيوية ان جميع العزلات كانت موجبة لاختبار الكاتلبز والاوكسيديز ولها القدرة على الحركة بينما اعطت ثمانية عزلات نتيجة سالبة اختبار فحص الاندول، كما اظهرت ثمانية من العزلات نائج موجبة للاختبارات المثيل الاحمر وانزيم الجلاتينيز واستهلاك السترات بينما اعطت عزلة واحدة نيجة موجبة لاختباري اختزال النترات والنمو عند درجة حرارة 42 م° (Collee واخرون ،1996; Mac faddin،2000).

جدول (1) نتائج الاختبارات التشخيصية العزلات البكتيرية كبكتريا*P. fluorescens*

ت	رقم العزلة	النتيجة					
	الاختبارات	1	2	3	4	5	10
1	استجابة الخلايا لملون غرامGram stain	-	-	-	-	-	-
2	فحص الحركة Motility test	+	+	+	+	+	+
3	اختبار فوكس – بروسكاورVoges proskauer test	-	-	-	-	-	-
4	التحلل المائي للنشأStarch hydrolysis test	-	-	-	-	-	-
5	اختبار اختزال النتراتNitrate reduction	-	-	-	-	-	-
6	النمو عند درجة حرارة 4 مْGrowth in 4c	+	+	+	+	+	+
7	النمو عند درجة حرارة 42 مْGrowth in 42c	-	-	-	-	-	-
8	فحص الاندولIndol test	-	+	+	-	-	-
9	اختبارانزيم الاوكسديز Oxidase	+	+	+	+	+	+
10	اختبار انزيم الكاتليز Catalase	+	+	+	+	+	+
11	اختبار انزيم اليوريزUrease test	+	+	+	+	+	+

12	اختبار أحمر المثيلMethyl Red test	+	+	+	+	+	+
13	اختبار انزيم الجلاتينزGelatinase test	+	+	+	+	+	+
14	**اختبار استهلاك السترات**Citrate utilization test	+	+	+	+	+	+

تشخيص بكتريا الرايزوبيا

يوضح الجدول (2) بعض الاختبارات الزرعية والمجهرية لعزلات بكتريا الرايزوبيا اذ كونت هذه العزلات مستعمرات محدبة بيضاء اللون مخاطية القوام عند تخطيطها على وسط مستخلص الخميرة-المانتول المضاف له صبغة احمر الكونغو اذ انها لم تمتص الصبغة في حين اظهرت تلك العزلات اختلاف في اختبار صبغة البروموثايمول الزرقاء اذ استطاعت العزلات رقم (2 و5) من تغير لون الوسط من الاخضر الى اللون الاصفر وهذا يشير الى هذا العزلات تعود الى جنس *Rhizobium* ، ،في حين غيرت العزلات رقم (1و3و4) لون الوسط من الاخضر الى اللون الازرق وهذا الصفة تعود الى جنس *Bradyrhizobium* من جانب اخر فقد ظهر الفحص المجهري لخلايا هذه المستعمرات انها عصوية الشكل مرتبة اما بشكل ازواج ثنائية او مفردة احيانا وسالبة لملون كرام (Atlas واخرون ، 1995). اعتماد على النتائج المذكورة اعلاه بالإضافة الى نوع العائل الذي عزلت منه هذه البكتريا فقد تم تشخص العزلات رقم (2و5)على انها **بكتريا *R leguminosarum***بينما العزلات(1و3 و4) على انها*Bradyrhizobium ssp*

جدول (2) الاختبارات الزرعية والمجهرية لبكتريا الـ *Rhizobium*

شكل المستعمرات	محدب	محدب	محدب	محدب	محدب
قوام المستعرة	مخاطي	مخاطي	مخاطي	مخاطي	مخاطي
لون المستعمرات	أبيض	أبيض	أبيض	أبيض	أبيض
شكل الخلية	عصوية	عصوية	عصوية	عصو ية	عصوية
استجابة الخلايا لملون غرام Gram stain	-	-	-	-	-
الاستجابة لصبغة Bromothymole blue	ازرق	اصفر	ازرق	ازرق	اصفر
فحص الحركة	+	+	+	+	+

قدرة *P.fluorescens* و *R. leguminosarum* على انتاج الغشاء الحيوي

اظهرت نتائج الاختبار باستعمال طريقة الانابيب (Christensen واخرون،1982) للتحري عن وجود الغشاء الحيوي قدرة هذه

العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي وقد تفاوتت عزلات بكتيريا *Rhizobium*و *P.fluorescens* في كمية المواد الخارج خلوية المنتجة اذ ظهرت جدران الانابيب الحاوية على كميات قليلة من المواد خارج خلوية بلون احمر بينما ظهرت جدران الانابيب الحاوية على العزلات المنتجة كميات كبيرة من المواد خارج خلوية بلون احمر غامق وعلى الوسطين المستعملين لهذا الغرض جدول (3) وهذه النتيجة تتفق مع ماوجده (Ude واخرون،2006)اذ اشاروا الى ان اغلب بكتريا *P fluorescens*و *P putida* والمعزولة من اوراق النباتات والتربة لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي. كما تبين نتائج الجدول ذاته قدرة عزلات بكتريا *Rhizobium* على انتاج الغشاء الحيوي وعلى الوسطين المذكورين وهذا يتفق مع نتائج عدد من الباحثين (Fujishige, 2005; P´erez-Gim´enez واخرون،2009; Monika, 2015)اذ اشاروا الى قدرة انواع مختلفة من بكتريا الريزوبيا على تكوين الغشاء الحيوي.

جدول(3) نتائج قدرة عزلات بكتريا*P.fluorescens* و *Rhizobium* لتكوين الغشاء الحيوي على نوعين من الاوساط الزرعية

نوع البكتريا	رقم العزلة	الوسط الزرعي	
		Tryptic soy broth MS	Nutrient broth MB
	P1	+	+
	P2	+++	+++
	P3	+++	+++
C1	P4	+++	+++
P fluorescens	P5	+	+
	P6	+++	+++
	P7	+++	+++
	P8	+	+
	P9	+	+
	P10	+++	+++
	R1	+++	+++
C2	R2	+++	+++
Rhizobium	R3	+++	+++
	R4	+++	+++
	R5	+++	+++

+ لون الحلقة احمر +++ لون الحلقة احمر غامق

تبين نتائج الجدول (4) سمك الغشاء الحيوي (ملم) لعزلات البكتريا اذ اوضحت النتائج اختلاف العزلات البكتيرية في كفاءتها على انتاج الغشاء الحيوي اذ كان معدل سمك هذا الغشاء المتكون بواسطة عزلات بكتريا *P.fluorescens* يتروح بين 0.46 ملم - 1.43ملم على وسط تريبتيك الصويا Tryptic soy broth بينما كان معدل سمك الغشاء على وسط المرق المغذي Nutrient broth يتروح بين 0.13 ملم-1.07ملم .في حين بلغ معدل سمك الغشاء الحيوي المتكون بواسطة بكتريا الرايزوبيا على وسط تريبتيك الصويا يتراوح بين1ملم-2ملم بينما سجل سمك الغشاء الحيوي معدل يتراوح بين 0.93 ملم -1.6ملم على وسط المرق المغذي .وفي هذا المجال فقد وجد Al-Ithawy(2010) ان سمك الحيوي المتكون بواسط بكتريا *P aeruginosa* قد تتراوح بين

1.1ملم-6ملم ،في حين وجدت Mea'da(2013) ان سمك الغشاء الحيوي المتكون بواسط بكتريا *Staphylococcus aureus* قد يتراوح بين 0.2ملم -1.5ملم .

من جانب اخر تشير نتائج الجدول (4)الى تأثير نوع الوسط الزرعي في تحديد سمك الغشاء الحيوي المنتج بواسطة العزلات البكتيرية اذ تشير النتائج الى زيادة معنوية في سمك الغشاء المتكون على الوسط تريبتيك الصويا اذ سجل هذا الوسط اعلى معدلات في سمك الغشاء الحيوي بلغت 1.14ملم و0.89 ملم لعزلات *Rhizobium* و *P fluorescens* بالتتابع مقارنة بوسط المرق المغذي الذي سجل اقل معدلات بلغت 0.91 ملم و0.65ملم لعزلات *Rhizobium* و *P fluorescens* بالتتابع ،وقد يعود السبب الى الاختلاف في التركيب الكيميائي بين الوسطين اذ يحتوي وسط تريبتيك الصويا على مصدرين لتجهيز الاحماض الامينية والببتيدات والبروتينات وهما مركب تريبتون و مركب ببتون الصويا (ATCC،2014)اضافة الى قدرة التريبتون المحافظة على مستوى عالي من الفيتامينات وعوامل النمو ويوصى به للنمو السريع كما يحتوي هذا المركب على الكبريتات والكربوهيدرات من جانب اخر يحتوي الوسط على سكر الديكستروز الذي يعد مصدرا للكربوهيدرات وهذا يتفق مع ما وجده Fujishige واخرون(2005)اذ اشاروا الى ان الزيادة في تكوين الغشاء الحيوي تعتمد على نوع الوسط .

جدول(4) سمك الغشاء الحيوي لعزلات مختلفة من بكتريا*Rhizobium* و *P fluorescens*على نوعين من الاوساط الزرعية

نوع*البكتريا*	رقم العزلات البكتيرية	الاوساط الزرعية		C×M	C
		Tryptic soy brothMS	Nutrient brothMB		
	P1	0.53	0.13	0.33	
	P2	0.97	0.76	0.87	
	P3	1.43	1.07	1.25	
	P4	0.97	0.70	0.84	
C1	P5	0.46	0.30	0.38	
P.fluorescens	P6	0.83	O.67	0.75	
	P7	0.63	0.40	0.52	
	P8	0.97	0.80	0.89	
	P9	0.86	0.73	0.80	
	P10	1.23	0.96	1.10	
معدل	M	0.89	0.65	0.73	
LSD=0.05	C1=0.477	M=0.111	C1+M=0.350		
	R1	1.20	1.03	1.12	
C2	R2	2.00	1.60	1.80	
Rhizobium	R3	1.60	1.40	1.50	
	R4	1.17	0.93	1.05	
	R5	1.0	0.86	0.93	

معدل	C2×M	1.39	1.16	1.28
معدل	M	1.14	0.91	
LSD=0.01	C2=0.267	M=0.169	C2+M=0.377	

كفاءة عزلات بكتريا *P fluorescens* في اذابتها الفسفور في الوسط السائل وتغيرpH

لوحظ اختلافا في كفاءة هذه العزلات البكتيرية في زيادة الفسفور الذائب وانخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط خلال مدة تحضين والبالغة 10 ايام فقد ظهر تفوق العزلة P_3 اذ سجلت اعلى معدل لذوبان الفسفور والذي بلغ24.29 ملغم P لتر$^{-1}$ ، بينما سجلت العزلة P_5 اقل معدل بلغ 12.54ملغم Pلتر$^{-1}$ عند نهاية مدة التحضين (بعد عشرة ايام) ،كما سببت العزلةP_3 انخفاضا في قيمة الpH لأدنى معدل له اذ بلغ 6.50 في حين لم تستطيع العزلة P_5 احداث الا خفض بسيط للرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي اذ بلغ 7.26مقارنة بمعاملة المقارنة والتي بلغ فيهاpH 7.50، هذا الانخفاض في pH الوسط قد يعزى الى انتاج الاحماض العضوية التي تكون مصدرا لتوفير ايونات الهيدروجين الفعالة في البيئة ،اضافة الى قدرة ونشاط كل عزلة في انتاجها للأحماض العضوية مثل حامض الستريك والاوكزاليك (Alamواخرون،2004) ، وقد يعزى السبب في اختلاف قيم الفسفورالذائب و pH بين العزلات البكتيرية الى اختلافات وراثية بين العزلات البكتيرية تلك فضلا عن الاختلاف في كمية ونوع الاحماض العضوية المفرز للوسط والتي قد تؤثر في قدرة الاحياء المجهرية في اذابتها للفوسفات غير الذائبة (IguaIواخرون،2001; حسن ،2012).،أوقد يعود السبب الى ظروف بيئة النمو او اختلاف ميكانيكيات الاذابة من قبل الاحياء المجهرية (Filho و Vidor،2001).

جدول (5) تأثير عزلات بكتريا *P fluorescens* في اذابة الصخر الفوسفاتي في الوسط الزرعي السائل(ملغم P لتر$^{-1}$) وتغير pH

القياس	الزمن(يوم)										المعدل	
رمزالعزلة	1		2		4		6		10			
	pH	P	pH	P	pH	P	pH	P	pH	P	pH	P

6.71	7.50	7.00	7.65	7.17	7.00	7.22	7.67	6.18	7.60	6.03	7.60	مقارنة
11	7.19	21.68	6.90	17.09	7.20	15.61	7.00	10.01	7.33	7.57	7.50	P2
14.39												
24.29	6.50	39.00	5.70	30.13	6.40	21.83	6.42	17.94	6.83	12.57	7.14	P3
21.16	6.87	33.40	6.42	27.26	6.65	20.00	6.80	15.51	7.16	12.00	7.30	P4
12.54	7.26	18.01	6.92	15.78	7.15	12.55	7.20	9.93	7.45	6.44	7.60	P5
14.36	7.09	21.12	6.80	17.11	7.00	14.31	7.25	11.07	7.10	8.200	7.30	P10
		23.368	6.73	19.090	6.900	15.253	7.093	11.773	7.245	8.802	7.407	المعدل
										P 0.066	pH 0.054	LSD 0.01

كفاءة العزلات البكتيرية في انتاج اندول حامض الخليك

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (6) قدرة كل من ببكتريا *P fluorescens* و بكتريا *R. leguminosarum* على انتاج

الاندول حامض الخليك Indole Acetic acid like substances (IAAs)،اذ لوحظ اختلاف في كفاءة عزلات بكتريا*P fluorescens* لانتاج IAA،اذ تفوقت العزلة P3 على بقية العزلات و سجلت معدل بلغ 26.5ملغم لتر$^{-1}$وبنسبة زيادة قدرها 49.06% مقارنة لأقل العزلات في انتاج IAA ذات الرقم P5 التي سجلت معدل انتاج IAA بلغ 13.5 ملغم لتر$^{-1}$ ، وتلتها العزلة P4 التي سجلت معدل بلغ24.8 ملغم لتر$^{-1}$ ، كما تفوقت العزلة P2 معنويا على العزلتين P10وP5 وبنسبة زيادة 2.22% و40.91%من العزلتين بالتتابع وهذا يتفق مع ما ذكره Dubeikovsky واخرون (1993) Barazani; وFriedman (1993) ; Ashrafuzzaman واخرون (2009) بان لهذه البكتريا القدرة على انتاج IAA .

اشارت نتائج هذه الدراسة كذلك الى تفوق العزلة البكتيرية R2 للرايزوبيا معنويا في قدرتها على انتاج IAA مقارنة ببقية العزلات الاخرى اذ سجلت معدل انتاج بلغ 23ملغم لتر$^{-1}$ وبزيادة بلغت 43.48% نسبة الى العزلة R5 التي سجلت اقل معدل بلغ 13ملغم لتر$^{-1}$، بينما تفوقت العزلة R3 معنويا عن كل من العزلتين R1وR4 اذ سجلت معدل بلغ 21 ملغم لتر$^{-1}$ وبنسبة زيادة بلغت5.24 %و28.57 على التتابع للعزلتين المذكورتين ، وبنفس الاتجاه تفوقت العزلة R1 على العزلتين R4وR5واذ سجلت معدل بلغ 19.9 ملغم لتر$^{-1}$ ،وهذا يتماشى مع ما اشار له باسط واخرون (2006); ادهم واخرون (2009) والذين اكدوا على ان اغلب عزلات بكتريا الريزوبيا كانت منتجة لاندول حامض الخليك .

من جانب اخر بينت النتائج وجود تفاوت في كمية الاندول حامض الخليك المنتج بين عزلات بكتريا*P fluorescens* وعزلات بكتريا *R. leguminosarum* اذ تفوقت العزلتين P3 وP2 في كمية الاندول المنتج ولم تسجل عزلتين اي فروق معنوي مع عزلة R2 .

جدول (6)تركيز Indole Acetic acid (IAA) like substances (ملغم لتر$^{-1}$)المنتج من عزلات بكتريا *P fluorescens* و بكتريا*Rhizobium*

نوع البكتريا	رقم ورمز العزلات البكتيرية	التركيز IAA (ملغم لتر$^{-1}$)
P fluorescens	P2	22.5
	P3	26.5
	P4	24.8
	P5	13.5
	P10	22.0
LSD=0.01		P=0.321
Rhizobium	R1	19.9
	R2	23.0
	R3	21.0
	R4	15.0
	R5	13.0
LSD=0.01		R=0.495

تأثير العزلات البكتيرية على نسبة الإنبات والمؤشر الحيوي

اظهرت نتائج جدول(7) التأثير المعنوي للتلقيح بالعزلات البكتيرية في نسبة انبات ومؤشر حيوية حبوب الحنطة .اذ اظهرت النتائج تفوق العزلتين P3 وP4 من بكتريا *P fluorescens* معنويا اذ سجلتا اعلى معامل حيوية بلغ 9.43 و8.96 بالتتابع وبنسبة زيادة 73.28% و71.86%عن معاملة المقارنة كما سجلتا نسبة الانبات 100%،وهذه النتيجة تتفق مع جديع واخرون(2009) الذين اشاروا الى ان تلقيح الحنطة بالمعلق البكتيري*P fluorescens* ادى الى زيادة نسبة الانبات التي تعود الى قدرة البكتريا على انتاج منظمات النمو مثل الاندول حامض الخليك والسايتوكاينينات والجبرلينات المؤثرة في استطالة الخلايا وانقسامها (Verma واخرون ،2010)، بينما سجلت العزلة P5 اقل معامل حيوية بلغ 5.66 كما تشير النتائج الى عدم تسجيل فروق معنوية بين العزلتين P2 وP10 اذ سجلتا معامل حيوية 6.81 و6.65 على التتابع .

من جانب اخر اشارت نتائج الجدول(7) الى تأثير التلقيح ببكتريا الريزوبيا في معامل الحيوية ونسبة انبات حبوب الحنطة اذ ظهر تفوق العزلة R2 معنويا اذ سجلت اعلى معامل حيوية بلغ 8.33 وبنسبة زيادة بلغت 69.75% عن معاملة المقارنة كما سجلت نسبة انبات 100%وتلتها العزلة R3اذ سجلت معامل حيوية 7.07 ونسبة انبات مئة بالمئة بينما سجلت العزلة R5 اقل معامل حيوية بلغ2.65 وبنسبة انبات 80% وهذا يعود الى مقدرة العديد من البكتريا المثبتة للنتروجين من افراز منظمات النمو كالأوكسينات والجبرلينات ،وكذلك المواد المنشطة والمحفزة لامتصاص العناصر الاخرى (بشير، 2003).

من جانب اخر تشير النتائج الى تفوق العزلة P3 معنويا وعلى كافة العزلات البكتيرية في صفة معامل الحيوية وهذا قد يعود الى كفاءة العزلة على انتاج الاندول حامض الخليك (5) .

جدول(7)أثير بكتريا*Rhizobium* و *P fluorescens* على نسبة الانبات و المؤشر الحيوي

نوع اللقاح	رقم ورمزالعزلة	معدل طول الجذير	معدل طول السويق	نسبة الانبات	مؤشر الحيوية
بدون اللقاح	المقارنة	3.03	0.57	70%	2.52
	P2	5.17	2.4	90%	6.81
P. fluorescens	P3	6.83	2.6	100%	9.43
	P4	6.66	2.3	100%	8.96
	P5	4.87	2.2	80%	5.66
	P10	5.26	3.06	80%	6.65
LSD		مؤشر الحيوية P=1.167			
Rhizobium	R1	5.33	2.93	80%	6.61
	R2	5.50	2.83	100%	8.33
	R3	5.40	1.67	100%	7.07
	R4	4.63	1.1	85%	4.87
	R5	4.43	0.87	80%	2.65

LSD=0.01 R=0.087مؤشر الحيوية

المصادر:

الباسط ، علي سلامة وسالم، علي سمير و الزامك فاطمة ابراهيم ولبيب ، هويدا محمد. 2006 . عزل وانتخاب سلالات محلية عالية الكفاءة من بكتريا الرايزوبيوم والازوسبيرلم والازوتوبكتر من اراضي بمحافظات الشرقية،المجلة الزراعية– جامعة الزقازيق مجلد 35 عدد : 20– 25 .16 .

بشير ،عفراء يونس .2003.التداخل بين المايكورايزا وبكتريا الأزوتوبكتر و الأزوسبرلم وتأثيره في نمو وحاصل الحنطة .أطروحة دكتوراه .كلية الزرعة .جامعة بغداد.

حسن ، كريم عبيد. 2012. عزل البكتريا المذيبة لمفوسفات من التربة وتعيين الحوامض العضوية المنتجة منها. مجلة العلوم الزراعية العراقية مجلد 43(6) : 71-77 .

عبد ،ادهام علي ،جمال صالح حمود وحماد خلف فرحان. 2009 . إنتاج منظم النمو اندول حامض الخليك (IAA)البكتيري باستعمال أوساط محلية واختبار كفاءته على نبات فول الصويا .مجلة الانبار للعلوم الصرفة المجلد 2العدد(1) .

عبد الله ،بشير حمد وعماد محمود علي وياس امين محمد.2011 .تأثير عدة مستويات من السماد النتروجيني في نمو وحاصل اربعة تراكيب وراثية من الذرة البيضاء Moench .bicolor) (Sorghum L. .مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية . 73-85 .:(11)1

A. A. Abdul-Baki. and J. D. Anderson. 1973. Vigor determination in soy bean seed by multiple criteria. *Crop Sci*. 13: 630-633.

Alam, S; K. Samina; A. Najma and R. Maliha. 2004. In Vitro Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. International J. of Agric. And Biology 4. 4.

Alami Y, Champolivier L, Merrien A, Heulin T. 1999. The role of Rhizobium sp., a rhizobacterium that produces exopolyshaccaride in the aggregation of the rhizospheric soil of sunflower: effects on plant growth and resistance to dydric constraints. OC-Ol. Corps Gras Lipides6:524–28

Al-Ithawy ,A.A. 2010.Affected factors on *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from deferent environmental sources on biofilm formation M.Sc.Thesis submitted to the university of Anbar /college of science.

M. Ashrafuzzaman , F. A. Hossen, I. M. Razi, H. M. Anamul, I. M. Zahurul, S. M. Shahidullah and M. Sariah. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. Afr. J. Biotechnol. 8: 1247-1252.

Atlas, R.M.; Brown, A.E. and Parks, L.C. 1995. "Experimental Microbiology Laboratory Manual". McGraw-Hill Companies, Mosby Company, St. Louis, pp. 400-402.

Barazani O, Friedman J.1999. Is IAA the major growth factor secreted from plant growth mediating bacteria? J Chem Ecol 25:2397–2406**.**

Beck, D.P; L. A. Materon and F.A . Fadi . 1993 . Practical Rhizobium Legume technology manual . Technical No .19 . ICARDA, Syria.

Ben Farhat M, Farhat A,Bejar W, Kammoun R,Bouchaala K, Bejar S,Chouayekh H.2009.Charactrization of the mineral phosphate solubilizing activity Of serratia marcescens CTM

Filho, G. N. S. and C. Vidor .2001. Phosphate Solubilizing Activity of Microorganisms in the Presence of Nitrogen, Iron, Calcium and Potassium. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 36, 1-21.

Fujishige NA, Rinaudi L, Giordano W & Hirsch AM .2005. Superficial liaisons: colonization of roots and abiotic surfaces by rhizobia. Biology of Plant–Microbe Interactions. Proceedings of the 12th International Congress on Molecular Plant–Microbe Interactions, Vol. 5 (S´anchez F, Quinto C, L´ opez-Lara IM & Geiger O, eds), pp. 292–299. International Society for Molecular Plant–Microbe Interactions, St. Paul, MN.

Gilbert, P.; Das, J.; Foley, I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* **1997**, *11*, 160–167.

S. A. Gordon. and R.P. Webber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant Physiol. 26: 192-195.

Hansel CM, Fendorf S, Sutton S, Newville M. 2001. Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of minewaste impacted aquatic plants. *Environ. Sci. Technol. 35:3863–68*

Holt, J.G and N.R ,Krieg . 1984. Bergey's Manual of Systematic Bactriology .Vol. 1.Williams and Wilkins .London .U.K.

Igual M.; A. Valverde; E. Cervantes and E. Velazquez. 2001. Phosphate Solubilizing Bacteria as Inoculants for Agriculture: Use of Updated Moleclular Techniques in Their Study. INRA, EDP Sciences, 21: 561-568.

50650 isolated from phosphate min of Gafsa .Arch Microbiol. 191:815-824.

Bianciotto V, Andreotti S, Balestini R, Bonfante P, Perotto S. 2001. Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. Mol. Plant- Microbe Interact. 14:255–60.*

J. C. Biswas ., J. K. Ladha, F. B. Dazzo, Y. G. Yanni and B. G. Rolf. 2000. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agron. J.* 92: 880-886.

Christensen,G .D;Simpson,W ,A;Bison,A.L.and Beachey ,E.H.1982.Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces .Infect Immum;37:318-2**.**

Collee, J. G. ; Miles, R. S. and Watt, B. 1996.b. Tests for the Identification of Bacteria. In : Practical Medical Microbiology 14th ed. Ed. by J. Gerald Collee, Barrie, P, Marmion, Andrew, G. ; Fraser and Anthony Simmons. Churchill Livingstone. New York. P. 132 – 149.

Costerton, J. W., G. G. Geesey, and G. K. Cheng. 1978. How bacteria stick. Sci. Am. 238:86–95.

Dubeikovsky AN, Mordukhova EA, Kochetkov VV, Polikarpova FY, Boronin AM .1993. Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain Pseudomonas fluorescens BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. Soil Biol Biochem 25:1277–1281.

in the absence of plants. Int J Microbiol 2009, 1–9.

Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ. 2006. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol8:1997–201*

Van de Mortel, M.; Halverson, L.J. Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. *Mol. Microbiol.* 2004, *52*, 735–750.

Verma , J.P. ; J. Yadav ; K. Tiwari ; N. Lavakush and V. Singh . 2010. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. Int. J. of Agric. Res. 954-983.

Macfaddin,J.F. 2000..Biochemical tests for identification of medical Bacteria .3rd –ed.-

Mae'da ,A.Y. 2013 .Study comparative protection of biofilm produced by *Staphlococcus aureus* with other it's antigen ,M .Sc . Thesis –college of Veterinary Medicine-Baghdad university.

Marshall, K. C. 1976. Interfaces in microbial ecology, p. 44-47. Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Migula, W. 1900. System der Bakterien, Vol. 2. Jena, Germany: Gustav Fischer.

P´erez-Gim´enez J, Althabegoiti MJ, Covelli J, Mongiardini EJ, Quelas JI, L´ opez-Garc´ıa SL & Lodeiro AR .2009. Soybean lectin enhances biofilm formation by Bradyrhizobium japonicum