عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter* من بعض النباتات النامية في التربة الجبسية وتقييم كفاءتها في تثبيت النتروجين وأنتاج الاندول(IAA) واذابة الفوسفات

عبدالكريم عريبي سبع الكرطاني وجمانة بهجت ياسين

قسم علوم التربة والموارد المائية– كلية الزراعة– جامعة تكريت

الخلاصـــة

جمعت 20 عينة تربة جبسية من مناطق مختلفة من محافظة صلاح الدين (جامعة تكريت، ناحية العلم، قضاء سامراء) محيطة بجذور نباتات مختلفة (الحنطة والشعير والذرة الصفراء والباقلاء والخس، واللهانة والشلغم والقرنابيط والبصل والسلق والفجل والرشاد والكرفس والخباز والطماطة والجرجير والحمص والخيار) ومن تربة غير مزروعة بهدف عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter* من هذه العينات واختبار كفاءة العزلات في تثبيت النتروجين وانتاج الاوكسين (اندول حامض الخليك IAA) واذابة الفوسفات.

واظهرت النتائج أن أعلى تثبيت للنتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك (I.A.A) واذابة الفوسفات ثلاثي الكالسيوم (TCP) سجل عند العزلة (Az2) *A.chroococcum*، تليها العزلة(Az12) *A.vinelandii*، ثم العزلة (Az10) *A.beijerinckii*، وقد كانت العزلة (Az2) لبكتريا *A.chroococcum* هي الأكثر كفاءة ، اذ بلغ تثبيت للنتروجين لها 6.70 ملغم.لتر$^{-1}$، وانتاج الاندول بلغ 28.6 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ، واذابة الفوسفات 192 ، بينما بلغت قيمة هذه المعايير الثلاثة عند افضل عزلة عائدة لبكتريا(Az12) *A.vinelandii* اذ بلغت 5.12 ملغم.لتر$^{-1}$ و23.0 مايكروغرام.مل$^{-1}$ و 186على التتابع، في حين كانت 3.91 ملغم.لتر$^{-1}$ و 17.4 مايكروغرام.مل$^{-1}$ و 177 لعزلة البكتريا (Az10) *A.beijerinckii* على التتابع.

الكلمات المفتاحية:
عزل، تشخيص، بكتريا ***Azotobacter*** ، تثبيت النتروجين، IAA ، الفوسفات.

للمراسلة:
عبدالكريم عريبي سبع الكرطاني
البريد الالكتروني:
alkurtany@yahoo.com

الاستلام: 24/ 11 / 2016
القبول: 16 / 4 / 2017

Isolation and Identification of *Azotobacter* from Some Plants Grow in Gypsiferous Soil and Evaluation of Its Efficiency for Nitrogen Fixation and Production Indole (IAA) and Solubilizing Phosphate

Abdul−Kareem E. Alkurtany and Joumana Bahjat Yseen

Soil Science and Water Resources- College of Agriculture- Tikrit University

ABSTRACT

Twenty samples of Gypsiferous soil where collected from different sites of Salahuddin province (Tikrit University, Alam and Samarra) from Rhizosphere of different plants roots (wheat, barley, corn, peas, lettuce, , cabbage , cauliflower , turnip , onions, chard, radishes, Cresson, celery, malve, tomato, watercress, chickpeas, cucumbers) ، to isolate and identify of *Azotobacter* Bacteria from these samples , and test the efficiency of these isolates in nitrogen fixation and production of auxin (indole acetic acid IAA) and phosphate.

The results showed that the highest nitrogen fixation and production indole Acid Acetic (IAA) and phosphate solubilizing recorded in *A.chroococcum*, followed by *A.vinelandii*, then *A.beijerinckii*, and the (Az2) isolate which belong to *A.chroococcum* gave the highest value, this isolate gave 6.70 mg.L-1, 28.6 µg.ml-1, and 192 of fixed nitrogen , indole production and phosphate solubilizing respectively , while the efficient isolate of *A.vinelandii* (Az12) gave 5.12 mg.L-1 ,23.0 µg.ml-1and 186 respectively, and the only isolate of *A.beijerinckii* gave 3.91 mg.l -1 ,17.4 µg. ml -1 and 177 respectively.

Key words:
Isolation, identification, Azotobacter, nitrogen fixation, IAA, phosphate.
Corresponding Author:
Abdul-Kareem E. Alkurtany
E-mail:
alkurtany@yahoo.com
Received: 24/11/2016
Accepted: 16/4/2017

المقدمة:

تقع بكتريا *Azotobacter* ضمن شعبة (Proteobacteria) ،صنف (Gammaproteobacteria)، الرتبة (Pseudomonadales) ، العائلةfamily (Azotobacteraceae) والى جنس genus (*Azotobacter*) (Bergeys manual، 2004 ؛Leon و Espin, 2008)، اكتشفت في وقت مبكر من عام (1901) من قبل عالم النبات والاحياء الدقيقة الهولندي Beijerincki ،خلايا جنس الـــ *Azotobacter* تكون عادة كبيرة مقارنة بأنواع البكتريا الاخرى وجميع انواعها سالبة لصبغة غرام (Bergeys manual، 2004) متعددة الاشكال (Pleomorphism) وبإمكانها تثبيت النيتروجين الجوي بمقدار10ملغم/غم من الكربوهيدرات الموجودة في الوسط الزرعي وحرة المعيشة(Freeliving) ومنتجة لمادة Poly-β-hydroxybutyrate داخل الخلية(Page وShivprasad،1991)، تنتشر انواعها في الترب المتعادلة والقاعدية الخفيفة وينعدم تواجدها تقريباً في الترب الحامضية، ذكر(Rajaram وآخرون، 2013) أن الدرجة المثلى لدرجة التفاعل لنموها تتراوح ما بين (4.8 –8.5)، وتعد هذه البكتريا من مجموعة البكتريا المشجعة لنمو النبات PGPR((Plant growth promting Rizobacterin) اذ تثبيت النتروجين الجوي لا تعايشيا وتطلقه بصيغة ايون الامونيوم NH_3 في التربة فضلا عن اذابتها للفوسفات وإنتاجها لمختلف منظمات النمو ومنها اللأوكسينات التي يقع إندول – حامض الخليك (IAA) في مقدمتها وكذلك السايتوكاينينات والجبرلينات، و أنتاج مجموعة فيتامين B2 و B4 وB12 و Folic acid و Thiaminو Niacin و Pantothenic acid و Riboflavin و Biotin المحفزة لنمو الجذور وتكوين الشعيرات الجذرية، فضلاً عن دورها في تثبيط الممرضات النباتية وانتاجها مركبات السايدروفورات (Mali و Bodhan ، 2009 ؛ Mahdi واخرون، 2010 ؛Jnawali وآخرون، 2015).

ونظرا لقلة البحوث والدراسات في هذا المجال على مستوى محافظة صلاح الدين لذلك أجريت هذه الدراسة التي تهدف إلى :

1. عزل وتشخيص انواع بكتريا *Azotobacter* من عوائل نباتية مختلفة نامية في الترب الجبسية .
2. تقييم قدرة هذه العزلات في تثبيت النتروجين وإنتاج الاندول حامض الخليك واذابة الفوسفور TCP.

المواد وطرائق العمل :

المسح الحقلي :

جمعت 20عينة تربة جبسية من مناطق مختلفة من محافظة صلاح الدين (قضاء تكريت، ناحية العلم و قضاء سامراء) محيطة بجذور نباتات مختلفة (الحنطة والشعير و الذرة الصفراء والباقلاء و اللهانة والشلغم والقرنابيط و البصل و السلق و الفجل والرشاد و الكرفس، والخباز والطماطة والجرجير و الحمص والخيار) ومن تربتين غير مزروعة.

عزل بكتريا *Azotobacter* :

تم عزل بكتريا*Azotobacter* حسب(Moreno وآخرون، 1986) اذ حضر 100 مل من الوسط الغذائي الخالي من النتروجين (Nitrogen Free Jensen`s Medium) المكون من اذابة 0.4 غم كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ و0.1غم كلوريد الكالسيوم $CaCL_2$ و0,012غم كبريتات الحديدوز المائية و0.01 غم مولبيدات الصوديوم المائية $Na_2MoO_4.2H_2O$ و20 غم سكروز Sucrose ، 2 غم فوسفات البوتاسيوم K_2HPO_4 و0.4غم كلوريد الصوديوم NaCl لكل لتر في دوارق مخروطية سعتها 250 مل ووضعت على فوهاتها سدادات قطنية ثم عقمت بالمؤصدة في درجة حرارة 121م° وتحت ضغط جوي 1.5 بار لمدة 20 دقيقة وبعد التبريد وضع 1 غم من عينة التربة في الوسط الغذائي الخال من النتروجين ، ووضعت في الحاضنة على درجة 28مْ لمدة 48 ساعة الى لحين حدوث العكارة وتغير في لون الوسط وبهذا يستدل على تواجد بكتريا *Azotobacter* .

تشخيص بكتريا *Azotobacter*:

شخصت عزلات بكتريا *Azotobacter* الى الانواع التابعة لها بدراسة صفاتها الزرعية والتي تضمنت سطح المستعمرة وشكلها وقوامها ولونها واللمعان وانتاج الصبغات Pigments وشكل الحافة حسب (Mahonو Manuselis، 2000)، وبعض صفاتها المجهرية والتي تضمنت صبغة غرام ،الشكل والحركة حسب (Collee واخرون ،1996)، ودراسة صفاتها الكيموحيوية والتي تضمنت النمو في درجة حرارة37 مئوي و فحص انزيم الكاتليز واختبار الاوكسديز و اختبار تخمر السكريات و اختبار تحلل الجيلاتين و اختبار انتاج الاندول واختبار النمو في وسط بيرك، اختبار اختزال النترات حسب (Allen،1959 ؛ Thompsonو Skerman، 1979 ؛Collee واخرون ،1996).

اختبار كفاءة العزلات على انتاج المواد المحفزة لنمو النبات

اختبار كفاءة العزلات على تثبيت النتروجين الجوي:

استخدم وسط جنسن السائل _الخالي من النتروجين (Nitrogen Free Jensen`s Medium)، إذ وضع (100) منه في قناني سعة (250) مل ولقح الوسط بإضافة (1) مل من المزرعة السائلة للعزلات المختلفة وحضنت بالحاضنة الهزازة (shaker) ولمدة (3) أسابيع على درجة حرارة 30م˚، وقدرت كمية الامونيا المتكونة في البيئة بأخذ 2مل منها وتقديرها بجهاز (micro-kjeldahl) وحسب طريقة (Bremner، 1965)

اختبار قدرة العزلات على اذابة الفوسفور المعدني من مركب ثلاثي فوسفات الكالسيوم (TCP) :

حضر الوسط الغذائي لهذا الاختبار باذابة 10غم من الكلوكوز Glucose و 0,5 غم كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ و 0,5غم خلاصة الخميرة Yeast extract و0.2غم كلوريد الصوديوم Nacl و0.1غم كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ و 0.002 غم كبريتات الحديدوز المائية$FeSO_4.7H_20$ و0.002 غم كبريتات المنغنيز المائية $MnSo_4.7H_20$ و5 غم فوسفات الكالسيوم $Ca(po_4)_5$ و 0.2غم كلوريد البوتاسيوم KCl و 15 غم اكارAgar في لتر من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني (pH) الى7.0 وعقم الوسط في المؤصدة بدرجة 121م˚ وبضغط 1.5 بار لمدة 20 دقيقة، وحسب(Pikovskaya ، 1948)،ثم لقحت الاطباق بالعزلات البكتيرية بطريقة التخافيف وحضنت الاطباق لمدة سبعة ايام بدرجة حرارة 30 م°، قدرت فعالية البكتريا على إذابة مركب ثلاثي فوسفات الكالسيوم شخصت على اساس تكوين هالة شفافة حول المستعمرة البكتيرية (halo zone) ، واستعملت المعادلة للتعبير عن قدرة البكتريا على اذابة الفوسفات(Patil وآخرون، 2013)

Solubilization efficiency (SE)=Solubilization diameter×100/ Growth diameter

تقدير الاندول حامض الخليك (IAA)

1. حضر وسط الاكار المغذي (N.B) اذ وضع 100مل من هذا الوسط في قناني سعة (250) مل وتم أضافة 0.2% لكل قنينة من التربتوفان وعقم بوساطة المؤصدة بدرجة حرارة 121 م˚ وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة، ثم لقحت القناني بعد التبريد بمسحة من العزلات البكتيرية المختلفة.
2. حضنت العزلات في حاضنة هزازة لمدة 24 ساعة بدرجة 27 ± 2م˚.
3. بعد مدة التحضين وضع 1.5مل من العزلة البكتيرية في أنابيب ابندروف واجري النبذ بجهاز الطرد المركزي (centrifuge) لمدة 7 دقائق وبسرعة 7000 دورة بالدقيقة.
4. نقل 1مل من الراشح إلى أنابيب اختبار وأضيف2 مل من محلولSalkowsky(كاشف A) الذي حضر عن طريق خلط 2مل من0.5 مولاري من FeCl3 مع 98مل من حامض البيروكلوريك بتركيز 35%.
5. وتركت الأنابيب مدة (20–25) دقيقة لحدوث التفاعل والتغير اللوني.
6. تم قياس الامتصاصية بجهاز Spectrophotometer على طول موجي 535nm.
7. تم حساب تركيز IAA برسم منحنى القياسي من خلال العلاقة بين التركيز والامتصاصية (Glickmann و Dessaux، 1995).

النتائج والمناقشة :

يبين جدول (1) العزلات العشرين العائدة لبكتريا *Azotobacter* والتي عزلت من ترب الدراسة ، وشخصت بالاعتماد على الصفات المزرعية و المجهرية والكيموحيوية، ويظهر من الجدول بان كل العزلات هي سالبة لصبغة كرام، ،تتجمع خلاياها بأشكال مختلفة اما مفردة او ثنائية او رباعية او تكون بشكل سلاسل ويظهر من الجدول ايضا بان مستعمراتها كاملة الحافة وشكل المستعمرات تباينت بين المحدبة والمسطحة ومن ناحية الشفافية فانها اما شفافة او غير شفافة ،وذات قوام متباين من اللزجة وشديدة اللزوجة الى غير اللزجة ، ويتضح من الجدول ايضا بان جميع العزلات البكتيرية التابعة لجنس*Azotobacter* كانت موجبة لاختباري فحص الكاتليز والاوكسيديز، وقادرة على اختزال النترات، وقادرة على النمو في درجة حرارة 37م˚، وقادرة على إنتاج الإندول وغير قادرة على تحلل الجيلاتين تتفق هذه النتيجة مع ما وجده (Tchan وPeter، 1984 ؛ Saribay، 2003؛ Dashti, 2011) .

جدول (1) الصفات الزرعية وبعض الاختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *Azotobacter* المعزولة من بعض النباتات النامية في التربة الجبسية

العزلة	حافة المستعمرة	شكل المستعمرة	الشفافية	القوام	لون الصبغة	النمو في 37م˚	تحلل الجلاتين	اختزال النترات	اختبار الاندول	اختبار الاوكسديز	اختبار الكاتاليز
AZ1	كاملة الحافة	محدبة	شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ2	=	محدبة	غير شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ3	=	مسطحة	شفافة	شديدة اللزوجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ4	=	محدبة	غير شفافة	لزجة	بنية غامقة	+	–	+	+	+	+
AZ5	=	مسطحة	شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ6	=	مسطحة	غير شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ7	=	محدبة	غير شفافة	غير لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ8	=	محدبة	شفافة	لزجة	خضراء	+	–	+	+	+	+
AZ9	=	محدبة	شفافة	لزجة	خضراء	+	–	+	+	+	+
AZ10	=	محدبة	شفافة	غير لزجة	صفراء	+	–	+	+	+	+
AZ11	=	مسطحة	شفافة	لزجة	خضراء	+	–	+	+	+	+
AZ12	=	محدبة	شفافة	لزجة	خضراء	+	–	+	+	+	+
AZ13	=	مسطحة	غير شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ14	=	محدبة	شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ15	=	محدبة	غير شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ16	=	محدبة	غير شفافة	شديدة اللزوجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ17	=	محدبة	شفافة	غير لزجة	خضراء	+	–	+	+	+	+
AZ18	=	محدبة	شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+
AZ19	=	محدبة	شفافة	لزجة	خضراء	+	–	+	+	+	+
AZ20	=	مسطحة	شفافة	لزجة	بنية فاتحة	+	–	+	+	+	+

وعند اجراء الاختبارات التفريقية جدول (3) تميزت عزلات بكتريا *Azotobacter* (AZ1 و AZ2 و AZ3و AZ4 و AZ5 و AZ6 و AZ7 و AZ1، و AZ15 و AZ16 و AZ18 و AZ20) بشكل خلايا عصوية– عصوية صغيرة ومتحركة وذات قوام لزج مكونة لصبغة بنية (بنية غامقة– بنية فاتحة) على سطح الوسط الغذائي الصلب(N- Free Jensen`s Medium)، كما انها لم تنمو في وسط بيرك، يمكنها استهلاك سكريات (النشا والسكروز والكلوكوز والمانتول واللاكتوز والزيلوز والمالتوز

والمالونات) ولم تستهلك سكر (الرامينوز والينوسيتول) وهذهِ الصفات تتطابق مع خصائص بكتريا *A.chroococcum* ، وتميزت ايضا العزلات (AZ8 و AZ9 و AZ11 و AZ12 و AZ13 و AZ17 و AZ19) بشكل خلايا كروية– كروية عصوية، متحركة، ، وذات قوام غير لزج، ومكونة لصبغة خضراء على سطح الوسط الغذائي الصلب(N- Free Jensen`s Medium)، ، كما انها تنمو في وسط بيرك، وتتمكن من استهلاك سكريات (سكروز والمانتول والرامينوز والكلوكوز واللاكتوز والزيلوز والمالتوز والمالونات والينوسيتول) ولم تستهلك سكر (النشا) وتتطابق هذه الصفات مع خصائص بكتريا *A.vinelandii* .

جدول رقم (2) قابلية عزلات بكتريا *Azotobacter* المعزولة من نباتات مختلفة في النمو على وسط بيرك وفي استهلاك بعض السكريات

رمز العزلة مع النوع	وسط بيرك	المالونات	الينوسيتول	اللاكتوز	الزايلوز	المالتوز	الكلكوز	الرامينوز	المانتول	النشا	سكروز
		النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز	النمو / انتاج الغاز
***A. chroococcum* Az1**	-	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	+ - +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. chroococcum* Az2**	-	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	+ - +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. chroococcum* Az3**	-	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. chroococcum* Az4**	-	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. chroococcum* Az5**	-	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. chroococcum* Az6**	-	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ - +	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	+ + +
***A. chroococcum* Az7**	-	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	+ + +
***A. vinelandii* Az8**	+	+ - +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ - +	+ - +	+ + +	- - -	+ + +
***A. vinelandii*Az9**	+	+ - +	+ + +	+ + +	+ - +	+ + +	+ - +	+ - +	+ + +	- - -	+ + +
***A.beijerinckii*Az10**	-	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	- - -	+ - +	- - -	- - -	- - -	+ + +
***A. vinelandii* Az11**	+	+ - +	+ + +	+ + +	+ - +	+ - +	+ - +	+ + +	+ - +	- - -	+ + +
***A. vinelandii* Az12**	+	+ - +	+ + +	+ + +	+ - +	+ - +	+ - +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +
***A. vinelandii* Az13**	+	+ - +	+ + +	+ + +	+ - +	+ - +	+ - +	+ - +	+ + +	- - -	+ + +
***A. chroococcum* Az14**	-	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. chroococcum* Az15**	-	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. chroococcum* Az16**	-	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. vinelandii* Az17**	+	+ - +	+ + +	+ + +	+ + +	+ - +	+ + +	+ - +	+ + +	- - -	+ + +
***A. chroococcum* Az18**	-	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	++ +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +
***A. vinelandi*Az19**	+	+ - +	+ + +	+ + +	+- +	+ - +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +
***A. chroococcum* Az20**	-	+ + +	- - -	+ - +	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	+ + +	+ + +	+ + +

اما العزلة الوحيدة (AZ10) تميزت شكل الخلية بكونها عصوية، وغير متحركة، وذات قوام غير لزج، ومكونة لصبغة صفراء على سطح الوسط الغذائي الصلب (N- Free Jensen`s Medium)، ، كما انها لم تنمو في وسط بيرك، وتتمكن من استهلاك سكريات (السكروز واللاكتوز و الزيلوز والكلوكوز والمالونات) ولم تستهلك سكريات (المانتول والنشا واللاكتوز والمالتوز و الرامينوز و الينوسيتول وتتطابق هذهِ الصفات مع خصائص بكتريا *A.beijerinckii* (Jenson، 1954؛ Bernner واخرون 2005،).

كفاءة عزلات بكتريا *Azotobacter* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج اندول حامض الخليك(IAA) واذابة فوسفات ثلاثي الكالسيوم (TCP):

اظهرت النتائج في الجدول (3) بان عزلات الدراسة العشرين قادرة على تثبيت النتروجين الجوي وانتاج اندول حامض الخليك واذابة الفوسفات ثلاثي الكالسيوم TCPبنسب مختلفة ، ويظهر من الجدول تفوق العزلة (AZ2) العائدة لبكتريا *A.chroococcum* على كل العزلات الواقعة تحت الانواع الثلاثة في تثبيتها للنتروجين الجوي والتي بلغت 6.70 ملغم.لتر$^{-1}$ ،اما العزلة *A. vinelandii* (AZ12) فقد بلغ تثبيتها للنتروجين الجوي لها 5.12 ملغم. لتر$^{-1}$ ، اما العزلة الوحيدة الواقعة تحت بكتريا *A.beijerinckii* (AZ10) اعطت في تثبيتها للنتروجين الجوي مقدار بلغ 3.91 ملغم.لتر$^{-1}$ وقد يعود اختلاف العزلات العشرين على تثبيت النتروجين الجوي وتحويله من شكله الخامل N_2 الى شكل مفيد للنبات NH_3 الى اختلاف التراكيب الوراثية للنوع الواحد والجين المسؤول عن تثبيت النتروجين(Cheng، 2008) ولاسيما كفاءتها في انتاج انزيم النتروجينيز المختلف من عزلة إلى أخرى اذ يساعد على تحطيم الاصرة الثلاثية بين ذرتين النتروجين وتحويله الى امونيا (Dixon و Khan، 2004)، وتتفق هذه النتائج مع Dashti (2011) لبكتريا *A.chroococcum* (Ko62) و *A. vinelandii* (Sa51) و *A.beijerinckii* (Ka123) ،وبشير (2003) والتي بينت ان العزلة *A.chroococcum* (A5) أعطت أعلى قيمة لتثبيتها النتروجين الجوي تليها العزلة *A. vinelandii* (A10).

اما اختبار كفاءة العزلات على اذابة الفوسفات ثلاثي الكالسيوم ،اذ اعطت العزلة (AZ2) العائدة لبكتريا *A.chroococcum* اعلى قيمة لاذابة الفوسفات بلغ 192 ،تليها العزلة (AZ12) العائدة للنوع *A. vinelandii* بقيمة بلغت 186 ،اما العزلة (AZ10) العائدة للنوع *A.beijerinckii* فقد اعطت في اذابتها للفوسفات مقدار 177، وعلى الرغم من كون هذا الاختبار نوعياً وليس كمياً الا انه يؤكد كفاءة هذه البكتريا على اذابة الفوسفات المعدني من خلال انتاجها للاحماض العضوية ذات اوزان جزئية منخفضة وطبيعة ونوع الحامض المنتج مثل(فورمك اسد ،اوكزالك اسد ، فيتك ، لاكتك اسد ، بروبيونك) ، والتي سوف تساهم من خلال مجاميع الهايدروكسيل (Hydroxyle) والكاربوكسيل على تحرير حامض الفسفوريك H_2PO_4 من المجاميع العضوية(Rodrigues و Fraga، 1999) وتتفق هذه النتائج مع نتائج Dashti (2011) لبكتريا *A.chroococcum* (Ko62) و *A. vinelandii* (Sa51) و *A.beijerinckii* (Ka123) وتتفق مع (Paulو Sinha , 2013) لبكتريا *Azotobacter sp* (JPSB17).

اما اختبار كفاءة العزلات على انتاج الاندول حامض الخليك فسجلت العزلة (AZ2) العائدة لبكتريا *A.chroococcum* اعلى قيمة في انتاجها (IAA) بلغ 28.6 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ،تليها العزلة (AZ12) العائدة للنوع *A. vinelandii* بتركيز بلغ 23.0 مايكروغرام .مل$^{-1}$ ،اما العزلة (AZ10) العائدة للنوع *A.beijerinckii* فقد بلغ تركيز حامض الخليك تركيز 17.4 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ،وقد يعود اختلاف العزلات العشرين في انتاجها الى الاندول حامض الخليك الى سلالات بكتريا *Azotobacter* وظروف وطور النمو(Mirza واخرون، 2001) وأيضاً الى التركيب الجيني و طبيعة وقابلية بكتريا *Azotobacter* لإنتاج هذه الهرمونات (Kukrejaواخرون،2004) ، كذلك تختلف في إنتاجها للIAA معتمدة بذلك على تركيز الحامض الاميني Tryptophen. المضاف للوسط وعندما لا تضاف هذه المادة الى الوسط الزرعي فان كميات قليلة من الIAA يمكن ملاحظتها في الاوساط

الزرعية القديمة لبكتريا *Azotobacter* (kizilkaya، 2008) وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه (Ravikumar واخرون ، 2004) لبكتريا *A.chroococcum* و *A. vinelandii* و *A.beijerinckii*.

جدول (4) كفاءة عزلات بكتريا *Azotobacter* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج Indole-3-acetic acid واذابة فوسفات ثلاثي الكالسيوم (TCP)

Zone mm	Colony diameter mm	اذابة الفوسفات (SE)	IAA مايكروغرام .مل$^{-1}$	كمية N2 المثبتة ملغم .لتر$^{-1}$	رمز العزلة	نوع البكتريا
16	10	160	19.5	2.73	AZ1	*A.chroococcum*
13.5	7	192	28.6	6.70	AZ2	*A.chroococcum*
10	9	111	21.1	3.53	AZ3	*A.chroococcum*
10	8	125	13.2	2.47	AZ4	*A.chroococcum*
11	8	137	18.7	1.29	AZ5	*A.chroococcum*
8.5	6	141	21.3	1.07	AZ6	*A.chroococcum*
13	8	162	17.8	3.63	AZ7	*A.chroococcum*
8.5	6	141	16.4	2.49	AZ8	*A.vinelandii*
6.5	6	108	18.9	2.73	AZ9	*A.vinelandii*
8	4.5	177	17.4	3.91	AZ10	*A.beijerinckii*
7	6	116	19.3	1.63	AZ11	*A.vinelandii*
14	7.5	186	23.0	5.12	AZ12	*A.vinelandii*
7	5.5	127	20.3	2.18	AZ13	*A.vinelandii*
13.6	8	170	21.0	1.68	AZ14	*A.chroococcum*
8.5	7	121	15.2	2.11	AZ15	*A.chroococcum*
8	7	114	22.4	2.22	AZ16	*A.vinelandii*
10	6.5	153	15.7	2.96	AZ17	*A.vinelandii*
9	5.5	163	19.2	3.53	AZ18	*A.chroococcum*
9.5	6	158	14.7	3.78	AZ19	*A. vinelandii*
6.6	6	110	10.5	1.02	AZ20	*A.chroococcum*

المصادر:

بشير، عفراء يونس .(2003) :التداخل بين المايكورايزا وبكتريا الازوتوباكتر والازوسبرلم وتأثيره في نمو و حاصل الحنطة . اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد

-**Allen, O.N. (1959)**. Experiments in soil bacteriology. J. Bacteriology. 27: 325–339.

-**Bergey"S Manual**,(2004). Systematic Bacteriology. Williams and Wilking.Baltimore. London .

-**Bernner, D.J.; Krieg, N.R. and Staley, J.T. (2005)**. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2. Edited by Garrity, G.M. springer science business Media, Inc., New York, USA.

-**Bremner,J.M. (1965)**. Total nitrogen In : "Methodes of soil analysis" Black,C.A. Evans,D.P., Ensminger,L.E., White,J.L., Clark,F.E., Dinauer,R.C. (Ed) part 2, American Society of Agronomy. Madison Wisconsin, USA.

Cheng, Qi (2008).Perspectives in biological Nitrogen fixation research Journal − Integrative Plant Biology . 50(7):784-796.

-**Collee, J. G.; Marmion, B. P.; Fraser, A. G. and Simmon, A. (1996)**. Practical Medical Microbiology. 14thed. Produced by Longman Singapore Publishers (pte) Ltd. pp: 385.

-**Dashti, A.M.K. (2011)**. Isolation and characterization of *Azotobacter* spp. in Erbil soils and the effect of biofertilizers (*Azotobacterchroococcum* and *traansconjugant lactobacillus plantaruum*) on nutrient uptake by wheat. Ph.D. thesis. College of Agriculture. University of Salahaddin–Erbil.

Dixon, R. and Kahn D.,(2004). Genetic regulation of biological Nitrogen fixation.− Department of Molecular Microbiology .John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, UK.

Glickmann, E. and Dessaux, Y. (1995). Acritical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria .Appl . Environ . Microbiol . 61 : 793 – 796 .

Jenson, H.L. (1954). Azotobacteriaceae. Bact. Rev., 18: 195–214

Jnawali, A.D.; Ojha, R.B. and Marahatta, S. (2015) . Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability. A review advance in plant and Agriculture research. 2(8).

Kizilkaya. R. (2008). Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. Ecological Engineering. 33(2): 150–156.

-Kukreja, K.; Suneja, S.; Goyal, S. and Nurula, N. (2004). Phyto hormone production by *Azotobacter*. A review. Agric.–Res.–25(1). India.

-Leon, R. and Espin, G. (2008). Flh DC, but not Fle Q, regulate Flagella biogenesis *Azotobacter Sp*., and are under Algu and Cyd R negative control. Microbial., 154: 1719–1728.

-Mahdi, S.S., Hassan, G.I.; Samoon, S.A.; Rather, H.A, Dar, S.A and Zehra, B. (2010). Bio – fertilizers in organic agriculture. Journal of Phytology ,2 (10) : 42-54.

-Mahon, C. and Manuselis, G. (2000). Textbook of diagnostic microbiology, 2nd edition. W.B. Sanders Company.

-Mali, **G.V. and Bodhankar, M.G. (2009).** Antifungal and Phytohormone Production Potential of *Azotobacter chroococcum* Isolates from Groundnut (*Arachis hypogea* L.) Rhizosphere. Asian J. Exp. Sci., 23 (1) : 293–297.

-Mirza, M.S.; Ahmed, W.; Latif, F.; Haurat, J.; Bally, R.; Normand, P. and Malik, K.A. (2001). Isolation partial characterization and the effect of plant growth– promoting bacteria (PGPB) on micro–propagated sugarcane in vitro. Plant and soil, 237: 47–54.

-Moreno, J. Gonzalez–Lopez, J. and Vela, G.R. (1986). Survival of *Azotobacter Spp.* In dry soils. Appl. Environ. Microbial. 51: 123–125.

-Page, W. J. and Shivprasad, S.(1991). *Azotobacter salinestris* sp. nov. a Sodium Dependent, Microaerophilic, and Aeroadaptive Nitrogen– Fixing Bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol.,41 (3): 369–376.

-Patil,**V.S.;Patil, S.V. ; Deshmukh, H.V. and Pathade,G.R. (2013).** Isolation of Halotolerant, Thermotolerant and Phosphate Solubilizing Species of *Azotobacter* from the Saline Soil. Nature Environment and Pollution Technology An International Quarterly Scientific Journal .Vol .12 , pp.139-142 .

-Paul, D. and Sinha, S.N. (2013). Phosphate solubilizing activity of some bacterial strains isolated form Jute mill effluent exposed water of River ganga. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences ISSN: 2231–6345.

-Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Microbiologia 17:362-370

-Rajaram, S.; Nongrang K.; Mandal, S.K.; Ghosh and Bindroo B. B. M.K. (2013). *Azotobacter chroococcum* mass culture for production of bioFertilizer, Its sustained efficacy on Nitrogen fixation and crop productivity in Mulberry Garden. International Journal Of Computational Engineering Research (ijceronline.com). 3 (3):332–341.

- Ravikumar,S. ;Kathiresan ,K.; Ignatiammal,S.T.M ;Baby Selvam ,M. and Shanthy ,S. (2004).Nitrogen –fixing *Azotobacters* from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers .Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 312(125):5-9.

Rodriguez, H. and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17: 319–339.

- Saribay, G. F. (2003). Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum* in nitrogen – free and OMW containing medium. Ms.C. Thesis. The graduate school of natural and applied sciences of the Middle East Technical University.

Tchan, Y.T. and Peter N.B. (1984). Genus *Azotobacter*. In: Sneath, P.H., mair, N.S.

-Thompson,J.P. and Skerman,V.B.D. (1979). Azotobacteraceae. The Taxonomy an Ecology of Aerobic Nitrogen-Fixing Bacteria. Academic Press, London.