مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد الثالث والعشرون - المجلد التاسع - علوم الحياة - آب 2024 م
doi.org/10.52866/esj.2023.09.23.07

تحديد الظروف المثلى لأنتاج الاندول حامض الخليك من بكتريا *Bacillus subtilis S4.* المعزولة من الترب العراقية

صفاء عبد الرحيم محمود الالوسي[1] خلود عبد الاله الخفاجي [1] اسماعيل عباس جديع[2]
(1). قسم الاحياء المجهرية التطبيقية، مركز التقانات الغذائية والاحيائية، دائرة البحوث الزراعية، وزارة العلوم والتكنولوجيا، العراق.
(2) قسم علوم الحياة ، كلية التربية , الجامعة العراقية

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

مستخلص

هدف البحث الى عزل وتشخيص البكتريا *Bacillus* من مصادر التربة وجذور بعض أنواع النباتات من مناطق زراعية مختلفة وتحديد العزلة الأكفأ في إنتاج إندول حامض الخليك ودراسة الظروف المثلى لأنتاجه. عزلت البكتريا المكونة للسبورات الداخلية من عينات شملت ترب من عمق 10 سم من سطح التربة ومحيطة بالجذور لعدد من النباتات وعزلت البكتريا بعد المعاملة الحرارية. شخص انتاج الاندول حامض الخليك وحدد تركيزه باستخدام الطريقة اللونية بوجود كاشف سالكوزكي. انتخبت العزلة الأكفأ وشخصت مظهريا ووراثيا وحددت الظروف المثلى للأنتاج المختبري في مختبرات دائرة البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنولوجيا. تم الحصول على 60 عزلة بكتيرية، وتبين أن 22 عزلة بكتيرية من النماذج قد كونت حلقة الإندول الحمراء لكن بنسب متفاوتة وأن أعلى إنتاجية وصلت الى 3.39 ملغم لتر $^{-1}$ للعزلة *Bacillusspp s4* والمعزولة من جذور الحنطة و شخصت العزلة باستخدام الطرق الجزيئية والاختبارات الكيموحيوية بانها *Bacillus subtilis* واستعملت في الدراسات اللاحقة وانتجت عزلة المقارنة التي تعود للنوع *Bacillus thuringiensis* kurstaki تركيز 3.19 ملغم لتر $^{-1}$ من الاندول حامض الخليك خلال 24 ساعة فقط. وامكن الحصول على أعلى إنتاج للأوكسين لكل عند تركيز التربتوفان 0.8 غم/ 100 مل وبلغ 8.97 ملغم لتر $^{-1}$ للعزلة المحلية *Bacillus subtilis* و 7.70 ملغرام لتر $^{-1}$ لعزلة *Bacillus thuringiensis kurstaki*. ' أما الوقت الأمثل لإعلى إنتاجية فكان خلال 24 ساعة ، وتفوق التربتون كمصدر نتروجيني بتركيز 0.1غم / 100 مل على كل من مستخلص الخميرة والببتون ' إذ أعطى انتاجاً وللعزلتين *Bacillus subtilis* و *Bacillus thuringiensiskurstaki*, تركيزاً مقداره 8.69 و 7.62 ملغرام لتر $^{-1}$على التوالي. وبينت النتائج ان العزلة المحلية *Bacillus subtilis* أعطت أعلى إنتاج لها عند حرارة 25م° إذ بلغ 9.647 ملغرام لتر $^{-1}$في حين العزلة *Bacillus thuringiensiskurstaki* اعطت بدرجة حرارة 40 مئوي 9.413 ملغرام لتر $^{-1}$، وقيس أعلى تركيز من إندول حامض الخليك وبلغ 9.757 ملغرام لتر $^{-1}$ عند الدالة الحامضية 8 للعزلة *Bacillus thuringiensis kurstaki* التي أعطت 9.200 ملغرام لتر $^{-1}$، ولوحظ تضاعف ألأنتاج في الظروف الهوائية مقارنة مع الظروف اللاهوائية 4.710 ملغرام لتر $^{-1}$.

الكلمات المفتاحية: سالكوزكي ، اوكسين، Bacillus thuringiensis ، ببتون .

Determining the optimal conditions for the production of indole acetic acid from *Bacillus subtilis* S4 Isolated from Iraqi soil

Saffa Abdualrheem Mahmood[1] , Khlood Abedalelah Mohammed[1] , Ismael Abbas Jdeya[2]
Department of Applied Microbiology/ Center of Biotechnology/ Directorate of Agriculture Research/ Ministry of Science and Technology; (2) Department of Life Sciences, College of Education, Iraqia- University
safaalalusy@gmail.com

Abstract:

The research aimed to isolate and diagnose *Bacillus* bacteria from soil samples and the roots of some plants collected from different agricultural regions, determine the most efficient bacterial isolate in producing indole acetic acid, and study the optimal conditions for auxin production. Endospores-producing bacteria were isolated from samples that included soil from a depth of 10 cm from the soil surface and surrounding the roots of several plants. The bacteria were isolated after heat treatment. The production and concentration of indole acetic acid were determined using the colorimetric method in the presence of Salkowski's reagent. The most efficient isolate was selected, phenotypically and genetically diagnosed, and the optimal production conditions were determined by the laboratories of Agriculture Research Directorate/ Ministry of Science and Technology. **Out of** 60 bacterial isolates obtained, it was found that only 22 of them formed the red indole ring, but in varying proportions, and that the highest productivity reached 3.39 mg L-1 for the isolate *Bacillus* spp s4, which was isolated from the roots of wheat. The isolate was identified using molecular methods and biochemical tests as *Bacillus subtilis* and was used in the study. In subsequent studies, the comparison isolate belonging to the species *Bacillus thuringiensis* kurstaki produced a concentration of 3.19 mg L^{-1} of indole acetic acid in only 24 hours. The highest auxin production was obtained at a tryptophan concentration of 0.8 g/100 ml, reaching 8.97 mg L^{-1} for the local isolate *Bacillus subtilis* and 7.70 mg L^{-1} for the *Bacillus thuringiensis* kurstaki isolate. The optimal time for the highest productivity was within 24 hours, and tryptone as a nitrogen source at a concentration of 0.1 g/100 ml outperformed both the yeast extract and peptone, as it gave production for the two isolates, *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* kurstaki, at a concentration of 8.69 and 7.62 mg L^{-1}. The results showed that the local isolate *Bacillus subtilis* gave its highest production at a temperature of 25°C, reaching 9.647 mg L^{-1}, while the isolate *Bacillus thuringiensis* kurstaki gave a production of 9.413 mg L^{-1} at a temperature of 40°C. The highest concentration of indole acetic acid was measured and amounted to 9.757 mg L^{-1} at pH 8. For the *Bacillus thuringiensis* kurstaki isolate, which produced 9,200 mg L^{-1}, a doubling of production was observed in aerobic conditions compared to anaerobic conditions, 4,710 mg L^{-1}.

Key words: salkawski, auxin, *Bacillus thuringiensis*, peptone

المقدمة:

يمتاز جنس *Bacillus* بصفات مظهرية عديدةٍ إذ تظهر خلاياه مجهرياً بأشكال عصوية مفردة أو بشكل أزواج وتكون بعض تشكيلاتها بشكل سلاسل وأحياناً تشبه الخيوط الطويلة، وتمتاز انواع الجنس بتكوينها للسبورات الداخلية وبكونها موجبة لصبغة جرام عند التصبيغ و تحتاج بعضها إلى أوساط معقدةٍ للنمو فضلاً عن نموها في الأوساط الاعتيادية مثل الوسط المغذي الصلب وأكار الدم (Logan و Devos ،2009). وقد أجمع عدد كبير من الباحثين على قدرة البكتريا المتواجدة في التربة ومنها مجموعة *Bacillus* كأهم الأجناس على استغلال العديد من منتجات الجذور الأيضية كمواد اساس مغذية في إنتاجها للهرمونات النباتية مثل إندول حامض الخليك والجبريلينات والتي تعد من محسنات النمو للنبات واطلق على هذه الكائنات المنتجة اسم (PGPR) Plant Growth Promoting Rhizobacteria والتي تزيد من قدرة النبات على مقاومة الأمراض فضلاً عن إستعمالها في مجال المكافحة الإحيائية وإنتاج السايدروفورات وتهيئة الفوسفات للنبات (Chagas واخرون، 2015);(**Kyung** و Ja ،2016)Yu(واخرون ،2012)(Akindolire و Babalola،2011) (Richardsonواخرون،2009).

وتعد الهرمونات النباتية ومنها الإندول حامض الخليك والإندول حامض البيوتريك ذات اهمية كبيرة لسيطرتها على العديد من الفعاليات الفسلجية والخلوية المهمة. وتقوم العديد من البكتريا لأجناس اخرى بانتاج مثل هذه المركبات ومنها أجناس *Pseudomonas* و *Klebsiella* و *Azotobacter* و*Azospirillum*Idris (Ahmad واخرون،2005) وقد أثبت (Joseph واخرون،2007) بعد اختبارات قام بها على 150 عزلة بكتيرية معزولة من المحيط الجذري والمحفزة لنمو النبات (PGPR) من ألأجناس اعلاه، ان جميعها قادرة على إنتاج الإندول حامض الخليك.

لذلك قام العديد من الباحثين بعزل جنس *Bacillus* القادر على إنتاج إندول حامض الخليك (IAA) من التربة ومحيط الجذور، ومن هذه الانواع التابعة لجنس *Bacillus* ا *B.megaterium,B. thuringiensis,* *B. pumilus,B. subtilis* و *B. Cereus* (Kumar واخرون،2011) (Muraواخرون،2016) (Payel واخرون،2017).

إن هرمون اندول حامض الخليك المنتج من بكتريا المحيط الجذري يختلف بحسب تركيز التربتوفان في الوسط وبحسب الزمن بدءاً من التلقيح (Sridevi و Mallaiah2008,) فقد استعمل العديد من الباحثين تراكيز مختلفة من التربتوفان لمعرفة تأثيره على إنتاج الإندول حامض الخليك. وأكد العديد من الباحثين إمكانية زيادة إنتاج الإندول حامض الخليك بزيادة تركيز التربتوفان، فقد وجد (Swain2007)، أن بكتريا *Bacillus subtilis* يمكنها أن تضاعف إنتاج IAA (6.1–31.5) مرة عند إضافة التربتوفان بتراكيز (0.1–1) ملغم/ لتر الى وسط تنميتها. كما أثبت (منال الدوس وزملاؤه 2016) أن غياب التربتوفان من وسط الأنتاج أدى إلى غياب أي إنتاج من الإندول حامض الخليك في جميع العزلات التي استعملها في دراسته في أول خمسة أيام وأكدوا أن زيادة تركيز الإندول يزداد بازدياد تركيز التربتوفان في الوسط .

لذا هدف البحث الى عزل بكتريا Bacillus وتحديد ألأكفأ بانتاج الاندول حامض الخليك وتشخيصها الدقيق وتحديد الظروف المختبرية التغذوية والبئية الأفضل للأنتاج.

مواد البحث وطرائق العمل:

عزل البكتريا *Bacillus* والتحري عن انتاجها لمنظم النمو النباتي IAA

عزلت البكتريا المكونة للسبورات الداخلية من عينات شملت 18 عينة لترب محيطة بالجذور لعدد من النباتات فضلاً عن 12 عينة لجذور الطماطم، الخيار، الحنطة و الشعير وما يرافقها من تربة من محافظات بغداد وواسط والأنبار وأربيل وكركوك وبواقع 8،5،7،6،4 عينة على التتابع حيث أخذ النماذج من عمق 10 سم من سطح التربة. ونُقِلَتْ النماذج في أكياس بلاستيكية لضمان عدم جفافها (Arsalan واخرون، 2011).

عُلِّقَ وزن 10غم من كل عينة سواء تربة ام جذور في 90 مل ماء مقطر أي بنسبة 10:1 ويكمل الحجم الى 100 مل وِحُضِنَتْ لمدة 60 دقيقة في حاضنة هزازة بدرجة 25 مº ثم تم تعريض معلق التربة لمعاملة حرارية وبدرجة 80 مº لمدة 30 دقيقة باستعمال حمام مائي لقتل الخلايا الخضرية. أجريت تخافيف عشرية متسلسلة ' وزرع 0.1 مل من آخر تخفيفين (10^{-5}و 10^{-3}) في أطباق بتري حاوية على وسط المغذي الصلب Nutrient agar باستعمال الناشر الزجاجي وحُضِنَتْ الأطباق عند درجة حرارة 30مº لمدة 24 ساعة (Arsalan و اخرون، 2011). التقطت العزلات المفردة وزرعت بطريقة التخطيط على وسط الأاكار الصلب بوساطة الناقل المعدني وحُضِنَتْ 72 ساعة وعند درجة حرارة 30 مº للحصول على عزلات نقية كما حددت الصفات الشكلية للمستعمرات من حجم ولون ومظهر فضلاً عن الارتفاع وشكل المستعمرة كما أجري تصبيغ شريحة زجاجية بصبغة جرام وفحصت مجهرياً لتحديد الشكل العصوي وموقع السبور الداخلي من الخلية. (Baron واخرون، 2007).

أعتمد كشف تكوين حلقة الاندول كدلالة اولية نوعية على انتاج المواد الاندولية، حيث لقح وسط الاندول بالبكتريا وحضنت لمدة 48 ساعة ثم اضيف لها 10-5 قطرات من كاشف كوفاكس، يعد ظهور حلقة حمراء عند الطبقة العليا من الوسط دلالة على قدرة البكتريا في انتاج الاندول (Gordonº و Weber,1951).

قدر الاندول حامض الخليك كميا من 13 عزلة بكتيرية من الجنس *Bacillus* من خلال انتاجه واستخلاصه من وسط MS السائل. وقد لقح 5 مل من الوسط MS لكل عزلة وحضنت بدرجة 30مº لمدة 24 ،72،48 ساعة بالحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/ دقيقة، وأجريت عملية الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 10000 دورة/ دقيقة لأستخلاصه من الوسط الزرعي.

قدر الاندول حامض الخليك لونيا باستعمال كاشف سالكوزكي والذي حضر تبعا Arsalan Ashraf et. al.(2011) وذلك بمزج مل واحد من تركيز 0.5 مولاري لكلوريد الحديديك مع 49 مل من تركيز 35٪ حامض البريكلوريك. للكشف، اضيف 2 مل من الكاشف الى مل واحد من المستخلص المذكور آنفا وحضن بدرجة 25 مئوي لمدة نصف ساعة في الظلام، اجريت عملية التقدير اعتمادا على شدة اللون الوردي المتكون حيث قيست الامتصاصية الضوئية للتفاعل عند الطول الموجي 530 نانوميتر، أعتمد منحنى قياسي لتخافيف متسلسلة من الاندول حامض الخليك القياسي لتحديد المنتج البكتيري من الاندول حامض الخليك وتبعا لذلك انتخبت عزلتان بكتيريتان أعطت أعلى إنتاجية لاكمال التجارب اللاحقة (Glick و Lwin , ;2002,Patten واخرون، 2012).

تشخيص البكتريا بالطريقة الجزيئية

شخصت العزلات المنتخبة بالطرق الجزيئية حيث استخلص الحمض النووي باستعمال العدة الخاصة لاستخلاص الجينوم البكتيري، أستعمل جهاز مقياس

الطيف الضوئي النانوي (Thermo Scientific، 1000 Nano Drop ND) في تحديد تركيز ونقاوة الحمض النووي للعينات. أجري تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال اثنين من البواديء الخاصة بمضاعفة ما يقارب من 1500 قاعدة نووية للحامض النووي الرايبوسومي 16srRNA.

ولتحضير خليط تفاعل PCR ذي تركيز 1X مزج 3 ميكرومولار من MgCl2، 200 ميكرومولار من ثلاثي فوسفات ديوكسينوكليوزيد

Promega77 (Corporation ,Wisconsin)

شمل محلول التفاعل النهائي 0.5 ميكرومولار من البواديء (primer)، وحدة واحدة 1U من Taq DNA polymarase(Promega Corporation، Wisconsin) وأكمل الحجم النهائي الى 25 ميكرولتر ووضعت الانابيب في جهاز التضخيم (Analytic jena) وتسلسلت الخطوات لتعطى دورة واحدة بدرجة 94 م ولمدة 5 دقائق وثلاثون دورة بدرجة 55 م ولدقيقة واحدة ثم ترفع الى 72 م ولمدة دقائق و72 م كخطوة نهائية ولمدة 10 دقائق ولدورة واحدة .

أُجري الترحيل الكهربائي لناتج البلمرة وتحديد أطوال القطع المتكونة مقارنة مع الـ DNA القياسي لتحديد كفاءة ونجاح عملية البلمرة للقطعة المطلوبة من الـ DNA (Evans واخرون، 2005) . ولتحديد تتابعات القواعد النتروجينية الناتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل للبكتريا المستعملة في الدراسة، ارسل نموذج من الـ DNA المتضاعف بالبلمرة مع بواداه الخاصة الى شركة (Macrogen) الكورية لغرض إجراء الفحص ومعرفة التتابع الخاص للحامض النووي المنقوص الاوكسجين. ثم أجري تحليل التتابعات باستعمال الموقع العالمي للمركز الوطني لمعلومات التكنولوجية الحيوية (NCBI National Centre for Biotechnology Information) ضمن النافذة الفرعية Blast ثم النافذة الفرعية الثانوية Neucleotide blast، ورسمت شجرة التطور Phylogenetic tree باستعمال برنامج Mega 6 اعتماداً على تسلسل النيوكلوتيدات للعزلات العالمية المسجلة في بنك الجينات Gen Bang ضمن المنظمة العالمية NCBI.

تحديد الظروف المختبرية المثلى لإنتاج الأندول حامض الخليك

استعمل وسط MS السائل كوسط في إنتاج إندول حامض الخليك لاحتوائه على مصادر النتروجين والحامض الأميني التربتوفان الأساس الذي يمكن أن تقوم الأحياء المجهرية بإدخاله في مسارات أيضية لإنتاج IAA فضلاً عن وجود المصدر الكاربوني وهو الكلوكوز وإمكانية معرفة التركيز الأمثل من هذه المكونات للوصول الى أعلى إنتاج عبر إجراء بعض التحويرات على مكونات وتراكيز الوسط، كما وتدرس العوامل البيئية من درجة الحرارة، والدالة الحامضية والتهوية وتأثيرها على الانتاج المختبري .

تأثير تركيز المواد المغذية على الإنتاج

شملت التجارب تحديد الاحتياج للحامض الاميني التريبتوفان كعامل اساسي في البناء ونوع المصدر النتروجيني المعقد وتركيزه حيث حُضِّر وسط MS السائل الاساس بتراكيز مختلفة من التريبتوفان وكالتالي: (0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0) وضُبطت الدالة الحامضية على pH 7 وبعد تعقيم الوسط لُقح بالعزلات البكتيرية المنتخبة وحُضنت بدرجة حرارة 30 م° في حاضنة هزازة وبأوقات حضنٍ 72-48-24ساعة لمعرفة التركيز والوقت الأمثل الذي أعطى أعلى إنتاج كمي من اندول حامض الخليك بالاعتماد على المنحنى القياسي.

واستعملت المعقدات البروتينية البيبتون، التربتون، مستخلص الخميرة، كمصادر أكثر استخداماً وتوفراً وبتراكيز (0, 0.01, 0.04, 0.07, 0.1, 0.13,

0.16)غم/ 100مل (Sasirekha واخرون، 2012).

تأثير العوامل البيئية المختبرية على الإنتاج

حضر وسط MS السائل بتركيبة جديدة اعتمدت فيها التركيز الامثل من التريبتوفان ونوع وتركيز المصدر النتروجيني وعقم وزرع بالعزلات المنتخبة لتحضن المزارع في درجات حرارة مختلفة 25,30,35,40 مئوية لمعرفة تأثير درجات الحرارة على الإنتاج واختيار درجة الحرارة المثلى للإنتاج في غضون 24 ساعة (Sonali واخرون، 2018).

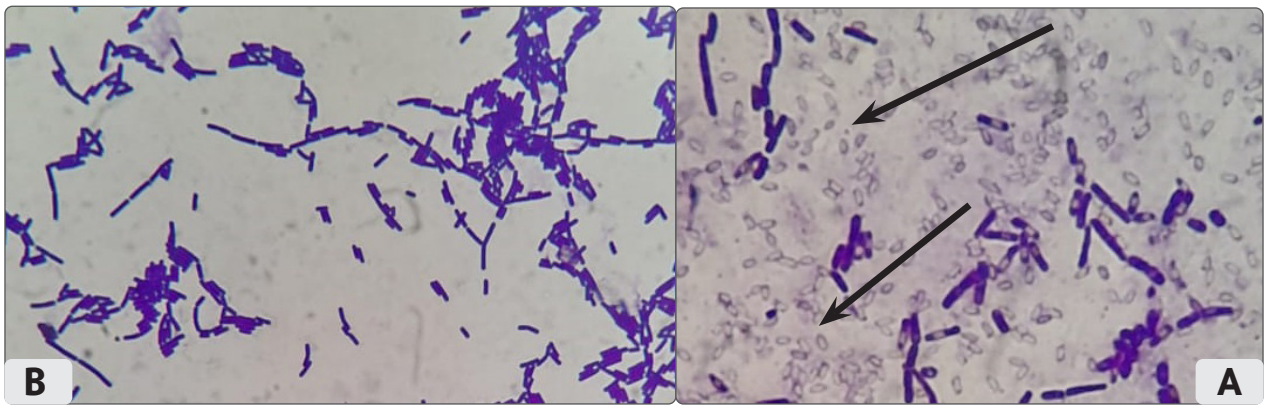
اعتمدت العوامل المثلى في تحضير الاوساط الانتاجية وبدالات هيدروجينية مختلفة 6,6.5,7,7.5,8 لتحديد الدالة الهيدروجينية المثلى للوسط وبدرجتي حرارة حضن شملت 25,40 مئوية لأنها أعطت أعلى إنتاج كمي وبالاعتماد على المنحنى القياسي لإندول حامض الخليك.(Patil,2011). كما درس تأثير عامل التهوية على الانتاج كخطوة اخيرة في تحديد العوامل، أستعملت دوارق مخروطية بسعة 500 مل حاوية على 100 مل من وسط الانتاج. وحضنت بشكلين الاول بحاضنة هزازة وبسرعة 120 دورة/ دقيقة والاخرى بحاضنة ثابتة.

التحليل الاحصائي Statistical Analysis

أستعمل البرنامج gen stat في التحليل الإحصائي لنتائج الدراسة الحالية، وذلك لمعرفة المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لتحليل التباين (الكروي والراوي، 2018).

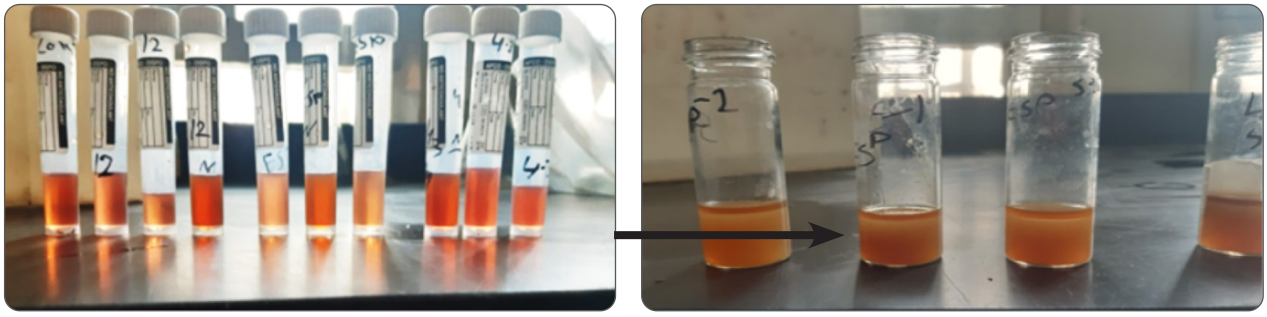
النتائج والمناقشة:

تم الحصول على 60 عزلة بكتيرية مختلفة الشكل المظهري في الوسط الصلب من نماذج التربة البالغ عددها 18 نموذجاً وجذور النباتات والبالغ عددها 12 نموذجا. ظهرت22عزلة بكتيرية بأشكال عصوية تحت المجهر وبشكل عصيات مفردة أو ثنائية موجبة لصبغة كرام، ويوضح الشكل (1) شكل الخلايا العصوي وموقع السبور تحت الطرفي وشكل السبور البيضوي للعزلات التي تم اختيارها للدراسة.



شكل(1) الشكل المجهري لخلايا بكتريا *Bacillus S4* المعزولة محليا باستعمال العدسة الزيتية 100x
A-الخلايا الخضرية للعزلة المحلية *Bacillus S4*, B-الخلايا مع السبورات الداخلية

وأوضح التحري النوعي عن تكوين حلقة الإندول باستعمال كاشف كوفاكس لـ (22) عزلة من العزلات البكتيرية انها كوّنت حلقة الإندول الحمراء بعد تفاعلها مع الكاشف، وأكد ظهور اللون الوردي- الأحمرعلى وجود اندول حامض الخليك، اللون كان ناتج عن تفاعل كاشف سالكوزكي مع المواد الاندولية المنتجة في وسط النمو ومنها الإندول حامض الخليك وكماهو واضح في الشكل(2).

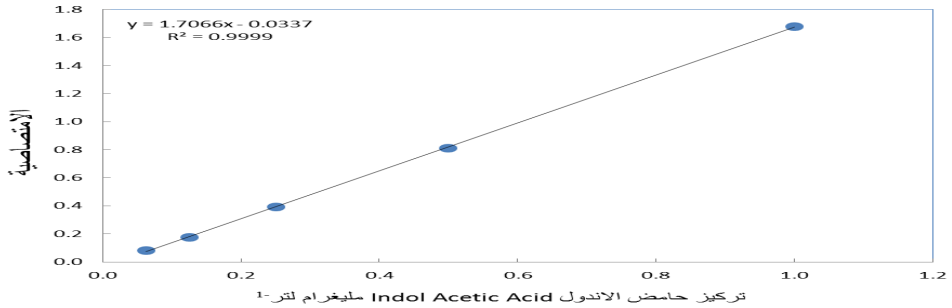


شكل (2) التحري النوعي لأنتاج الاندول حامض الخليك بأستعمال كاشف كوفاكس وكاشف سالكوزكي للعزلات البكتيرية المحلية تكون حلقة الإندول الحمراء بإضافة كاشف كوفاكس(اليمين)، التحري النوعي لإنتاج الإندول حامض الخليك باضافة كاشف سالكوزكي (اليسار).

وكان عدد العزلات المنتجة للإندول 22عزلة بكتيرية من نماذج الترب أي بنسبة 66٪ ، و10 عزلات بكتيرية من نماذج الجذورأي بنسبة 83٪ من النماذج (جدول 1) وإن الإنتاج مختلف بين العزلات البكتيرية بدليل اختلاف شدة اللون الوردي من الباهت إلى اللون الوردي الغامق وحددت التراكيز المنتجة اعتماداً على المنحنى القياسي شكل (3) والذي اوضح أن أعلى إنتاجية لثلاثة عشر عزلة بكتيرية جدول (2).

جدول (1) اماكن جمع ونوع نماذج العينات للعزلات المنتجة لاندول حامض الخليك

رقم النموذج	منطقة جمع النموذج	نوع النموذج
1	بغداد	جذور خيار
2	بغداد	جذور حنطة
3	اربيل	تربة
4	بغداد	جذور شعير
5	اربيل	تربة
6	كركوك	تربة
7	بغداد	جذور لوبيا
8	بغداد	جذور طماطة
9	واسط	تربة
10	كركوك	جذور لوبيا
11	الانبار	تربة
12	كركوك	تربة
13	اربيل	تربة
14	الانبار	تربة
15	اربيل	تربة
16	الانبار	جذور لوبيا
17	الانبار	جذور طماطة
18	الانبار	جذور خيار
19	بغداد	تربة
20	واسط	جذور طماطة
21	اربيل	تربة
22	بغداد	تربة



شكل (3) المنحني القياسي لحامض الإندول Indol Acetic Acid

الخط المستقيم (Liner equation) من الدرجةالأولى (y=1.7066X – 0.0337) وكانت قيمة ميل الخط المستقيم (slope) لهذه العلاقة هي (1.7066) وقيمة القاطع (0.0337–) (intercept) أما قيمة معامل التحديد (Determination coefficient) فهي (R^2 = 0.9999).

اكدت النتائج ان أفضل العزلات انتاجاً *Bacillus* 4 *spp* S والمعزولة من جذور الشعير المزروع شمالي بغداد منطقة التاجي و*B. thuringiensis kurstaki* اعطت اعلى انتاجية وكانت 3.19 و3.39 ملغم لتر$^{-1}$ في 24 ساعة فقط تليهاالعزلة *Bacillus spp.12* المعزولة من تربة من كركوك والعزلة *Bacillus spp.8* المعزولة من جذور الطماطة من محافظة بغداد بتركيز وصل الى 2.88 و2.71 ملغم لتر$^{-1}$. كما نلاحظ من الجدول ان العزلة *Bacillus 5.3* والعزلة *Bacillus 3.5* قد أعطت أعلى إنتاج لها من الحامض في 72 ساعة وكما هو واضح في جدول 2 وذلك لاختلاف الأنواع البكتيرية في إنتاجها للإندول حامض الخليك وهذا يتوافق مع (Shokri وEmtiazi, 2010) إذ توصلوا إلى أن 72 ساعة هو الوقت الأمثل لإنتاج إندول حامض الخليك لبعض أنواع البكتريا حرة المعيشة.

جدول (2) إنتاج الإندول حامض الخليك كمياً من عـــزلات *Bacillus spp.* في أوقات حضن مختلفة

اسم العزلة	وقت التحضين (ساعة)		
	24	48	72
	معدل التركيز (ملغرام لتر$^{-1}$)		
*Bacillus*13	2.55	2.11	0.81
B. thuringiensis kurstaki	3.39	3.05	2.25
*Bacillus*8	0.271	0.128	1.70
4 *Bacillus*	2.01	1.93	1.97
Bacillus3	0.51	0.61	1.18
Bacillus S4	3.19	3.03	3.10
Bacillus2	2.22	1.12	1.28
Bacillus 5	1.35	1.26	2.25
Bacillus9	1.76	1.83	1.94
Bacillus 6	1.50	1.02	1.05
Bacillus1	1.28	1.20	1.28
Bacillus7	1.01	1.11	0.97
Bacillus12	2.88	1.67	1.81

ظروف الإنتاج: درجة الحرارة:30 – تركيز التربتوفان 0.1 غم / 100 مل – سرعة الهزاز 120 دورة/ دقيقة

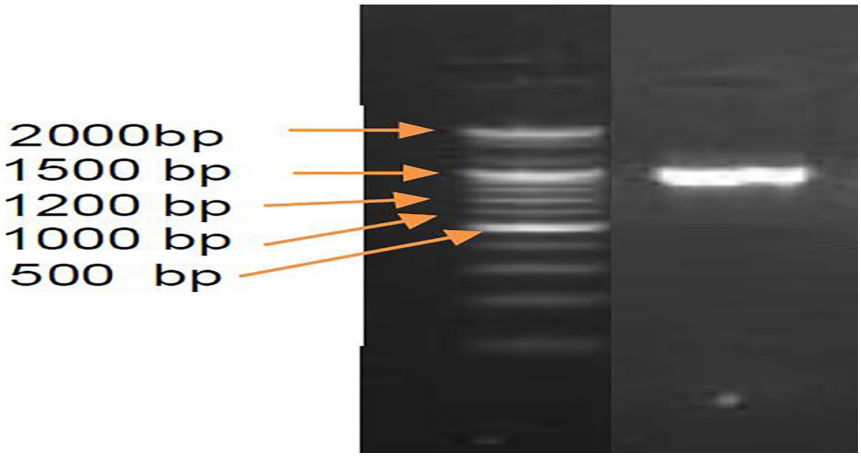
وجد ان الإنتاج يتناقص مع زيادة وقت تحضين المزروع البكتيري ولاغلب العزلات قيد الاختبار وقد يعود هذا الشيء إلى نفاذ اغلب التربتوفان المستعمل في التجربة والذي تعتمدها البكتريا كمسار لها في إنتاج إندول حامض الخليك، وإن التباين في التراكيز المنتجة من الإندول قد يعود إلى اختلاف قدرات هذه العزلات البكتيرية في التمثيل الحيوي للتربتوفان في عملية إنتاج هذا الحامض، كما أن من بين أسباب تناقص الإنتاج بمرورالوقت هو إنتاج إنزيمات قد تؤدي إلى تكسير IAA(مثل إنزيم peroxidase وانزيمIAA Oxidase) (Arora واخرون 2015b)كما ذكر(Johan ,.. 2005) إن بقاء البكتريا في الوسط الزرعي بعد 72 ساعة أدى إلى تحلل 25 ٪ من الإندول المنتج ألى مركبات أخرى ووجد ارتباطاً معنوياً بين كتلة الأحياء المجهرية في الوسط بعد 72 ساعة وكمية الإندول المحللة إن الاختلاف في كمية الإندول المنتج من قبل العزلات المستعملة يتفق مع ما توصل اليه (Shinoواخرون، 2002) في حين أكد (الكبيسي واخرون، 2010) أنه استعمل ثلاث عزلات فقط من 106 عزلة حصل عليها من التربة كانت منتجة للإندول، في حين أشار (Erum و 2008، Bano) إلى أن سبب الاختلاف في كمية إنتاج إندول حامض الخليك سواء زيادة أو نقصان ومن عزلة إلى أخرى قد يعود إلى التباين الوراثي في العزلات البكتيرية ومصدر هذا التباين هو اختلاف المنطقة الجغرافية، أما (Sahasradbudhe 2011) فذكر أن سبب الاختلاف بين العزلات في الإنتاج هو نوع النبات الذي عُزِلَ منه والمنطقة الجغرافية.

والنتائج التي ذُكرت أعلاه تتفق مع ماذكره (Shabana و Ambreen, 2019وآخرون، 2015)) أن من بين مجموعة من أنواع البكتريا الداخلية اظهرت *Bacillus subtilis* أعلى قدرة إنتاج لإندول حامض الخليك وان 24 ساعة هو الوقت الأمثل لإنتاج إندول حامض الخليك والذي يتناقص تدريجيا مع مرورالوقت.

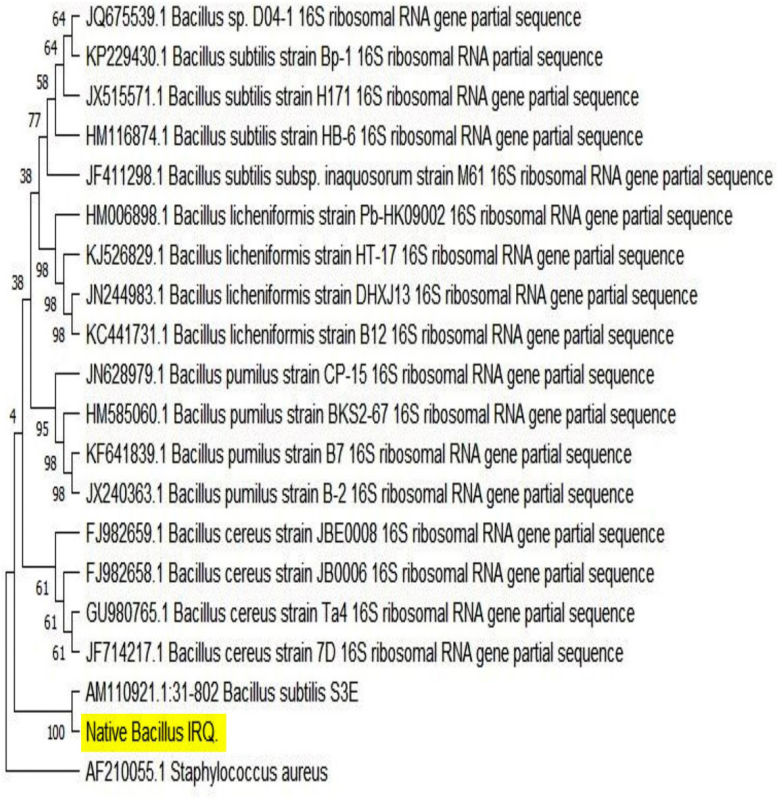
نظراً لأعلى إنتاج من الاندول حامض الخليك أنتخبت كلٌّ من العزلة *Bacillus S*4 والعزلة *B.thuringiensis kurstaki*, لدراسة الظروف المختبرية المثلى للإنتاج حيث تعتبر العزلة الاولى محلية ومقارنتها مع العزلة *B.thuringiensis kurstaki* التي نقيت من مبيد حشري مستورد (اسباني).

شخصت العزلة المحلية جزيئياً باعتماد جزيء الوراثي الرايبوسومي 16srRNAحيث أُجريت عملية مضاعفة الـ DNA باستعمال تقنية PCR ويوضح الشكل (4) الحزمة المعنية المتضاعفة. وأكدت دراسة نتائج تحليل التتابعات للحزمة المعنية والمرسلة من الشركة الكورية أن التتابعاتت طابقت وبنسبة 96.43٪ مع العزلة العالمية *Bacillus subtilius* strain s3e العالمية ذات رقم الدخول jx274662.

رُسمت الشجرة التطورية Phylogenetic tree لتوضيح صلة القرابة الوراثية بين العزلات مع عزلات عالمية كما موضح في الشكل (5) وأن العزلات توزعت في عقدتيْن (node) رئيسيتَيْن شملت العقدة الأولى عدد من عزلات *B. subtilis* وتضمنت العقدة الثانية عدد من عزلات*B. Pumilus* كما لوحظ تباعد العزلة المحلية قيد التشخيص عن عدد من عزلات *B.cereus* التي غالباً ما تسبب التسمم الغذائي.



شكل (4) عملية تضاعف الدنا باستعمال تقنية PCR
1= المعلم القياسي marker ladder (2000-500 bp) **الفولتية= 80 فولت لمدة 40 دقيقة**
L=**نموذج بلمرة** DNA **عزلة *B.subtilis*** : **تركيز الاكاروز:** 1.5٪



شكل (5) الشجرة التطورية Phylogenetic tree لتوضيح صلة القرابة الوراثية بين العزلات

بينت النتائج المعروضة في الجدول (3) والمتضمنة تأثير التريبتوفان الايجابي على إنتاج إندول حامض الخليك حيث سجل تركيز 0.59 مليغرام لتر$^{-1}$ من العزلة *B.subtilis S4* في ظل غياب التربتوفان ، ويزداد الأنتاج مع زيادة تركيز التربتوفان لغاية التركيز 0.8 مليغرام لتر$^{-1}$ ولكلا العزلتين *B.subtilis S4*

و *B. thuringiensis kurstaki*' إذ بلغ (8.970 و7.710) مليغرام لتر$^{-1}$ وفي التركيز 0.2 من التربتوفان نلاحظ أن أعلى تركيز كان 6.160 ملغم / لتر $^{-1}$ للعزلة المحلية *B.subtilis* وكان في الأربع والعشرين ساعة واقل انتاج 02.68 ملغم/ لتر $^{-1}$ للعزلة *B. thuringiensis* عند 72 ساعة، أما عند التركيز 0.4 غم / 100 مل فكان اعلى انتاج هو 6.510 ملغرام لتر $^{-1}$ وللعزلة المحلية *B.subtilis S4* في الأربع والعشرين ساعة الأولى أيضا وأقل إنتاج هو3.130 ملغم/ لتر $^{-1}$ عند 72 ساعة أوتستمر زيادة الانتاج بزيادة التركيز 'إذ كانت أعلى إنتاجية عند التركيز 0.6 غم/ 100 مل هو 7.100 مليغرام لتر $^{-1}$ وأقل إنتاج هو 4.420 ملغرام لتر $^{-1}$ وأعلى انتاج من الإندول حامض الخليك كان عند التركيز 0.8 غم/ 100مل وبلغ 8.970 ملغرام لتر $^{-1}$ وأقل إنتاجية 3.910 عند 72 ساعة مما يؤكد التجربة الأولى أن افضل إنتاجية كانت عند 24 ساعة، كما يؤكد انه كلما زاد تركيز التربتوفان زادت الإنتاجية ولحد معين. إن زيادة إنتاج أندول حامض الخليك بزيادة تركيز التربتوفان قد يعود لكون البكتريا استعملت المسار الذي يعتمد على التمثيل الحيوي للتربتوفان في عملية إنتاج الإندول وان الزيادة في إنتاج الاندول مع زيادة تركيز الحامض تدريجياً يتفق مع أشارة (Shameer و Prasad ، 2018) بكون الزيادة في إنتاج الإندول تحدث كلما زاد تركيز الحامض الأميني التربتوفان الذي يعّد المصدر الاساس لإنتاج حامض الإندول (Gusmiaty و اخرون، 2019)، أما عملية إنتاج الاندول في ظل غياب التربتوفان فقد يعود إلى أن البكتريا استعملت المسار الثاني الذي لا يعتمد على التربتوفان بصورة مباشرة في عملية إنتاج الإندول أو أن وسط النمو حاوٍ على التريبتوفان في مصدره النيتروجيني قامت البكتريا باستعماله ما أدى الى تكون الحامض ولو بنسبةٍ قليلة جداً وهذا يشابه الذي يحدث في النباتات، حيث لها القابلية على إفراز التربتوفان في منطقة الجذور والتي تستعملها البكتيريا الجذرية كمقدمة لعملية التخليق الحيوي لاندول حامض الخليك (Shameer,2018 (Yadav واخرون، 2015).

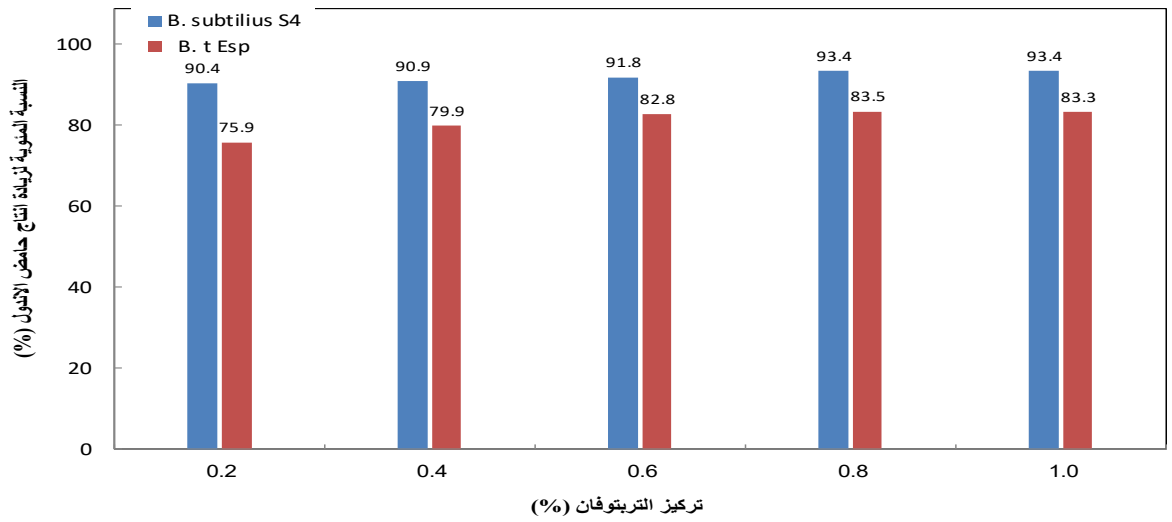
جدول 3 تأثير تراكيز مختلفة من التربتوفان على إنتاج الإندول حامض الخليك من العزلة المحلية *Bacillus subtilis* والعزلة *B. thuringiensis kurstaki* تحت ظروف الإنتاج المختبري

العزلات A	ساعات التحضين C (يوم)	B تراكيز التربتوفان (غم $^{-1}$100)					
		0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Bacillus subtilis S4	24	x 0.590	g 6.160	e 6.510	v 7.100	a 8.970	a 8.894
	48	w 1.190	p 3.790	n 4.280	4.420 m	e 6.470	e 6.530
	72	x 0.670	r 3.490	s 3.130	j 5.130	h 5.480	h 5.483
Bacillus *thuringiensis kurstaki* Esp.	24	w 1.270	i 5.280	6.330 f	7.390 c	7.710 b	7.620 b
	48	v 1.700	t 2.810	3.660 q	4.840 kl	5.270 i	4.940 k
	72	w 1.290	u2680.	4.740 i	5.490 h	3.910 o	5.480 h
معدل تركيز التربتوفان		f 1.181.	e 4.035	4.775 d	5.746 c	6.301 b	6.498 a

المعدلات التي تحمل حروفا متشابهة للعوامل الرئيسية وتداخلاتها ضمن الصفة الواحدة لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار دنكن متعدد الحدود وعلى مستوى احتمال 5٪.

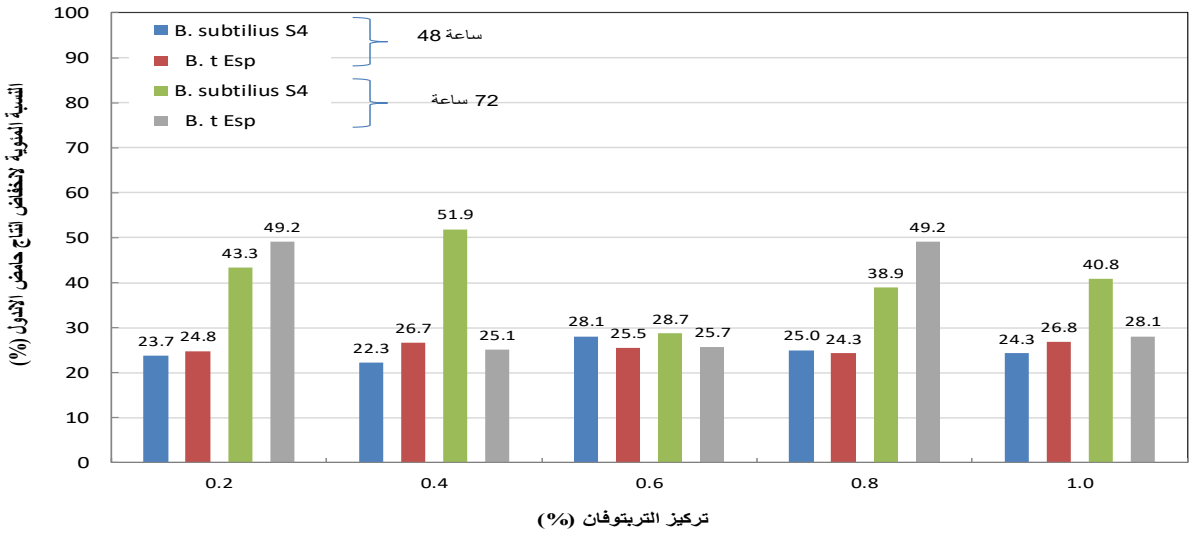
قد يعود انخفاض إنتاج اندول حامض الخليك عند زيادة تركيز التربتوفان لأكثر من 1غم / لعدم قدرة البكتريا على استهلاك التربتوفان لزيادته عن حاجتها الغذائية أو للتأثير العكسي للحامض الأميني لعملية الانتاج كونه يصبح ساما لها وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Shilts واخرون، 2005) من أن التركيز العالي للتربتوفان لايزيد من إنتاج إندول حامض الخليك.

ويوضح الشكل (6) زيادة او انخفاض النسب المئوية للانتاج حيث تزداد بنسبة 90.4٪ خلال فترة 24 ساعة عند التركيز 0.2 من التربتوفان للعزلةا لمحلية *B. subtilis* ووصلت أعلى نسبة عند التركيز 0.8 إذ بلغت 93.4٪ واستمرت عند التركيز 1غم/ 100 مل وعند تساوي كمية الإنتاج يأخذ التركيز الأقل والأكثر جدوى اقتصادياً في التجارب اللاحقة، أما فيما يخص العزلة (*B.thuringiensis*) فقد كانت نسبة الزيادة عند تركيز (0.2٪) من التربتوفان 75.9 ٪ وكانت أعلى زيادة عند التركيز 0.8 تربتوفان وبلغت 83.5٪ ثم بدأت في الانخفاض.



شكل (6) النسبة المئوية لزيادة إنتاج الإندول حامض الخليك (٪) بمدة حضن 24 ساعة لعزلتي بكتريا (*B. subtilis*) و (*B. thuringiensis kurstaki*) تركيز التربتوفان غم٪

ويبين الشكل (7) أن نسبةإ نتاج الإندول المئوية قد انخفضت في 48 و 72 ساعة ولكلا العزلتين ولجميع التراكيز المستعملة في التجربة وأن نسبة الانخفاض تتراوح بين (22.3- 28.1٪) في الثماني واربعين ساعة بالنسبة للعزلة المحلية (*B. subtilis S4*) في حين تراوحت النسبة المئوية للانخفاض في إنتاج الإندول في 72 ساعة للعزلة التجارية *B. t* قد تراوحت بين (25.1- 49.2٪)، وهذا يعطي دليلاً كافياً على تبني مدة حضن 24 ساعة مقارنة مع (48 و 72 ساعة).



شكل (7) النسبة المئوية لانخفاض انتاج حامض الاندول (٪) غم بمدة حضن 72 , 48 ساعة مقارنة مع 24 ساعة وبوجود تراكيز مختلفة من التربتوفان لعزلتي بكتريا *(B. subtilis S4)* و *(B. t kurstaki)*.

اما الجدول (4) فيوضح العلاقات والقوانين الرياضية، ويفسر سلوك التفاعل أنه كلما كانت قيمة معامل التحديد (R2) مرتفعة وباستعمال معادلة الخط المستقيم (Linear equation) كلما كانت الإنتاجية أعلى بدلالة قيمة الميل وقيمة القاطع ' فيتضح لنا أن 24 ساعة هي المدة الأفضل في عملية الإنتاج لاندول حامض الخليك وللعزلتين كليهما وموضحاً اختلاف قيم المعايير (parameters) المرتبطة بها ومنها قيم الميل (Slope) وقيم القاطع (Inter cept) وقيم معامل التحديد (R2) لكل انحدار خطي.

جدول (4) المعادلات الرياضية لوصف سلوك العزلات البكتيرية (*B.subtilis* و *B. thuringiensis*) في إنتاجية اندول حامض الخليك.

اسم العزلة	مدة الحضن (ساعة)	معادلة الخط المستقيم (Linear equation)	قيمة الميل (Slope)	قيمة القاطع (Intercept)	قيمة معامل التحديد (R^2)
B.subtilis	24	y = 0.4030x + 0.5144	0.4030	0.5144	0.9107
	48	y = 0.3835x + 0.2793	0.3835	0.2793	0.8651
	72	y = 0.2985x + 0.2717	0.2985	0.2717	0.7264
B. thuringiensis	24	y = 0.3025x + 0.5049	0.3025	0.5049	0.8431
	48	y = 0.2945x + 0.2535	0.2945	0.2535	0.8065
	72	y = 0.2385x + 0.3029	0.2385	0.3029	0.4027

أظهرت التحاليل الإحصائية في الجدول (5) وجود فروقات معنوية بإنتاج الإندول حامض الخليك مع اختلاف المصدر النتروجيني، وأن الاندول المنتج من العزلتين *B.subtilis* و *B.thuringiensis* بوجود التربتون قد أعطى فرقاً معنوياً مقارنة مع مستخلص الخميرة و البيبتون 'إذ سجل معدل إنتاج 8.155 مليغرام لتر$^{-1}$ في حين كان معدل الإنتاج 6.185، 4.870 مليغرام لتر$^{-1}$ لكلٍ من مستخلص الخميرة و البيبتون على التوالي. وتفوقت العزلة المحلية *B.subtilis* في معدل الإنتاج وبفرقٍ معنوي عن العزلة *B.thuringiensis*'إذ اعطت تركيزاً بلغ 6.457 مليغرام لتر$^{-1}$. في حين كان تركيز العزلة*B.t*.6.350 مليغرام لتر$^{-1}$.أما على مستوى التداخل بين المعاملات فإن العزلة *B.subtilis* مع التربتون قد أعطت أعلى إنتاجية وبفرقٍ معنوي عن بقية المعاملات 'وبلغت الإنتاجية 8.690 مليغرام لتر$^{-1}$بينما أقل إنتاجية فكانت مع البيتون للعزلة المحلية *B.subtilis* S4 S4 وبلغت 4.560 مليغرام لتر$^{-1}$. وعند مقارنة نتيجة المصدر النتروجيني التربتون نجد ان العزلة المحلية أعطت إنتاجية بلغت 8.690 مليغرام لتر$^{-1}$أما العزلة *B.thuringiensis* فقد أعطت 7.620 مليغرام لتر$^{-1}$، في حين اعطى البيتون للعزلة *B.subtilis* معدل إنتاج بلغ 4.560 مليغرام لتر$^{-1}$ ، بينما كان معدل إنتاج العزلة *B.thuringiensis* 5.180 مليغرام لتر$^{-1}$. وعند مقارنة النتيجة بين العزلتين مع المصدر النتروجيني مستخلص الخميرة كان معدل الانتاج للعزلة المحلية 6.120 مليغرام لتر$^{-1}$ وللعزلة قيد البحث 6.250 مليغرام لتر$^{-1}$.

كما وجد اختلاف في التراكيز المنتجة من الاندول حامض الخليك مع التراكيز المضافة من التريبتون للوسط الزرعي وتشير النتائج على مستوى التداخل بين المعاملات فان العزلة المحلية *B. subtilis* و وبتركيز 0.01 غم / 100 ملغرام من التر بتون أعطت أعلى إنتاجية وبفرق معنوي عن بقية المعاملات وبلغت الانتاجية 9.830 مليغراملتر$^{-1}$ أما أقل إنتاجية من إندول حامض الخليك فكانت للعزلة *B. thuringiensis* عند تركيز 0.14غم / 100 مل وبلغ 7.910 مليغراملتر$^{-1}$ ولوحظ انه كلما زاد تركيز التربتون انخفضت إنتاجية الإندول حامض الخليك لكلا العزلتين كما هو نلاحظ جدول 5.

تشير هذه النتائج إلى تفوق التربتون وبتركيز 0.01٪ على بقية المصادر وهو ما أشار اليه (الكاتب، واخرون 2017) كون التربتون عبارة عن مجموعة من الأحماض الأمينية ومن ضمنها التربتوفان المادة الاساس في تصنيع الاتدولات وان زيادة تراكيز التربتون قد أدى إلى إنخفاض إنتاج إندول حامض الخليك كون استهلاك وتمثيل التربتون بكميات عالية من قبل البكتريا قد يؤدي الى تاثير عكسي على أطوار نمو البكتريا وبالتالي قلة الانتاج، من ناحية أخرى ان تمثيل التربتون واستهلاكه من قبل البكتريا يؤدي الى تكون التربتوفان كونه احد الاحماض الامينية الرئيسة المكونة للتربتون او من نتائج تمثيله حيوياً وبالتالي زيادة تركيزه ومن ثم انخفاض عملية الانتاج وذلك اكدته التجارب السابقة من انخفاض انتاج الاندول عند زيادة تركيز التربتوفان لاكثر من 1غم لكل 100 مل. وتوصل (سليمان واروى شوكت، 2019) و (Suliasih و Widawati ,2020) أيضا الى النتيجة نفسها كون التربتون أعطى أعلى إنتاجية عند استعماله مصدراً نتروجينياً.

جدول (5) تأثير تراكيز مختلفة من التربتون Trypton عليإنتاجية إندول حامض الخليكمن قبل عزلتين بكتيريتين *B. subtilis S4* و *B. t.* عند مدة حضن 24 ساعة وفي درجة حرارة حضن 30 م°.

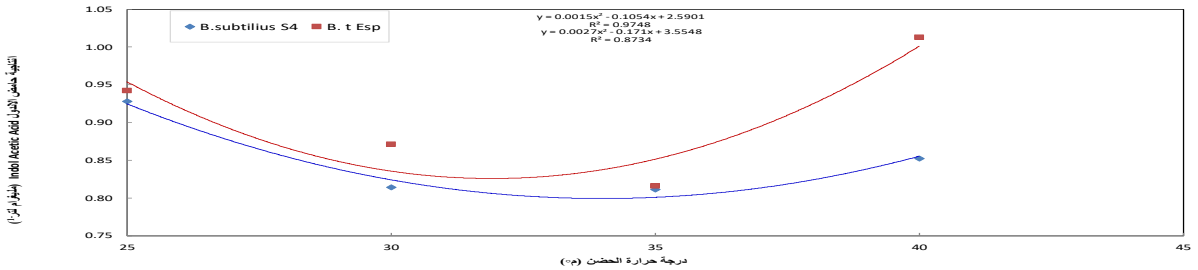
العزلات	تركيز الـ Trypton (غم / 100مل)						المعدل
	0.01	0.04	0.07	0.1	0.13	0.14	
B. subtilis	**a** 9.830	**c** 9.180	**c** 9.090	**d** 8.780	**d** 8.720	**e** 8.430	**a** 9.005
B. thuringiensis	**b** 9.560	**d** 8.820	**e** 8.490	**e** 8.410	**f** 8.130	**g** 7.910	**b** 8.553
المعدل	**a** 9.695	**b** 9.000	**c** 8.790	**d** 8.595	**e** 8.425	**f** 8.170	
المعدلات التي تحمل حروفاً متشابهة للعوامل الرئيسية وتداخلاتها ضمن الصفة الواحدة لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب إختبار دنكن متعدد الحدود وعلى مستوى احتمال 5٪.							

بينت النتائج في الجدول (6) الى تأثير درجة الحرارة على انتاج الاندول حامض الخليك حيث تفوقت درجة حرارة 25 سليزي معنوياً عن معدلات درجات الحرارة الاخرى، وقد كان معدل تركيز الإندول المنتج 9.328 مليغراملتر$^{-1}$، وتفوقت العزلة المحلية *Bacillus subtilis S4* بأنتاج بلغ9.647 مليغرام لتر$^{-}$ على *B. thuringiensis kurstaki* بأنتاجها 9.010مليغراملتر$^{-1}$ عند درجة حرارة 25 مئوي ' في حين تفوقت العزلة *B. thuringiensis kurstaki* عند درجة حرارة 40 سليزي وبتركيز بلغ9.413 مليغراملتر$^{-1}$ مقارنة مع تركيز 8.140 مليغراملتر$^{-1}$ من العزلة المحلية. قد يعود التباين في إنتاج الإندول حامض الخليك في درجات حرارة المختلفة الى سلوك البكتريا في التفاعل الحاصل مع مكونات الوسط ودرجات الحرارة، فضلاً عن الخصائص الوراثية لكل عزلة بكتيرية وهذا يتفق مع ما أشار اليه (Shabana و, Ambreen2019) كون البكتريا *Bacillus subtilIs* تنتج الأندول حامض الخليك عند درجة حرارة 25 مئوية أما (Apine و,Jadhav2011) فقد توصلوا إلى أن درجة الحرارة 30 م° أعطت أعلى إنتاجية من إندول حامض الخليك من قبل العزلة *Pantoea agglomer rans* PVM ، بينما وجد (Prashanthو,Mathivanam2010) أن درجة الحرارة 37 م° أعطت أعلى إنتاجية لبكتريا *Bacillus licheniformis*.

جدول.(6) تأثير درجات حرارة الحضن المختلفة على انتاج عزلتي لبكتريا *B. subtilis* و *B. t* من حامض الإندول أستيك أسد مليغراملتر$^{-1}$.

العزلات	درجات حرارة الحضن c°				المعدل
	25	30	35	40	
B. subtilis	**a** 9.647	**cd** 8.070	**cd** 8.170	**cd** 8.140	**b** 8.506
B. thuringiensis	**b** 9.010	**c** 8.410	**d** 7.440	**a** 9.413	**a** 8.568
المعدل	**a** 9.328	**b** 8.240	**b** 7.805	**b** 8.777	
المعدلات التي تحمل حروفا متشابهة للعوامل الرئيسية وتداخلاتها ضمن الصفة الواحدة لاتختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار دنكن متعدد الحدود وعلى مستوى احتمال 5٪.					

ويوضح الشكل (8) أن هناك أكثر من طور في سلوك التفاعل، إذ إن أعلى إنتاجية للعزلة *B. subtilis* كان عند درجة حرارة 25 م° ثم تنخفض عند بقية درجات الحرارة المستعملة في التجربة، أما العزلة *B. thuringiensis* فبدأت الانتاجية عند 25 م° ثم انخفضت إلى حد معين، بعدها يزداد الإنتاج أي أن سلوك الإنتاج ليس خطياً وهذا ما تبين عند تطبيق معادلة متعددة الحدود من الرتبة الثانية لوصف سلوك التفاعل، كما نلاحظ أن من خصائص البكتريا *B. thuringiensis* هو ازدياد الإنتاج عند درجة 40م° وتكون أقل عند بقية درجات الحرارة المستعملة في التجربة.



شكل (8) تأثير درجات حرارة مختلفة (25 و 30 و 35 و 40 c) في إنتاجية اندول حامض الخليك مليغرامل⁻¹ من قبل عزلتين بكتيريتين *B.subtilis* و*B. thuringiensis kurstaki* عند مدة حضن (24 ساعة)، بتطبيق معادلة متعددة الحدود (Polynomial equation) من الرتبةالثانية لوصف سلوك التفاعل.

ويلاحظ عند دراسة التداخل الثلاثي بين العزلات ودرجة التحضين ودرجة الحامضية، تفوق معنوي لمعدل الاندول حامض الخليك للعزلة *B. subtilis* تحت درجة تحضين 25 م° وعند درجة حامضية 7.5 والتي بلغت 9.757 ملغم لتر⁻¹ مقارنة بالعزلة *B.t. kurstaki* ولكلا درجتي التحضين ودرجات الحامضية. ويبين الجدول(7) إن أعلى معدل انتاج لبكتريا *B. thuringiensis* عند الدالة الحامضية 8 ودرجة 40 مئوي وبلغ 9.200 مليغرام لتر⁻¹. أما أقل إنتاجية سجلت لبكتريا *B. subtilis* S4 عند 25 م فكانت عند الدالة الحامضية 6 حيث كانت 6.130 ملغم لتر⁻¹ مقارنة مع أقل معدل للإنتاج عند الدالة الحامضية 6 ودرجة حضن 40 م لبكتريا *B. thuringiensis* وبواقع انتاج بلغ 6.850 ملغم لتر⁻¹. كما بينت النتائج عدم وجود اختلاف معنوي بين العزلتين في انتاجها للاندول حامض الخليك، أما التداخل بين درجات الحامضية والعزلات فيلاحظ تفوق العزلة المحلية *B. subtilis* على العزلة *B. thuringiensis* عند درجة الحامضية 7.5 في محتواها من الـ IAA على جميع التداخلات ، إذ كانت 9.005 ملغم لتر⁻¹. وأثر التداخل بين درجة حرارة التحضين ودرجة الحامضية على المحتوى من الـ IAA ، ويلاحظ التفاوت في المحتوى بتأثير درجة التحضين إذ سَبَّبَ التحضين بدرجة الحرارة 25 م° عند درجة الحامضية 7.5 أعلى محتوى للـ IAA بلغت 9.057 ملغم لتر⁻¹ مقارنة بجميع التداخلات، في حين لم يختلف المحتوى عند درجة الحامضية 6.5 و 7.0 ولكلا درجتي التحضين وكذلك لم يختلف عند درجة الحامضية 7.0 لدرجة الحرارة 25 م° ودرجة الحامضية

8.0 لدرجة الحرارة40 م° .

قد تعادل الدالة الحامضية للوسط الزرعي 7.5 و8 حموضة الوسط بعد أنتاج الأندول حامض الخليك وبالتالي تعمل البكتريا على الإستمرار في الإنتاج وزيادته (Sadhana وآخرون2017). كما قد يعود تأزر حامضية الوسط قبل وبعد الأنتاج الى أنخفاض تركيز الاندول حامض الخليك مما يؤدي إلى التأثير على الفعاليات الحيوية للعزلات البكتيرية ' فضلاً عن التأثير السلبي على نشاط وفعالية وثبات الأنزيم المسؤول عن الأنتاج في مثل هذه الظروف وانخفاض ذوبان التربتوفان في وسط الانتاج (Sodikواخرون ,2018, .Naeima 2018).

تتفق النتائج مع ما توصل اليه الباحثون من أختلاف درجات الحموضة المثلى بين الانواع البكتيرية لأنتاج الاندول حامض الخليك حيث تنتج العزلة *Streptomyces viridis CMU-H009* تركيز لها عند الدالة (7)، وذكر (Mohite, 2013) أن أقل إنتاجية للإندول كانت عند الدالة (6) أما أعلى إنتاجية فكانت عند الدالة (8) للأنواع (*Lactobacillus casei Bacillu* *subtilius* ,Bacillus*megaterium*).

جدول.(7) تأثير درجة حامضية الوسط PH ودرجة حرارة الحضن 30م°
في قدرة العزلتين *B.subtilis*و *B. thuringiensis kurstaki* في إنتاج اندول حامض الخليك ملغرام لتر$^{-1}$.

العزلات	درجة حرارة الحضن (c°)	درجة الحامضية (PH)					كمية IAA المنتجة / ملغم / لتر
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	
B.subtilis	25	6.130 o	8.080 e	8.480 e	9.757 a	8.740 c	
	40	6.113 o	8.280 gh	8.090 ij	8.253 gh	7.490 k	
B. thuringiensis	25	6.250 m	7.300 l	8.193 hi	8.357 fg	8.443 ef	
	40	6.850 m	8.073 j	gh 8.293	8.597 d	9.200 b	
معدل الانتاج		e 6.336	d 7.933	c 8.264	a 8.741	b 8.468	

درجة الحامضية * درجة حرارة الحضن						معدل الانتاج
25	6.190 h	f 7.690	d 8.337	a 9.057	b 8.592	a 7.973
40	6.482 g	0.8177 e	8.192 e	8.425 c	8.345 d	b 7.924

درجة الحامضية * العزلات						
B.subtilis	i 6.122	8.180 ef	8.285 d	9.005 a	8.115 f	الانتاج
B. thuringiensis	6.550 h	7.687 g	8.243 de	8.477 c	8.822 b	

العزلات * درجة حرارة الحضن		معدل الانتاج
العزلات	درجة حرارة التحضين (c°)	
	25	40
B.subtilis	a 8.237	c 7.645	a 7.941
B. thuringiensis	709.b7	a 8.203	a 7.956

المعدلات التي تحمل حروفا متشابهة للعوامل الرئيسية وتداخلاتها الثنائية والثلاثية لا تختلف عن بعضها معنويا وحسب اختبار دنكن متعدد الحدود وعلى مستوى احتمال 5٪.

تشير النتائج في الجدول (8) إلى أن الـ IAA المستخلص من العزلتين *B. t.* و*B. subtilis* مع التهوية قد أعطى فرقاً معنوياً عنهما بدون عامل التهوية، إذ أعطى معدل انتاج بلغ 9.340 مليغرام لتر$^{-1}$ في حين كان معدل الإنتاج بدون تهوية 4.710 مليغرام لتر$^{-1}$. وتفوقت العزلةالمحلية *B. Subtilis* على العزلة B. t. مع التهوية إذأعطت فرقاً معنوياً عنهما بدون عامل التهوية .وكان معدل الإنتاج للعزلتان قد بلغ 9.255 مليغرام لتر$^{-1}$ في حين كان معدل الإنتاج بدون تهوية 4.585 مليغرام لتر$^{-1}$، وتفوقت العزلة المحلية في الانتاج وبفرقٍ معنوي عن العزلة *B. t.*إذ أعطت معدل إنتاج بلغ7.025 مليغراملتر$^{-1}$. في حين كان معدل الإنتاج للعزلة *B. t.*6.815 مليغراملتر$^{-1}$، العزلة *B. subtilis* تفوقت من حيث الانتاج في الظروف الهوائية واللاهوائية على العزلة *B. t* حيث بلغ الانتاج في الظروف الهوائية 9.340مليغرام لتر$^{-1}$ واللاهوائية 4.710مليغرام لتر$^{-1}$ اما العزلة B.t. كانت الانتاجية 9.170مليغرام لتر$^{-1}$ في الظروف الهوائية و 4.460 مليغرام لتر$^{-1}$في الظروف اللاهوائية، وهذه النتيجة متوافقة مع ماذهب اليه (Umangواخرون، 2013) من أن إنتاج اندول حامض الخليك IAA في ظروف الاهتزاز يزيد إلى ضعفين مقارنة بالحاضنة الساكنة في ظل الظروف المثلى، وقد يكون ارتفاع معدل الإنتاج في حالة الاهتزاز بسبب معدل نقل الأوكسجين الجيد ' إذ يؤثر توافرالأوكسجين على نشاط التحولات الأنزيمية من التربتوفان إلى الأكسينات.

جدول (8) تأثير التهوية في إنتاجية عزلتين من البكتريا *B.subtilis*و*B. thuringiensis kurstaki* من إندول حامض الخليك مليغراملتر$^{-1}$

العزلات	المخمر		المعدل
	دورق مخروطي بدون التهوية	دورق مخروطي مع التهوية	
B.subtilis	c 4.710	a 9.340	a 7.025
B. thuringiensis	d 4.460	b 9.170	b 6.815
المعدل	b 4.585	a 9.255	

المعدلات التي تحمل حروفا متشابهة للعوامل الرئيسية وتداخلاتها ضمن الصفة الواحدة لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار دنكن متعدد الحدود وعلى مستوى احتمال 5٪.

ويتبين مدى تأثيرعامل التهوية على إنتاجية إندول حامض الخليك إذ ازدادت الإنتاجية الى الضعف تقريباً بسب اثر التهوية على البكتريا كونها هوائية وبالتالي يفضل إنتاج الإندول من البكتريا في ظروف هوائية. وقد ذكر (Jaeو Kyung 2016) أن بكتريا *Bacillus megaterium* أعطت أفضل إنتاجية من إندول حامض الخليك عند زيادة حجم التهوية .

المصادر

- العربية:

1- سليمان، عصام داوود واروى شوكت ذنون (2019) تنقية وتقدير اندول حامض الخليك من الخميرتين *Rhodotorulamucilaginosa*-AR و *Kodamaeaohmeri* – AR1 وتحديد افضل الظروف البيئية لانتاجه . مجلة جامعة كركوك 14 (4) 89-108.

الكبيسي، جمال صالح (2008) انتاج منظم النمو اندول حامض الخليك (IAA) بواسطة البكتريا باستعمال اوساط محلية واختبار كفائته على نبات فول الصويا.اطروحة دكتوراه جامعة الانبار كلية الزراعة.

3 – منال الدوس ;عايدة جّلول ; محمود أبو غرة ; فواز العظمة ويوسف العموري(2016). تقييم قدرة عزلات محلية من بكتريا المحيط الجذري rhizobacteria للحمص في إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي(IAA Indole-3 acetic acid). مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 32 (1): 98-83.

– الاجنبية:

1- Ahmad, F.; IqbalA.andMohd S. (2005). Indole acetic acid production by indigenous isolates of Azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turk. J. bl. 29:29-34.

2- Arora, PK.; Sharma, A. and Bae, H. (2015b) Microbial degradation of indole and its derivatives. Jornal of Chem,2015.1-13.

3- Arsalan, A. M.; Mohammod, R. and Muhammed,S.M. (2011). Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharumofficinarum* L.). Advances in Biological Research, 5(6): 348- 355.

4- Babalola, O.O. and Akindolire, A.M. (2011). Identification of native rhizobacteria peculiar to selected food crops in Mmabatho municipality of South Africa. Belma A., Necde T .,Yavus B.2002.

5- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974) Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. (8th Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, USAF.

6- Chagas,Junior. A. F.; De Olivera,A.G.;. de Olivera L.. A;. dos Santos, G. R; Chagas L. F. B.; Lopes da Silva A L.and da Luz Costa J., (2015). Production of indole-3-acetic acid by Bacillus isolated from different soils. Bulg. J. Agric. Sci., 21: 282–287.

7- Crozier, A.; Paulo, A.; Janie, M. J.; Ana, M.M. and Goran ,S. (1988). Analysis of Indole-3- acetic acid and related indole in culture medium from *Azospirillumlipoferum* and *Azospirillumbrasilense*. App. Env. Microbiol. 54(11): 2833- 2837.

8- Determination of some properties of Bacillus Isolated from soil. Journal biology 126:41-48.

9- Devos P.; GarrIty G.M.; Jones, D.; Krieg, N.B.;LudwingW.;Rainey F. A.; Schleifer, K. and Whitman, W. B. (2009). Bergeys manual of systematic bacteriology . Second Edition . Volume 3. the Fermicutes. Library of Congress.

10- Erum, S. and Bano, A. (2008).Variation in phytohormone production in Rhizobium strains at different altitudes of northern areas of Pakistan. International Journal of Agriculture and Biology,10(5):536 – 540.

11- Evans, M.F.;Adamson,C.S;Simmons-Arnold, L. and Cooper, K. (2005). Touchdown General Primer (GP5+/ GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. BMC Clinical Pathology.16:(5)10.

12- Gordon, SA.;andWeber,RP. (1951) Colorimetric estimation of indolacetic acid. Plant Physiol 26: 192-195.

13- Ja,C.L.andKyung,S.W.(2016):Optimization of Indole – 3 – acetic acid (IAA) Production by *Bacillus megaterium* BM5: Korean J. Soil Sci. Fert. 49 (5) , 461-468.

PlantScienes Research v1:13 – 16.

21- Swain, MR.; Naskar, SK.and Ray, RC. (2007). Indol -3- acetic acid production and effect on sprouting of Yam (*Dioscorearotundata* L.) Minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culture ablecowdungMicroflora. Polish J. of Microbiology. 56(2): 103-110.

22- Naeima, M. H. Yousef(2018) Capability of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions . European Journal of Biological Research ; 8 (4): 174-182.

23- Patten, C. L. and Glick, B. R..(2002). Role of *Pseudomonas putida*indole acetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology. 68(8): 3795–3801.

24- Patil, V.(2011).production of indol acetic acid by Azotobacter sp. Resent Researchin in science and Technology,3(12):14-16.

25- Prashanth, S.andMathivanan, N. (2010) Growth promotion of groundnut by IAA producing rhizobacteria*Bacillus licheniformis* MML2501. Arch Phytopathol Plant Protect 43(2):191–208.

26- Richardson, AE.; Barea, JM.; McNeill, AM.andPrigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil321:305–339.

27- Sadhana, b.; Padal, S. B., Ravi SankarUmmidi, V.; Ashok Paltati and Nikitha, Thanagala(2017). Isolation of IAA Producing Bacteria from soil and optimization of culture conditions for maximum IAA production .Int. J. Adv. Res. 5(10), 1003-1010.

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

15- Joseph, B. R.; RanjanPatra and Lawrence, R.(2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicerarietinum L*.). International Journal of Plant Production. 1(2): 141-152.

16- Kumar, K.; Amaresan, N.; Bhagat, S.; Madhuri, K. and Srivastava, RC. (2011) Isolation and characterization of rhizobacteria associated with coastal agricultural ecosystem of rhizosphere soils of cultivated vegetable crops World J MicrobiolBiotechnol 27(7): 1625-1632.

17- Lwin, K.M.; Moe Moe, M.; Tar , T. and WaiZin, M.A.(2012). Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid-IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling.4TH AUN/ SEED- Net Regional Conference on Biotechnology:EmergingJM.

18- Murat Ozdal; OzlemGurOzdal; AlevSezen; and Omer FarukAlgur (2016) Biosynthesis Of Indole-3-Acetic Acid By *Bacillus cereus*Immobilized Cells Cumhuriyet University Faculty of Science Sci J (CSJ) 37(3): 213-222.

19- Payel Choudhury; Arshad Jawed and PradiptaSaha(2017). Optimization of phytostimulatory potential in *Bacillus toyonensis*isolated from tea plant rhizosphere soil of Nilgiri Hills, India International Journal of Engineering Science Invention 6(11): 13-18.

20- Mallaiah,K.V. and Sridevi,M.(2008) Production of Indole -3-Acetic acid by Rhizobium Isolates from SesbaniaSpecies.

and non symbioticNitroogen fixing bacteria and its optimization by taguchi design cuireMicrobial Appl 61(3)217-225.

36- Sodik, W.; Sarjiya, A. and Wibowo, M.(2018). Production of Indole-3-acetic acid (IAA) by isolate bacteria of TPK5b2: Various of pH medium conditions. International Conference on Science and Applied Science (ICSAS) 2018 AIP Conf. Proc. 2018, 020138-1–020138-5.

37- Sonali, K.; Prabha, C.; Singh, A.; Kumari, S. and Kiran, S. (2018). Optimazation of Indole -3-Acetic acid production by DizatrophicB. subtilis DR2.(KP455653),Isolated from Rhizosphere of EragrostiscynosuroideInt J Pharma Med Bio,Sci7(2):20 -27.

38- Suliasih, S. and Widawati, Sri.(2020). Isolation of indole acetic acid (IAA) producing *Bacillus siamensis*from peat and optimization of the culture condition for maximum IAA production.Earth and EnviromentalScience.volume 572,IOP 012025.

39- Yadav, AN.; Sachan, SG.; Verma. P.; Tyagi, SP.; Kaushik, R. and Saxena, AK.(2015) Culturable diversity and functional annotation of psychrotrophic bacteria from cold desert of LehLadakh. (India) World J MicrobiolBiotechnol 31(1):95–108.

40- Yadav, A. N., Yadav, N., Sachan, S. G., & Saxena, A. K. (2019). Biodiversity of psychrotrophic microbes and their biotechnological applications. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(4), 99-108.

28- Sahasrabudhe, M. M.(2011). Screening of rhizobia for indole acetic acid production. Annals of Biological Research. 2(4): 460-468.

29- Sasirekha, B. ; Shivakumar, S. and Sallia, B.(2012)Statical optimization for improved indole -3-acetic aced (iaa) production by Pseudomonas aeruginosa and demonostration of enhanced plnt growth promotion .Journal of soil science and plant nutration. Voll 2:4

30- ShabanaWagi and Ambreen Ahmed (2019) *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA Peer J 7:e7258 DOI 10.7717/ peerj.7258.

31- Shino, S. ; Yuxi, H. and Hiroshi, O.(2002) Indole acetic acid production Pseudomonas and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. J. Cur. Micro.,47(2):138-143.

32- Shameer, S. Prasad (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. Plant Growth Regulation.;84(3):603–615.

33- Sheela, C; Kazim, A. and Madhumita, K.(2018)Optimazition of Indol acetic acid production by isolated bacteria from stevia rebaudianarhizosphere and its effects on plant growth .Jornal of Genetic engineering and Biotechnology. 16.581 – 586.

34- Shilts, T.; Erturk, V.; Patel, N. J.and Chung, K.P.(2005). "Physiological regulation of biosynthesis of Indole-3-acetic acid and other indoleclerivatives by the citrus fungal pathogen Collectotrichumacutatum", Journal. Biology science 5,205 .

35- Shokri, D. and Emtiazi(2010). Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic