مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد(13) العدد(2)–(2013)
ISSN-1813-1646

عزل وتشخيص بكتريا *Azospirillum spp.* من بعض النباتات النامية في التربة الجبسية وتقييم كفائتها في تثبيت النتروجين وأنتاج IAA

عبدالكريم عريبي سبع الكرطاني [1] عبدالله عبد الكريم حسن الدوري[2] وهبه محمد يوس[3]
[3، 1] قسم علوم التربة والمياه–كلية الزراعة– جامعة تكريت
[2] قسم وقاية النبات–كلية الزراعة– جامعة تكريت

الكلمات الدالة :
تشخيص ، ترب جبسية ، تثبيت نايتروجين

للمراسلة :
عبدالكريم عريبي سبع الكرطاني
قسم علوم التربة والمياه–كلية الزراعة– جامعة تكريت

الاستلام:
25-6-2012

القبول :
30-12-2012

الخلاصة

جمعت 162 عينة تربة وجذور لستة نباتات (الحنطة ، الشعير ، الذرة البيضاء ، فول الصويا ، الجت ، الباقلاء) من حقول كلية الزراعة – جامعة تكريت هذه العينات تمثل ثلاثة مناطق نسبة إلى جذور النبات (Rhizoplan ، Rhizosphere، Non_rhizosphere) خلال ثلاثة اشهر من عمر النبات ، لدراسة المجتمع السكاني لبكتريا ال*Azospirillum* المرافقة لجذور بعض النباتات النامية في الترب الجبسية ، وأظهرت النتائج عزل 155 عزلة تعود إلى أربعة أنواع لبكتريا ال *Azospirillum* وهي (*A.brasilense* ، *A.halopraeferens* ، *A.lipoferum*، *A.irakense*) والتي تم تشخيصها من خلال الصفات المجهرية والمظهرية والمزرعية والكيموحيوية ، وبينت النتائج أن النوع *A.brasilense* هو الأكثر تواجد إذ بلغ 89 عزلة بنسبة 57.4% ، يليه النوع *A.halopraeferens* الذي بلغ 35 عزلة بنسبة 22.5% ، ويليه النوع *A.lipoferum* اذ بلغ 30 عزلة بنسبة 19.3% ، ثم النوع *A.irakense* عزلة واحدة بنسبة 0.6% ، ويعد عزل النوع *A.halopraeferens* أول تسجيل لعزل هذا النوع من الترب العراقية ، وكذلك فان عزل النوع *A.irakense* من تربة الرايزوسفير لنبات الباقلاء يعد التسجيل الأول في محافظة صلاح الدين .وأظهرت النتائج أن أعلى تثبيت للنتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك سجل عند النوع *A.brasilense* ، يليه النوع *A.lipoferum* ، ثم النوع *A.halopraeferens* ، ويليه النوع *A.irakense* ، وعند النوع *A.brasilense* كانت العزلة الأكثر كفاءة Ab83T ، والتي أعطت تثبيت للنتروجين بلغ 14.7 ملغم.لتر$^{-1}$ ، وانتاج للاندول بلغ 10.6 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ، وعند النوع *A.lipoferum* كانت العزلة الأكثر كفاءة هي Al28T والتي أعطت قيم تثبيت للنتروجين الجوي وأنتاج الاندول حامض الخليك 13.2 ملغم.لتر$^{-1}$ و 9,6 مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التعاقب ، وعند النوع *A.halopraeferens* أظهرت العزلة Ah16T قدرة عالية على تثبيت النتروجين وانتاج الاندول بلغت 13 ملغم.لتر$^{-1}$ و 9.8 مايكروغرام.مل$^{-1}$. وأظهرت العزلة الوحيدة من بكتريا *A.irakense* قابلية في تثبيت النتروجين بلغت 11 ملغم.لتر$^{-1}$ وانتاج IAA بتركيز 8.3 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ، وبينت النتائج أن النسبة المئوية لتواجد أنواع بكتريا الازوسبيرلم المعزولة من نباتات مختلفة كانت أعلاها في منطقة سطح الجذورRhizoplan إذ بلغت 74% ، تليها المنطقة المحيطة بالجذور وبلغت 65.1% ، في حين سجلت أدنى نسبة مئوية لتواجد هذه البكتريا في المناطق البعيدة عن الجذور وبنسبة 51% ، وظهر أعلى تواجد للبكتريا في نبات الحنطة يليه نبات الشعير ويليه نبات الذرة البيضاء ويليه نبات الجت ، ثم نبات الباقلاء ، ومن ثم نبات فول الصويا بنسبة 88.1 ، 80.7 ، 71.0 ، 54 ، 50.3 ، 36.2% على التعاقب .

***البحث مستل من رسالة ماجستير الباحث الثالث**

مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد(13) العدد(2)–(2013)
ISSN-1813-1646

Isolation and Identification of *Azospirillum spp*.from some plants grow in gypsi ferous soil and evaluation of its effecincy for Nitrogen fixation and IAA production .

Abdul Kareem E. Alkurtany
College of Agriculture
University of Tikrite
Soil and Water Science

Abdullah A. Hassan
College of Agriculture
University of Tikrite
Depatement of Plant Protection

Heba Mohammed Yosef
College of Agriculture
University of Tikrite
Soil and Water Science

Abstract

A field surveying of three regions including Non-Rhizosphere, Rhizosphere and Rhizoplan was carried out in Agriculture college fields/ Tikrit university. 162 soil and roots samples were collected from six host plants including wheat *Triticum aestivum* , barley *Hordeum vulgare* , *sorghum* sp., soybean *Glycine max*, alfalfa *Medicago sativa* , and broad bean *Vicia faba* during three months from the plant age for the study of population level of *Azospirillum* associated with these plants grown on gypsiferous soil. The results showed isolation of 155 isolates belong to four species *A.brasilense, A. halopraeferens* , *A. lipoferum* and *A. irakense* which diagnosed according to microscopic and biochemical properties. the highest frequent species was *A.brasilense* (89%) followed by *A. halopraeferens* (22.5%) then , *A. lipoferum* (19.3%) and *A. irakense* (0.6%). In this study, isolation of *A. halopraeferens* was recorded for the first time in Iraqi soil in addition, isolation of *A. irakense* was recorded for the first time in Salah-Aldin government.The results showed the maximum nitrogen fixation and IAA production were recorded by *A.brasilense* followed by *A. lipoferum* then , *A. halopraeferens* and *A. irakense* . The highest nitrogen fixation and IAA production were recorded by the isolate AB83T of *A.brasilense* (14.7 mg/L and 10.6µg/ml) while in *A. lipoferum* the isolate Al28T gives (13.2 mg/L and 9. 6µg/ml , then the isolate Ah16T of *A. halopraeferens* (13 mg/L and 9.8 µg/ml) and the isolate of *A. irakense* (11 mg/L and 8.3 µg/ml), respectively.The results also showed the highest percentage of *Azospirillium* species frequent was 74% in rhizoplan followed by 65.1% in rhizosphere, while the lower percentage was 51% in non-rhizosphere. According to the hosts, the highest percentage of *Azospirillium* species frequent was 88.1,80.7,71, 54, 50.3 and 36.2% in wheat, barley, sorghum, alfalfa , broad bean and soybean, respectively.

Key Words: Identification , plants , soil , production

Correspondence: Abdul Kareem Alkurtany College of Agriculture- Soil and Water Science-Tikrit University

Received: 25-6-2012

Accepted: **30-12-2012**

المقدمة

توجد الانواع التابعة لبكتريا الازوسبيريلم *Azospirillum spp.* في مختلف الانظمة البيئية في العالم ، فهي تستوطن التربة و جذور النباتات في معظم مناطق العالم الاستوائية و شبه الاستوائية و المناطق المعتدلة و قد عزلت بعض الانواع التابعة لهذه البكتريا في العراق (ظاهر ، 2001 ؛ السالم ،2003) ، اشار العديد من الباحثين ان بكتريا الازوسبيريلم تستوطن منطقة جذور النبات (الرايزوسفير) (Rhizosphere) او سطح الجذر او المناطق البينية لخلايا الجذور او قد تستوطن القشرة الداخلية للجذر و ذلك لامتلاكها انزيمات قادرة على تحليل جدران الخلية النباتية (Ganamanickam، 2006) وجدت بكتريا الازوسبريلم مرتبطة (Associative) مع جذور نباتات متنوعة مثل الحنطة و الشعير و الرز و الشوفان و الذرة الصفراء و البيضاء و قصب السكر و الدخن كما وجدت مع جذور محاصيل الخضار (Gamo، 1991) (Shaheen وآخرون ،2007) وكذلك وجدت مع جذور نباتات الحشائش مثل Digitaria و ال Kallar الذي ينمو في ترب متاثرة بالملوحة و القاعدية ، فضلا عن عزلها من الرايزوسفير من مناطق متعددة ذات اس هيدروجيني متعادل او خفيف القاعدية . تنتج سلالات بكتريا الازوسبيرلم العديد من الهرمونات النباتية في محلول المزرعة وأن الهرمون الرئيسي الناتج هو ال Indol-3-acetic acid (IAA)ـ وهناك هرمونات أخرى تنتج بكميات قليلة لكنها ذات تأثيرات معنوية وهي Indol lactic acid (ILA) و Indol-3-butyric acid (IBA) و Indol-3-ethanol و Indol -3-methanol ومركبات الاندول الأخرى وعدد من الجبرلينات (Gibberellins) والسايتوكاينيات Cytokinins(Tien وآخرون ،1979) . أشارت العديد من الأبحاث إلى أن الهرمونات النباتية مثل (IAA) Indol-3-acetic acid التي تنتج من بكتريا الازوسبيرلم تشجع نمو النبات

وذلك لتحفيزها لنمو الجذور وتكوين الشعيرات الجذرية (Akbari وآخرون ،2007) . نظرا لقلة الدراسات الخاصة بعزل وتشخيص بكتريا ال *Azospirillum* في محافظة صلاح الدين فقد اجريت هذه الدراسة التي تهدف الى :

1–عزل وتشخيص انواع بكتريا الازوسبيرلم من الترب العراقية (محافظة صلاح الدين) .

2–تقييم كفاءة هذه الانواع من حيث تثبيتها للنتروجين وانتاجها للIAA

المواد وطرائق البحث

جمعت 162 عينة تربة وجذور لستة نباتات (الحنطة ، الشعير ، الذرة البيضاء ، فول الصويا ، الجت ، الباقلاء) من حقول كلية الزراعة – جامعة تكريت هذه العينات تمثل ثلاثة مناطق نسبة إلى جذور النبات (Rhizoplan ، Rhizosphere، Non_rhizosphere) خلال ثلاثة اشهر من عمر النبات وكذلك اخذت نماذج لتربة كل نبات من الطبقة السطحية (0–30)سم وقدرت فيها خواص التربة الفيزياوية والكيمياوية جدول (1) حسب الطرق الواردة في Black وآخرون ، (1965). تم عزل بكتريا الازوسبيرلم من منطقة الرايزوسفير والمنطقة البعيدة عن الجذور وسطح الجذر حسب Baldani وآخرون،(1986) ، وقدرت اعداد بكتريا الازوسبيرلم باستخدام الوسط الزرعي شبه الصلب الخالٍ من مصدر النتروجين (Nfb) حسب (Krieg و Dobereiner ،1984) ، اذ عزلت بكتريا الازوسبيرلم المثبتة للنتروجين بعد ظهور النمو الحلقي (Pellicle) الابيض اللون على بعد 1–4 ملم اسفل السطح للوسط الزرعي بعد 24 ساعة من الحضن ويرتفع هذا النمو باتجاه السطح ليصبح على بعد 2 ملم بعد 48ساعة من الحضن وعند فحص النمو مجهريا تظهر خلايا عصوية سريعة الحركة Rodriguez –caceres (1982). نقيت بكتريا الازوسبيرلم باجراء ثلاث نقلات متتالية للنمو الحلقي على نفس الوسط اعلاه وحضنت في درجة 30^0 م لمدة 48 ساعة ، ثم ينقل النمو الحلقي بالتخطيط على الأطباق الحاوية على وسط R .C (Rogo) Congo المضاف له صبغة الكونغو الحمراء وحضنت الأطباق في 37 $م^0$ لمدة 72ساعة حسب Rodriguez –caceres (1982) . وبعد ظهور المستعمرات القرمزية اللون على الوسط نقيت كل مستعمرة مرة أخرى بأعادة تخطيطها على نفس الوسط للتأكد من نقاوتها شخصت عزلات بكتريا الازوسبيرلم الى الانواع التابعة لها بدراسة صفاتها المظهرية والمجهرية (تلون المستعمرات واشكالها ونموها ، الشكل والحركة ، صبغة كرام) ودراسة صفاتها الكيموحيوية (النمو في pH (6) و (7,5) ، فحص انزيم الكاتليز ، النمو في (3%) كلوريد الصوديوم ، اختبار الاوكسديز ، اختبار استهلاك المصادر الكاربونية ، اختبار الحاجة للبايوتين ، اختبار ظاهرة تعدد الاشكال ، اختبار اختزال النترات وعملية عكس النترجة ، تحلل البكتين) حسب Krieg و Dobereiner ،(1984) Khammas وآخرون (1989). وكذلك تم اختبار مقدرة العزلات على تثبيت النتروجين الجوي (Bremner ،1965) و اختبار مقاومتها للمضاد الحيوي الستربتومايسين حسب (Baldani و Dobereiner ،1980) و تقدير الاندول حامض الخليك (IAA) المنتج من قبل عزلات الازوسبيرلم حسب طريقة (Glickmann و Dessaux ،1995)

جدول (1) بعض الصفات الكيمياوية والفيزياوية لتربة مناطق المسح المدروسة

اسم النبات / الصفة		فول الصويا	الذرة البيضاء	الباقلاء	الجت	الحنطة	الشعير
التوصيل الكهربائي	$ds.m^{-1}$	1.94	1.86	2.23	2.16	2.3	1.2
PH		7.22	7.62	7.4	7.25	7.23	7.16
C.E.C	Cmol.100gm soil	12.1	11.8	10.8	11.4	14.2	11.6
الجبس	$gm.kg^{-1}$	52.6	55.4	66	58	64.2	58.4
الكلس		175	170	190	185	182	182
المادة العضوية		8.4	10.2	9.2	8.4	14.6	7.2
نتروجين جاهز		64.6	68.4	68.2	72.6	88.4	72.5
فسفور جاهز	$mg.kg^{-1}$	24.8	22.6	26.3	25.7	28.8	22.8
بوتاسيوم جاهز		126.3	124.7	122.5	124.9	132.2	127.2
الطين	التوزيع الحجمي لدقائق التربة ($g.kg^{-1}$)	160	140	180	200	220	160
الغرين		260	280	240	240	210	260
الرمل		580	580	580	560	570	580
النسجة		مزيجية رملية	مزيجية رملية	مزيجية رملية	مزيجية رملية	مزيجية طينية رملية	مزيجية رملية
بكتريا الازوسبيرلم	خلية/ غم تربة c.f.u/gm	$10*0.55^2$	$10*0.65^2$	$10*0.60^2$	$10*0.72^2$	$10*0.83^2$	$10*0.77^2$

النتائج والمناقشة

يبين جدول (2) الاختبارات العامة والتفريقية التي أجريت لعزلات المجاميع البكترية الأربعة التابعة للجنس ازوسبيرلم اذ تم عزل 155 عزلة من جذور نباتات (الحنطة ، الشعير ، الذرة البيضاء ، فول الصويا ، الجت ، الباقلاء) والتربة المحيطة بها rhizosphereوالتربة البعيدة عن النبات (non_rhizosphere) من حقول كلية الزراعة _جامعة تكريت ، ومن خلال الصفات المجهرية والمظهرية والمزرعية والكيموحيوية للعزلات المدروسة والمبينة في الجدول (2) فإنها تتميز بأشكال عصوية ضمية (Vibrioid) اوحلزونية قصيرة، وإنها ذات حركة لولبية ، كما تميزت بقابليتها على تثبيت النتروجين في الوسط الزرعي شبه الصلب الخالي من النتروجين (Nfb) مكونة نموا غشائيا رقيقا(Pellicle) ابيض اللون تحت سطح الوسط الزرعي بمسافة1–4 ملم ، وعند الاستمرار بالحضن لمدة 48 ساعة في 30^0م ارتفع النمو الغشائي إلى 2 ملم تحت السطح أي إنها تثبت النتروجين تحت ظروف التهوية القليلة وهذه الصفة من العلامات المميزة لجنس بكتريا الازوسبيرلم كما تم ملاحظة تغير لون الوسط الزرعي Nfb الحاوي على صبغة البروموثايمول الزرقاء من الأخضر الفاتح عند pH 6.8 إلى الأزرق القاعدي ، بسبب تكون الامونيا عند تثبيت النتروجين . وان مستعمراتها النامية على الوسط الحاوي على صبغة الكونغوا الحمراء قد اصطبغت باللون الأحمر .

جدول (2) الاختبارات العامة والتفريقية التي أجريت لعزلات المجاميع البكترية الأربعة التابعة للجنس ازوسبيرلم

		A.brasilense	*A.halopraeferens*	*A.lipoferum*	*A.irakense*
	الاعداد	89	35	30	1
	شكل الخلايا	عصوية تشبه الضمة منحنية قليلا	عصوية تشبه الضمة منحنية قليلا	عصوية تشبه الضمة منحنية قليلا	عصوية تشبه الضمة منحنية قليلا
	الحركة	متحركة حركة لولبية	متحركة حركة لولبية	متحركة حركة لولبية	متحركة حركة لولبية
الخصائص التشخيصية المظهرية والمجهرية	احتواء الخلايا على حبيبات - poly β hydroxybutarate	+	+	+	+
	التفاعل مع صبغة كرام	–	–	–	–
	فحص أنزيم الاوكسيديز	+	+	+	+
	فحص أنزيم الكاتليز	+	+	+	+
	لون المستعمرات على وسط R.C الحاوي على صبغة الكونغو	احمر	احمر	احمر	احمر
	تجمع الخلايا	مفردة	مفردة	مفردة	مفردة
	أشكال المستعمرات على وسط R.C بوجود صبغة الكونغو الحمراء	ذات حافة متموجة او ملساء ،تنتشر الصبغة في معظم انحاء المستعمرة	ذات حافة متموجة تتمركز الصبغة في وسط المستعمرة	ذات حافة ملساء تتمركز الصبغة في وسط المستعمرة	ذات حافة ملساء تحوي خطوط شعاعية تتمركز الصبغة في وسط المستعمرة
الاختبارات العامة والتفريقية لعزلات المجاميع البكتيرية	اختزال النترات NO^{--}_3 إلى نتريت NO^-_2	– +	+	+	+
	القيام بعملية عكس النترجة	±	– +	– +	–
	النمو في أس هيدروجيني 7.5	+	+	+	+
	النمو في أس هيدروجيني 6	+	–	+	+
	النمو بوجود 3% NaCl	±	+	±	+
	تحلل البكتين	–	–	–	+
	أشكال الخلايا في وسط Nfb الحاوي على مستخلص الخميرة 0.05 غم.لتر$^{-1}$	ثابتة الاشكال	ثابتة الاشكال	متعددة الاشكال طويلة وعريضة وقسم قصيرة	ثابتة الاشكال
	الحاجة للبايوتين	–	+	+	–
	استخدام المصادر الكاربونية Sucrose	–	–	–	+
	Glucose	–	–	+	+
	α-ketoglutarate	–	+	+	+
تركيز المضاد الحيوي الستربتومايسين مايكروغرام.مل$^{-1}$ من الوسط	5	+	+	+	+
	10	– +	±	±	+
	15	±	±	±	–
	20	–	–	–	–

– :جميع العزلات سالبة
+ :جميع العزلات موجبة
± :معظم العزلات سالبة
–+ : معظم العزلات موجبة

من خلال الصفات المجهرية والمظهرية لهذه العزلات وبناءا على ماورد في معظم الدراسات التي تناولت هذا الموضوع فان هذه الصفات تتطابق مع الصفات المجهرية والمظهرية للجنس ازوسبيرلم (Tarrand واخرون ،1978 ؛ Krieg و Dobereiner ،1984 ؛ Khammas وآخرون ،1989 ؛ Holt وآخرون ،1994) . تم تقسيم العزلات التابعة لجنس الازوسبيرلم وعددها 155 عزلة إلى الأنواع التابعة لها اعتمادا على المفاتيح الخاصة للتفريق بين الأنواع الواردة في (Dobereiner و Day ،1976 ؛ Tarrand وآخرون ،1978 ؛ Krieg و Dobereiner ،1984 ؛ Khammas وآخرون ،1989 ؛ Holt وآخرون ،1994) . ولتسهيل عملية التشخيص قسمت العزلات إلى أربع مجاميع المجموعة الأولى تضم 89 عزلة والمجموعة الثانية تضم 35 عزلة والمجموعة الثالثة تضم 30 عزلة وتضم المجموعة الرابعة عزلة واحدة ، ومن خلال دراسة بعض الصفات التفريقية بين الأنواع ولاسيما اختبار الحاجة للبايوتين وقابلية العزلات على استهلاك بعض المواد الكربوهيدراتية كمصادر للكاربون وعند مقارنة هذه الصفات مع صفات الأنواع التابعة لجنس الازوسبيرلم يمكن الاستنتاج أن الصفات المثبتة في العمود الأول من الجدول (2) تعود للنوع *A.brasilense* والصفات المثبتة في العمود الثاني تعود للنوع *A.halopraeferens* والصفات المثبتة في العمود الثالث تعود للنوع *A.lipoferum* والصفات المثبتة في العمود الرابع تعود للنوع *A.irakense* لامتلاك كل مجموعة منها لخصائص وصفات ذلك النوع ، وان عزل بكتريا *A.halopraeferens* تعد أول أشارة لعزل هذا النوع من الترب العراقية وهذا لايتفق مع (مهدي ،1995 ؛ Khammas وآخرون ،1989) اللذان استبعدا وجود النوعين *A.amazonense* و *A.halopraeferens* وكذلك تم عزل النوع *A.irakense* من تربة الرايزوسفير لنبات الباقلاء ، وهذا التسجيل الأول في محافظة صلاح الدين ، إذ تم عزلها أول مرة من جذور وتربة الرايزوسفير لنبات الرز في محافظة القادسية (Khammas وآخرون ،1989) ،وتم نشرها في كتاب Bergey's manual of determinative bacteriology (Holt وآخرون ،1994) ، كما سجل (ظاهر ، 2001) أول أشارة لعزل هذا النوع من جذور الذرة الصفراء .

يبين الجدولان (3 ، 4) **النسب المئوية لتواجد وانتشار بكتريا الازوسبيرلم** اذ يبين الجدول (3) النسب المئوية لتواجد بكتريا ال *Azospirillum*في التربة المحيطة بالجذر(Rhizosphere) وسطح الجذر (Rhizoplan) والمنطقة البعيدة عن الجذر (Non-rhizosphere) في نباتات الذرة البيضاء ، الحنطة ، الشعير ولثلاثة أشهر من عمر النبات ، ونلاحظ من الجدول ان النسب المئوية لتواجد البكتريا على مستوى مناطق العزل كانت أعلى تردد في منطقة سطح الجذور اذ بلغت 95.5 ، 88.8 ، 79.9% لنباتات الحنطة والشعير والذرة البيضاء على الترتيب ، ويلاحظ من نفس الجدول أن أعلى تواجد لبكتريا ال*Azospirillum* على مستوى النباتات سجل في نبات الحنطة88.1% ، يليه نبات الشعير80.7% ، ويليه نبات الذرة البيضاء 71.0% ، أما على مستوى الأشهر فقد سجل أعلى تواجد للبكتريا في نباتات الذرة البيضاء خلال شهر تشرين الثاني 77.7% ، وفي نباتات الحنطة والشعير كان أعلى تواجد للبكتريا في شهر مايس اذ بلغ 93.3 ، 86.6% ، على التعاقب ، ويبين نفس الجدول أن النسبة المئوية لتواجد البكتريا في نبات الذرة البيضاء سجلت أعلى تردد في منطقة سطح الجذر إذ بلغت 73.3 ، 80 ، 86.6% للأشهر آب ، أيلول ، تشرين الثاني ، أما النسبة المئوية لتواجد البكتريا في نباتات الحنطة والشعير فقد سجلت أعلى تردد في منطقة سطح الجذر وبلغ 93.3 ، 93.3 ، 100 و 86.6 ، 86.6 ، 93.3% للأشهر كانون الأول ، آذار ، مايس ، على التعاقب و النسب المئوية لتواجد بكتريا ال*Azospirillum* في التربة المحيطة بالجذر(Rhizosphere) وسطح الجذر (Rhizoplan) والمنطقة البعيدة عن الجذر (Non-rhizosphere) في نباتات فول الصويا ، الجت و الباقلاء ولثلاثة أشهر من عمر النبات يبينها الجدول (4) ، ويظهر من هذا الجدول أن أعلى نسبة تواجد كانت في نبات الجت54% ويليه نبات الباقلاء50.3% ، ومن ثم نبات فول الصويا 36.2% الأقل ترددا ، وان منطقة سطح الجذر سجلت أعلى تردد لتواجد البكتريا بلغ 64.4 ، 59.9 ، 55.5 % لنباتات الجت والباقلاء وفول الصويا على التعاقب . وعلى مستوى الأشهر فقد سجل أعلى تواجد للبكتريا في نبات فول الصويا خلال شهر تشرين الثاني 44.4% ، وأعلى تواجد للبكتريا في نبات الجت كان خلال شهر مايس 59.9% ، وكان أعلى تواجد في نبات الباقلاء خلال شهر مايس إذ بلغ 57.7% . ويوضح نفس الجدول أن أعلى نسبة لتواجد البكتريا في نبات فول الصويا كانت في منطقة سطح الجذر إذ بلغت 46.6 ، 53.3 ، 66.6% للأشهر حزيران ، آب ، تشرين الثاني على الترتيب ، وكان أعلى تواجد للبكتريا في نبات الجت في منطقة سطح الجذر بنسب بلغت 53.3 ، 66.6 ، 73.3% للأشهر كانون الثاني ، نيسان ، مايس على الترتيب ، وكذلك سجلت أعلى نسبة تواجد للبكتريا في نبات الباقلاء في منطقة سطح الجذر إذ بلغت 53.3 ، 60 ، 66.6 للأشهر كانون الثاني ، نيسان ، مايس على الترتيب .

أظهرت النتائج إن نسبة تواجد بكتريا الازوسبيرلم كانت في منطقة سطح الجذور كانت أعلى من نسبتها في تربة الرايزوسفير والتربة البعيدة عن الجذور ، وتعزى هذه الزيادة إلى وجود الطبقة الهلامية اللزجة (Mucigel) المحيطة بسطوح الجذور ، والى وجود كميات كبيرة من المركبات العضوية والأنسجة المتحللة والجذور المتخدشة التي تتحرر منها المركبات العضوية كالأحماض العضوية والكاربوهيدرات والأحماض الامينية

والهرمونات والتي تشجع نمو وتكاثر البكتريا المتباينة التغذية في هذه المنطقة (Chaboud ،1981) مقارنة بتربة الرايزوسفير والتربة البعيدة عن الجذور ، وكذلك قد يعزى إلى امتزاز هذه البكتريا على أسطح الجذور (Bashan وآخرون ،1986) ،أن اختلاف نسب تواجد الأنواع من نبات لآخر يعزى إلى إن بكتريا الازوسبيرلم غير متخصصة في ارتباطها مع النبات لكن لها فعل تفضيلي (Preferential) بالارتباط فمثلا محاصيل الحبوب التابعة لمجموعة C_3- كالحنطة والشعير غالبا ما تصاب بسلالات *A.brasilense* السالبة لعملية عكس النترجة (nir^-) بينما الحبوبيات التابعة لمجموعة C_4- كالذرة الصفراء والبيضاء تصاب بسلالات *A.lipoferum* السالبة لعملية عكس النترجة (nir^-) (Baladani و Dobereiner ،1980) . وكذلك تؤثر ملوحة التربة على تواجد بكتريا الازوسبيرلم إذ بين (Jofre وآخرون ،1998) إن نتائج استعمار جذور نباتات الحنطة والذرة الصفراء الملقحة ببكتريا *A.brasilense* والنامية تحت ظروف ملحية كانت غير معنوية ،إذ إن البكتريا لا تستجيب لإفرازات جذر النبات ولا يمكنها أن تفرز الهرمونات المشجعة لنمو النبات بصورة طبيعية ، إما النوع *A.halopraeferens* فانه يكون ذات مقاومة عالية للحموضة أو الأملاح والحرارة العالية (Reinhold وآخرون ،1988) . إن خلايا الازوسبيرلم تمتز على أسطح دقائق التربة وإن الظروف ألفيزيائية والكيميائية للتربة مثل pH والتغدق والجفاف وجاهزية العناصر وCEC والمادة العضوية والطين تؤثر على هذا الامتزاز ، إذ إن تجفيف التربة أو زيادة pH لها يقلل الامتزاز وكذلك فإن زيادة محتوى الطين والمادة العضوية لأكثر من 5 % يزيد الامتزاز (Bashanواخرون ، 1989a ؛ Horemanc واخرون ، 1988؛ Bashan واخرون ، 1989b) ، وهذا يفسر وجود بكتريا الازوسبيرلم في التربة بأعداد جيدة أو فقر التربة بها وإن التراكيز العالية من الرمل والكلس والجبس تؤثر على بقاء بكتريا الازوسبيرلم في التربة(Gamo ،1991) .

ونلاحظ زيادة نسبة التواجد مع تقدم أشهر السنة وذلك يعزى إلى زيادة المجموع الجذري للنبات ومن ثم زيادة افرازات الجذور مما يؤدي إلى زيادة في أعداد هذه البكتريا ، كذلك يلعب النبات المضيف دورا مهما في تواجد البكتريا ، وهذا التواجد يمدها بما تحتاجه من المغذيات (Schmidt ، 1979) وان زيادة افرازات النبات تؤدي إلى زيادة تواجد البكتريا (Umali-Garcia واخرون،1980) .

جدول (3) النسب المئوية لتواجد بكتريا ال*Azospirillum* في التربة المحيطة بالجذر(Rhizosphere)وسطح الجذر (Rhizoplan) والمنطقة البعيدة عن الجذر (Non-rhizosphere) في نباتات الذرة البيضاء ، الحنطة ، الشعير ولثلاثة أشهر من عمر النبات

النبات / منطقة العزل	الذرة البيضاء				الحنطة				الشعير				معدل مناطق العزل
	آب	أيلول	تشرين الثاني	معدل مناطق العزل للذرة البيضاء	كانون الأول	آذار	مايس	معدل مناطق العزل للحنطة	كانون الأول	آذار	مايس	معدل مناطق العزل للشعير	
Rhizoplan	73.3	80	86.6	79.9	93.3	93.3	100	95.5	86.6	86.6	93.3	88.8	88.1
Rhizosphere	66.6	73.3	80	73.3	86.6	86.6	93.3	88.8	73.3	80	86.6	79.9	80.7
Non-rhizosphere	53.3	60	66.6	59.9	73.3	80	86.6	79.9	66.6	73.3	80	73.3	71.0
المجموع	193.2	213.3	233.2		253.2	259.9	279.9		226.5	239.9	259.9		
معدل الأشهر	64.4	71.1	77.7		84.4	86.6	93.3		75.5	79.9	86.6		
معدل تواجد البكتريا في النبات			71.0				88.1				80.7		

جدول(4) النسب المئوية لتواجد بكتريا الAzospirillum في التربة المحيطة بالجذر(Rhizosphere) وسطح الجذر (Rhizoplan) والمنطقة البعيدة عن الجذر (Non-rhizosphere) في نباتات فول الصويا ، الجت ، الباقلاء ولثلاثة أشهر من عمر النبات

النبات / منطقة العزل	فول الصويا				الجت				الباقلاء				معدل مناطق العزل
	حزيران	اب	تشرين الثاني	معدل مناطق العزل لفول الصويا	كانون الثاني	نيسان	مايس	معدل مناطق العزل للجت	كانون الثاني	نيسان	مايس	معدل مناطق العزل للباقلاء	
Rhizoplan	46.6	53.3	66.6	55.5	53.3	66.6	73.3	64.4	53.3	60	66.6	59.9	59.9
Rhizosphere	33.3	40	46.6	39.9	46.6	53.3	60	53.3	46.6	53.3	66.6	55.5	49.5
Non-rhizosphere	6.7	13.3	20	13.3	40	46.6	46.6	44.4	33.3	33.3	40	35.5	31.0
المجموع	86.6	106.6	133.2		139.9	166.5	179.9		133.2	146.6	173.2		
معدل الأشهر	28.8	35.5	44.4		46.6	55.5	59.9		44.4	48.8	57.7		
معدل تواجد البكتريا في النبات	36.2				54				50.3				

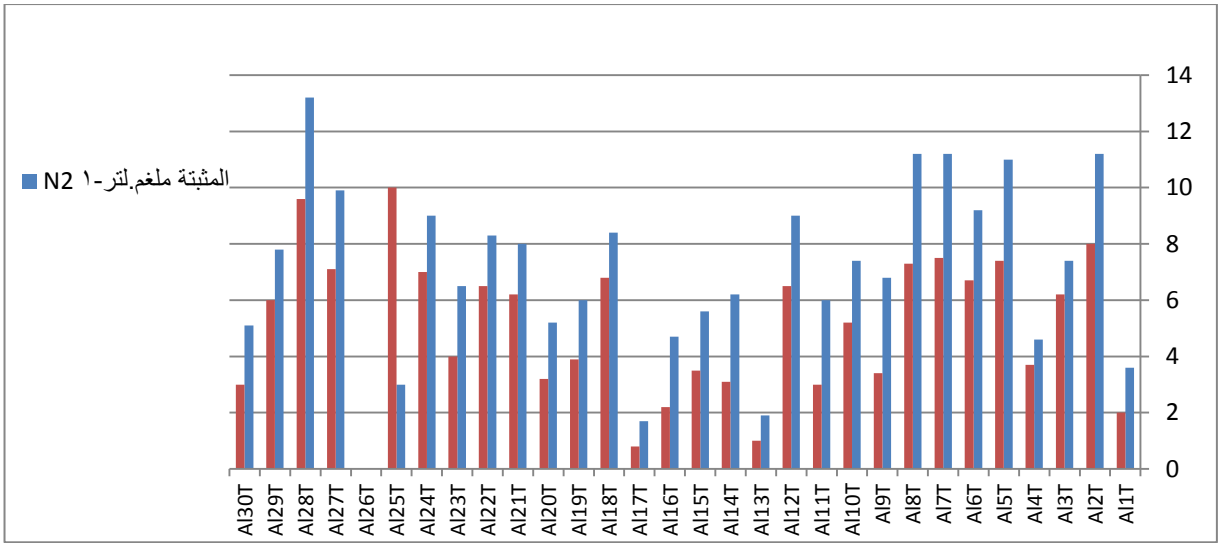
–كفاءة عزلات بكتريا الازوسبيرلم في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك

يبين الشكل (1) كفاءة عزلات بكتريا *A.lipoferum* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك إذ سجلت العزلة Al28T اعلى تثبيت للنتروجين بلغ 13.2 ملغم.لتر$^{-1}$ ، كما وسجلت العزلة نفسها أعلى انتاج للاندول حامض الخليك إذ بلغ 9,6 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ،وكما يبين الشكل نفسه أن عزلة واحدة من مجموع 30 عزلة كانت غير قادرة على تثبيت النتروجين وانتاج IAA .

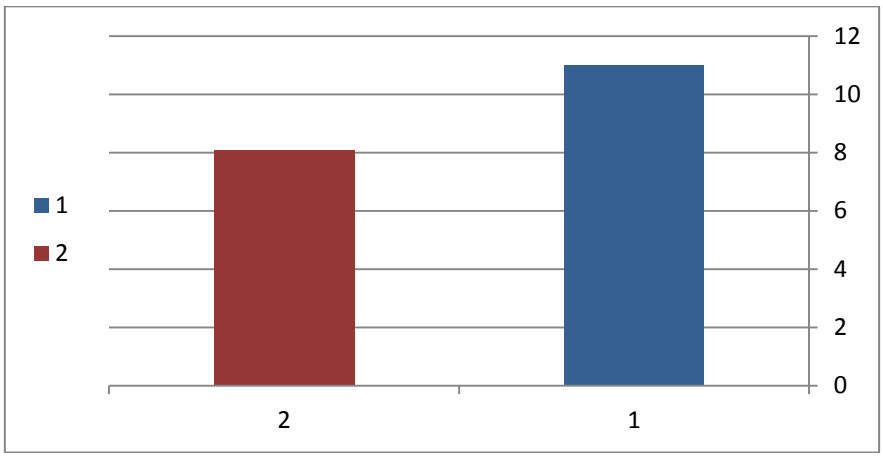
أما كفاءة عزلات بكتريا *A.halopraeferens* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج IAA فيبين الشكل (3) أن هناك تباينا في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج IAA باختلاف العزلة البكتيرية ، وأظهرت العزلة Ah16T قدرة على تثبيت النتروجين وانتاج الاندول بلغت 13 ملغم.لتر$^{-1}$ ، 9.8 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ، للنتروجين والاندول على الترتيب .

وأظهرت العزلة الوحيدة من بكتريا *A.irakense* (شكل 2) قابلية في تثبيت النتروجين بلغت 11 ملغم.لتر$^{-1}$ وانتاج IAA بتركيز 8.3 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

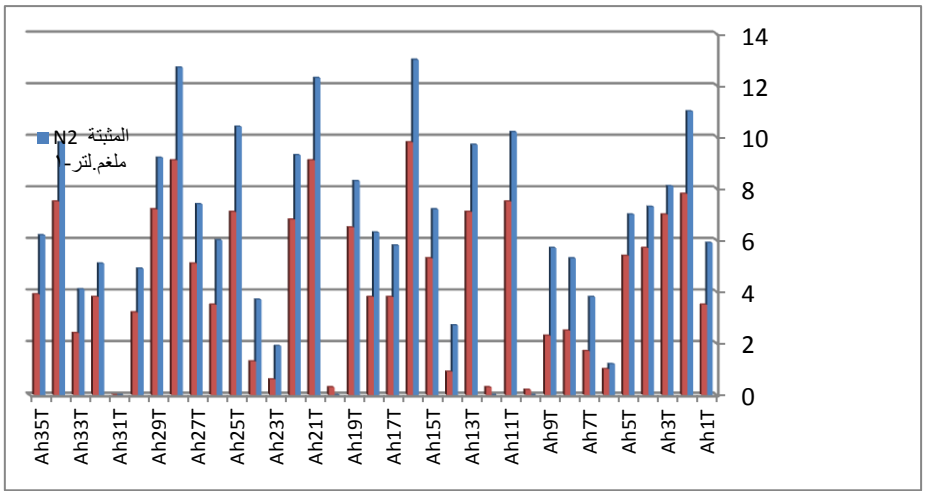
يبين الشكل (4) كفاءة عزلات بكتريا *A.brasilense* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك ، إذ نلاحظ من الشكل ان 8 عزلات من بكتريا *A.brasilense* غير قادرة على تثبيت النتروجين الجوي في حين ان 81 عزلة كانت قادرة على التثبيت وبنسب مختلفة ، في حين أن عزلة واحدة كانت غير قادرة على انتاج IAA ، وأبدت العزلة Ab83T أعلى تثبيت للنتروجين إذ بلغ 14.7 ملغم.لتر$^{-1}$ وأعلى انتاج للاندول كان في العزلة نفسها إذ بلغ 10.6 مايكروغرام.مل$^{-1}$.



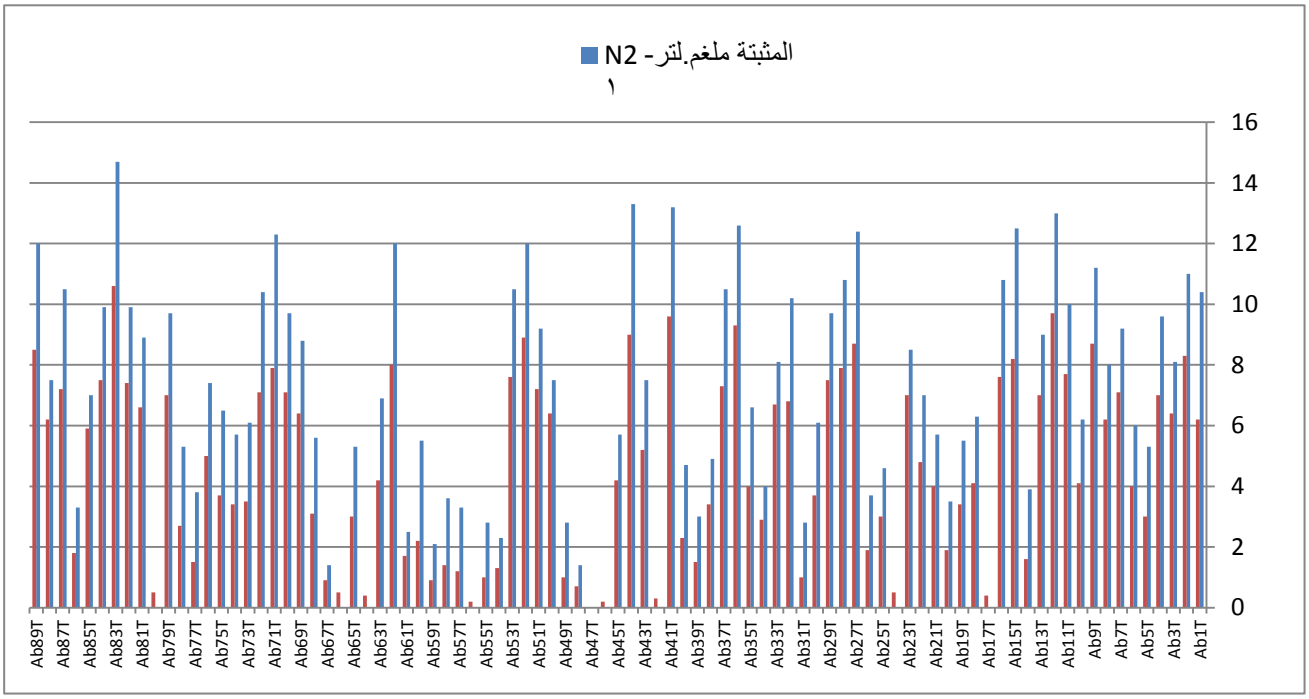
شكل (1) كفاءة عزلات بكتريا *A.lipoferum* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك



شكل (2) كفاءة العزلة Ai1T لبكتريا *A.irakense* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك



شكل (3) كفاءة عزلات بكتريا *A.halopraeferens* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك



شكل(4) كفاءة عزلات بكتريا *A.brasilense* في تثبيت النتروجين الجوي وانتاج الاندول حامض الخليك

بينت النتائج أن الاختلاف في تثبيت النتروجين وانتاج الاندول حامض الخليك قد يعزى إلى اختلاف التراكيب الوراثية للنوع الواحد ولاسيما فعالية انزيم النتروجينيز التي قد تختلف من عزلة إلى أخرى وهذا ينعكس على تثبيت النتروجين ، أي أن عملية التثبيت عملية حيوية تقوم بها بعض الأحياء المجهرية مشتركة مع النبات المضيف لذا فان هذه العملية تحتاج إلى ظروف معينة معتمدة على خصائص هذا الكائن الحي المجهري والظروف البيئية المحيطة (السالم ،2003) ، بينت البشير ،(2003) ان العزلة *A.brasilense* (M8) أعطت أعلى قيمة لتثبيت النتروجين إذ بلغت 9.7 ملغم. لتر$^{-1}$ ، وكذلك بين Kanimozhi و Panneerselvam (2010) ، إن العزلة *A.brasilense* (PA03) أبدت أعلى قدرة لتثبيت النتروجين بلغت 15.6 ملغم. لتر$^{-1}$.

وأشارت دراسات عديدة بان للأحياء المجهرية دور مهم في انتاج مديات واسعة من الهرمونات النباتية ولاسيما الاندول حامض الخليك IAA (Burdman وآخرون ، 1996 ؛ Noel وآخرون ، 1996 ؛) ، اذ وجد Cassan واخرون ، (2009) ان السلالة Az39 العائدة للنوع *A.brasilense* قد تفوقت في انتاجها للIAA إذ بلغت 13.16 مايكروغرام لكل مل ، وهذا الاختلاف قد يعود إلى طبيعة وقابلية بكتريا الازوسبيرلم لأنتاج هذه الهرمونات (Jain و Partiquin ، 1985)كما بين Tien وآخرون ،(1979) أن بكتريا *A.brasilense* المثبتة للنتروجين والمعزولة من رايزوسفير مختلف الحشائش تختلف في أنتاجها للـــIAA ويعتمد ذلك على تركيز الحامض الاميني الـــTryptophan المضاف للوسط ، كما أشار الباحث نفسه إلى أن عمر المزرعة البكتيرية يؤثر على أنتاج الهرمونات حتى الوصول إلى طور الثبات (Stationary phase).

المصادر

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

السالم ، هتاف عبد الملك احمد (2003) . تلقيح نبات الشعير ببكتريا الازوسبيرلم *Azospirillum brasilense* واستجابتها لإضافة الحديد والموليبدنم . أطروحة دكتوراه .كلية الزراعة . جامعة بغداد .

ظاهر ، عبد الزهرة طه .(2001) . استجابة نباتات الذرة الصفراء للتلقيح ببعض أنواع بكتريا الازوسبرلم *Azospirillum* spp. . أطروحة دكتوراه .كلية الزراعة . جامعة بغداد .

مهدي ، ندى زكي . (1995) . عزل و تشخيص وكثافة بكتريا*Azospirillum*في المنطقة الجذرية لنبات الرز

في محافظة ديالى . رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

Akbari, Gh.; Arab. S.M.; Alikhani, H.A. ; Allahdadi ,I. and Arzanesh , M.H.(2007). Isolation and selection of indigeous *Azospirillum SPP*. And the IAA of superior stains effect on wheat Roots World .J. Agri.Sci. 3(4): 523 – 529.

Baldani,V.L.D. and J.Dobereiner .(1980) . Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem. 12:433-439.

Baldani,V.L.D.;M.A.Alvarez;B.de;J.I.Baldani, andJ.Dobereiner.(1986). Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. In the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum.Plant and Soil. 90: 35-46.

Bashan, Y.; levanony , H. and Klein, E.(1986). Evidence for aweak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* cd to wheat roots . J. Gen. microbial. 132:3069-3073.

Bashan, Y.; Levanony , H. and Mttiku,G.(1989a). Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* cd. Can.J. microbial . 35:691-697.

Bashan, Y.; Singh, M. and Levanony,H.(1989b). Contribution of *Azospirillum brasilense* cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation . can . J. Bot. 76:2429-2434.

Black, C.A. (1965).Methods of soil analysis.part 1. Physical properties Amer Soc . Agron. Inc. publisher, Madison Wisconsin, 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.

Burdman ,S.; H.Volpin.; J.Kigel.; Y.Kapulnik., and Y.Okon ,(1996) . Promotion of nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol . Biochem. 29: 923- 929.

Cassan, F.; D. Perrig; V. Sgroy; O. Masciarelli; C. Penna and V. Lune,(2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max L.*). Eur. J. of Soil Biol., 45 : 28-35.

Chaboud ,A. and Rougier,M.(1981).Secretions racnaries mucilaginease role rhizosphere. Ann. Biol. 20:313-362.

Dobereiner , J. and Day, J.(1976). Associative Symbiosis in tropical grasses . characterization of Microorganisms and dinitrogen . fixing sites .In: Newton , W.E. , and Nymans , C.J. cedsj. Proceeding of the Ist international symposium on nitrogen fixation . Vol.2.pp.518 – 538 washingtion state university Paress Pulluman .

Gamo,T. 1991. *Azospirillum* spp. From crop roots. A promoter of plant growth. J.A.R.Q. 24: 253-259 .

Gnanamanickam , Samuel S. (2006).Plant-Associated Bacteria ,University of Madras , Chennai , India.

Holt,J. ;N.R.Krieg ;P.H.A.Sneath ;J.T.Staley and S.T.WillIams.(1994). Bergey's manual determinative bacterioiogy. 9th, ed. USA.

Horemanc, S. ; De Koninck ; K. and Vlassak, K. (1988). Aspects of the ecology of *Azospirillum Sp.* In Belgian soils . In *Azospirillum* . IV. Genetics , physiology , ecology , Edited by W.Klingmuller. Springer –Verlag , Berlin

Jain , D.K. and Patriquin , D.G. (1984) . Root hair deformation bacterial attachment and plant growth in wheat – *Azospirillum* associations. Appl. Environ. Microbial 48 : 1208 – 1213 .

Jofre , E .; Rivarola , V. ; Balegno , H . ;Mori , G. (1998). Differential gene expression in *Azospirllum barasilense* cd under saline stress. Can. J. Microbiol . 44(10) :929 – 936.

Kanimozhi ,K. and Panneerselvam A,(2010). Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp. Isolated from Thanjavur district. Der Chemica Sinica, 1(3): 138 – 145 .

Kapulnik, Y; Sarig , S.,Sarig, s., Nur , I. and okon, Y. (1983). Effect of *Azospirillum* inoculation on Yield of Field grown wheat . can . J.microbiol. 29:895-899.

Khammas , K.M.; Ageron , E.; Grimont , P.A.D. and Kaiser, P.(1989). *Azospirillum irakense sp*. Nov., Anitrogen . Fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere Soil .Res. microbial . 104 : 679 – 693.

Krieg , N.R. and Dobereiner , J.(1984). Genus *Azospirillum* In :Krieg , N.R. and Holt , J.G. (eds) . Bergeye's Manual Of systematic Bactriology , Vol.1.pp. 94- 104 williams and wilkins , Baltimor. London .

Noel,T .; C.Sheng .; C.Yost.; R.Pharis., and M.Hynes ,1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth promoting rhizobacterium : direct growth promoting of canola and lettuce. Can. J. Microbiol. 42: 279- 283.

Reinhold B.; Hurek T. Baldani ; I. and Dobereiner, J.(1988) . Temperature and salt tolerance of *Azospirillum*. IV . Genetics, physiology, ecology .Edited by W. Kling muller . springer. Verlag , Berlin, Heidelberg pp.234-241.

Rodriguez –caceres , E.A.(1982) . Improved medium For isolation of *Azospirillum spp.* Appl. and Environ . microbiol .44: 990 – 991.

Schmidt,E.L. 1979.Initation of plant root-microbe interaction. Annu. Rev. Microbiol. 33: 355 - 376.

Shaheen , A.M.; Fatma , A.R.; Omiama , M.S. and Ghoname , A.A.(2007). The Intergrated use of Bio-inculants and chemical Nitrogen fertilizer on Growth Yield and Nutritive value of Two okra (*Abelmoschus Esculentus, L.*). cultivears. Aus. J. Basic and Applied Sci, 1(3): 307 – 312.

Tarrand , J.J. ; Krieg , N.R. and Dobereiner , j.(1978). Ataxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of anew genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species , *Azospirillum Lipoferum* (Beijerink) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov, can.J. microbiol. 24 : 967 – 980.

Tien,T.m.; Gaskins,M.H. and Hubbel,D.H. (1979). Plant growth substances produced. by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum L.*) Appl. Environ. Microbiol., 37 : 1016-1024.

Umali-Garcia; M. Hubbell, D.H.; Gaskins, M.H. and Dazzo, F.B. (1980). Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Environ. Microbiol. 39: 219-226.