عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus polymyxa* المذيبة للفوسفات من بعض ترب جنوبي العراق وكفاءتها في اذابة الفوسفور

عبد المهدي صالح الأنصاري عبد الزهرة طه ظاهر زينب كاظم حسن

الملخص

تضمنت الدراسة عزل وتنقية وتشخيص عشرة عزلات من البكتريا المذيبة للفوسفات من ترب رايزوسفير نباتات الحنطة والشعير والطماطة المزروعة في مناطق مختلفة من جنوب العراق (ابو الخصيب والزبير– محافظة البصرة والشطرة – محافظة ذي قار). اعتمادا على مفاتيح التشخيص الخاصة اظهرت النتائج بان البكتريا المعزولة تتبع الى الجنس ***Bacillus*** والنوع ***polymyxa*** . وان اقص اذابة للفوسفات كانت عند التلقيح بالعزلة **B2** بعد **21** يوماً و **14** يوماً من الحضن لسمادي السوبر فوسفات والصخر الفوسفاتي على التوالي. وان اعلى زيادة للحموضة الكلية وانخفاض في **PH** للوسط الزراعي كانت عند الايام الاولى من الحضن لكلا السمادين .

المقدمة

يعد عنصر الفوسفور من العناصر الاساس الكبرى التي يحتاجها النبات في نموه الا انه يتعرض في التربة الى العديد من التفاعلات مثل الترسيب والامتزاز وغيرها التي تجعل الكمية الجاهزة منه للامتصاص غير كافية لنمو النبات، مما ينعكس سلباً على كفاءة السماد الفوسفاتي المضاف، إذ ذكر **El-Komy** وجماعته (**11**) ان كفاءة الاسمدة الفوسفاتية لاتتجاوز **25 –30%**وهذا يتطلب إضافة كميات كبيرة من الاسمدة الفوسفاتية مما يضيف تكاليف مالية على كاهل المزارعين اضافة الى تاثيرها السلبي على البيئة. لذا تم اتباع بعض الوسائل الممكنة لرفع كفاءة السماد الفوسفاتي ومن تلك الوسائل التسميد الحيوي (**Biofertilization**) التي تتم من خلال إضافة لقاحات حيوية (البكتريا او الفطريات) مفردة او مع الأسمدة الكيميائية وهي طريقة شائعة الاستعمال في كثير من الدول مثل الهند وأمريكا وروسيا (**31**) ، ذكر **Harrigan** و**Cane** (**13**) ان التربة تحوي اعداداً كبيرة من الاحياء المجهرية المذيبة للفوسفات وبين **Alexander** (**6**) أن **10–50 %** من أجناس البكتريا في التربة لها القدرة على إذابة الفوسفور من مصادرها غير الذائبة، واشتملت هذه العزلات على الأجناس ***Bacillus*** و***Micrococcus*** . وهذ يتم بفعل جملة من الميكانيكيات منها انتاج الحوامض العضوية مثل **citric, lactic** وغيرها (**22**) وكذلك من خلال انتاج حوامض غير عضوية مثل كربونيك او الكبريتيك (**30**) او بانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين نتيجة النشاط المايكروبي مما يؤدي الى خفض **Ph** (**29**) او من خلال افراز لبعض الانزيمات مثل انزيم الفوسفتيز (**11**)، ونظراً لقلة الدراسات الخاصة بعمل التلقيح الحيوي في كفاءة الاسشمدة وعملها في زيادة الانتاج في العراق بصورة عامة وفي المنطقة الجنوبية بصورة خاصة . لذا فقد استهدفت الدراسة:

1– عزل وتنقية وتشخيص البكتريا المذيبة للفوسفات من تربة رايزوسفير نباتات الحنطة والشعير والطماطة النامية في مناطق الشطرة وابو الخصيب والزبير من جنوب العراق.

2– دراسة كفاءة هذه العزلات في تغييرقيم لد **pH** والحموضة الكلية واذابة الفوسفور في الوسط الزرعي

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الثالث

كلية الزراعة – جامعة البصرة– البصرة ، العراق.

تاريخ تسلم البحث: نيسان/**2014**.

تاريخ قبول البحث: شباط/**2015**.

المواد وطرائق البحث

عزل وتشخيص البكتريا المذيبة للفوسفات

جمعت ترب الرايزوسفير لنباتات الشعير والحنطة والطماطة النامية في مناطق الزبير وأبو الخصيب في محافظة البصرة ومن منطقة الشطرة في محافظة ذي قار. عزلت البكتريا المذيبة للفوسفات من تربة الرايزوسفير الملاصقة للمجموع الجذري لهذه النباتات، باستخدام الوسط الزرعي البيكوفيسكي المحور من قبل **perber** (27) واعتماداً على ظهور الهالة الشفافة حول المستعمرات النامية حسب ماجاء في **El-Komy** (11) ثم شخصت باستخدام مفاتيح التشخيص الموضحة في جدول (1)

جدول 1: الصفات المدروسة لتشخيص البكتريا المذيبة للفوسفات (**Bacillus**)

الصفة المدروسة	المصدر
اختبار صبغة كرام	(1)
اختبار الحركة	(1)
تكون السبورات	(1)
التحميض والتخمير الهوائي واللاهوائي للكلوكوز	(16)
استخدام المصادر الكربونية	(16)
اختزال النترات والقيام بعملية عكس النترجة	(25)
اختبار تحلل النشا	(3)
اختبار تحلل الجيلاتين	(3)
اختبار الاندول	(3)
اختبار شكل الخلية	(3)
النمو بوجود 5 و 7.5 % كلوريد الصوديوم	(16)
النمو في درجة الحموضة 6 و7	(16)
اختبار انزيم الفوسفتيز	(16)
انتاج انزيم الكاتليز	(14)
انتاج انزيم الاوكسيديز	(25)

قياس كفاءة إذابة الفوسفات

وضع 150مل من وسط بيكوفيسكي السائل الخالي من الفوسفات في فلاسكات زجاجية سعة 250 مل وبعد ضبط pH الوسط عند 7.4 أضيف الفسفور بهيئة سوبر فوسفات الكالسيوم الثلاثي (20% فسفور) اوصخر الفوسفاتي المطحون (10% فسفور) وبتركيز 0.115 و1 غم لكل250مل وسط زرعي على التوالي .عقم الوسط بالموصدة على حرارة 121مْ وضغط 1.5 باوند/انج لمدة 15 دقيقة ، بعدها لقح بـ 1مل (تركيز 1×10^8 خلية لكل مل) من العزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات بعمر 24 ساعة مع ترك فلاسكات دون لقاح (معاملات مقارنة). حضنت الدوارق في الحاضنة الرجاجة بسرعة 100دورة بالدقيقة ثم سحب 9ملم من الوسط بعد (2و 8 و 14 و 21 و 28) يوماً لتقدير PH والحموضة الكلية حسب طريقة (26) والفوسفور الجاهز حسب ما ماورد في **Nahas** (23)

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص البكتريا المذيبة للفوسفات

يوضح جدول (2) الصفات المظهرية والكيميائية والكيموحيوية لعزلات البكتريا المذيبة للفوسفات المعزولة من ترب مناطق رايزوسفير النباتات المستعملة في الدراسة . وتظهر النتائج بان اغلب العزلات ذات أشكال بين عصوية رفيعة وعصوية قصيرة والمستعمرات دائرية الشكل بحواف منتظمة لها سطح مرتفع ولماع، امتازت بلونها الأبيض المصفر والهلامي والبني الفاتح وظهرت تحت المجهر الاعتيادي بإنها موجبة لصبغة كَرام وذات حركة بروانية في الوسط السائل.

جدول 2: الصفات المظهرية والكيموحيوية للبكتريا المذبية للفوسفات

	منطقة العزل	Mol	pH 6	pH 7.5	Grow. 5C°	NaCl7%	NaCl5%	تخمر هوائي	Lact.	Gluc.	Ind.	Oxi.	Cata.	Star.	Nitrit reducfase	Phosph. Tase	Gela	Spor.	Casin	Citra.	Gram stain	شكل الخلية	شكل المستعمرة	الحافة	الارتفاع	السطح	اللون
B_1	حنطة الشطرة	+	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+/-	عصية رفيعة	دائرية	منتظمة	مرتفعة	لماع	بيضاء مصفرة
B_2	حنطة الشطرة	+/-	+	+	+	++	+/-	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	عصية رفيعة	دائرية	منتظمة	مرتفعة	لماع	بيضاء مصفرة
B_3	شعير أبي الخصيب	+/-	+/-	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+/-	+	عصية قصيرة	دائرية	منتظمة	منبسطة	لماع	هلامية
B_4	حنطة الشطرة	+	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	عصية رفيعة	دائرية	منتظمة	منبسطة	لماع	بيضاء مصفرة
B_5	حنطة الشطرة	+	+	+/-	+	++	++	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	عصية قصيرة	دائرية	منتظمة	منبسطة	لماع	بيضاء مصفرة
B_6	طباخة الزبير	+	+	+	+	++	++	+/-	+	+	++	+	+	++	++	+	++	+/-	+	+	+	+	عصية رفيعة	دائرية	منتظمة	مرتفعة	لماع	هلامية
B_7	حنطة الشطرة	++	+	+	+	+/-	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	عصية قصيرة	دائرية	منتظمة	مرتفعة	لماع	بيضاء مصفرة
B_8	طباخة الزبير	+	+	+/-	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-	+/-	+/-	+	+	عصية قصيرة	دائرية	منتظمة	منبسطة	لماع	بيضاء مصفرة
B_9	طباخة الزبير	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+	+	+	عصية رفيعة	دائرية	منتظمة	منبسطة	لماع	بيضاء مصفرة
B_{10}	حنطة الشطرة	+/-	+	+	+	++	+/-	++	+	+	++	+	+	+/-	+	+	+/-	-	+/-	+	+	+/-	عصية قصيرة	دائرية	منتظمة	مرتفعة	لماع	بني فاتح

+ الاختبار موجب؛ - الاختبار سالب؛ +/- أكثر الفولات موجبة للاختبار ؛ ±/- أكثر الفولات سالبة للاختبار

أظهرت الصفات الكيميائية للعزلات المدروسة بان اغلبها تنمو في pH 6 و5 .7 . تباينت العزلات في قدرتها على النمو في التركيزين 5 و 7.5 % لملح كلوريد الصوديوم ، وأظهرت الاختبارات الكيموحيوية قدرة غالبية العزلات على تكوين السبورات وإنها موجبة لاختبار الكاتليز والاوكسديز وهي هوائية اجبارية . تعتمد العزلات جميعها على الكاربون بوصفها مصدراً للطاقة من خلال استهلاكها مركبات سكرية مثل كلاكوز واللاكتوز وامتازت بعدم إنتاجها للاندول نترات الى نتريت (عدا العزلتين B_3 و B_6) اغلبهما غير مختزل لنترات . كما ظهر أن غالبية العزلات لها قدرة على إفراز إنزيم الفوسفتيز (عدا B_8 و B_9) .

استناداً الى الصفات المظهرية والكيموحيوية للعزلات المدروسة المذكورة في أعلاه واعتماداً على Bergeys وجماعته (10) . فقد تم تشخيص العزلات بأنها تتبع لجنس *Bacillus* والنوع *polymyxa* . أشارت بعض من الدراسات الى أن الترب العراقية تكون غنية بعزلات البكتريا المذيبة للفوسفات (4).

كفاءة العزلات في اذابة الفوسفات :

قطر الهالة الشفافة

يوضح جدول (3) تباين أقطار الهالة الشفافة حول المستعمرات للعزلات المختلفة التي تعد مؤشراً على قابلية الأحياء على إذابة الفوسفور ، فقد تراوحت ما بين 0.8 سم للعزلات B7 وB9 و2.5 سم للعزلتينB1 وB5 . تشير بعض المصادر الى أن تكوين الحلقة الشفافة حول المستعمرات يدل على قدرة العزلة في إذابة الفوسفات (11) ووجد الجنابي (2) ان العزلة ذات منطقة اذابة رائقة قطرها 1. 45 اكثر كفاءة من العزلة ذات منطقة اذابة رائقة قطرها 0. 15 سم في اذابة الفوسفات. من جانب اخر تشير بعض المصادر الى انه لايفترض الاعتماد على قطر الهالة الشفافة (قطر الاذابة) دليلاً قاطعاً على اذابة الفوسفات في الوسط. فقد يرجع تكوين الهالة الشفافة الى اذابة مركبات اخرى كالنشأ وغيره نتيجة لإذابة الترسبات الناعمة من فوسفات الكالسيوم غير الذائبة قبل صبها بالاطباق الحاوية على تخافيف تربة الرايزوسفير(5، 17،30).

جدول3: قياس قطر الإذابة (سم)

ت	منطقة العزل	قطر الإذابة بـ (سم)
B1	حنطة \ الشطرة	2,5
B2	حنطة \ الشطرة	1,8
B3	شعير\ أبي الخصيب	2
B4	حنطة \ الشطرة	1,3
B5	حنطة \ الشطرة	2,5
B6	طماطة \ الزبير	1
B7	حنطة \ الشطرة	0,8
B8	طماطة \ الزبير	1
B9	طماطة \ الزبير	0,8
B10	حنطة \ الشطرة	1,2

درجة تفاعل الوسط (pH)

يظهر من الجدولين (4 و5) اختلافاً معنوياً قابلية العزلات المختلفة على خفض PH الاوساط الزراعية، أذ انخفض من 6.8 عند معاملة المقارنة الى 5.5 في الوسط الملقح بالعزلة B_2 في الأوساط المعاملة بالسوبر فوسفات ومن

7.5 عند معاملة المقارنة الى 5.9 عند التلقيح بالعزلة B_2 في الوسط المعامل بسماد الصخر الفوسفاتي . اظهرت نتائج (جدول 4). أن أدنى قيماً للـ pH كانت في الأوساط الملقحة بالعزلة B_2، إذ بلغت 5.5 وتراوحت للاوساط المعاملة بالعزلات B_1 . B_3 . B_8 ما بين 6.1 و 6.3 في حين لم تظهر العزلات B_6 B_7 B_9 . B_{10} فروقاً معنوية في قيم الـ pH أوساطها التي تراوحت ما بين 6.7 الى 6.8 ولم تختلف معنوياً عن قيم PH معاملة المقارنة التي بلغت 6.8 في معاملة السوبرفوسفات. أما الأوساط الملقحة بالعزلات المختلفة والمعاملة بسماد الصخر الفوسفاتي (جدول 5) ، فقد أظهرت النتائج ا ن أدنى قيماً الـ pH كان عند الوسط الملقح بالعزلة B_2 الذي بلغ 5.9 في حين بلغت عند العزلتينB_1 و B_5 6.6 و 6.7 على التوالي لم تظهر بقية العزلات فروق معنوية فيما بينها في قيم pH الوسط، إذ تراوحت بين 7.8 و 7.5 التي لم تختلف معنوياً عن قيم pH وسط معاملة المقارنة التي بلغت 7.5.

لوحظ أن انخفاض قيم الـ pH في الوسط الزرعي عند التلقيح بالبكتريا المذيبة للفوسفات من قبلEl-Komy (11) وعند استخدام عزلات مذيبة للفوسفات وذكر Salimpour وجماعته (24). ان انخفاض pH الوسط الذي تنمو فيه عزلات بكتريا المذيبة للفوسفات من أهم مؤشرات نشاط تلك العزلات. ويعزى سبب انخفاض الـ pH وسط نمو العزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات والحاوي على سمادي السوبر فوسفات والصخر الفوسفاتي الى زيادة نشاط والفعاليات الايضية لتلك العزلات. اشار Moreau (21) وأنه ليس كل العزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات المأخوذة من نماذج ترب في البرازيل كعزلة *Bacillus licheniformis* لها القدرة على إحداث تغييرات في قيم الـ pH للاوساط الزرعية المعاملة بسماد الصخر الفوسفاتي كالذي تسببه في الاوساط المعاملة بسماد السوبر فوسفات .

جدول 4: تأثير العزلة المذيبة للفوسفات ومدة الحضن في قيم الـ pH وإنتاج الحموضة الكلية للوسط السائل الحاوي على سماد السوبر فوسفات المركز

مدة الحضن	2 يوم		8 ايام		14 يوماً		21 يوماً		28 يوماً		المعدل العام	
العزلة	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية
المقارنة	7.2	0.11	6.3	0.21	7.1	0.12	6.3	0.31	8.2	0.12	6.8	0.17
B_1	5.3	0.94	5.9	0.98	5.7	0.95	7.6	0.21	7.4	0.16	6.1	0 .65
B_2	5.2	0.75	5.6	0.78	4.9	0.98	5.5	0.84	6.2	0.75	5.5	0.89
B_3	4.5	1.1	5.1	1.07	5.7	1.04	6.7	0.3	8.2	0.27	6.1	0.76
B_4	4.9	1.2	6.7	0.66	8.7	0.075	8.6	0.17	8.2	0.23	7.3	0.47
B_5	5.6	0.75	5.3	0.88	5.6	1.2	6.3	0.56	6.2	0.75	5.8	0.82
B_6	4.9	1.38	5.2	0.95	6.9	0.32	8.3	0.13	8.5	0.13	6.7	0.58
B_7	5.2	0.72	5.2	0.75	6.6	0.45	7.7	0.11	8.1	0.05	6.6	0.49
B_8	4.95	1.07	5	1.03	7.1	0.27	6.2	0.68	8.3	0.13	6.3	0.64
B_9	4.8	0.97	5.2	1.3	7.4	0.11	8.2	0.019	8.6	0.12	6.8	0.5
B_{10}	4.95	1.25	5.8	0.96	6.9	0.56	7.2	0.28	7.3	0.21	6.8	0.65
المعدل العام	5.2	0.93	5.8	0.87	6.6	0.54	7.2	0.33	7.8	0.26		
$RLSD_{0.05}$	pH		الحموضة الكلية									
العزلات	0.29		0.018									
مدة الحضن	0.20		0.039									
العزلات×مدة الحضن	0.68		0.19									

جدول 5: تأثير العزلة المذيبة للفوسفات ومدة الحضن في قيم الـ pH وإنتاج الحموضة الكلية للوسط السائل الحاوي على سماد الصخر فوسفات

مدة الحضن / العزلة	2 يوم		8ايام		14 يوماً		21 يوماً		28 يوماً		المعدل العام	
	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية	pH	حموضة كلية
المقارنة	6.9	0.6	7.2	0.2	7.5	0.05	8	0.09	8.6	0.01	7.5	0.13
B_1	5.1	1.2	4.6	1.3	6.6	0.75	8.2	0.2	8.5	0.02	6.6	0.69
B_2	5.5	1.0	6.1	0.9	6.6	0.75	5.5	0.96	6	0.19	5.9	0.9
B_3	5.9	0.79	7.1	0.12	8	0.08	8.3	0.03	8.1	0.1	7.5	0.2
B_4	6.5	0.5	7.5	0.1	8.8	0.03	8.3	0.03	8	0.09	7.8	0.2
B_5	5.7	0.8	7.4	0.16	6.9	0.6	6.3	0.7	7.2	0.15	6.7	0.4
B_6	5.95	0.3	7.3	0.07	7.9	0.05	7.9	0.04	8.4	0.02	7.5	0.11
B_7	7.2	0.08	8.2	0.08	8	0.09	8.6	0.06	8.4	0.02	8.1	0.06
B_8	6.1	0.6	7.3	0.07	7.1	0.3	7.9	0.15	8.3	0.03	7.3	0.23
B_9	7.9	0.03	7.7	0.04	8.4	0.06	7.3	0.07	7.6	0.13	7.8	0.07
B_{10}	6	0.7	7.9	0.03	8.2	0.07	8.3	0.05	8.8	0.01	7.8	0.17
المعدل العام	6.9	0.6	7.1	0.3	7.5	0.25	7.7	0.23	8.6	0.07		

$RLSD_{0.05}$	pH	الحموضة الكلية
العزلات	0.48	0.06
مدة الحضن	0.32	0.04
العزلات×مدة الحضن	1.07	0.14

ويتضح من الجدولين (4 و5) أن التغيير في الـ pH للأوساط الملقحة بالبكتريا المذيبة للفوسفات اثناء مدد الحضن يعتمد على نوع العزلات البكتيرية اذ بلغ 4.5 في الوسط المعامل بالسوبر فوسفات والملقح بالعزلة B_3 مقارنة بـ 7.2 عند معاملة المقارنة بعد يومين من الحضن . أما في الأوساط المعاملة بصخر الفوسفات فقد بلغ ادنى pH الوسط (5.1) بتأثير العزلة B_1 مقارنة بـ 6.9 في معاملة المقارنة المعاملة بصخر الفوسفات عند مدة الحضن نفسها . كما ويتضح من الجدولين (4و 5) بان تأثير التلقيح بالبكتريا المذيبة للفوسفات في خفض pH الوسط يتلاشى بمرور الوقت حيث ارتفع الـ pH الوسط من 5.2 (كمعدل) الى 7.8 في الأوساط المعاملة بالسوبر فوسفات ومن 6.9 الى 8.6 في الأوساط المعاملة بصخر الفوسفات بعد زيادة مدة الحضن من 2 الى 28 يوماً . لم تظهر النتائج وجود تباين في سلوك الأنواع المختلفة للعزلات المستعملة في الدراسة في تأثير فترة الحضن على تغير الـ pH الوسط من حيث تلاشي تاثير العزلات البكتيرية في خفض الـ pH بزيادة فترة الحضن من 2 الى 28 يوماً وللمصدرين السمادين المستخدمة بالدراسة. وهذا يتفق مع ما ذكر El-Komy (11) و Illmer (17) .اللذان أشارا الى أن انخفاض قيم pH الوسط يكون أقصاه في مدة الحضن الأولى للعزلات الملقحة بالبكتريا المذيبة للفوسفات بوجود السوبر فوسفات إلا أن هذا الانخفاض الـ pH يتلاشى في الفترة المتأخرة من الحضن وعند العزلات البكتيرية كافة عازيا ذلك الى ان أعلى مستوى من إنتاج الحوامض العضوية يكون عند المدة الأولى من الحضن من جانب اخرو وجد Baridya و Gaur (9) ارتفاع في قيم pH الوسط عند بعض العزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات عند مدد الحضن الأولى.

الحموضة الكلية

يتضح من الجدولين (4و5) أن تلقيح الوسط الزرعي بالعزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات أدى الى زيادة في معدل الحموضة الكلية من 0.17 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط زرعي عند معاملة المقارنة الى 0.89 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط زرعي بتأثير التلقيح بالعزلة B_2 في الوسط المعامل بسماد السوبر فوسفات وارتفعت الحموضة الكلية من 0.13 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط زرعي عند معاملة المقارنة الى 0.9 ملي مكافئ مل$^{-1}$ الوسط الملقح بالعزلة B_2 و المعاملة بالصخر الفوسفاتي . تبين النتائج أن قيم الحموضة الكلية للعزلات الباقية تراوحت بين 0.47 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط عند العزلة B_4 و 0.82ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط عند التلقيح بالعزلة B_5 في الأوساط المعاملة بالسوبر فوسفات ، ويلاحظ عدم وجود فرق معنوية في قيم الحموضة بين العزلتين B_1 و B_{10} إذ بلغت الحموضة 0.65 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط . أما في الأوساط المعاملة بالصخر الفوسفاتي فقد تراوحت قيم الحموضة الكلية بين 0.06 ملي مكافئ مل$^{-1}$ الوسط عند العزلة B_7 و 0.69 ملي مكافئ مل$^{-1}$ الوسط عند العزلة B_1 ويلاحظ عدم وجود فرق معنوي بين العزلتين B_3 و B_4 في مقدار الحموضة الكلية إذ بلغت 0.2 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط. أن الكثير من عزلات بكتريا ***Bacillus sp.*** لها القدرة على إنتاج حوامض عضوية مثل **Oxalic** و**2-Ketogluconic** و**Succinic** (28). وحوامض لاعضوية مثل **Carbonic** و **Sulfuric** (29) . وذكر **Mikanova,** (20) أن قدرة العزلات المذيبة للفوسفات من مصادرالسوبر فوسفات أو الصخر الفوسفاتي تختلف حسب نوع العزلة البكتيرية معللاً السبب اختلاف قدرة هذه العزلات على إنتاج الحوامض العضوية وأكثر هذه الحوامض إنتاجاً هو حامض **Lactic acid** .

ويظهر من الجدولان (4و5) أن ارتفاع الحموضة الكلية كان اقصاه عند المدد الأولى من الحضن (بعد 2 يوم)، اذ انخفض معدل الحموضة الكلية من 0.93 ملي مكافئ مل$^{-1}$وسط عند الزمن 2 يوم الى 0.26 ملي مكافئ مل$^{-1}$وسط عند 28 يوماً بوجود السوبر فوسفات في 0.6 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط عند 2 يوم الى 0.07 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط بعد 28 يوماً للأوساط المعاملة بالصخر الفوسفاتي. بين **Vazquez** وجماعته (32) بان معدل إنتاج حامض **Succinic acid** قد انخفض من 0.05 ملي مكافئ لتر$^{-1}$ بعد 48 ساعة من الحضن الى 0.026 ملي مكافئ لتر$^{-1}$ بعد إطالة مدة الحضن الى 72 ساعة .

يشير الجدولان (4و5) أن التغيير في مقدار الحموضة الكلية للأوساط الملقحة بالبكتريا المذيبة للفوسفات يعتمد اثناء مدد الحضن على نوع العزلات إذ بلغ 1.38 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط بعد 2 يوم من الحضن بتأثير التلقيح في العزلة B_6 مقارنة بـ 0.11 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط عند معاملة المقارنة للأوساط المعاملة بالسوبر فوسفات اما في الاوساط المعاملة بالصخر الفوسفاتي فبلغ أقصى ارتفاعاً للحموضة الكلية 1.3 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط بتأثير العزلة B_1 بعد 8 ايام من الحضن مقارنة بـ 0.2 ملي مكافئ مل$^{-1}$ وسط عند معاملة المقارنة .

الفوسفور الجاهز

يظهر من الجدولين (6 و7) أن تلقيح الوسط الزراعي بالعزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات أدى الى زيادة كمية الفوسفور الجاهز من 1.2جزء بالمليون عند معاملة المقارنة غير الملقحة (وسط + سماد فوسفاتي) الى 73.9 جزء بالمليون عند العزلة B_2 النامية في الوسط المعامل بسماد السوبر فوسفات، ومن 0.57 جزء بالمليون عند معاملة المقارنة الى 56 جزء بالمليون بتأثير التلقيح في العزلة B_2 في الوسط المعامل بسماد الصخر الفوسفاتي تتفق هذه النتائج مع **El-Komy** (11) و**Salimpour** وجماعته (24) الذين اشاروا الى هناك زيادة في كمية الفوسفور المذاب في الوسط الحاوي على السوبر فوسفات الثلاثي المركز الملقح بعزلات بكتريا مذيبة للفوسفات واستنتج **Low** و**Webley (18)** ان فعالية اذابة الفوسفات المترسب من قبل البكتريا المذيبة للفوسفات تزداد مع زيادة

محتوى الوسط من الفوسفات المضاف. وذكر Finck (12) ان الأحياء المجهرية التي تمتلك القدرة على إذابة الفوسفات في الوسط تكون مشتركة جينياً باحتواء بلازما الخلايا على جينة عنقودية تمنحها صفة الإذابة للفوسفات في الوسط . اظهرت النتائج عدم وجود اختلاف معنوي في معدل تركيز الفوسفور المنطلق بتأثير العزلتين B_1 و B_3 وبين العزلتين B_5 و B_6 وكذلك بين العزلتين B_8 و B_9 (جدول 6) .أما بوجود الصخر الفوسفاتي فتظهر النتائج عدم وجود فرق معنوي بين معدل تركيز الفوسفور المنطلق بتأثير العزلات البكتيرية B_{10} وB_9 و B_7 وB_1 ، وبين العزلات B_8 وB_6 , B_5 وB_3 (جدول 7)

جدول 6: تأثير العزلة المذيبة للفوسفات ومدة الحضن في الفوسفور الجاهز (جزء بالمليون) في الوسط الزرعي المعامل بسماد السوبر فوسفات

مدة الحضن / العزلة	2 يوم	8 ايام	14 يوماً	21 يوماً	28 يوماً	المعدل العام
المقارنة	102	1.8	2.4	0.5	0.32	1.2
B_1	52	49.5	30.9	32.5	23	37.6
B_2	63	65	79.8	82.9	78.7	73.9
B_3	41	35.6	20	56.7	20	34.7
B_4	25.9	52	46.7	47	25.6	44.7
B_5	35.7	44.6	51.7	69.8	43.9	50.3
B_6	43	56.8	33.6	75.8	55	52.8
B_7	46	68.9	21.6	48.5	20	41
B_8	62	33	42.8	58	28	44.8
B_9	66	56.7	35.9	55	32.7	49.6
B_{10}	65.9	58	43	47	36	50.1
المعدل العام	45.6	47	42	54	33	

$RLSD_{0.05}$	الفوسفور الجاهز
العزلات	14
مدة الحضن	15
العزلات × مدة الحضن	16

جدول 7: تأثير العزلة المذيبة للفوسفات ومدة الحضن في بالفوسفور الجاهز (جزء بالمليون) في الوسط الزرعي المعامل بسماد الصخر الفوسفاتي

مدة الحضن / العزلة	2 يوم	8 ايام	14 يوماً	21 يوماً	28 يوماً	المعدل العام
المقارنة	1.2	0.78	0.5	0.28	0.11	0.57
B_1	46	18.5	53	13	11	28.3
B_2	55	65	75	45	40	56
B_3	66	32	53	21	17	37.8
B_4	15	12	16	32	17	18.4
B_5	19	34	59	32	24.5	33.7
B_6	33	26	31	27	33	30
B_7	26	29.6	33	21	14.8	24.9
B_8	48	18	49	25	28	33.6
B_9	25	22	16	15.8	13	26
B_{10}	36	25	25	24	21	26
المعدل العام	34.9	25.7	35.7	23.3	29	

$RLSD_{0.05}$	الفوسفور الجاهز
العزلات	4.79
مدة الحضن	3.22
العزلات × مدة الحضن	10.7

لاحظ Low و Webley (18) وجود فروق معنوية في قابلية ثمانية عزلات من البكتريا على إذابة الفوسفات في الوسط الحاوي على 40 جزءاً بالمليون من سماد السوبر فوسفاتي الثلاثي. وأعزى Asea و Kucey (7) ، Nahas (22) سبب اختلاف تأثير العزلات المذيبة للفوسفات في إذابة الفوسفور الى اختلاف العزلات البكتيرية في إتباعها لأحدى ميكانيكيات إذابة الفوسفات والتي تكون من خلال إنتاج الحوامض العضوية في الوسط من قبل عزلة معينة في حين عزلات أخرى تساهم في اذابة الفوسفور عن طريق إنتاج بعض الإنزيمات أو إنتاج مركبات مخلبية لها قدرة على خلب الكالسيوم من السماد الفوسفاتي المضاف وتحرر الفوسفور مما يؤدي الى زيادة تركيزه في الوسط .

كما يبين الجدولان (6 و7) أن لمدة الحضن تأثير معنوي في كمية الفوسفور الجاهز في الوسط، اذ بلغت أقصى كمية للفوسفور الجاهز (54 جزء بالمليون) عند مدة حضن 21 يوماً وأدنى كمية (33جزءاً بالمليون) عند مدة الحضن 28 يوماً الأوساط المعاملة بسماد السوبر فوسفات (جدول 6). أما بوجود سماد الصخر الفوسفاتي فقد بلغت أقصى كمية من الفوسفور الجاهز عند مدة حضن 14 يوماً (35.7 جزءاً بالمليون) واقل كمية (29 جزءاً بالمليون) عند مدة حضن 28 يوم (جدول 7) . وتشير النتائج ان كمية الفوسفور الجاهز في الأوساط المعاملة بسماد السوبر فوسفات قد تفوقت معنوياً على مثيلاتها في معاملات الصخر الفوسفاتي وعند جميع فترات الحضن حيث تراوح تركيز الفوسفور ما بين 33–54 جزء بالمليون وما بين 29 و 35.7 جزء بالمليون لمعاملات السوبر فوسفات والصخر الفوسفاتي على التوالي.

يتضح من الجدولين (6 و7) بان كمية الفوسفور الجاهزة في الوسط بلغت أقصاها بعد مدة حضن 21 يوماً إذ بلغ تركيز الفوسفور 82.9 جزء بالمليون في الوسط الملقح بالعزلة B_2 عند وجود السوبر فوسفات بينما بلغ أعلى تركيزاً للفوسفور بعد مدة حضن 14 يوماً و بلغ 75 جزءاً بالمليون عند التلقيح بالعزلة B_2 عند وجود صخر الفوسفات . في حين كان أدنى كمية من الفوسفور الجاهز عند التلقيح بالعزلة B_3 وعند مدة حضن 28 يوم و بلغ 20 جزء بالمليون في الأوساط المعاملة بالسوبر فوسفات و11جزء بالمليون عند التلقيح بالعزلة B1 في الاوساط المعاملة بصخر الفوسفات وعند مدة حضن 28 يوم

ان تأثير مدة الحضن على إذابة الفوسفور قد اختلف حسب المصدر الفوسفاتي المضاف وحاصل إذابته في الوسط وعلى مدى قدرة العزلات البكتيرية على إذابة وتحرر الفوسفور الى الوسط الزرعي. أشار El-Komy (11) Salimpour وجماعته (24) أن لمدة الحضن تأثيراً معنوياً في قدرة البكتريا المذيبة للفوسفات على إطلاق الفوسفور . وذكر Babenko وجماعته (8) ان سبب الانطلاق البطيء للفوسفور الذائب الى الوسط أثناء مدد الحضن الأولى قد يعود الى الفوسفات المذابة في الساعات الاولى قد يستهلك من قبل تلك البكتريا لأجل فعالياتها الايضية كعنصر مغذي لبناء أجسامها والفائض عن الحاجة يتحرر الى الوسط السائل. وذكر Mikanova و Kubat (19) بان حساسية البكتريا المذيبة للفوسفات خلال مدد الحضن تباين حسب المصدر الفوسفاتي المضاف للوسط واعدها عاملاً محدداً في كفاءة العزلات البكتيرية لإذابة السماد الفوسفاتي. يمكن الاستنتاج من الدراسة وجود البكتريا المذيبة للفوسفات في ترب جنوب العراق تتبع ***Bacillus polymyxa*** وتختلف كفاءتها باختلاف مناطق العزل مما يؤشر وامكان ادخال التسميد الحيوي جزءاً من برنامج تسميد متكامل لزيادة كفاءة الاسمدة الفوسفاتية في هذه المناطق .

المصادر

1- الحديثي، هديل توفيق (**1983**) . الكتاب العملي في أساسيات علم البكتريا. مطبعة جامعة البصرة

2- الجنابي، حمدي عبد الله نايف (**2001**). عزل وتشخيص البكتريا المذيبة للفوسفات من تربة محافظة الانبار ودراسة كفاءتها . رسالة ماجستير، كلية علوم الحياة، الموصل.

3- السلمي، أمين عبد الجبار وزهرة مراد علي (**1987**). تجارب مختارة في الأحياء المجهرية. مطبعة جامعة البصرة، العراق.

4- بهجة، دنحا يلدا (**1995**). تأثير الأحياء المجهرية المذيبة للفوسفات في جاهزية الفوسفور. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

5- ظاهر، عبدالزهرة طه (**1981**). دراسة الاحياء المجهرية المذيبة للفوسفات في منطقة جذور بعض المحاصيل. رسالة ماجستير ،كلية الزراعة ،جامعة بغداد، العراق.

6- **Alexander, M. (1982). Introduction of soil microbiology 2nd edition, Jhon. Wiley and Sons New York USA.**

7- **Asea, P.E. and R.M. Kucey (1988). Inorganic phosphate solubilization by two pencillium species in solution culture and soil. Soil. Boil. Biochem., 20: 459-464.**

8- **Babenko, Y.S.; G. Tyrygina; E.F. Grigoryev; L.M. Dolgikh and T.I. Borisova (1984). Biological activity and physiologo-biochemical properties bacteria dissolving phosphate, Microbiologiya, 53: 533-539.**

9- **Baridya, M.C. and A.C. Gaur (1974). Rock phosphate dissolution by bacteria. Indian J. of Microbiology, 12: 269-271.**

10- **Bergeys, D.H.; R.E. Buchanan and N.E. Gibson (1974). Manual of determinative bacteriology .8th edition,Baltimone:the William and wilkins company.**

11- **El-Komy, H.M. (2005). Coimmobilization of *Azospirillum lipoferm* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and Nitrogen nutrition of wheat plants. J. Food. Technol. Biotechnol. 43(1): 19-27.**

12- **Finck, A. (1992). Fertilizer and their efficiency use In: IFA, 19 .**

13- **Harrigan, W.F. and M.E. McCane (1966). Laboratory Methods in Microbiology acad. Press, London and New York.**

14- **Havlin, J.L.; J.D. Beaton; S.L. Tisdale and W.L. Nelson (2005). Soil fertility and Fertilizers "An Introduction to Nutrient Mangement "7th Ed PRENTIC Hall.NEW J.**

15- **Holt, J.; N. R. Krieg ; P. H. Sneath; J.T. Staley and S.T. Williams (1994). Bergey's Manual determinative bacteriology, 9th ed. U.S.A.**

16- **Illmer, P. (1995). Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microogansim. Soil Biol. Biochem. 27: 265-270.**

17- **Krieg, N.R. and J. Dobereiner (1984). Genus *Azospirillum* in : Krieg, N. R. and Holt, J. G. (eds.). Beery's Manual of systematic bacteriology, vol. I. pp, 94-104. William and Wilkins, Baltimore London**

18- **Low, H. and Webley (1958). A plant method for estimatins the numbers of phosphate dissolving and acid productivity. Bacteria in soil nature. Jonb. 182: 1317-1318.**

19- **Mikanova, O. and J. Kubat (1994). Phosphorus solubilization from hardly soluble phosphates by soil microflora, Rosh. Vyr. 45: 407-409.**

20- Mikanova, O.; J. Kubat; K. Vorisek; T. Simon and D. Randova (1997). Influence of soluble phosphate on P-Solubilizing activity of bacteria. Rosh. Vyr., 43: 421-424.

21- Moreau, R. (1960). The biological liberation of soluble phosphate from insoluble phosphorus compounds in soil. C. R. Acad. Sci. Paris. 249: 1804-1806.

22- Nahas, F. (1996). Factors determining rockphosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. WJ. Microbiol Biochem. 22: 1097-1101.

23- Roos, W. and W. Luckner (1989). Relation between proton and fluxes of ammonium ions and organic acids in Pencillium cyclopium, J. Gen Microbiol, 130: 1007-1014.

24- Salimpour, Si; K. Khavazi ; H. Nadian; H. Besharati and M. Miranari (2010). Enhancing phosphate availability to canola (*Brassica rapus* L.) using P solubilizing and sulfur oxidizing bacteria. A. J.C.S. 4(5): 330-334.

25- Shekhar, C.; S. Bhadauria; P. Kumar; H. Lal; R. Mondal and D. Verma (2006). Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS. Microbiology, 182: 291-296.

26- Smibert, M.R. and N.R. Krieg (1981). General characterization. In : Gerhardt P., Murray, R.G.E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood; W. A. Krieg; N. R. and Phillips, G. P. (eds.). Manual of Methods for general bacteriology. pp: 409-443. American Soc. for micro. Washington. D. C.

27- Sperber, J.I. (1957) .Nutr.180: 994-995 (cited by introduction of soil Microbiology,(1982)

28- Sundara-Rao, J.P. Sinha (1963). Solubilization of phosphate by phosphorous solubilizing organisms using P32. at trace and influence of seed bacterization on uptake by crop. J. Indian. Soc. Soil Sci., 11: 209-219.

29- Sundara, B.; V. Natarayan and K. Hari (2001). Influence of phosphorus solubilising bacteria on soil available P-status and sugar-cane development on a tropical vertisol. Proc. Soc. Sugar Cane Technol. 24: 47-51.

30- Tisdal, W.L.; W.L. Nelson; and J. Havlin (1993). Soil fertility and fertilizers . Macmillon publishing Co., New York.

31- Vazquez, M.; S. Cesar; R. Azcon and J. Barea (2000). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial moculants (Azospirillum, Pseudomonas, Trichoderma) and in the rhizosphere of maize plant, Appl. Soil. Ecol., 15: 261-272.

32- Webley, D. M. (1960). Evaluation of the plates technique in use for studing phosphate-dissolving Microorganisms, 7th Intern. Congress of soil Sci. Midson, Wisc. USA.

33- Yadav, S.; Y. Juhi and G.S. Samuel (2011). Performance of Azospitillum for improving growth, yield and yield Attributing characters of Maize (*Zea mays*) in presence of nitrogen fertilizer, Res. J. Agr. Sci., 2(1): 139-141.

Iraqi J. Agric Res. Vol.20 No.1 pp. 36-47 July/ 2015

ISOLATION , IDENTIFICATION AND EFFECIENCY OF PHOSPHATE DISSOLVING BACTERIA ISOLATED FROM RHIZOSPHERE OF SOME PLANTS GROWN IN SOUTH OF IRAQ

A.S. Al-Ansari A.T. Thaher Z.K. Hassan*

ABSTRACT

The study included Isolation , purification and, identification of ten isolates of phosphate dissolved bacteria from rhizosphere of wheat , barely and tomato plants grown in different areas (Abu al Khasib ,Shatt Arab and Al-Zubair) south of Iraq . Result showd that all obtained isolates identified as *Bacillus Polymyxa*. Variation in PH value, total acidity and dissolved phosphrous were differ among different isolates and times of incubation . Bacteria isolated from rhizosphere of wheat plants of Shatt Arab were most effective among other in dissolving phosphous, decreasing PH and increase total acidity after 21 and 14 days for super hale and rock pho sphale respcctively.

Part of Ph.D. thesis for the third author.
College of Agric. – Basrah Univ. – Basrah, Iraq.