عزل وتشخيص البكتريا المنتجة للهرمونات النباتية من محيط جذور الذرة البيضاء

خلود عبد الاله محمد مها مولى طعين عمار محمد جواد
فاطمة محمد امين محمد جعفر صفاء عبد الرحيم محمود

الملخص

تهدف الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص البكتريا من محيط جذور الذرة البيضاء والتحري عن قابليتها لانتاج الهرمونات النباتية من مواد الاندول اسيتك اسيد والاندول بيوتريك اسيد وتحديد العزلة الاكثر انتاجاً. استعملت اوساط انتخابية مختلفة منها وسطين خاليتين من النتروجين ووسط ادنى **MS (minimal salt)** المحور، ويحتوي على التربتوفان وقد عزلت اشكال مختلفة من العزلات البكتيرية غير المكونة للسبورات والمكونة لها على هذه الاوساط. وقد وجد ان ست عزلات من مجموع **32** عزلة تكون هالات حمراء اللون حول النمو البكتيري بعد اضافة كاشف سالكاوسكي عند غربلة العزلات لانتاج الاندول اسيتك اسيد ووصلت اقطار الهالات الى **30** ملم في العزلة **KM2** بينما ظهر اللون الاحمر للكشف مقتصراً على النمو البكتيري في خمس عزلات غير مكونة للسبورات وعزلتين مكونتين للسبورات. اظهر التقدير الكمي انتاج العزلة **KM2** لتركيز **15** مايكروغرام/ مل من الاندول اسيتك اسيد تبعتها العزلة **B2** بانتاجها لتركيز **11** مايكروغرام/مل. شخصت العزلة **KM2** لجنس ***Pseudomonas*** والعزلة **B2** لجنس ***Bacillus*** وذلك اعتمادا على الشكل المظهري وبعض الفحوص الفسلجية. اظهر التحليل بواسطة **HPLC** واعتماداً على الهرمونات القياسية انتاج العزلتين **KM2** و**B2** لمادتي الاندول اسيتك اسيد والاندول بيوتريك اسيد.

المقدمة

تضاف العديد من المخصبات والمبيدات باشكالها المختلفة الى الترب لاجل النهوض بالواقع الزراعي والاكتفاء الذاتي للمحاصيل المهمة اقتصادياً وحددت بعض السلبيات في استعمال المخصبات والمبيدات الكيميائية منها تلوث الترب ببقايا السماد اوالمبيد او كلاهما و وصول تلك البقايا الى مصادر المياه مما يؤدي الى الضرر بالتوازن الطبيعي للاحياء المجهرية في التربة بالاضافة الى زيادة حموضة التربة وجلبت تلك المساوئ العديدة اهتمام الباحثين بتوفير اسمدة حيوية وذلك بعزل احياء مجهرية طبيعية من محيط جذور النباتات لما لهذه المنطقة من نشاط كبير من حيث انتاج النبات للعديد من الفيتامينات والاحماض الامينية والمواد المغذية المساعدة على نمو الاحياء المجهرية وبالمقابل تقوم الاحياء المجهرية بافراز العديد من عوامل النمو المؤثرة بصورة مباشرة في نمو النبات من خلال قابليتها على تثبيت النيتروجين وزيادة جاهزية بعض المعادن او انتاجها للهرمونات النباتية او بصورة غير مباشرة بإنتاجها لمواد تمنع نمو الاحياء المجهرية الضارة للنبات (**14**، **15**).

تعد الهرمونات النباتية ومنها الاندول اسيتك اسيد والاندول بيوتريك اسيد ذات اهمية كبيرة لسيطرتها على العديد من الفعاليات الفسلجية والخلوية المهمة وتقوم العديد من البكتريا بانتاج مثل هذه المركبات ومنها الاجناس ***Pseudomonas*** و***Klebsiella*** و***Bacillus*** و***Azotobacter*** و ***Azospirillum*** (**1**، **3** ، **5** ، **8** ، **12**). ويمثل نبات الذرة البيضاء احد النباتات ذات الاهمية الاقتصادية إذ يدخل في علف الحيوانات، وتعد الدراسات

وزارة العلوم والتكنولوجيا– بغداد، العراق.

الخاصة بعزل البكتريا المنتجة لمواد نمو من محيط جذور هذا النبات ذات اهمية كبيرة لتحسين نمو النبات. لذا يهدف البحث الحالي الى: عزل البكتريا من محيط جذور الذرة البيضاء وبتنميتها على اوساط انتخابية مختلفة والتحري النوعي والكمي عن العزلات التي تنتج الاندول اسيتك اسيد واستخدام التحليل الكروموتاغروفي لتشخيص الاندول اسيتك اسيد والاندول بيوتريك اسيد بواسطة **HPLC**.

المواد وطرائق البحث

نماذج التربة

اقتلعت عدة نباتات من الذرة البيضاء مع جذورها وما يرافقها من تربة من مناطق عدة للحقل في التويثة ونقلت النماذج في اكياس بلاستيك لضمان عدم جفافها (2). وزنت 10 غرامات من التربة وعلقت في 100مل ماء مقطر معقم ومزجت بالهزاز بدرجة حرارة الغرفة وحضرت تخافيف عشرية من هذا المعلق لغرض زرعها وقطعت الجذور ووزنت بواقع 10غرامات لكل أنموذج ومزجت مع الماء المقطر لتحضير تخافيف عشرية منها. حضن معلق التربة بدرجة 80 °م ولمدة نصف ساعة لقتل الخلايا الخضرية وعزلت البكتريا المكونة للسبورات من خلال زرع التخافيف العشرية من المعلق المعامل بالحرارة.

عزل البكتريا

استعملت اوساط انتخابية عدة للحصول على البكتريا من محيط جذور نبات الذرة البيضاء، إذ حضر وسطين خاليين من النتروجين هما NFM1 الخاص بعزل بكتريا ***Azospirillum*** ومكوناته (5غرامات من malic acid و 0.5 من KH_2PO_4 و0.2 من $MgSO_4$ و0.1 من NaCl و0.02 من $CaCl_2$ و0.002 من مولبيدات الصوديوم و 0.01 من $MnSO_4$ و0.01 من $FeCl_3.6H_20$ و0.0001 من البايوتين و4.5غرامات من KOH و2 مل من ازرق البروموثايمول والرقمين الهيدروجيني 6.8 و20غراماً من اكار في لتر من الماء المقطر) (5، 15) والوسط الثاني NFM2 والخاص بعزل بكتريا ***Azotobacter*** ومكوناته 15غراماً من المانيتول و0.2 من K_2HPO_4 و0.5 من $MgSO_4$ و0.02 من $CaCl_2$ و0.05 من $FeCl_3$ و0.01 من مولبيدات الصوديوم والرقمين الهيدروجينين 7.5 و20غراماً من الاكار في لتر من الماء المقطر واستعمل الوسط MS (وزن 0.136غرام من KH_2PO_4 و0.213غرام من Na_2HPO_4 و0.02 من $MgSO_4.7H_2O$ و1غرام من الكلوكوز و0.01غرام من مستخلص الخميرة و0.1غرام من التريبتوفان و100مل ماء مقطر) الموصوف من قبل الباحث Hussen (7) وذلك بعد تحويره لعزل البكتريا القابلة على استغلال التربتوفان. وتم نشر 0.1 مل من التخافيف العشرية من معلق البكتريا والمعلق المعامل بالحرارة على سطح الاوساط وحضنت لمدة 72 ساعة وبدرجة 28مْ واختيرت المستعمرات المفردة ذات المظهر المختلف واعيدت زراعتها وتنقيتها.

التحري عن انتاج الاندول اسيتك اسيد

استعمل كاشف Salkawiski في الكشف اللوني عن حلقة الاندول في مركب الاندول اسيتك اسيد وحضر الكاشف بمزج 1مل من محلول 0.5 مولاري كلوريد الحديد مع 50 مل من محلول 35% لحامض البريكلوريك وحفظ الكاشف في قناني معتمة (2). تمت غربلة العزلات نوعياً كما ذكرها Sahasrabudhe (12) مع اجراء بعض التحوير، إذ زرعت العزلات جميعها على وسط MS الحاوي على التربتوفان وحضنت لمدة 72 ساعة وبدرجة 28مْ واضيفت قطرات من الكاشف على سطح الاكار بصورة مباشرة وحضنت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة

نصف ساعة في الظلام ويعد تلون المزروع البكتيري باللون الاحمر او ظهور هالات حمراء حوله دلالة على انتاج الاندول اسيتك اسيد.

كما استعمل الكاشف في قياس تركيز الاندول اسيتك اسيد في مزارع العزلات التي اعطت كشفاً نوعياً موجبا، إذ زرعت البكتريا على اوساط MS المحور السائل وحضنت لمدة 72 ساعة وبدرجة 28مْ لقياس الامتصاصية الضوئية للنمو البكتيري عند الطول الموجي 600 نانومتر. نبذت المزارع السائلة مركزيا بسرعة 10000 دورة/ دقيقة وجمع رائق المزارع لتقدير الاندول اسيتك اسيد، أذ مزج 1 مل من رائق المزرعة مع 2 مل من الكاشف وحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة بظروف معتمة لتتم قراءة الامتصاص الضوئي عند 530 نانومتر. تم التقدير الكمي للإنتاج اعتماداً على المنحنى القياسي لتراكيز تراوحت من 0–100 مايكروغرام/ مل من الاندول اسيتك اسيد النقي (11).

تشخيص البكتريا

شخصت اجناس البكتريا المنتجة للاندول اسيتك اسيد من خلال عمل شرائح حية للعزلات لمعرفة اشكال الخلايا وحركتها وتصبيغ شرائح اخرى بصبغة كرام او بصبغة المالاكايت الاخضر كما اجريت اختبارات الحركة وانتاج الكاتاليز والاوكسديز وتحلل كل من النشاء والجلاتين والدم والكازائين والدهون والنمو بدرجات حرارية مختلفة وذلك لتشخيص العزلات البكتيرية.

استخلاص الاندول اسيتك اسيد والاندول بيوتريك اسيد وتشخيصهما بواسطة HPLC

استخلصت الهرمونات النباتية من راشح عزلتي KM2 وB2 *Bacillus* والعزلة *Pseudomonas* NFM4 المتألقة والعزلة التجارية للنوع *P. fluorescens* وتوصيفه بواسطة HPLC اعتماداً على ما ذكره Arsalan وجماعته (2) وTien وجماعته (14) إذ نبذت المزارع السائلة للعزلات وبسرعة 10000 دورة/دقيقة واضيفت خلات الاثيل الى الراشح وبواقع 3حجم مذيب/ حجم راشح البكتريا. فصل الطور العضوي بواسطة قمع الفصل وجفف الأنموذج لتتم اذابة المستخلص بواسطة الايثانول. اضيف المستخلص الايثانولي الى عمود C18 لجهاز HPLC (shimadzo) واستعملت سرعة جريان 1مل/دقيقة تحت ضغط 1400 بار/انج وقرأت الامتصاصية عند الطول الموجي 254 نانوميتر وقورنت القمم مع القمم المفصولة لمحلولي الاندول اسيتك اسيد والاندول بيوتريك اسيد القياسيان.

النتائج والمناقشة

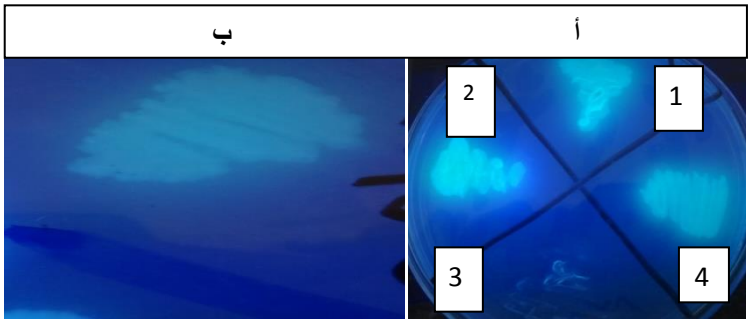
أوضحت النتائج عزل العديد من الأجناس البكتيرية المختلفة من محيط جذور الذرة البيضاء، اذ ظهرت مستعمرات بكتيرية مختلفة المظهر على وسطي NFM1 وNFM2 وكان العدد الحي لها 2×10^{4} خلية/ مل و5×10^{3} خلية/ مل لنماذج التربة غير المعاملة بالحرارة ونماذج التربة المعاملة بالحرارة على التوالي وتراوحت أشكال المستعمرات بين صغيرة الحجم ما يقارب 1ملم قطرا شفافة المظهر وحافات ملساء واخرى ذات قطر اكبر يصل الى 5 ملم وذات سطح أملس ولزجة القوام ذات لون بني وحافات متعرجة قليلا وظهور شكل ثالث من المستعمرات بقطر 3ملم شفافة اللون بحافات مستوية وملساء السطح ويبين جدول (1) الاختلافات المظهرية بين العزلات البكتيرية من نماذج تربة الذرة البيضاء.

جدول 1: الاختلافات المظهرية والمجهرية لعدد من العزلات البكتيرية المعزولة من تربة محيط جذر الذرة البيضاء وباستخدام وسطين خاليين من النيتروجيني

نموذج التربة	اعداد الخلايا الحية (CFU)	رمز العزلة	عدد المستعمرات المنتخبة	الشكل المظهري للمستعمرة	الفحص الحي للخلايا	الفحص المجهري (صبغة كرام)
التويثة (غير معامل بالحراة)	2×10^{4}	*AS1 NFM2 NFM3 NFM7 AS2	5	صغيرة الحجم 1ملم،شفافة، ملساء، حافة مستوية	عصوية وعصوية كروية، متحركة	عصوية سالبة لصبغة كرام
		**AZ1 AZ2 AZ3 AZ4 AZ5 AZ6 AZ7	7	5ملم قطرا، لون بني، لزجة، حافات متعرجة قليلا	عصوية ومتحركة ومكونة للاكياس	عصوية سالبة لصبغة كرام
		**NFM 1 PF3 PF4 NFM4	4	3ملم قطرا، شفافة، متحركة، ملساء، حافات ملساء	عصوية متحركة	عصوية سالبة لصبغة كرام
		*NFM5، ** NFM6 NFM8	3	3ملم قطرا، شفافة، متحركة، ملساء، حافات ملساء	عصوية متحركة	عصوية سالبة لصبغة كرام
		*AS3 AS4 AS5	3	صغيرة الحجم 1ملم،شفافة، ملساء، حافة مستوية	عصوية وعصوية كروية، متحركة	عصوية سالبة لصبغة كرام
التويثة (معامل حراريا)	5×10^{3}	*،**B1 B2	2	5ملم، صفراء اللون، حافة مستوية، سطح املس	عصوية ومتحركة	عصيات موجة لصبغة كرام مكونة للسبور
		*،**B3 B4 B5	3	7ملم، كريمية اللون، حافة متعرجة قليلاً، سطح املس	عصوية ومتحركة	عصيات موجة لصبغة كرام مكونة للسبور
		*،**B6 B7 B8	3	7–10 ملم، بيضاء اللون، حافة متعرجة، سطح مجعد	عصوية ومتحركة	عصيات موجة لصبغة كرام مكونة للسبور

*= وسط NFM1، **= وسط NFM2

وجد انتاج اربع عزلات وهي NFM1 و NFM 2 و NFM 4 و NFM 5 لصبغة صفراء مخضرة عند زرعها على وسط اكار السيدوموناس، وظهرت المستعمرات متألقة عند فحصها تحت الاشعة فوق البنفسجية وقورن تألقها مع العزلة التجارية ***P. fluorescens***. وكما هو واضح في شكل (1).



شكل1: التألق البكتيري تحت الاشعة فوق البنفسجية لعدد من العزلات البكتيرية المعزولة من محيط جذور الذرة البيضاء.

أ(1= العزلة NFM1؛ NFM2=2؛ NFM3 =3 ؛NFM4 =4)، ب(العزلة التجارية لبكتريا ***P. fluorescens***)

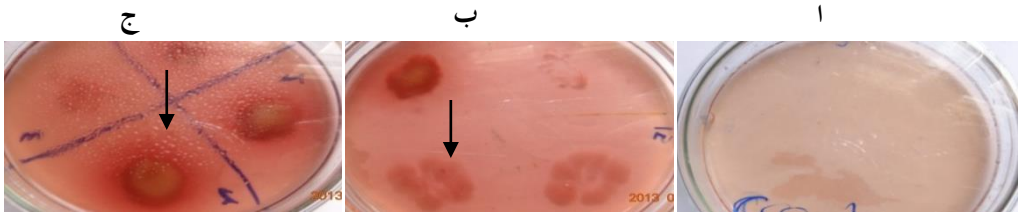
كما تم عزل مستعمرات بكتيرية مختلفة الشكل والمظهر على وسط MS المحور وبعدد بكتريا وصل الى 4×10^{6} خلية/ مل ويعرض جدول (2) وصف المستعمرات على وسط MS المحور والفحص المجهري لها.

جدول 2: الاختلافات المظهرية والمجهرية لعدد من العزلات البكتيرية المعزولة من محيط جذور الذرة البيضاء وباستعمال وسط MS المحور

أنموذج التربة	اعداد الخلايا الحية (CFU)	رمز العزلة	عدد المستعمرات المنتخبة	الشكل المظهري للمستعمرة	الفحص المجهري (صبغة كرام)
التويثة	4×10^{6}	KM1, KM2 KM4 KM11 KM15	5	لزجة المظهر صفراء اللون، حافات مستوية، محدبة السطح	عصوية قصيرة سالبة لصبغة كرام
		KM3 KM7	2	سطح املس، صفراء، غير لزجة، مسطحة الشكل	عصوية سالبة لصبغة كرام
		KM5	1	سطح املس، لزجة، بنية اللون	عصوية سالبة لصبغة كرام
		KM5, KM8, KM9 KM14 KM18	5	سطح املس، شفافة المظهر، نمو ضعيف	عصوية سالبة لصبغة كرام
		KM10 KM17	2	صفراء اللون، مسطحة، منتشرة على الوسط	عصيات سالبة لصبغة كرام

استعملت اوساط زرعية مختلفة في هذه الدراسة لتوفير ظروف عزل انتخابية لمختلف الاجناس البكتيرية المتوفرة في محيط الجذر، إذ تعد هذه المنطقة من اخصب مناطق التربة وذلك لطرح جذور النباتات لمواد عديدة تعمل على إغناء التربة بالمواد التي تساعد على نمو وتكاثر العديد من الاحياء المجهرية ومنها ***Pseudomonas*** و ***Klebsiella*** و***Azotobacter*** و ***Azospirillum*** وانواع مختلفة لجنس ***Bacillus*** وذلك يتوافق مع ما اشار اليه العديد من الباحثين في تطويرهم واستخدامهم لاوساط زرعية خالية من النيتروجين واوساط انتخابية لغرض عزل مختلف الاجناس البكتيرية المنشطة لنمو النبات (**plant growth promoting bacteria**) وبالأخص تلك التي لها القابلية على انتاج الهرمونات النباتية او المثبتة للنيتروجين التي توجد بصورة حرة على اسطح الجذور والشعيرات الجذرية والترب في منطقة الجذر (7، 11، 14).

وقد اظهر الكشف النوعي باستخدام كاشف سالكوسكي انتاج عدد من العزلات البكتيرية لمادة الاندول اسيتك اسيد ، إذ ظهرت هالات حمراء حول النمو البكتيري لعدد من العزلات بينما ظهر اللون الاحمر مقتصرا على النمو البكتيري في عزلات اخرى وكما هو واضح في شكل (2).



شكل 2: الكشف النوعي لإنتاج الاندول اسيتك اسيد بأستخدام وسط MS المحور وكاشف سالكاوسكي

أ= وسط MSالمحور غير المزروع؛ ب= العزلة B2 (الكشف مقتصرا على النمو البكتيري للعزلة) ؛ج= العزلة KM2 (ظهور هالة حمراء حول النمو)

وبينت اقطار الهالات الحمراء الناتجة بعد اضافة الكاشف اختلاف قابلية العزلات على الانتاج. وكما هو مبين في جدول (3)، إذ وصل قطر الهالة الحمراء الى 30 ملم للعزلة KM2 تلتها العزلة KM13 وKM4 باقطار هالة وصلت الى 27 و25 ملم على التوالي. يمكن الكشف عن مادة الاندول اسيتك اسيد من خلال اكسدة حلقة الاندول بوجود حامض قوي واعطاء اللون الاحمر لمشتقات مركبات الحديد، ويعتمد الكشف النوعي المحور على إضافة الكاشف بصورة مباشرة على سطح وسط التنمية عوضاً عن استخدام النايلون على سطح الوسط ويعطي التحوير سهولة في الكشف ودقة في تحديد اقطار الهالات المتكونة ولا يعتمد على نضوح المادة خلال طبقة النايلون المستخدمة في الكشف.

جدول 3:انتاج الاندول اسيتك اسيد من بعض العزلات البكتيرية المعزولة من محيط جذور الذرة البيضاء باستخدام وسط MS المحور والحضن لمدة 72 ساعة وبدرجة 30مْ

رمز العزلة	قطر الهالة الحمراء (ملم)
NFM1	مقتصر على النمو البكتيري
NFM2	مقتصر على النمو البكتيري
NFM4	مقتصر على النمو البكتيري
NFM5	مقتصر على النمو البكتيري
NFM6	مقتصر على النمو البكتيري
B2	مقتصر على النمو البكتيري
B7	مقتصر على النمو البكتيري
KM1	15
KM2	30
KM4	25
KM7	10
KM5	14
KM13	27

وأظهر القياس الكمي اعتماداً على المنحنى القياسي للاندول اسيتك اسيد اختلاف انتاجية العزلات المنتخبة حيث انتجت العزلات KM2 وKM13 وKM4 بما يقارب من 15 و12 و10 مكغم/مل على التوالي بينما انتجت افضل عزلات جنس *Bacillus* بما يقارب من 11 و8 مكغم/مل لعزلات B2 وB7 على التوالي وقد تبين ان العزلات المتألقة ذات انتاجية منخفضة ، إذ وصل تركيز الاندول اسيتك اسيد الى 5مكغم/مل في العزلة NFM4 (جدول4)، وقد يعزى سبب ذلك الى احتياج هذه العزلات الى ظروف تنمية مختلفة من حيث درجة الحرارة او الرقم الهيدروجيني اوتحديد تركيز التربتوفان الامثل للانتاج في وسط التنمية وذلك يتوافق مع ما اشار Ahmad وجماعته (1) من تحديد ظروف تنمية مختلفة للوصول الى انتاجية اعلى من الاندول اسيتك اسيد من عزلات لبكتريا *Pseudomonas* المتألقة.

تنتج العديد من انواع الاجناس البكتيرية المختلفة بعض الهرمونات النباتية ومنها الاندول اسيتك اسيد من خلال مسارات ايضية مختلفة معتمدة او غير معتمدة على وجود التريبتوفان الحامض الاميني الاساس في المسار الايضي للانتاج. ويؤدي الاندول اسيتك اسيد اعمالاً مختلفة منها ما له علاقة مع امراضية البكتريا الممرضة للنبات والسيطرة على بعض العمليات الفسلجية الخاصة بكبر الخلايا وتطور الانسجة وتأثر النبات في الضوء والجاذبية وزيادة المحتوى الجذري للنبات وتكون تأثيرات الاندول اسيتك اسيد سلبية او ايجابية في النبات معتمدة على تركيز المركب المنتج ومدى حساسية النسيج النباتي للتغييرات في تركيزه في التربة (3، 4،6، 10، 12، 13) تختلف انتاجية العزلات البكتيرية من مركبات الاندول في الاوساط المختبرية المختلفة اعتماداً على ظروف التنمية وعلى كفاءة العزلات

البكتيرية ومساراتها الايضية المختلفة المستعملة في انتاج المركب وذلك يتوافق مع العديد من البحوث ، إذ اشار Ahmed وجماعته (1) الى انتاج عزلات *Azotobacter* لتركيز 27 ملغم/ لتر من الاندول اسيتك اسيد بوجود 5ملغم/مل من التريبتوفان، وقد وجد Karnwell (9) ان عدد من عزلات *Pseudomonas* المتألقة والمعزولة من محيط جذور نباتات مختلفة لها القابلية على انتاج الاندول اسيتك اسيد ليصل الى 9.3 مايكروغرام/مل في عزلات *P. flourescens*، كما تمكن Idris وجماعته (8) من عزله وتشخيصه لعزلات بكتيرية تعود لجنس *Bacillus* لها القدرة على انتاج مركبات هرمون نباتية من محيط جذور فول الصويا وقد وصلت انتاجيتها من مركب الاندول اسيتك اسيد الى 15.16 ملغم/لتر.

شخصت أفضل العزلات البكتيرية المنتجة للاندول اسيتك اسيد اعتماداً على بعض الصفات المظهرية والفسلجية وانتاجها لبعض الانزيمات، وكما هو موضح في جدول (5).

جدول 4: تركيز الاندول اسيتك اسيد المنتج من قبل بعض العزلات البكتيرية المعزولة من جذور الذرة البيضاء وباستخدام وسط MS المحور والحضن بدرجة 30مْ وسرعة 150 دورة/ دقيقة ولمدة 72 ساعة

رمز العزلة	تركيز الاندول اسيتك اسيد (مكغم / مل)
NFM1	اقل من 5
NFM2	اقل من 5
NFM4	5
NFM5	اقل من 5
NFM6	اقل من 5
B2	11
B7	8
KM1	5
KM2	15
KM4	10
KM7	7
KM5	اقل من 5
KM13	12

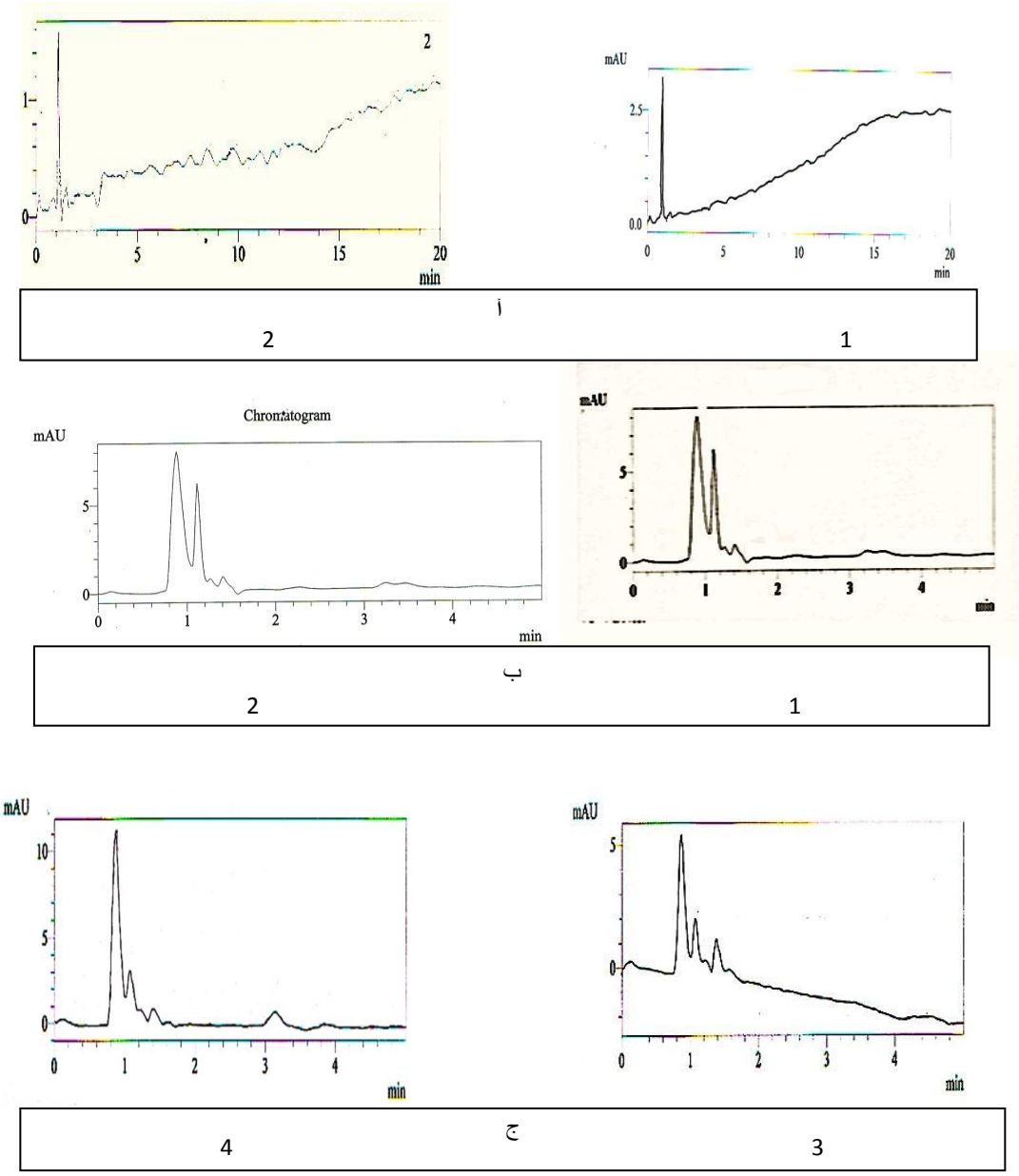
جدول 5: تشخيص العزلات المنتجة للاندول اسيتك اسيد

الصفة التشخيصية	الاختبار		
	KM2	B2	NFM4
شكل الخلايا	عصوي	عصوي	عصوي
تكوين سبورات وموقعها	غير مكون للسبور	سبور اسطواني تحت طرفي	غير مكون للسبور
الكاتاليز	+	+	+
الاوكسيديز	+	+	+
تحلل الدم	−	−	−
الحركة	+	+	+
تحلل النشاء	−	−	−
تحلل الجلاتين	−	+	−
تحلل الكازايين	+	+	+
تحلل الدهون	+	+	+
النمو في 41 مئوي	−	−	−
النمو في 4 مئوي	+	+	+
التشخيص	*Pseudomonas* spp	*Bacillus* spp	*Pseudomonas fluorescence*

+= موجب الفحص: −= سالب الفحص

بينت نتائج تحليل الهرمونات النباتية المنتجة بواسطة HPLC للجزء العضوي لمستخلص كل من العزلة *Pseudomonas* KM2 والعزلة *Bacillus* B2 والعزلة المتألقة *Pseudomonas* NFM4 والعزلة التجارية *P. fluorescens* ظهور قمتين منفصلتين وواضحتين تعودان للاندول اسيتك اسيد والاندول بيوتريك اسيد عند

مقارنتها مع الهرمونات القياسية وكما هو واضح في شكل (3). ان انتاج العزلة الواحدة لمركبات اندولية مختلفة يتوافق مع ما وجده **Cruzer** وجماعته (5)،**Idris** وجماعته (8)،**Tien** وجماعته (14)، إذ شخصت مواد الاندول اسيتك اسيد والاندول بيوتريك اسيد وغيرها من المواد الاندولية في مزارع عزلات بكتيرية تعود لاجناس ***Azospirillum*** و ***Bacillus*** و ***Pseudomonas*** .



شكل 3: فصل الهرمونات النباتية بوساطة HPLC للجزء العضوي للمستخلص الخام لعدد من الانواع البكتيرية المعزولة من جذور الذرة البيضاء

أ= الهرمونات القياسية (1= الاندول اسيتك اسيد؛ 2= الاندول بيوتريك اسيد)

ب= الجزء العضوي لمستخلصات البكتريا (1= العزلة ***Pseudomonas*** KM2؛ 2= العزلة***Bacillus*** B2 ؛ ج: 3= العزلة المتألقة ***Pseudomonas*** NFM4؛ 4= العزلة التجارية ***Pseudomonas fluorescens***)

ملاحظة: تركيز الهرمونات القياسية هو 1 ملغم/ 100مل؛ الطور المتحرك ميثانول 30%؛ الانسياب 1مل/ دقيقة؛ حجم النموذج 0.2 مايكروميتر؛ الفحص عند الطول الموجي 254 نانوميتر.

يتضح من البحث الحالي وجود العديد من الاجناس البكتيرية ذات القابلية على انتاج الاندول اسيتك اسيد وبتراكيز جيدة مقارنة مع المصادر الموثقة، وسيكون لدراسة ظروف الانتاج المثلى من حيث درجة الحرارة والتهوية ومدة الإنتاج وتحديد بعض العوامل التغذوية و الأرقام الهيدروجينية لوسط الانتاج تأثيراً في زيادة انتاج الاندول اسيتك اسيد من هذه العزلات.

المصادر

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

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

3-Balaji. N; S. S. Lavanya; S. Muthamizhselvi and K. Tamilarasan (2012). Optimization of fermentation condition for indole acetic acid production by *Pseudomonas* species. International J. of Advanced Biotechnology and Res., 3(4):797- 803.

4-Comai, L.; G. Suricand and T. Kosuge (1982). Relation of plasmid DNA to indole acetic acid production in different strains of *Pseudomonas syringae*. J. Gen. Microbiol., 128:2157- 2163.

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

6-Fett, W. F.; F.O. Stanley and F. D. Michael (1987). Auxin production by plant pathogenic pseudomonads and xanthomonads. Appl. Environ. Microbial. 53(8):1839- 1845.

7-Husen, E. (2003). Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. Agric. Sci.,4(1):27-31.

8-Idris, E. E.; D. J. Iglesias; M. Talon and R. Borriss (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3- acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciencs* FZB42. Mol.Plant Microbiol. Interact, 20(6):619- 626.

9-Karnwal, A. (2009).Production of indole acetic Acid by fluorescence *Pseudomonas* in the presence of L- tryptophan and rice exudates. J. plant Pathology, 91(1):61- 63.

10-Klopper, J. W.; C. M. Ryu and S. Zhang (2004). Induced systematic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94: 1259-1266.

11-Lwin, K. M.; M. Moe; T. Tar and M. A. Wai Zin (2012). Isolation of plant hormone (indole-3- acetic acid- IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on Maize seediling. 4th AUN/ SEED- Net Regional Conference on Biotechnology: Emerging Technology for Green Engineering in Bangkok, Thailand, 26- 27 January.

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

13-Syonok, K. U. (1996). The excessive production of indole-3- acetic acid and its significance in studies of biosynthesis of this regulator of plant growth and development. Plant cell physiol., 37(8):1043- 1048.

14-Tien, T. M.; M. H. Gaskins and D. H. Hubbell (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Applied and Environmental Microbiology, 37: 1016- 1024.

15-Ng, P. and E.S. Nancy (1979). Characterization of *Azospirillum* isolated from nitrogen fixing roots of harvested sorghum plants. Appl. Environ. Microbial., 38(6):1189- 1191.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHYTOHORMONE PRODUCING BACTERIA FROM RHIZOSPHERE OF SORGHUM (*sorghum bicolor*)

K. A. Mhammad M. M. Taen A. M. Jwaad

F. M. Amen M. Jaafar S. A. R. Mahmood

ABSTRACT

This research was aimed to isolate and identify rhizospheric bacteria capable for producing indole acetic acid and indole butric acid. However, quantification of IAA choose the best producing isolate. Two nitrogen free media and modified minimal medium (MS) with tryptophan were used in bacterial isolation. Different bacterial isolates (non spore forming and spore forming) were screened for IAA production. Qualitative screening of bacteria indicated that only six isolate out of thirty two produced red zone around the bacterial growth after treatment with Salkawski's reagent. The radius of zone reached to 30 mm with KM2 isolate culture, whereas, five non spore forming isolates and two spore forming isolates produced red zone appeared restricted to the growth. Quantitative determination indicated that KM2 produced 15 microgram/ml IAA followed by B2 which produced 11 microgram/ ml. The identification tests indicated that the isolate KM2 is belong to *Pseudomonas* spp and B2 to *Bacillus* spp. Analysis by HPLC depending on standard phytohormones showed that indole acetic acid (IAA) and indole butric acid (IBA) were produced by both isolates.

Ministry of Sci. and Tech. – Baghdad, Iraq.