الدور الحيوي للازوتوبكتر المحورة وراثياً

أحمد محمد تركي[1] حسن علي عبد الرضا[2] نورية عبدالحسين علي[3]

[1]كلية العلوم، جامعة الانبار

[2]كلية طب البيطري، جامعة بغداد

[3]معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية، جامعة بغداد

الخلاصة

نفذت هذه الدراسة في محاولة للحصول على عزلة من بكتيريا *Azotobacter vinilandii* (عزلة محلية معزولة من التربة) محورة وراثياً أي تمتلك صفتي تثبيت النتروجين وإذابة الفوسفات وإعتماد عدد من المؤشرات لتقييم الفعالية الحيوية للعزلة المحورة وراثياً تلك لمقارنتها بالعزلة الأم وبعزلة بكتيريا السيدوموناس المستعملة في التحوير الوراثي وقد شملت هذه المؤشرات الكثافة العددية للبكتيريا ومعدل النمو النسبي لها في التربة وكمية الفسفور الجاهزة في التربة وكمية النتروجين المثبت.أجريت عملية التحوير الوراثي من خلال نقل البلازميدات المسؤولة عن صفة إذابة الفوسفات من عزلات السيدوموناس المعزولة من ذات التربة إلى عزلات الازوتوبكتر المثبتة للنيتروجين. أظهرت النتائج تفوق عزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً في كافة المعايير المستعملة في الدراسة مقارنة بعزلة الازوتوبكتر أو السيدومونس الأصليتين أو خليطهما معاً. أدى تلقيح التربة بالازوتوبكتر المحورة وراثياً الى حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في كمية الفسفور الجاهز في التربة ليبلغ أعلى معدل له 28.1 ملغم/كغم تربة بعد 45 يوماً من تحضين هذه البكتيريا في التربة مقارنةً بما أعطته ذات العزلة غير المحورة وراثياً ولذات المدة الزمنية إذ بلغ 16.2 ملغم/كغم تربة ازدادت كفاءة عزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً في تثبيت النتروجين ليبلغ 157 ملغم نتروجين كلي/كغم تربة بعد مرور 45 يوماً من تحضين هذه البكتيريا في التربة في حين بلغت 130 ملغم نتروجين كلي/كغم تربة لذات العزلة غير المحورة وراثياً. إخفضت جميع المعايير المستعملة في الدراسة عند خلط العزلتين مع بعضها وإضافتهما للتربة.

THE BIOROLE OF GENETICALLY MODIFIED

Azotobacter

Ahmed M. Turki[1] Hussan A. Abdul Ratha[2] Norrya A. H. Ali [3]

[1]College of Science, Al-Anbar University, Iraq
[2]Veterinary College, Baghdad University, Iraq
[3]Genetic Engineering and Biotechnology Institue, Baghdad University, Iraq

ABSTRACT

The study was conducted as attempt to obtain genetically modified *Azotobacter vinilandii* isolate able to fix nitrogen and dissolve phosphate at the same time and used different biological activity parameters (Bacterial count, relatively growth rate, available phosphorus in soil and amount of fixed nitrogen) to compare between genetically and non-genetically modified *A. vinilandii* isolates.The transferring of a plasmid coding for dissolving phosphate were made according to Sam brook *etal* (1) to transfer the plasmid from local isolate of *P.aeruginosa* to local isolate of *A. vinilandii.* Results showed the superiority of genetically modified *A. vinilandii* was the best in all the parameter used above in comparison with the original selected local isolates (*P. aeruginosa* and *A. vinilandii).*Inoculation of soil with genetically modified *A. vinilandii* increase significantly (P<0.05) the available phosphorus was 28.1 mg/kg soil after 45 days inoculation in compare with non-genetically modified *A. vinilandii* which gave 16.2 mg\kg available phosphorus.The efficiency of nitrogen fixation increased with modified genetically *A. vinilandii* isolate and reach to 157 mg total nitrogen /kg soil after 45 days of it incubation in soil while 130 mg total nitrogen /kg soil was recorded with the original *A. vinilandii* isolate. Results showed that all parameters which were used in the present study decreased when culture of the original isolate of (*P. aeruginosa* and *A. vinilandii)* were mixed and used.

Key words: *Azotobacter vinilandi,* Nitrogen fixation. Genetically modified

المقدمة

تعد بكتيريا الازوتوبكتر *Azotobacter* الأكثر شيوعاً ضمن عائلة Azotobactereace تمتاز خلايا هذا الجنس بأنها كبيرة الحجم يتراوح قطرها بين 1.5-2 مايكرون، ذات أشكال متعددة يغلب عليها الشكل العصوي، محاطة بأسواط محيطية أو قد تكون بعضها غير متحركة، هوائية كما تستطيع النمو في ظروف نقص الأوكسجين(2). تستطيع هذه البكتيريا تثبيت النتروجين بصورة حرة في خلاياها وتنتشر بصورة واسعة في التربة والمياه وسطوح جذور النباتات(3). أشارت الدراسات إلى أن هذه البكتيريا تنتشر في الترب العراقية والمصرية بأعداد كبيرة ولكن هناك العديد من العوامل المثبطة لانتشارها كوجود المناطق القاحلة وتجمع الأملاح في التربة التي تؤدي إلى تقليل كثافتها في التربة(4). تأتي أهمية هذه البكتيريا لما تساهم له في إمداد النبات باحتياجاته من النتروجين إذ أنها تمتاز بكفاءة عالية في تثبيت النتروجين وإنتاج منظمات النمو(5) وتعد الازوتوبكتر من أهم الأجناس في حياة النبات(6) لذا اهتم الباحثون منذ زمن بعيد في برامج إنتاج لقاحات من هذه البكتيريا لزيادة أعدادها في التربة وفي هذا المجال وجد Martin *et al.* (7) إن *Azotobacter vinilandii* و *Azotobacter chroococcum* هي الأكفاء في تثبيت النتروجين بصورة حرة عند إستعمالها كمخصبات حيوية إذ تساهم في زيادة الانتاج النباتي، ونظراً لأن ذلك الامر يتطلب التوازن في توفر إحتياجات النبات من النتروجين والفسفور ولكون الاخير قليل الجاهزية في الترب ذات الاس الهيدروجيني المرتفع فقد هدفت الدراسة الحالية محاولة إجراء تحوير وراثي على بكتيريا الازوتوبكتر لجعلها قادرة في إذابة الفوسفات فضلاً عن أمتلاكها أصلاً لصفة تثبيت النتروجين.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات التربة

تم جمع 60 عينة من التربة من مناطق مختلفة في مدينة الرمادي موزعة على خمس مناطق مختلفة لغرض عزل البكتيريا المذيبة للفوسفات والبكتيريا المثبتة للنتروجين (الازوتوبكتر) وبواقع 1-0.5 كغم تربة بعد إزالة 2سم من سطح التربة.

عزل وتشخيص البكتيريا

أ-أستعمل وسط بيكوفسكي (8) لزرع تخافيف من نماذج التربة وتحضينها في درجة 28ºم لمدة 72 ساعة لغرض عزل البكتيريا المذيبة للفوسفات.

ب-أستعمل الوسط السائل المشار لمكوناته في Harold *et al.* (9) لغرض تلقيح نماذج من التربة فيه لعزل بكتيريا الازوتوبكتر التي نمت بشكل غشاء رقيق فوق سطح الوسط.

شخصت البكتريا أعلاه (أ، ب) بعد إجراء عدد من الفحوصات المجهرية والزراعية والكيموحيوية وبالرجوع الى المصادر المعتمدة في التشخيص (9،2، 10،11).

نقل البلازميد و التحوير الوراثي

تم أولا عزل الدنا البلازميدى الكلى من البكتريا الواهبة (السيدوموناس) حسبPospiech and Neuman (12) وأجرى الترحيل الكهربائى له فى هلام الاكاروز حسب Prifer(13) وحسب تركيز الدنا المستخلص ونقاوته حسب Maniatis *et al.* (14). تم تحييد البلازميدات فى الخلايا البكتيرية (السيدوموناس) بإستعمال المعاملة بحامض السالسليك وبإستخدام الطريقة الموصوفة من قبل(15) وعند إعادة زرع البكتريا المحيدة على وسط بيكوفسكى وفقدها لصفة اذابة الفوسفور فقد عد ذلك دليلا على إن هذه الصفة محمولة على البلازميد.

أتبعت طريقة Sam brook *et al.* (1) لغرض نقل البلازميدات المحتمل وجودها والمسؤولة عن صفة إذابة الفوسفات من البكتيريا الحاملة لها الى عزلات بكتيريا الازوتوبكتر المثبتة للنتروجين وقد أطلق على البكتيريا التي تحمل تلك الصفتين بعزلات الازوتوبكتر المحورة وراثياً.

إختبار قدرة العزلات البكتيرية في تثبيت النتروجين وإذابة الفوسفات

نفذت تجربة معملية داخلة في التصميم العشوائي الكامل وبثلاث مكررات لدراسة قابلية عزلات الازوتوبكتر المحورة وراثياً وعزلات السيدوموناس والازوتوبكتر الاصلية (غير المحورة وراثياً) في تثبيت النتروجين وإذابة الفوسفات عند ظروف مسيطرة عليها ومعرفة مدى بقائها في التربة.

حضرت تربة مزيجة منخولة بمنخل قطر فتحاته 2 مليمتر وعقمت بالموصدة في درجة حرارة 121°م لمدة نصف ساعة لمدة ثلاث أيام متتالية. يوضح الجدول(1) بعض خصائص هذه التربة، وضع 50 غم من هذه التربة في حاوية بلاستيكية إرتفاعها 15سم وقطرها 5سم، رطبت التربة لايصالها الى 65% من السعة الحقلية باستعمال الماء المقطر المعقم ثم لوثت بلقاح عزلات الازوتوبكتر المحورة وراثياً وعزلات السيدوموناس والازوتوبكتر الأصلية وبمعدل 10^6 وحدة تكوين مستعمرة/غم تربة وحضنت في درجة حرارة 28°م لمدة 30،15،45 يوماً وبمعدل ثلاث مكررات للمعاملة الواحدة، تم إعادة ترطيب التربة كل سبعة أيام عن طريق قياس الفقد في الوزن وتقدير الكثافة العددية للبكتيريا والنتروجين الكلي والفسفور الجاهز في التربة بعد إنتهاء كل مدة من مدد الحضن الثلاث المشار لها أعلاه.

الجدول (1): بعض خصائص التربة المستعملة في الدراسة.

الصفة	القيمة
الرقم الهيدروجيني	7.52
التوصيل الكهربائي (E.C) (ديسمنز / م)	3.35
المادة العضوية (غم/كغم)	11.18
الفسفور الجاهز (ملغم/كغم)	9.0
الفسفور الكلي(ملغم/غم)	26
النتروجين الكلي(ملغم/كغم)	60
كاربونات الكالسيوم (غم/كغم)	180.5
نسجة التربة	مزيجية
المحتوى الرطوبي عند السعة الحقلية (%)	28.4

النتائج والمناقشة

عزل الدنا البلازميدى

أظهرت النتائج إحتواء عزلة السيدوموناس المحلية على حزمة بلازميدية واحدة كبيرة الحجمmega plsmid وكذلك على بلازميدين صغيرين متماثلين وقد أظهرت نتائج التحييد بالزرع المستمر عند وجود 150 مايكروغرام/مليلتر من حامض السالسليك والتقاط مايقارب من 150 مستعمرة مفردة من على وسط بيكوفسكى فقدان صفة إذابة الفوسفات بشكل كامل على هذا الوسط وهذا ربما يدل على أن هذه الصفة محمولة على البلازميد ولاجل إثبات صحة ذلك تم إستخلاص الدنا من خلايا السيدوموناس ورحل كهربائياً على هلام الاكاروز بعد عملية التحييد فوجد عدم إحتوائها على أي حزمة بلازميدية وإن إختفاء البلازميدات بشكل كامل فى العزلة المحيدة يؤكد إرتباط الصفة المفقودة بتلك البلازميدات.

الفعالية الحيوية للعزلات البكتيرية في التربة

الكثافة العددية ومعدل النمو النسبي

يظهر من الجدول(2) تباين معدل الكثافة العددية لخلايا العزلات البكتيرية المختلفة (الازوتوبكتر المحورة وراثياً والازوتوبكتر والسيدوموناس الأصلية) في التربة خلال مدد التحضين المختلفة إذ بلغ معدل عدد الخلايا لعزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً أعلى مستوى له بعد مرور 30 يوماً من التحضين وكان 8.65 لو.

وحدة تكوين المستعمرة/غرام تربة في حين إنخفض لاقل مستوى له بعد مرور 45 يوماً من التحضين ولنفس العزلة ليبلغ 8.35 لو.وحدة تكوين المستعمرة/غرام تربة، ومن ملاحظة أعداد خلايا العزلة غير المحورة وراثياً للازوتوبكتر نجد أن العزلة المحورة وراثياً قد تفوقت معنويا في كثافتها العددية في المدة الأولى من التحضين (15 يوماً) وأستمر هذا التفوق حتى بعد مرور 30 يوماً على الرغم من أنه لم يكن مؤكداً إحصائياً في حين تفوقت العزلة الأصلية للازوتوبكتر في أعداد الخلايا في المرحلة الثالثة من التحضين، من جانب آخر كانت عزلة بكتريا السيدوموناس الأقل قابلية للبقاء في التربة بعد مرور 30 و45 يوماً على التوالي إذ إنخفضت أعداد الخلايا لتصل لادنى مستوى لها 6.35 لو.وحدة تكوين المستعمرة/غرام تربة بعد 45 يوماً من التحضين.

أظهرت النتائج أيضاً أن إضافة خليط عزلتي الازوتوبكتر والسيدوموناس الأصلية معاً إلى التربة قد ساهم في انخفاض أعدادها في بداية التجربة (بعد15يوماً من التحضين) إذ وصلت إلى 6.83 لو.وحدة تكوين المستعمرة/غرام تربة وأن ذلك قد يعود إلى حصول تنافس أو تضاد بينهما في بداية التجربة وأثر سلباً في أعدادها في التربة وربما حصل تأقلم أو تكيف لاحدى العزلتين لظروف التربة في مدتي التحضين اللاحقتين مما أنعكس على زيادة العدد رغم أنه بقي منخفضاً مقارنة بالكثافة العددية لخلايا عزلات الازوتوبكتر المحورة وراثياً أو الازوتوبكتر أو السيدوموناس الأصلية. أظهر التحليل الإحصائي وجود فرق معنوي عالي ($P<0.05$) في الكثافة العددية بين عزلة الازوتوبكتر الأصلية وعزلة السيدوموناس الأصلية بعد مرور 45 يوماً من التحضين وقد تفوقت الازوتوبكتر الأصلية في تلك الأعداد الجدول (2).

بين التحليل الإحصائي من جانب آخر أيضاً وجود فرق عالي المعنوية ($P<0.05$) في الكثافة العددية لعزلة السيدوموناس المسجلة بعد 15و45 يوماً في حين لم يسجل هذا الاختلاف في الكثافة العددية بين المدتين 15و30 يوماً. لم يظهر التحليل الإحصائي أيضاً وجود اختلافات معنوية في الكثافة العددية لخلايا عزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً بين مدد التحضين المختلفة.

الجدول (2): الكثافة العددية لخلايا عزلات البكتيريا في التربة في مدد تحضين مختلفة.

العزلات البكتيرية	الكثافة العددية (لو.وحدة تكوين المستعمرة/ غرام تربة)				LSD=p<0.05
	بعد 15 يوماً	بعد 30 يوماً	بعد 45 يوما	المعدل	
Az**	8.63	8.65	8.35	8.54	0.39
Az	8.12	8.27	8.63	8.33	
Ps	8.34	8.22	6.35	7.68	
Az +Ps	6.83	6.58	5.55	6.08	
المعدل	7.98	7.75	7.72		
LSD=p<0.05	0.25				0.36

Az : عزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً**

Az: عزلة الازوتوبكتر الاصلية (غير المحورة وراثياً)

PS: عزلة السيدوموناس

تباين معدل النمو النسبي لعزلات البكتريا المختلفة من جانب آخر خلال مدد التحضين المختلفة إذ تراوح بين2.63 لعزلة الازوتوبكتر المحورة وراثيا بعد 15 يوماً من التحضين إلى 0.83 لخليط العزلتين للازوتوبكتر والسيدوموناس (Az+Ps) خلال ذات المدة الزمنية الجدول(3).

أظهرت النتائج زيادة معدل النمو النسبي لعزلة الازوتوبكتر الأصلية مع تقدم وقت التحضين إذ بلغ 2.27،2.12، 2.63 للمدد الزمنية 15 ،45،30 يوماً على التوالي وهذا يتوافق مع ما سجل من كثافة عددية (الجدول 2) في حين شهد معدل النمو النسبي لعزلة السيدوموناس إنخفاضاً واضحاً وصل لحد المعنوية خلال مدد التحضين المختلفة إلا أن أقل معدل نمو نسبي سجل هو لخليط العزلتين للازوتوبكتر الأصلية مع عزلة السيدوموناس إذ لم يتجاوز في أحسن أحواله 0.83 بعد مرور 15 يوماً على تحضين تلك العزلات في التربة وأستمر هذا الانخفاض ليصل بعد 45 يوماً إلى 0.44 رغم أنه لم يكن مؤكداً إحصائياً.

الجدول (3) : معدل النمو النسبي لخلايا العزلات البكتيرية في التربة في مدد تحضين مختلفة.

العزلات البكتيرية	معدل النمو النسبي للعزلات البكتيرية خلال المدة الزمنية.				LSD=0.05
	بعد 15 يوماً	بعد 30 يوماً	بعد 45 يوماً	المعدل	
Az**	2.63	2.60	2.35	2.52	0.39
Az	2.12	2.27	2.63	2.34	
Ps	2.34	2.22	2.35	1.63	
Az +Ps	0.83	0.66	0.44	0.64	
المعدل	1.98	1.94	1.94		
LSD=p<0.05	0.44				0.36

أما ثابت معدل النمو النسبي فقد تراوح بين 0.403 لعزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً بعد 15 يوماً من التحضين إلى 0.124 لخليط عزلتي الازوتوبكتر والسيدوموناس خلال ذات المدة الزمنية وقد أظهرت نتائج ثابت معدل النمو النسبي حدوث انخفاض واضح لهذه القيم مع تقدم مدد التحضين إذ بلغ 0.403 ، 0.159 ،0.117 لعزلة الازوتوبكتر المحورة وراثيا خلال مدد التحضين 15، 30 ، 45 يوماً على التوالي في حين وصل الى 0.124 لخليط عزلتي الازوتوبكتر الأصلية مع عزلة السيدوموناس بعد 15 يوماً من التحضين وإنخفض بعد مرور شهر و 45 يوماً ليصل إلى 0.008 و 0.022 على التوالي الجدول(4).

أن معدل الكثافة العددية للبكتريا المذيبة للفوسفات في التربة يرتبط مع وجود العزلات البكتيرية الاخرى ونشاطها في التربة ونوعية المادة العضوية في التربة(16)

وفي هذا المجال ذكر المنصوري (17) أن الازوتوبكتر تكون أعدادها في التربة مرتبطة بالمادة العضوية الموجودة وأكد Lindemann and Cardenas (18) ظهور بعض التغيرات في أعداد الازوتوبكتر عند تحضينها في التربة كما أشار كل من Milosevic *et al.* (19) والظفيري (20) إلى أن هناك إرتباطاً عالياً بين وجود النتروجين والكاربون وأعداد الازوتوبكتر في التربة وإن تلقيح التربة بها يعمل على زيادة أعدادها.

أن هذه التغايرات التي حصلت في الكثافة العددية ومعدل النمو النسبي لعزلات البكتريا قد يرتبط ببعض مكونات التربة من المادة العضوية وقدرة هذه العزلات في البقاء وقد وجد الظفيري (20) ذلك عندما حصل على أعلى زيادة في أعداد بكتيريا الازوتوبكتر بعد 35 يوماً من التحضين.

الجدول (4) : ثابت معدل النمو النسبي لخلايا العزلات البكتيرية في التربة خلال مدد تحضين مختلفة.

العزلات البكتيرية	ثابت معدل النمو النسبي			
	بعد 15 يوماً	بعد 30 يوماً	بعد 45 يوماً	المعدل
Az**	0.403	0.159	0.117	0.266
Az	0.318	0.136	0.131	0.195
Ps	0.351	0.133	0.017	0.167
Az +Ps	0.124	0.008	0.022	0.051
المعدل	0.299	109	0.071	

الفوسفور الجاهز في التربة

تباينت كمية الفسفور الجاهز في التربة بإختلاف لقاح العزلة البكتيرية المضافة وقد أظهرت النتائج أن عزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً قد تفوقت في تجهيز الفسفور في التربة إذ وصل أعلى مستوى له 28.1 ملغرام فسفور/كغم تربة بعد مرور 45 يوماً من التحضين وهو أعلى معدل سجل طيلة مدة الدراسة، وقد أظهر التحليل الإحصائي أن هناك اختلافاً معنوياً في كمية الفسفور الجاهز في التربة بفعل إضافة العزلة المحورة وراثياً بين مدتي التحضين 15و30 يوماً في حين لم يكن هذا الفرق مؤكد إحصائياً بين المدتين 30و45 يوماً الجدول (5). أظهرت عزلة السيدوموناس تفوقاً معنوياً على بقية العزلات في كمية الفسفور الجاهز في مدة التحضين الأولى إذ بلغ 18.1ملغرام فسفور/كغم تربة وحصلت زيادة لم تكن كبيرة وواضحة في الفسفور الجاهز في التربة بتأثير ذات العزلة بعد 30و45 يوماً من التحضين.

بينت النتائج ايضاً وجود اختلاف معنوي عالي ($p<0.05$) بين عزلتي الازوتوبكتر الأصلية والازوتوبكتر المحورة وراثياً في كمية الفسفور الجاهز في التربة إذ تفوقت العزلة المحورة وراثياً وبشكل مؤكد إحصائياً في زيادة جاهزية الفسفور في التربةالجدول (5)، في حين أن أقل كمية فسفور جاهز في التربة كان لخليط عزلتي الازوتوبكتر الأصلية مع عزلة السيدوموناس عند مدة تحضين 30 يوماً والتي بلغت 6.1 ملغرام فسفور/كغم تربة.

الجدول (5): تأثير تلقيح التربة بالعزلات البكتيرية في الفسفور الجاهز في مدد تحضين مختلفة.

العزلات البكتيرية	الفوسفور الجاهز ملغرام /كغم تربة				LSD=0.05
	بعد 15 يوما	بعد 30 يوما	بعد 45 يوما	المعدل	
Az**	15.6	26.6	28.1	23.43	4.57
Az	11.1	10.2	16.2	12.50	
Ps	18.1	20.1	20.9	19.70	
Az +Ps	14.5	6.1	7.6	9.40	
المعدل	14.82	15.15	18.2		
LSD=p<0.05	5.15				4.23

تشيرهذه النتائج إلى أن عزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً قد تطورت قابليتها لإذابة مركبات الفوسفات في التربة من خلال تمكنها من توفير أحتياجاتها من النتروجين عن طريق التثبيت الحر للنتروجين فضلاً عن امتلاكها البلازميدات الجديدة من عملية التحوير الوراثي والتي قد تكون عززت قدرتها الحيوية والأيضية. تتفق هذه النتائج مع Ratti *et al.* (21) الذي تمكن من استنسال الموروثات المسؤولة عن إنتاج الأحماض العضوية في العزلات البكتيرية، وزاد من قدرتها في إذابة الفوسفات مما يؤكد تحسين الأنظمة الحيوية في العزلة المحورة وراثياً ، وقد تأكد إن إستعمال خليط العزلتين، قد أدى إلى حدوث تضاد حيوي في نشاط العزلتين الذي سبب خفض كمية الفوسفور الجاهز في التربة، في حين ذكر Vazque *et al.* (22) أن الأحياء المجهرية المذيبة للفوسفات كلما حققت كثافة نمو ومعدل نمو نسبي جيد كان نشاطها أفضل في زيادة جاهزية الفوسفور في التربة. وأن إختلاف العزلات في الكمية المذابة قد يعود إلى الاختلاف الحاصل في قابلية العزلات وطبيعتها الفسلجية ونوعية وكمية الأحماض العضوية المنتجة من قبلها وهذا ما أكده الكسندر(23).

تثبيت النتروجين

يوضح الجدول (6) تباين كمية النتروجين الكلية في التربة باختلاف العزلات البكتيرية المضافة وقد أظهرت النتائج أن كمية النتروجين في التربة قد إزدادت معنوياً ($p<0.05$) عند استعمال لقاح عزلة الازوتوبكتر المحورة وراثياً إذ بلغت الكمية الكلية للنتروجين 157 ملغرام نتروجين/كغم تربة بعد45 يوماً من التحضين وهي أعلى كمية وصلت إليها الدراسة تلتها عزلة الازوتوبكتر الأصلية إذ إزدادت كمية النتروجين الكلية في التربة بتأثير إضافة هذه العزلة لتصل إلى118و130 ملغرام نتروجين/كغم تربة في مدتي حضن 45,30 يومياً على التوالي، من جانب آخر فقد إستطاعت السيدوموناس تثبيت النتروجين في التربة الجدول(6).

إلا أن كمية النتروجين الكلية قد إنخفضت وبشكل مؤكد إحصائياً ($p<0.05$) مقارنة بما حققته عزلتا الازوتوبكتر الأصلية والازوتوبكتر المحورة وراثياً من جانب أخر فقد إنخفضت كفاءة عزلة الازوتوبكتر الأصلية في تثبيت النتروجين عند إستعمالها في الخليط مع عزلة السيدوموناس ويستدل على ذلك من خلال كمية

النتروجين الكلية في التربة من مدد التحضين المختلفة تؤكد هذه النتائج اكتساب العزلة المحورة وراثياً نظام حيوي أيضي مكنها من زيادة كفاءتها في تثبيت النتروجين حيوياً وتوفير الفسفور الجاهز في ذات الوقت. وتعد زيادة كمية

النتروجين في الترب الملقحة متوافقة مع ما وجده كلا من مامندو(21) وLindemann and Cardenas (18) اللذين وجدا أن تلقيح التربة ببكتريا الازوتوبكتر تزيد من كمية النتروجين المثبتة في التربة ولكل مدد التحضين كما أكد الكسندر(25) أن إضافة اللقاح البكتيري من بكتريا الازوتوبكتر إلى التربة يسبب زيادة محتوى التربة بحدود 1 ملغرام نتروجين/1 غرام

الجدول (6): تاثير تلقيح التربة بالعزلات البكتيرية في كمية النتروجين الكلي في مدد تحضين مختلفة.

العزلات البكتيرية	النتروجين الكلي ملغرام / كغم تربة				LSD=0.05
	بعد 15 يوما	بعد 30 يوما	بعد 45 يوما	المعدل	
Az**	116	122	157	131.66	13.6
Az	100	118	130	116.00	
Ps	89	66	79	78.00	
Az +Ps	91	61	71	74.33	
المعدل	99.00	91.75	109.25		
LSD= p<0.05	9.85				22.65

المصادر

1- Sam brook, J.; Fritagah, E. and Manitatis, T.(1989). Molecular cloning alaboratory manual, cold spring Harbour laboratory. New York.

2- Holt, T.G.; Krieg, N. R.; Sneath, P.H.; Staley, J.T. and Williams, S.T.(1994). Bergey's Manual of Deter minative bacteriology. 9th ed. U.S.A.

3- قاسم، غياث محمد، مضر عبد الستار(1989). علم أحياء التربة المجهرية، مطبعة وزارة التعليم العالي في الموصل، جامعة الموصل

4- Abd –el –Malek,Y. (1971). Free living nitrogen –fixing bacteria in Egyptian soils and their possisble contribution to soil fertility. Plant and Soil, special volume: 423-443

5- Forlani, G.; Branzoni, M.; Pastorclli, R. and Farvilli, F.(1995). Root colonization efficiency, plant growth promting activity & potentially related properties in plant. Associated Bacteria Journal of Genetics and Breeding (Italy), 49 (4) :343-352.

6- Bashan, Y.; Holguin, G.; Ferrera, C. and Ronald.(1996).Interactions between plants and beneficial microorganism II.Associative rhizoshere bacterial review. Terra (Mexico), 14(2):195- 210.

7- Martin, A.; Moreno, M. and Marin, P. (1993). *Azotobacter* and *Azospirillum* as potential nitrogen fertilizers communications in soil. Sci. and Plant Analysis.24 (3-4): 255-260.

8- Subba, R. N. S. (1980).Soil microorganisms and plant growth. Oxford and IBH publishing co. Newdelhi, Bombay, Calcatta

9- Harold, J.; Benson, W. C. B.; Mc Grow, H.(1998).Microbiological applications laboratory manualin general microbiology. 7th ed.

10- Baron, E. F. and Fingold, S. M. (1990). Baily and scott diagnositc microbiology c.v. Mosby company, st. ions. Batihore, Philadelphia Tornoto.

11- جاد الله، نزار، فؤاد، عقاب العزام، عبد المجيد الشاعر، وعوسان المنسي (1994). الاحياء المجهرية. سلسلة الطرائق العملية المستقبل للنشر والتوزيع. عمان.

12- Pospiech, T. and Neuman, T. (1995).Salting out procedure for isolation of genomic DNA.In Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA. Kieser, T.L.(eds.) Norwich,U.K.

13- Prifer, U.(1984).Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis In: Advanced molecular genetics.(ed. A. Publer and K, Timmis).pp.26-37.Springer Verlage,Berline

14- Maniatis, T, Fritsch, F and Sambrook, J. (1982).Molecular Cloning: a laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laborstory. NewYork.

15- Domenico, P.; Schwartz, S. and Cunha, B.(1989). Reduction of capsula polysaccharide production in ***Klebsiella pneumoniae*** by sodium salicylate.infect. Immun.57:3778-3782

16- Yahya, A. I. and AL- Azawi, S. K. (1989). Occurrence of phosphate solubilizing bacteria in some Iraqi soils. Plant and Soil, 177:135 –141.

17- المنصوري، جمال علي قاسم (1995) معدنة النتروجين وتأثير في بعض صفات التربة ونمو حاصل الحنطة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة جامعة بغداد

18- Lindemann, W. C. and Cardenas, M. (1984). Nitrogen mineraliztion potential & nitrogen transformation of suldge – amended –soil. Sci. Soc. Amer. J., 48 : 1072-1077.

19- Milosevic, N.; Mitar G.; Mirjana J.; Darink, B.; Momcilo U. and Maja,C.(1995). Number of microorganisms and dehydrogenase activity in soil under peas, onion & cabbage. Mikrobiologija, 32: 259-261

20- الظفيري، محمد إبراهيم (1999). تأثير مستوى الكاربون في المواد العضوية المضافة والتلقيح بـ *Azotobacter vinelandii* في تغير التربة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

21- Ratti, N.; Kamar, S.; Verma, H. N. and Gautam, S. P.(2001). Improvement in biovall – ability of tricalcim phosphate to cymbopogon martinii var. motia by rhizobacteria AMF,and *Azospirillum* inoculation. Microbiological Rese–arch,156(2):145-149. (in Germany).

22- Vazque, Z. P.; Holguin, G.; Puente, M.E.; Loppez – Cortes, A. and Bashan, Y. (2000).Phosphate solubilizing microorganisms associates with the rhizosphere of mangroves in asemirid coastal Lagoon. Biology & Fertility of soils 30 (5-6): 460-468

23- الكسندر، مارتن (1982). مقدمه في مايكروبيولوجيا التربة. الطبعة الثانية. ترجمة جون وايلي وأولاده، نيويورك.