Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

تنقية وتقدير هرمون أندول حامض الخليك من الخميرتين *Rhodotorula mucilaginosa* -AR و*Kodamaea ohmeri*- AR1 وتحديد أفضل الظروف البيئية لإنتاجه.

عصام داوؤد سليمان[1]، اروى شوكت ذنون[2]

[2,1] قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، موصل، العراق.

[1]Is_alr@yahoo.com, [2]arwaaltaii@gmial.com

الملخص

اظهرت النتائج ان (5) عزلات فقط اثبتت قدرتها على انتاج الـ IAA بتراكيز مختلفة؛ كانت افضل العزلات من الخمائر *Kodamaea ohmeri* –AR1 و*Rhodotorula mucilaginosa* –AR في إنتاجها للهرمون إذ بلغ µg/ml 109 و107 على التوالي عند زراعتها على وسط Yeast Pepton Glucose (YPG) بدرجة حرارة 28°C لمدة 5 ايام باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer. بلغ اعلى انتاج للـ IAA عند تحضينها لمدة 7ايام µg/ml 222.2 و217.6 لكل من الخميرتين *K .ohmeri*-AR1 و*Rh.mucilaginosa* –AR على التوالي. كما اظهرت النتائج ان الكلوكوز افضل مصدر كاربوني لانتاج IAA للعزلة*K.ohmeri* -AR1 والمانيتول للعزلة *Rh.mucilaginosa* -AR إذ بلغ تركيزهما 119.4 µg/ml و58.3 على التوالي. في حين كان التربتون افضل مصدر نتروجيني إذ بلغ انتاج الهرمون 194.0 µg/ml للعزلة *K.ohmeri* –AR1 والببتون للعزلة *Rh.mucilaginosa* -AR 68.4 µg/ml . اوضحت النتائج ان للرقم الهيدروجيني تاثيرا واضحا في انتاج IAA إذ اعطى اعلى انتاج من pH6 للعزلة *K.ohmeri*-AR1 اذ بلغ 267.9 µg/ml و pH7 للعزلة *Rh.mucilaginosa* –AR بلغ انتاجها µg/ml 246.5 وكان اعلى انتاج للـ IAA عند استخدام التربتوفان بتركيز 0.3% للعزلة *Rh.mucilaginosa* AR بينما اعطى تركيز 0.4% للعزلة *K.ohmeri*-AR1 208.85 µg/ml . كما تم تقدير الهرمون 191.36µg/ml

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

باستخدام HPLC اذ بلغ تركيزه 96 µg/ml للعزلة *K.ohmeri*-AR1 و 44 µg/ml للعزلة *Rh.mucilaginosa*-AR .

الكلمات الدالة: اندول حامض الخليك، الخمائر.

DOI: http://doi.org/10.32894/kujss.2019.14.4.6

Purification, Estimation of Indole Acetic Acid of the Yeasts *Kodamaea Ohmeri* –AR1and *Rhodotorula Mucilaginosa* – AR and Determination of the Optimium Environmental Conditions for Its Production

Essam D. Sulyman[1], Arwa SH. Thanon[2]
[1,2] Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.
[1]Is_alr@yahoo.com, [2]arwaaltaii@gmial.com

Abstract

The results indicated that (5) isolates only of yeasts of them have proved their ability for IAA production with different concentrations. Best yeast isolates where chosen for IAA production the yeast; *K. ohmeri* –AR1and *Rh.mucilaginosa* –AR the best isolates to produced 109 and 107 µg/ml for each of them respectively, when grown on YPG media at 28℃ for 5 days. Spectrophotometer were used for this purpose. The highest production of IAA were noticed when incubated for 7 days and reached 222.2 and 217.6 µg/ml respectively. Results also declared that glucose was the best carbon source the production of IAA for *K.ohmeri* –AR1and manitol for *Rh.mucilaginosa* –AR and reached 119.4 and 58.3 µg/ml respectively. While trypton was the better source of nitrogen and gave 149.0 µg/ml for *K.ohmeri* –AR1and pepton for *Rh.mucilaginosa* –AR with 68.4 µg/ml. Result also showed that pH level played an important role on the production of IAA where the high output was discovered at pH 6 for the growth of *K.ohmeri* –AR1gave 267.9 and pH 7 produced 246.5 µg/ml for *Rh.mucilaginosa*-

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

AR . The highest concentration of IAA production was noticed when tryptophan was used at 0.3% for growing of *Rh.mucilaginosa* –AR and 0.4% for *K.ohmeri* –AR1 where hormone production was about 191.3 and 202.8 µg/ml for each of them respectively. The estimation of IAA was also done by HPLC which gave 96 µg/ml of IAA for *K.ohmeri* –AR1and 44 µg/ml for *Rh.mucilaginosa*-AR .

Keyword: Indole Acetic Acid, Yeast.

DOI: http://doi.org/10.32894/kujss.2019.14.4.6

1. المقدمة:

يعد الاندول استيك اسيد Indole Acetic Acid (IAA) أحد الهرمونات النباتية ويصنف على أنه من مشتقات عائلة الاوكسينات و يمكن انتاجه بكميات كبيرة في المرستيم القمي، البراعم، الاوراق والاوراق الفتية [1]. يحتاج النبات IAA اكثر من اي نوع آخر من مشتقات الاوكسينات يعتبر IAA اكثر الاوكسينات فعالية من الناحية الفسلجية، اذ يتم إنتاجه عن طريق أيض التربتوفان من قبل العديد من الاحياء المجهرية ومن ضمنها البكتريا المشجعة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) [2]. يمتلك الهرمون ادواراً مهمة في حياة النبات مثل تحفيز انقسام الخلايا، استطالتها ويعد مسؤولاً عن الانتحاء الارضي والضوئي [3]، كما يعمل على زيادة حماية النباتات من المؤثرات الخارجية ويعد عاملاً منظماً لتمايز الخلايا المايكروبية، مثل تحفيز إنبات الابواغ استطالة المايسليوم لبكتريا الستربتومايس والاكتينومايسيتات [4]. ان الباديء الرئيس لتخليق IAA في النباتات والاحياء المجهرية هو الحامض الاميني التربتوفان وتؤدي اضافته للوسط انتاجا عاليا للهرمون [5]. يلعب الاوكسين المايكروبي دورا مهما في تداخل النباتات مع الاحياء المجهرية وفي الاونة الاخيرة ازداد دور الاندول المايكروبي عند تداخل النباتات مع الاحياء المجهرية كالبكتريا والفطريات والخمائر [6]. ينتج IAA من قبل انواع مختلفة من الاحياء المجهرية مثل البكتريا، الفطريات، الخمائر، الطحالب. تشير الدراسات إلى ان IAA ينتج من الخمائر مثل *Pichia* sp. [7]، *Candida valida* و*Rhodotorula glutinis* و*Trichosporon asahii* و*Cyberlindnera* [8]، *Rh.graminis*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

و*Rh.mucilaginosa* [9]. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد قدرة عزلات الخمائر المعزولة من الترب والثمار على انتاجها لهرمون اندول حامض الخليك Indole Acetic Acid (IAA) وتحديد الظروف المثلى لانتاجه.

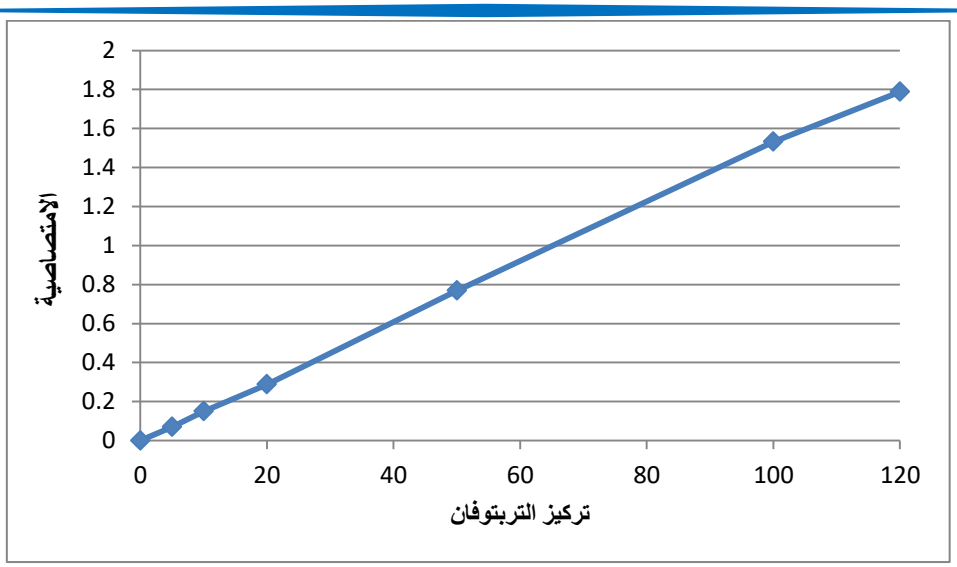
2. المواد وطرائق العمل:

2.1 الكشف عن هرمون أندول حامض الخليك:

اعتمدت الطريقة اللونية Colorimetric method للكشف عن انتاج هرمون IAA من قبل عزلات الخمائر المعزولة من الثمار والترب تسمى هذه الطريقة Salkowski test وذلك بزراعة عزلات الخمائر في قناني زجاجية حاوية على الوسط Yeast pepton glucose باضافة 0.1% (V/W) تربتوفان. لقح الوسط الغذائي بعزلات الخمائر بدون اضافة التربتوفان، حضنت في الحاضنة الهزازة بدرجة 28°C بسرعة 50 rpm لمدة 5 دقائق في ظروف مظلمة. أخذ 2ml من راشح العزلات طردت مركزيا عند القوة 5000 rpm ولمدة 5 دقائق. اخذ 0.5 ml من العالق ومزج مع 0.5 ml من كاشف سالكوسكي نلاحظ تغير اللون بعد اضافة الكاشف إلى اللون الوردي ثم يزداد تدريجيا بعد 30 دقيقة من التحضين في ظروف مظلمة في درجة حرارة الغرفة. بعد ذلك تم تقدير الهرمون باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي (530)nm [10].

تم عمل المنحنى القياسي للاندول باستخدام IAA القياسي وذلك باذابة 10 mg من IAA في 100 ml من الاسيتون (1000 µg/ml) من المحلول الخزين تم عمل التراكيز (10 µg/ml –100) . تم مزج 1 ml من كل تركيز مع 1 ml من الكاشف بعد ذلك حضن لمدة 30 دقيقة في ظروف مظلمة بدرجة حرارة الغرفة تم تقديرها بواسطة المطياف الضوئي بطول موجي 530 nm شكل 1.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)



شكل 1: المنحنى القياسي للـ IAA.

2.2 دراسة الظروف المثلى لانتاج هرمون الاندول حامض الخليك IAA:

لغرض تحديد الظروف المثلى لانتاج هرمون IAA من عزلات الخمائر تم تغير الظروف لواحد أو اكثر من مكونات الوسط فترات التحضين والرقم الهيدروجيني.

تم دراسة تاثير كل من فترات التحضين من 1–9 ايام والرقم الهيدروجيني pH 4–8 والمصادر الكاربونية كلوكوز – سكروز – نتروز – لاكتوز – كلاكتوز – مالتوز – ارابينوز – مانوز – مانيتول، المصادر النتروجينية الببتون – التربتون – نترات البوتاسيوم KNO_3 كلوريد الامونيوم NH_4Cl ونترات الامونيوم NH_4NO_3 وكبريتات الامونيوم $(NH_4)(SO_4)$، واستخدام تراكيز مختلفة من الحامض الاميني التربتوفان (0.1 – 0.2 – 0.3 – 0.5 – 0.6%) على انتاج الهرمون IAA.

2.3 استخلاص وتنقية هرمون IAA:

تم تلقيح وسط Yeast Pepton Glugose (YPG) السائل بعزلات الخمائر في دوارق مخروطية سعة 250ml تحتوي على 50 ml من الوسط حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بدرجة 28°C لمدة 7 ايام في ظروف مظلمة وتم طرد العزلات مركزيا عند سرعة 10.000 rpm لمدة 30 دقيقة تم تعديل الحامضية باستخدام حامض HCl الى pH 2.5

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

وضع في قمع الفصل وجرى رجه بشكل جيد وترك لمدة 10 دقائق يلاحظ ظهور طبقتين اخذت طبقة خلات الاثيل الحاوية على الهرمون، وتم اجراء عملية الاستخلاص باستخدام خلات الاثيل بنسبة 2:1 ثلاث مرات بعد ذلك تم التخلص من خلات الاثيل باستخدام المبخر الدوار Rotary evaporater عند درجة 40°C بعدها اذيب المستخلص بالميثانول [11].

2.4 تنقية الهرمون بتقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة:

بعد استخلاص الهرمون بخلات الاثيل تم تقنية الهرمون باستخدام (TLC) Thin Layer Chromatoghraphy استخدمت الواح TLC (40f254) cilica gel plate (20×20) وسمك (0.25 mm) مجهزة من شركة Merk الالمانية وباستخدام محلول التشرب Propamo: water بنسبة V/V(8:2) تم تطبيق العينات وIAA القياسي (100/ 10 mg ml) [12].

2.5 التقدير الكمي لهرمون IAA باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الفصل السائل عالي الاداء:

بعد استخلاص الهرمون الخام واذابته في 3 ml من الميثانول ثم حقن 20µl من كل عينة وIAA القياسي بمعدل جريان 1 ml/min ولمدة 10 دقائق باستخدام جهاز High Performance Liquid Chromatoghraphy HPLC موديل SYKMN الماني المنشأ باستعمال:

محلول الفصل Mobile phase (A) (Methanol: D.W: Acetic Acid) بالنسب (2: 12: 85) محلول الفصل (B)(Methanol: D.W: Acetic Acid) بالنسب (5: 70: 25) وذلك باستعمال عمود الفصل C18-ODs (25cm ×4.6mm) عند الطول الموجي UV 360nm [13]. استخدمت المعادلة التالية لحساب العينة المجهولة: العينة

$$\text{المجهولة µg/ml} = \frac{\text{مساحة العينة}}{\text{مساحة العينة القياسية}} \times \text{تركيز المحلول القياسي.}$$

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

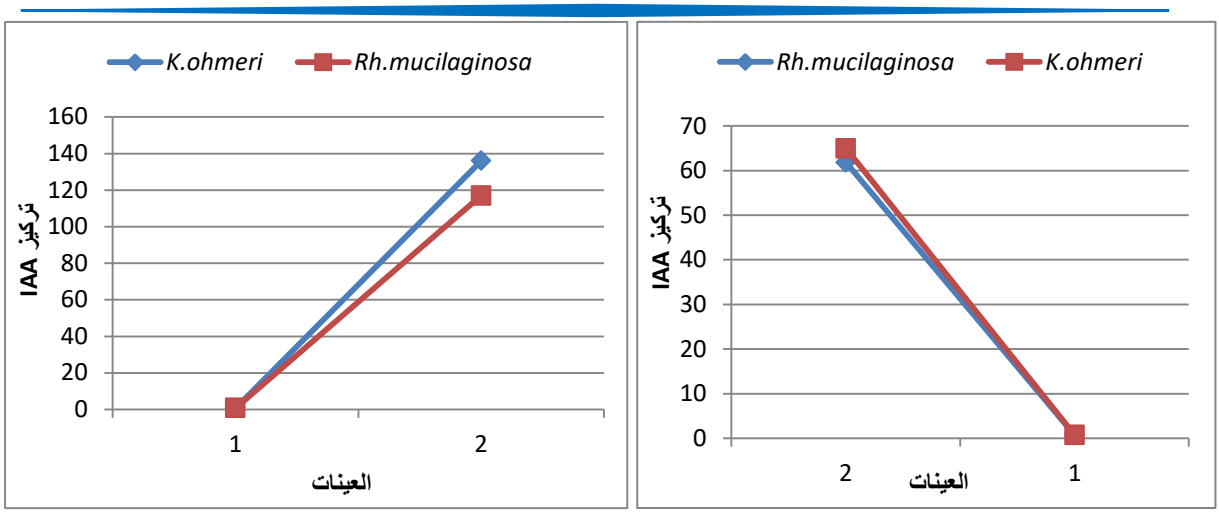
3. النتائج والمناقشة:

تم اختبار قابلية العزلات على انتاج IAA باستخدام كاشف سالكوسكي اذ يتحول اللون إلى الوردي بعد اضافة الكاشف وتزداد شدة اللون بعد 30 دقيقة من التحضين في ظروف مظلمة بدرجة حرارة الغرفة شكل 2.

وجرى قياس الكثافة الضوئية لهرمون IAA باستخدام جهاز المطياف الضوئي لتحديد تركيز IAA المنتج من عزلات الخمائر اذ اظهرت خمسة عزلات فقط قدرتها على انتاج الهرمون وبتراكيز مختلفة. تم اختيار العزلات الاكثر كفاءة في انتاج IAA وهما AR1- *K.ohmeri* و *Rh. mucilaginosa*-AR، وتم مقارنة قابلية العزلات على انتاج IAA في وسط خالي من التربتوفان مع الوسط الحاوي على التربتوفان بتركيز 0.1% اذ لوحظ انتاج اعلى لهرمون IAA بلغ 109µg/ml و107 لكل من العزلتين AR1– *K.ohmeri* و *Rh.mucilaginosa*-AR على التوالي في حين كان تركيزهما في الوسط الخالي من التربتوفان 61.8 µg/ml و59.1 شكل 3.

شكل 2: انتاج هرمون IAA بواسطة عزلات الخمائر 15- K.ohmeri 37- Rh.mucilaginosa

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)



b **a**

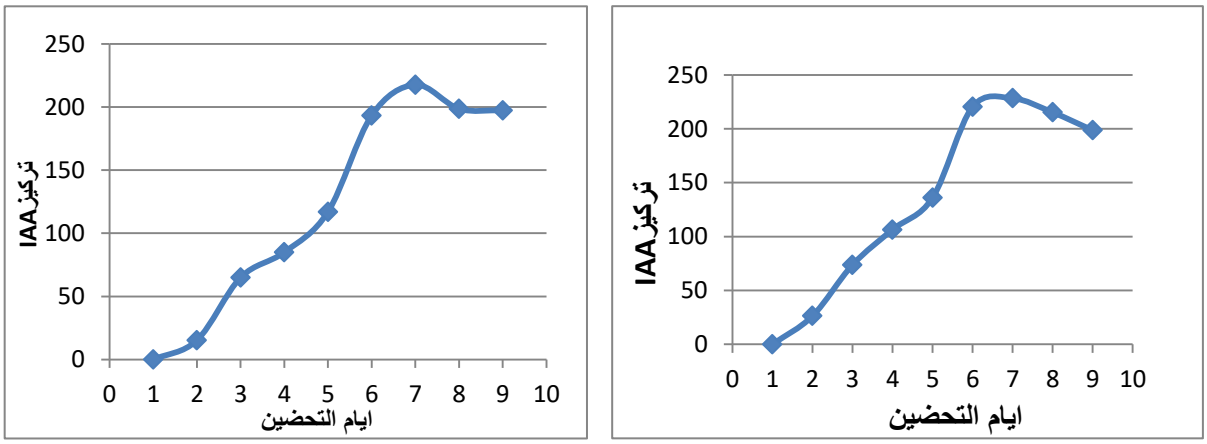
شكل 3: a: تركيز ال IAA المنتج من قبل عزلات الخمائر في الوسط الخالي من التربتوفان. **b:** تركيز ال IAA المنتج من قبل عزلات الخمائر في الوسط الحاوي على التربتوفان.

ان استخدام تقنية كاشف سالكوسكي مهمة في التقدير الكمي لهرمون IAA في الاوساط الغذائية السائلة إذ يتفاعل كاشف سالكوسكي مع IAA ولا يتفاعل مع N-acetyle-L-tryptophan المستخدم بشكل عام [14]. يعتبر التربتوفان بشكل عام كمصدر لهرمون IAA لان اضافته إلى الاوساط المنتخبة لهرمون IAA يعزز البناء الحيوي لهذا الهرمون [15]. هناك العديد من الدراسات التي أشارت إلى انتاج IAA من قبل الخمائر اذ بين [16] قدرة *Auerobosidium pullulaus* على انتاج IAA بتركيز 147.4 µg/ml في حين اظهرت الخميرة *Sporisorium reilianum* انتاجا اقل من IAA بلغ تركيزه 32.0 µg/ml على الرغم من ان جميع عزلات *Cryptococcus flavus* كانت منتجة لـ IAA الا ان انتاجها يعتمد على العزلات التابعة لنفس النوع ويتراوح معدل الانتاج ما بين 38.6µg/ml إلى 103.9 في حين *Pseudozgma aphidis* لها القابلية على انتاج IAA بتراكيز واطئة.

اظهرت النتائج التي توصل اليها [17] قدرة *Rh.mucilaginosa* على انتاج IAA بتراكيز عالية مقارنة مع *Trichosporon asahii* تحت جميع الظروف المستخدمة في الاختبار قام كل من [18] بعزل الخمائر من انواع نباتية مختلفة من 7 مدن تايلندية مختلفة اذ تم الحصول على 114 عزلة من الخمائر و10 عزلات من الفطريات الشبيهة بالخمائر تم تشخيصها إلى 18 جنس يعود إلى الخمائر الكيسية منها *Kodamea* و*Pichia* وكذلك الخمائر البازيدية

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

Sporidiobolus و*Trichosporon* واظهرت العزلات قدرتها على انتاج IAA كما بين ان تركيز IAA المنتج من قبل *K.ohmeri* LM052 كان 25.7 mg/l و*K.ohmeri* LM_{111} بلغ 24.3 mg/l. كما اوضح [19] ان (DMK4-RP233) *K.ohmeri* تنتج 2.0 mg/l. تم دراسة الظروف المثلى لانتاج الـ IAA اذ اظهر اختبار فترات التحضين ان انتاج IAA لليوم الأول بلغ (0) لجميع العزلات ولوحظ بدء انتاج IAA في اليوم الثاني للتحضين وبلغ 26.3µg/ml و15.2 للعزلة *K.ohmeri*-AR1 و *Rh.mucilagions* -AR على التوالي. في حين انخفض انتاج IAA لكلا العزلتين في اليوم الثامن والتاسع بلغ 217.6µg/ml و195.4 لكل منهما على التوالي. شكل 4 وقد بين ان هذا الانخفاض ربما يعود إلى تحطم الانزيمات المحللة لهرمون IAA مثل IAA Oxidase و Peroxidas [20].



b **a**

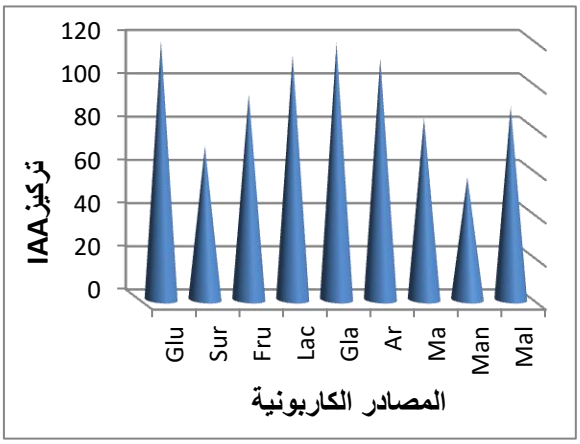
شكل 4: a: تاثير ايام التحضين على انتاج IAA بواسطة العزلة *K.ohmeri* **b:** تاثير ايام التحضين على انتاج IAA بواسطة العزلة *Rh.mucilaginosa*

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [21] ان انتاج IAA بدأ في اليوم الثاني من التحضين بلغ 21.2mg/l ويزداد إلى 301.7 mg/l وكان اعلى انتاج في اليوم السابع 321.7mg/l بواسطة العزلة *Rhodosporidium paluclignum*، كذلك اوضحت نتائج [9] ان اعلى انتاج لهرمونIAA في اليوم السابع بواسطة العزلات *Rh.graminis* و*Rh.mucilaginosa* وانخفض في اليوم الثامن من التحضين بلغ 30.98mg/l. كان اعلى انتاج للاندول عند الوزن الجاف للخلايا بالنسبة *K.ohmeri* –AR1 0.64g/ml و0.83g/ml للخميرة *Rh.mucilagionsa*-AR

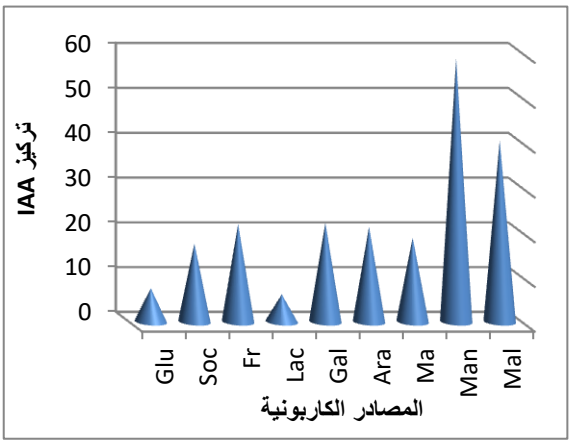
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

إذ اشار [9] ان *Rh.graminis* اعلى انتاج لهرمون IAA عند 39mg/g عند تنميتها على وسط YPD السائل بوجود 0.1% تربتوفان، تشير النتائج إلى ان *R.paludigenum* تنتج كميات عالية من IAA عند 53.6 g/mg الوزن الجاف للخلايا مقارنة مع *Rh.graminis* من بين جميع المصادر الكاربونية المستخدمة كان اعلى انتاج لهرمون IAA باستخدام المصدر الكاربوني الكلوكوز إذ بلغ 119.4µg/ml لـ *K.ohmeri*-AR1 والمانيتول *Rh.mucilagionsa*-AR 58.35 µg/ml شكل 5 عند 0.40 g/ml و0.51 g/ml الوزن الجاف للخلايا *K.ohmeri*-AR1 و*Rh.mucilagionsa* -AR على التوالي. ان هذه النتائج اختلفت عما جاء به [21] الذي ذكر ان اعلى انتاج لـ IAA كان عند استعمال السكروز 201.6 mg/l كذلك اشار [17] الى ان وجود السكروز كمصدر كاربوني يشجع انتاجه بكميات عالية مقارنة مع الكلوكوز الذي اعطى اعلى انتاج لـ IAA بلغ 0.07 mg/l بواسطة العزلة *Rh.mucilaginosa* عند pH6 وباستعمال الكلوكوز ذات انتاج اعلى عند pH4.

تشير هذه النتائج إلى ان هناك علاقة بين المصدر الكاربوني ودرجة الحموضة، في حين تتفق هذه النتائج مع [11] الذي حصل على اعلى انتاج لـ IAA باستخدام الكلوكوز بواسطة البكتريا *Bacillus mgaterium* والمانيتول لـ *Lactobacillus casei* و*B.subtilis* والكلوكوز والمانيتول *B.cereus*. أشار [22] إلى الانتاج العالي للهرمون IAA في الوسط الحاوي على المانيتول واللاكتوز.



a



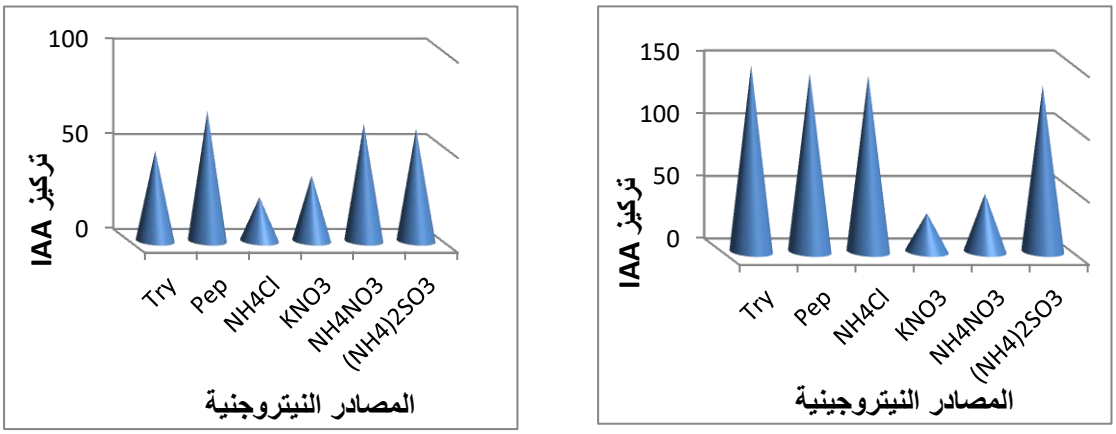
b

شكل 5: a: تاثير المصادر الكاربونية على انتاج IAA للعزلة *K.ohmeri*

b: تاثير المصادر الكاربونية على انتاج IAA للعزلة *Rh.mucilaginosa*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

اما بالنسبة للمصادر النتروجينية المستخدمة في الدراسة بتركيز 1% فقد كان اعلى انتاج لهرمون IAA هو 49.0 µg/ml باستخدام المصدر النتروجيني التربتون بالنسبة للعزلة *K.ohmeri* -AR1عند الوزن الجاف للخلايا 0.20g/ml والببتون 68.4 µg/ml الوزن الجاف للخلايا 0.40 g/ml للعزلة *Rh.mucilagionsa* –AR شكل 6.



شكل 6: a: تاثير المصادر النيتروجنية على انتاج IAA للعزلة *K.ohmeri*

b: تاثير المصادر النتروجينية على انتاج IAA للعزلة *Rh.mucilaginosa*

إن هذه الاختلافات المعنوية في انتاج IAA تشير إلى وجود تأثير عالي للمصادر النتروجينية على انتاج IAA. اذ بينت نتائج [21] ان اعلى انتاج لهرمون IAA بواسطة العزلة *R.paludigenum* كان عند استخدام شراب الذرة 314.8mg/l وانخفاض الوزن الجاف للخلايا في حين ان المصادر النتروجينية الأخرى كلوريد الامونيوم، الببتون كانت ذات انتاجية اقل اذ بلغت195.8 mg/l و280.3 على التوالي، كما بين عدم وجود فرق معنوي في انتاج IAA عند استخدام شراب الذرة بتركيز 0.1% و0.05% اذ بلغ 314.8 mg/l و310.2 على التوالي.

كما اوضح ان مستخلص الخميرة تميز من بين جميع عوامل النمو المستخدمة في الاختبار بانتاج عالي لهرمون IAA اذ بلغ 565.4 mg/l باستخدام التركيز المثالي 1% من مستخلص الخميرة وبلغت الانتاجية 214.7 m/l و222.9 باستخدام كل من مستخلص اللحم ومستخلص الشعير على التوالي كمصدر نيتروجيني.

في حين تبقى كمية IAA المنتجة من قبل *R.paludigenum* اقل انتاجية من العزلة *Pantoea agglomeraus* وبلغت 2.191 mg/l تحت مكونات الوسط المثلى وظروف النمو [23] وذكر [11] ان اعلى انتاج للـ IAA عند استخدام

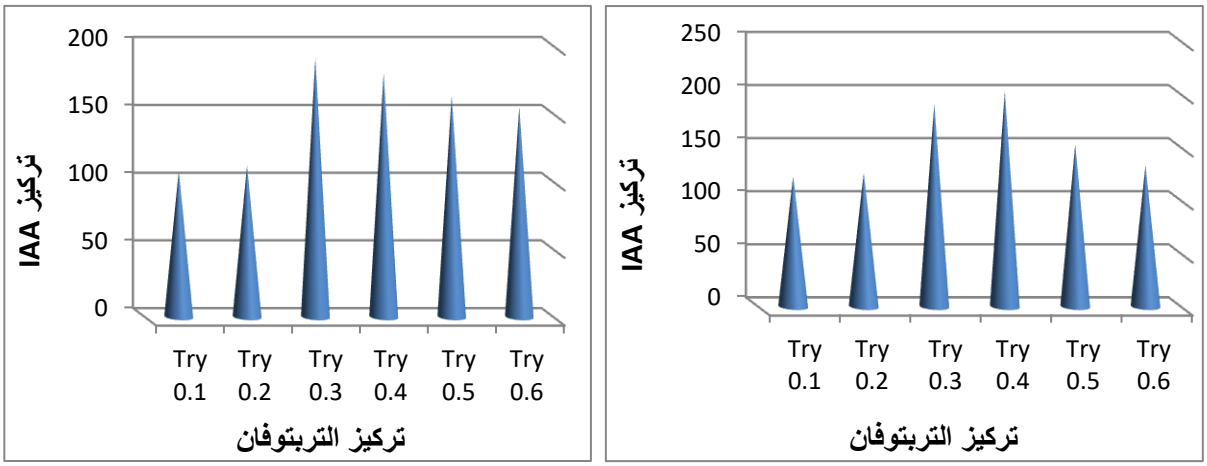
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

$NaNO_3$ كمصـــدر نيتروجينـــي للعزلـــة *B.megaterium* و*L.acidophilus* ونتـــرات البوتاســـيوم والببتـــون *L.casei* و*B.subtilis* والببتون لبكتريا *B.cereus*. تم استخدام تراكيز مختلفة من التربتوفان لمعرفة التركيز الامثل في انتاج IAA اذ كان التركيز 0.4% للتربتوفان هو الامثل للعزلة *K.ohmeri*-AR1 اذ بلغ 202.85 µg/ml عند 0.50g/ml وزن جاف للخلايا والتركيز 0.3% للعزلة *Rh.mucilaginosa*-AR اذ بلغ 91.36 µg/ml عند 0.43 g/ml وزن الجاف للخلايا شكل 7.

وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [21] اذ كان اعلى انتاج *R.paludigenumm* 1.054 mg/l عند استخدام التربتوفان بتركيز 4%. واوضح ان التركيز العالي للتربتوفان 0.5 و0.6% لا يزيد من انتاج IAA في هذه الخميرة تشير النتائج ان التركيز المثالي يجهز انتاج IAA 3.3 اضعاف الانتاج الاولي عند زراعة الخميرة في وسط YPD المضاف اليه 0.1% تربتوفان واشار [11] جميع عزلات البكتريا الخمسة كانت الافضل في انتاج IAA بوجود التربتوفان اعلى انتاج لهرمونIAA وجد في الوسط الحاوي على 0.1% تربتوفان لبكتريا *B.megaterium* و*L.casei* و*B.subtilis* و1.5% لـ *B.cerus* و0.05% *L.acidophilus*. لا ينتج IAA أو ينتج بكميات ضئيلة في الاوساط الخالية من التربتوفان هناك اختلافات معنوية في مستويات التربتوفان لتباين الكائنات المجهرية بالنسبة للعديد من البكتريا يعتبر تحويل التربتوفان إلى IAA الاكثر اهمية.

اظهرت النتائج ان الرقم الهيدروجيني ذو تاثير كبير على انتاج IAA واظهر هناك فرق معنوي بين pH4 ، pH6 و pH7 اذ كان اعلى انتاج لهرمون IAA عند pH7 بالنسبة *K.ohmeri* –ARl 246.5µg/ml عند 0.7 g/ml و pH6 للعزلة *Rh.mucilaginosa* –AR إذ بلغ 267.9µg/ml عند 0.40g/ml شكل 8.

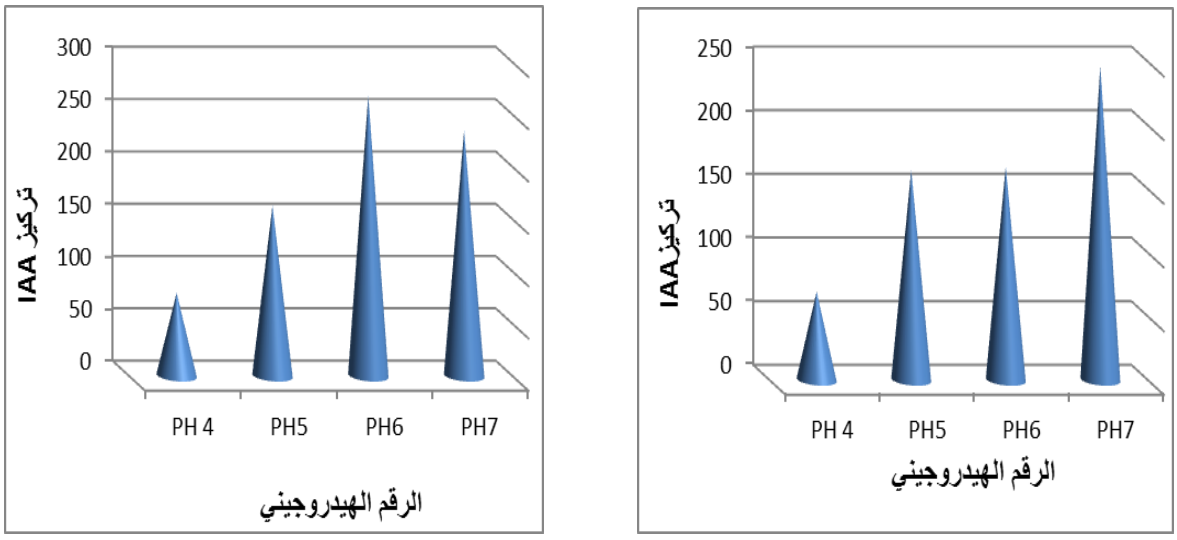
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)



b **a**

شكل 7: a: تاثير تركيز التربتوفان على انتاج IAA للعزلة *K.ohmeri*

b: تاثير تركيز التربتوفان على انتاج IAA للعزلة *Rh.mucilaginosa*



b **a**

شكل 8: a: تاثير pH على انتاج IAA للعزلة *Rh.mucilaginosa* **b:** تاثير pH على انتاج IAA للعزلة *K.ohmeri*

ذكر[17] ان للرقم الهيدروجيني تاثيراً مهماً على انتاج IAA بواسطة *T.asahii* إذ يبدأ انتاج IAA عند pH4.5 بينما كان اقصى انتاج له 0.03 mg/l في الوسط الحاوي على 2% كلوكوز كمصدر كاربوني في حين ان pH3 لا يسمح

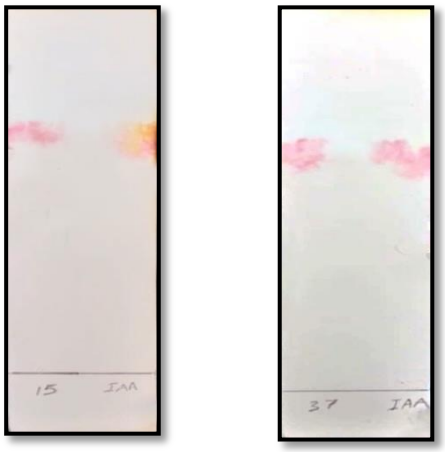
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

بانتاج IAA بواسطة الخمائر. وبين كذلك بان *Rh.mucilaginosa* تنتج كميات عالية من IAA بلغت 0.65 mg/l عند pH6 في الوسط الحاوي على الكلوكوز كمصدر كاربوني. كما بين [21] ان انتاج IAA يبدأ عند pH4 وان اعلى انتاج لهرمون IAA عند pH7 الذي وصل إلى1.464 mg/l.

3.1 استخلاص وتقنية اندول حامض الخليك:

3.1.1 كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة:

بعد استخلاص IAA بخلات الاثيل تم تنقيته باستخدام الواح TLC ومحلول التشريب Propanol: water بنسبة (8:2)V/V تم تطبيق كل من العينات وIAA القياسي على اللوح بشكل بقع ورشه بكاشف سالكوسكي يلاحظ ظهور بقع وردية اللون تم قياس معدل الجريان Rate flaw (R_f) للعينات وIAA القياسي كانت Rf للعينات مساوية لهرمون IAA القياسي تقريبا بينما كان *K. ohmeri* –AR1 Rf 0.93 و *Rh.mucilaginosa*-AR 0.95 وIAA القياسي 0.95 وكانت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه [24] شكل 9.



A **B**

شكل 9: تنقية هرمون IAA بتقنية TLC

A: العزلة *Rh.mucilaginosa* 37 **B:** العزلة *K.ohmeri* 15

IAA الهرمون القياسي

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)

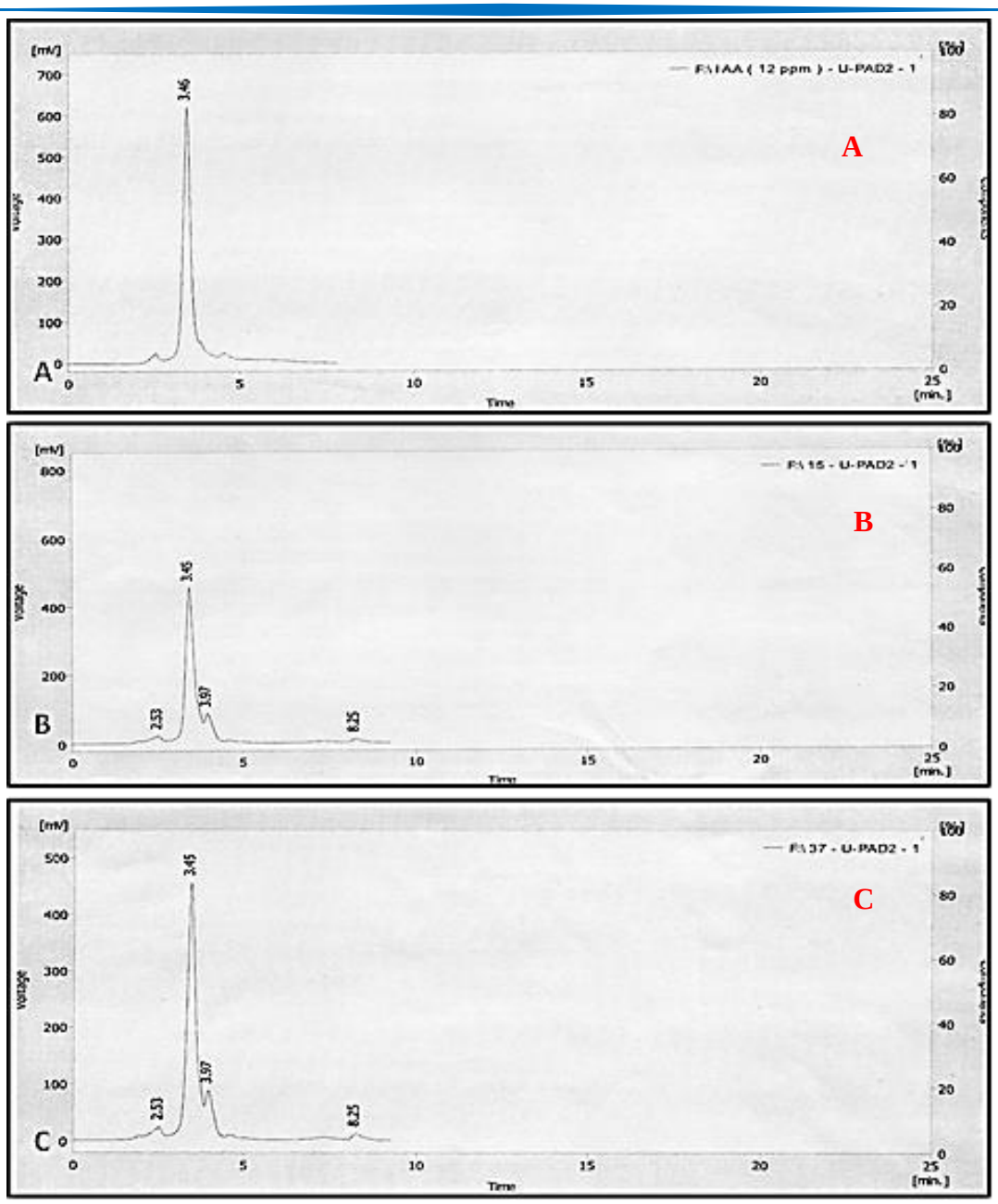
3.1.2 التقدير الكمي لاندول حامض الخليك باستخدام كروماتوكرافيا الغاز السائل عالي الاداء:

بينت نتائج التقدير الكلي لهرمون IAA بتقنية HPLC إلى ان تركيز IAA المنتج من قبل *K.ohmeri* –AR1 كان اعلى اذ بلغ 96µg/ml مايكروغرام/مل من العزلة *Rh.mucilaginosa*-AR اذ بلغ 44 µg/ml المزروعة على وسط YPG مستخلص الخميرة والببتون والكلوكوز مضافا اليه 0.1% تربتوفان وفترة تحضين 7 ايام.

اذ كان زمن الاحتباس لهرمون IAA الخام المعزول من العينات 3.54 لكلا العزلتين مقارب لزمن الاحتباس لـ IAA القياسي 3.46 شكل 10. ان هذه النتيجة تتوافق مع ما جاء به [25] عند فصل وتقنية الهرمون من الفطر *Fusarium oxysporum* (F2) باستخدام جهاز HPLC حيث كان زمن الاحتباس 3.882 للهرمون القياسي وبلغ 3.887 للهرمون المستخلص من الفطر. كما بين [26] ان تركيز IAA في المزارع السائلة بواسطة HPLC لبكتريا *Pseudomonas flourencence* بلغ 40 mg/l كان اقل من التركيز الذي تم الحصول عليه في دراستنا.

الا ان النتائج التي حصل عليها [27] لهرمون IAA بواسطة HPLC للخميرة *K.ohmeri* كان التركيز اعلى من الذي تم الحصول عليه في دراستنا اذ بلغ 1563.7 µg/ml ، كما اعطت 31 عزلة من *Rh.mucilaginosa* انتاجا من هرمون IAA بلغ ما بين (12.2−1139.1) µg/ml. في حين كان تركيزه في الخميرة *Rh.mucilaginosa* DMKu-Y33-A 66.9 µg/ml [28].

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 14, Issue 4, December 2019, pp. (89-108)
ISSN: 1992-0849 (Print), 2616-6801 (Online)



شكل 10: التقدير الكمي لهرمون IAA باستخدام كروماتوكرافيا الغاز السائل عالي الاداء HPLC

A: الهرمون القياسي **B:** عزلة *K.ohmeri* **C:** *Rh.mucilaginosa*

المصـــادر:

[1] J. Ueda, M.K. Komaki, K. Okada and Y. Shimura. **"*Identification and quantitative distribution of Indole-3-acetic acid in Brassica juncea Xzeru*"**, Journal Plant Physiology, 137, 628 (1991).

[2] J. M. Lynch. **"*Origin, nature and biological activity of aliphatic substance and growth hormones found in Soil*", ** In: Vanghon, D., Malcom, R.E. (Eds) Soilorganic matter and biological activity. Matinus nigh of Dr. Jank publish. Dordrecht, Boston, Lamcaster. 151,174 (1985).

[3] W. D. Teale , I.A. Paponv and K. Palme. **"S*Auxin in action. Signaling, transport and the control of plant growth and development*", ** . Molecular Cell Biology, 7(11), 847 (2006).

[4] E. Matsukawa, Y. Nakagawa, Y. Imura and M. Hayakawa,**"*Stimulatory effect of Indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in Streptomyces spp*", ** Actinomycetologica, 21, 32 (2007).

[5] H. Rifat, A. Safda , A. Ummay , Rabiak and A. Iftikhar,**" *Soil benficial bacteria and their role in plant growth promotion*", ** A review. Annals of Microbiology, 60, 597 (2010).

[6] R. Radhakrishaan, K.B. Shim, B.W. Lee, C. Hwang and S.B. Pae**," *IAA-production Pencillium sp. NICSo1 triggers plant growth and sufferesses Fusarium sp.-induced oxidative stress in Sesame (Sesamum indicum L.)*" ,** Journal Microbiol Biotechnology. 123,856 (2013).

[7] T. Nakarmura, T. Murakami , M. Saotome, K. Tomita , T. Kitsuwa**, "*Identification of indole-3-acetic acid in Pichia sfartinae,an ascosporogenous yeast from Spartina alterniflora*", ** marshal and environment. Mycologia, 83,662 (1991).

Nassar, A.H., El-Tarabily, K.A. and Sivasithampanam, K. ***"Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yest Williopsis saturnus endophytic in Maize (Zea mays L.) roots" ',*** Violation. Fertility. Soils. 42, 97 (2005).

[8] G. Xin ; D. Glawe and S.L. Doty. ***"Characterization of the three endo phytic, indol-3-acetic acid producing Yeast occurring in Populus trees",*** mycological . Research. 113,973 (2009).

[9] S.F. Fu; P.F .Sun.; H.Y . Lu; J.Y. Wei; H.S. Xiao; W.T. Fang; B.Y. Ghengand and J.Y. Chou, ***"Plant growth promoting trails of yeast isolated from the phylosphere and rhizospher of Drosera spatulata Lab",*** Funal Biology. 120(3),433 (2017).

[10] B. Mohite and Bhavna***, "Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth"***, Journal . Soil Science and Plant Nutrition., 13(3): 638 (2013).

[11] G. Ren, , S. Turksen, E. Umran, L.W. Timmer, and P.U. Peter. ***"Indol derivatives produced by the fungus Colletetorichum acututum casing lime anthracnose and post bloom fruit drop of citrus"*** . F.E. Ms Microbiology letters, 226, 23 (2003).

[12] G. Mradu ,S. Saumyakauti, M. Sohini and M. Arup. ***"HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plant",*** International. Journal. Pharmacognosy and Phytochemical Research. 4(3), 162 (2012).

[13] H.L. Vaghasiat , G.M. Pate, R.S. Chudasama and K.R. Bhott. ***"Screening of IAA from rhizosphere micro flora of filed crops",*** Bio scinence Discovery. 02,94 (2011).

[14] A. Costacurta and J. Vanderleydn. ***"Synthesis of phytohormons by plant associated bacteria",*** Critical Reviews in Microbiology. 21,1 (1995).

[15] P.F. Sun ; W.T. Fang ; L.Y. Shin; J.Y .Wei and S.F. Fu et al **." *Indole 3-acetic acid producing yeasts in the phyllosphere of the carnivous plant Drosera indica L*." ,** Plos ONE journal 9(12).pone 011496.

[16] A.S.D.E .Scarcella , R.Bizarraia **,** R.G.Bastos and M.M. Magri **. "*Temperature , pH and carbon source affect drastically indole acetic acid production of plant growth promoting yeasts* ",** Brazilian Journal of Chemical Engineering .34(02), 429 (2017) .

[17] S. Limtong and N.Koowadjanakul**"*Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole -3-acetic acid*",** world Journal of Microbiolology and Biotechnology 28,3323 (2012).

[18] P. Nutaratat , N. Srisuk , P. Arunattiyakorn and S. Limtong, **" *Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and suger cane leaves in Thailand* ",** Fungal. Biology. 118,683 (2014).

[19] C. Datta and P.S. Basu, ***"Indol acetic acid by Rhizobium species form root nodules of a leguminous shrub, Cajamus cajan"*,** Microbiology. Research. 155,132 (2000).

[20] P. Nutaratut , W. Amsri , N. Srisuk , P. Arunrattiokorn, and S. Limotong**." *Indole-3-acetic acid production by newly isolate yeast Rhodosporidium paludigenum*",** Journal General and Applied. Microbiology, 61,1 (2015).

[21] T. Shilts , V. Erturk , N. J. Patel and K.P. Chung. **"*Physiological regulation of biosynthesis of Indole-3-acetic acid and other indole clerivatives by the citrus fungal pathogen Collectotrichum acutatum*",** Journal. Biology science 5,205 (2005).

[22] O.A. Apine and J.P. Jadhar **"*Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using Pantoea agglomerams strain PVM*",** Journal.Applied Microbiology. 110, 1235 (2011).

[23] H. Xie , J.J. Pasternak and B.R. ***"Glick Isolation and characterization of mutant of plant growth-promoting rhizobacterium Psedomonas putida GR$_{12-2}$ that overproduce indole acetic acid",*** Current. Microbiology, 32,67 (1996).

[24] الجميلي، عصام فاضل والسامرائي، نجوى شهاب أحمد، ***"دراسة العوامل المؤثرة في انتاج منظم النمو حامض الاندول خليك من العزلة المحلية Fusarium oxysporum*** ''، مركز بحوث التقنيات الحياتية، المجلد 3، العدد (1), 15 (2009) .

[25] V. Jeyanthi and P. Ganesh. ***"Production of timization and characterization of phytohormone indole acetic acid by Pseudomonas fluorescence",*** International . Journal. Pharmaceutical Biological Science Archive , 4(2), 514 (2013).

[26] R.A. Stereltskii, A.V. Kachalkine , A.M. Glushakova , V.V. Demin and Chernov, ***"Quantitiative determination of Indole-3-acetic acid in yeast using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry",*** ISSN 0026-2617, Microbiology.85(6), 727 (2016).

[27] K. Jaiboon, N. Lertwattamasakul P. Limtong, and S. Limtong**."** ***Yeast form peat in atropical peat swamp forest in Thailand and their ability to produce ethanol, Indole-3-acetic acid and extracellular enzyme",*** Microbiological progress. 15(7), 755 (2016).