عزل البكتريا والفطريات المذيبة للفوسفات من منطقة نمو الجذور وكفاءتها في إذابة الصخر الفوسفاتي

رند عبد الهادي الطائي مازن فيصل سعيد
قسم علوم التربة والمياه / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل – العراق

الخلاصة

أجريت تجربة مختبرية لغرض عزل وانتخاب العزلات البكتيرية والفطرية الكفوءة في إذابة الصخر الفوسفاتي في البيئات الغذائية. أظهرت النتائج بأن العزلات البكتيرية تمتلك قدرات مختلفة في عملية إذابة الصخر الفوسفاتي في البيئات السائلة. تغلبت البكتريا Bacillus subtilis و Pseudomonas fluorescence على باقي العزلات البكتيرية المختبرة والبالغة أربعة عشر عزلة وهي الأكثر كفاءة في إنتاج الأحماض وفي خفض الأس الهيدروجيني ، إذ انخفض الـ pH إلى ٥.٣٥ و ٥.٢ رافقه إذابة للفسفور بمعدل ٥٠ و ٥٦ ملغم P.لتر$^{-1}$ بعد أربعة وعشرون يوماً من التحضين على التوالي. كانت علاقة الارتباط (R_2) بين زمن التحضين والأس الهيدروجيني ٠.٦٤ و ٠.٥٩ في حين كانت علاقة الارتباط بين pH البيئة والفسفور المتحرر عالية بلغت ٠.٩٨ لكلا النوعين من البكتريا . أظهرت النتائج أيضاً بأن العزلات الفطرية التابعة للأجناس Alternaria و Aspergillus هي من بين العزلات الأكثر كفاءة على باقي العزلات الفطرية المختبرة والبالغة أربع عشر عزلة في إنتاجها للأحماض وخفضها للأس الهيدروجيني حيث انخفض الـ pH إلى ٤.٧ و ٣.٣٥ بعد عشرون يوماً من التحضين على التوالي ، رافقه إذابة للفسفور بمقدار ٧٧.٧ و ١١٨.٣ ملغم P. لتر$^{-1}$ والأس الهيدروجيني هي ٠.٣٣ و ٠.٦ في حين كانت علاقة الارتباط بين الأس الهيدروجيني والفسفور المتحرر ٠.٦٥ و ٠.٤٥ ، على التوالي .

المقدمة

تنتشر الأحياء المجهرية المذيبة للفوسفات في الترب إذ تشمل أجناساً عديدة من البكتريا والفطريات وأهمها بكتريا *Bacillus* و *Pseudomonas* وفطريات *Aspergillus* حيث تزداد أعدادها في المنطقة المحيطة بالجذور (الرايزوسفير) مقارنة بالترب غير الرايزوسفيرية حيث أفاد Alexander (١٩٧٧) بأن ٢٥% من الأحياء الدقيقة في التربة لها القدرة على إذابة المركبات الفوسفاتية وأكد ذلك Bopaiah (١٩٨٥) والذي وجد بأن الأجناس *Bacillus* و *Pseudomonas* هي السائدة. أما من حيث أعدادها فإنها اختلفت باختلاف الترب حيث أوضح Yin (١٩٨٨) بأن أعداد البكتريا في تربة الجيرنسم بلغ ١٠×٤.٨٦ ^{٧} خلية.غم$^{-1}$ تربة في حين انخفضت الأعداد في الترب القاعدية إلى ٢×١٠ ^{٤} خلية.غم$^{-1}$ تربة.

تتفاوت قدرة الأحياء المجهرية المذيبة للفوسفات في إذابة مركبات الفسفور غير الذائبة ، إذ لاحظ Banik و Dey (١٩٨٢) بأن عزلات من بكتريا *Bacillus* وعزلات من فطريات *Penicillium* و *Aspergillus* والمعزولة من ترب هندية أبدت كفاءة عالية في إذابتها لفوسفات الكالسيوم الثلاثية عند تنميتها في بيئة صناعية حيث وجد بأن هذه العزلات أنتجت كميات محسوسة من الأحماض العضوية الأليفاتية الحرة مثل حامض الأوكزاليك والسكسنيك والستريك. أجرى Widiastuti وآخرون (٢٠٠٠) اختباراً لخمسين عزلة فطرية ووجدوا بأن سبع عشرة عزلة تميزت بقابليتها العالية في إذابة الفوسفات وتميزت بالأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* في حين تم عزل بكتريا مذيبة للفوسفات من الترب الاسبانية تابعة للجنس *Pseudomonas* من قبل Peix وآخرون (٢٠٠٣) أبدت قدرة عالية في إذابة الفوسفات وتمثلت بالأنواع *P. aeruginosa* و *P. fluorescens* ، وحصل Babana (٢٠٠٣) على نتائج مشابهة لما وجده الباحثون السابقون حيث أشار إلى أن الأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Pseudomonas* هي الأكثر كفاءة في الإذابة نسبة لبقية العزلات المختبرة .

بين Alam وآخرون (٢٠٠٢) بأن العزلات البكتيرية والفطرية المذيبة للفوسفات والمعزولة من المنطقة المحيطة بجذور نبات الذرة ، أظهرت قدرة عالية في إذابة الفوسفات وتراوح معامل الإذابة بين

١.٦٣ – ٣.٢٩ ورافقه انخفاض في الأس الهيدروجيني من ٧ – ٣.٢ عند تنميتها في بيئات صناعية ، كما أكدوا بأن هذه العزلات تميزت بإنتاج حامض الأوكزاليك والستريك .

بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول ٢٠٠٥ .
تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٥/٧/١٦ وقبوله ٢٠٠٦/٩/٢٥

الدراسات السابقة في العراق محدودة جداً وخاصة في محافظة نينوى حيث لم يدرس سابقاً الأجناس السائدة والكفوءة في إذابة الفوسفات غير الذائبة لذلك كان هدف البحث هو عزل الأجناس البكتيرية والفطرية المذيبة للفوسفات واختبار كفاءتها في إذابة الصخر الفوسفاتي .

مواد البحث وطرائقه

تم عزل الأحياء المجهرية المذيبة للفوسفات في ترب مأخوذة من منطقة الرايزوسفير لمحاصيل الحنطة والشعير والبطاطا والسلق والبصل والطماطة ومن حقول الرشيدية والدندان وكلية الزراعة والغابات وحقول أهلية في مدينة الموصل. حيث تمت المحافظة عليها بوضعها في أكياس بلاستيكية للمحافظة على رطوبتها بعد إزالة الكتل الكبيرة مع الاحتفاظ بالتربة الملتصقة الجذرية .

عزلت البكتريا المذيبة للفوسفات باستخدام Pikovskaya's medium والموضحة من قبل Motsara وآخرون (١٩٩٥) حيث أذيبت المكونات في لتر من الماء المقطر وضبط الـ pH على ٦.٨ وعقمت باستخدام جهاز الأوتوكليف على درجة حرارة ١٢١° م وضغط ١٠٠ كيلوباسكال ولمدة ٢٠ دقيقة. لقحت الأطباق بتخافيف ١٠ $^{-٦}$ من ترب الرايزوسفير المختلفة المذكورة أعلاه وحضنت على درجة حرارة ٣٠° م لمدة ٣-٤ أيام. حيث تميزت البكتريا النامية بتكوين هالة حول المستعمرات دلالة على قدرتها في إذابة الفوسفات. تم اختبار اثنا عشر مستعمرة بكتيرية تميزت في أشكال مورفولوجية مختلفة تم عزلها وتنقيتها على وسط الآكار المائل وحفظت في الثلاجة لحين استخدامها . إضافة لما ذكر استخدمت البكتريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas* fluorescence (العزلة ١٣ و ١٤ ، على التوالي) والمعزولتان من التربة والمصنفة من قبل قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل. تم دراسة بعض الخواص المورفولوجية واستجابتها لصبغة كرام وحركة البكتريا بطريقة القطرة المعلقة والموضحة من قبل Atlas وآخرون (١٩٩٥) .

لغرض عزل الفطريات المذيبة للفوسفات تم استخدام بيئة مارتن (Martin ، ١٩٥٠) مع إجراء بعض التحويرات عليها حيث تم الاستعاضة عن فوسفات البوتاسيوم الأحادية بفوسفات الكالسيوم الثلاثية وبمعدل ٥ غم.لتر$^{-١}$. انتخبت ١٤ عزلة فطرية مختلفة في خواصها المورفولوجية والتي أظهرت قابلية في إذابة الفوسفات ، تم تنقيتها وحفظها على الآكار المائل لحين استخدامها. أجري فحص مجهري للعزلات الفطرية لتحديد الأجناس المعزولة وذلك بالاستعانة بالطريقة الموضحة من قبل Barnett و Hunter (١٩٧٢) .

التجربة الأولى: اختبار كفاءة العزلات البكتيرية في إذابتها للصخر الفوسفاتي في البيئات الغذائية السائلة: تم اختبار كفاءة العزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات في بيئات غذائية سائلة وفي دوارق حجم ٢٥٠ مل ، إذ وضع ١٥٠ مل من الوسط الغذائي السائل (Pikovskaya's Medium) وبإضافة ١ غم من الصخر الفوسفاتي لكل دورق. عقمت الدوارق في جهاز الأوتوكليف ، ومن ثم لقحت بـ ١ مل من مزرعة حديثة النمو وبعمر ٤٨ ساعة من كل عزلة بكتيرية (احتوت كمعدل ٢.٥×١٠ ^{٨} خلية.مل$^{-١}$) قدرت بطريقة التخافيف المتسلسلة (Atlas وآخرون ، ١٩٩٥) وبثلاث مكررات مع مراعاة استخدام دوارق بدون تلقيح (كعينة مقارنة) ، حضنت الدوارق على درجة حرارة ٢٨ - ٣٠° م حيث تم سحب ١٠ مل من المزرعة السائلة بواسطة ماصة معقمة كل أربعة أيام وقدر فيها الفسفور الجاهز والأس الهيدروجيني (pH) ولمدة ٣٢ يوماً .

التجربة الثانية: اختبار كفاءة العزلات الفطرية في إذابتها للصخر الفوسفاتي في البيئة الغذائية السائلة: تم تنمية العزلات الفطرية على بيئات صلبة مائلة وفي دوارق مخروطية ٢٥٠ مل ، وبعد اكتمال النمو أضيف لكل دورق ١٠ مل من الماء المقطر المعقم لغرض تحضير معلق سبوري كثيف من الفطريات. لقحت البيئات السائلة الخاصة بالفطريات (بيئة مارتن المحورة) بـ ١ مل من المعلق السبوري الكثيف من الفطريات المعزولة (احتوت كمعدل ٣.٧×١٠ ^{٥} خلية فطرية.مل$^{-١}$) وبثلاث مكررات مع مراعاة استخدام دوارق بدون تلقيح (كعينة مقارنة). حضنت الدوارق على ٢٨ - ٣٠° م

وسحب ١٠ مل من المزرعة السائلة بواسطة ماصة معقمة وأجري لها طرد مركزي وأخذ الرائق وقدر فيه الفسفور الجاهز والأس الهيدروجيني ولمدة ٣٢ يوماً .

النتائج والمناقشة

من خلال فحص العزلات البكتيرية تبين أنها تقع ضمن الشكل المورفولوجي العصوي الموجب والسالب لصبغة كرام والمتحركة وغير المتحركة فضلاً عن بعض العزلات الكروية الشكل والتي تقع تحت الجنس *Micrococcus* . إذ تقع العزلات البكتيرية المذيبة للفوسفات في أشكال مورفولوجية مختلفة كما أوضحها Yadav و Dadarwal (١٩٩٧). كما أظهرت العزلات الفطرية بأنها تتبع مجموعة الفطريات الناقصة وشملت الأجناس *Cladosporium* (العزلة ١) و *Cephalosporium* (العزلة ٢) و *Alternaria* (العزلات ٣ و ٤) و *Penicillium* (العزلتين ٥ و ١٢) و *Ulocladium* (العزلة ٦) و *Aspergillus* (العزلات ٧ و ١١ و ١٣ و ١٤) و *Stemphylium* (العزلتين ٨ و ٩) و *Curvularia* (العزلة ١٠) والتي تم التعرف عليها من خلال تكون المنطقة الشفافة حول المستعمرات والتي تمثلت بإذابة الصخر الفوسفاتي والتي أكدها كل من Chabot وآخرون (١٩٩٣) و Nahas (١٩٩٦) .

١- كفاءة العزلات البكتيرية في إذابتها للصخر الفوسفاتي في بيئات سائلة: يوضح الجدول (١) أن تلقيح الوسط السائل بالعزلات البكتيرية أدى إلى زيادة في كمية الفسفور الذائب وانخفاض في الأس الهيدروجيني للبيئة نسبة لعينة المقارنة خلال مدة التحضين. كذلك لوحظ أن هنالك اختلافاً في كفاءة العزلات البكتيرية في إذابتها للصخر الفوسفاتي والتغيرات في pH الوسط ، وقد بلغ أعلى معدل لقيم الفسفور الذائب عند التلقيح بالعزلات B_{13} و B_{14} هو ٣٧.٩٣ و ٤٢.٢٤ ملغم p.لتر$^{-1}$ ، على التوالي ، وأقل القيم تمثلت بالعزلتين B_3 و B_{12} وبمعدل ٢١.٦٩ و ١٨.٩٤ ملغم p.لتر$^{-1}$ ، على التوالي عند نهاية مدة التحضين .

إن الانخفاض في pH الوسط قد يعزى إلى إنتاج بعض الأحماض العضوية مثل حامض الستريك والأوكزاليك (Alam وآخرون ، ٢٠٠٢) ، والتي أدت إلى انخفاض في pH الوسط من ٧ - ٣.٢ عند تلقيحه بالبكتريا ، أو قد يكون بسبب تنفس الأحياء الدقيقة وتحريرها غاز ثاني أوكسيد الكربون والذي يكون حامض الكربونيك عند اتحاده مع الماء (Illmer و Schinner ، ١٩٩٢).

إن الاختلاف في قيم الفسفور الجاهز بين العزلات ربما يعود إلى اختلافات وراثية بين العزلات والتي قد تؤثر في قدرة الأحياء الدقيقة وسعتها في إذابتها للفوسفات غير الذائبة والتي أكدت من قبل Igual وآخرون (٢٠٠١) عند استخدامهم تقنيات البايولوجي الجزيئي لاختبار كفاءة الإذابة . أو قد يعود السبب إلى ظروف بيئة النمو أو اختلاف ميكانيكيات الإذابة من قبل الأحياء (ظاهر ، ١٩٨١ و Filho و Vidor، ٢٠٠١). وقد تعزى الزيادة في الفسفور الذائب إلى إنتاج بعض الأحماض العضوية والتي تعمل على إذابة جزء من الصخر الفوسفاتي ، وخاصة حامض اللاكتيك الذي ينتج بكميات كبيرة والذي اثبت فاعليةً في إذابة مركبات الفسفور غير الذائبة والمؤيدة من قبل Didiek وآخرون (٢٠٠٠)

أو إنتاج حامض 2-Ketogluconic والذي يعمل على إذابة الفوسفات والتي أكدها Yong وآخرون (٢٠٠٢) عند دراستهم لبكتريا *Enterobacter intermedium* .

كما لوحظ أن هنالك انخفاضاً نسبياً في الفسفور الذائب في المراحل الأخيرة من التحضين ، وقد يعود السبب في ذلك إلى استخدام البكتريا للفسفور في عملية التمثيل وبناء الخلايا وتكوين الأحماض

النووية ، كما تقوم البكتريا أيضاً باستعمال الفسفور الموجود في جسم الأحياء المثبتة واستخدامه كمصدر للفسفور وذلك بسبب تنميتها في مزارع الوجبات (Prasad و Power ، ١٩٩٧). إن هذه النتيجة كانت متفقة مع ما وجده Seshadri وآخرون (٢٠٠٠) عند دراستهم إذابة الفوسفات غير الذائبة بوساطة البكتريا *Azospirillium halopraefrans* ، وكما قد يعزى السبب في انخفاض كمية الأحماض العضوية في المزرعة السائلة إلى استخدامها من قبل البكتريا بوصفها مصدراً للكاربون والطاقة ، ومن ثم قللت من كمية الفسفور المتحرر بسبب الارتفاع الحاصل في الأس الهيدروجيني للمزرعة السائلة (Molla وآخرون ، ١٩٨٤) .

كما لوحظ أن هنالك ارتفاعاً نسبياً في الأس الهيدروجيني في الوسط السائل في المراحل النهائية للتحضين ، وقد يعزى السبب إلى قدرة العزلات البكتيرية على تحويل الأحماض الناتجة إلى مواد متعادلة أو إلى ثاني أوكسيد الكربون وماء ، والذي يؤدي إلى رفع قيمة pH الوسط والتي أكدت من قبل Molla وآخرون (١٩٨٤) ، والذين لاحظوا أن قيمة pH الوسط الغذائي تنخفض لغاية ١١ يوماً ثم ترتفع قليلاً مرة أخرى .

إن الاختلافات في قيم pH المزرعة السائلة يختلف باختلاف تركيب البيئة ، حيث لوحظ بأن الانخفاض أكبر من في بيئة Pikovskaya المستخدمة في الدراسة مقارنةً في بيئة Sperber والمؤكدة من قبل Nautiyal (١٩٩٩) و Seshadri وآخرون (٢٠٠٠) .

٢- كفاءة العزلات الفطرية في إذابتها للصخر الفوسفاتي في بيئات سائلة: يوضح الجدول (٢) أن التلقيح بالعزلات الفطرية أدى إلى زيادة في الفسفور الذائب وانخفاض في الأس الهيدروجيني ، وقد يعزى السبب في الانخفاض في الأس الهيدروجيني إلى إنتاج الأحماض العضوية واللاعضوية المختلفة من قبل
الفطريات ، والتي تعمل على إذابة الصخر الفوسفاتي ، ومن ثمّ تجهيز الفسفور في تلك الأوساط ، وهذا يتفق مع ما وجده كل من Ali وآخرون (١٩٨٦). وكما أن لبعض الفطريات القدرة على إفراز أحماض الهيدروكسي العضوية الكفوءة في عملية إذابة المركبات الفوسفاتية عن طريق عملية الخلب ، وهذا ما أكده Filho و Vidor (٢٠٠١) .

تميزت العزلات F_3 (*Alternaria sp.*) و F_7 (*Asperguillus sp.*) من بين العزلات الفطرية المختبرة والكفوءة في إذابة الصخر الفوسفاتي وتحرير الفسفور الذائب ، إذ بلغت معدلاتها بمقدار ٥٥.٤٤ و ٨٣.٢٦ ملغم p.لتر$^{-1}$ ، على التوالي في نهاية مدة التحضين ، في حين تمثلت العزلات F_8 و F_9 (*Stemphylium sp.*) بكفاءة أقل في الإذابة ، إذ بلغ معدل الفسفور المتحرر ١٠.٥٠ و ١١.٠١ ملغم p.لتر$^{-1}$ ، على التوالي .

إن الاختلافات في الإذابة من قبل العزلات الفطرية قد يعود إلى الاختلاف في نوع الأحماض العضوية المنتجة ، إذ وجد بأن نوع الحامض المنتج هو الأهم وليس كمية الحامض في عملية الإذابة ، (Banik و Dey ، ١٩٨٢) .

من النتائج المتحصل عليها وجد بأن العزلات الفطرية الكفوءة في إذابة الصخر الفوسفاتي تمثلت بالأجناس *Alternaria* و *Aspergillus* (العزلات F_3 و F_7) ، إن فطر *Aspergillus* أكد قدرته في الإذابة من قبل Sarhan (١٩٩٩) و Khalil و Sultan (٢٠٠٠) و Alam وآخرون (٢٠٠٢) ، إذ وجد
الأول بأن المتطلبات الغذائية ومصدر الكربون والطاقة والمعادن الثقيلة مثل Cu ، Zn ، Co ، Mn تؤثر في الإذابة ، كما وجد بأن هنالك علاقة بين معدل إذابة الصخر الفوسفاتي والإفرازات الخارجية التي تشمل الأحماض العضوية والفوسفاتيز الحامضية والقاعدية ، فقد تميزت هذه الأجناس المذكورة آنفاً بقدرتها العالية نسبياً على امتصاص الفسفور من الوسط الغذائي السائل (الجدول ٣) ، بحيث أعطت قيماً عالية نسبياً في الفسفور الكلي المتحرر وبمعدل ٧٢.٢٧ و ١٠٦.٤٠ ملغم p.لتر$^{-1}$ ، على التوالي ، في حين تميزت البكتريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas* fluorescence (العزلتين B_{13} و B_{14}) عن بقية العزلات البكتيرية في كفاءتها في إذابة الفسفور وامتصاصها له ، إذ بلغت قيمة الفسفور الكلي المتحرر بمعدل ٣٨.٩٣ و ٤٤.٩٣ ملغم p.لتر$^{-1}$ ، على التوالي (الجدول ٣). وتعدّ كمية الفسفور المتحرر من الصخر الفوسفاتي بواسطة البكتريا قليلة لحدٍ ما بسبب الصخر الفوسفاتي المعقد. (Bardiya و Gaur ، ١٩٧٢) .

إن النتائج المتحصل عليها جاءت متفقة مع ما وجده Albalki وآخرون (٢٠٠٢) الذين أكدوا بأن الجنس الفطري *Aspergillus* هو من الأجناس الكفوءة في إذابة الصخر الفوسفاتي ، فضلاً عن الأجناس البكتيرية *Bacillus* و *Pseudomonas* التي كانت أكثر كفاءة من الأجناس البكتيرية الأخرى في إذابة الصخر الفوسفاتي ، وقد كانت كميات الفوسفات الميسرة من الصخر الفوسفاتي والمتحصل عليها في دراستنا متماشية مع ما وجده Khalil (١٩٩٥) .

إن الاختلافات بين العزلات الفطرية في محتواها من الفسفور قد يعود إلى الاختلاف في المتطلبات الفطرية من الفسفور الذائب ، فضلاً عن قدرة الفطريات على إذابة الصخر الفوسفاتي

وامتصاصها للفسفور كانت أكبر من قدرة البكتريا (Albalki وآخرون ، ٢٠٠٢) ، وقد يعود السبب إلى نوع الأحماض المنتجة من قبل الفطريات والتي تؤدي إلى إذابة الصخر الفوسفاتي ، فقد أشار Didiek وآخرون (٢٠٠٠) إلى أن عدداً من الفطريات يمكنها إفراز حامض الستريك والماليك في الوسط السائل والذي يؤثر بدرجة كبيرة في تحويل الأشكال غير الذائبة من الفسفور إلى صور أكثر ذوباناً ، وهذا ما أكده سابقاً Banik و Dey (١٩٨٢) و Gaind و Gaur (١٩٩١) .

كما أن النمو الغزير للفطريات يؤدي إلى امتصاص كمية كبيرة من عنصر الفسفور لبناء الهايفات الجديدة ، ومن ثمّ يزيد من كمية الفسفور الكلي في الفطر ، وهذا ما وجده أيضاً Didiek وآخرون(٢٠٠٠) .

الجدول (٣) : كمية ونسبة الفسفور المتحرر من الصخر الفوسفاتي بوساطة العزلات البكتيرية والفطرية .

رقم العزلة	بكتريا		فطر	
	كمية الفسفور (ملغم p. لتر$^{-1}$)	% للفسفور المتحرر	كمية الفسفور (ملغم p. لتر$^{-1}$)	% للفسفور المتحرر
مقارنة	١٤.٠٠	١٦.٤٧	١٣.٢٠	١٥.٥٣
١	٣١.٨٧	٣٧.٤٩	١٠.٣٠	١٢,١٢
٢	٢٨.٨٧	٣٣.٩٦	١٣.٠٠	١٥.٢٩
٣	٢٩.٠٧	٣٤.٢٠	٧٢.٢٧	*٨٥.٠٢
٤	٢٠.١٣	٢٣.٦٨	١٩.٩٣	٢٣.٤٥
٥	٢٤.٥٣	٢٨.٨٦	٤٨.٧٣	٥٧.٣٣
٦	١٨.٢٧	٢١.٤٩	١٠.٤٧	١٢.٣٢
٧	٣١.٢٠	٣٦.٧١	١٠٦.٤٠	*١٢٥.١٨
٨	٢٧,٦٠	٣٢.٤٧	٤.٦٧	٥.٤٩
٩	٣٤.٠٧	٤٠.٠٨	٣.١٣	٣.٦٨
١٠	٢٨.٤٧	٣٣.٤٩	٦.٩٣	٨.١٥
١١	٣٢.٦٠	٣٨.٣٥	١٦.٢	١٩.٠٦
١٢	١٧.١٣	٢٠.١٥	٢٥.٩٣	٣٠.٥١
١٣	٣٨.٩٣	*٤٥.٨٠	٣٧.٠٧	٤٣.٦١
١٤	٤٤.٩٣	*٥٢.٨٦	١٣.٠٠	١٥.٢٩

(*) العزلات المنتخبة والأكثر كفاءة .

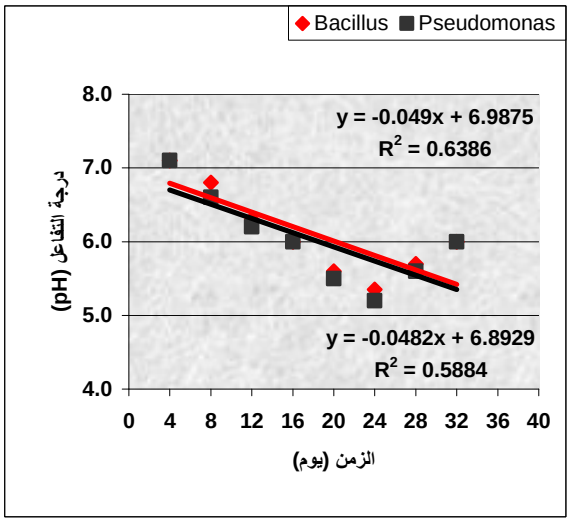
يوضح الشكلان (١ و ٢) انخفاض في pH الوسط السائل مع زمن التحضين ولغاية ٢٤ يوماً ، بعدها حصل ارتفاع نسبي في الـ pH ولم تلاحظ فروقاً واضحة بين الجنسين من البكتريا في تأثيرهما على الـ pH ، حيث كانت قيمة R^2 لكل من البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescence* هي ٠.٦٤ و ٠.٥٩ ، على التوالي (الشكل ١) ، ورافق ذلك زيادة في جاهزية الفسفور في البيئة السائلة ، إذ أبدت البكتريا *P. fluorescence* قدرة أعلى على إذابة الفوسفات بالنسبة لبكتريا *B. subtilis* . كما لوحظ انخفاضاً في قيم الفسفور الجاهز في البيئة بعد ٢٤ يوماً من التحضين حيث بلغت قيمة R^2 لكل من البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescence* ٠.٦٠ و ٠.٥٤ ، على التوالي (الشكل ٢) ، وقد يرجع السبب في ذلك إلى عملية التمثيل الحاصل من قبل البكتريا ، إذ تحتاج البكتريا عنصر الفسفور ، لتصنيع الأحماض النووية والدهون المفسفرة والفايتين ووحدات الطاقة (ATP) وغيرها من المركبات الفسفورية العضوية (Prasad و Power ، ١٩٩٧) ، إن النتائج المتحصل عليها جاءت متفقة مع ما

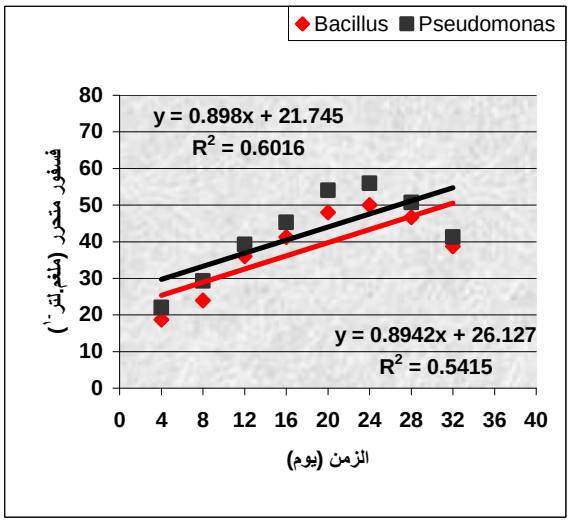
توصل إليه Hegde (٢٠٠٤) والذي أكد على أهمية بكتريا *Pseudomonas striota* و *Bacillus megatherium* في إذابتها للصخر الفوسفاتي وإمكان استخدامهما في تصنيع الأسمدة البايولوجية ، كما أشار إلى أن بكتريا *P. fluorescence* تعدّ من الأنواع البكتيرية الكفوءة في إذابة الصخر الفوسفاتي .

أما بالنسبة للعلاقة بين الـ pH والفسفور المتحرر من الصخر الفوسفاتي فقد أظهرت العزلات البكتيرية علاقة ارتباط قوية ، فقد ازداد الفسفور المتحرر بانخفاض الـ pH (الشكلين ٣ و ٤) ، وبلغت قيمة R^2 بمقدار ٠.٩٨ لنوعي البكتريا وهذه النتائج متفقة إلى حدٍ ما مع ما وجده البلداوي (١٩٨٨) في أن هنالك علاقة ارتباط سالبة بين قيم pH الوسط الغذائي وكمية الفسفور المتحررة من الصخر الفوسفاتي .

يشير الشكلين (٥ و ٦) تأثير التلقيح بالأجناس الفطرية *Aspergillus* و *Alternaria* في الـ pH والفسفور الجاهز في البيئة السائلة المحتوية على الصخر الفوسفاتي، إذ تبين أن العزلة الفطرية *Aspergillus* سببت انخفاضاً كبيراً في pH البيئة السائلة مقارنةً بالعزلة *Alternaria* ، وهذا الانخفاض استمر لغاية ٢٠ يوماً ، بعدها حصل ارتفاع نسبي في كلا العزلتين ، حيث بلغت قيمة R^2 للفطرين *Aspergillus* و *Alternaria* ٠.٣٣ و ٠.٦٠ ، على التوالي (الشكل ٥) ، وهذا بدوره أدى إلى زيادة في جاهزية الفسفور عند التلقيح بالفطر *Aspergillus* مقارنةً بالفطر *Alternaria* ، إذ ازداد محتوى البيئة من الفسفور لغاية ٢٠ يوماً ، بعدها حصل انخفاض في المحتوى الجاهز من الفسفور، حيث بلغت قيمة R^2 للفطرين *Aspergillus* و *Alternaria* ٠.٢٢ و ٠.٤٢ ، على التوالي (الشكل ٦) ، وقد يعود السبب إلى استعمال الفطر للفسفور في عملية التمثيل أثناء نموه وتكوين الهايفات الجديدة التي وضحت سابقاً ، كما أن الارتفاع في pH البيئة السائلة قد يعود إلى تحويل الأحماض إلى مواد متعادلة (Gaur وآخرون ، ١٩٧٣). إن الفرق بين العزلتين الفطرية في إذابتها للفسفور قد يعود إلى نوع الأحماض العضوية المفرزة من قبل هذه العزلات ، فنوع الحامض العضوي المتكون هو الأهم في الإذابة مقارنةً بكمية الحامض التي قد تحد أيضاً من زيادة كفاءة العزلات الفطرية في إذابتها للصخر الفوسفاتي مقارنةً بالعزلات البكتيرية .

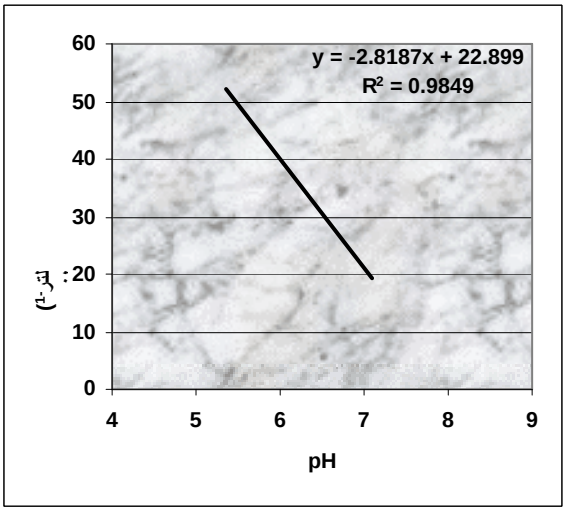
يشير الشكلين (٧ و ٨) إلى العلاقة بين الـ pH والفسفور المتحرر من الصخر الفوسفاتي إذ بلغت قيمة R^2 ٠.٤٥ و ٠.٦٥ للعزلات *Aspergillus* و *Alternaria* ، على التوالي ، وهذه النتائج متفقة إلى حدٍ ما مع ما وجده البلداوي (١٩٨٨) في أن هنالك علاقة ارتباط سالبة بين قيم pH الوسط الغذائي وكمية الفسفور المتحررة من الصخر الفوسفاتي .

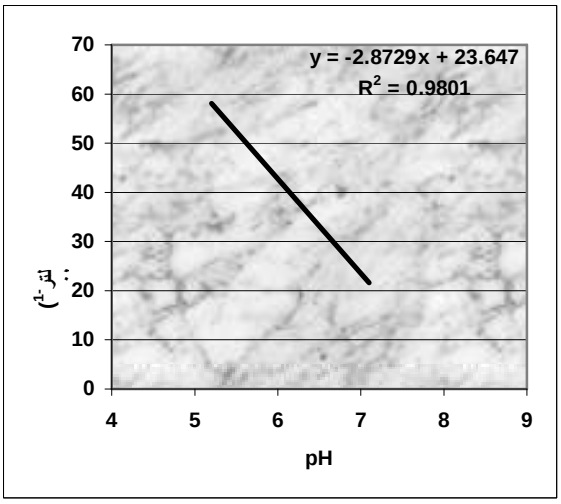


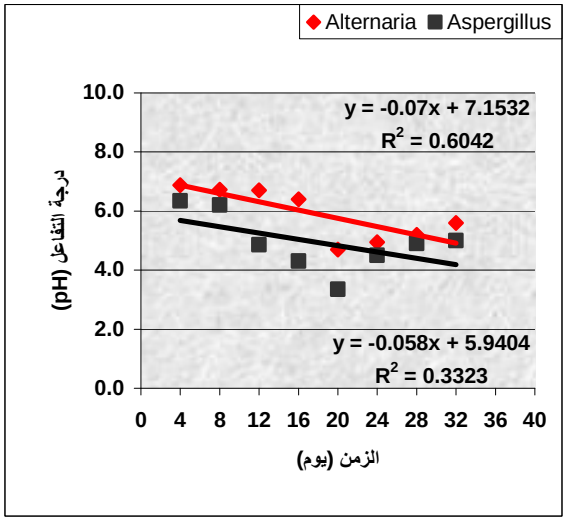


الشكل (١): تأثير التلقيح بالبكتريا المذيبة للفوسفات في pH البيئة الغذائية السائلة المحتوية على الصخر الفوسفاتي .

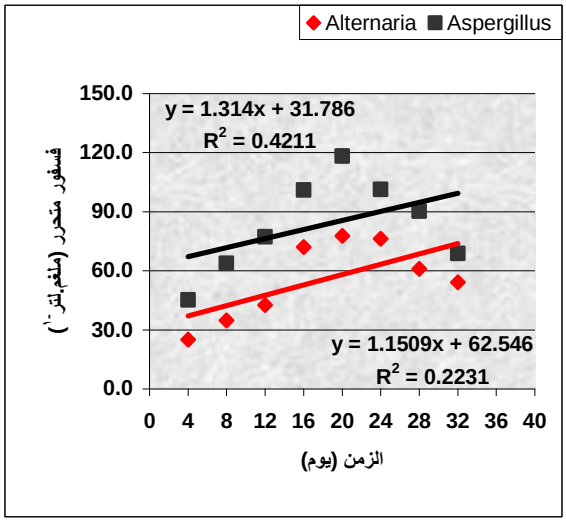
الشكل (٢): تأثير التلقيح بالبكتريا المذيبة للفوسفات في جاهزية الفسفور في البيئة الغذائية السائل المحتوية على الصخر الفوسفاتي .







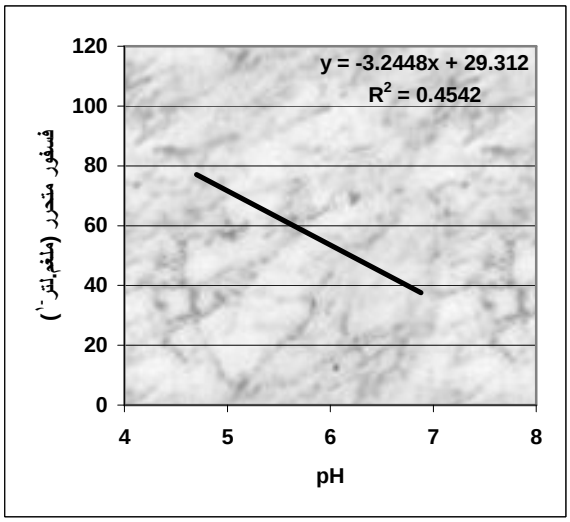
الشكل (٥): تأثير التلقيح بالفطريات المذيبة للفوسفات في pH البيئة الغذائية السائلة المحتوية على الصخر الفوسفاتي .



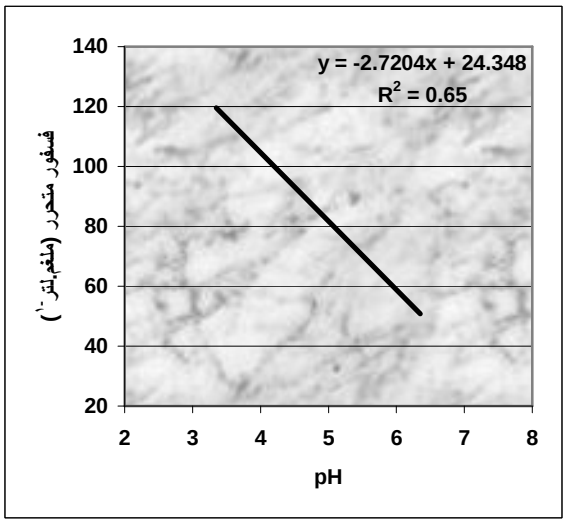
الشكل (٦): تأثير التلقيح بالفطريات المذيبة للفوسفات في جاهزية الفسفور في البيئة الغذائية السائلة المحتوية على الصخر الفوسفاتي .

الشكل (٣): علاقة الارتباط بين pH و P المتحرر من الصخر الفوسفاتي والملقح بالبكتريا Bacillus subtilis في بيئات سائلة .

الشكل (٤): علاقة الارتباط بين pH و P المتحرر من الصخر الفوسفاتي والملقح بالبكتريا Pseudomonas fluorescence في بيئات سائلة.



شكل (٧) : علاقة الارتباط بين pH وP المتحرر من الصخر الفوسفاتي والملقح بالفطر Aspergillus sp. في بيئات سائلة .



شكل (٨) : علاقة الارتباط بين pH وP المتحرر من الصخر الفوسفاتي والملقح بالفطر Alternaria sp. في بيئات سائلة .

ISOLATION OF PHOSPHOROUS SOLUBILIZING BACTERIA AND FUNGI FROM RHIZOSPHERE AND ITS EFFICIENCY ON ROCK PHOSPHATE SOLUBILIZATION

Rand A. Al-Tae'e Mazin F. Said
Soil and Water Sci. Dept., College of Agric. and Forestry , Mosul Univ., Iraq

ABSTRACT

Laboratory experiment was conducted to isolate and select the most efficient bacterial and fungal isolates in rock phosphate solubilization in culture medium. Results showed that bacterial isolates exhibited a different efficiencies in their ability to solubilize rock phosphate. *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescence* were the greatest efficient among other bacterial isolates tested (14 isolates) in their acids production and decreasing medium pH value which droped to 5.35 and 5.2 and increasing in available phosphorous to 50 and 56 mg P. L^{-1} after 24 days incubation respectively. The correlation coefficient (R_2)

between incubation time and pH value were 0.65 and 0.59 while the correlation between pH value and available phosphorous were high reached 0.98 in both bacterias. Results also showed that fungal isolates which related to the genera *Alternaria* and *Aspergillus* were the greatest efficient among other fungal isolates tested (14 isolates) in their acid production and decreasing pH value , which droped to 4.7 and 3.35 with increasing in available phosphorous to 77.7 and 118.3 mg P. L^{-1} after 24 days incubation respectively. The correlation coefficient between incubation time and pH value were 0.33 and 0.6 while the correlation between pH value and available phosphorous were 0.65 and 0.45 respectively .

المصادر

البلداوي ، سلمان برهان عبدالحسين (١٩٨٨) . تأثير الفطريات المذيبة للفوسفات على جاهزية الفسفور لنباتي الدخن والشعير . رسالة ماجستير ، جامعة بغداد .

ظاهر ، عبدالزهرة طه (١٩٨١) . دراسة الأحياء المجهرية المذيبة للفوسفات في منطقة جذور بعض المحاصيل . رسالة ماجستير ، جامعة بغداد .

Alam, S.; S. Khalil; N. Ayub and M. Rashid (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. Department of Biological Sciences, Quaid-I-Azam University, Islamabad-Pakistan. October. 4: 454-458.

Albalki, M. A.; M. S.Alshter and M. M. Alzobi (2002). Isolation of some phosphate solubilizing microorganisms from various syrian soils and studying their effectiveness in solubilization of the phosphate rock. 2nd. Congress of recent Technologies in Agriculture, Giza 28-30 Oct. 1, 134-143.

Alexander, M. (1977). Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons. Inc. New York and London.

Ali, A.; M. A. Z. Molla; A. A. Chowdhury and A. Islam (1986). Microbial solubilization of different insoluble phosphates. J. of Bangladesh Acad. of Sci., 10: 45-50.

Atlas, R. M.; L. C. Parks and A. E. Brown (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby-Year Book, Inc., Missouri.

Babana, A. H. (2003). Mise au Point d'un inoculant biologique pour le ble' irrigue du Mail. Facult. Des. Sciences del Agriculture Et. De L'Alimentation.

Banik, S. and B. K. Dey (1982). Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. Plant and Soil, 69: 353-364.

Bardiya, M. C., and A. C. Gaur (1972). Rock phosphate dissolution by bacteria. Indian J. of Microbiology. 12: 269-271.

Barnett, H. L. and B. B. Hunter (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi Burgess Publishing Company Minneapolis, Minnesote. 3rd. edt.

Bopaiah, B. M. (1985). Occurrence of phosphate solubilizing microorganisms in the root region of arecanut palms. J. Plantation Crops. 13: 60-62.

Chabot, R.; H. Antoun and M. P. Cescas (1993). Stimulation of growth of maize and lettuce by inorganic phosphorus solubilizing microorganisms. Canadian J. Microbiol. 39: 941-947.

Didiek, H. G.; Siswanto and Y. Sugiarto (2000). Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus solubilizing fungus. Soil Sci. Soc. of Amer. J. 64: 927-932.

Filho, G. N. S. and C. Vidor (2001). Phosphate solubilizing activity of microorganisms in the presence of nitrogen, iron, calcium and potassium. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 36, 1-21.

Gainds S., and A. C., Gaur (1991). The rmotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interactions in mungbean. Plant and Soil, 133: 141-149.

Gaur, A. C. Maden, M. and K. P. Ostwal (1973). Solubilization of phosphatic compounds by native microflora of rock phosphates. Ind. J. of Exp. Bio., 11: 427-429.

Hegde, S. V. (2004). Microbial Biotechnology in Agriculture. High-Tech. Agri. Services.

Igual, M.; A. Valverde; E. Cervantes and E. Velazquez (2001). Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated moleclular techniques in their study. INRA, EDP Sciences, 21: 561-568.

Illmer, P. and F. Schinner (1992). Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biol. Biochem., 24:389-395.

Khalil, S. and T. Sultan (2000). Phosphorus solubilizing microorganisms potential improve pavail ability from unavailable sources, 8th. Int., Soil Sci. Conf. November, 2000. Islamabad.

Martin, J. P. (1950). Use of acid rose bengal and streptomycin for estimating soil fungi. Soil Sci. 69: 215-232.

Molla, M. A. Z.; Z. Chowdhury; A. Islam, and S. S. Hoque (1984). Microbial mineralization of organic phosphate in soil. Plant and Soil, 78: 393-399.

Motsara, M. R.; P. Bhattacharyya and B. Srivastava (1995). Biofertiliser, Technology, Marketing and Usage. Fertiliser development and Consultation Organisation, New Delhi, India.

Nahas, E. (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by micro-organisms isolated from soil. World J. Microbiol. Biotech., 12: 567-572.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol Letters, 170:265-270.

Peix, A.; R. Rivas; P. F. Mateos; E. M. Molina; C. R. Barrueco; E. Velazquez (2003). *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. Nov., a novel species that activity solubilizes phosphate in vitro. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 53: 2067-2072.

Prasad, R. and J. F. Power (1997). Soil Fertility Management for Sustainable Agriculture. Lewis Publishers, Boca Raton, New York.

Sarhan, M. M. (1999). Influence of nutritional requirements and heavy metals on the solubilization of rock phosphate by *Aspergillus niger*. J. Union Aab Biol., Cairo, Microbiology and Viruses, 8:39-52.

Seshadri S.; R. Muthukumara Samy; C. Laks Hminarasimhan; and S. Ignacimuthu (2000). Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. Current Science, 79: 565-568 .

Widiastuti, H.; D. H. Goenadi; T. Panji; L. P. Santi; P. Faturachim; N. Mardiana; and I. Harianto (2000). Bioactivation of phosphate rocks by indigenous phosphate-solubilizing fungi. Menara Perkebunan, 68: 39-52.

Yadav, K. S. and K. R. Dadarwal (1997). Phosphate Solubilization and Mobilization Through Soil Microorganisms. In: Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Corp Production. Dadarwal, K. R. (ed.), Scientific Publishers, Jodhpur, India.

Yin, R. L. (1988). Phosphate dissolving microorganisms in upland soils in china. Soils Turang, 20: 243-246.

Yong, K. K.; H. Hoom; P. R. Dong; S. K. Young;K. Y. Woong; P. B. Ki and K. H. Bhupathi (2002). 2-Ketogluconic Acid Production and Phosphate Solubilization by *Enterobacter intermedium*. 17th WCSS, August 2002, Thailand, Symposium No. 6.