Isolation and screening of Indole - acetic acid producing *Azotobacter*

عزل وغربلة بكتريا *Azotobacter* المنتجة لإندول–حامض الخليك

أ.م.د. علي عبد الكاظم جاسم / جامعة كربلاء – كلية العلوم- قسم علوم الحياة
أ. د. عبد عون هاشم علوان / جامعة كربلاء – كلية العلوم- قسم علوم الحياة
* ضرغام حسن شاطي / جامعة كربلاء – كلية العلوم- قسم علوم الحياة
المراسلات الى : أ.م.د. علي عبد الكاظم جاسم

❖ البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الثالث

الخلاصة

امكن الحصول 16عزلة بكتيرية عائدة لجنس الـ*Azotobacter* من مناطق زراعية مختلفة مزروعة بمحصول الجت من محافظتي كربلاء وبابل بعد أن تم إجراء أختبار الكاتليز و الاوكسديز والاندول والحركة واختبار تخمر السكريات واختبار قابلية نموها 1% كلوريد الصوديوم والكلسيرول و0.1% فينول وتصبيغها بصبغة غرام . وخضعت العزلات الست عشرة المستحصل عليها لعملية غربلة لتحديد الأكفأ منها في إنتاج إندول– حامض الخليك (IAA) تحت ظروف حضن مختلفة وأوضحت النتائج أن العزلة *Azotobacter* sp. *8a* هي الاكفأ في إنتاج IAAوتم إستخدام العزلة المذكورة في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها .

Abstract

Sixteen bacterial isolates belonged to the genus *Azotobacter* were obtained from different agricultural areas cultivated by alfalfa in sacred Karbala and Babylon governorates and each the isolates were identify by gram stain , Catalase test , Oxidase test , Indole test , Motility test, Sugar fermentation test and growth ability in 1% NaCl , glycerol and 0.1% phenol . All the isolates were subjected to a screening program to test their abilities for indole- acetic acid (IAA) production using different incubation conditions . Results showed that, *Azotobacter* sp.*8a* was the highest producer isolate and chosen to be used for further studies .

المقدمة (Introduction) :

إستقطب إندول - حامض الخليك(Indole Acetic Acid , IAA) إهتمام الباحثين في العقود الأخيرة نظراً للدور المهم الذي يلعبه في السيطرة على العديد من العمليات الفسيولوجية في النبات عبر دورة حياة الخلية النباتية بدءاً من إنقسام الخلية (Cell division) وحتى الشيخوخة (Senescence) مروراً بأستطالة الخلايا وتمايزها

ونشوء الجذور والسيادة القمية والاستجابات الانتحائية والتزهير ونضج الثمار (1) , فضلاً عن تطبيقات هذا الإندول في المجال الطبي والتي من أبرزها إستخدامه في معالجة السرطان بعد توليفه مع أنزيم البيروكسيديز المستخلص من الرشاد(Horseradish Peroxidase) (2).

يصنف إندول–حامض الخليك ضمن الاوكسينات(Auxins) التي تعد هرمونات نمو نباتية وتظهر فعاليات فسيولوجية نباتية متنوعة (3) .

يوجد مصدران لإنتاج هذا الأوكسين أحدهما داخلي (Endogenous) بوساطة الأنسجة النباتية والأخر خارجي (Exogenous) بوساطة الأحياء المجهرية المتمثلة ببكتريا وفطريات التربة (1) .

ينتمي جنس *Azotobacter* الى مجموعة البكتريا المحفزة لنمو النبات وقد حظي هذا الجنس بنصيب وافر من الاهتمام لما يمتلكه من أهمية كبيرة في المجال الزراعي من خلال تحسين خصوبة التربة وزيادة إنتاجية المحاصيل عن طريق تثبيت النيتروجين الجوي , وإنتاجهللأوكسينات التي يقع إندول–حامض الخليك في مقدمتها وكذلك السايتوكاينينات المحفزة لنمو الجذور وزيادة كفاءتها لامتصاص المواد الغذائية , وإنتاج العديد من المواد الأخرى مثل الأمونيا و الفيتامينات و المواد المساعدة على إنبات البذور , فضلاً عن دوره في تثبيط الممرضات النباتية (5,4) .

ونظراً لما يمتلكه إندول - حامض الخليك من أهمية تطبيقية كبيرة فقد جاءت هذه الدراسة لتهدف الى :

1. عزل بكتريا *Azotobacter*المنتجة لإندول - حامض الخليك .
2. غربلة العزلات البكتيرية لتحديد الأكفأ منها لأنتاج الحامض .

المواد وطرائق العمل:

عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter*

تم جمع 22 عينة تربة من مناطق زراعية مختلفة مزروعة بمحصول الجت ضمن محافظتي كربلاء و بابل على عمق 4 سم لعزل بكتريا *Azotobacter* حسب الطريقة الموصوفة من قبل (4) ثم جلبت العينات الى المختبر بأكياس بلاستيكية معقمة محكمة الغلق.كما استخدمت طريقة التخافيف المتسلسلة في عزل البكتريا بأستخدام الوسط الزرعي Sucrose Mineral Salt (SMS) الصلب والسائل , والحضن بدرجة حرارة37 مئوية لمدة 96 ساعة في ظروف هوائية .

كما شخصت عزلات بكتريا *Azotobacter* على وفق ماجاء في (6) حيث تم الأعتماد على الصفات المظهرية التي شملت تصبيغ البكتريا واختبار الحركة فضلاً عن الفحوصات الكيموحيوية التي شملت إختبار الكاتليز وإختبار الأوكسديز و إختبار الأندول وإختبار تخمير السكريات وإختبار قابلية البكتريا على النمو 1% كلوريد الصوديوم و الكليسيرول و0.1% فينول .

غربلة عزلات بكتريا *Azotobacter* لإنتاج إندول - حامض الخليك

استخدمت 16 عزلة من بكتريا *Azotobacter* لتحديد أكفأها في إنتاج هذا الأوكسين ونشطت العزلات في انابيب حاوية على 5 مل من وسط SMS السائل بدرجة حرارة 37مئوية لمدة 18 ساعة للحصول على اللقاح .

– **تحضير وسط الأنتاج**

استخدم وسط L.B. السائل الموصوف من قبل (7) كوسط انتاجي لغربلة عزلات بكتريا *Azotobacter* إذ تم توزيعه في دوارق مخروطية سعة 250 مل وبواقع 50 مل لكل دورق وتم تعقيمها بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة , وبعد ان بردت الدوارق الى درجة حرارة الغرفة أصبحت جاهزة لعملية التلقيح .

– **تلقيح وسط الإنتاج**

تم تلقيح وسط الإنتاج بحجم لقاح مقداره 4% من حجم الوسط لكل العزلات الست عشرة التي شملتها الغربلة وتمت التنمية بدرجة حرارة 37° مئوية لمدة 96 ساعة وبأستخدام ظروف نمو مختلفة اشتملت على الحاضنة الساكنة (Static) والحاضنة الهزازة (Shaker incubator) بسرعة رج100 دورة/دقيقة وبعد انتهاء مدة الحضن فصلت الخلايا عن وسط التخمر بأستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة5000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق حيث اهملت الخلايا في حين استخدم الراشح لتقدير كمية إندول – حامض الخليك.

– **تقدير أندول –حامض الخليك**

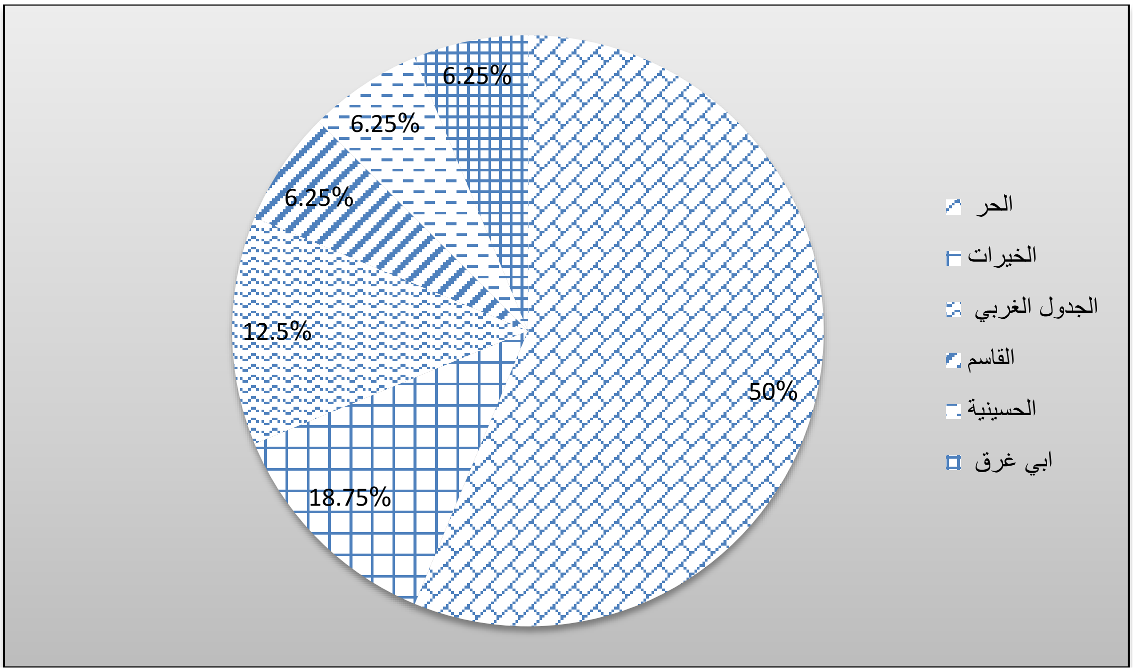
قدرت كمية إندول–حامض الخليك خلال جميع مراحل الدراسة بأتباع الطريقة الموصوفة من قبل(8) واعتماداً على المنحنى القياسي لإندول–حامض الخليك .

النتائج والمناقشة:

عزل وتشخيص بكتريا*Azotobacter*

عزل بكتريا *Azotobacter*

أسفرت نتائج عزل بكتريا *Azotobacter* عن الحصول على 16 عزلة عائدة لهذا الجنس والتي تملك صفات مظهرية مطابقة لصفات البكتريا المراد عزلها عند استخدام وسط SMS بكونه وسطاً ملائماً لنمو هذه البكتريا , وقد تباين عدد العزلات المتحصل عليها باختلاف مكان العزل إذ بلغ 8 و3 و 2 و1 و 1 و 1 بنسب (50 و18.75 و 12.5 و6.25 و 6.25 و 6.25)% , على التوالي لكل من مناطق الحر والخيرات والجدول الغربي و القاسم والحسينية و أبي غرق , على التوالي وكما موضح في الشكل (1) .



الشكل (1) : النسب المئوية لبكتريا *Azotobacter* موزعة حسب أماكن عزلها .

أشارت العديد من الدراسات الى عزل بكتريا *Azotobacter* من مصادر متعددة واستخدامها في مجالات مختلفة , فقد تم عزل ثلاث عزلات عائدة لهذا الجنس من التربة واستخدمت في إنتاج الألجينات (9) , وأستخدم (4) ترب مختلفة لعزل هذه البكتريا اشتملت على حقول نباتات بقولية وأخرى غير بقولية وحقول رز وترب حشائش وأراضي غابات وأراضي متروكة فضلاً عن رواسب مياه نهر وأظهرت النتائج ان أعلى أعداد من البكتريا تم عزلها من حقول البقوليات في حين لم يتم الحصول على أي عزلة من رواسب مياه النهر , بينما حصل (10) على 10 عزلات منها من التربة ودرس قابلية هذه البكتريا في تحويل الحامض الاميني التربتوفان الى إندول– حامض الخليك .

إن الطريقة المثلى لعزل السلالات تبدأ باستعمال المصادر الطبيعية (التربة غالباً) والتي قد تكون غنية بالإحياء المجهرية المرغوبة وعادة تصمم عملية العزل بحيث تشجع نمو الانواع التي تحمل الصفة المرغوبة (11) .

تشخيص بكتريا *Azotobacter*

عند إجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات بكتريا *Azotobacter* المتحصل عليها في هذه الدراسة إتضح أن جميع العزلات كانت موجبة لاختباري الكاتاليز و الاوكسيديز (12) وسالبة لصبغة غرام ومتحركة كما أن لها القابلية على النمو في 1 % من كل من NaCl وGlycerol وتتفق هذه النتائج مع ما حصل عليه (13) بينما لم تتمكن من النمو في 0.1 % فينول إذ أن التراكيز العالية من الفينول تصبح مادة سامة لبعض أنواع جنس *Azotobacter* (14) , ولها القابلية على إنتاج الاندول كما هو مبين في الجدول (1) .

الجدول (1): الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *Azotobacter*

ت	الاختبار	النتيجة
-1	صبغة غرام	-
-2	المظهر	مفردة او ازواج او بشكل سلاسل قصيرة
-3	ظروف النمو	هوائية ولها القابلية على النمو بهواء قليل
-4	إختبار الكاتليز	+
-5	إختبار الاوكسديز	+
-6	إختبار الحركة	+
-7	القابلية على النمو في 1% **NaCl** و **Glycerol**	+
-8	القابلية على النمو في 0.1% فينول	±
-9	إختبار الاندول	+
-10	الوسط الأنتقائي	وسط MSS الصلب والسائل

(+):نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

وتم إختبار قابلية بكتريا *Azotobacter* على تخمير بعض أنواع السكريات (الكلوكوز و الفركتوز و الرافينوز و السكروز واللاكتوز و النشأ و المليزايتوز و الزايلوز و السوربيتول و الارابينوز) . وقد أظهرت النتائج في الجدول (2) أن لعزلات بكتريا *Azotobacter* قابلية مختلفة على تخمير السكريات , إذ كانت لجميعها القابلية على تخمير سكريات الكلوكوز و الفركتوز و السكروز بينما بلغت نسبة العزلات المخمرة للرافينوز واللاكتوز و المليزايتوز و النشأ و الزايلوز و السوربيتول والارابينوز (81.25 و 75 و 62.5 و 43.75 و 37.5 و 25 و12.5) % , على التوالي. وذكر (10) في دراسة قام بها عن بكتريا *Azotobacter* أن (80 و 50 و30) % من العزلات كانت مخمرة للنشأ واللاكتوز و السكروز , على التوالي . بينما وجد (15)أن جميع عزلات بكتريا *Azotobacter* كانت مخمرة لسكر الكلوكوز في حين إن العزلة *Azotobacter L delta* كانت مخمرة لسكري الزايلوز و الارابينوز مقارنة مع العزلات الباقية .

الجدول (2): إختبار قابلية بكتريا*Azotobacter* على تخمير السكريات

ت	السكـــــــر	عدد العزلات		النسبة المئوية للعزلات الموجبة (%)
		الموجبة للتخمير	السالبة للتخمير	
.1	الكلوكوز	16	0	100
.2	الفركتوز	16	0	100
.3	السكروز	16	0	100
.4	الرافينوز	13	3	81.25
.5	اللاكتوز	12	4	75
.6	المليزايتوز	10	6	62.5
.7	النشأ	7	9	43.75
.8	الزايلوز	6	10	37.5
.9	السوربيتول	4	12	25
.10 1	الارابينوز	2	14	12.5

غربلة عزلات بكتريا *Azotobacter*لإنتاج إندول–حامض الخليك

أعطيت عزلات بكتريا *Azotobacter* الست عشرة المستحصل عليها الرموز (1 و 2 و3 و4 و 5a و 5b و 6 و7 و8a و8b و 9a و9b و 10a و 10b و 11و 12) وتم إختبار قابليتها جميعاً في إنتاج إندول– حامض الخليك من خلال قياس كمية هذا الاوكسين المنتج باستخدام كاشف السالكاوسكي (الطريقة اللونية) , إذ يعد هذا الكاشف من الكواشف الشائعة الاستخدام للكشف عن الاوكسينات (16) . وتم تنمية هذه العزلات على الوسط الانتاجي السائل(L.B.Broth) المدعم بالتربتوفان كمادة محفزة لإنتاج هذا الأوكسين تحت ظروف مختلفة شملت ظروفاً هوائية ساكنة وأخرى هزازة بسرعة رج 100 دورة / دقيقة. ويبين الجدول (3) قابلية جميع العزلات قيد الدراسة على انتاج أندول –حامض الخليك ولكن بدرجات متفاوتة , وبمقارنة قيم الانتاج في الجدول نفسه يلاحظ أن أعلى إنتاج من الـ IAA تحقق من العزلة*Azotobacter sp.8a* إذ بلغ (58.2) مايكروغرام / مل وذلك بتنميتها تحت ظروف

ساكنة .ويبين الجدول ايضاً انخفاض عام في انتاج الأوكسين تحت ظروف إهتزاز وهذا ما يفسر حاجة البكتريا الى كمية قليلة من الهواء (17).

إن الأحتياج للأوكسجين خلال عمليات التخمر يعتمد على النوع الميكروبي وتركيز الخلايا ونوع المادة الاساس (18), ويعزى سبب تباين العزلات في الإنتاج الى إختلاف قابليتها في التعبير الجيني الذي يتضمن مسار تخليق الأوكسين وعدم امكانية تحفيز الانتاج باستخدام بعض العوامل (19) واعتماداً على هذه النتائج فقد أختيرت العزلة المذكورة اعلاه للدراسات اللاحقة وتم انتاج الأوكسين منها تحت ظروف ساكنة . تعد عملية الغربلة مهمة جداً نظراً لكونها تسمح بفرز إضافي لتلك الأحياء المجهرية التي لها قيمة حقيقية في العمليات الصناعية ونبذ تلك التي تنقصها هذه الأمكانية (20).

الجدول (3):غربلة عزلات بكتريا ***Azotobacter*** لإنتاج أندول –حامض الخليك تحت ظروف هوائية مختلفة.

ت	العـــزلـة	ظروف هوائية هزازة تركيز أندول –حامض الخليك(µg/ml)			ظروف هوائية ساكنة تركيز أندول– حامض الخليك(µg/ml)		
		4 Day	5 Day	6 Day	4 Day	5 Day	6 Day
.1	*Azotobacter* sp.*(1)*	10.2	10.9	11.6	22.46	23	26.06
.2	*Azotobacter* sp.*(2)*	15.5	11.4	10.6	34.26	33.66	31.26
.3	*Azotobacter* sp.*(3)*	6.06	4.8	4.6	31.6	31.2	28.26
.4	*Azotobacter* sp.*(4)*	10.6	9.4	9.3	34.2	31.86	27.2
.5	*Azotobacter* sp.(5_a)	3.8	3.06	2.7	47.13	44.06	35.26
.6	*Azotobacter* sp.(5_b)	5.26	4.53	4.3	13.33	11.6	10.93
.7	*Azotobacter* sp.*(6)*	2.7	2.3	1.8	23	19.2	18.06
.8	*Azotobacter* sp.*(7)*	10.06	10.4	17.7	41.8	43	43.86
.9	*Azotobacter* sp.(8_a)	9.6	8.4	8.0	58.2	56.6	53.06
.10	*Azotobacter* sp.(8_b)	7.2	7.6	7.2	22.9	24.06	28.33
.11	*Azotobacter* sp.(9_a)	4.1	4.3	4.1	19.26	21.8	33.9
.12	*Azotobacter* sp.(9_b)	4.4	4.0	3.8	26.6	16.86	15.13
.13	*Azotobacter* sp.(10_a)	2.9	3.1	3.3	32.8	39	45.8
.14	*Azotobacter* sp.(10_b)	10.1	7.9	7.2	39.2	36.8	36.46
.15	*Azotobacter* sp.*(11)*	4.4	4.0	3.8	51.13	45.26	43
.16	*Azotobacter* sp.*(12)*	14.2	14.7	15.9	26.6	29.86	31

المصادر :

1. **Baca, B. E.** and Elmerich, C. (2003). Microbial production of plants hormones. In Associative Nitrogen-fixation Bacteria and *Cyanobacteria.Series*: Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress,Vol. 2003. pp 1-31.C. Elmerich, and W. Newton (Eds). Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

2.**Huang, C**.; Liu, L.Y. ; Song, T. S. ; Ni, L. ; Yang, L.; Hu, X. Y.; Hu, J. S. ; Song, L. P. ; Luo, Y. and Si, L. S. (2005). Apoptosis of pancreatic cancer BXPC-3 cells induced by indole-3-acetic acid in combination with horseradish peroxidase. World J, Gastroenterol.,11(29):4519-4523.

3. **أبو زيد** , الشحات نصر . (1990) . الهرمونات النباتية و التطبيقات الزراعية. مؤسسة عز الدين للطباعة و النشر- القاهرة .

4. **Islam, M. Z.** ; Sharif, D. I. And Hossain, M. A. (2008). AComparativestudy of *Azotobacter spp*. From different soil samples. J.Soil.Nature. 2 (3):16-19.

5. **Mali, G.V.** and Bodhankar, M.G. (2009). Antifungal and Phytohormone Production Potential of *Azotobacter chroococcum* Isolates From Groundnut (*Arachis hypogea* L.) Rhizosphere. Asian J. Exp. Sci.,23 (1) : 293-297.

6.**Krieg , N. R.** and Holt, J.G. (1984) . Bergey's Manual of Systematic Bacteriology . Volume 1. Williams and Wilkins. Baltimore / London .

7.**Ahemad, M.** and Khan , M. S. (2012). Effects of pesticides on plant growth promoting traits of *Mesorhizobium* strain MRC4 . Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.11(1): 63 – 71 .

8. **Khamna,S.;** Yokota, A.; Peberdy, J. F. and Lumyong, S.(2010).Indole-3- acetic acid production by *Streptomyces sp.* isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. EurAsia. J.BioSci.,4: 23-32.

9.**Khanafari, A.** and Sepahei, A. A. (2007). Alginate biopolymer production by *Azotobacter chroococcum* from wheydegradation.Int. J. Environ. Sci. Tech., 4 (4): 427-432.

10.**Ahmad, F.**; Ahmad , I. and Khan, M. S. (2005) . Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. Turk. J. Biol., 29 : 29-34.

11. **العاني** , فائز عزيز.(1987) . التكنولوجيا الحيوية , دار الكتب للطباعة والنشر , جامعة الموصل .

12. **Idowu, A.B.** ; Edema, M.O. and Adeyi, A.O. (2006). Distribution of bacteria and fungi in theearthworm *Libyodrillus violaceous* (Annelida: Oligochaeta), a native earthworm fromNigeria.Rev. Biol. Trop., 54 (1): 49-58.

13. **Sachin, N. D.** (2009). Effect of *Azotobacterchroococcum* (PGPR) on the Growth of Bamboo (*Bambusabamboo*) and Maize (*Zea mays*) Plants.Biofrontiers , 1(1): 24-31.

14. **Revillas, J. J.** ; Rodelas, B. ; Pozo, C. ; Martinez-Toledo, M. V. and LopezJ. G.(2005). Production of amino acids by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum* with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. Amino Acids, 28: 421–425.

15. **Naik, N.** ; Kumar, H.V. and Harini, S.T.(2010). Synthesis and antioxidant evaluation of novel indole-3-acetic acid analogues . European Journal of Chemistry 2 (3): 337-341.

16.***de*-Bashan, L. E.**; Antoun, H. and Bashan, Y. (2008). Involvement of Indole-3-Acetic acid production by the growth-promoting bacterium *Azospirillumspp*. Promoting growth of *Chlorella vulgaris* . J. Phycol., 44: 938–947.

17.**Prompaphagorn, A.** (2008).Alginate production by *Azotobacter spp.*and Its application in enzyme Immobilization.Ms.C. Thesis.Science in Biotechnology.Suranaree University of Technology.

18. **Chisti , Y.** (1999) . Encyclopedia of food microbiology , Robinson , R. ; Batt , C. and Patel, P. , editors , Academic press , London, 1999. pp. 663-674.Fermentation (industrial): basic considerations .

19. **Leelahawonge, C**. ; Pongsilp, N. and Nuntagij, A. (2009) . Factors Influencing Indole-3- Acetic Acid Biosynthesis of Root-Nodule Bacteria Isolated from Various Leguminous Plants. Thammasat Int. J. Sc.Tech., 14(2):1-12.

20.**ساجدي** , عادل جورج وعلي , علاء يحيى محمد .(1987) . أساسيات التخمرات الصناعية الجزء الأول . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة البصرة . مطبعة جامعة البصرة .