دراسة نشاط انزيم اليوريز وبعض العوامل المؤثرة لتحلل اليوريا في بعض الترب الزراعية في الرمادي

م. جمال صالح حمود
كلية الزراعة / جامعة الانبار

تاريخ الاستلام: 2012/1/29

الخلاصة

نفذ البحث لدراسة تواجد وانتشار وعزل وتشخيص البكتريا المحللة لمركب اليوريا والمنتجة لليوريز من 30 عينة تربة جمعت من 6 مواقع في الحقول الزراعية التي تقع بين مدينتي الرمادي وهيت على جانبي نهر الفرات (الجزيرة وزنكورة) ، اذ شملت 3 موقع منها في منطقة الجزيرة مستغلة بزراعة القمح والخضر وبور و3 اخرى من منطقة زنكورة مستغلة بزراعة القمح والخضر وبور، خلال المدة بين اذار وحزيران 2010. حللت عينات التربة وحددت 20 عينة منها موجبة لفحص البكتريا المحللة لليوريا ودرس نشاط انزيم اليوريز ثم انتخب 5 عزلات بكتيرية الأكفأ في تحلل اليوريا. درس تأثير بعض العوامل على نشاطها في تحلل اليوريا شملت درجات الحرارة وتركيز اليوريا ونسب الجبس ($CaSO_4$). أوضحت النتائج ان منطقة الدراسة ذات مساحة 8000 هكتار تقريباً، كان اغلب تربها ذات نسجة غرينية رملية كلسية (18– 23% $CaCO_3$) ومتباينة المحتوى الجبسي بين (2.53– 14.12%$_4$ CaSO) ومحتوى عضوي (0.23 –0.92%)، كما كانت ملوحة الترب المستغلة زراعيا (3.13 و3.50 ديسي سيمنز.م$^{-1}$) اما ترب البور فبلغت 4.52 ديسيسيمنز.م$^{-1}$. تبين ان معظم الكمية المضافة من اليوريا للتربة تتحول الى امونيا في جميع الترب المستعملة خلال مدة شهر، وسجل أفضل مستوى لنشاط انزيم اليوريز 75 و 80 ميكروغرام يوريا. غم. سا$^{-1}$ في تربتي الجزيرة وزنكورة للخضر على التتابع. تميزت العزلتين *P. fluorescens* GV2 و *Sp. ureae* ZV2 بأفضل نشاط لليوريز 8.40 و7.99 ملغم.NH_3 لتر.سا$^{-1}$، وأظهرت النتائج أن أفضل نشاط لانزيم اليوريز 8.45 و8.32 ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$ من العزلتين *P. fluorescens* GV2 و *B.subtilis*ZB4 عند درجة حرارة 38 مْ ، زاد معدل نشاط العزلات بزيادة تركيز اليوريا في الوسط من 300–9000 ملغم يوريا.لتر$^{-1}$ وبلغ أعلى معدل 62 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ من العزلة *Sp. ureae* ZV2 مع تركيز 900 ملغم يوريا.لتر$^{-1}$. بينما انخفض نشاط العزلات في تحلل مركب اليوريا مع أستعمال نسب من الجبس تزيد عن 5% وتوقف نشاط العزلة *B.subtilis*ZB4 عند نسبة 10% جبس كذلك توقف نشاط العزلة *Ur. pasteuri* ZW4 مع نسبة جبس 15%.

Study of the Urease enzyme activity and the some effect factors on urea hydrolyses in some agriculture soils in Ramadia

Jammal S. H Al-Kabbaisia
Coll. agric. Anbar-Univ.

Abstract

The research has been carried out to study the existence, distribution and identified the isolated of urea hydrolysis bacteria and produced the urease from 30 samples have been collected from 6 regions agricultural soils felids between Ramadia and Heat city on the two sides of Euphrates river (Gzeria and Zngora).3 regions for each Gzeria and Zngora that wheat and vegetable agriculture uses and wild, in the period march to July 2010. The samples were analyzed and limited 20 samples are positive for urea hydrolysis. The urease enzyme activity was also investigated, 5 isolates are belong to good urea hydrolysis bacteria have been selected and identified. The effects of some factors such as the temperatures, different concentrations of urea and different ratios of $CaSO_4$.

The results were as follows; The area of study was about 8000 ha., most soils' had sandy loom texture , calcareous (CaCO3 18 – 23%), variation in gypsum content (2.53 – 14.12%), organic content (0.23 – 0.92%), soil salinity for agriculture fields (3.13 – 3.50 $ds.m^{-1}$) but the wild soils increase to 4.52 $ds.m^{-1}$. Urea applied was almost totally hydrolyzed to ammonia in all soils tested with 30 days and the best urease activity recorded 75, 80 µg $urea.g.h^{-1}$ in the vegetable agriculture uses for Gzeria and Zngora soils alternately. Two bacterial isolates *P. fluorescens* GV2, *Sp. urea* ZV2 have achieved the best urease activity 8.40 ,7.99 $mg.NH_3\ L^{-1}.h^{-1}$, Results have shown that the best activity of urea hydrolysis and Urease producing bacteria *P. fluorescens* GV2 and *B.subtilis*ZB4 8.45 ,8.32 $mg.NH_3\ L^{-1}.h^{-1}$ were at 38c° temperatures alternately. The isolates activity rate increased with increasing the urea concentration in the medium from 300to 900 mg urea L^{-1}. The highest rate was 62 mg $NH_3\ L^{-1}.\ h^{-1}$ with 900 mg $urea.L^{-1}$ concentration by *Sp. ureae* ZV2. While the results have shown a decrease in the activity of isolates in hydrolyseis urea when using increased amounts of gypsum after 5%, the hydrolyze rate was 0.0 $NH_3\ L^{-1}.h^{-1}$ for the *B.subtilis*ZB4 at 10% gypsum and gradually decreased with increasing the amount of gypsum in the medium to reach 0.0 $mg.NH_3\ L^{-1}.h^{-1}$ when using 15% of gypsum with *Ur. pasteuri* ZW4.

المقدمــة

تزايد استعمال مركبات اليوريا في السنوات الأخيرة للمحاصيل الزراعية ، أذ وصل معدل المضاف منها إلى بيئة التربة خلال أعوام 2008 و2009 معدل 67,146,000 طن (11) وهذه الكمية معرضة للزيادة لسهولة الاستعمال وارتفاع ثمنها إضافة الى محتواها العالي من النتروجين (N 46%) ، مع الرغبة بزيادة الرقعة الزراعية والحاصل ودورها المهم في زيادة نمو النبات ، ويطرح الإنسان والحيوان يومياً جزءاً كبيراً من اليوريا فضلا على ما يستعمل منها كمصدر لعنصر النتروجين، إلا أن هذا النتروجين لا يشكل غذاءً جاهزاً للنباتات على شكل يوريا ، الا بعد الخضوع لعملية التحلل الميكروبيولوجي ليصبح غذاءً نيتروجياً قابلاً للتمثيل. تتعرض الكميات المضافة من اليوريا لإنزيم اليوريز المنتج من الخلايا الميكروبية وخلايا بعض النباتات حسب المعادلة :

$(NH_2)_2CO$---NH_2COOH +NH_3----CO_2 +2NH_3---H_2CO_3 +2NH_3- وان الحفاظ على نشاط انزيم اليوريز في التربة بشكل جيد يضمن تحولات الكميات العالية من اليوريا المضافة للتربة بفعل عمليات التسميد، ويتاثر نشاط الانزيم بفعل عدة عوامل منها نسبة التواجد والانتشار وكفائة وتنوع الميكروبات المنتجة له والتي تمارس معظم أنواعها عملية نشدرة اليوريا بالظروف الهوائية باستثناء جزء بسيط منها يمارس نشاطه في الظروف اللاهوائية وتميزت بعض انواع البكتريا الهوائية ذات الشكل الكروي بعملية التحلل كان منها الهوائية *Planosarcina Ureae* وايضا بعض الانواع عصوية الشكل مثل *Urebzcillus pasteuri* و *Bacillus sp.*(6).كما ان عوامل مكونات التربة ومحتواها من الطين والجبس والاملاح والمادة العضوية وطبيعة الاستغلال الزراعي والظروف البيئة ،اذ يعد تحلل اليوريا من نوع الممتص للحرارة لذلك يكون استعماله في المواسم التي تنخفض بها درجات الحرارة عن 15 مْ بطيء الجاهزية للنبات ويؤدي إلى خفض نسب الإنبات ويسبب أضرار للبذور والبادرات(2) وتنتشر الأحياء المجهرية المنتجة لإنزيم اليوريز في الطبيعة بشكل كبير وتختلف في قابليتها على تحلل مركب اليوريا وان زيادة فعالية اليوريز في التربة يدل على نشاط تلك الأحياء ألمجهرية في أنتاج اليوريز ويقوم عدد كبير من الأحياء المجهرية المتواجدة في بيئة التربة بأنتاج إنزيم اليوريز في التربة الذي يؤدي دوره في تحلل مركبات اليوريا لتصبح جاهزة للنبات ، ولكن عند تعرض الأحياء المنتجة لهذا الإنزيم إلى العوامل المؤثرة في الفعالية ستؤدي إلى تباين كمية النتروجين الجاهزة للنبات (1). يرتبط نشاط الانزيم بصورة مباشرة بفعالية ونشاط الأحياء المجهرية التي تتأثر بدورها بخواص التربة الكيميائية والفيزيائية والبايولوجية وبطبيعة المعاملات المطبقة على التربة (25)، كما انه قد يرتبط مع نسبة الدبال والطين، وإذا تواجد هذا الإنزيم حرا في التربة يكون عرضة للتحلل السريع او يصبح غير فعال ووجدت زيادة خطية في فعالية إنزيم اليوريز مع ازدياد درجة الحرارة بين 15- 45 مْ، وأن فعالية إنزيم اليوريز تكون على أقصاها بمدى من 35 الى40 مْ (17) ويكون الرقم الهيدروجيني الأمثل لليوريز الميكروبي قريب من المتعادل وفعاليته القصوى عند رقم 6.5. وتبين أن معدل تحلل اليوريا يزداد مع ازدياد تركيز اليوريا في التربة حتى الوصول الى مستوى اشباع مادة الانزيم من المادة الاساس(24 و19)، ووجد (4) زيادة معدل تحلل اليوريا مع زيادة تركيز الإنزيم وزيادة نشاط الأحياء المنتجة لإنزيم اليوريز واستمرار تحول المركبات الناتجة من الأمونيوم بعملية النترجة الى نترات وتحول CO_2 الى حامض الكربونيك المتفاعل مع الماء.

لغرض مواجهة الأضرار الناجمة من زيادة أستعمال مركبات اليوريا التي أصبحت تصل إلى البيئة بكميات كبيرة من مصادر مختلفة، يجب العمل على تواجد العزلات المنتجة لإنزيم اليوريز في البيئة بكميات كافية ومتوازنة مع الكميات المضافة، لذلك تهدف الدراسة إلى تحديد نسب التواجد والإنتشار والعزل والتشخيص للميكروبات المنتجة لإنزيم اليوريز ومعرفة دورها في تحلل اليوريا وتحرر الامونيا في بعض مواقع الترب الزراعية لقضاء الرمادي وتحديد بعض العوامل المؤثرة في نشاط إنزيم اليوريز.

مواد وطرائق العمل

جمع عينات التربة وعزل وغربلة البكتريا المحللة لليوريا والمنتجة لليوريز

جمعت 30 عينة تربة اخذت بواقع 5 عينة من مناطق مزروعة بالقمح او الخضر او بور من منطقتي الجزيرة و زنكورة خلال المدة بين اذار و حزيران2010، وكان معدل وزن العينة 500 غم اخذت باستعمال مجرفة نظيفة بعد قشط 1 سم من سطح التربة وبعمق يتراوح بين 5-10 سم.حضر وسط urea agar ولقح من محلول التخفيف الخامس للتربة وحضنت النماذج بدرجة حرارة 28 مْ وبعد 24 و 48 ساعة عد تغير لون الوسط حول المستعمرات النامية من الاصفر الى الوردي دلالة على ايجابية الفحص كونها منتجة لإنزيم اليوريز اما بقاء اللون الوسط اصفر فعد سالبا (15)، وحسبت الكثافة البكتيرية الكلية والبكتريا المحللة لليوريا بعد 24 ساعة من الحضن، ودرست بعض صفات التربة لمواقع العينات الستة جدول (1) حسب (16).

نشطت العزلات المنتجة لأنزيم اليوريز بنقل مليء عروة الناقل (loop full) من المزارع المحفوظة الى الوسط Urea broth الحاوي على اليوريا بتركيز200 ملغم .لتر$^{-1}$ وبحجم 20 مل (26) وحضنت بدرجة 28 مْ لمدة 12 ساعة وسجلت معدلات تحلل اليوريا من خلال قياس الامونيا المتحررة (المنحني القياسي للأمونيا). انتخب 5 عزلات بكتيرية على أنها الأكفأ في أنتاج اليوريز وتحلل اليوريا. شخصت العزلات المنتخبة بأجراء الفحوصات المجهرية والكيموحيوية اعتماد على(3 و 10) كما استعمل نظام (أبي 20 للعائلة المعوية20 API) لتاكيد تشخيص العزلات البكترية اذ يشمل 23 اختباراً كيموحيوي حسب تعليمات الشركة المجهزة Bioerieux.

تقدير نشاط انزيم اليوريز في التربة

قدر نشاط اليوريز باستعمال طريقة(7) باستعمال 5 غرام تربة لكل موقع من العينات المستعملة في دورق زجاجي حجمي مع 4 مل من اسيتات الصوديوم (0.5 مولاري) كمنظم للرقم الهيدروجيني 6.5 مع اضافة 1 مل تلويين و 10 مل من محلول اليوريا 0.5 ملي مولاري يوريا-N)، حضنت المكونات بثلاثة مكررات في حاضنة بسرعة رج 100 دورة. دقيقة$^{-1}$ لمدة 10 ساعة في 28 م^{o}. بعد نهاية الحضن أضيف 2 مولاري من كاشف اسيتات فينايل كلوريد الزئبق بمعدل 20 مل لتثبيط انزيم اليوريز ، بعدها رجت الدوارق لمدة 30 دقيقة ورشحت خلال ورق ترشيح whatman no-1. قدر تركيز اليوريا للراشح على طول موجي 525 نانوميتر وقدر تركيز اليوريا بتحضير منحنى قياسي (لليوريا- N) 0- 10 مايكروغم. مل$^{-1}$.

قياس نشدرة اليوريا وتحرر الامونيا من التربة خلال مدة شهر من الحضن

اختيرت 6 عينات تربة من مواقع العينات المستعملة(لكل موقع عينة) بمعدل 5 غم تربة وجهزت باليوريا بمعدل 100 ملغم يوريا-N .غرام$^{-1}$ تربة لغرض تقدير تحول اليوريا في التربة الى امونيا. حضنت عينات التربة في علب بلاستيكية مغلقة مع ترك فراغ فوق سطح التربة في العلبة للتبادل الهوائي. وقد نظمت العلب بثلاثة مكررات(لكل مرحلة قياس 10 يوم بثلاثة مراحل)، رطبت التربة الى حدود السعة الحقلية وحضنت تحت ظروف 28 م^{o}. لمدة 30 يوم استخلصت اليوريا من التربة لكل مدة حضن بالماء المقطر والامونيا باستعمال KCl 1.5 مولاري بنسبة 1: 10 ماء : تربة مع الرج لمدة 20 دقيقة بمعدل 100 دورة. دقيقة$^{-1}$، ثم رشحت خلال ورق ترشيح whatman no-1 قدر تركيز النتروجين، كذلك قدرت اليوريا حسب (7) وقدر NH_4 بطريقة ازرق الاندوفينول.

تأثير درجة الحرارة في نشاط العزلات المنتجة لإنزيم اليوريز

درس تأثير درجات الحرارة (18 و28 و38) م° في نشاط العزلات المنتخبة والمحللة لليوريا ومنتجة لأنزيم اليوريز (GV2 و GW3 و ZV2 و ZW4 و ZB4) لتحديد درجة الحرارة المثلى لتحلل اليوريا وإنتاجها لانزيم اليوريز في الوسط urea broth الحاوي على اليوريا بتركيز200 ملغم .لتر$^{-1}$ بحجم 20 مل .لقح الوسط 1 مل بالعزلات البكتيرية بواقع ثلاثة مكررات. حضنت لمدة 10 ساعة في 28 م°. بعدها قيست الشدة اللونية للوسط (18).

تاثير تركيز اليوريا في نشاط العزلات المحللة لليوريا

حضر وسط urea broth بتراكيز من اليوريا(300 و 600 و900) ملغم .لتر$^{-1}$ ثم ضبط pH الى 6.8 بعدها لقح الوسط بحجم 1 مل بالعزلات البكتيرية(GV2 و GW3 و ZV2 و ZW4 و ZB4) بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة (و لاختبار قدرة العزلات على تحلل اليوريا بتراكيز مختلفة وحضنت بدرجة حرارة 28 مْ وبعد التحضين لمدة 12 ساعة ، قيست الشدة اللونية للوسط (18).

تاثير الجبس$CaSO_4$ في نشاط العزلات المحللة لليوريا

لغرض اختبار تأثير نسبة الجبس في نشاط العزلات المحللة لليوريا تم إضافة الجبس بنسب(4 % و8% و12%) بعدها عقمت بالموصدة أضيفت مكونات وسط urea broth الحاوي 200 ملغم يوريا-N .لتر$^{-1}$ المعقمة بالترشيح مع ضبط pH الوسط الى 6.8 ، بعدها لقح الوسط بحجم 1 مل بالعزلات البكتيرية (GV2 و GW3 و ZV2 و ZW4 و ZB4) بواقع ثلاثة مكررات، وحضنت بدرجة حرارة 28 مْ وخلال 24 ساعة ،قيست الشدة اللونية للوسط (18). حللت البيانات احصائيا حسب نظام كل تجربة وعواملها وحسب تصميم CRD والتجارب العاملية وقورنت المتوسطات بقيم LSD P=0.05.

النتائج والمناقشة

تواجد والانتشار للعزلات المنتجة لانزيم اليوريز

بلغت مساحة المناطق الزراعية التي أخذت منها عينات الدراسة بحدود 8000 هكتار تمتد بين الرمادي وهيت تتوزع على جانبي نهر الفرات(الجزيرة على الضفة اليسرى وزنكورة على الضفة اليمنى لنهر الفرات) وتعد من أوسع المناطق الزراعية المهمة لمدينة الرمادي. يتنوع الاستغلال الزراعي لها شتاءً بين الخضر والنجيلي والأعلاف او تترك بور كما تستغل صيفا بالخضر او المحاصيل العلفية ، تميزت نسجتها بأنها ترب مزيجة رملية ذات معدل لنسبة الماء الجاهز بين 14.8 و13.1%، وذات درجة تفاعل متعادلة وملوحة بين 3.50 و 3.21 في الترب المزروعة جدول(1) اما ترب البور كانت بحدود 4.54 ديسيسيمنز ، جميعها ترب كلسية بنسبة 18-23% ، ارتفعت نسبة الجبس في ترب الجزيرة بور لتصل 14.12% في الافق السطحي (20 سم) تلتها تربة زنكورة بور بنسبة 9.12% ، اما المحتوى من المادة العضوية فكنت بحدود 0.9% في الترب المزروعة بالخضر للموقعين وبنسبة 0.51 للموقعين المسغلة بالقمح اما ترب البور فكانت بمعدل 0.23%، وبلغت كمية النتروجين الكلي بحدود 205 ملغم N .كغم$^{-1}$ في المواقع المستغلة بالخضر ، بينما تراوح بحدود 125 ملغم N .كغم$^{-1}$ تربة في المواقع المستغلة بالقمح وانخفضت لتصل بحدود 50 ملغم N .كغم$^{-1}$تربة في المواقع البور، انعكس ذلك على كمية النتروجين الجاهز (NH_4+NO_3) ليصل بحدود 80 و37 و16 ملغم N .كغم$^{-1}$ في المواقع بالتتابع. كذلك تميزت الترب المستغلة زراعيا باعلى محتوى ميكروبي تراوح بين 6.92 و 6.42 logcfu.g^{-1} وانخفض في ترب البور الى معدل 3.31 logcfu.g^{-1}.

جدول 1. بعض صفات التربة المقدرة

الموقع والاستغلال	المفصولات غم.كغم $^{-1}$			p H	EC دي سيسيمنز. م $^{-1}$	$CaCO_3$ %	$CaSO_4$ %	O.M %	TN ملغم. كغم $^{-1}$	Av.N ملغم كغم $^{-1}$	TM Log cfu.ml $^{-1}$	Av. W%
	رمل	غرين	طين									
جزيرة خضر	270	430	300	7.62	3.21	23	2.53	0.92	210	86	6.92	14.5
جزيرة قمح	250	450	300	7.57	3.42	21	4.03	0.51	130	36	6.64	14.8
جزيرة بور	400	400	200	7.56	4.54	18	14.12	0.23	46	14	3.41	13.2
زنكورة خضر	270	420	310	7.61	3.13	23	6.05	0.89	200	74	6.86	14.8
زنكورة قمح	240	430	330	7.60	3.50	20	3.22	0.52	120	38	6.42	14.9
زنكورة بور	450	320	230	7.58	4.53	18	9.12	0.25	54	18	3.32	13.1

TN= النتروجين الكلي و TM =الكثافة البكتيرية21 وAv.W% = الماء الجاهز و O.M% = مادة العضوية وAv.N = NH_4+NO_3

كما أظهرت النتائج في جدول (2) أن عدد العينات لتي اعطت فحصا موجبا لتواجد العزلات المحللة لليوريا 20 عينة قد أرتبط بنوع التربة وطبيعة الاستغلال الزراعي وتوزعت بنسبة انتشار66.6% في عينات الدراسة البالغة 30 عينة لستة مواقع زراعية في مدينة الرمادي، وأكدت النتائج تباين العينات بنسبة التواجد باختلاف مصدر العزل وبلغت 5 عينات ذات فحص موجب لعينات مواقع ترب الجزيرة وزنكورة المستغلة بزراعة الخضر وبنسبة تواجد 100% ، تلتها عينات الجزيرة وزنكورة المستغلة بزراعة القمح بعدد 4 و2 (80 و40%) على التتابع واقل عدد بلغ 1(20%) عينة في الترب غير المستغلة (بور). بلغت الكثافة الميكروبية للعزلات المنتجة لليوريز في المواقع المزروعة بالخضر والقمح بحدود 5.46 و 4.0 $Logcfu.g^{-1}$ بالتتابع، وانخفضت الكثافة في مواقع البورلتصل معدل 1.01 $Log\ cfu.g^{-1}$. تؤكد النتائج قابلية العزلات على الانتشار والتواجد في بيئات مختلفة ومتنوعة مما يعكس قدرتها في المقاومة وأمتلاكها إنزيم اليوريز لتحليل المركبات العضوية والنتروجينية للحصول على مصادر الكاربون والنيتروجين والطاقة (3). واظهرت نتائج تشخيص العزلات المنتخبة والمنتجة لليوريز انها تنتمي للانواع *Pseudomonas fluorescens* و *Planosarcina Ureae* و *Sporosarcina ureae* و *Urebzcillus pasteuri* *Bacillus subtilis* والتي عزلت من مواقع الجزيرة خضر والقمح وزنكورة خضر ثم القمح اما عزلة *Bacillus ubtilis* فقد عزلت من مواقع ترب البور. واظهرت نتائج اختبار قدرة العزلات بتحلل اليوريا من خلال تحرير الامونيا اذ تمكنت العزلة GV2 *P. fluorescens* وعزلة ZV2 *Sp. ureae* من انتاج اكبر كمية بلغت 8.40 و 7.99 ملغمNH_3.لتر$^{-}$.ساعة$^{-1}$ على التتابع، تلتهما عزلتي ZV2 *Sp. ureae* و GW3 *Pl. Ureae* بمعدل 6.61 و 6.52 ملغمNH_3.لتر$^{-}$.ساعة$^{-1}$ على التتابع، بينما تحقق اقل معدل 5.02 ملغمNH_3.لتر$^{-}$.ساعة$^{-1}$ من عزلة GB4 *B. subtilis* .

جدول 2. الفحص الموجب لليوريز وتحرر الامونيا والعزلات المحللة وكثافتها

مواقع العينات	رمز العزلة	عدد العينات	الفحص الموجب لليوريز	معدل الامونيا المتحرر ملغمNH_3^{-1}.ساعة$^{-1}$.لتر$^{-1}$	العزلات المنتخبة	TM. Ur- hydroly. Log cfu.g^{-1}
الجزيرة خضر	GV1-5	5	5	**8.40**	*P. fluorescens* GV2	5.62
الجزيرة حنطة	GW1-5	5	4	**6.52**	*Pl. Ureae* GW3	4.15
الجزيرة بور	GB1-5	5	1	**5.02**	*B. subtilis* GB4	1.00
زنكورة خضر	ZV1-5	5	5	**7.99**	*Sp. ureae* ZV2	5.33
زنكورة حنطة	ZW1-5	5	2	6.61	*Ur. pasteuri* ZW4	3.98
زنكورة بور	ZB1-5	5	1	**5.19**	*B. subtilis* ZB4	1.02

ربما يعود سبب في اختلاف الكثافة العددية للعزلات حسب مواقع العينات إلى طبيعة الاستخدام الزراعي و نوع النبات المزروع وطبيعة الخدمة ونوع الاسمدة المستعملة إذ وجد أن التربة المزروعة بالخضر (والتي غالباً ما تسمد بالمخلفات الحيوانية) أفضل بتواجد بالبكتريا المحللة لليوريا والميكروبات الكلية الترب المزروعة بمحاصيل النجيليات، وهذا يتوافق مع ما وجده(21) الذي ذكر بأن إنزيم اليوريز يوجد بكميات غزيرة في الترب الزراعية المزروعة بالعوائل النباتية مثل البقوليات. كما أشار (9) إلى أن لنوع المحصول المزروع في التربة تأثير واضح على معدل تحلل اليوريا ، وأن الترب المزروعة ذات محتوى عال من البكتريا المنتجة لإنزيم اليوريز مقارنة بالترب غير المزروعة بسبب إفرازات الجذور التي تؤدي إلى زيادة إعداد الأحياء المجهرية. وقد وجد ان العدد الكلي للبكتريا في التربة يرتبط مع عدد البكتريا القادرة على أنتاج أنزيم اليوريز، وترتبط فعالية الإنزيم في التربة بعلاقة طردية مع حجم المجتمع الميكروبي ومحتوى التربة من المادة العضوية(13). وتوصل (1) إلى أن هنالك اختلافا كبيرا في نشاط إنزيم اليوريز بالتربة تبعا لنوع المخلفات الحيوانية العضوية المضافة، وقد يرجع إلى الأختلاف في محتوى المخلفات من النتروجين ، و التفاوت سرعة تحلل المخلفات وتأثيرها في خواص المادة العضوية وزيادة نشاط الأحياء المجهرية التي تفرز إنزيم اليوريز ويزداد نشاط البكتريا المنتجة لإنزيم اليوريز عند إضافة المخلفات الحيوانية إليها.

النشدرة والامونيا المتحررة ونشاط انزيم اليوريز وتحرر الامونيا من الترب(خلال مدة 30 يوم حضن)

تشير النتائج في جدول 3 تباين معدل نشاط انزيم اليوريز لعينات الترب باختلاف مواقعها اذ أظهرت عينات تربة الجزيرة خضر اعلى معدل معنوي بلغ 82.31 مايكروغم. NH_3.غم.سا$^{-1}$ تلتها عينات مواقع ترب زنكورة خضر والجزيرة قمح وزنكورة قمح بمعدلات بلغت 78.01 و 77.52 و 75.23 مايكروغم. NH_3.غم.سا$^{-1}$ على التتابع ، بينما انخفض معدل النشاط للانزيم في عينات مواقع ترب البور الجزيرة وزنكورة ليصل 19.23 و21.02 مايكروغم. NH_3.غم.سا$^{-1}$ على التتابع. كذلك يبين الجدول انخفاض تركيز اليوريا المتبقي في التربة بزيادة مدة الحضن ولحد 30 يوم اذ بلغ 7.87 و5.27 و3.46 ملغم يوريا-N . غم$^{-1}$ بعد 10 و 20 و30 يوم حضن على التتابع، كما تباينت عينات مواقع الترب وأظهرت تربة الجزيرة وزنكورة خضر بأقل محتوى بلغ 4.68 و4.74 ملغم يوريا-N . غم$^{-1}$، كذلك اظهر التداخل بين مدة الحضن ومواقع اجزيرة تأثيرا معنويا في كمية اليوريا المتبقية اذ حصل اقل معدل 2.37 و2.45 ملغم يوريا-N . غم$^{-1}$في مواقع زنكورة والجزيرة خضر. انعكست الكمية المتحللة من اليوريا على كمية الامونيا المتكونة في التربة اذ تبين وجود زياد معنوية لها مع زيادة مدة الحضن وبلغت 4.23 ملغم

NH_3 .غم $^{-1}$بعد 30 يوم حضن(جدول 3) كذلك تباينت عينات الترب ووجد ان اعلي معد معنوي لها 3.52 و3.50 ملغم NH_3 .غم $^{-1}$ في تربتي زنكورة والجزيرة خضر على التتابع، واظهر التداخل الثنائي تأثيرا معنويا لزيادة الامونيا المتحررة في تربتي الجزيرة وزنكورة خضر ليصل 4.87 و4.62 ملغم NH_3 .غم $^{-1}$ على التتابع. يتبين ان اغلب الترب المستغلة تقوم بتحلل ما يصل اليها من سماد اليوريا خلال شهر محررة الامونيا وكان معد ل الانخفاض في تركيز اليوريا متزامن مع كميات الامونيا المتحررة، ويرجع التباين بين مواقع الترب الى تباين محتوى الترب من تنوع العزلات المحللة ونشاطها بانتاج انزيم اليوريز وكذلك اختلاف محتواها من المادة العضوية التي تساهم في حماية النشاط المايكروبي وفعالية الانزيم من الارتباط بمعادن الطين كذلك اظهرت ترب البور انخفاض في الاداء مما يعكس زيادة مستوى الاملاح وانخفاض المحتوى العضوي والنشاط الميكروبي ا لامر الذي ينعكس على عمليات المعدنة والتمثيل لمركبات النتروجين في التربة اذ تؤدي زيادة ملوحة التربة الى تثبيط عملية النترجة مما يؤدي الى تراكم الامونيا وانخفاض تحلل اليوريا(8 و20 و27).

جدول 3. النشدرة والامونيا المتحررة ونشاط انزيم اليوريز في الترب(خلال مدة 30 يوم حضن)

العينات	نشاط اليوريز مايكروغم. NH_3.غم.سا$^{-1}$	تركيز اليوريا ملغم . غم$^{-1}$ خلال يوم				تركيز الامونيا ملغم NH_3 .غم $^{-1}$ خلال يوم			
		10	20	30	معدل	10	20	30	معدل
الجزيرة خضر	82.31	7.21	4.38	2.45	4.68	2.24	3.50	4.87	3.50
الجزيرة حنطة	77.52	8.02	5.31	3.52	5.61	1.45	3.12	4.44	3.03
الجزيرة بور	19.23	8.31	6.25	4.45	6.33	1.61	2.26	3.25	2.37
زنكورة خضر	78.01	7.48	4.39	2.37	4.74	2.12	3.82	4.62	3.52
زنكورة حنطة	75.23	7.98	5.25	3.86	5.69	2.03	3.17	4.34	3.18
زنكورة بور	21.02	8.24	6.04	4.13	6.13	1.42	2.42	3.88	2.57
المعدل	58.88	7.87	5.27	3.46		1.81	3.03	4.23	
LSD P=0.05	4.14	So= 0.54 , ti= 1.41 st=1.62				So=0.23 , ti=0.41 st=0.62			

تأثير درجات الحرارة على نشاط اليوريز للعزلات المنتخبة

يبين جدول 4 تاثير درجات الحرارة المختلفة على نشاط اليوريز للعزلات المنتخبة اذ بلغ افضل معدل معنوي لنشاط لليوريز 7.93 و7.57 ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$ بينما انخفض معدل النشاط مع انخفاض درجة الحرارة ليصل 5.01 ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$ مع 18 مْ، ووجد تباين في نشاط العزلات باختلاف درجات الحراة واعطت عزلات *Sp. ureae* ZV2 و *Ur. pasteuri* ZW4 و *P. fluorescens* GV2 افضل معدل معدل نشاط معنوي بلغ 7.18 و7.17 و7.06 ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$ على التتابع تلتهما عزلة *Pl. Ureae* GW3 بمعدل نشاط بلغ 6.78 ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$ بينما حققت العزلة *B. subtilis* ZB4 اقل معدل لنشاط الانزيم بلغ 5.98 ملغم. NH_3 .لتر.سا$^{-1}$، واظهر التداخل بين انواع العزلات ودرجات الحرارة المستعملة تاثيرا معنويا في نشاط الانزيم اذ بلغ اعلى معدلات للنشاط المعنوي تراوحت بين 7.66 و8.45 ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$ لجميع العزلات مع 28 و38 مْ بينما

كان افضل نشاط للعزلتين *Sp. ureae* ZV2 و *Ur. pasteuri* ZW4 والذي بلغ 6.56 و6.42 ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$ تحت درجة 18 مْ بينما انخفض معدل نشاط العزلات *B. subtilis* ZB4 و *Pl. Ureae* GW3 و*Pl. Ureae* GW3 اذ بلغ 3.43 و 4.21 و 4.62 ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$ ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$ على التتابع.

جدول 4. تأثير درجات الحرارة (مْ)على نشاط اليوريز للعزلات المنتخبة (ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$)

المعدل	*B. subtilis* ZB4	*Ur. pasteuri* ZW4	*Sp. ureae* ZV2	*Pl. Ureae* GW3	*P. fluorescens* GV2	المعاملات
5.01	3.43	6.24	6.56	4.21	4.62	18
7.57	6.21	7.85	7.66	8.02	8.12	28
7.93	8.32	7.43	7.32	8.12	8.45	38
	5.98	7.17	7.18	6.78	7.06	المعدل

LSD p=0.05, tem= 0.31, iso=0.21 tem-iso= 0.33

يعود تباين العزلات في نشاط اليوريز الى اختلاف الأنواع المستعملة وقدرتها على تحليل مركب اليوريا، كما يعود الى انخفاض انتاجية البكتريا من الأنزيم عند درجات الحرارة المنخفضة والى بطأ نموها وتأخر تخليق الإنزيم (6)، وتوصل (14) الى وجد زيادة بعلاقة خطية لفعالية إنزيم اليوريز في التربة مع ازدياد درجة الحرارة بين 15-45 مْ ، كما تتفق النتائج مع (8) الذي ذكر بأن فعالية إنزيم اليوريز تستمر بالزيادة المعنوية لحدود درجة 37 مْ. وهذا ما يفسر بطء الاستجابة لسماد اليوريا من النبات في فصل الشتاء.

تأثير تركيز اليوريا (ملغم .لتر$^{-1}$) على نشاط اليوريز للعزلات المنتخبة

يبين الجدول (5) ان زيادة تركيز اليوريا في الوسط ادى الى زيادة معدل التحلل وبلغ اعلى معدل معنوي للنشاط 52.80 ملغم NH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ مع استعمال تركيز 900 ملغم يوريا.لتر$^{-1}$ وانخفض معدل النشاط مع استعمال التركيز 600 ملغم يوريا.لتر$^{-1}$ الى 43.10 ملغم NH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ ، وتباين نشاط العزلات المستعملة تحت تراكيز اليوريا في الوسط في نشاط الانزيم وتراوح أعلى معدل 46.00 و42.66 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ من قبل العزلات *Sp. ureae* ZV2 و*Ur. pasteuri* ZW4 و*P. fluorescens* GV2 على التتابع ، وبلغ معدل النشاط 35.66 و35.33 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ للعزلتين *Pl. Ureae* GW3 و *B. subtilis* ZB4 على التتابع. وكان للتداخل الثنائي بين العزلات وتراكيز اليوريا المستعملة تاثير معنوي في زيادة نشاط اليوريز اذ حصل اعلى معدل معنوي تركيز 900 ملغم يوريا.لتر$^{-1}$ الذي حفز انتاج الانزيم بفعالية 62.00 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ مع العزلة *Sp. ureae* ZV2 تلتها العزلتان *Ur. pasteuri* ZW4 *Ur. pasteuri* ZW4و *P. fluorescens* GV2 بمعدل نشاط بلغ 56.0 و 54.0 ملغمNH_3.لتر$^{-1}$.ساعة$^{-1}$ على التتابع.

جدول 5. تأثير تركيز اليوريا (ملغم .لتر$^{-1}$) على نشاط اليوريز للعزلات المنتخبة (ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$)

المعاملات	*P. fluorescens* GV2	*Pl. Ureae* GW3	*Sp. ureae* ZV2	*Ur. pasteuri* ZW4	*B. subtilis* ZB4	المعدل
300	28	21	28	30	26	26.60
600	46	38	48	46	36	43.10
900	54	48	62	56	44	52.80
المعدل	42.66	35.66	46.00	44.00	35.33	

LSD p=0.05, Ura = 6.43, iso =4.34, Ura-iso =8.87

تأتي هذه النتائج مقاربة لما وجده (5) عند دراستهم لنشاط اليورييز اذ امكن الاستدلال على انتاج الانزيم بحالة نشطة حتى تبدأ عملية التحسس لقاعدية الوسط الناتجة عن تحلل اليوريا بفعل اليورييز المنتج من قبل البكتريا(22) وعدوا المدة الافضل لانتاج الانزيم تكون في بعد الساعات الاولى لاضافة اليوريا، وتتزامن مع النمو الى نهاية الطور اللوغارتمي بعدها تبدأ فعالية الانزيم بالانخفاض، وهذا يتطابق مع ما اورده (12). كما وجد(16 و 24) ان معدل نشاط الانزيم يستمر بالزيادة مع زيادة تركيز اليوريا لمستوى اشباع مادة الانزيم وسجلت علاقة خطية في زيادة معدل التحلل مع زيادة معدل تركيز لليوريا(4).

تاثير نسب الجبس على نشاط اليوريز للعزلات المنتخبة

يبين جدول (6) تاثير استعمال نسب من الجبس على نشاط العزلات بتحلل اليوريا وانتاج انزيم اليوريز اذ وجد ان زيادة نسبة الجبس تؤثر سلبا في نشاط الانزيم وبلغ معد النشاط 7.37 ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$ مع نسبة 5% جبس، بينما انخفضت لتصل 4.18 و1.63 ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$ على التتابع، كذلك وجد تباين في معدل نشاط العزلات بتباين نسب الجبس المستعملة وتحقق اعلى معدل للنشاط 5.87 و5.71 و 4.92 ملغم. NN_3.لتر.سا$^{-1}$ للعزلات *Sp. ureae* ZV2 و *Pl. Ureae* GW3 و *P. fluorescens* GV2 على التتابع ، وكان معدل نشاط العزلة *B. subtilis* ZB4 2.15 ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$. كذلك وجد ان التداخل يؤثر معنويا في نشاط العزلات وقد حققت العزلات معدلات نشاط تراوحت بين 7.88 و6.46 ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$ مع نسبة جبس 5% ، وانخفض نشاط العزلات مع زيادة نسبة الجبس 10% وحققت العزلتين *Sp. ureae* ZV2 و *Pl. Ureae* GW3 و*Pl. Ureae* GW3 معدل نشاط بلغ 6.80 و5.43 ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$ على التتابع، بينما اختفى نشاط العزلة *B. subtilis* ZB4 مع نسبة الجبس 10% واستمر التوقف مع زيادة نسبة الجبس الى 15% وتوقف معها نشاط العزلة*Ur. pasteuri* ZW4 .

جدول 5. تاثير نسب الجبس على نشاط اليوريز للعزلات المنتخبة (ملغم. NH_3.لتر.سا$^{-1}$)

المعاملات	*P. fluorescens* GV2	*Pl. Ureae* GW3	*Sp. ureae* ZV2	*Ur. pasteuri* ZW4	*B. subtilis* ZB4	المعدل
5	7.88	7.86	7.32	7.36	6.46	7.37
10	4.47	5.43	6.80	4.22	0.0	4.18
15	2.42	2.23	3.51	0.0	0.0	1.63
المعدل	4.92	5.17	5.87	3.86	2.15	

LSD p=0.05, CaSO4= 2. 12, iso= 1.32, CaSO4-iso=1.43

يعود سبب الأنخفاض في نشاط الانزيم إلى كون تفاعل تحلل اليوريا ممتص للحرارة وكذلك تفاعل الجبس مع الماء الأمر الذي يؤثر على تحلل اليوريا ونشاط إنزيم اليوريز بالتنافس على الحرارة وتكون الأسبقية للمركب الأكثر سرعة في التفاعل واعلى تركيز وحاصل للإذابة وهذا ما يميز الجبس مما ينعكس على إذابة مركب اليوريا، وتمكن(5) من تفسير الانخفاض في فعالية إنزيم اليوريز إلى تأثير الايونات الذائبة في تركيب الموقع الفعال للإنزيم، والتي تنافس ايونات النيكل التي تعد مهمة في فعالية الانزيم وتكون معقدات تؤدي إلى إعاقة ارتباط الإنزيم بالمادة الأساس. كما استخدمت مثبطات اليوريز من الجبس للتخلص من الآثار البيئية السلبية للأمونيا المتحررة في حقول الدواجن وزراعة الفطر (23).

المصادر

1-Al-Ansari, A.S.; Kadhem, S.J. and Abdul Kareem M.A..(1999).Nitrogen mineralization and ammonia volatilization from alfalfa residue and poultry manure in presence of soluble Ca and Mg salts .J.Iraqi Agric.Sci.30(1):225-238.

2-Askin,T and Kizilkaya,R.(2005).The spatial variability of urease activity of surface agricultural soil within an urban area. Journal Central European Agriculture, 6 (2): 161-166.

3-Baron ,E.J. and Finedgold , S.M. (1990). Diagnostic microbiology . 8th ed . Mosby – Year – Book . Inc. Missouri . USA.

4-Bhat,M.R.;Murthy,D.V.R.and Saidutta,M.B.(2011).Urea hydrolysis in loam soil. Arpn J. of Agric. and Biological Science. 6:3.

5--Breitenbach, J.M. and Hausinger, R. P. (1988). *Proteus mirabilis* urease partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids. Biochem. K. 250: 917-920.

6- Davies,R.(1963).Microbial extracellular enzyme their uses and some factors affected their formation In :biochemistry of industrial microorganism ,(eds Rainbow ,and Rose,A.H.,) Academic press , New York.

7-Douglus,L.A. and J.M.Bremner,1970.Colorimetric determination of microgram quantities of urea.Anal. Letters,3:79-87.

8-Gould,W.D.; Cook ,F.D. and Webster, G.R.. (1973) .Facters affecting urea hydrolysis in several Albert soils .plant soil .38:393- 401.

9-Hamid.M.;Khalid –Ur-Rahman;Sheikh.M.A. and Basra.S.M.A.(2004). Effect of substrate concentration,temperature and cropping system on hydrolysis of urea in soils.International J. of Agri. and Biology.964-966.

10-Holt , J.G. ; Krieg , N.R. ; Sneath ,P.H.; Staley , J.T.and Williams , S.T. (1994) .Bergy's manual of determinative Bacteriology .9th ed William and Wikins co. Baltimore. London.

11-I.F.A. International Fertilizer Industry Association. (2008). http://www.fertilizer.org /ifa/ statistics/STATSIND/tablen.asp

12-Island, M.D. and Mobley, H.L.T. (1995). *Proteus mirobilis* Urease: operon fusion and linker insertion analysis of ure gene organization, regulation and function. J. Bacteriol. 177 (19): 5653-5660.

13- Klose,S. and Tabatabai, M.A .(2000).Urease activity of microbial biomass in soil as affected by cropping system .Bio.Fert.Soil.31:191-9.

14-Kumar,D.,V. Kumar and A.Swarup,(2000).Effect of temperature on kinetics of urea hydrolysis and ammonia volatilization losses in submerged alkali soil .Fert.News.45:57-60.

15-Lloyd, A. B., and M. J. Sheaffe.(1973). Urease activity in soils.Plant Soil .39:71-80.

16-Jacson,M.L.,1962.Soil and plant analysis. Constable and Co. Ltd.London.

17-Maia,D.M.Vasconcelos,E.A.D.Maia,P.F.Maciel,J.Cajueiro,K.R.Silva,M.D.Jr,E.F. Dutra, R. A. Freire, V.N. and Filho, J.L. (2007).Immobilization of urease on vapour phase stain etched porous silicon. Process Biochem.42:429-433.

18-Mobley, H. L. T.; Jones B. D. and Jerse, A. E. (1986). Cloning of urease gene sequences from *Providencia stiurtiti*. Infect. Immun. 54:161-169.

19-Overrein,L.N. and P.G. Moe.1967.Factors affecting urea hydrolysis and ammonia volatization in soil. Soil Sci.Soc.Am. Proc., 31:57-61.

20- Pettit, N.M.,A.R.J. Smith, R.B. Freedman and R.G. Burns.1976 Soil urease activity, stability and kinetic properties. Soil Biochem.8:479-484.

21-Polacco, J.C. and Winkler, R.C. (1984). Soybean leaf urease: A seed enzyme. Plant Physiol. 74: 800-803.

22-Senior, B. W.; Bradford, N.C. and Simpson, D.S.(1980). The urease of *Proteus* strains in relation to virulence for the urinary tract. J. Med. Microbiol. 13: 507-512.

23-Singh, A.; Casey, K.D.; Pescatore, A.J. and Gates, R.S. (2005). Efficacy of urease to reduce ammonia emissions from broiler litter. Animal Waste Management Symposium. 219-225.

24-Tabatabai, M.A. and J.M. Bremner, 1972.Assay of urease activity in soils. Soil Biochem.4:479-487.

25-Vindokumar, R.L.and Wagenet, R.J. (1985).Salt effect on urea hydrolysis and nitrification during leaching through laboratory soil columns.Plant and Soil.85:219-227.

26-Vuye, A. and Pijck, J. (1973). Urease activity of enterobacteriaceae: which medium to choose. Appl. Microbiol. 26(6): 850-854.

27-Wickramasinghe, K.N., S. Sivasubramaniam and P. Nalliah,1982. Urea hydrolysis in some tea soil. Plant Soil,62:473-477.