تقدير مستوى النتروجين الجوي المثبت لبعض عزلات *Azotobacter vinelandii* من التربة

محمد ابراهيم الظفيري / مركز بحوث البيئة المحلية –جامعة بابل

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة الى تقدير مستوى النتروجين الجوي المثبت من قبل بكتريا *Azotobacter vinelandii* المعزولة من بعض الترب المختارة .

تم عزل وتشخيص اربع عزلات (*Azotobacter vinelandii*) من عينات ترب اخذت من افق Ap لاربعة ترب واقعة في مناطق زراعية مختلفة ضمن محافظة بغداد وذلك باستخدام اوساط زرعية انتخابية خاصة بـ*Azotobacter vinelandii* للحصول على عزلات نقية , وتم التشخيص على وفق الفحوصات الواردة في Bergyes manual (الطبعة الثامنة) .

اظهرت النتائج ان النتروجين المثبت لعزلات *vinelandii Azotobacter* في تجربة *In vitro* تتراوح (7.0 -17.8) ملغم نتروجين لكل 100 مل من الوسط الغذائي الخالي من النتروجين.

المقدمة

تعد الازوتوباكتر *Azotobacter* من الاحياء الرئيسة التي تقوم بتثبيت النتروجين بصورة لا تعايشية وتوجد في التربة والمياه وعلى سطوح النباتات وخاصة سطوح جذور النباتات والتي تكون فيها انشط لانها ستستفيد من افرازات الجذور كمصدر للكاربون [1] وعادة تكون اكثر انتشارا في التربة المتعادلة او التي يميل اسها الهيدروجيني نحو القلوية المتعادلة .

بكتريا الازوتوباكتر لها اهمية اقتصادية فقد استخدمت من قبل علماء السوفيت في القرن الماضي كمحسن ومخصب حيواني واطلق عليه لقاح الازوتزباكترين Azotobacterin ثم وجد فيما بعد ان له القدرة على تكوين مواد فعالة مثل فيتامينات والجيرالين [2] وعموما ان بكتريا الازوتوباكتر هي من نوع متباينة التغذية تستطيع اختزال النتروجين الجوي N_2 الى امونيا داخل الخلية الحية بمساعدة انزيم النتروجينيز ,تتاثر الازوتوباكتر بالظروف البيئية المحيطة بها , فهي تكون حويصلات Cysts تقاوم الجفاف ولا توفر حماية للبكتريا عند ارتفاع درجات الحرارة [3] الا ان *Azotobacter vinelandii* من اكثر انواع الازوتوباكتر تحملا لارتفاع درجات الحرارة (37 م) [4] .

من الناحية التطبيقية فان الازوتوباكتر تعمل على زيادة في محتوى التربة من النتروجين , وقد اشير الى ان الازوتوباكتر تحقق زيادة في محتوى النتروجين في الوسط التي تعيش فيه بكميات تفوق 1 ملغم لكل1 سم^3 من هذا الوسط [5] , فيما استنتجت دراسة [6] من ان التلقيح بالازوتوباكتر يؤدي الى زيادة النتروجين في التربة وان هذه الزيادة تعتمد على نوع التربة والمادة العضوية ونوع اللقاح وتعقيم التربة , في حين بينت احدى الدراسات [7] ان الازوتوباكتر تستطيع ان تثبت (37) ملغم لكل غرام سكر المنتول تحت جهد اوكسجين مقداره (0.08) ضغط جوي .

لذا فان هذه البكتريا تسهم في دورة النتروجين من خلال تثبيت النتروجين الجوي في مكونات التربة لذلك فمن الضروري معرفة قدرات هذه البكتريا في عملية تثبيت النتروجين .

طرق العمل والمواد :-

التجربة الاولى :-

تم جلب اربع عينات من الافق Ap لترب زراعية ذات مواقع جغرافية مختلفة من محافظة بغداد , فقدعرف عن التربة وخصوصا الترب الزراعية أن لها عدد كبير و متنوع من انواع الاحياء المجهرية و الطريقة المستخدمة في هذا المجال هو الحصول على العينات مختلفة وعديدة من التربة ومن مناطق جغرفية و ذات بيئة مختلفة , حضر الوسط الغذائي السائل والخاص بالازوتوباكتر وباستخدام طريقة Most Probable- Number[8] وذلك لغرض للحصول على نموات من الازوتوباكتر فقط ,اذ تم التلقيح من تخفيف (10^{-3}) لعينات الترب ثم حضنت على درجة حرارة (30) م لمدة اسبوع . بعدها اخذت الأنابيب التي اعطت فحصا موجبا للازوتوباكتر وتم تنميتها على الوسط الصلب Burks N Free Medium [9] بطريقة التخطيط Streeking . وبعد الحضن على درجة حرارة (30) م وظهور النمو في الاطباق تم تلقيح الوسط الغذائي Burks N Free Medium المعدل باضافة (10) غم من بنزوات الصوديوم بدل سكر الكولكوز لغرض الحصول على عزلات نقية ليصبح وسطاً انتخابياً خاصا بـ *Azotobacter vinelandii* [10] وبطريقة التخطيط على درجة حرارة (30) م . كرر التلقيح من النموات المنفردة التي اعطت صفات مظهرية مطابقة لهذه البكتريا وعلى الوسط نفسه ليتم بعد ذلك تشخيصها على وفق الفحوصات الواردة في Bergyes Manual (الطبعة الثامنة) [10] والمرجع العلمي [4] , علما ان هذه الفحوصات الاختبارية تم اجرائها لغرض تشخيص ***Azotobacter vinelandii***, و هذه الفحوصات تمت باستخدام اوساط انتخابية وبطريقة التخطيط على اسطح الاطباق الحاوية على هذه الاوساط ,حيث تم استخدام وسط انتخابي Derxs و استخدام الوسط الغذائي الذي يحتوي على سكر رامنوز [12] , كما استخدم الوسط Burks المضاف اليه الملح كلوريد الصوديوم بتركيزين (1% , 2%) و 0.1% فينول , بعدها تم تنمية العزلات على اسطح بيئة الاكار المائل وحفظت في الثلاجة لحين استخدامها في التجربة اللاحقة .

التجربة الثانية :-

قياس كفاءة عزلات *Azotobacter vinelandii* في الوسط الغذائي لغرض اختبار العزلة الاكثر كفاءة في تثبيت النتروجين الجوي من بين العزلات الاربع التي يمكن استخدامها في اللقاح البكتيري ,فقد تم اولا تنمية هذه العزلات على

وسط السائل الاغنائي [4] ثم حضنت على درجة حرارة (30) م ولمدة يومين بعد ذلك تم توحيد الكثافة الضوئية على قراءة (1.4) وبطول (600) نانوميتر لجميع العزلات باستخدام جهاز الطيف الضوئي Spectrophotometer , وعلى اساس ان معيار الكثافة الضوئية كدليل لتوحيد الكثافة العددية . حضر الوسط الغذائي السائل [12] , و وضع (50) مل من هذا الوسط في دوارق زجاجية حجم (100) سم ^{3} ولقحت بـ (1) مل من اللقاح ذو الكثافة الضوئية الموحدة لكل عزلة وبثلاثة مكررات. وبعد عشرة ايام من الحضن على درجة حرارة 30 م وظهور نمو واضح بتلك الدوارق , تم تقدير نسبة النتروجين الكلي في هذه الاوساط باستخدام جهاز كلدال بعد ان تم هضمها [13] , وذلك على وفق الطريقة المذكورة في A practical manual of soil microbiology laboratory method فيما قدرت الكثافة العددية لهذا اللقاح بطريقة الاطباق Plant count [8] فكانت (70×10^6) بكتريا لكل 1 مل من اللقاح .

النتائج والمناقشة

1- عزل وتشخيص البكتريا *Azotobacter Vinelandii*

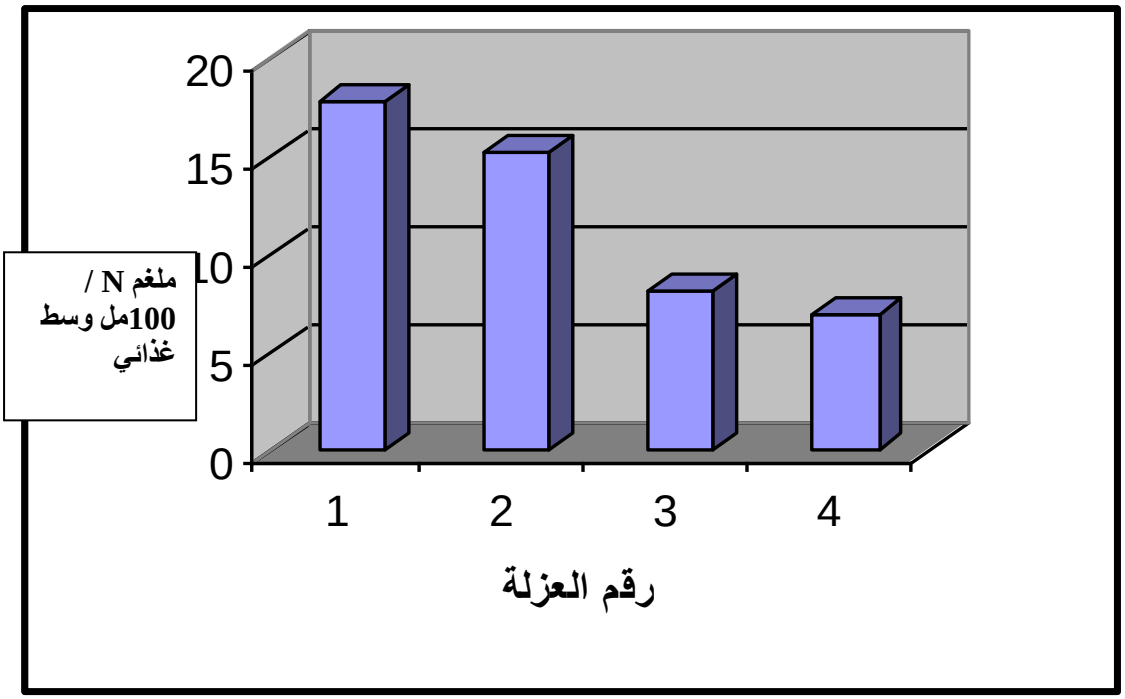
اظهرت الدراسة عن وجود بكتريا الازوتوباكتر في الترب الاربعة المستخدمة للعزل وذلك عند زراعتها على بيئة Burks Free N . اذ ان افضل مصدر يمكن الحصول على عدد متنوع وواسع من الاحياء المجهرية هي التربة , لان التربة تمثل حوض تخمر طبيعي هائل اذ تشترك احياؤها المجهرية في تحلل وتخليق المواد العضوية البسيطة والمعقدة لذلك تعد التربة مصدر مثالي الذي نحصل منه على انواع مختلفة من الاحياء المجهرية .

في ما اظهر الوسط الانتخابي لـ *Azotobacter vinelandii* نموا بطيئا لهذه البكتريا التي لها القدرة على تمثيل الكاربون الموجود في بنزوات الصوديوم ([14, 12]) وقد تميزت هذه البكتريا عند الفحص المظهري على بيئة Burks بان مستعمراتها متوسطة الحجم (قطرها 1 ملم) مستديرة الشكل منبسطة ذات صبغة خضراء فاتحة اللون تحت الاشعة فوق البنفسجية وذك بعد (7) ايام من الحضن على درجة حرارة (30 م ±2 م) . في حين بين الفحص المجهري للعزلات انها ذات شكل عصوي الى بيضوي وبصورة مفردة وثنائية ومتجمعة كما انها سالبة لصبغة كرام . وقد اظهرت الفحوصات الاختبارية التشخيصية التي اجريت على العزلات باستخدام اوساط تحتوي على كلوريد الصوديوم بتركيزين 1% , و 2% والفينول بتركيز 0.1 % وسكر رامنوز بتركيز 1% و وسط انتخابيDerxs نمو في هذه الاوساط , ومن الجدير بالذكر ان *Azotobacter vinelandii* تستطيع ان تمثل سكر رامنوز كمصدر وحيد للكاربون عن Azotobacter Spp [11 ,4] .

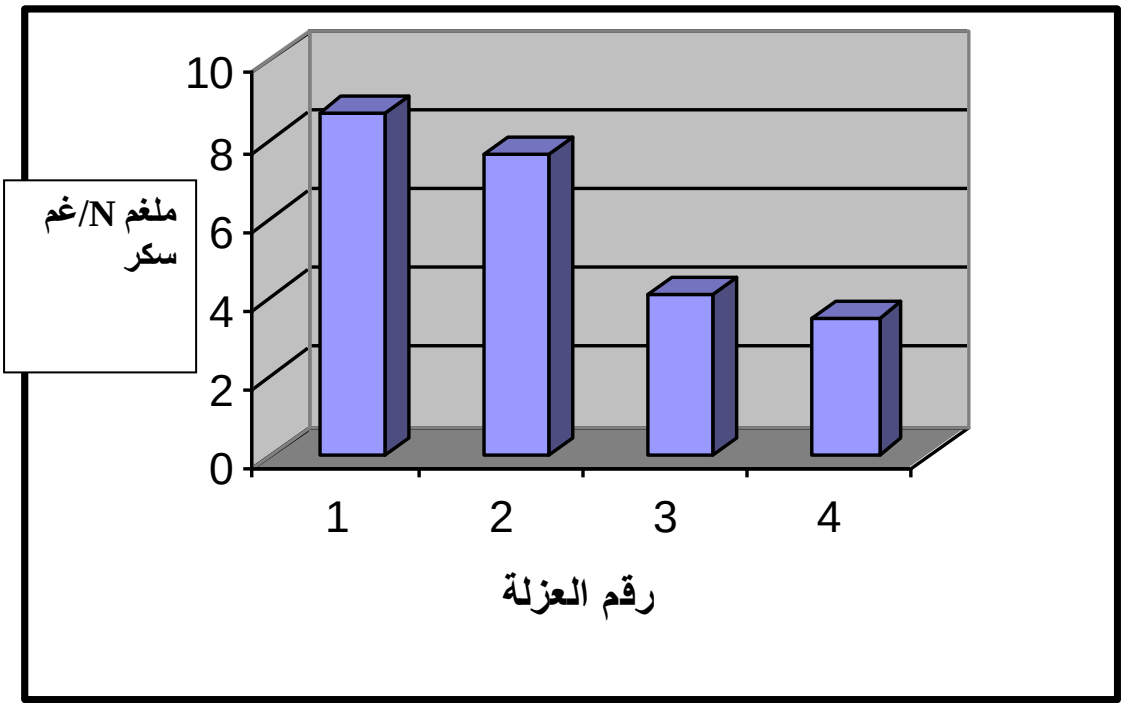
2- مقدار النتروجين الجوي المثبت لبكتريا *Azotobacter vinelandii* في وسط خالي من النتروجين

اظهرت نتائج تجربة *Invitro* لتحديد افضل عزلة في تثبيت النتروجين , كما موضح في الشكلين (2,1) , ان نسبة النتروجين المثبت كانت مختلفة في الوسط الغذائي المستخدم فيما بينت العزلات وهذا يرجع الى اختلاف كفاءة بكتريا *Azotobacter vinelandii* في تثبيت النتروجين لاسباب قد تكون وراثية, وتراوحت نسبة النتروجين المثبت بين (7.0 – 17.8) ملغم N / 100 مل من الوسط الغذائي و (3.5 – 8.9) ملغم N / غم سكر وكانت العزلة الاولى قد حققت اعلى تثبيت للنتروجين ,وعلى هذا الاساس يمكن انتخابها لتحضير لقاح بكتيري يستخدم لتحسين مستوى النتروجين في التربة , ان هذه النتائج تتفق مع نتائج احدى الدراسات[6] التي اجريت على الازوتوباكتر, بيد ان بعض العزلات لهذه الدراسة[6] قد حققت نسب اعلى من النتروجين المثبت والتي تراوحت بين (19.3 – 23.5) ملغم N /100 مل من الوسط الغذائي وقد يكون السبب في ذلك يعود الى اختبار عدد كبير من العزلات .

في حين ان العزلة الاولى والثانية حققت اعلى من نتائج دراسة اخرى [15] , اذ ثبتت عزلاته نسبة تراوحت بين (1.9 – 11.5) ملغم N / 100 مل من الوسط الغذائي ,وقد يعزى السبب الى وجود عنصري المولبدنم والحديد في تركيب الوسط الغذائي المستخدمة في هذه الدراسة وان هذين العنصران يدخلان في تركيب الانزيم المساعد " النايتروجينز " ولهما دورا في زيادة النتروجين المثبت .



شكل (1) مقدار النتروجين المثبت للعزلات لكل 100 مل من الوسط الغذائي.



شكل(2) مقدار النتروجين المثبت للعزلات لكل غم سكر.

المصادر :-

1- قاسم , غياث محمد ومضر عبد الستار علي (1989) علم احياء التربة المجهرية . مطبعة التعليم العالي في الموصل / جامعة الموصل .

2-Mishustin , E. N. and V.K .Shilnikova (1969) . The biological fixation of atmospheric nitrogen by free – living bacteria . Soil Biology Review Research , Unesco ,pub vaillant – carmanne , S. A. , liege (Belgium) .

3- الخفاجي ,زهرة محمود (1987) الفعاليات الحيوية للبكتريا . دار الكتب للطباعة والنشر / جامعة الموصل.

4-Thompson ,J P. and V.B .D . Skerman (1979) Azotobacteracea . The taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen – fixing bacteria . Academic press . London .

5- الكسندر , مارتن (1982) مقدمة في ميكروبيولوجي التربة .الطبعة الثانية . مترجمة جون ويلي واولاده نيويورك .

6- مامندو . نجيب اغاجان . (1982) . بعض التغيرات المايكروبيولوجية ذات العلاقة بالنتروجين في الترب الصحراوية . رسالة ماجستير . كلية الزراعة / جامعة بغداد .

7- Dalton H. (1974) . Fixation of dintrogen by free living micro organisms . CRC. Critical Reviews in Microbiology 3. (cited by) Klubek (1980) Heterotrophic N_2 – Fixation in arid soil crusts . Soil Biol . Biochemi P : 233- 236.

8- Clark F.E (1965) Azotobacter P:1493 – 1497 . (cited by) Black C. A . (1965) Methods of soil analysis part (2) chemical and microbiologyical properties . Am. Soc Agion . Inc . pablisher Madison , Wisconsin , USA.

9- Allen , O,N. (1953). Experiment in soil bacteriology . Burgress Pablishing Co. Minnesota .

10- Tchan , Y.T .and N .B peter (1984) Genus Azotobacter. In : Sneath , P. H. ; N . S Mair ; M .E . Sharp and J. G .Holt(eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology . Vol 1, William and Wilkins , P : 219 – 229 .

11- Jensen , V. (1961) Rhamnose for detection and isolation of *Azotobacter vinelandii*. Nat . 190 : 830 – 833 .
12- Becking , J . H . (1981) The family Azotobacteraceae . In Starr , M. P . (ed) : the" prokaryates " Vol. I springer verlag Berlin . Heidelbery . New York P : 795 – 817 .
13- Food and Agriculture Organization of the United Nation (1967) . A practical manual of soil microbiology laboratory method . Rome . Total nitrogen of culture suspensions by macro Kjeldahl P: 68- 69 .
14- Fung , J; J.Moreno and G .R . Vela (1987) Growth of *Azotobacter vinelandii* on soil nutrients . Appl . Environ . Microbiol . 53 : 589 – 594 .
15- Green ,R . A. (1932) The effect of temperature up on nitrogn fixation by Azotobacter . Soil Sci-33: 153 – 161 .

Estimation of fixed dintrogen level for some isolates of *Azotobacter vinelandii* from soils

Abstract

This study aims to estimate atmospheric dinitrogen that fixed by *Azotobacter vinelandii* bacteria that isolated form selective soils.

Four isolates were obtained and diagnosed from soil samples which collected from Ap horizon for four soils from different agriculture regions in Baghdad governorate by using selective culture medium for *Azotobacter vinelandii* to obtain pure isolates the diagnosing was done according to Bergyes manual examinations (8^{th} ed.).

The results showed that the fixed nitrogen for the isolates of *Azotobacter vinelandii* in *in vitro* experiment was ranged from (7.0 – 17.8) mg of nitrogen for 100 ml of free nitrogen medium .