مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (6) العدد (5) 2022

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (6) No. (5)

عزل وتصنيف بعض البكتريا المثبتة للآزوت من النوعين *Azospirillum lipoferum*، *Azospirillum halopraferen* من تربة منطقة سقوبين في محافظة اللاذقية

أ.د موسى السمارة*

أ.د بديع سمرة**

م. معالي محمد***

(تاريخ الإيداع 18/5/ 2022 – تاريخ النشر15/9/ 2022)

□ ملخّص □

هدفت الدراسة إلى عزل وتصنيف بكتريا مثبتة للآزوت الجوي تكافلياً في عينات تربة بمنطقة سقوبين في محافظة اللاذقية خلال العام ٢٠٢١ واختبار كفاءة هذه العزلات في عملية التثبيت.

صُنفت العزلات البكتيرية اعتماداً على الخصائص المزرعية والشكلية للمستعمرات البكتيرية، وعلى الأوساط العامة والنوعية والتفريقية، وعلى الاختبارات البيوكيميائية وتلوينها بغرام. واستناداً إلى تصنيف Bergey's .

سجلت النتائج عزل وتصنيف *Azospirillum halopraferen Azospirillum lipoferum* كلاهما سالب لصبغة غرام وبلغت قيمة الآزوت الجوي المثبتة من قبلهما (١١.٣) و(٦.٥) على التوالي وبالتالي كانت العزلة *Azospirillum lipoferum* هي الأكثر كفاءة.

الكلمات المفتاحية: عزلات ، بكتريا مثبتة للآزوت الجوي، *Azospirillum lipoferum*، *Azospirillum halopraferen* ،تربة.

*أستاذ– قسم الوقاية البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة– جامعة تشرين– اللاذقية–سوريا

**أستاذ– قسم البساتين– كلية الهندسة الزراعية– جامعة تشرين – اللاذقية – سوريا

***طالبة ماجستير– قسم الوقاية البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة– جامعة تشرين– اللاذقية–سوريا

مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (6) العدد (5) 2022

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (6) No. (5)

Isolation and identification of some nitrogen-fixing bacteria of the two types, *Azospirillum lipoferum, Azospirillum halopraferen* from the soil of Sqoubine in Lattakia city

Dr Mousa Alsamara*
Dr Badie Samra**
Eng Maali Mohammed***

(Received 18/5/2022.Accepted 15/9/2022)

□ABSTRACT □

The study aimed to isolate and classify symbiotic nitrogen-fixing bacteria in soil samples in Sqoubine area in Lattakia city during the year 2021 and to test the efficiency of these isolates in the fixation process.

Bacterial isolates were classified based on the cultivar and morphological characteristics of the bacterial colonies,on general , qualitative and differential media, and on biochemical tests and their Gram staining Based on Bergey´s classification.

The results recorded the isolation and classification of *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum halopraferen* both of which were gram-negative, and the value of atmospheric nitrogen fixed by them was (11.3) and (6.5), respectively, and therefore *Azospirillum lipoferum* isolate was the most efficient.

key words: isolations , nitrogen-fixing bacteria , Azospirillum lipoferum, Azospirillum halopraferen, soil

*Professor, Department of Environmental Protection, Higher Institute of Environmental Research, Tishreen University, Lattakia, Syria

**professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tishreen university, Lattakia, Syria

***Master students, Department of Environmental Protection, Higher Institute of Environmental Research, Tishreen University, Lattakia, Syri

مقدمة Introduction

تعرف PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria)/(البكتريا المعززة لنمو النبات)(Glick,2012) أنها عبارة عن عدد كبير من مجتمعات الكائنات الحية المجهرية الموزعة في التربة على نطاق واسع، والتي تعيش بحرية حول جذور النباتات، أو قد يستعمر البعض منها أجزاء من الأنسجة الداخلية لجذور النباتات لتشكيل علاقات تكافلية محددة مع النباتات، ويعزز PGPBنمو النبات مباشرة عن طريق تسهيل الحصول على الموارد، أو تعديل مستويات هرمون النبات، أو بشكل غير مباشر عن طريق خفض التأثيرات المثبطة لمختلف الضغوط الحيوية واللاحيوية (Consentino *et al.*,2022)

ومن أهم بكتريا PGPB جنسAzospirillum ،وذلك لقدرته الكبيرة على تصنيع الهرمونات النباتية، والمركبات الأخرى مثل (حمض الإندول ٣ الخليك الأكسينات والسيتوكنين وحمض الساليسيليك) (Pedraza et al., 2020)، مما يؤدي إلى زيادة في نمو النبات من خلال عدة اتجاهات، الأول منح النباتات القدرة على تحمل الضغوط الحيوية واللاحيوية مثل (الملوحة والجفاف)،والثاني تؤثر الهرمونات على نمو الجذور مما يحسن امتصاص الرطوبة والمواد الغذائية (Perez and Casas,2005).

كما أن لبعض سلالات Azospirillum القدرة على إذابة الفوسفور غير العضوي، والتخلص من المعادن الثقيلة (Turan *et al.*, 2012)فيما يتميز جنس Azospirillum بقدرته على المكافحة البيولوجية لمسببات الأمراض النباتية من خلال عدة آليات مثل الحد من توافر الحديد لمسببات الأمراض النباتية، وصنع مجموعة من المستقلبات الثانوية التي تزيد من مقاومة النبات للعدوى (Fukami *et al.*, 2016) ،إلا أن أهم فائدة لجنس Azospirillumهي قدرته الكبيرة على تثبيت الآزوت من الغلاف الجوي.

يقول أحد الفلاسفة:" على الرغم من أن الكائنات النباتية تسبح في بحر من الآزوت وذلك لاعتبار أن٤/٥ الغلاف الجوي يشكلها الأزوت، فإن هذه الكائنات تعاني من الجوع الآزوتي، لأن نسبة ضئيلة من الآزوت في البيئة هي متاحة للنبات"، يتم تثبيت كمية كبيرة من الآزوت الجوي بوساطة الأحياء الدقيقة التي تقوم بتحويله الى صور قابلة للامتصاص من قبل النبات (NO_3 –NH_4) (بوعيسى وأخرون،٢٠٠٨)، حيث يوجد مجموعتان من الميكروبات التي لها القدرة على تثبيت الآزوت الجوي هما: الأولى الميكروبات المثبتة للآزوت تعايشياً ، لا يمكنها تثبيت الآزوت الحر إلا عندما تكون متعايشة مع النباتات، لأنها تعتمد على النباتات لمدها بالمجهود اللازم لنشاطها مثل الجراثيم من جنس Rhizobium وجنس Frankia وجنس Bacillus، والثانية الميكروبات المثبتة للآزوت الجوي الحرة، وتوجد بحالة حرة في التربة وتقوم بتثبيت الآزوت الجوي، وتعتمد على نفسها في الحصول على مصدر الطاقة، ويتم ذلك بوساطة البكتريا من جنس الأزوتوباكتر Azotobacter والأزوموناس Azomonass و البيارنكيا Beijernckia والأزوسبيريللم Azospirillum والكليبسيلا Klebssella وغيرها(كبيبو،٢٠٠٤).

تتلخص عملية تثبيت الآزوت الجوي التي يقوم بها جنس Azospirillum وفق المعادلة الآتية: (علم الأحياء المجهرية في التربة والمياه ، ١٩٨٧)

$$N \equiv N + 2H \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} HN$$

$$= NH + 2H \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} H2N - NH2 + 2H \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} 2NH3 + 2H$$

آزوت ثنائي الآمايد هيدرازين أمونيا

وبالتالي عند إتحاد الأمونيا الناتجة مع أحماض عضوية يتكون أحماض أمينية.

$$NH3 + Glutamate \xrightarrow{\text{تمثيل حيوي}} \text{amino acids} \rightarrow Protein$$

تحتاج عملية اختزال الآزوت الجوي NH_3 إلى طاقة ومصدر هذه الطاقة هو ATP (Adenosine Triphosphate)الذي يتحول إلى ADP (Adenosine Diphosphate) ويستطيع Azospirillum تثبيت الآزوت بمعدل وسطي ٣٩ كغ N /هكتار/عام، والتي تعادل حوالي ٢٠% من الكمية الإجمالية الممتصة من الآزوت من قبل النبات(ألكسندر،١٩٨٢).

أهمية البحث:

يعد عنصر الآزوت من العناصر الغذائية الأساسية الكبرى التي يحتاجها النبات، كونه يدخل في بنية البروتينات والأحماض النووية والإنزيمات والكلوروفيل والفيتامينات وغيرها من المواد الهامة، إلا أن وجوده بشكل متاح للنبات قليل جدا، وتكمن كميته الكبرى في الغلاف الجوي، ومن هنا تبرز أهمية عمل الميكروبات المثبتة للآزوت لتوفيره على شكل شوارد قابلة للامتصاص من قبل النبات.

أهداف البحث:

١-عزل وتصنيف البكتريا المثبتة للآزوت لا تكافليا من تربة منطقة سقوبين في محافظة اللاذقية.

٢-دراسة كفاءة هذه العزلات في تثبيت الآزوت الجوي لا تكافليا في التربة.

طرائق البحث ومواده:

جمع العينات:

جمعت عينات التربة من ثلاثة مواقع في منطقة (سقوبين) خلال العام (٢٠٢١) م بطريقة المغلف البريدي بوزن ١ كغ من عمق (0-٣٠) سم بوساطة أداة حادة معقمة ، ثم خلطت مع بعضها ونخلت على منخل قطره (٢)مم، وأخذت منها عينة مركبة وضعت في أكياس بولي إيثيلن، وكتب عليها المعلومات بقلم رصاص ونقلت إلى المختبر لإجراء التحاليل اللاحقة عليها (Neill, *et al.*, 2007)

التحاليل الفيزيائية والكيميائية

.١

.٢

.٢.١

.٢.٢

.٢.٣

.٢.٤

١-تقدير الرطوبة

أُخذ(10) غرام من العينات، ووضعت في الفرن على درجة (105) درجة مئوية حتى ثبات الوزن، وحسبت الرطوبة وفق المعادلة الآتية: (FAO, 1980)

$$\text{الرطوبة \%} = \frac{\text{وزن العينة قبل التجفيف} - \text{وزن العينة بعد التجفيف}}{\text{وزن العينة قبل التجفيف}} \times 100$$

٢- التحليل الميكانيكي للتربة

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على قياس كثافة معلق التربة، عند أزمنة مختلفة بوساطة الهيدرومتر، إذ تتغير كثافة المعلق المتجانس مع الزمن، نتيجةً لترسّب الحبيبات الفردية بسرعة تتناسب مع أحجامها. (Gupta, 2000)

وذلك باستخدام محلول الغالغون تركيزه (50) غ/ل يحتوي على ميتا هكسا فوسفات الصوديوم كمادة مفرقة.

و أخذ (50) غرام من التربة الجافة هوائياً، والمنخولة بغربال قطر ثقوبه (2) مل، ووضعت في بيشر بسعة (600) مل، ثم أضيف (5-6) مل من الماء الأكسجيني لأكسدة المادة العضوية، وأضيف (150) مل من الماء المقطر، و(٥٠) مل من محلول الغالغون، وتركت إلى اليوم التالي، خلط المزيج المُعامل بمحلول الغالغون بخلاط كهربائي لمدة (10) دقائق، نقل المعلق إلى سلندر سعة (1000) مل، وأكمل حجم المعلق بالماء المقطر حتى (1000) مل، ترك المعلق حتى تتوازن درجة حرارته مع درجة حرارة الغرفة (20-25) درجة مئوية، أدخل الغطاس إلى العينة وتم التحريك إلى أعلى وأسفل لخلط المحتويات كلياً بشكل جيد، وذلك لتحريك الراسب أسفل السلندر ولمدة (20) دقيقة، وضع الهيدرومتر في العينة وأخذت القراءة بعد (40) ثانية، ويرمز لها بالرمز ($R40_S$)، ثم بعد ساعتين ويرمز للقراءة الرمز ($R2_h$).

طريقة الحساب $\%(\boldsymbol{silt+clay}) = \frac{(\boldsymbol{R40_S - R_L})}{\boldsymbol{wt}}$ $\%\boldsymbol{clay} = \frac{(\boldsymbol{R2_h - R_L})}{\boldsymbol{wt}}$

$\%\boldsymbol{sand} = \mathbf{100} - (\%\boldsymbol{silt} + \%\boldsymbol{clay})$ $\%\boldsymbol{silt} = (\%\boldsymbol{silt} + \%\boldsymbol{clay}) - \%\boldsymbol{clay}$

٣-تقدير المادة العضوية بطريقة ولكي وبلاك

قُدرت المادة العضوية، عن طريق أكسدتها تحت ظروف مثالية، بكمية زائدة من ثاني كرومات البوتاسيوم، وبوجود حمض الكبريت وفق المعادلة الآتية:(FAO, 1980)

$$2K_2Cr_2O_7 + 3C + 8H_2SO_4 \longleftrightarrow 2K_2SO_4 + 2Cr_2(SO_4)_3 + 3CO_2 + 8H_2O$$

ثم حُسبت كمية ثاني كرومات البوتاسيوم الفائضة بالمعايرة بسلفات الحديدي بوجود مشعر الفروئين وفق المعادلة

$$K_2Cr_2O_7 + 6FeSO_4 + 7H_2SO_4 \longleftrightarrow Cr_2(SO_4)_3 + 3Fe_2(SO_4)_3 + K_2SO_4 + 7H_2O$$

وحسب الفرق بين حجم كبريتات الحديدي اللازمة لمعايرة الشاهد، وحجم كبريتات الحديدي اللازمة لمعايرة العينة لتحديد عدد ميلي مكافئات ثاني كرومات البوتاسيوم التي قامت بأكسدة الكربون، وهي مساوية لعدد ميلي مكافئات الكربون في العينة.

وذلك باستخدام محلول ثاني كرومات البوتاسيوم ($K_2Cr_2O_7$) بتركيز (1) نظامي، محلول سلفات الحديدي ($FeSO_47H_2O$) بتركيز (1) نظامي، مشعر الفروئين، حمض الفوسفور (80)%، ماء ثنائي التقطير، حمض الكبريت المركز.

وُزِنَ (0.5) غرام من العينة، ووضعت في أرلينة مخروطية سعة (250) مل، أضيف إليها (5) مل من محلول ثاني كرومات البوتاسيوم ذو تركيز (1) نظامي، و (10) مل حمض الكبريت المركز وحركت المخروطية جيداً.

تُرك المعلق لمدة (15) دقيقة، في حال ظهور لون زيتي غامق (دليل وجود محتوى عالي من المادة العضوية)، تمّ مضاعفة كمية ثاني كرومات البوتاسيوم وحمض الكبريت المضاف للعينة، وذلك لأن حجم ثاني كرومات البوتاسيوم المضاف في هذه الحالة يكون غير كاف لأكسدة الكربون العضوي في العينة، أغلق المخروط بإحكام وتركت العينة

حوالي (30) دقيقة، ويمكن تركها لليوم التالي، وبعدها أضيف (100) مل من الماء المقطر، وبعدها (10) مل من حمض الفوسفور المركز وذلك لتوضيح لون المعايرة، أضيف (3–4) نقاط من دليل الفروئين وحركت جيداً، وتم المعايرة بعد ذلك بإضافة محلول سلفات الحديدي حتى ظهور اللون الأحمر القرمزي، وسجّل الحجم اللازم للمعايرة.

تم اتباع نفس الخطوات لتحضير عينة الشاهد وأخذ الحجم اللازم للمعايرة.

يتم التفاعل الكيميائي بهذه الطريقة وفق المعادلة الآتية:

$$2H_2Cr_2O_7 + 3C + 6H_2SO_4 \longrightarrow 2Cr_2(SO_4)_3 + CO_2 + 2H_2O$$

تتفكك ثاني كرومات البوتاسيوم بوجود حمض الكبريت وينطلق الأكسجين، والذي يتفاعل مع الكربون العضوي ليشكل غاز ثاني أكسيد الكربون، وتأكسد هذه الطريقة حوالي (77) % من الكربون العضوي.

حُسبت المادة العضوية من العلاقة الآتية:

$$\text{المادة العضوية} = \frac{(B-A)*\text{عيارية كبريتات الحديدي}*3*100*100*100}{77*0.5*58*1000}\mathbf{100}\ \text{غرام/غرام}$$

A: حجم محلول سلفات الحديدي اللازم لمعايرة الشاهد.

B: حجم محلول سلفات الحديدي اللازم لمعايرة العينة.

3: الوزن المكافئ للكربون في تفاعل أكسدته إلى غاز ثاني أكسيد الكربون.

0.5: وزن العينة.

77/100: فعالية الأكسدة.

58/100: تحويل من الكربون العضوي إلى المادة العضوية.

بعد حساب نسبة المادة العضوية، حسبت نسبة الكربون باعتبار أن نسبته تساوي (58)% من المادة العضوية، ومن الممكن إلغاء عامل التحويل من معادلة الحساب السابقة (FAO, 1980).

٤–تقدير البوتاسيوم المتاح

المبدأ العام للتجربة:

يتم استخلاص البوتاسيوم القابل للإفادة بإزاحته من غرويات التربة بمحلول غني بشاردة الأمونيوم، ثم قراءته على جهاز اللهب، حيث يؤدي اللهب إلى تهيج ذرات البوتاسيوم لتصدر أشعة ضوئية يتم قراءة شدتها بحساب مناسب

(Helmke and Sparks (1996); Suarez, 1996; FAO, 2007)

وذلك باستخدام محلول خلات الأمونيوم (١) N (NH_4CH_3COOH) حضر بإذابة ٧٧ غ خلات أمونيوم في لتر من الماء المقطر وضبط pH ليصبح مساوياً ٧ باستخدام حمض الخل محلول أم قياسي: إزبنا ١.٩٠٦٩غ من كلوريد البوتاسيوم المجففة على درجة ١٠٥ مْ لمدة ساعة في أرلنماير سعة ليتر لأكمل بالماء المقطر، يحوي هذا المحلول ١٠٠٠مغ/ل بوتاسيوم. حضر القياسات الآتية من المحلول الأم: (٢٠٠,١٥٠,١٠٠,٨٠,٦٠,٤٠,٢٠) مع/ل وفق القاعدة:

ح×ع=حَ×عَ أي أُخذ على التوالي (٢٠,١٥,١٠,٨,٦,٤,٢) مل من المحلول الأم إلى أرلنمايرات سعة ١٠٠ مل، أكمل الحجم حتى العلامة بمحلول خلات الأمونيوم لزوم تقدير البوتاسيوم الكلي، وبالماء المقطر لزوم تقدير البوتاسيوم الذائب بالماء.

وُزن ١٠ غ تربة جافة منخولة على منخل قطر ثقوبه ٢ مم في أرلنماير مخروطي سعة ٢٥٠ مل، أُضيف ٥٠ مل من محلول أسيتات الأمونيوم، رُجت لمدة نصف ساعة ثم رُشحت، وحسب البوتاسيوم المتاح وفق المعادلة الآتية:

بوتاسيوم مع/كغ= التركيز من المنحني × حجم محلول الاستخلاص/ وزن التربة.

٥-تقدير الآزوت الكلي بجهاز التحليل الآلي

يتم استخلاص الآزوت الأمونياكي المدمص باستعمال محلول غني بشاردة البوتاسيوم، بينما يكفي الماء المقطر لاستخلاص النترات والنتريت (تهمل شاردة النتريت لندرتها في التربة) يقدر الأمونيوم بتقطير بخار الأمونياNH_3 باستعمال MgO كمادة قلوية، ويتم التقاطه باستعمال حمض البوريك، ولتقدير الآزوت المعدني تضاف خلطة ديفاردا لتحويل كافة أشكاله إلى أمونيوم ويقدر الآزوت النتراتي بالفرق بينهما. (Keeney, 1982; Bremner, 1983)

باستخدام محلول كلوريد البوتاسيوم (١)N، أكسيد المغنيزيوم MgO، محلول حمض البوريك H_3PO_3 (٢)%، خلطة ديفاردا(Cu 50: Al 45: Zn 5) ، محلول ($C_4H_{11}NO_3$) (٠.٠١)N، محلول حمض الكبريت (H_2SO_4) N(٠.٠١)

وزن (١٠)غ من عينة التربة وضعت في أرلنماير سعة (٢٥٠) مل، أضيف (٥٠) مل من كلوريد البوتاسيوم (١)N. رُجت لمدة ساعة ثم رُشحت، سحب (٢٠) مل من الراشح إلى أنبوب التقطير الخاص بالجهاز. لتقدير الأمونيوم فقط أضيف (٠.٢) غ من أكسيد المغنيزيوم إلى أنبوب التقطير، ثبت أنبوب التقطير في المكان المخصص لوحدة التقطير، وضع (٥٠) مل من حمض البوريك في وعاء الاستقبال، شغل وحدة التبلايد ووحدة البخار وقطر لمدة ٤ دقائق، تم معايرة حمض البوريك مع المادة المقطرة باستخدام وحدة المعايرة الآلية حتى (pH= 5)، سجل حجم الحمض المضاف كحجم لتقدير الأمونيوم، لتقدير النترات أضيف لنفس أنبوب التقطير(بوجود الراشح المسحوب سابقاً) (٠.٢)غ من خلطة ديفاردا.

وحسب الآزوت كالآتي:

$$\text{الآزوت الأمونياكي مغ/كغ} = \frac{\text{حجم الحمض لمعايرة الأمونيوم *عياريته *حجم المستخلص *الوزن المكافئ للآزوت}}{\text{وزن العينة* الحجم المسحوب}} * \text{معامل الرطوبة}$$

$$\text{الآزوت النتراتي مغ/كغ} = \frac{\text{حجم الحمض للنترات *عياريته *حجم المستخلص *الوزن المكافئ للآزوت}}{\text{وزن العينة* الحجم المسحوب}} * \text{معامل الرطوبة}$$

فيكون الوزن المكافئ للآزوت هو : الآزوت المعدني مغ/كغ= الآزوت الأمونياكي مغ/كغ+ الآزوت النتراتي مغ/كغ

تحضير مستخلص التربة

مزجت عينة التربة جيداً لتحقيق تجانسها بشكل جيد، ثم تم تجفيفها هوائياً، ثم غربلتها بمناخل ذات أقطار(١)مم، ليتم بعدها أخذ (١)غ من التربة وحلت في أرلينة تحوي (٩) مل ماء مقطر معقم مع التحريك المستمر مدة (15) دقيقة، ورُشحت العينة، وأخذ منها بوساطة ماصة معقمه حوالي ١ مل إلى أنبوب يحتوي ٩ مل ماء مقطر معقم، وبذلك تم الحصول على تخفيف (1\10) ثم (1\100)، ثم (1\1000)حتى(١\١٠٠٠٠٠٠٠) ونقل (١)مل من كل أنبوب إلى أطباق بيتري تحوي الوسط المغذي نترينت أغار بمعدل ثلاث مكررات (Merck,, 2007 ; Neill *et al*., 2007 ; Latha, 2012).

زراعة وتصنيف العزلات الجرثومية المثبتة للآزوت الجوي

نقل (١) مل من كل أنبوب يحوي محلول تربة مخفف إلى أنبوب اختبار يحوي وسط مغذي نصف جامد Nfb (Nitrogen free bromothymol) (بروموثيمول خالٍ من النيتروجين) مع حمض الماليك، وماءات البوتاسيوم، وفوسفات ثنائية البوتاسيوم، وكلوريد الكالسيوم، وكلوريد الصوديوم، وكبريتات المغنيزيوم وFe–EDTA ، ومحلول مكون من مزيج من عناصر صغرى هي (كبريتات الزنك والنحاس والمنغنيز ومولیبدات الصوديوم مع حمض البوريك)، وكلوريد الأمونيوم وآغار، وحضنت الأنابيب عند درجة الحرارة (٣٢) درجة مئوية لمدة (٢٤–٤٨) ساعة.(Dobereiner*, et al*., 1976; Mishra and Dadhich, 2010)

عزل البكتريا من جنس Azospirillum

نقل من الأنابيب التي زرع فيها محلول التربة المخفف، وظهر فيها النمو الجرثومي إلى أطباق بيتري تحوي وسط مغذي شبه جامد Nfb ، مضاف لكل (١) ليتر منه بعد التعقيم كمية (١٥) مل من محلول معقم محضر بالنسبة (١:٤٠٠) من صبغة أحمر الكونغو (المكونة من فوسفات ثنائية البوتاسيوم، وكبريتات المغنيزيوم المائية، وكلوريد الصوديوم ومستخلص الخميرة وكلوريد الحديد المائي، وحمض الماليك، وماءات البوتاسيوم والآغار) في الماء المقطر، وذلك بهدف عزل .Azospirillum sp بمعزل عن البكتريا الأخرى المثبتة للآزوت الجوي، وذلك لأن .Azospirillum sp يملك القدرة على امتصاص صبغة أحمر الكونغو دون الأجناس الأخرى المثبتة للآزوت الجوي، والتي تنمو على الوسط المغذي ذاته مع .Azospirillum sp، وحضنت الأطباق في درجة حرارة (٣٢) درجة مئوية مدة (٢٤– ٤٨) ساعة، ثم زرع من كل مستعمرة جرثومية نامية على وسط مغذي جامد قليل الملوحة بطريقة التخطيط للحصول على مستعمرات نقية (Caceres, 1982; Cassán, et al., 2008)

تنميط البكتريا المثبتة للآزوت الجوي اعتماداً على الاختبارات البيوكيميائية وتلوين غرام واختبار النقطة المعلقة

تم دراسة خصائص المستعمرات الجرثومية النامية على الأوساط الزرعية المغذية، وتلوينها بطريقة غرام (Akhter, 2012)، والتعرف على أشكالها تحت المجهر، وإجراء بعض الاختبارات البيوكيميائية لمعرفة مقدرة البكتريا المعزولة على تخمير السكريات (Mac, 2003;)، واعتماداً على دليل بيرجي (Krieg, ١٩٨٤).

كما تم إجراء اختبار الحركة للبكتريا وذلك عن طريق أخذ نقطة من المستعمرات باستخدام الإبرة ذات الحلقة، ووضعناها في وسط غطاء الشريحة الذي سبق ونظفناها ووضعنا الشريحة المجوفة (المقعرة) أمامنا، ثم

بوساطة قضيب زجاجي رفيع سبق غمسه في فازلين وضعنا أربع نقط منه حول تجويف الشريحة، ثم رفعنا الشريحة وقلبناها على غطاء الشريحة بحيث يكون التجويف مواجها للنقطة، ثم أخذنا الشريحة الملصق بها الغطاء، ووضعناها بحيث يكون الغطاء إلى أعلى المجهر وفحصنا بالعدسة الشيئية الكبرى (مدوخ، ٢٠٠٠)

اختبار كفاءة العزلات البكتيرية.sp *Azospirillum* في تثبيت الآزوت الجوي

تم إجراء كفاءة تثبيت N_2 لعزلات Azospirillum في وسط Nfb شبه جامد يحتوي على (٠.٠٥)% من malate كمصدر للكربون. لقحت العزلات في وسط Nfb شبه جامد خال من الآزوت، وحضنت عند ٣٢ درجة مئويةو احتفظ بثلاث مكررات لكل عزلة، وحددت الكمية الكلية لتثبيت N_2 بوساطة جهاز كلداهل، تم هضم بعد ١٠ أيام من الحضانة الوسط المحتوي على العزلات في دورق كلداهل سعة ١٠٠ مل عن طريق إضافة خليط الملح [(نسبة ٥٠: ١٠: ١ من كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4، وكبريتات النحاس $CuSO_4$ والسيلينيوم المعدني)] و٣ مل من H_2SO_4 المركز. بعد عملية الهضم ، تمت إضافة ١٠٠ مل من الماء المقطر وتبريده.

سكبت العينات المهضومة في جهاز كلداهل، وأضيفت ١٠ مل من هيدروكسيد الصوديوم (٤٠) % إلى جهاز التقطير، ثم أضيفت ١٠ مل من كاشف حمض البوريك (٤)% و٣ قطرات من المؤشر المختلط. تم وضع أرلنماير تحت مكثف جهاز التقطير لاستقبال ناتج التقطير، وضع شاهد قياسي يحتوي حمض كلور الماء HCl ، ومعايرة ناتج التقطير مع الشاهد بحمض كلور الماء، وحسبت نسبة الآزوت في العينة كالآتي:

$$Percentage\ of\ N2\ in\ the\ sample = \frac{Sample\ titer - Blank\ titer}{Sample\ wt.\ in\ g\ X\ 1000} X\ Normality\ of\ HCl\ X\ 14\ X\ 100$$

(Kanimozhi and Panneerselvam, 2010)

النتائج والمناقشة

نتائج التحاليل الفيزيائية والكيميائية للتربة المدروسة

بينت نتائج التحاليل الفيزيائية والكيميائية على التربة المدروسة أنها ذات بنية رملية طينية كما هو موضح في الجدول (١)

الجدول (١): التحاليل الفيزيائية والكيميائية للتربة المدروسة

العامل المدروس	القيمة
pH	7.77
Ec (ميليموس/سم)	1.05
المادة العضوية %	2.46
N المعدني (PPM)	12
P المتاح (PPM)	37
K (PPM)	342
كربونات الكالسيوم	٥٦
الكلس الفعال	١٦
نوع التربة حسب مثلث القوام	طينية

نتائج عزل البكتريا المثبتة للآزوت الجوي:

تم الحصول على البكتريا المثبتة للآزوت الجوي من طبقة التروبسفير للتربة من منطقة سقوبين وتوافق هذا مع دراسة Lakshmi وآخرين (٢٠٠٧)، ودراسة Attitalla وآخرين (٢٠١٠) حيث تم عزل بكتريا مثبتة للآزوت الجوي من تربة زراعية في كلا الدراستين.

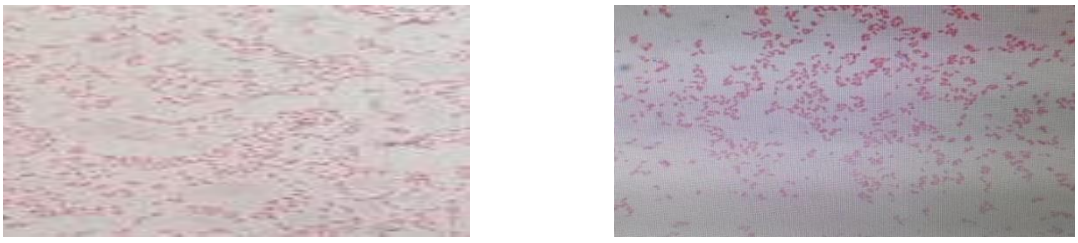
حيث نمت المستعمرات البكتيرية على الوسط المغذي نصف الجامدNfb على شكل مستعمرات جرثومية بيضاء حبيبية الشكل تحت السطح العلوي للوسط ، وظهرت المستعمرات البكتيرية المثبتة للآزوت الجوي على الوسط المغذي بوجود صبغة أحمر الكونغو التابعة للجنس *Azospirillum*، حيث ظهرت بعض المستعمرات بلون أبيض مائل إلى الأصفر الفاتح، وبعضها بلون أحمر تدرج من الفاتح إلى الغامق وذلك حسب كمية صبغة أحمر الكونغو التي امتصتها البكتريا، وذلك باختلاف النوع البكتيري النامي على هذا الوسط المغذي، وتوافقت هذه النتيجة مع دراسات عدة باحثين الباحث Fukami وآخرين(2018a)، (2018b) والباحث Fukami وآخرين(2016)، حيث تم في هذه الدراسة تنميط عزلتين بكتيريتين رمز لها كالآتي: العزلة البكتيرية الأولى (A)، والعزلة البكتيرية الثانية (B)،

تصنيف العزلات الجرثومية:

تظهر نتائج الجدول (٢) الخصائص الشكلية ودراسة حركة العزلات التي تم الحصول عليها من عينات التربة في منطقة سقوبين في محافظة اللاذقية.

الجدول(٢) الخصائص الشكلية واختبار الحركة

	العزلة A	العزلة B
الشكل	قضيب منحني	عصية لولبية الشكل
الحركة	متحركة	متحركة
السياط	قصيرة	مجموعة إحداها قطبي التموضع
تلوين بصبغة غرام	سالبة	سالبة
تلوين بأحمر الكونغو	أحمر فاتح	أبيض مائل للأصفر



(A) (B)

الشكل (١) الخصائص الشكلية للعزلة الأولى (A)والعزلة الثانية (B) بعد التلوين بصبغة غرام.

الجدول (٣)تبعاً للاختبارات البيوكيميائية:

	العزلة A	العزلة B
الغلوكوز	+	+
اللاكتوز	+	+
الفركتوز	+	+
المانيتول	+	+
الرافينوز	+	+
السكروز	−	+
الكزيلوز	−	+
الأرابينوز	−	+
إنتاج كبريتيد الهيدروجين	−	−
إسالة الجيلاتين	−	+
إنتاج الأندول	−	−
إنتاج الحمض	−	−
إنتاج اليوريا	+	+
السيترات	+	+
الأوكسيداز	+	+

يظهر الجدول (٣) نتائج الاختبارات البيوكيميائية للعزلات والتي على أساسها تم تنميط العزلات إلى:العزلة الجرثومية (A) هي *Azospirillum lipoferum*، وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة Hungria وآخرين (٢٠١٠)، حيث تم في الدراسة تنميط العزلات البكتيرية *A.lipoferum* اعتماداً على الاختبارات البيوكيميائية.

كما تبين نتيجة الاختبارات البيوكيميائية أن العزلة البكتيرية (B) هي *Azospirillum halopraferens*، وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة Vijayalakshmi وMahadeva(٢٠١٩) حيث تم تنميط العزلة البكتيرية اعتماداً على الخصائص البيوكيميائية.

نتائج اختبار العزلة البكتيرية الأكثر كفاءة في تثبيت الآزوت الجوي:

بينت النتائج أن العزلة البكتيرية الأكثر كفاءة في تثبيت الآزوت الجوي هي التي تم عزلها من تربة سقوبين وهي العزلة البكتيرية *A. lipoferum* حيث بلغت كمية الآزوت التي ثبتتها (١١.٣) مغN/غ، تلاها العزلة البكتيرية و *A. halopraferens* وبلغت الكمية المثبتة من الآزوت الجوي (٦.٥) مغN/غ.

وقد توافقت هذه الدراسة مع دراسة Kanimozhi وPanneersel (٢٠١٠) مع تفوق نتائج دراسته على نتائج الدراسة الحالية من حيث قدرة العزلات البكتيرية *A. lipoferum* و*A. halopraferens* على تثبيت الآزوت الجوي، والتي بلغت القيمة (١٥.٦) و (١١.٣) مغN/غ للعزلات البكتيرية على التتالي.

الاستنتاجات:

– عزل وتصنيف سلالتين من البكتريا المثبتة للآزوت الجوي لا تكافليا من التربة وهما *A. lipoferum* ، *A. halopraferen* .

– بلغت نسبة الآزوت الجوي المثبتة من قبل البكتريا A. lipoferum (١١.٣) مغN/غ والبكتريا halopraferens.A (٦.٥) مغN/غ.

– بينت التحاليل الفيزيائية والكيميائية للتربة المدروسة في منطقة سقوبين بأنها ذات بنية رملية طينية.

التوصيات:

١– متابعة دراسة الجراثيم بهدف استكمال تصنيف الأنواع المحلية، والتعرف على مدى التنوع الحيوي في الترب السورية مع التركيز على الأنواع ذات الأهمية الاقتصادية والبيئية.

٢– تطبيق عمليات التسميد الحيوي.

المراجع:

١. ألكسندر، مارتن. ١٩٨٢ . *مقدمة في ميكروبيولوجيا التربة. الطبعة الثانية. منشورات جون واليلي وأولاده*

٢. بوعيسى، عبد العزيز؛ زيدان، علي؛ علوش، غياث؛ خليل، نديم(٢٠٠٨) *خصوبة التربة والنبات*. منشورات جامعة تشرين

٣. *علم الأحياء المجهرية في التربة والمياه*.(١٩٨٧) منشورات جامعة الأنبار.

٤. كبيبو، عيسى(٢٠٠٤) *كتاب علم الأحياء الدقيقة*. منشورات جامعة تشرين.

٥. مدوخ، حمدي(٢٠٠٠) *القسم العملي لمقرر الأحياء الدقيقة*. الجامعة الإسلامية –غزة. ص ٢٤–٢٥.

1- Akhter md. S, hossain sj, hossain ask, datta rk. (2012). *Isolation and characterization of salinity tolerant Azotobacter sp*. Gr. J Biol. Sci. 2(3):043-051

2- Attitalla Ih, Abobaker Ma, Muftah An, Amir Hg, Latiffah Z, Hasnah Mj. (2010). *Occurrence and microbiological characteristics of Azospirillum strains associated with leguminous and non leguminous plants in Al jabal Al Akhdar eco-Region*, Libya. American Eurasian J Agric. Environ. Sci. 8(6):617-62

3- Bremner, j.m. And g.a. Breitenbeck. (1983*). A simple method for determination of ammonium in semimicro-Kjeldahl analysis of soils and*

plant materials using a block digester. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 14: 905–913.

4- Caceres, e. A. R., (1982*). Improved Medium for Isolation of Azospirillum spp.* Applied and Environmental Microbiology, 44(4): 990-991

5- Cassán, f. V. Sgroy, d. Perrig, o. Masciarelli and v. Luna. (2008). *Phytohormone production by Azospirillum spp. physiological and technological aspects of plant growth promotion*. In Azospirillum spp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina, 2008; 61-86.

6- Consentino, Beppe; Aprile, Simona; Rouphael, Youssef; Ntatsi, Georgia(2022*) Application of PGPB Combined with Variable N Doses Affects Growth, Yield-Related Traits, N-Fertilizer Efficiency and Nutritional Status of Lettuce Grown underControlled Condition*. Agronomy 2022, 12, 236. https://doi.org/10.3390/agronomy12020236

7- Dobereiner, j., Marriel, i. E., and Nery, m. (1976*). Ecological distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck. Can. J. Microbia*l. 22: 1464-1473

8- FAO. (1980). *Soil testing and plant analysis* (No. 38/1). Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

9- FAO. (2007). *Methods of analysis for soils of arid and semi arid regions*. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

10- Fukami j, Abrantes jlf, Delcerro p, Nogueira ma, Ollero fj ,Megías m, Hungria m. (2018a). *Revealing different strategies of quorum msensing in Azospirillum brasilense strains* Ab-V5 and Ab-V6. Arch Microbiol 200:47–56.

11- Fukami J, Cerezini P, Hungria M. (2018b). *Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. AMB Express* 8:73.

12- Fukami J, Nogueira Ma, Araujo Rs, Hungria M. (2016). *Accessing inoculation methods of maize and wheat with Azospirillum brasilense.* AMB Express 6:3.

13- Glick, B.R.(2012*) The enhancement of plant growth by freeliving bacteria.Microbiology.* Vol. 2, 2004, P. 123-140.

14- Gupta, P.K. 2000. *Soil, plant, water and fertilizer analysis. Agrobios (India), Jodhpur,* New Delhi, India. p.438

15- Helmake,W P.A. and Sparks. (1996*). Lithium, sodium, potassium, rubidium, and cesium*. p. 551-574. In: Methods of Soil Analysis: Part 3, (eds. Sparks, D.L. et al.), SSSA and ASA, Madison.

16- Hungria M, Campo Rj, Souza Em, Pedrosa Fo. (2010*). Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil.* Plant Soil 331:413– 425. https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0

17- Kanimozhi, k; Panneerselvam, a. (2010*). Studies on isolation and nitrogen fixation ability of Azospirillum spp. Isolated from Thanjavur district. ISSN*: 0976- 8505. CODEN (USA) CSHIA 5. Pelagia Research Library. Der Chemica Sinica, 1(3): 138-145.

18- Keeney, d.r. And d.w. Nelson. (1982*). Nitrogen in organic forms. In: Methods of Soil Analysis, Part 2, (Eds. Page, A.L., R.H. Miller and D.R.*

*Keene*y), Agronomy No. 9, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 643–698.

19- Krieg N.R And J.Doberenier.(1984).*Genus Azospirillum, Bergey's Manual of systematic Bacteriology,1*:94-104

20- Lakshmi nr, Rafi mm, rao Rvb, Charyulu Pbbn. (2007). *Population and nitrogen fixation by Azospirillum spp*. isolated from the rhizosphere of foxtail millet. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences. 9(3):515-518.

21- Latha, r. And kalaivani, r. (2012). *Bacterial Degradation of Crude Oil Gravimetric Analysis. Department of Microbiology*. Pela Research Library Advaces in Applied Science Research. 3(5): pp 2789-2795.

22- Mac Faddin, J. (2003*). Biochemical tests for the identification of clinically important bacteria* , Ed . Medical Panbamericana, pp. tests. 850.

23- Merck. (2007*). "Microbiology manual," 12th Edition*, pp. 1-169, Merck Publications, Darmstadt, Germany.

24- Mishra, b. K; Dadhich, s. K., (2010*). Methodology of Nitrogen Biofertilizer Production. J.* Adv. Dev. Res., 1(1): 3-10.

25- Neill, m.; Ouinones,a.;Ackerman,l. (2007*).Wastewater Sampling: Operating Procedure. U.S*. Environmental Protection Agency Svience and Ecosystem Support Division Athens, Georgia.

26- Pedraza, Raúl; Filippone, María; Fontana, Cecilia(2020) *Azospirillum. Beneficial Microbes in Agro-Ecology, First Edition*, 2020, 73e105

27- Perez j. And m. Casas. (2005*). Study of the interaction plant Azospirillum in sugarcane(Saccharusp.)*CropAvailablein:http://www.redalyc.org/pdf/1932/193216160002.pdf.

28- Suarez,W D.L. (1996). *Beryllium, magnesium, calcium, strontium, and barium*. In: Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods (Eds. D.L. Sparks et al.), SSSA Book Series No. 5, SSSA and ASA, Madison, WI, pp. 575–602.

29- Turan M, Gulluce M, von Wirén N, Sahin F (2012) *Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey*. J Plant Nutr Soil Sci 175:818–82.https://doi.org/10.1002/jpln.201200054

30- Vijayalakshmi Nr And Mahadeva Swamy. (2019). *Morphological and biochemical characterization of Azospirillum isolates from rhizoplane of foxtail millet [Setaria italica* (L.). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8(1), 114-118