مجلة الزراعة العراقية (البحثية) مجلد 20 عدد1 ص. 48-54 .تموز/2015

عزل وتشخيص البكتريا المثبتة للنايتروجين الجوي لاتعايشيا(*Azospirillum*) من بعض ترب جنوبي العراق وكفاءتها في تثبيت النتروجين الجوي

عبدالمهدي صالح الانصاري زينب كاظم حسن عبدالزهرة طه ظاهر

الملخص

تم عزل وتشخيص عشر عزلات من البكتريا المثبتة للنايتروجين الجوي لاتعايشيا من جذور نباتات مختلفة من الحنطة ،الشعير والطماطة النامية في مناطق مختلفة من جنوب العراق .واعتماداً على مفاتيح التشخيص الخاصة بينت النتائج بان العزلات البكتيرية جميعها تتبع لجنس ***Azospirillum*** والنوع ***lipoferum***. اختلفت كفاءة العزلات المدروسة في قابليتها على تثبيت النتروجين الجوي (فعالية انزيم النيتروجنيز) وتراوحت كمية النتروجين المثبتة مابين **112.19**و**803.07** نانومول.مل$^{-1}$. ساعة$^{-1}$ وبينت الدراسة اختلاف كفاءة انزيم النتروجينز باختلاف العزلات ضمن الجنس والنوع الواحد للعزلات الموجودة في جذور النبات الواحد

المقدمة

يعد عنصر النيتروجين اكثر العناصر اهمية في برامج التسميد لان النبات يحتاجه بكميات عالية اكثر من بقية العناصر. يشارك النتروجين في بناء جزيئة الكلوروفيل وبناء البروتينات والانزيمات لكثير من التفاعلات الحيوية في النبات (7).يتعرض النتروجين في التربة الى عدد من التفاعلات مثل غسل النترات او تطاير الامونيا او التثبيت، اضافة الى عملية عكس النترجة مما يؤدي الى فقد كمية كبيرة من النتروجين التربة اذ اظهرت نتائج عدد كبير من الدراسات بان كفاءة السماد النتروجيني تكون تقريباً **50%** (**11**). مما يتطلب اضافة جرعات عالية من الاسمدة النتروجينية وبصورة مستمرة الى الترب الزراعية لرفع قدرتها الانتاجية وبعدها اضافة تكاليف مالية على المزارعين وما يرافقه من اثر سلبي في البيئة . لذا اتجهت الابحاث الحديثة الى التقليل من اضافات الاسمدة النتروجينية باستعمال وسائل تؤدي الى زيادة كفاءة السماد المضاف للتربة دون التاثير في انتاجية النبات .

تعد طريقة التسميد الحيوي **(Biofertilization)** التي تتم من خلال إضافة لقاحات حيوية مع الأسمدة الكيميائية إحدى الطرق الممكن استعمالها لهذا الغرض وهي طريقة شائعة لاستعمال في كثير من الدول مثل الهند وأمريكا وروسيا (**13**و**22**). ومن اللقاحات الحيوية عزلات بكتيرية ذات قدرة تخصصية عالية في تجهيز النبات بالنتروجين وذلك عن طريق تثبيت النتروجين الجوي من قبل البكتريا. تعد بكتريا ***Azospirillum*** من الاحياء المجهرية المهمة التي يمكنها العيش بصورة مترابطة (**association**) مع جذور النباتات النجيلية وغير النجيلية (**17**) التي يمكن استخدامها لقاحاً بكتيرياً يعمل على تثبيت النتروجين الجوي للنباتات اوقيامها بافرازبعض الهرمونات ومنظمات النموالتي تعمل على تحسين تطور وامتداد المجموع الجذري وبعدها زيادة سعة الامتصاص للعناصر الغذائية مثل الفوسفور والبوتاسيوم (**18**). اشارت الدراسات الى ان تلقيح المحاصيل ببكتريا***Azospirllum*** ادى الى زيادة الانتاج الكلي بنسبة **41%** قياساً بالمعاملة غير الملقحة (**5**) .كما اظهرت نتائج **Yadav** وجماعته (**22**) ان تلقيح نباتات ببكتريا ***Azospirllum*** ادى الى تقليل كمية السماد النتروجيني المضاف الى **50 %** دون التاثير في انتاجية النبات ونظراً لقلة الدراسات الخاصة بعمل التلقيح الحيوي وعمله في زيادة الانتاج في العراق بصورة عامة وفي

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني.

كلية الزراعة– جامعة البصرة– البصرة ، العراق.

تاريخ قبول ابحث: آذار/**2013**.

تاريخ تسلم البحث:ك$_1$/ **2013**.

المنطقة الجنوبية بصورة خاصة لذا اجريت دراسة مفصلة لعزل وتشخيص البكتريا المثبتة للنتروجين الجوي لاتعايشياً من مناطق مختلفة من جنوب العراق وأثرها في نمو النباتات. لهذا هدفت الدراسة إلى :

1- عزل وتشخيص البكتريا المثبتة للنتروجين لا تعايشياً من جذور نباتات نامية في ترب مناطق مختلفة من جنوب العراق.

2- دراسة كفاءة هذه العزلات في تثبيت النتروجين الجوي لا تعايشيا بالتربة.

المواد وطرائق البحث

عزل وتشخيص البكتريا المثبة للنايتروجين الجوي

جمعت نماذج ترب الرايزوسفير وجذور نباتات الطماطة والشعير والحنطة من مناطق تختلف بخواصها الكيميائية والفيزيائية والبايلوجية في محافظتي البصرة والناصرية جنوبي العراق ،عزلت البكتريا المثبة للنايتروجين الجوي من جذور النباتات استخدام الوسط الزرعي الشبه صلب الخالي من النتروجين (NFB) حسب الطريقة الموصوفة من قبل Dobereiner و Krieg (15) ثم شخصت باستخدام مفاتيح التشخيص الموضحة في جدول (1).

جدول 1: مفاتيح تشخيص العزلات البكتيرية

الصفة المدروسة	المصدر
التحميض والتخميرالهوائي واللاهوائي للكلوكوز	Kreig and Dobereiner (15)
اختزال النترات والقيام بعمليةعكس النترجة	Smibert and Kreig(19)
النمو في وسط congo red media(RC) بوجود صبغةالمثيل الاحمر	Smibert and Kreig(19)
الحاجة للبايوتين	Tarrand et . al (20)
انتاج انزيم الكاتليز	Harrigand and McCane(12)
انتاج انزيم الاوكسيديز	Smibert andKreig (19)
استخدام المصادرالكربونية	Kreig and Dobereiner(15)
تكون السبورات	الحديثي (1)
الحركة	الحديثي (1)
الحفظ والادامة	الحديثي (1)
النموبوجود 3%كلوريدالصوديوم	Kreig and Dobereiner(15)

قياس كفاءة إنزيم النتروجينز

استخدم وسط NFb شبه صلب الخالي من مصدر نيتروجيني وصبغة البروموثايمول الزرقاء ووزع في قناني زجاجية وبمعدل 7مل لكل قنينة عقمت القناني ثم لقحت بعزلات مختلفة من البكتريا المثبة للنتروجين وبكثافة ضوئية مقدرها 0.85. أغلقت القناني بواسطة أغطية مطاطية محكمة بعدها حضنت القناني الملقحة وغير الملقحة (مقارنة) في 30مْ لمدة 48 ساعة، وحقنت القناني بواسطة محاقن خاصة بغاز الاستلين بمعدل 10% من الطور الغازي وحضنت على 30مْ لمدة ساعتين.

قدر الاثيلين الناتج من اختزال الاستلين في النماذج بأخذ 0.2مل من الغاز الخليط داخل القناني بواسطة محاقن طبية حجمها 0.5مل وحقنت داخل جهاز الكروموتوغرافي الغازي (Gas chromotography) (21).

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص البكتريا المثبة للنايتروجين االجوي

تم عزل عشر عزلات من البكتريا المثبة للنتروجين الجوي لا تعايشيا من داخل أنسجة جذور النباتات (وذلك بتعقيم الجذور سطحياً ثم هرسها) المأخوذة من المحاصيل في المناطق المختلفة (جدول2)، وتم تشخيصها من خلال الصفات المجهرية والمظهرية والكيموحيوية للعزلات المدروسة المبينة في جدول (3).

جدول 2: العزلات التابعة لجنس*Azospirillum* ومنطقة ومصدر العزلة

العزلات	مصدر العينة	منطقة العزل
A_1	جذور نباتات الحنطة	ناصرية– شطرة
A_2	جذور نباتات الحنطة	ناصرية– شطرة
A_3	جذور نباتات الشعير	حقل كلية الزراعة– جامعة البصرة
A_4	جذور نباتات الشعير	حقل كلية الزراعة– جامعة البصرة
A_5	جذور نباتات الشعير	حقل كلية الزراعة– جامعة البصرة
A_6	جذور نباتات الشعير	حقل كلية الزراعة– جامعة البصرة
A_7	جذور نباتات الحنطة	ناصرية– شطرة
A_8	جذور نباتات الطماطة	البصرة– الزبير
A_9	جذور نباتات الشعير	ناصرية– البدعة
A_{10}	جذور نباتات الشعير	ناصرية– البدعة

جدول 3. بعض الصفات المجهرية والمظهرية التشخيصية لعزلات جنس ***Azospirillum***

الصفة أو الإختبار	الملاحظات
ظروف التثبيت	قليلة التهوية **Micro aerophilic**
لون المستعمرات على وسط **RC** الحاوي على صبغة الكونغو الحمراء	احمر
التفاعل مع صبغة كَرام	–
فحص إنزيم الاوكسديز	+
فحص إنزيم الكاتليز	+
شكل الخلايا	عصوية منحنية قليلاً **Vibroid**
حركة الخلايا	حركة ثاقبة الفلين
اختزال النترات NO_3^- الى النتريت NO_2^-	∓
Denitrification	∓
النمو في **7,5 pH**	+
النمو في **6 pH**	∓
النمو في **3% NaCl**	+
النمو على وسط **RC** بوجود صبغة المثيل الأحمر	+
لون المستعمرات في وسط **NA**	وردي فاتح
شكل الخلية في وسط **NFb** الحاوي على **0,005%** مستخلص الخميرة	متعددة الأشكال طويلة وعريضة متحركة
تحميض سكري كلوكوز والفركتوز هوائياً	+
تخمير سكري كلوكوز والفركتوز لاهوائياً	+
شكل المستعمرة على وسط **RC** بوجود صبغة الكونغو الحمراء	ذات حافة ملساء تتمركز الصبغة وسط المستعمرة
استخدام المصادر الكربونية	
D-sorbitol و **D-ribose** و **D-manitol**	+
D-trehalose و **Lactose** و **Maltose** و **Sucrose**	–
D-glucose	+
D-fructose	+
Lactate و **Succinate** و **Malate** و **Pyruvate**	–
الحاجة للبايوتين	+

تميزت العزلات بأنها خلايا عصوية ضمية الشكل (Vibrioid) ذات حركة تموجية (Vibratory) تشبه حركة ثاقبة الفلين في الوسط السائل وتميزت بقابليتها على تثبيت النتروجين في الوسط الزرعي شبه الصلب الخالي من النتروجين (NFb) مكونة نمواً غشائياً رفيعاً (Pellicle) ابيض اللون تحت سطح الوسط الزرعي بمسافة من 1–1.5سم، يأخذ النمو بالارتفاع نحو الأعلى ليصل بعد 48 ساعة من الحضن عند 30مْ الى 2–3 ملم تحت السطح. ولوحظ أن البكتريا لها قابلية على التثبيت الجوي تحت ظروف التهوية القليلة (Microaerophilic) إذ تغير لون الوسط NFb الحاوي على صبغة البروموثايمول الزرقاء من الأخضر الفاتح عند pH 6.8 الى الأزرق القاعدي. اصطبغت المستعمرات النامية على وسط RC الحاوي على صبغة الكونغو الحمراء باللون الأحمر ومن خلال الصفات المجهرية والمظهرية والكيموحيوية لهذه العزلات تبين بأنها تابعة لجنس*Azospirillum* والنوع *Lipoferum* وحسب ماجاء في 14، 15) للبكتريا المعزولة من العينات المأخوذة من قطع جذور النباتات .

أشار Khammas وجماعته (14) الى أن الترب العراقية تحتوي على عزلات مختلفة من بكتريا الازوسبيرولم ومنها *A.lrakense* و *A.brasilense* و *A.halopraeferms* *Kاضافة الى* ***A.lipeform***. وذكر Baldani (6) ان بكتريا ***A.lipeform*** *تفضل جذور نباتات* الحنطة والشعير والذرة الصفراء والبيضاء والدخن، وان وجود بكتريا ***A.lipeform*** داخل أنسجة الجذر للمحاصيل المختلفة يشير الى مدى ملائمة بعض الظروف داخل أنسجة الجذر المشجعة لنمو هذه البكتريا مقارنة بعدم توفر مثل هذه الظروف في تربة الرايزوسفير (9) . وقد تصل نسبة بكتريا الازوسبيرولم داخل أنسجة الجذر الى أكثر من 5% من الأعداد الكلية للبكتريا في المنطقة الجذرية. و يعزى ذلك الى وجود عنصري الطاقة والكاربون اللازمة لنمو وبقاء هذه البكتريا (8). أشار NIIR (16) بان بكتريا الازوسبيرولم المعزولة من الأنسجة الداخلية لخلايا الجذور لمحاصيل مختلفة مثل الحنطة والشعير والذرة الصفراء والدخن لها قابلية عالية على تثبيت النتروجين مع توفر الظروف الملائمة لنموها من حرارة والـ pH وتهوية ومصدر كاربوني.

كفاءة انزيم النتروجينز (تثبيت النتروجين الجوي)

يبين جدول (4) فعالية إنزيم النتروجيز معبراً عنها بكمية الاثيلين المنتج من اختزال الاستلين. تظهر النتائج بان العزلات تختلف فيما بينها في قدرتها على تثبيت النتروجين. تراوحت كمية الاثيلين المنتج ما بين 112.19 و 803.07 نانومول مل$^{-1}$ساعة$^{-1}$ للعزلتين A_4 و A_3 على التوالي، التي تشير الى ان العزلة A_3 المأخوذة من قطع جذور نبات الشعير المزروع في حقل كلية الزراعة– كرمة علي هي الأكثر كفاءة في تثبيت النتروجين الجوي مقارنة بالعزلات الأخرى.

أظهرت نتائج الدراسة (2) أن كمية الاثيلين المنتج من العزلات العالية الكفاءة تقريباً من 622– 2314 نانومول اثيلين مل$^{-1}$ساعة$^{-1}$ والمتوسطة الكفاءة تقريباً من 17–467 نانومول اثيلين مل$^{-1}$ساعة$^{-1}$ بينما منخفض الكفاءة اقل من 10 نانومول اثيلين مل$^{-1}$ساعة$^{-1}$من الوسط الزرعي. وتتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه Al-Maadhidi (4)، إذ ذكر أن كفاءة عزلات بكتريا الازوسبيرولم تقسم الى ثلاث مستويات تشمل عالية الكفاءة ومتوسطة الكفاءة وقليلة الكفاءة اعتماداً على كمية الاثيلين المنتج. ووجدت المنصور (3) أن العزلات البكتيرية لجنس ***Azospirillum*** مختلفة في كفاءتها لتثبيت النتروجين الجوي، إذ تراوح معدل كمية الاثلين الناتجة بين 30.9 و 304.9 نانومول مل$^{-1}$ساعة$^{-1}$. وذكر El-Komy (10) أن التلقيح ببكتريا ***A.lipoferm*** أعطى كمية من الاثلين تتراوح بين 5.6 نانومول غم$^{-1}$ساعة$^{-1}$ عند عدم التلقيح بالبكتريا و26.4نانومول غم$^{-1}$ساعة$^{-1}$ للمعاملات الملقحة ببكتريا ***A.lipoferm*** وأضاف أن كفاءة بكتريا ***Azospirillum*** تتأثر وبشدة في منافسة بقية الأحياء المجهرية القريبة. كما

تظهر النتائج إختلاف كفاءة العزلات في تثبيت النتروجين الجوي وكذلك إختلاف الكفاءة ضمن الجنس الواحد والنوع للعزلات الموجودة في جذور النبات نفسه (الجدولان 2 ، 4)

جدول 4. فعالية إنزيم النيتروجنيزلعزلات بكتريا *Azospirillum*بطريقة اختزال الاستلين

العزلات	كمية الاثيلين الناتج (نانومول. مل$^{-1}$ ساعة$^{-1}$)
A_1	128.82
A_2	259.45
A_3	803.07
A_4	112.19
A_5	167.82
A_6	176.79
A_7	222.19
A_8	165.72
A_9	398.75
A_{10}	223.11

المصادر

1- الحديثي، هديل توفيق (1983). الكتاب العملي في اساسيات علم البكتريا، مطبعة جامعة البصرة.

2- ظاهر، عبد الزهرة طه (2001). استجابة نبات الذرة الصفراء (*Zea mays* L.) للتلقيح بعض أنواع بكتريا (*Azospirillum brasilense*) المعزولة محلياً. أطروحة دكتوراة، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

3- المنصور، كاظمية جواد عبد الله (2009). تأثير التلقيح بعزلات بكتريا الازوسبيرولم *Azospirillum spp.* المحلية في نمو وإنتاج الشعير (*Hordeumvulgare* L.) في محافظة البصرة. رسالة ماجستير ، كلية الزراعة، جامعة البصرة.

4- Al-Maadhidi, J.F. (1989). Proposed soil classification at the series level for Iraqi soils. Alluvial soils. Baghdad. Univ., Coll. of Agric. Tech. Bul. No.2.

5- Anjum, M.R.; N.M. Sajjad; A. Qureshi; Lqbal and Jar Mahmud and A. R. –VL- Hasan (2007). Response of cotton to plant growth promot: Rhizobacteria (PGPR) inoculation under different of Nitrogen. J. Agr. Res. 8.

6- Baldani, V.L. and J. Dobereiner (1980). Host-plant specificity in the infection of cereal with *Azospirillum spp*. Soil Biol. Biochem., 12: 433-439.

7- Barker, A.V. and G.M. Bryson (2007). Nitrogen. IN:Barker, A.V. and D.J. pilbeam(eds Hand book of plant nutrition.CRCpress.USA.PP.21-50.

8- Bashan,Y,(1986) .Aginate beeds as synthetic inoculants carriers for the slow release of bacteria that affeet plant growth . Appl . Environ Microbial . 51 : 1089 – 1098 .

9- **Dobereiner, J. and J.M. Day (1976). Associative symbioses in trobical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. Proc. Ist. Int. Symp. N2-Fixation. Edited by W. E. Newton and J. Nyman Washington state University Press, Pullman. pp : 518-538.**

10- **El-Komy, H.M. (2005). Coimmobilization of *Azospirillum lipoferm*and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and Nitrogen nutrition of wheat plants. J. Food. Technol. Biotechnol. Vol. 43(1): 19-27.**

11- **Finck, A. (1992). Fertilizer and their efficiency use In: IFA, 19.**

12- **Harrigan, W.F. and M.E. MeCane (1966). Laboratory .Methods. in microbaiology acad . Press , London and New York**

13- **Jagadeesha, V. (2008). Effect of organic manure and biofertilizers on growth, seed yield and quality in tomato (*Lycopersiconesculentum*Mill). Megha. Thesis submitted to Unv. Agri. Sci. Dharwed, 580005**

14- **Khammas, K.M.; E. Ageron; P.A. Grimont and P. Kaiser (1989). *Azospirillumirakensesp*. Nov. Anitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140: 679-693.**

15- **Krieg, N. R. and J. Dobereiner (1984). Genus *Azospirillum* in : Krieg, N. R. and Holt, J. G. (eds.). Bergy's Manual of systematic bacteriology, vol. I. pp, 94-104. William and Wilkins, Baltimore London.**

16- **NIIR, National Institute of Industerial Research. 106-E, Kamla Nagar, Delhi-110007 (India).**

17- **Okon, Y.; E. Falik; S. Sarig; E. Yahelom and S. Tal (1988). Plant growth promoting effect of *Azospirillum*. In: Bothe, H., DeBagn, F. J. and Newton W. E. (eds.). Nitrogen Fixation, Hundred year after. pp: 741-746. Gaster fisher, Stuttgar**

18- **Ramos, H.J.; L.D. Rancoto-Maccari; E.M.; Souza; J.R. Soares-Ramos; M. Hungria and F.O. Pedrosa (2002). Monitoring Azospirillum wheat interaction using the gfp and gus genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. J. Biotechnology, 97: 243-252.**

19- **Smibert, M.R. and N. Krieg (1981) .General characterization. In : Gerhardt p., Murry, R.G.E, Costilow, R.N., Nester, E.W.,woodP; W. A Krieg; N.R. and Phillips, G.P.(eds) Manual of Methods for general bacteriology. pp:409–443. American Soc. for miero. Washington. D.C**

20- **Tarrand, J.J.; N. R. Krieh and J. Dobereiner (1978). A taxonomic study of the spirillum lipoferm group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species *Azospirillum* lipoferm (Beijerink) Comb. Nov and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. Can. J. Microbiol, 24: 967-980.**

21- **Turner, G.L. and A.H. Gibson (1980). Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In: Bergerser, F. J. (ed.). methods for evaluating biological nitrogen fixation, pp: 111-138. John Willey and Sons Ltd. Chiohester, New York.**

22- **Yadav, S.; Y. Juhi and G.S. Samuel (2011). Performance of Azospirillum for improving growth, yield and yield Attributing characters of Maize (*Zea mays*) in presence of nitrogen fertilizer, Res. J. Agr. Sci., 2(1): 139- 141.**

Iraqi J. Agric Res. Vol.20 No.1 pp. 48-54 July/ 2015

ISOLATION , IDENTIFIEATION AND ACTIVITY OF NON ASYMBIOTIE N-FIXING BACTERIA (*Azospirillum*) INHABITED ROOTS OF SOME PLANTS GROWN IN SOUTH OF IRAQ

A. S. Alansari Z.K.Hasan A.T. Thaher

ABSTRACT

Ten isolates of nitrogen fixing bacteria were isolated from roots of wheat,barley and tomato grown in different areas in south of Iraq. Isolated bacteria were puried then identified .Results indicated that all isolates belong to *Azospirillum* genus and *Lipoferum* species .Nitrogenase activity differs for all isolates ranged from 112.19 to 803.07 nmole .ml-.hr-. highest activity were associated with isolate A3 while the lower activity was associated with isolate A4 . Results showd that difference efficiency in nitrogenase activity for different isolates with in genus and species habited same plant

Part of Ph.D. thesis for the second author.
College of Agric. – Basrah Univ. – Basrah, Iraq.