استخدام طريقة اختزال الاسيتيلين لتشخيص بكتريا ازوتوبكتر معزولة من ترب عراقية واستخدامها سماداً حيوياً

مهدي صالح ياسر العتابي وفاء سلمان علي العبيدي

الملخص

عزلت إحدى عشرة عزلة بكتيرية من مناطق مختلفة من العراق. شخصت بالطرق الكيمياحياتية والمظهرية إضافة إلى تشخيصها بطريقة اختزال الاسيتيلين ووجد إن أربع عزلات كانت من النوع ***Azotobacter chroococcum*** وقد وصلت كمية غاز الاثيلين المنتج إلى 7900 نانومول/ساعة. مللتر، وستة منها من النوع ***Azotobacter vinelandii*** وصلت كمية غاز الاثيلين المنتج إلى 7450 نانومول/ساعة. مللتر، استبعدت العزلات العشرة الحدية لعدم مطابقتها لصفات البكتريا المطلوبة. أخضعت العزلات جميعاً إلى تجربة أصص لدراسة تأثيرها في نبات الذرة البيضاء السكرية، كل ثلاثة نباتات لاصيص، إذ أظهرت العزلة ***Azotobacter vinelandii*** تأثيراً متميزاً في الأخريات فقد ازدادت نسبة البروتين في المجموع الخضري للنبات بعد ثلاثين يوماً من الزراعة إلى 114,7% عند المقارنة بالسيطرة السالبة.

المقدمة

يعد جنس ***Azotobacter*** من أشهر الأجناس ضمن عائلة **Azotobacteraceae** وهو من أحياء التربة غير التعايشية مع النبات المثبتة الناتروجين وقد عرفت هذه البكتريا بأنها ذات عمل إيجابي كبير في الزراعة في المناطق المعتدلة فبالإضافة إلى فعلها في تثبيت الناتروجين الجوي فقد وجد إنها تنتج مواداً محفزةً للنمو والمضادات الحياتية وتزيد مقاومة النباتات للأمراض. لقد أثبتت التجارب الحقلية على محصول الذرة الصفراء والقطن إن استخدام بكتريا ***A. chroococcum*** كسماد حيوي أدى إلى زيادة في الحاصل إلى 71.7% (11)، وأدى إلى زيادة في محتوى فيتامين C في محصول الطماطم (2). ان انزيم النايتروجينيز **Nitrogenase** هو المسؤول عن عملية تثبيت النايتروجين وذو قابلية لاختزال غاز الاسيتلين C2H2 الى غاز الاثيلين C2H4 (12) إذ بقيت هذه الظاهرة تستخدم بشكل واسع لتقدير فعالية هذا الانزيم لحساسيتها العالية وكلفتها المنخفضة. وقد تضمن البحث عزل وتشخيص أنواع هذه البكتريا من الترب العراقية إذ استخدمت طريقة اختزال الاسيتيلين في هذه الدراسة لغرض تشخيص العزلات وتحديد الأكفأ منها في إنتاج أنزيم النايتروجينيز. كما درست فعاليتها في تثبيت الناتيروجين الجوي في تجربة أصص وقياس نسبة الناتيروجين في المجموع الخضري للنبات.

المواد وطرائق البحث

العزل

أخذت عينات تربة بعمق يتراوح بين 20-0 سم من حقول زراعية لمناطق مختلفة من محافظتي بغداد ونينوى/ العراق وتركت لتجف في درجة حرارة الغرفة ومعرضة لتيار من الهواء، ثم تمت تنقية العينات من الجذور النباتية والأجزاء العالقة الأخرى بواسطة منخل ذو فتحات 4 ملم. أخذ 10 غرام من كل أنموذج تربة ونقل إلى 90 مللتراً من

الهيئة العامة للنخيل-وزارة الزراعة-بغداد، العراق.

الماء المعقم في دورق مخروطي وبعد الرج لمدة خمس دقائق، عملت تخافيف عشرية عدة لعالق التربة مع الماء المقطر المعقم حتى التخفيف الثاني (8).

نقل1 مللتر من كل تخفيف إلى الوسط المغذي السكروز- أملاح معدنية **Sucrose- Mineral Salts (SMS)** (1) وبدرجة حموضة للوسط المغذي **7.2** الموزع في أنابيب اختبار بواقع **9** مللترات من الوسط معقمة بالموصدة تحت درجة **121** م وضغط **15** باوند.أنج$^{-1}$ وبثلاثة مكررات لكل تخفيف.

حضنت أنابيب الاختبار تحت درجة **28** م لمدة **3-2** أيام ثم أجري الكشف عن بكتريا ***Azotobacter*** بملاحظة تكون غشاء بني رائق في الأنابيب الموجبة. حضرت أطباق من الوسط المغذي السكروز- أملاح معدنية الصلب **Sucrose-Mineral Salts Agar (SMSA)** استخدمها في العزل والتنقية وحساب المحتوى الميكروبي للمواقع المختارة.

الاختبارات الكيموحياتية

1-جرى اختبار النمو في وسط **Litmus Milk** واختبار تحلل الجيلاتين والنمو على وسط (77) السائل والصلب حسب ماذكره **Gimmestad** وجماعته (5) وملاحظة النتائج بعد مرور **1-4** أيام. تم اختبار النمو على الوسط المعامل بالفينول **0.1%** والنمو في تركيز **NaCl 1%** حسب (14،16) حيث نميت العزلات البكتيرية على الوسط الزرعي **SMS** السائل والوسط الزرعي **SMSA** الصلب الذي يحتوي على **0.1%** فينول لمدة **1-4** أيام تحت درجة حرارة **28** م يلاحظ تكوين العكرة في الوسط السائل وظهور المستعمرات على الوسط الصلب دليلاً على قدرة البكتيريا على النمو. كما جرى اختبار النمو على وسط بيرك المعدل (14) لغرض الحصول على عزلات نقية من البكتريا ***Azotobacter vinelandii***.

2-اختبار مقاومة العزلات للمضاد الحيوي **Streptomycin**-استخدم المضاد الحيوي بتركيز**200** مايكرو غرام/مل كمحلول خزين، واخذ منه التراكيز التالية (5، 10، 15، 20) مايكرو غرام/مل ويكمل الحجم بواسطة الوسط السائل المعقم ليصل الحجم النهائي **10** مل. لقحت الأنابيب الحاوية على المضاد الحيوي بالتراكيز المذكورة بواسطة **1**مللتر من العزلات البكتيرية وبكثافة ضوئية **0.85** على طول موجي **500** نانومتر وتحضن بدرجة **35** م ولمدة **48** ساعة، ثم يلاحظ حصول نمو بكتيري.

تؤخذ الأنابيب ذات أقل تركيزاً من المضاد الحيوي الذي لم يظهر فيه نمو وهو التركيز المثبط الأدنى (**MIC**) ويؤخذ منه **1** مللتر وينشر على الوسط المغذي الصلب **SMSA** وتحضن بدرجة**35** م ولمدة **72** ساعة **(13)** .

اختبار اختزال الأسيتلين

استخدم وسط شبه صلب خالي من النايتروجين مع صبغة البروموثايمول الزرقاء،(تحضر من **0.5** غم صبغة مذابة في**100** مل **0.2** مولاري **KOH**). وزع الوسط في قناني زجاجيه بكمية **7** مل/قنينة وعقم بالموصدة، لقحت القناني الحاوية على الوسط المعقم بالعزلات البكتيرية وبثلاثة مكررات لكل عزلة وذلك بإضافة **1**مل/قنينة وبكثافة ضوئية **0.85** على طول موجي **500** نانومتر. حضنت القناني الملقحة بدرجة **30** م ولمدة **48** ساعة مع السيطرة السالبة.

بعد ملاحظة النمو البكتيري إستبدلت السدادات القطنية بأخرى مطاطية محكمة الغلق ثم حقنت هذه القناني بغاز الأسيتلين وبمعدل **10%** من حجم الطور الغازي، ثم حضنت بدرجة حرارة **30** م لمدة ساعتين. بعدها تم حقن الاثيلين القياسي بتركيز **200** جزء بالمليون بجهاز **Gas Chromatography**، قدر الاثيلين المتكون نتيجة اختزال

الأسيتلين في النماذج الحاوية على بكتيريا *Azotobacter* وذلك بحقن 0.2 مل من الغاز الخليط في كل واحدة من القناني وحسبت كمية الاثيلين الناتج بالنانومول/ساعة. مل (12).

وسط الحفظ

يتكون هذا الوسط من 1 غم ببتون، 0.5 غم خلاصة الخميرة، 0.5 غم كلوريد الصوديوم، 1.5غم أكار، 100 مللتر ماء مقطر ويعدل الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 7.0 (16).

زراعة الأصص

تم تنفيذ تجربة زراعة الذرة البيضاء السكرية باستخدام العزلات البكتيرية الإحدى عشرة لغرض تلقيح البذور بها قبل الزراعة لاختبار كفاءة العزلات في تثبيت النايتروجين الجوي واختيار الأكفأ منها، وقد صممت التجربة بطريقة الألواح المنشقة تامة التعشية وبثلاثة مكررات، تم استخدام 36 أصيص حاوي على 1كغم تربة مزيجية مغسولة ومعقمة بالموصدة لمدة 3 ساعات وتحت درجة 121م مضاف لها سماد الناتيروجين على شكل نترات الامونيوم بواقع 200 ملغرام/ أصيص.

أخذت بذور الذرة السكرية صنف Rex معقمة بالكحول 70% ووزعت على اثني عشر طبقاً بترياً معقماً وغمرت محتويات كل طبق بعالق إحدى العزلات البكتيرية الاحدى عشرة لمدة خمس دقائق لغرض تشبيع البذور بالبكتيريا بعدها غمرت البذور بمحلول السكروز 10% لمدة 15 دقيقة وأزيلت البذور لتجف تحت تيار الهواء في الظل، أما الطبق الثاني عشر فقد كان للسيطرة غير الملوثة بالبكتيريا.

زرعت البذور المعاملة في الأصص بطريقة الوسادة (9) وبواقع خمس بذور لكل اصيص. وسقيت بالماء بنصف السعة الحقلية (100) مللتر لكل منها وتركت في البيت الزجاجي لمدة 20 يوماً، خفت النباتات إلى ثلاثة نباتات لكل أصيص.

تقدير البروتين

تم حساب نسبة البروتين الكلي في المجموع الخضري بطريقة كلدال Micro -Kjeldahl (3).

تعداد البكتيريا

تم حساب البكتريا الموجودة في المنطقة المحيطة بالجذور أو الملتصقة بها أو البكتيريا الداخلة في الجذور

1-بأخذ غرام واحد من التربة المحيطة بالجذور وعمل تخفيف بالمحلول الملحي الفسيولوجي من 10^{-3} إلى 10^{-6}وزرعت على وسط غذائي صلب ملائم لنمو بكتيريا *Azotobacter* هو SMSA وقرئت النتائج بعد أربعة أيام من الحضانة تحت درجة 28م.

2-ولغرض تعداد البكتيريا الملتصقة بالجذور غسلت الجذور بالماء المقطر المعقم بلطف لإزالة التربة الملتصقة بها ووضع غرام واحد منها في حوجلة حاوية على10 مللتر من المحلول الفسيولوجي المعقم وتم تحريكه بشدة بواسطة محرك مغناطيسي لمدة نصف ساعة ثم أخذ مللتر واحد من المحلول وزرع بالطريقة السابقة نفسها.

3-أخذت الجذور المغسولة وهرست بالمحلول الفسيولوجي المعقم وأخذ المحلول الناتج وزرع بالطريقة السابقة نفسها.

النتائج والمناقشة

أوضحت النتائج في جدول (1) إن التربة المستخدمة للعزل كانت ذات محتوى ميكروبي من بكتيريا *Azotobacter* بحدود 100- 1000 خلية/غرام تربة إذ ازداد العدد في منطقة نينوى عن منطقة بغداد وذلك ربما

يعود أما لزيادة المحتوى العضوي للتربة أو لملائمة درجات الحرارة لهذا النوع من البكتيريا إذ تعد هذه البكتيريا من الأحياء المجهرية واسعة الانتشار في المناطق المعتدلة والاقل تلوثاً (6).

جدول 1: مواقع عزل بكتيريا *Azotobacter SPP.* من التربة والمحتوى الميكروبي لها

موقع العزل	عدد البكتيريا المعزولة
حقل حنطة / نينوى	$10^3 \times 1.9$
حقل شعير / نينوى	$10^3 \times 1.2$
حقل جت / نينوى	$10^2 \times 6$
حقل ذرة صفراء / بغداد	$10^2 \times 4$
حقل قطن / بغداد	$10^2 \times 3$

عزلت إحدى عشرة عزلة بكتيرية على الوسط الزرعي الانتخابي SMS السائل والصلب إذ أظهرت صفات مزرعية ومظهرية مطابقة لصفات بكتيرية *Azotobacter SPP.* (4، 14) إذ إن ظاهرة تعدد الأشكال من الصفات المميزة لجنس *Azotobacter* (10).

يظهر جدول (2) نتائج الاختبارات الزراعية التي أجريت على العزلات لمطابقة الصفات مع جنس *Azotobacter* ومن هذه الصفات إن البكتريا تنمو في تركيز 1% بزوات الصوديوم، وتركيز 1% كلوريد الصوديوم، وتركيز 0.1% فينول والنمو في وسط بيرك إذ يمكن أن تكون هذه الصفات مميزة لأغراض تشخيص أجناس هذا النوع من البكتيريا إضافة للنمو في وسط الحليب وقابلية تحلل الجيلاتين (14).

جدول 2: الاختبارات التشخيصية لبكتيريا *Azotobacter* المعزولة محلياً من التربة

رقم العزلة	Litmus milk	Gelatin hydrolysis	النمو في 1% Phenol	النمو في 1% NaCl	النمو في 1% Na benzoate	النمو في وسط بيرك
1	+	+	+	+	−	+
2	+	+	+	−	+	−
3	+	−	+	+	−	+
4	−/+	−	−	−	−	+
5	−	−/+	+	+	+	−
6	−	−/+	+	+	+	−
7	−	−	+	+	+	−
8	+	+	+	+	−	+
9	+	+	+	+	−	+
10	−	−	+	+	+	−
11	−	−	+	+	+	−

(+) نمو كثيف (+/−) نمو ضعيف (−) لا يوجد نمو.

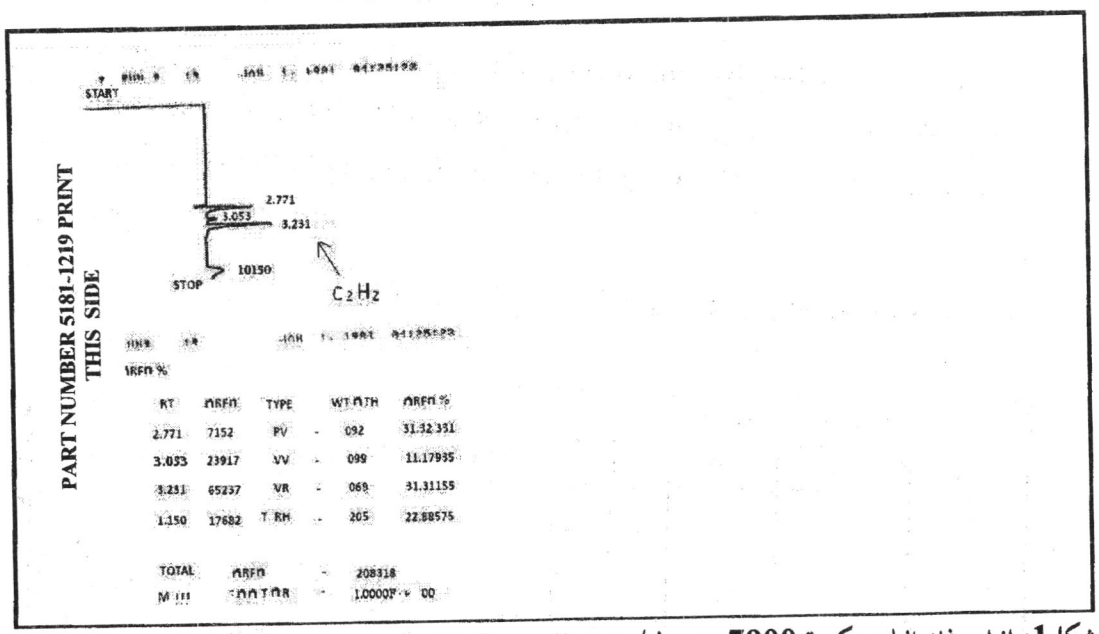
أظهرت النتائج من مجموع ماتم عزله انها تتضمن ست عزلات من النوع *A. vinelandii* واربعة من النوع *A. chroococcum* وقد أشار Thomson وSkerman (16) إلى إن هذه البكتيريا هي الوحيدة من أفراد جنسها التي تستطيع النمو بتركيز 1% بزوات الصوديوم بدرجة حموضة 8–9 وتنمو في تركيز 0.1% فينول، وقد يعود ذلك إلى تركيب الجدار الخلوي والقدرة الفسيولوجية التي تمتلكها للحد من سمية بعض المركبات الحلقية وتستخدمها في مساراتها الايضية كمصدر للكاربون.

ان تعريض العزلات إلى تراكيز مختلفة من المضاد الحيوي **Streptomycin** لغاية تركيز **20** مايكرو غرام (جدول3) حسب **Sindhu** وجماعته (13) بينت ان العزلات جميعها مقاومة للتركيز **5** مايكرو غرام وأظهرت العزلة **11** حساسية متوسطة في التراكيز الأعلى (20،15،10) لهذا المضاد الحيوي، وقد اهملت العزلة (4) لعدم تطابقها مع صفات العزلات الاخرى.

جدول 3: اختبار مقاومة عزلات بكتيرياً **Azotobacter** المعزولة محلياً للمضاد الحيوي **Streptomycin** وفحص اختزال الاستيلين

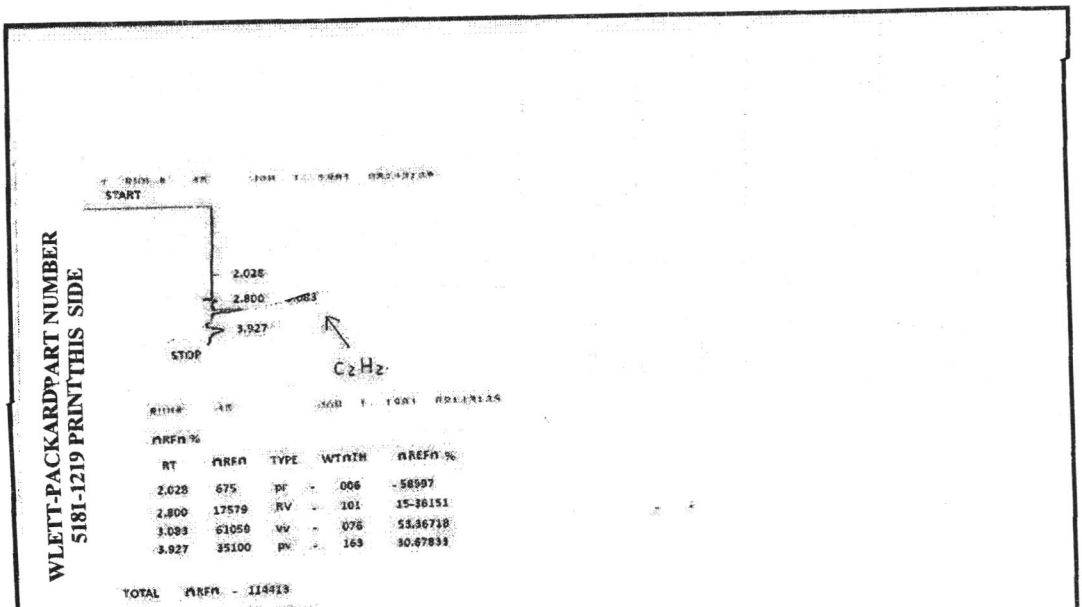
رقم العزلة	التشخيص	كمية الاثيلين الناتج nmole/h.ml	تركيز المضاد الحيوي µl/ml			
			5	10	15	20
1	*A. chroococcum*	5100	+	+	+	+
2	*A. vinelandii*	4400	+	+	+	+
3	*A. chroococcum*	5050	+	+	+	+
4	*BACTERAL STRAIN*	4900	+	−/+	−/+	−/+
5	*A. vinelandii*	3250	+	+	+	+
6	*A. vinelandii*	4100	+	+	+	+
7	*A. vinelandii*	3800	+	+	+	+
8	*A. chroococcum*	4700	+	+	+	+
9	*A. chroococcum*	7900	+	+	+	−/+
10	*A. vinelandii*	7250	+	+	+	+
11	*A. vinelandii*	7450	+	+	−/+	−/+

كما يتضح من جدول (3) قابلية العزلات البكتيرية على تثبيت النايتروجين الجوي وذلك من خلال قابليتها على إختزال الاستيلين إلى اثيلين وتحدث هذه العملية أثناء اختزال النايتروجين وذلك بفعل أنزيم **Nitrogenase** الناتج من البكتيريا أثناء العمليات الحيوية، وقد تفوقت العزلات الثلاث (9، 10، 11) على باقي العزلات في كمية الاثيلين المنتج.



شكل1: انتاج غاز اثيلين بكمية 7900 نانومول/ساعة مللتر من العزلة **A. chroococcum** المزروعة على وسط خالي من مصدر النايتروجين.

شكل2: انتاج غاز اثيلين بكمية 7450 نانومول/ساعة مللتر من العزلة **A. vinelandii** المزروعة على وسط خالي من مصدر النايتروجين.



زراعة الأصص

تشير النتائج في جدول (4) إلى تفوق العزلة رقم 11 بنسبة زيادة 114.7% من البروتين الكلي مقارنة بمعاملة السيطرة ويلي ذلك تفوق العزلات 1، 2، 3، 7، 9 إذ تراوحت نسبة الزيادة من 14.7% إلى 57.3% فقد كان محتوى الجزء الخضري من البروتين الكلي ذو زيادة واضحة مقارنة بالسيطرة، أما العزلات 5، 6، 8، 10 فقد كانت ذات فعالية منخفضة ومحتوى واطئ من البروتين الكلي في المجموع الخضري وذلك يعود إلى إختلاف كفاءة العزلات المحلية في تثبيت النايتروجين الجوي.

تعداد البكتيريا

لقد وجد أن العدد البكتيري لبكتريا Azotobacter (جدول4) لا يقل عن 10^6 خلية/غرام تربة في التربة المحيطة بجذور الـذرة السكرية بعـد مـرور 30 يومـاً على الـزراعة، وقـد تفـوقت العزلة 9 والمشخصة على إنها *A. chroococcum*، على بقية العزلات إذ وصل العدد البكتيري إلى 1.12×10^7 خلية /غرام تربة وكانت العزلة 11 والمشخصة على إنها *A. vinelandii* ذات كفاءة مماثلة لسابقتها إذ كان العدد البكتيري 1.5×10^7 خلية/ غرام تربة، بينما انخفض العدد إلى 2.7×10^6 خلية/للعزلات 3 و10. كما لم تلاحظ هذه البكتيريا ملتصقة بالجذور أو داخل الجذور وهذا ما يؤيد إن البكتريا المعزولة غير تعايشية ولكنها حرة المعيشة ومثبتة الناتروجين الجوي (6).

جدول4: العدد البكتيري نسبة البروتين في المجموع الخضري لنباتات الذرة البيضاء المعاملة بالبكتيريا Azotobacter

رقم العزلة	التشخيص	العدد البكتيري $\times10^7$/غرام تربة	نسبة البروتين الكلي mg/100g	مقدار الزيادة (%)
السيطرة	–	–	1.22	0.0
1	*A. chroococcum*	0.51	1.4	14.7
2	*A. vinelandii*	0.58	1.57	2.86
3	*A. chroococcum*	0.26	1.66	36
4	*BACTERAL STRAIN*	0.70	1.75	43.4
5	*A. vinelandii*	0.57	1.22	0.0
6	*A. vinelandii*	0.67	0.875	-29
7	*A. vinelandii*	0.89	1.75	43.4
8	*A. chroococcum*	0.60	0.96	-22
9	*A. chroococcum*	1.12	1.92	57.3
10	*A. vinelandii*	0.27	1.05	-14
11	*A. vinelandii*	1.50	2.62	114.7

المصادر

1- الراشدي، راضي كاظم وتاج الدين، منذر ماجد (1988). أحياء التربة المجهرية (العملي). دار الحكمة– جامعة البصرة،العراق.

2- Aiyer, R.S.; G.S. Venkataraman and W.V.B. Sundra Rao (1964). Effect of Azotobacter inoculation on vitamin C content of tomato. Sci. and culture, 30:556-557.

3- Bremner, J.M. and C.S. Mulvaney (1982). Nitrogen-total. P. 595-624. In: A.L. page (ed.), methods of soil analysis Agron. No. 9, part 2: chemical and microbiological properties, 2nd ed., Am. Soc. Agron, Madison, Wisc, U.S.A.

4- Fang, J.; J. Moreno and G.R. Vela (1987). Growth of *Azotobacter vinelandii* on Soil Nutrient. Appl. Environ. Microbiol. 53: 489-494.

5- Gimmestad M.; M. Steigedal; H Ertesvåg; S. Moreno; BE. Christensen; G. Espín; S. Valla (2006). Identification and characterization of an Azotobacter vinelandii type I secretion system responsible for export of the AlgE-type mannuronan C-5-epimerases. J.Bacteriol. 188(15):5551-60.

6- Harunor Rashid KHAN, Md. MOHIUDDIN and M. RAHMAN (2008). Enumeration, Isolation and Identification of Nitrogen-Fixing Bacterial Strains at Seedling Stage in Rhizosphere of Rice Grown in Non-Calcareous Grey Flood Plain Soil of Bangladesh Journal of the Faculty of Environmental Sci. and Tech., 13(1): 97-101.

7- Jensen, H.L. (1965). Nonsymbiotic Nitrogen Fixation. In: W.V. Bartholomew and F.E. Clark (eds.) Soil Nitrogen American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisc. P. 436-480.

8- Martínez-ToledoMV, González-López J, de la Rubia T and Ramos-Cormenzana A (1985). Isolation and characterization of *Azotobacter chroococcum* from the roots of *Zea mays*. FEMS Microbiol.Ecol. 31, 197–203.

9- Owusn,-Bennoah, E. and B. Mosse (1979). Components of VA mycorrhizal inoculum and their effects on growth of onion. New phytol., 87: 355-361.

10- Sadoff, H.L. (1975). Encystment and Germination in *A. vinelandii.* Bacteriol. Rev. P.516-539.

11- Shende, S.T. and R.G. Apte (1982). Azotobacter inoculation as a remunerative input for agricultural crops. Proceeding of national symposium on biological nitrogen fixation, New Delhi, India, pp.532-543.

12- Spiff, E.D. and C.T.I. Odu (1972). Acetylene reduction by Beijerinkca under various partial pressure of oxygen and acetylene. J. General Microbiology, 78,207-209.

13- Sindhu, S.; V. Grover; N. Narula and K Lakshminarayana (1989). Occurrence of multiple antibiotic resistance in Azotobacter chroococcum . Zentralblattfur Mikrobiologie 144(2): 97-101.

14- Tchan, Y.T. and N.B. Peter (1984). Genus Azotobacter. In: Sneath, P.H.; N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. HOH (eds.) Bergey's manual of systematic Bacteriology "Vol. 1 William and Wilkins, P. 219-229.

15- Tejera, N and et al., (2005). Isolation and characterization of Azotobacter and Azospirillum strains from the sugarcane rhizosphere Plant and Soil (2005), 270: 223–232.

16- Thomson, J.P. and V.B.D. Skerman (1979). Azotobacter. The Taxonomy and Ecology of the Aerobic Nitrogen–Fixing Bacteria. Academic Press, London.

USING ACETYLENE REDUCTION FOR IDENTIFICATION OF *Azotobacter* SPP. ISOLATED FROM IRAQI SOIL AND USED AS BIOFERTILIZER

M.S.Y. Alattabi W.S.A. Alobidy

ABSTRACT

Eleven bacterial isolates were collected from different habitats of Iraq. The isolates were diagnosed by biochemical, morphological and acetylene reduction technique. The results indicated that four isolates were *Azotobacter chroococcum* type and have had produced ethylene gas reached to 7900 nomul/hours. However, six isolates are *Azotobacter vinelandii* and produced 7450 nomul/hours ethylene gas. Since, the eleventh sample is not belonging to *Azotobacter* group, it was discarded from the experiment. To study the effect of the ten isolates on the plant, sorghum-sugary (*Sorghum vulgaris)* plant planted on pots were subjected to two bacterial species under study. It was found after 30 days from cultivation that *Azotobacter vinelandii* increased the total protein in the shoots to 114.7% compared with negative control.

Ministery of Agric.-General Board for Date Palm-Baghdad, Iraq.