عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter chrococcum* الأزوتوباكتر وتقييم كفاءة العزلات المحلية والمستوردة في تثبيت النتروجين الجوي*

عبدالزهرة طه ظاهر حسن علي طاهر

قسم علوم التربة والموارد المائية – كلية الزراعة- جامعة البصرة

المستخلص

أجريت تجربة في مختبر الأحياء المجهرية التابع إلى كلية الزراعة جامعة البصرة لإختبار كفاءة عزلات بكتريا الأزوتوباكتر المحلية والمستوردة في تثبيت النتروجين الجوي ، وتضمنت التجربة عزل وتشخيص بكتريا الأزوتوباكتر من ترب رايزوسفير نباتات مختلفة جُلبت من مناطق مختلفة من محافظتي البصرة وذي قار إذ تم الحصول على 12عزلة من خلال عمل تخافيف لهذه الترب ودُرست الصفات الكيموحيوية و المورفولوجية والمجهرية لها وتم مقارنتها بعزلتين حُصل عليهما من كلية العلوم - جامعة ذي قار وعزلة مستوردة(إيطالية المنشأ) ،بينت النتائج أنَّ جميع العزلات تعود للنوع *Azotobacter chrococcum* وأنَّ أعداد بكتريا الأزوتوباكتر تتواجد بوفرة في تربة رايزوسفير النباتات المختلفة المستخدمة في البحث وقد تراوحت أعدادها ما بين (1.1×10^3 - 3.6×10^5) cfuغم تربة$^{-1}$ ، كذلك تراوحت كمية النتروجين المثبتة من قبل بكتريا الأزوتوباكتر في الوسط الزرعي التخصصي مابين (6.53- 19.00) ملغم لتر$^{-1}$.

المقدمة

يُعرف التثبيت الحيوي للنتروجين بأنَّهُ عملية إختزال غاز النتروجين إلى أمونيا بوساطة أحياء التربة المجهرية بدائية النواة يساعدها في ذلك إمتلاكها إنزيم النتروجينيز وبوجود مصدر للطاقةATP وبعض المعادن (Milosevic *et al*., 2012)، يُشكل النتروجين 80%من الهواء الجوي ولايمكن لأغلب الكائنات الحية الإستفادة منهُ بصورتهِ الحرة ، لكن بعض الكائنات الدقيقة المثبتة للنتروجين الجوي قادرة على كسر الاصرة الثلاثية للنتروجين بدرجة الحرارة والضغط الإعتياديين (مخيمر , 2008)، من هذه الكائنات بكتريا *Azotobacter* التي تتبع العائلة Azotobactereacea وتكون أفرادها حرة المعيشة ، هوائية إجبارية متباينة التغذية وتوجد في الترب القاعدية والمتعادلة، ونادراً ماتتجاوز أعدادها10^4– 10^5 خليه غم$^{-1}$

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني كلمات مفتاحية : أزوتوباكتر ، عزل وتشخيص، رايزوسفير ، النتروجين الجوي ،عزلة

تربة جافة(Mishra *et al*.,2013) ، تضم هذه العائلة أجناس (*Azotobacter* و *Azomonas* و*Beijerinckia* وDerxia) واهم جنس فيها هو*Azotobacter* الذي يُعد أول بكتريا هوائية عُزلت من قبل العالم Beijerinck عام 1901 من التربة وتقدر كمية النتروجين التي تثبتها 20 كغم N هكتار$^{-1}$سنة$^{-1}$ (Kizilkaya , 2009)، إذ أنَّها تستفيد من النتروجين في بناء اجسامها وبعد موتها وتحللها ينتقل إلى التربة لتستفيد منهُ النباتات والأحياء الأخرى (Gomare , 2013).

يشتمل جنس *Azotobacter*على الأنواع *A.chrococcum* و *A.beijerinckii* و *A.Vinellandii* و *A.insignis* و *A.agilas* و *A. pasapli* و *A. armeniacus* و*A.nigricane* و *A.salinestris* و *A.macrocytogena* (Wani *et al*. ,2013) ، ويُعد النوعان *A. chrococcum* و*A. Vinellandii* من أكثر الأنواع إنتشاراً في التـــرب العراقيـــــة (مطلوب , 2012) ، وبصورة عامة فإن النوع *A. chrococcum* هو أكثر الأنواع إنشاراً في التربة (kaur,2014) ، وهي سالبة لصبغة كرام وممكن أن تكون متغيرة لصبغة كرام، لها القدرة على إستعمال مصادر كاربونية متعددة والكحولات والأملاح والحوامض العضوية ، بعضها غير متحرك والبعض الأخر يتحرك بواسطة أسواط محيطية أو قطبية لا تنمو في وسط البيتون (Brenner *et al*. ,2004)، خلاياها كبيرة الحجم قطرها 1.3- 2 µm وطولها 5- 10 µm متعددة الأشكال خصوصا في المزارع القديمة , غير مكونة للإبواغ لكنها تكون حويصلات cysts أو كبسولة أو غلاف خارجي سميك slime لمقاومة الحرارة والجفاف والظروف القاسية ، تمتاز بكتريا الأزوتوباكتر بإنتاج الصبغات فالـ *A. chrococcum* تنتج صبغة ذات لون بني وتحتاج هذه البكتريا إلى pH متعادل أو مائل للقاعديـــة ودرجـــة الحرارة الملائمـــة لهـــا (20- 30) مْ (Dhamangaonkar and Misra , 2009) ، وتوجد هذه البكتريا في التربة والمياه وعلى سطوح جذور النباتات وتستفيد من إفرازات الجذور للسكريات والأحماض العضويـــة والأمينيـــــــة والفيتامينـات (Abd El-Fattah *et al*. ,2013) ، يهدف البحث إلى عزل بكتريا الأزوتوباكتر وتشخيصها ومقارنتها مع بعض العزلات المحلية والمستوردة في تثبيت النتروجين الجوي.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات التربة :

جمعت عينات التربة من مناطق مختلفة من محافظتي البصرة و ذي قار إذ أُخذت عينات التربة من منطقة الرايزوسفير لنباتات مختلفة جدول(1) و وضعت في أكياس من البولي اثلين المعقمة بكحول الأثيلي و نُقلت إلى المختبر ووضعت في الثلاجة لحين إجراء العمليات اللاحقة عليها.

جدول(1) مناطق أخذ عينات التربة

ت	المنطقة	نوع النبات
1	ناحية الفهود- ذي قار	حنطة
2	ناحية الحمّار- ذي قار	شعير
3	محطة أبحاث كلية الزراعة جامعة البصرة	شعير
		حندقوق
4	قضاء الزبير- البصره	طماطة
5	قضاء الجبايش –ذي قار	شعير
6	ناحية الإصلاح- ذي قار	حنطة
7	ناحية سيد دخيل- ذي قار	خبّاز
8	قضاء القرنه – البصره	جت

عزل بكتريا الأزوتوباكتر *Azotobacter spp.*

تم عزل بكتريا *Azotobacter* من خلال تحضير تخافيف لعينات التربة بإضافة 10 غم من عينات التربة المختارة إلى 90سم^{3}من الماء المقطر والمعقم في دوارق سعة 250 سم^3 ومزجت جيداً وأُجريت تخافيف متسلسلة لحد 10^{-6} ثم نُقل 1 سم^3 من عالق التربة إلى أنابيب إختبار تحتوي 9 سم^{3}من الوسط السائل الخالي من النتروجين Jensen's media) sucrose mineral salts)المعقم بالمؤصدة وبواقع خمس مكررات لكل تخفيف والموصوف في(Sharma, 2003) وأُخذ أيضا 1سم^3 من تخافيف التربة المحضره أعلاه ولُقحت الأنابيب الحاوية على الوسط (sucrose mineral salts) وبواقع خمسة مكررات لأغراض العد ، حضنت الأنابيب في درجة حراره 28 مْ ولمدة 3-4 أيام بعدها فحصت الأنابيب بملاحظة الغشاء البني المتكون على السطح والذي يُعد مؤشراً إيجابيـــــــــاً لنمو بكتريا الأزوتوباكتـــر وتم عد بكتريا الأزوتوباكتر بطريقـة احتمال العدد الأعظـــم(MPN) (Becking ,1981)، وأُخذ جزء من الغشاء البني

بوساطة الناقل(loop) وخُطط على الوسط sucrose mineral salts الصلب في درجة حرارة 28مْ ولمدة 3-4 أيام وتم دراسة الصفات المظهرية والمجهرية للمستعمرات النامية لغرض تشخيصها ، كذلك تم الحصول على عزلتين لبكتريا الأزوتوباكتر من كلية العلوم جامعة- ذي قار وأُعطيت الرمز (AR1 و AR2) , اما العزلة المستوردة فقد تم الحصول عليها من وزارة الزراعة /الدائرة العامة للبحـوث الزراعية(إيطالية المنشأ) وأُعطيت الرمز(AB).

تنقية بكتريا الأزوتوباكتر :

تم أخذ0.1 سم^3 من الوسط في الأنابيب التي أعطت مؤشراً إيجابيا ونشرت على سطح طبق بتري يحتوي على الوسط الصلب (sucrose mineral salts agar) وحضنت الأطباق على درجة حرارة 28 مْ ولمدة 3-4 أيام وبعد ظهور المستعمرات أُعيد التخطيط ثلاث مرات متتالية لغرض الحصول على عزلات نقية من بكتريا الأزوتوباكتر, ثم حُفظت العزلات على الآكار المائل slant للوسط (sucrose mineral salts agar) ومن ثم حفظت في الثلاجة.

تشخيص بكتريا الأزوتوباكتر:

الصفات الزرعية :

تم تخطيط عزلات بكتريا الأزوتوباكترعلى الوسط الزرعي(sucrose mineral salts agar) وحضنت في 28 مْ لمدة 3-4 أيام وبعد النمو سُجلت الصفات الزرعيـة للمستعمرات الناميـة على الوسط الصـلب والتي تضمنت شكلها ، قطرها ، قوامها ، لونها ومقدرتها على إفراز مواد لزجه وصبغات بعد إسبوعين من النمو (Jimenez *et al*. ,2011).

الصفات المجهرية

تم تخطيط عزلات بكتريا الأزوتوباكتر المشار إليها بالفقرة على شريحة زجاجية(Slide) ثم صُبغت بصبغة كرام وفحصت تحت المجهر لتحديد شكل الخلايا و طريقة تجمعها , وتكوينها للغلاف الخارجي (الحويصلة) cyst وقابليتها على الإصطباغ بصيغة كَرام وحسب ماجاء في(Black ,1965).

إختبار الحركة :

أجري إختبار الحركة للعزلات البكتيرية السابقة بعد تنميتها في وسط سائل (nutrient broth) والمجهز من (شركة LBS mumbai) الهندية وبإستعمال طريقة القطرة المعلقة (Hanging drop) حسب (الحديثي , 1983).

النمو في درجة حرارة (37)مْ

نُميت عزلات بكتريا الأزوتوباكتر على الوسط الزرعي الصلب (sucrose mineral salts agar) لمدة (3-4) ايام بدرجة حرارة (37)ْ م , ويُعد الفحص موجباً عند نمو المستعمـــــرات في الوسط الزرعـــي (Thompson and Skerman ,1979).

النمو في (1%) كلوريد الصوديوم

نميت العزلات البكترية في الوسط الزرعي (sucrose mineral salts) السائل والصلب بعد اضافة 1% من كلوريد الصوديوم له والتحضين لمدة 3-4 ايام حرارة 28 مْ , ويُعد الفحص موجباً عند ظهورالعكارة على الوســـط السائـل وظهور المستعمرات في الوســـط الصلب وحسب (Tchan and Peter,1984) .

النمو في (0.1%) فينول :

نميت العزلات البكترية في الوسط الزرعي (sucrose mineral salts) السائل والصلب الذي اضيف له 0.1% فينـــــول ولمدة 2-3 ايام بدرجة حرارة 28ْم , ويُعد الفحص موجبـــــاً عند تكويـــــن العكارة في الوسط السائل وظهور المستعمرات على الوسط الصلب حسب(Tchan and Peter,1984).

النمو في وسط بيرك (Burk's media)

يستعمل هذا الوسط للتمييز بين أنواع بكتريـــــــا الأزوتوباكتر وقد أُستبـــــــدل فيه المصـــــــدر الكاربونـــــي (sucrose) بـ 10 غم لتر$^{-1}$ من بنزوات الصوديوم ، إذ نُميت العزلات البكتيرية على هذا الوسط لمدة 3-4 ايام وبدرجة حرارة 28 مْ وأن عدم نمو المستعمرات على الوسط دليل على أنها من نوع (*Azotobacter chrococcum*) (Tchan and Peter,1984).

إختبار إستهلاك المصادر الكاربونية المختلفة

تم اختبار مقدرة العزلات البكتيرية على إستغلال مصادر الكاربونية الاتية (Mannitol , Glucose, Fructose , Sucrose , Rhamnose , Citrate) اذ اضيفت بصورة منفصلة (كل سكر أُضيف لوحدهِ) الى وسط السائل(Walksman No 77) وذلك بعد تعقيمها بالمؤصده واضافتها بنسبة 1%وزن.حجم$^{-1}$ (1غم 100 سم$^{-3}$ بيئة) ثم حضنت في درجة 28 مْ ولمدة 3 ايام وان نمو العزلات البكتيرية (على شكل عكارة) دلالة على إستغلال العزلات للمصدر الكاربوني(Shankarappa and Madhav, 1998).

إختبار تحلل النشا :

أضيف النشاء الذائب إلى الوسط الصلب الخالي من النتروجين بتركيز 2% تم إضافة قطرات من محلول Gram's Iodin solution إلى المستعمرات البكتيرية النامية على الوسط اكار النشا (Starch culture agar) بعد 3 أيام من الحضن في درجة حرارة 28 مْ لإختبار قدرتها على تحلل النشا ويُعد الفحص موجباً عند ظهور الهالات الرائقة حول المستعمرة (Williams and Baltiomre ,1984) .

إختبار تحلل الجيلاتين

استعمل الوسط الصلب الخالي من النتروجين(sucrose mineral salts) الحاوي على 12% جيلاتين للكشف عن انزيم gelatinase ولقُح الوسط بالعزلات البكتيرية وحضنت في درجة 28 مْ ولمدة 3 أيام وان عدم تصلب الوسط دليل على تحلل الجيلاتين وان النتيجة موجبة (جميل وآخرون, 1993).

إختبار النمو في وسط الببتون:

أضيف 1% من مادة الببتون إلى الوسط السائل الخالي من النتروجين (sucrose mineral salts) ولقُح الوسط بناقل واحد من العزلات البكتيرية وحضنت في درجة 28 مْ ولمدة 3 ايام ويُعد عدم نمو عزلات البكتريا(عدم تكون عكارة) في الوسط أن البكتريا هي *Azotobacter spp.* لعدم قدرتها على إستغلال الببتون كمصدر للنتروجين (Brenner,2004) .

إختبار إختزال النترات :

أضيف 1 غم من KNO_3 إلى لتر واحد من وسط السكروز السائل الخالي من النتروجين الملقح بالعزلات البكتيرية (بواسطة الناقل) المراد إختبارها ويضاف محلول كشف اختزال النترات

إلى الزرع البكتيري وأن ظهور اللون الأحمر يُعد مؤشراً على اختزال النترات إلى نتريت(Smibert and Kreig , 1981).

إختبار إنزيم الكاتاليز Catalase test

أُجري الاختبار بأخذ نموات بكتيرية بعمر 24 ساعة بواسطة الناقل (Loop)على شريحة زجاجية ثم أُضيفت له قطره من محلول 3% بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وانَّ التحرر الفوري لفقاعات الأوكسجين تؤخذ نتيجة موجبة (Baron and Finegold,1990).

إختبار إنزيم الأوكسيديز:

خُططت البكتريا على سطح الآكار المغذي وحضنت الأطباق في 28 مْ لمدة 24 ساعة، ثم أضيف إلى المستعمرات النامية محلول Cytochrome oxidase وأنَّ تلون المستعمرات باللون البنفسجي يؤخذ نتيجة موجبة (Jimenez ,2011) .

إختبار كفاءة العزلات على تثبيت النتروجين الجوي :

نُميت عزلات بكتريا الأزوتوباكتر المراد إختبار كفاء تها في تثبيت النتروجين على وسط الآكار المغذي المائل (Slant) المجهز من (شركة LBS mumbai الهندية) وحضنت في درجة حرارة 28 مْ لمدة 24 ساعة ثم حُصدت المزارع بواسطة الناقل(Loop) بإضافة 3 سم^3 من الماء المقطر المعقم ، ثم نقل اللقاح إلى أنابيب سعة 10 سم^3 بعد ذلك أُخذ 1 سم^3 من اللقاحات البكتيرية التي كثافتها 1.5×10^8 خلية بكترية سم$^{-3}$ (Baron and Finegold,1990) ولقحت بها القناني الحاويه على الوسط السائل الخالي من النتروجين (Beijrinkia free-N) الخاص بإختبار كفاءة العزلات البكتيرية وبثلاثة مكررات ووضعت القناني في الحاضنه الهزازه (shaker incubator) لمدة 12 يوماً ثم وضعت في حمام مائي وعلى درجة حرارة 60 مْ لغرض التجفيف ثم قدر فيها النتروجين في جهاز كلدال(FAO, 2008).

النتائج والمناقشة

أعداد بكتريا الأزوتوباكتر :

الجدول(2) يبين أعداد بكتريا الأزوتوباكتر(cfu غم تربة$^{-1}$جافة) في منطقة رايزوسفير النباتات المختلفة المزروعة في ترب المناطق المختلفة المؤشرة إزاءها ويلاحظ فيه إختلاف أعداد البكتريا بإختلاف مناطق أخذ العينات إذ تراوحت أعداد بكتريا الأزوتوباكتر مابين(1.1×10^3 - 3.6×10^5) cfuغم تربة$^{-1}$ ويعزى ذلك إلى إختلاف الظروف البيئية والمناخية ونوع التربة ونوع النبات المزروع والمادة العضوية في التربة (Rana *et al.*, 2013).

جدول (2) أعداد بكتريا الأزوتوباكتر في المواقع المختلفة cfu غم تربة$^{-1}$جافة

الموقع	نوع النبات	أعداد البكتريا cfu غم تربة$^{-1}$جافة
محطة كلية الزر اعه-جامعة البصرة	الشعير	10×3.6^{5}
محطة كلية الزر اعه-جامعة البصرة	الحندقوق	10×1.2^{5}
الزبير	الطماطه	10×2.4^{3}
الفهود/ ذي قار	الحنطة	10×1.1^{3}
الإصلاح/ذي قار	الحنطه	10×9.3^{3}
سيد دخيل /ذي قار	الخبَاز	10×8.6^{3}
القرنه/ البصره	الجت	10×0.3^{4}

تشخيص بكتريا جنس الأزوتوباكتر:

تم عزل(12) عزلة بكتيرية تابعة للجنس أزوتوباكتـــر عُزلت من مناطق مختلفة من محافظتـــي البصرة وذي قارحسب الطيقة الواردة في(Brenner *et al*. ,2004) بينما حُصل على(2) عزلات من كلية العلوم – جامعة ذي قار وعزلة واحدة من الدائرة العامة للبحوث الزراعية– وزارة الزراعة ، والجدول (3) يبين رموز هذه العزلات ومن خلال دراسة الصفات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية للعزلات (الجداول4 و5 و6) ظهر أن العزلات كونت الغشاء البني في الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي السائل(Sucrose mineral salts) وقد اظهر الفحص المجهري أن الخلايا البكتيرية تميزت بأشكال عصوية قصيرة أو كروية وأنها سالبة لصبغة كَرام وقد أظهرت تجمعات بشكل أزواج ثنائية أو رباعية أوسلاسل أوخلايا مفردة وأنها كونت الغلاف الخارجي (الحويصلة)cyst وأنَّها ذات حركة نشطة جدول(4) وهذه الصفات تتطابق مع الصفات المجهرية والزرعية للجنس أزوتوباكتر (Jimenez *et al*., 2011).

جدول (3) رموز العزلات التابعة للجنس أزوتوباكتر ومصادر عزلها

رمز العزله	منطقة العزل	مصدر العزل
A 1	محطة كلية الزر اعه-جامعة البصرة	الشعير
A 2	محطة كلية الزر اعه-جامعة البصرة	الشعير
A 3	محطة كلية الزر اعه-جامعة البصرة	الشعير
A5	محطة كلية الزر اعه-جامعة البصرة	الحندقوق
A 7	الزبير	الطماطه
A 8	الزبير	الطماطه
A 10	الفهود/ ذي قار	الحنطة
A 13	الإصلاح/ ذي قار	الحنطه
A 17	سيد دخيل / ذي قار	الخبَاز
A 21	القرنه/ البصره	الجت
A 22	القرنه/ البصره	الجت
A23	القرنه/ البصره	الجت
A R 1	جلبت عزله جاهزه من كلية العلوم - جامعة ذي قار	
A R 2	جلبت عزله جاهزه من كلية العلوم - جامعة ذي قار	
A B	جلبت عزله جاهزه من وزارة الزراعه /الدائره العامه للبحوث الزراعيه(مستورده من إيطاليا)	

وظهر من خلال دراسة بعض الصفات المظهرية للعزلات وقابلية نموها في بعض الأوساط الزرعية التفريقية والصفات الكيموحيوية وقدرتها على إستهلاك بعض المواد الكاربوهيدراتية والمبينة في الجدول (5) والذي يوضح أنَّ جميع العزلات قادرة على النمو في درجة حرارة 37 مْ وفي الوسط الحاوي على 1% كلوريد الصوديوم وفي الوسط الحاوي على الفينول وأنَّها موجبة لإختبار الأوكسيديز والكاتليز وقادرة على تحلل النشا والجيلاتين وقابليتها على إختزال النترات وأنَّها غير قادرة على النمو في وسط الببتون ووسط بيرك كذلك فأنها غير قادرة على إستغلال الراميزوز وهذه من الصفات التفريقية بين انواع بكتريا الأزوتوباكتر جدول(5) وأنَّ جميعها قادرة على تثبيت النتروجين الجوي وإستغلال المصادر الكاربونية (المانيتول والسكروز والكلوكوز والسترات) جدول (5) وهذه الصفات تنطبق على النوع *Azotobacter chroccoccom* (Brenner *et al*. ,2004) وهو الأكثر إنتشاراً في الترب العراقية (مطلوب, 2012) .

جدول (4) الصفات المجهرية لعزلات بكتريا الأزوتوباكتر

العزلة	صبغة جرام	الحركة	شكل الخلايا	تكوين الحويصلة	تجمع الخلايا
A1	**-**	**متحركة**	**عصوية قصيرة**	**مكونة للحويصلة**	**سلاسل**
A2	**-**	**متحركة**	**عصوية قصيرة**	=	**ثنائي**
A3	**-**	=	**عصوية قصيرة**	=	**مفردة**
A5	**-**	=	**كروية**	=	**ثنائي**
A7	**-**	=	**كروية**	=	**رباعية**
A8	**-**	=	**عصوية قصيرة**	=	**سلاسل**
A10	**-**	=	**عصوية قصيرة**	=	**ثنائي**
A13	**-**	=	**كروية**	=	**مفردة**
A17	**-**	=	**عصوية قصيرة**	=	**مفردة**
A21	**-**	=	**عصوية قصيرة**	=	**ثنائي**
A22	**-**	=	**عصوية قصيرة**	=	**رباعي**
A23	**-**	=	**عصوية قصيرة**	=	**ثنائي**
AR1	**-**	=	**كروية صغيرة**	=	**ثنائي**
AR2	**-**	=	**عصوية قصيرة**	=	**رباعي**
AB	**-**	=	**كروية**	=	**رباعي**

كفاءة عزلات بكتريا الأزوتوباكتر في تثبيت النتروجين الجوي :

يلاحظ من الجدول (7) أنَّ عزلات بكتريا الأزوتوباكتر قد إختلفت فيما بينها في تثبيت النتروجين الجوي فكانت اعلى قيمة 19.60 ملغم لتر$^{-1}$ بتاثير العزلةA1 المعزولة من رايزوسفير نبات الشعير النامي في محطة كلية الزراعة - جامعة البصرة تليها العزلات AB وA21 وA5 وثبتت كمية من النتروجين مقدارها18.93 و18.67 و18.35 ملغم لتر$^{-1}$ على التوالي في حين كانت أقل كمية مثبتة 6.53 ملغم لتر$^{-1}$ بواسطة العزلة A3 ، وقد يعود هذا الإختلاف إلى التركيب الوراثي والجين المسؤول عن تثبيت النتروجين(Cheng , 2008).

جدول(5) الإختبارات الكيموحيوية لبكتريا الأزوتوباكتر

العزلة	النمو في درجة حرارة 37	إختزال النترات	النمو في وسط بيرك	تحلل النشا	تحلل الجيلاتين	وسط البيتون	كاتاليز	الأوكسيديز	النمو في NaCl%1	الفينول	إستهلاك مصادر كاربونية مختلفة				
											كلوكوز	مانيتول	رامينوز	سكروز	ستارت
A1	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A2	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A3	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A5	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A7	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A8	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A13	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A17	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A21	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A22	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
A23	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AR1	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AR2	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AB	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

الإشارة (+)تمثل نتيجة موجبة والإشارة (-)تمثل نتيجة سالبة

جدول (6)الصفات الزرعية لبكتريا الأزوتوباكتر

العزلة	حافة المستعمرة	الشكل	اللمعان	الشفافية	القوام	اللون	قطر المستعمرة ملم	اللون بعد إسبوعين من النمو
A1	كاملة الحافه	محدبه	لماعة	شبه شفافه	جيلاتيني	حليبي	5	أسود
A2	كاملة الحافه	قبيه	لماعة	شفافه	جيلاتيني	حليبي	5	أسود
A3	كاملة الحافه	قبيه	لماعة	شفافه	جيلاتيني	حليبي	5	بني فاتح
A5	كاملة الحافه	محدبه	لماعة	شفافه	مخاطي	كريمي	8	بني - اسود
A7	كاملة الحافه	قبيه	لماعة	شفافه	مخاطي	حليبي	7	بني غامق
A8	كاملة الحافه	مسطحه	غير لماعة	غير شفافه	جيلاتيني	حليبي	7.5	بني غامق
A10	كاملة الحافه	محدبه	غير لماعة	غير شفافه	مخاطي	بيضاء	4	بني غامق
A13	كاملة الحافه	محدبه	غير لماعة	غير شفافه	جيلاتيني	حليبي	1.5	بني فاتح
A17	كاملة الحافه	محدبه	غير لماعة	غير شفافه	جيلاتيني	بيضاء	1	بني فاتح
A21	كاملة الحافه	قبيه	لماعة	شفافة	مخاطي	أصفر	3	بني غامق
A22	كاملة الحافه	محدبه	غير لماعة	غير شفافه	جيلاتيني	حليبي	4	بني غامق
A23	كاملة الحافه	مسطحة	غير لماعة	غير شفافة	جيلاتيني	حليبي	6	بني غامق
AR1	كاملة الحافه	محدبه	غير لماعة	غير شفافة	جيلاتيني	بني فاتح	5	بني غامق
AR2	كاملة الحافه	محدبة	غير لماعة	غير شفافة	جيلاتيني	بني	4	اسود
AB	كاملة الحافه	مسطحة	لماعة	غير شفافة	مخاطي	كريمي	10	بني فاتح

جدول (7) كمية النتروجين المثبتة من قبل بكتريا الأزوتوباكتر

رمز العزلة	كمية النتروجين المثبتة (ملغم لتر-1)
A1	19.60
A2	14.00
A3	6.53
A5	18.35
A7	18.07
A8	11.20
A10	9.33
A13	13.27
A17	13.17
A21	18.67
A22	10.27
A23	9.33
AR1	13.07
AR2	15.87
AB	18.93

المصادر العربية والأجنبية

جميل، سيف الدين محمد، الرزوق مصباح وصلاح محمد الزوي (1993). الدراسة العملية للبكتريا والفطريات الطبية. الدار العربية للنشر والتوزيع.

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

مخيمر، جمال عبد الفتاح احمد(2008). أهمية استخدام الأسمدة الحيوية في الزراعة. مقالة، مجلة شمس.العدد (91) يوليو – أغسطس جمهورية مصر العربية.

مطلوب، عهد عبدعلي هادي(2012) . تحديد مسببات تعفن جذور وقواعد سيقان الفاصوليا وتقويم فعاليـــة بعض عوامل المكافحة الإحيائية في مقاومتها.إطروحة دكتوراه.كلية الزراعة – جامعة بغداد.

Abd El-Fattah, Dalia A. ; Wedad E. Eweda ; Mona S. Zayed and Mosaad K. Hassane(2013). Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. Annals of Agricultural Science . 58(2):111–118.

Baron,E.J. and S.M. Finegold (1990). Diagnostic microbiology. 8th . (ed) . The C.V. mosby company.

Becking,J.H. (1981). The family Azotobacteraceae . In: Starr, M.P. (Ed): "The prokaryotes" Vol 1 . Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. P. 795-817.

Black, C. A. (1965). Method of soil analysis. Part.2 Chemical and Microbiological properties. Am. Soc. Agron. Inc. Madison. Wisconsin. USA.

Brenner, D.j.;N.R.Krieg and J.T.Staley(2004).Bergey's manual of systematic bacteriology.Williams and Wilking.Baltimore.London. pp1136.

Cheng, Qi (2008). Perspectives in biological Nitrogen fixation research. J. of Integrative Plant Biology . 50 (7): 784–796.

Dhamangaonkar, S.N. ; P. Misra. (2009). *Azotobacter chroococcum* (PGPR) on the Growth of Bamboo (*Bambusa bamboo*) and Maize (*Zea mays*) Plant. Biofrontiers .1(1):37-46.

FAO,(2008). Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis.FAO Fertilizer and Nutrition Bulletin.

Gomare, S.; M. Mese and Y. Shetkar(2013). Isolation of *Azotobacter* and Cost Effective Production of Biofertilizer.India J. of Applied Research.3(5).54-56.

Jimenez, D. Javier.; J. S. Montana and M. M. Martínez (2011). Characteriztion of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soil.. Brazilian J. of Microbiology. 42: 846-858.

Kaur, I.(2014).Effect of nitrogen fixing bacteria Azotobacter and Azospirillum on the growth of rosa polyantha. International J. of Emerging Trends in Science and Technology.1(7):1073-1080.

Kizilkaya, R. (2009). Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter spp*. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. J. Environ. Biol. 30(1):73-82.

Milosevic, N. ; B.Tintor; R.Protic; G. Cvijanovic and T.Dimitrijevic(2012). Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on wheat yield and seed quality. Romanian Biotechnological Letters.17(3).7352-7358.

Mishra, D.J.; S. Rajvir; U.K. Mishra and S. Kumar(2013). Role of biofertilizer in organic agriculture. R. J. of Recent Sciences. 2:39-41.

Rana, R. ; Ramesh; and P. Kapoor(2013). Biofertilizers and Their Role in Agriculture. Popular Kheti.1(1). www.popularkheti.com.

Shankarappa,T.H.and A.R.Madhav (1998).Characterization and Identification of *Azotobacter* strains Isolated. from Mulberry RhizosphereSoil. In : Biofertilizers and Biopesticiders A.M. Deshmukh

Sharma, AK. (2003). Biofertilizers for Sustainable Agriculture. Agrobios, India,

Smibert, R.M. and Krieg, N.R. (1981). General characterization. In: Gerhardt P., Murray, R.G.E., costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Philips, G.P. (eds). Manual of Methods for General bacteriology: 409-443. American Soc. For Microb. Washington, D.C.

Tchan, Y.T. and N.B. Peter (1984). Genu *Azotobacter*. In: Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (ed.s): "Bergeys's manual of systematic bacteriology" 1. William and Wilkins: 219-229.

Thompson,J.P. and V.B.D. Skerman. (1979). Azotobacteraceae. The Taxonomy and Ecology of Aerobic Nitrogen-Fixing Bacteria. Academic Press, London.

Wani, S. A. ; S. Chand; and T. Ali(2013). Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production. Current Agri. R. J. 1 (1): 35-38.

Williams and W. Baltiomre (1984). Bergey's manual Systematic bacteriology, London.

Isolation and Diagnosis *Azotobacter* and Assessment of Nitrogen Fixation Efficiency by Local and Foreign Isolates

Abd AL-Zahra Taha Thaher **Hassan Ali Taher**

Department of soil and water resourses –Agriculture colleg –Basrah university

Abstract

An experiment was conducted in microbes laboratory in Agriculture college-Basrah university to test efficiency of local and foreign isolates in nitrogen fixation ,included isolation and diagnosis Azotobacter from rhizosphere different plants were brought from different region of Basrah and Thi-Qar province ,then 12 isolates were obtained ,two isolates from Thi-Qar university and one isolate from Italy . Isolates were diagnosed by biochemical,microscopical and morphological characteristics.

Results showed that all isolates are belong to *Azotobacter chrococcum* , existed abundance in rhizosphere different plants used in this sudy and ranged between ($^{3}10\times1.1$- $^{5}10\times3.6$) cfu gm^{-1}dry soil , also amount nitrogen fixed by *Azotobacter* in cultural media are ranged between (6.53- 19.00)mg liter $^{-1}$.