دراسة نمو البكتريا المتحملة للملوحة ومقدرتها في تثبيت النتروجين الجوي في أوساط ملحية.

كريم عبيد حسن

* مدرس- قسم علوم التربة والموارد المائية - كلية الزراعة- جامعة بغداد- جمهورية العراق .kareemaubaid@yahoo.com

المستخلص

عزلت البكتريا المتحملة للملوحة من عينات ترب متأثرة بالملوحة . عزلت ونقيت على الوسط الزرعي Ashby. شخصت العزلات البكتيرية المعزولة اعتمادا على الصفات المظهرية والاختبارات البايوكيميائية . أظهرت نتائج التشخيص وجود خمسة عزلات بكتيرية متحملة للملوحة تعود للجنس البكتيري *Azotobacter Spp.* اختبرت قدرتها في النمو وتثبيت النتروجين في أوساط ذات تراكيز : 0.0% ، 1.5 % ، 4.5 % ، 6.0 % ، 7.5 % و 10.0% NaCl. أظهرت النتائج أن العزلات البكتيرية جميعها استطاعت النمو في الأوساط ذات التراكيز 0.0% - 3.0% NaCl . لوحظ إن العزلتين A1 و A4 استطاعتا النمو في التركيز 4.5 % NaCl مقارنة بالعزلات الأخرى وان العزلة A1 استطاعت النمو في التركيز 6.0% NaCl . الأوساط ذات التراكيز 7.5% و 10.0% NaCl لم يلاحظ أي نمو بكتيري فيها . قدر النتروجين المثبت في الأوساط الملحية أعلاه وتفوقت العزلة A1 في تثبيت اكبر كمية من النتروجين 6.70 ملغم N غم $^{-1}$ مقارنة مع معاملة المقارنة، في حين كانت اقل كمية النتروجين المثبت للعزلةA3 هي 1.98ملغم N غم $^{-1}$. إن هذا التباين في الكمية المثبتة من النتروجين له علاقة بمقدرة البكتريا على تحمل الملوحة . عليه نوصي باستعمال بكتريا *Azotobacter* المتحملة للملوحة كسماد حيوي لزيادة النتروجين وتحسين النمو وزيادة حاصل النبات في الترب الملحية .

الكلمات المفتاحية : بكتريا التربة تحمل الملوحة تثبيت النتروجين .

المقدمة

تعد ملوحة التربة من المشاكل الرئيسة التي تعاني منها الزراعة وإنتاج المحاصيل في العديد من مناطق العالم ولاسيما في المناطق الجافة وشبه الجافة إذ تتجمع الأملاح في المنطقة الجذرية للنبات ومن ثم تؤثر في نموه وإنتاجه ، إن التأثير المباشر للملوحة على النبات يتمثل بالضغط الازموزي الذي يؤدي إلى عجز في امتصاص الماء والتأثير في التوازن الغذائي في التربة . إن الزيادة السكانية الحاصلة في العالم تستدعي زيادة إنتاجية المحاصيل الزراعية باستخدام مختلف التقنيات العلمية الحديثة المستخدمة مع الأسمدة البايلوجية. إن معظم الأراضي المالحة تتواجد في مناطق المدارات الاستوائية والمناطق المحيطة بالبحر المتوسط إذ تعاني هذه الأراضي من مشكلة التملح وانعكاس ذلك على تردي الإنتاج الزراعي بسبب الظروف الملحية التي تقلل من إمكانية امتصاص الماء من قبل النبات مما يترتب على ذلك حدوث بعض التغيرات في الجانب الايضي مسببا انخفاض في سرعة النمو بسبب الإجهاد المائي (Epstein، 1980) توجد أجناس بكتيرية متعايشة مع الملوحة مثل أجناس بكتريا الازوتوبكتر وهي حرة المعيشة ومثبتة للنتروجين الجوي بشكل حر واسع الانتشار في مختلف البيئات كالتربة والماء والرسوبيات ، إن التحمل الملحي ضرورة ملحة وله أسبقية في مستقبل الزراعة للتغلب على الظروف التي تؤدي إلى ترك مساحات كبيرة من الأراضي بسبب التملح وعدم إمكانية زراعتها (Gisbert وآخرون ، 2000) .

تاريخ استلام البحث 19 / 8 / 2013 .
تاريخ قبول النشر 30 / 10 / 2013 .

إن الأحياء المجهرية المتحملة للملوحة توجد في بيئات مختلفة منها ترب الرايزوسفير والتي يمكن أن تعزل هذه الأحياء من هذه الترب للاستفادة منها في دراسات متعلقة بالتحمل الملحي. إن الأحياء المجهرية المتحملة لتراكيز مختلفة من الملوحة قادرة على تثبيت النتروجين الجوي وهذه الصفة لها دور في زيادة خصوبة التربة .

إن الهدف من هذا البحث هو دراسة نمو البكتريا المتحملة للملوحة ومقدرتها في تثبيت النتروجين في تراكيز ملحية مختلفة .

المواد وطرائق البحث

جمعت عينات ترب متأثرة بالملوحة من مناطق متعددة من مدينة بغداد وضواحيها أخذت العينات من عمق 5- 10 سم من سطح التربة وضعت في علب بلاستيكية معقمة وجلبت إلى المختبر .

تحضير الأوساط الزرعية المستخدمة

الوسط الزرعي Ashby مكوناته غرام لكل لتر ماء مقطر (Islam وآخرون، 2008):
مانيتول : 20، K_2HPO_4 :0.2 ، $MgSO_4.7H_2O$: 0.2 ، NaCl : 0.2 ، K_2SO_4 : 0.1 ، $CaCO_3$: 5.0 ، Agar : 15 ، ماء مقطر 1000مللتر .

الوسط الزرعي semi- solid (L G) Nitrogen- free (Girish وآخرون،2010) مكوناته غرام في لتر ماء مقطر: $FeSO_4.7H_2O$: 0.1 ، $MgSO_4.7H_2O$: 0.2 ، K_2HPO_4 : 1.0 ، $CaCO_3$: 1.0 ، $Na_2MoO_4.2H_2O$: 5 ، Sucrose : 5 ومحلول bromophenol blue : 5 مللتر (تضاف 5 غرام من bromophenol blue إلى 100مللتر من 0.2 N-KOH).

العزل والتشخيص :Isolation and Identification

حضرت سلسلة من التخافيف العشرية لعينات الترب لغاية 10^{-5}، نشر 0.5 مللتر من التخافيف على سطح الوسط الزرعي Ashby في أطباق بتري وحضنت في درجة حرارة 28م لمدة أربعة أيام بعد ظهور المستعمرات البكتيرية جرى تشخيصها وتنقيتها بطريقة التخطيط على وسط العزل عدة مرات ثم نقلت إلى الوسط الصلب المائل Slant ووضعت في الثلاجة لحين استعمالها في التجارب. جرى تشخيص العزلات البكتيرية بعد عزلها بإجراء الفحوصات المجهرية الأولية الآتية :

شكل المستعمرة (الصبغة البسيطة) ، صبغة كرام ، إفراز الصبغات ، تكوين السبورات. ثم اجري اختبار Deep glucose agar لمعرفة متطلبات الكائن المجهري من الأوكسجين .أجريت الاختبارات البايوكيميائية الآتية: استنادا إلى Palleroni (1984).

الكاتليز ، الاوكسيديز ، اختزال النترات وتحلل النشا .

تحمل الملوحة : Salt Tolerance

حظرت الأوساط المغذية الصلبة (Nutrient) على شكل أوساط مائلة Slant،إذ يحتوي كل منها على احد تراكيز ملح NaCl: 0.0 % ، 1.5% ،3.0 % ، 4,5% ، 6.0 % ، 7.5 % و 10.0 %. إذ استخدم التركيز 0.0 % للمقارنة، لقحت الأوساط المائلة بالبكتريا وحضنت في درجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة لغرض تعيين العزلات المتحملة والمقاومة للملوحة.

تقدير النتروجين المثبت :

قدر النتروجين المثبت من قبل عزلات بكتريا الازوتوبكتر بتقدير كمية النتروجين التراكمي لمدة سبعة أيام باستعمال 25مللتر من الوسط الزرعي الملحي (LG) الشبه صلب ، إذ قدر النتروجين في المزارع البكتيرية باستعمال جهاز كلدال .

النتائج والمناقشة

بينت النتائج إن عدد المستعمرات البكتيرية المعزولة من التربة كانت متباينة الجدول (1) إذ أن أعلى عدد كان 4×10^5غرام $^{-1}$ تربة جافة في حين اقل عدد للبكتريا كان 1×10^5 غرام $^{-1}$ تربة جافة. استنادا إلى الفحوصات المجهرية و الاختبارات البايوكيميائية شخصت خمسة عزلات بكتيرية تعود إلى الجنس *Azotobacter Spp.* وأعطيت الرموز A1،A2،A3،A4،A5 وظهرت البكتريا ذات شكل عصوي وسالبة لصبغة كرام وغير مكونة لسبورات وقادرة على إفراز الصبغات وكذلك ظهرت أنها هوائية إجبارية لجميع العزلات البكتيرية . أما نتائج الاختبارات البايوكيميائية فكانت موجبة لاختبار الكاتليز ، الاوكسيديز ، تحلل النشا و اختزال النترات .

جدول1. عدد بكتريا التربة ونتائج الاختبارات التشخيصية للعزلات البكتيرية.

رمز العزله	CFU × 10^5 غرام-1 تربة جافة	الاختبارات الشكلية والمجهرية					الاختبارات البايوكيميائية			
		الصبغة البسيطة	صبغة كرام	صبغة السبورات	إفراز الصبغة	متطلب الأوكسجين	الكاتليز	تحلل النشا	الاوكسيديز	اختزال النترات
A1	**4**	**عصوية**	_	_	+	**هوائيه مجبرة**	+	+	+	+
A2	**2**	**عصوية**	_	_	+	**هوائية مجبرة**	+	+	+	+
A3	**3**	**عصوية**	_	_	+	**هوائية مجبرة**	+	+	+	+
A4	**1**	**عصوية**	_	_	_	**هوائية مجبرة**	+	+	+	+
A5	**2**	**عصوية**	_	_	+	**هوائية مجبرة**	+	+	+	+

التحمل الملحي : Salt Tolerance

أظهرت النتائج إن قابلية التحمل الملحي للبكتريا كانت متباينة للعزلات البكتيرية الجدول(2) إذ لوحظ إن نمو البكتريا في التراكيز المنخفضة من NaCl 1.5% و 3.0% كان واضحا ولكنه اقل مقارنة بمعاملة المقارنة ذات التركيز NaCl 0.0% ، وقد لوحظ بان العزلة A1 استطاعت أن تنمو بشكل قليل جدا عند التركيز NaCl 6.0% مقارنة بالعزلات الأخرى التي لم تستطع النمو بالتركيز نفسه لذا يمكن القول بان العزلة A1 هي عزلة بكتيرية مقاومة للملوحة في حين إن العزلتين A1 و A4 اعتبرتا من العزلات المتحملة للملوحة وذلك لاستطاعتهما من النمو في التركيز NaCl 4.5% . ولم يلاحظ أي نمو ولجميع العزلات البكتيرية في التراكيز الملحية العالية NaCl 7.5% ، NaCl 10.0% . وان هذه النتائج جاءت متطابقة مع ما ذكره Tippannavar وآخرون(1989) الذين لاحظوا إن بكتريا الازوتوبكتر تستطيع ان تتحمل التراكيز الملحية الأعلى من NaCl 1.5% .

جدول 2. مقدرة العزلات البكتيرية في النمو وتثبيت النتروجين في الأوساط الملحية.

رمز العزلة	تركيز NaCl%							كمية النتروجين المثبتة ملغم N غم$^{-1}$من المادة
	0.0	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	10.0	
A1	++++	+++	++	++	+	–	–	6.70
A2	+++	++	+	–	–	–	–	3.85
A3	+++	++	+	–	–	–	–	1.98
A4	++++	+++	++	+	–	–	–	5.69
A5	+++	++	+	–	–	–	–	4.35

+: كثافة نمو البكتريا - :عدم وجود نمو بكتيري

مقدرة العزلات البكتيرية في تثبيت النتروجين:

أظهرت النتائج إن العزلة A1 حققت أعلى كمية مثبتة للنتروجين في الأوساط ذات التراكيز الملحية المنخفضة والتي كانت 6.70 ملغمN غم$^{-1}$ من المادة في حين حققت العزلة A3 اقل كمية مثبتة للنتروجين 1.98 ملغم N غم$^{-1}$ الجدول (2). وفي دراسة Kizilkya (2009) وجد إن بكتريا *Azotobacter* استطاعت أن تثبت النتروجين بمعدل 3.50 – 29.35 مايكروغرام N مللتر$^{-1}$ في الوسط الزرعي Ashby.إن بعض أجناس بكتريا الازوتوبكتر لها صفة التحمل الملحي التي مكنتها من التواجد في الترب المالحة والقيام بدور التثبيت النايتروجيني لتحسين خصوبة هذه الترب ، وفي دراسة أخرى لبكتريا الازوتوبكتر المتحملة للملوحة،وجد Islam وآخرون (2008) إن البكتريا *Azotobacter* المتحملة للملوحة استطاعت أن تنمو في وسط يحتوي 10.0% NaCl ومعدل تثبيتها للنتروجين كان 0.69 – 1.18ملغرام N لكل 25 مللتر من الوسط الزرعي ، يلاحظ من خلال النتائج تباين في مقدرة البكتريا في تثبيت النتروجين اعتمادا على صفة التحمل الملحي لكل عزلة بكتيرية ، لذا نلاحظ كلما كانت البكتريا قادرة على تحمل مستويات عالية من الملوحة ينعكس ذلك على زيادة قدرتها في تثبيت النتروجين. لاسيما إن إدارة الترب المالحة وغير المالحة يحسن من قابلية بكتريا الازوتوبكتر في تثبيت النتروجين ، إذ ذكر الباحث Hamdi (1982) إن قابلية تثبيت النتروجين من قبل البكتريا يمكن تحسينها بتحسين ظروف التربة الملحية إذ كان معدل تثبيت النتروجين10.0 ملغرام N غرام$^{-1}$من المادة.إن التوجه الآن من قبل كثير من الباحثين الاستفادة من الأجناس البكتيرية النافعة لاسيما المتحملة للملوحة في تثبيت النتروجين وإذابة الفسفور وتيسير البوتاسيوم . ذكر Nakade(2013) في دراسته لدورPGPR في نمو النبات وزيادة إنتاجه إذ لاحظ كمية النتروجين المثبة لبكتريا الازوتوبكتر كروكوكم هي السائدة وأكد إن المهم في هذه الأحياء المجهرية استعمالها لقاحات حيوية للترب المالحة ومن الممكن أن يكون لها دور في إنتاج الأسمدة الحيوية.

المصادر

Epstein, E. 1980 .Response of plants to saline environments. In:Rains DW, Valeintine RC, Hollaender A(eds) , Genetic Engineering of Osmor-Egulation, Plenum Press,New York, 7-21.

Girish , J.,S.S. Dipti,P.N. Devidas and K.B,Rama. 2010. Isolation and chara-Cterization of salt tolerant nitrogen fixing microorganisms from food. Eur Asia *J. Bio Sci.* 4,33-40.

Gisbert, C.,A.M. Rus, M. Carmen and J.M. Isabel. 2000.TheYeast HAL1 Gene improves salt tolerance of Tomato.*Plant Physiology* 123,393-402.

Hamdi YA. 1982. Application of Nitrogen fixing systems in soil impro-Vement and management. *FAO Soil Bul*l. 49: 45-82.

Islam, M.Z.,D.I. Sharif and M.A. Hossain. 2008. Acomparative study of *Azotobacter Spp*. from different soil samples .*J.Soil Nature.* 2(3): 16-19.

Kizilkya, 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.

Nakade D. B. 2013 .Bacteria Diversity in Sugarcane(saccharum officina-Rum) Rhizosphere of salinesoil.*J.Biological Sci*.Vol.2(2),60-64.

Palleroni N.J. 1984.Gram negative aerobic rods and cocci. In: Krieg, N.R., (Ed). Bergeys manual of systematic bacteriology.vol.I,II,III,Iv,pp.140-199.

Tippannavar, C.M., M.N.Rddy and E. Rajashekara, 1989. Tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains to different salt concentration and pH Levels .*Farming systems*, 5:1 and 2, 24-48.

STUDY GROWTH SALINITY TOLERANT BACTERIA AND ITS CAPABILITY IN FREE NITROGEN FIXATION IN SALINTY MEDIUMS.

Kareem U. Hasan

*Lecturer- Dept. of Soil And Water Res.-College of Agric. –Univ. of Baghdad- Republic of Iraq.
kareemaubaid@yahoo.com

ABSTRACT

Salinity tolerant bacteria were isolated from salinity affected soil samples by Ashby's medium. The isolates were purified and identified based on morphology and biochemical's tests. Results showed five isolates related to, *Azotobacter Spp*. Their salt tolerance capability tested in growth and nitrogen fixation with mediums content 0.0%, 1.5% , 3.0% , 4.5% , 6% , 7.5% and 10.0% NaCl,. Results showed all isolates could grow in 0.0% - 3.0% NaCl ,and A1 , A4 isolates could grow in 4.5% NaCl. While only A1 isolate can grow in 6.0 % NaCl .The isolate A1 was superior in Nitrogen fixation (6.70 mg N gm^{-1}) whereas the lowest amount of nitrogen fixation (1.98mg N gm^{-1})was with A3 isolate. Salinity tolerant *Azotobacter Spp*. has attracted the attention of agriculturists as soil inoculums to improve the plant growth and yield in salinity soils.

Key words: Soil bacteria Salinity tolerant Nitrogen fixation