مجلة المختار للعلوم 37 (1): 68-78, 2022
ISSN: online 2617-2186 print 2617-2178
Journal Homepage https://omu.edu.ly/journals/index.php/mjsc/index

عزل واختبار كفاءة كل من بكتيريا *Azotobacter* وبكتيريا *Burkholderia* المعزولتين محلياً من الترب الليبية في تثبيت النتروجين الجوي

ميرفت الطاهر بن محمود* وإيمان على الفرجاني
قسم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، طرابلس، ليبيا

تاريخ الاستلام: 01 نوفمبر 2021/ تاريخ القبول: 23 يناير 2022
Doi: https://doi.org/10.54172/mjsc.v37i1.381

المستخلص : أجريت هذه التجربة في معمل الأحياء الدقيقة، قسم التربة، كلية الزراعة ، جامعة طرابلس لغرض اختبار كفاءة بكتيريا *Azotobacter* و *Burkholderia* المعزولة محلياً من الترب الليبية في تثبيت النتروجين الجوي، وتضمنت التجربة عزل، واختبار بكتيريا *Azotobacter* و *Burkholderia* من ترب منطقة جذور لنباتات مختلفة جلبت من مدينة طرابلس وضواحيها إذ تم الحصول على 10عزلات نتيجة لعمل تخافيف لهذه الترب، وُدرست الصفات الكيموحيوية، والمورفولوجية، والمجهرية لهما، بينت النتائج أن جميع العزلات تعود للنوعين من *Azotobacter* و *Burkholderia* وأن أعداد بكتيريا *Azotobacter* توجد بوفرة في منطقة جذور (منطقة رايزوسفير) بعض النباتات المستخدمة في البحث، وقد تراوحت أعدادها ما بين (1.95×10^{3} - 6.1×10^{10}) cfu/جم تربة، كذلك تراوحت كمية النتروجين المثبتة من قبل بكتيريا *Azotobacter* ما بين (18.50 – 6.8) ملجم/ لتر ،أما بكتيريا *Burkholderia* فقد تراوحت أعدادها ما بين (9.4×10^{8} – 1.5×10^{3}) cfu/جم تربة، وتراوحت كمية النتروجين المثبتة ما بين (15.50 –5.38) ملجم/ لتر، وتبين أيضا أن هناك فروقا معنوية بين بكتيريا *Azotobacter*، و *Burkholderia* من حيث أعدادها، وقدرتها على تثبيت النيتروجين الجوي، وبهذا يمكن استخدام الجنسين في برامج التسميد الحيوي في الترب الليبية.

الكلمات المفتاحية: عزل، بكتيريا *Azotobacter* و *Burkholderia*، منطقة الرايزوسفير، النيتروجين الجوي المثبت.

المقدمة

في السنوات الأخيرة بدأ العالم يتجه إلى استعمال الأسمدة الحيوية لتخفيف مشاكل تلوث البيئة التي تسببها الأسمدة الكيميائية بكثرة، ومساهمة منها في زيادة خصوبة التربة حيوياً بحيث تؤدي الأسمدة الحيوية دورا مهما في تثبيت النيتروجين الجوي تكافلياً، ولا تكافلياً من خلال اللقاحات البكتيرية على حسب نوع المحاصيل، وكذلك تعمل على زيادة كفاءة امتصاص النيتروجين، وبعض العناصر الأخرى من التربة، كما أنها تساهم في رفع القدرة الإنتاجية للتربة، وللمحاصيل الزراعية (Osip et al., 2000)، استخدمت عدة أنواع من لقاحات تحتوي على أنواع من البكتيريا المثبتة للنيتروجين كبكتيريا *Azotobacter* وغيرها (الزعبي وآخرون، 2007) تستخدم لقاحات بكتيريا *Burkholderia* لزيادة معدل تثبيت النيتروجين الجوي مع المحاصيل(بن محمود، 2016)، ولها أيضا القدرة على إفراز مواد منظمة، ومنشطة تساعد على إنبات البذور، ونمو الجذور، من منظمات النمو ومنشطاته التي لها القدرة على إفرازها حمض الجبرليك، والسايتوكينات، واللوكسينات، ومنها IAA كما أنها تفرز كثيرا من المضادات الفطرية لحماية النباتات من المسببات المرضية، وهي شبيهة في عملها ببكتيريا *Azotobacter* (الحداد، 1998). إن

* ميرفت الطاهر بن محمود, dr.mbenmahmoud@yahoo.com قسم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، طرابلس، ليبيا

استعمال بكتيريا *Azotobacter*، و *Burkholderia* سماداً حيوياً يساهم في زيادة خصوبة التربة الزراعية حيوياً، والتقليل من استخدام الأسمدة الكيميائية، وبالتالي تقليل مشاكل التلوث البيئي. الاستنزاف الدائم لعنصر النيتروجين في التربة، وخاصة في الترب الخفيفة المنتشرة في ليبيا أدى إلى الاهتمام المتزايد بالطرائق المختلفة التي تؤدي إلى الحفاظ على المصادر المحدودة من هذا العنصر، والبحث عن وسائل آمنة، وغير مكلفة في استعمال التوازن النيتروجيني في التربة، لذلك اتجه العالم إلى استعمال طرائق بديلة عن الأسمدة الكيميائية، واستخدام الطرائق الحيوية لتثبيت النيتروجين الجوي، لتحسين محتوى التربة من عنصر النيتروجين، وكبديل آمن، وأوفر اقتصادياً، وصحياً(Osip et al., 2000)، أثبتت الدراسات الحديثة إمكانية تحسين التثبيت الحيوي للنيتروجين، وزيادة معدله باستخدام الأسمدة الحيوية Biofertilizers (Ben Mahmud, 2008) وأصبح من الضروري إعادة تقييم الأهمية لهذا النوع من النشاط الحيوي، لذلك يهدف هذ البحث لدراسة خواص البكتيريا المثبتة للنيتروجين المتعايشة في الترب الليبية، وصفاتها، وتقييم قدرتها في تثبيت النيتروجين الجوي قبل البدء في دراسة هذه البكتيريا كسماد حيوي في برامج التسميد الحيوي.

المواد وطرق البحث

جمع عينات التربة: جمعت عينات التربة بطريقة عشوائية من عدة مناطق من مدينة طرابلس، و ضواحيها على عمق 0- 40 سم من مناطق مختلفة من منطقة جذور(الرايزوسفير) بعض النباتات، والأشجار المزروعة بها، ونقلت العينات في أكياس بلاستيكية للمعمل لإجراء بعض التحاليل، والاختبارات الكيمائية والفيزيائية لعينات التربة لمعرفة درجة تفاعلها pH، ودرجة ملوحتها EC ملليموز/سم، ونسبة كل من المادة العضوية، والنيتروجين الكلي، والفسفور، والبوتاسيوم المتيسرين، وأكياس أخرى معقمة بكحول الأثيلي لمعمل الأحياء الدقيقة/ التربة بكلية الزراعة جامعة طرابلس ووضعت في الثلاجة لحين إجراء الاختبارات اللاحقة عليها.

جدول (1). يبين المناطق وأنواع النباتات التي أخذت منها العينات.

ت	المنطقة	نوع النبات
1	عين زارة	طماطم
2	تاجوراء	فلفل
3	وادي الربيع	باذنجان
4	طريق المطار	قمح
5	ترهونة	زيتون
6	الزاوية	شعير
7	قصر بن غشير	قمح
8	صبراتة	ذرة
9	جنزور	موالح (برتقال)

عزل البكتيريا *Burkholderia* و *Azotobacter* من الترب الليبية: عزلت كل من بكتيريا *Burkholderia*، وبكتيريا *Azotobacter* من عينات الترب المجمعة ، بحيث تم خلط 10غرام تربة في 1 لتر من الماء المقطر المعقم لكل عينة على حدة، ومزجت جيدا, ثم أجريت تخافيف متسلسلة لحد10^{-6}، ثم نقل 1 ملليلتر من معلق التربة لكل عينة إلى أنابيب اختبار تحتوي 9 ملليلتر من المحلول الغذائي الخالي من النتروجين Burk's media كونه وسطاً ملائماً لنمو بكتيريا *Burkholderia* (بن محمود، 2016)، وأنابيب أخرى بالمحلول المغذي الخالي أيضا من النتروجين sucrose mineral salts -Jensen's media) كونه وسطاً ملائماً لنمو بكتيريا *Azotobacter* (Sharma, 2003) وثم أخذت 1 ملليلتر من تخافيف التربة، ولقحت الأنابيب الحاوية على المحاليل المغذية الخاصة بكل بكتيريا Burk's media، و Jensen's media بثلاثة مكررات لكل تخفيف، وعدلت درجة حموضة المحاليل pHعند 7.0 ورجت بواسطة الرجاج لمدة ساعة ثم حضنت الأنابيب ثلاثة أيام على درجة حرارة 30° درجة مئوية لاستخدامها في عد الخلايا البكتيرية. خلال الثلاثة أيام الحضانة تمت مراقبة نمو الخلايا في الأنابيب بملاحظة الغشاء اللبني المتكون على السطح، والذي يعد مؤشراً لنمو الخلايا البكتيرية، وعدت خلايا بكتيريا *Burkholderia*، و *Azotobacter* بطريقة احتمال العدد الأعظم MPN (Becking, 1992).

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

تم أخذ جزء من الغشاء من سطح الأنابيب بواسطة إبرة التلقيحLoop، وخططت أطباق بتري المحتوية على البيئة الغذائية نفسها لكل بكتيريا مضاف إليها 7.5 جم الأجار المغذي لنمو بكتيريا *Burkholderia*، وبكتيريا *Azotobacter*، وحضنت الأطباق لمدة 3 –4 أيام عند 30 درجة مئوية، وبعد ظهور المستعمرات أعيد تخطيط أطباق بتري ثلاث مرات متتالية لغرض الحصول على عزلات نقية لكل من بكتيريا *Burkholderia*، و *Azotobacter* لدراسة الصفات المورفولوجية، والمجهرية للمستعمرات البكتيرية النقية المتحصل عليها، وتصنيفها. ثم حفظت العزلات على الآجار المائل للوسطين الغذائيين الخاص لكل بكتيريا في الثلاجة عند 80 تحت الصفر درجة مئوية.

اختبارا الخلايا البكتيرية المتحصل عليها: تم إجراء عدة اختبارات للصفات المزرعية (المورفولوجية)، والمجهرية، والكيموحيوية للأطباق الحاوية على الغشاء البكتيري النامي في كل طبق بتري، والذي يمثل كل طبق عينة من عينات التربة ,يحتوي على المستعمرات النقية، وحيث إن مظهر المستعمرة يعد دليلا قيما للتعرف على نوع المستعمرات النامية، وأنواع البكتيريا النامية، وبعد ذلك تم فحص الخلايا النامية في كل طبق تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية (x100)، والتأكد من نقاوتها، وسجلت الصفات المزرعية (المورفولوجية) للمستعمرات النامية، والتي تضمنت شكلها، وحجمها، وقوامها، و لونها، ومقدرتها على إفراز مواد لزجة، وصبغات بعد أسبوعين من النمو (Jiménez et al., 2011) تم وصف الغشاء البكتيري النامي، والنقي من كل الأطباق بتري حسب (Bergey, 2004) .

تصبيغ جرام للخلايا البكتيرية: أجري تصبيغ جرام على الخلايا النامية في كل طبق بتري، والذي يمثل كل طبق عينة من عينات التربة، ويحتوي على المستعمرات النقية لكل من بكتيريا *Burkholderia*، و *Azotobacter*، حديثة العمر (عمرها 18– 24 ساعة)، والتي مازالت خلاياها تحتفظ بخواص تركيب جدارها الخلوي لمعرفة الخلايا النامية سالبة أو موجبة لصبغة جرام (Black, 1965).

اختبار حركة البكتيريا: تم اختبار حركة الخلايا النامية أيضا في العينات كلها باستخدام بيئة شبه صلبة (semi-solid) من Nutrient broth في أنابيب كارجي Craigie tube لتسهل حركة الخلايا فيها إذا كانت من النوع المتحركة (Harvey & Price, 1967).

اختبار نمو بكتيريا *Burkholderia* و*Azotobacter* في درجة حرارة °37 و°4 م: درجة الحرارة تعد من العوامل البيئية المهمة جدا في تصنيف البكتيريا وتقسيمها، ونموها وذلك من حيث تأثيرها على النشاط الأنزيمي، والأيضي في الخلايا البكتيرية، وعلى قدرة الخلية للحصول على الماء، وهو ضروري لامتصاص العناصر، والتخلص من الفضلات، وكذلك تؤثر على معدل بناء الإنزيمات والبروتينات وتحطيمها، وبذلك تم إجراء دراسة لهذه الخاصية للخلايا, بحقن أطباق تحتوي على Burk's medium بالخلايا البكتيرية للبكتيريا *Burkholderia* و(sucrose mineral salts) للبكتيريا *Azotobacter* وحضنت تحت درجة حرارة °37 و°4 م لمدة 3 أيام، ويُعد ظهور المستعمرات في الوسط قدرتها وتلائمها لدرجة الحرارة المبينة (Thompson & Skerman, 1979).

اختبار النمو في 1 % كلوريد الصوديوم: نميت العزلات البكترية في Burk's medium للبكتيريا *Burkholderia*، وsucrose mineral salts للبكتيريا *Azotobacter* السائل، والصلب بعد إضافة 1 % من كلوريد الصوديوم، والتحضين لمدة 3–4 أيام عند درجة حرارة °30 م، ويُعد الاختبار موجبا عند ظهور العكاره على الوسط السائل، وظهور المستعمرات في الوسط الصلب، وحسب (Tchan, 1984).

اختبار تحلل النشا Starch hydrolysis test: أضيفت النشا الذائبة إلى الوسط الصلب الخالي من النتروجين بتركيز 2 % تمت إضافة قطرات من محلول Gram s' Iodin

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

solution إلى المستعمرات البكتيرية النامية على أطباق إجار النشا (Starch agar culture) بعد 3 أيام من التحضين في درجة حرارة °30 م، لاختبار قدرة الخلايا على تحلل النشا، ويُعد الفحص موجبا عند ظهور الهالات الرائقة حول المستعمرة (Ben Mahmud, 2008).

اختبار إنزيم الكاتاليز Catalase activity: أجري اختبار نشاط، أو تفاعل إنزيم الكاتاليز Catalase activity للخلايا البكتيرية النامية لمعرفة ما إذا كانت الخلايا هوائية أو لاهوائية التنفس حيث يحتوي إنزيم الكاتاليز على مركب الهيمو بورفيرين Hemmeporphyrin الذي يعد ميزة أيضا للسيتوكروم، وهي تعد من حوامل الإلكترونات في السلسلة التنفسية الموجودة في الكائنات الحية الهوائية، و ذلك بإضافة بضع قطرات من 3% H_2O_2 في كل عينة، ويلاحظ بدقة ظهور فقاعات أكسجين، وتكون رغوة على السطح كما في هذه المعادلة (Freeman, 1981):

$$2\ H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\ H_2O_2$$

وكذلك تم تحديد موضع منطقة نمو الخلايا في الأنبوب كمقياس لاحتياجاتها الأكسجينية، وذلك بصهر أنابيب تحتوي على بيئة من مستخلص الخميرة، والتربتون، واحتفظت درجة حرارته °100 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة لطرد الأكسجين المذاب ثم بردت الأنابيب حتى درجة °40-°42 م، وبعد ذلك لقحت الأنابيب كل منها تلقيحا كثيفا بإبرة التلقيح للخلايا البكتيرية المراد فحصها مع الحرص على عدم رج الأنابيب بطريقة تؤدي إلى دخول فقاعات هوائية داخل الآجار(الأنبوب)، وحضنت في درجة حرارة °30 م لمدة 72 ساعة ثم ملاحظة نمو الخلايا في الأنابيب ما إذا كانت سطحية (هوائي)، أو في عمق الأنبوب (لاهوائي)، أو نمو على طول الأنبوب (اختياري النمو).

اختبار استهلاك المصادر الكربونية المختلفة: تم اختبار مقدرة الخلايا البكتيرية على قدرة الخلايا على استخدام المواد الكربوهيدراتية، واستهلاك مصادر الكربونية، والمتمثلة في بعض من السكريات الأحادية، والثنائية Mannitol, Citrate, Fructose ,Glucose, Maltose Sucrose إذ أضيف كل سكر لوحدِه بصورة منفصلة بنسبة 1% وزناً أي1جم إلى 100 مليلتر من بيئة السائلة الخاصة لكل بكتيريا المراد اختبارها، وذلك بعد تعقيمها ثم حضنت في درجة °30 م، ولمدة 3 أيام، وأن نمو الخلايا البكتيرية على شكل عكارة دلالة على استهلاك الخلايا للمصدر الكربوني (Shankarapp & Madhav Rao, 1998)..

اختبار تحلل الجيلاتين Gelatine hydrolysis: اختبار تحلل الجيلاتين استعمل الوسط الصلب الخالي من النتروجين salts mineral sucrose الذي يحتوي على 12 %جيلاتين للكشف عن إنزيم gelatinize ، ولقُحت الأطباق بالخلايا البكتيرية، وحضنت في درجة °30 م، ولمدة 3 أيام، وإن النتيجة موجبة للاختبار تحلل الجيلاتين هو عدم تصلب الوسط الموجود بالأطباق (جميل وآخرون, 1993).

اختبار اختزال النتراتNitrate reduction: اختبار اختزال النترات أضيف 1جم من KNO_3 إلى لتر واحد من وسط السكروز السائل الخالي من النتروجين الملقح بالخلايا البكتيرية المراد اختبارها (بواسطة إبرة التلقيح Loop)، ويضاف محلول كشف اختزال النترات، و هي عبارة عن 1مللي من sulfarilic acid لكل أنبوب من الأنابيب الملقحة، ثم إضافة 1 مللي من محلول (dimethyl 1-naphthylamine)، وظهور اللون الأحمر يُعد مؤشرا على اختزال النترات إلى نتريت (Freeman, 1981).

اختبار إنزيم الأكسيديز: اختبار الأكسيديز تم به قياس قدرة الخلايا على أكسدة الآمينات العطرية حيث ترتبط هذه الأكسدة مع النشاط العالي لأنزيم السيتوكروم إكسيديز في بعض البكتيريا، ولوجود نتيجة إيجابية لاختبار الأكسيديز أهمية كبيرة في تعريف هذه الأجناس. أجري هذا الاختبار باستخدام إبرة تلقيح معقمة لنقل جزء من نمو المستعمرات النامية لكل العينات على حدة، ودعكها على شريط خاص باختبار

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

الأكسيديز، وبعد حوالي 30 ثانية لوحظ تغيير في لون المنطقة التي أضيفت إليها المستعمرات على الشريط، وظهور اللون الأزرق يعد دليلا على أن النتيجة إيجابية(Freeman, 1981).

اختبار كفاءة الخلايا البكتيرية للبكتيريا *Burkholderia* و*Azotobacter*على تثبيت النتروجين الجوي: اختبار كفاءة الخلايا البكتيرية لكل من بكتيريا *Burkholderia*، وبكتيريا *Azotobacter*، على تثبيت النتروجين الجوينُميت عزلات بكتيرية للبكتيريا *Burkholderia*، وللبكتيريا *Azotobacter* المراد اختبار كفاءتها في تثبيت النتروجين على وسط الأجار المغذي المائل Slant المصنع في شركة LBS Mumbai الهندية، وحضنت في درجة حرارة 30° م، لمدة 24 ساعة ثم أخذت من الخلايا البكتيرية النامية، والنقية المتحصل عليها لكل من البكتيريا *Burkholderia*، وبكتيريا *Azotobacter* بواسطة إبرة التلقيح (Loop) بإضافة 3 مليميتر الماء المقطر المعقم، ثم نقل اللقاح إلى أنابيب سعتها 10 مللي بعد ذلك أخذ 1 مللي من اللقاحات البكتيرية التي كثافتها 1.5×10^{8} خلية بكتيرية / مللي (Baron & Finegold, 1990)، ولقحت بها الأنابيب الحاوية على الوسط السائل الخالي من النتروجين-N) (free الخاص باختبار كفاءة الخلايا البكتيرية، وبثلاثة مكررات، ووضعت الأنابيب في الحضانة الهزازة (incubator shaker) لمدة 12 يوما ثم وضعت في حمام مائي، وعلى درجة حرارة 60° م لغرض التجفيف ثم قدر فيها النتروجين في جهاز كلداهل (Fao, 2008).

تم تحليل البيانات المتحصل عليها من التجربة إحصائيا باستخدام برنامج Minitab 15، وكذلك تحليل ثلاثي التباين لتحديد دلالة الفروق بين المتوسطات باستخدام اختبار توكي Tukey's test عند (P = 0.05)

النتائج والمناقشة

من النتائج المتحصل عليها من كل عينات الترب الممثلة للمدن الليبية المذكورة سابقا تبين أن نسبة المادة العضوية لجميع العينات تتراوح من 0.15 – 0.21 %، ونسبة كل من النيتروجين الكلي بين 6.12 .mg/kg – 7.56، ونسبة كل من الفوسفور المتيسر 11.5 mg/kg – 13.2، والبوتاسيوم 0.10meq/L – 0.15، ودرجة تفاعل التربة لجميع العينات تتراوح ما بين 7.6 – 8.2 ، ونسبة الملوحة أقل من 0.2 ds/m. وفي جدول (1) تبين أن أعداد كل من بكتيريا *Burkholderia*، والبكتيريا cfu*Azotobacter*/ جم تربة جافة في منطقة الجذور (ريزوسفير) النباتات المختلفة في ترب المناطق المختلفة الموضحة في جدول (2)، ويلاحظ أن هناك اختلافا في أعداد البكتيريا باختلاف مناطق أخذ العينات، وقد تراوحت أعداد بكتيريا *Burkholderia*، ما بين (9.4×10^{8} – 1.5×10^{3}) cfu/جم تربة أعداد بكتيريا *Azotobacter* مابين(195×10^{3} - 6.1×10^{10}) cfu/جم تربة، ويرجع ذلك إلى اختلاف الظروف البيئية، والمناخية، ونوع التربة، ونوع النباتات المزروعة، والمادة العضوية في التربة (Rana & Ramesh, 2013).

جدول (2). أعداد بكتيريا *Burkholderia* و *Azotobacter* في المناطق المختلفة cfu /جم تربة جافة

المنطقة	نوع النبات	أعداد بكتيريا *Burkholderia*	أعداد بكتيريا *Azotobacter*
عين زارة	طماطم	3.5×10^{7}	1.4×10^{8}
تاجوراء	فلفل	7.8×10^{3}	0.3×10^{4}
وادي الربيع	باذنجان	9.4×10^{8}	8.6×10^{4}
طريق المطار	قمح	5.5×10^{8}	6.5×10^{5}
ترهونة	زيتون	4.2×10^{6}	6.1×10^{10}
الزاوية	شعير	3.4×10^{4}	3.6×10^{5}
قصر بن غشير	قمح	1.2×10^{5}	2.95×10^{5}
صبراتة	ذرة	1.5×10^{3}	1.2×10^{5}
جنزور	موالح	1.0×10^{5}	1.95×10^{7}

نتائج اختبارات دراسة الصفات المجهرية، والكيموحيوية للخلايا البكتيرية المعزولة: تم عزل 10عزلات بكتيرية (Brenner et al., 2005) من ترب مناطق مختلفة من مدينة طرابلس، وضواحيها من منطقة جذور نباتات مختلفة كما هو موضح في جدول (1).من خلال دارسة الصفات المزرعية (المورفولوجية)،

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

والمجهرية، والكيموحيوية للشرائح الزجاجية الحاوية على الغشاء البكتيري النامي، وحسب ما ورد في المرجع (Bergey & JG, 1994; Bergey, 2004)

في جدول (3) تبين أن المستعمرات النامية التي شكلتها الخلايا البكتيرية على كل الأطباق (Burk’s medium) كانت أعمدة، لزجة، غير شفافة في البداية ثم تحولت إلى مستعمرا ت لامعة, حجمها من متوسطة إلى كبيرة, عصوية قصيرة. وتبين أيضا أن الخلايا سالبة لصبغة جرام, متحركة, هوائية, موجبة لاختبار الكاتاليز، ومن اختبار الأكسيديز تبين أن الخلايا لا تخمر السكريات، ولكن تمثلها تمثيلا تأكسديا بحيث ترتبط قدرتها على أكسدة الأمينات الحلقية بوجود السيتوكروم في سلسلتها التنفسية، وهذا هو أساس اختبار الأكسيديز, ونمت نمواً جيداً عند درجات الملوحة (1% من NaCl) مما يدل على قدرتها على التأقلم في الأوساط المالحة نسبيا. وكذلك نمت نمواً جيداً عند درجات الحرارة الدافئة °37 م، ولم يحدث أي نمو عند درجات الحرارة المنخفضة °4م، وهذا يتناسب نسبيا مع درجات الحرارة لهذه المناطق في ليبيا.

من الاختبارات التي أجريت على قدرة الخلايا على استخدام المواد الكربوهيدراتية المتمثلة في السكريات الأحادية، و الثنائية، و السكريات المتعددة كمصادر للكربون, فقد حدث نمو للخلايا في الأطباق التي تحتوي على Mannitol, Citrate , Fructose ,Glucose, Sucrose، ولم يحدث أي نمو على الأطباق التي تحتوي على Maltose كما هو موضح في جدول (4).

جدول (3). الصفات المجهرية لعزلات بكتيريا *Burkholderia*

المنطقة المعزولة منها	صبغة جرام	شكل الخلايا	تجميع الخلايا	الحركة	لون الغشاء المتكون
عين زارة	سالبة	عصوية قصيرة	مفردة	متحركة	حليبي
تاجوراء	سالبة	عصوية قصيرة	سلاسل	متحركة	ابيض
وادي الربيع	سالبة	عصوية	مفردة	متحركة	كريمي
طريق المطار	سالبة	عصوية	ثنائي	متحركة	حليبي
ترهونة	سالبة	عصوية قصيرة	سلاسل	متحركة	حليبي
الزاوية	سالبة	عصوية	مفردة	متحركة	حليبي
قصر بن غشير	سالبة	عصوية قصيرة	رباعية	متحركة	ابيض
صبراتة	سالبة	عصوية	رباعية	متحركة	كريمي
جنزور	سالبة	عصوية	مفردة	متحركة	كريمي

جدول (4) الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *Burkholderia*

المنطقة المعزولة منها	كاتاليز	الاكسيديز	النمو في درجة حرارة 37° و4°م	النمو في Burk media	تحلل الجيلاتين والنشا	اختزال النترات	النمو في 1% NaCL	استهلاك مصادر كربونية مختلفة			
								Mannitol	Fructose ,Glucose	Maltose	Sucrose Citrate
عين زارة	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+
تاجوراء	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+
وادي الربيع	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+
طريق المطار	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+
ترهونة	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+
الزاوية	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+
قصربن غشير	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+
صبراتة	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+
جنزور	+	+	+ / −	+	+	+	+	+	+	−	+

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

أوضحت نتائج الفحوصات، و الاختبارات على الصفات المتحصل عليها من الخلايا النامية في (Burk's medium)، والتي كان مصدرها عينات التربة المتمثلة المناطق الليبية بدليل (Bergey, 2004) تتطابق مع الصفات المورفولوجية، والمجهرية، والكيموحيوية للبكتيريا *Burkholderiasp*.

في جدول (5) تبين أن المستعمرات النامية التي شكلتها الخلايا البكتيرية على كل الأطباق (sucrose mineral salts - Jensen's media، و بدليل (Bergey's 2004) Manual of Determinativ Bacteriology.

تابعة للجنس *Azotobacter* من خلال دراسة الصفات المورفولوجية، والمجهرية، والكيموحيوية للخلايا النامية في الأطباق حيث كونت الغشاء البني على الوسط الغذائي (Sucrose mineral salts) وقد أظهر الاختبار المجهري أن الخلايا البكتيرية بأشكال عصوية قصيرة، أو كروية، و أظهرت تجمعات بشكل أزواج ثنائية، أو رباعية، أو سلاسل، أو خلايا مفردة، و كونت الغلاف الخارجي للحويصلة (cyst) وأنها سالبة لصبغةَ جرام، و ذات حركة نشطة (Jiménez et al., 2011).

جدول (5). الصفات المجهرية لعزلات بكتيريا *Azotobacter*

المنطقة المعزولة منها	صبغة جرام	شكل الخلايا	تجميع الخلايا	الحركة	لون الغشاء المتكون
عين زارة	سالبة	عصوية قصيرة	سلاسل	متحركة	بني
تاجوراء	سالبة	كروية	مفردة	متحركة	حليبي
وادي الربيع	سالبة	عصوية قصيرة	ثنائي	متحركة	بني فاتح
طريق المطار	سالبة	عصوية	مفردة	متحركة	بني
ترهونة	سالبة	كروية	سلاسل	متحركة	بني
الزاوية	سالبة	عصوية	سلاسل	متحركة	حليبي
قصر بن غشير	سالبة	عصوية	مفردة	متحركة	بني فاتح
صبراتة	سالبة	عصوية قصيرة	رباعية	متحركة	بيضاء
جنزور	سالبة	كروية	ثنائية	متحركة	بني

تبين في جدول (6) ومن خلال الاختبارات، ودراسة بعض الصفات المورفولوجية للخلايا البكتيرية، وقابلية نموها في بعض الأوساط، والصفات الكيموحيوية، وقدرتها على استهلاك بعض المواد الكربوهيدراتية، والسكريات، وكذلك يوضح أن جميع العزلات البكتيرية قادرة على النمو في درجة حرارة 37° م، وليس لها قدرة على النمو في درجة 4° درجة مئوية، والقدرة على النمو في وسط يحتوي على 1 % كلوريد الصوديوم، وأنها موجبة لاختبار الأكسيديز، والكاتاليز، وقادرة على تحلل النشا، والجيلاتين، وقابليتها لاختزال النترات، وأنها غير قادرة على النمو في وسط Burk.

كفاءة عزلات البكتيريا لبكتيريا *Burkholderia* و *Azotobacter* في تثبيت النتروجين الجوي: الجدول (7) يبين أن العزلات من الخلايا البكتيرية لبكتيريا *Burkholderia*، وبكتيريا *Azotobacter* المعزولة من ترب المنطقة الجذرية (رايزوسفير) لنباتات مختلفة من عدة مناطق في طرابلس، وضواحيها فاختلفت فيما بينهما في تثبيت النتروجين الجوي، وقد يرجع السبب في ذلك إلى الاختلاف في التركيب الوراثي، والجيني المسؤول عن تثبيت النيتروجين لكل منهما (Cheng, 2008)، أو اختلاف الإفرازات الجذرية النباتات المزروعة، أو اختلاف ظروف التربة لكل منطقة فكانت أعلى قيمة له 15.5 ملجم/ لتر بتأثير بكتيريا *Burkholderia* المعزولة من رايزوسفير نبات

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

القمح النامي في منطقة وادي الربيع تليها العزلات المعزولة من صبراتة، وجنزور، وترهونة وثبتت كمية من النتروجين مقدارها 15.2 ,15 ,14.5ملجم/ لتر على التوالي في حين كانت أقل كمية مثبتة 5.38 ملجم /لتر في منطقة قصر بن غشير، وكانت أعلى قيمة المثبتة للنيتروجين بتأثير بكتيريا *Azotobacter* 18.50 ملجم/ لتر المعزولة من منطقة ترهونة، وأقل قيمة 6.8 ملجم/ لتر من منطقة طريق المطار.

ويلاحظ من جدول (2) و(7) كلما زادت أعداد البكتيريا في التربة يزداد نشاط البكتيريا بها بدليل زيادة معدلات تثبيت النيتروجين الجوي فيها، وهذا كان واضحا في بكتيريا *Azotobacter*، أما بكتيريا *Burkholderia* خاصة في بعض الترب مثل تربة (منطقة طريق المطار) فقد لوحظ أن أعداد البكتيريا بها مرتفع، ولكن قيمة النيتروجين المثبت بها قليلة، وهذا قد يرجع إلى أنه ليست كل الأنواع من جنس هذه البكتيريا لها القدرة على تثبيت النيتروجين الجوي (Ben Mahmud, 2008). وقد لوحظ أيضا وجود فروق معنوية بين أعداد، وكمية النيتروجين المثبتة بين بكتيريا *Azotobacter*، وبكتيريا *Burkholderia*، ولكن يمكن استخدام كل منهما في برنامج التسميد الحيوي في الترب الليبية.

جدول (6). الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا Azotobacter

المنطقة المعزولة منها	كاتالين	الأكسيديز	النمو في درجة حرارة 37° و4°م	النمو في Burk media	تحلل الجيلاتين والنشا	اختزال النترات	النمو في 1% NaCl	استهلاك مصادر كربونية مختلفة			
								Mannitol	Fructose ،Glucose	Maltose	Sucrose Citrate
عين زارة	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+
تاجوراء	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+
وادي الربيع	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+
طريق المطار	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+
ترهونة	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+
الزاوية	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+
قصربن غشير	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+
صبراتة	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+
جنزور	+	+	+ / −	−	+	+	+	+	+	−	+

جدول (7) كمية النتروجين المثبتة (ملجم/لتر) من قبل بكتيريا 7 *Burkholderia* و*Azotobacter*

المنطقة المعزولة منها	بكتيريا *Burkholderia* ملجمN/لتر	بكتيريا *Azotobacter* ملجمN/لتر
عين زارة	10.69	14
تاجوراء	8.1	6.9
وادي الربيع	15.5	10.27
طريق المطار	5.56	6.8
ترهونة	14.5	18.07
الزاوية	9.45	18.5
قصر بن غشير	5.38	9.33
صبراتة	15.2	15.87
جنزور	15	13.27

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

المراجع

الحداد، محمد السيد مصطفى 1998 دور الأسمدة الحيوية بخفض التكاليف الزراعية، وتقليل تلوث البيئة،وزيادة إنتاجية المحصول، كلية الزراعة، جامعة عين الشمس، مصر .

الزعبي، محمد منهل، ونبيلة كريدي، و اواديس أرسلان 2007 عزل بكتيريا االأزوتوباكتر من بعض الترب السورية، واختبار فعاليتها في تثبيت الأزوت الجوي في التربة، مجلة باسل الأسد للعلوم الهندسية. العدد 37.

بن محمود، ميرفت الطاهر 2016 تأثير التسميد الحيوي ببكتيريا Azotobacter Spp ومعدلات مختلفة من سماد اليوريا في نمو نبات الشعير. المجلة السورية للبحوث الزراعية. 3 (1 :)213–219.

جميل سيف الدين محمد , الزروق مصباح، و صلاح محمد الزوي 1993. الدراسة العملية للبكتيريا والفطريات، الطبية. الدار العربية للنشر والتوزيع

Baron, F., & Finegold, S. (1990). Diagnostic Microbiology, 8th h ed. *The CV Mosby Co., St. Louis*.

Becking, J. H. (1992). The family azotobacteraceae. In *The prokaryotes* (pp. 3144-3170). Springer.

Ben Mahmud, M. (2008). *The effect of Burkholderia as biofertiliser on cereal productivity* Ph. D. Dissertation, Biotechnology and Environmental Biology (School of …].

Black, C. (1965). Methods of soil analysis part 1 physical properties Am. Soc. Agron. *Inc. publisher, Madison Wisconsin, USA*.

Bergey, D. H. (2004). *Bergey's manual of systematic bacteriology: the proteobacteria*. Springer.

Black, C. (1965). Methods of soil analysis part 1 physical properties Am. Soc. Agron. *Inc. publisher, Madison Wisconsin, USA*.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., & Garrity, G. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer.

Cheng, Q. (2008). Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of integrative plant biology*, *50*(7), 786-798.

Fao, F. (2008). Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. *FAO Fertilizer and Nutrition Bullet*, *15*.

Freeman, W. (1981). Microbes in action, a laboratory manual of microbiology, published in the United States. *New York and Oxford Rights*.

Harvey, R., & Price, T. (1967). The isolation of salmonellas from animal feedingstuffs. *Epidemiology & Infection*, *65*(2), 237-244.

Jiménez, D. J., Montaña, J. S., & Martínez, M. M. (2011). Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus Azotobacter in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, *42*(3), 846-858.

Osip, C., Ballescas, S., Osip, L., Besarino, N., Bagayna, A., & Jumalon, C. (2000). Philippine council for Agric. *Forestry and Natural Resources Research and Technology*, *143*, 17-18.

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

Rana, R., & Ramesh, K. P. (2013). Biofertilizers and their role in agriculture. *Pop Kheti, 1*, 56-61.

Shankarapp, T., & Madhav Rao, A. (1998). Characterization and identification of Azotobacter strains Isolated. From mulberry rhizosphere Scil. *Biofertilizers and biopesticiders A. M Deshmukh*.

Sharma, A. (2003). Biofertilizers for Sustainable Agriculture. Agrobios, India. Shetty. S., Singhal KS and Kulkaria PR Antimicrobial properties of cumin. *J. Microbial Biotech, 10*, 230-233.

Tchan, Y.-T. (1984). Genus 1. Azotobacter Beijerinck 1907, 567. *Bergey's manual of systematic bacteriology, 1*, 220-229.

Thompson, J. P., & Skerman, V. B. D. (1979). Azotobacteraceae: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria.

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

Isolation and characterisation of the efficiency of *Azotobacter* and *Burkholderia* bacteria locally isolated from Libyan soils in fixing atmospheric nitrogen

Merfat T. Ben Mahmud* and Eman A. Ferjani
Department of. Soil and Water, Faculty of Agriculture. Tripoli University, Tripoli, Libya

Received: 01 November 2021/ Accepted: 23 January 2022
Doi: https://doi.org/10.54172/mjsc.v37i1.381

Abstract: An experiment was conducted in the Soil Microbiology Laboratory of the Faculty of Agriculture, University of Tripoli, testing the efficiency of locally isolated *Azotobacter* and *Burkholderia* in fixing atmospheric nitrogen. The experiment included isolation and diagnosis of *Azotobacter* and *Burkholderia* from near-root soils of various plants brought from different regions of the city of Tripoli and its surrounding suburbs. Ten isolates were obtained as a result of making dilutions of these soils. The biochemical, morphological, and microscopic traits of them were studied. The results showed that all isolates belong to the two types of *Azotobacter* and *Burkholderia* and that the numbers of *Azotobacter* bacteria are abundant in the root zone (Rhizosphere) of some plants used in the research, whose numbers ranged between (1.95×10^3-6.1×10^{10}) cfu/gm soil. Also, the amount of nitrogen fixation by *Azotobacter* bacteria ranged between (6.8 -18.50) mg/l, while *Burkholderia* bacteria numbers ranged between ($9.4 \times 10^8 - 1.5 \times 10^3$) cfu/gm soil and the amount of nitrogen fixation ranged between (5.38-15.50) mg/l. There were also significant differences between *Azbacter* and *Burkholderia* bacteria in terms of their numbers and ability to fix atmospheric nitrogen. However, both genera can be used in biological fertilization programs in Libyan soil.

Keywords: Isolation, *Azotobacter* and *Burkholderia* Bacteria, Rhizosphere, fixated atmospheric nitrogen.

***Corresponding author:** Merfat T. Ben Mahmud *dr.mbenmahmoud@yahoo.com*, Department of. Soil and Water, Faculty of Agriculture. Tripoli University, Tripoli, Libya