

عزل سلالات من البكتيريا المثبتة للأزوت الجوي من تربة حميمة في محافظة حلب واختبار فعاليتها في تثبيت الأزوت الجوي

غفران حجيرة*⁽¹⁾ وأميمة ناصر⁽¹⁾ ونبيلة كريدي⁽²⁾

(1). قسم وقاية البيئة، المعهد العالي لبحوث البيئة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

(2). الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

(*المراسلة: م. غفران حجيرة. البريد الإلكتروني: ghofran.hogira@hotmail.com)

تاريخ القبول: 2022/05/26

تاريخ الاستلام: 2022/02/14

الملخص:

يهدف الحصول على عزلات نقية من بكتيريا الأروسبريليوم المثبتة للأزوت الجوي من التربة المحلية، واختبار كفاءتها في عملية التثبيت لاستخدامها كسماد حيوي، عزلت عشر من السلالات البكتيرية من ترب تابعة لعدة مواقع في منطقة حميمة في محافظة حلب، أجريت التجارب في مركز البحوث الزراعية بحلب بتاريخ 2020، أختبرت فعالية هذه العزلات في تثبيت الأزوت الجوي وذلك بتلقيحها على بيئات سائلة خالية من الأزوت، مع وجود شاهد لم يلحق بالبكتيريا، وتم توصيف العزلات الأكثر فعالية اعتماداً على الصفات الشكلية والمزرعية و بعض الاختبارات البيو كيميائية. أظهرت النتائج تفوق ثلاث عزلات بتثبيت الأزوت الجوي حيث وصلت نسبة تثبيت الأزوت الجوي للعزلات الثلاثة السادسة والرابعة والثالثة على التوالي (12.4) (8.7) (6.2) مغ N/غ، في كما أظهرت نتائج التوصيف أن البكتيريا السادسة هي *Azospirillum brasilense* والرابعة هي *Azospirillum lipoferum*، والثالثة هي *Azospirillum amazonense*

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المثبتة للأزوت، *Azospirillum*، تربة حميمة، الأزوت.

المقدمة:

يعد الأزوت من العناصر الكبرى الغذائية الضرورية في نمو وإنتاج النبات، حيث يحتاجها النبات بكميات كبيرة خلال مراحل نموه، إلا أنه غير متوفر في التربة كباقي العناصر لأسباب منها الخسائر النسبية للأزوت بانتظام من التربة من خلال عمليات النترجة الميكروبية - نزع الأزوت بالإضافة إلى الترشيح والتطاير والعمليات الطبيعية الأخرى، بالإضافة لزيادة تكاليف إنتاج الأسمدة الأزوتية (Spiertz, 2010)، على الرغم من وجوده بكمية كبيرة في الغلاف الجوي (78%)، جزء منه يصل للأرض عن طريق البرق والصواعق حيث يمكن للطاقة الكامنة فيما أن تقوم بتحويل غاز الأزوت من الجو إلى غاز ثاني أكسيد النيتروجين NO₂ فنترات NO₃ وبذلك يصل الأزوت إلى سطح الأرض والتربة مع مياه الأمطار ليصبح في متناول النباتات، غير أن كمية الأزوت المثبتة بهذه الطريقة قليلة جداً ولا تفي بحاجة النبات، إذا ما قورنت بطريقة التثبيت الحيوي، حيث أن للأحياء الدقيقة المثبتة للأزوت الجوي القدرة على تثبيت ما يقارب 17.2 * 10⁷ طن أزوت/سنة (Kanimozhi and Panneerselvam, 2010)، حيث تقوم أنواع محددة من الأحياء الدقيقة بتثبيت الأزوت من الهواء الجوي لتستخدمه في بناء أجسامها وتقوم بإفراز جزء من

الأزوت المثبت خارج خلاياها وتتركه في التربة، وتختلف كميته هذه حسب نوع الكائن الحي الدقيق وحسب الظروف المحيطة بعملية التثبيت (المدني، 2009)، وهذه الكمية يمكن أن تحل محل السماد المعدني في تلبية الطلب على النيتروجين. اكتسب التثبيت الحيوي للأزوت بواسطة الكائنات الحية الدقيقة أهمية أكبر لأنه المصدر الرئيس للأزوت، إذ تعد البكتيريا المثبتة للأزوت الجوي بنوعها التعايشية وغير التعايشية من أهم أنواع البكتيريا المستعملة في مجال التسميد الحيوي.

يعرف التثبيت الحيوي للأزوت *Diazotrophs* أنها عملية اختزال غاز الأزوت إلى أمونيا، بواسطة الأحياء الدقيقة بدائية النواة الموجودة في التربة ويساعدها في ذلك امتلاكها أنزيم النتروجيناز، ووجود مصدر للطاقة هو أدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP) وبعض المعادن (Rosenblueth et al. 2018) عرفت بعض أنواع البكتيريا بقدرتها على تثبيت الأزوت الجوي إما تكافلياً مثل الريزوبيوم التي تتعايش مع جذور النباتات البقولية أو بشكل حر وتعد *Azotobacter* و *Azospirillum* من أكثر الأحياء المثبتة للأزوت كفاءة (Kennedy and Toukdarian, 1987 ; Merrick and Edwards., 1995).

تعد *Azospirillum* واحدة من البكتيريا المعززة لنمو النبات (PGPR) *plant growth-promoting bacteria* ، يمتاز هذا الجنس بكونه متعدد الاستخدامات يمتلك مجموعة كبيرة من الآليات وأهم ما يميزه هو تثبت الأزوت في الغلاف الجوي، وإنتاج هرمونات نباتية وتعزيز نشاط المجموع الجذري، كما يحسن امتصاص المياه والعناصر المعدنية، والتخفيف من الضغوط البيئية للنباتات مثل تخفيف الإجهاد (الملح ، الجفاف ، المركبات السامة) والسيطرة على العديد من مسببات الأمراض النباتية، قد تختلف هذه المزايا وفقاً للبيئة والأنواع النباتية، وسلالة *Azospirillum* (Bashan and De-Bashan, 2010). إن البكتيريا التابعة لجنس *Azospirillum* لها تأثيرات إيجابية تتعدى تثبيت الأزوت الجوي إلى تشكيل وإنتاج الهرمونات النباتية واختزال النترات وتعزيز امتصاص العناصر الغذائية، ويوجد العديد من الدراسات أشارت إلى دور أنواع مختلفة منها في إذابة الفوسفور المثبت (El-Komy, 2005).

بينت دراسة Santa وآخرين (2004) أن التلقيح ببكتيريا *Azospirillum sp.* يكافئ 20% من الأسمدة الأزوتية الموصى بها بالنسبة لنبات الشعير.

بينت دراسة Ferreira وآخرين (2013) أنه عند التسميد الحيوي ببكتيريا *Azospirillum brasilense* لنبات الذرة زادت إنتاجية الحبوب بنسبة (29)%.

أكد Mehnaz (2015) إمكانية استخدام بكتيريا *azospirillum* كسماد حيوي للعديد من المحاصيل كالقمح والأرز ، حيث تعمل هذه البكتيريا على تثبيت الأزوت الجوي وتحوله إلى نشادر في التربة (Halina et al. 2012).

أكدت دراسة Fukami وآخرين (2018a) أن البكتيريا *Azospirillum brasilense* تملك القدرة على إنتاج عديدات السكاريد الخارجية لجذور النباتات، إضافة إلى قدرتها على الحركة هذا يساعدها على رفع كفاءة النبات بالمغذيات.

حيث أن الآثار والنتائج المفيدة لمثبتات النيتروجين تجعل الأسمدة الحيوية أكثر فائدة من الأسمدة الكيميائية، من هنا جاء هذا البحث لرصد الأبحاث العلمية في هذا المجال في البحث عن أفضل الطرائق وأبسطها، وهي الطريقة الحيوية، وذلك بعزل وتصنيف بعض البكتيريا المتخصصة بتثبيت الأزوت الجوي من التربة المحلية، لاستخدامها كمخصبات حيوية في المجال الزراعي كونها رخيصة الثمن صديقة للبيئة، وبالتالي الحصول على قيمة اقتصادية بتخفيض تكلفة الإنتاج الزراعي من جهة مضافة للقيمة البيئية، لذا تتمثل الأهداف الأساسية للبحث بعزل جراثيم مثبتة للأزوت الجوي من تربة محلية واختبار فعالية هذه العزلات على تثبيت الأزوت الجوي على نباتات انتخابية.

طرائق البحث ومواده:

جمع العينات:

جمعت عينات التربة من ثلاثة مواقع في منطقة حميمة في محافظة حلب خلال العام (2019-2020) م، حيث أخذ من كل موقع عدة عينات مركبة من عمق (5-15) سم بواسطة أداة حادة معقمة، وضعت العينات في أكياس بولي إيثيلين، نقلت إلى المختبر لإجراء (Neill)، *et al.*، 2007 التحاليل اللاحقة عليها حفظت بالثلاجة حتى بدء العمل فيها

تحليل التربة: قُدِّرَ الأزوت الكلي بطريقة كلاله، بعد هضم عينات التربة. قُدِّرَ الفسفور المتاح بطريقة (Olsen 1982) باستخدام جهاز المطيافية الضوئي. (Spectrophotometer) قُدِّرَ البوتاسيوم المتاح في مستخلص ملحي من خلات الأمونيوم باستخدام جهاز اللهب. (Flam-photometer) قُدِّرَت المادة العضوية بطريقة الأكسدة الرطبة بديكرومات البوتاسيوم بطريقة (Black وWalkley، 1934) قُدِّرَت الكربونات الكلية بواسطة جهاز الكالسيوم. قُدِّرَ التحليل الميكانيكي بطريقة الهيدروميتر).

عزل بكتيريا الازوسبيريليوم:

عزلت بكتيريا الازوسبيريليوم على بيئات انتخابية سائلة باستعمال بيئة (Nitrogen free bromothymol) (بروموثيمول خالٍ من الأزوت) (Nfb) ومعقمة في دوارق مخروطية 500 مل وضع فيها 250 مل من البيئة، أضيفت لها (1) غ من عينة التربة، واضيف لكل (1) ليتر منه بعد التعقيم كمية (15) مل من محلول معقم محضر بالنسبة (400:1) من صبغة أحمر الكونغو في الماء المقطر، وذلك بهدف عزل *Azospirillum sp.* بمعزل عن البكتيريا الأخرى المثبتة للأزوت الجوي، وذلك لأن *Azospirillum sp.* يملك القدرة على امتصاص صبغة أحمر الكونغو دون الأجناس الأخرى المثبتة للأزوت الجوي، والتي تنمو على الوسط المغذي ذاته حضنت الدوارق لمدة 10 أيام على درجة حرارة 2 ± 30 ، ثم عزلت هذه البكتيريا من وسط الدورق كونها بكتيريا لا هوائية تم زراعة البكتيريا الناتجة على أطباق بتري تحوي البيئة السابقة بعد إضافة الإجار لها وحضنت الأطباق في درجة حرارة (32) درجة مئوية مدة (24-48) ساعة، ثم تم تنقيتها بطريقة التخطيط حتى الحصول على عزلات نقية، وحفظت العزلات الناتجة بأنابيب اختبار مائلة تحتوي على البيئة نفسها بالبراد لحين الاستعمال. بلغ عدد العزلات الناتجة عشر عزلات من بكتيريا الازوسبيريليوم (Okon *et al.*, 1977, Caceres, 1982; Mac, 2003)

توصيف البكتيريا المثبتة للأزوت الجوي اعتماداً على الاختبارات البيوكيميائية:

تم دراسة خصائص المستعمرات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المغذية، وصبغها بصبغة غرام (Akhter، 2012)، والتعرف على أشكالها تحت المجهر، وإجراء بعض الاختبارات البيوكيميائية لمعرفة مقدرة البكتيريا المعزولة على تخمير السكريات الغلوكوز والفركتوز المالتوز اللاكتوز المانيتول الرافينوز والأرابينوز والسكروز والكيلوز، إنتاج الإندول وكبريتيد الهيدروجين واختبار Voges-proskauer، و السيترات وإنتاج اليوريا واختبار الأوكسيداز وإسالة الجيلاتين حسب (Mac، 2003)، وتم توصيف البكتيرية اعتماداً على دليل بيرجي (Krieg).

اختبار كفاءة العزلات البكتيرية *Azospirillum sp.* في تثبيت الأزوت الجوي

تم إجراء كفاءة تثبيت N_2 لعزلات *Azospirillum*. بزرع العزلات البكتيرية المعزولة سابقاً ببيئة (Nfb) النصف سائلة والمعقمة، بدورق مخروطي 250 مل، وضع فيه 100 مل من البيئة، بثلاث مكررات لكل عزلة. (أي تم زراعة 30 دورق مخروطي)، بالإضافة لمعاملة الشاهد (3 مكررات) بدون عزلة، حضنت بالحاضنة الرجاجة لمدة 10 أيام. بسرعة 100 دورة بالدقيقة وعلى درجة حرارة 28 ± 2 .

قدر الأزوت الكلي في البيئات السائلة السابقة بعد هضم عينة السائل المغذي بإضافة 3 مل من H_2SO_4 المركز وإضافة المحلول المكون من [(نسبة 50: 10: 1 من كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4 ، وكبريتات النحاس $CuSO_4$ والسيلينيوم المعدني)] لتسريع عملية الهضم.

وضعت العينة في جهاز الهضم على درجة حرارة 130 درجة مئوية لمدة نصف ساعة ثم على الدرجة 380 درجة مئوية لمدة 4 ساعات حتى يصبح المحلول عديم اللون، وبالتزامن مع انطلاق أبخرة، تمت إضافة 10 مل من هيدروكسيد الصوديوم (40) % إلى جهاز التقطير، ثم إضافة 10 مل من كاشف حمض البوريك (4) % و 3 قطرات من المؤشر المختلط. تم وضع أرلنماير تحت مكثف جهاز التقطير لاستقبال ناتج التقطير، يتم وضع شاهد قياسي يحتوي حمض كلور الماء HCl، ومعايرة ناتج التقطير مع الشاهد بحمض كلور الماء، وحسب نسبة الأزوت في العينة كالاتي Kanimozhi and Panneerselvam (2010):

$$\text{Percentage of N}_2 \text{ in the sample} = \frac{\text{Sample titer} - \text{Blank titer}}{\text{Sample wt. in g} \times 1000} \times \text{Normality of HCl} \times 14 \times X$$

النتائج والمناقشة:

نتائج التحاليل الفيزيائية والكيميائية للتربة المدروسة

بينت نتائج التحاليل الفيزيائية والكيميائية على التربة المدروسة أنها ذات بنية رملية طينية لومية، كما هو موضح في الجدول (1)

الجدول (1): التحاليل الفيزيائية والكيميائية للتربة المدروسة

القيمة			العامل المدروس
8.05			pH
2.62			Ec (مليغرام/سم)
2.28			المادة العضوية %
13.45			N المعدني (PPM)
7			P المتاح (PPM)
280			K (PPM)
25.8			كربونات الكالسيوم
4.75			الكلس الفعال
44			السعة التبادلية الكاتيونية مكافئ/100 غ تربة
طين	سنت	رمل	التحليل الميكانيكي
%26	%22	%52	
رملية طينية لومية			نوع التربة حسب مثلث القوام

نتائج عزل البكتريا المثبتة للأزوت الجوي

تم الحصول على عشر عزلات من البكتريا المثبتة للأزوت الجوي من التربة من منطقة حميمة في حلب، حيث نمت المستعمرات البكتيرية على الوسط المغذي نصف الجامد Nfb على شكل مستعمرات بيضاء حبيبية الشكل تحت السطح العلوي للوسط، وظهرت المستعمرات البكتيرية المثبتة للأزوت الجوي على الوسط المغذي حمض المالك بلون أبيض إلى كريمي، وظهرت بوضوح بوجود صبغة أحمر الكونغو بلون أحمر وردي تدرج من الفاتح إلى الغامق تبعاً للكمية الممتصة من صبغة أحمر الكونغو، وذلك باختلاف النوع البكتيري النامي على هذا الوسط المغذي، وذلك وفقاً لدراسات عدة باحثين Lakshmi وآخرين (1985)، والباحث Fukami وآخرين (2018a)، (2018b) والباحث Fukami وآخرين (2016)، وتوافق هذا مع دراسة Lakshmi وآخرين

(2007)، ودراسة Attitalia وآخرين (2010) حيث تم عزل بكتريا مثبتة للأزوت الجوي في كلا الدراستين.

نتائج اختبار العزلة البكتيرية الأكثر كفاءة في تثبيت الأزوت الجوي:

يبين الجدول (2) اختلاف في قدرة العزلات البكتيرية العشرة على تثبيت الأزوت الجوي، حيث تفوقت كافة العزلات على الشاهد في تثبيت الأزوت الجوي الذي كان فيه تثبيت الأزوت الجوي معدوم. كما بينت النتائج أن العزلة البكتيرية الأكثر كفاءة في تثبيت الأزوت الجوي هي العزلة البكتيرية السادسة، حيث بلغت كمية الأزوت التي تثبتها (12.4) مغ/N، تلاها العزلة البكتيرية الرابعة ، وبلغت الكمية المثبتة من الأزوت الجوي (8.7) مغ/N، ثم العزلة البكتيرية الثالثة، وبلغت الكمية المثبتة من الأزوت الجوي (6.2) مغ/N.

الجدول (2): كمية الأزوت الجوي المثبتة من قبل العزلات البكتيرية

رقم العزلة	كمية الأزوت التي تم تثبيتها مغ/N
1	4.2
2	.35
3	6.2
4	8.7
5	1.12
6	12.4
7	2.2
8	4.3
9	4.5
10	2.93
الشاهد	0

توافقت هذه الدراسة مع دراسة Kanimozhi وPanneersel (2010) من حيث قدرة العزلات البكتيرية المختلفة على تثبيت الأزوت الجوي.

توصيف العزلات البكتيرية الأكثر فعالية:

الخصائص المزرعية والمجهريّة والاختبارات البيوكيميائية للعزلة البكتيرية A6:

تبدو البكتريا بشكل عصيات منحنية إلى لولبية الشكل، متحركة بسوط قطبي وسياط أخرى قصيرة الطول، سالبة صبغة غرام، اعتماداً على دليل بيرجي (1984)، (1994)، وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع Perez و Casas (2005)، ظهرت المستعمرات على وسط المالات بلون أبيض إلى كريمي، تخمر الغلوكوز والفركتوز المالتوز اللاكتوز المانيتول الرافينوز والأرابينوز والسكروز والكزيلوز بشكل إيجابي، إنتاج الإندول وكبريتيد الهيدروجين واختبار Voges-proskauer سلبى، أما بالنسبة لتفاعل استخدام السيترات وإنتاج اليوريا واختبار الأوكسيداز وإسالة الجيلاتين إيجابي.

تبين نتيجة الاختبارات البيوكيميائية أن العزلة البكتيرية الأولى هي *Azospirillum brasilense*، وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة Vijayalakshmi و Mahadeva (2019) حيث تم توصيف هذه العزلة البكتيرية اعتماداً على الخصائص البيوكيميائية.

الخصائص المزرعية والمجهريّة والاختبارات البيوكيميائية للعزلة البكتيرية الرابعة A4

ظهرت البكتريا على شكل قضيب قصير ملتوي قليلاً، متحركة بعدة سيات أقصر بالمقارنة مع النوع البكتيري الأول ، سالبة صبغة غرام، اعتماداً على دليل بيرجي (1984) و (1994)، ظهرت المستعمرات على وسط المالات بلون أحمر فاتح، تخمر الغلوكوز

بشكل إيجابي فعال، كما أن تخمير الفركتوز المالتوز واللاكتوز والمانيتول والرافينوز إيجابي، أما تخمر السكروز والكريلوز والأرابينوز سلبي، أما بالنسبة لتفاعل إنتاج الأندول واختبار Voges-proskauer وإنتاج كبريتيد الهيدروجين وإسالة الجيلاتين وإنتاج الحمض سلبي، بينما استخدام السيترات وإنتاج اليوريا واختبار الأوكسيداز إيجابي.

تبين نتيجة الاختبارات البيوكيميائية أن العزلة البكتيرية الثانية هي *Azospirillum lipoferum*، وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة Hungria وآخرين (2010)، ودراسة Okon وآخرين (1977)، حيث تم في الدراستين توصيف العزلات البكتيرية *A.lipoferum* اعتماداً على الاختبارات البيوكيميائية.

الخصائص المزرعية والمجهريّة والاختبارات البيوكيميائية للعزلة البكتيرية الثالثة: A3

ظهرت البكتريا على شكل قضيب ملتوي قليلاً، متحركة بسيطا قصيرة، سالبة صبغة غرام، اعتماداً على دليل بيرجي (1984) و (1994)، ظهرت المستعمرات على وسط المالات بلون أصفر فاتح، تخمر السكروز بشكل إيجابي فعال، تخمر الفركتوز والمالتوز واللاكتوز والمانيتول بشكل إيجابي، بينما تخمر الغلوكوز والكريلوز والرافينوز والأرابينوز سلبي، أما بالنسبة لتفاعل إنتاج الأندول وكبريتيد الهيدروجين وإسالة الجيلاتين واختبار Voges-proskauer سلبي، بينما إنتاج اليوريا واختبار أوكسيداز واستخدام السيترات إيجابي، توافقت هذه النتائج مع دراسة Lakshmi وآخرين (2007)، ودراسة Oda وآخرين (2000).

تبين نتيجة الاختبارات البيوكيميائية أن العزلة البكتيرية الثالثة هي *Azospirillum amazonense*، وقد توافقت هذه النتيجة مع دراسة Lakshmi وآخرين (2007)، ودراسة Oda و Jos (2000)، حيث تم في الدراستين تمطيط العزلة البكتيرية *A. amazonense* اعتماداً على الاختبارات البيوكيميائية.

الاستنتاجات :

- عزلت سلالات متنوعة تابعة لبكتيريا *Azospirillum* من تربة الحميرية في محافظة حلب.
- تباينت هذه السلالات في مقدرتها على تثبيت الأزوت الجوي، إذ كان النوع *Azospirillum brasilense* أكثر كفاءة في تثبيت الأزوت الجوي من النوعين *Azospirillum lipoferum* و *Azospirillum amazonense*.

التوصيات:

- استخدام العزلات كمخصب حيوي لزيادة تركيز الأزوت في التربة أو بشكل داعم للتسميد المعدني.
- الاستفادة من المخزون الحيوي المتوفر في التربة المحلية واستثمارها في زيادة خصوبة التربة.

المراجع:

المدني، محمد، (2009). دليل تحويل الأراضي الزراعية إلى مزارع عضوية للمزارع الصغير. هيئة التبادل الاستشاري الشمالي والجنوبي للزراعة المستدامة "COSPE" 38 صفحة.

Akhter Md. S., Hossain Sj., Hossain Ask, Datta, Rk. (2012). Isolation and characterization of salinity tolerant Azotobacter sp. Gr. J Biol. Sci و 2(3),043-051.

Attitalla Ih., Abobaker Ma., Muftah An., Amir Hg., Latiffah Z., Hasnah Mj et al. (2010). Occurrence and microbiological characteristics of Azospirillum strains associated with leguminous and non-leguminous plants in Al jabal Al Akhdar eco-Region, Libya. American Eurasian J Agric. Environ. Sci, 8(6):617-625.

Bashan, Y., De-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium Azospirillum promotes plant growth a critical assessment? Advances in agronomy, (108), 77-136.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (1984). 9th Ed. Williams, V. I. and wilkins, Baltimore, 94-104.

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (1994). 9th Ed, Williams R. H., (Eds.), Williams and Wilkins, Maryland, USA.
- El-Komy, H. M. (2005). Immobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus magisterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *J. Food. Technol. Biotechnol*, 43(1), 19-27.
- Caceres, E. A. R. (1982). Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4): 990-991.
- Ferreira, As., Pires, Rr., Rabelo, Pg, *et al.* (2013). Applied soil ecology implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. *Appl Soil Ecol*, (72), 103–108.
- Fukami, J., Abrantes, Jf., Delcerro, P., Nogueira, Ma., Ollero, Fj., Megías, M., Hungria, M. (2018a). Revealing different strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Arch Microbiol*, (200),47–56.
- Fukami, J., Cerezini, P., Hungria, M. (2018b). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, (8),73.
- Fukami, J., Nogueira, Ma., Araujo, Rs., Hungria, M. (2016). Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express*, (6), 3.
- Halina, Podbielska., Igor, Buzalewicz., Agnieszka, Suchwałko., Alina, Wieliczko. (2012). Bacteria Classification by Means of the Statistical Analysis of Fresnel Diffraction Patterns of Bacteria Colonies. *Biomedical Optics*, 37(3),1-17.
- Hungria, M., Campo, Rj., Souza, Em., Pedrosa, Fo.. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil*, (331),413– 425.
- Kanimozhi, K., Panneerselvam, A. (2010). Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp. Isolated from Thanjavur district. *Der Chemica Sinica*, 1(3), 138-145.
- Kennedy, C., Toukdarian, A. (1987). Genetics of Azotobacters: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Annu. Rev. Microbiol*, (41), 227-25
- KRIEG, V.R., Dobereiner, J. (1984). Genus *Azospirillum*. In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, (1), 99.
- Lakshmi, Nr., Rafi Mm, Rao Kvb., Charyulu, Pbbn. (2007). Population and nitrogen fixation by *Azospirillum* spp. isolated from the rhizosphere of foxtail millet. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 9(3),515-518.
- Lakshmi Sadasivam, C., Carlos, A., Neyra, C. A. (1985). *J. Bacteriol*, (2),716-725.
- Mac Faddin, J. (2003). *Biochemical tests for the identification of clinically important bacteria*, Ed. Medical Panbamericana, pp. tests. 850.
- Mehnaz, S. (2015). *Azospirillum*: a biofertilizer for every crop. In *Plant microbe's symbiosis*: Springer, New Delhi, Applied facets, 297-314.
- Merrick, M.J., Edwards, R.A. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev*, (59), 604-622.
- Neill, M., Ouinones, A., Ackerman, L. (2007). *Wastewater Sampling: Operating Procedure*. U.S. Environmental Protection Agency Science and Ecosystem Support Division Athens, Georgia.
- Oda Steenhoudt, Jos Vanderleyden. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects.
- Okon, Y., Albrecht, S. L. And Burris, R. H. (1977). Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol*, (33), 83-87.
- Perez, J., M. Casas. (2005). Study of the interaction plant *Azospirillum* in sugar cane (*Saccharum* sp.) Crop.

- Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M. A., Reyes-Hernández, B. J., Martínez-Romero, J. C., ... & Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen fixation in cereals. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1794. ROSENBLUETH M., ORMEÑO-ORRILLO E., LÓPEZ-LÓPEZ A., ROGEL M.A., REYES-HERNÁNDEZ B.J., MARTÍNEZ-ROMERO J.C., REDDY P.M., MARTÍNEZ-ROMERO E. (2018). Nitrogen Fixation in Cereals. *Front. Microbiol.* (9), 9.
- Santa, O. R. D., Hernandez, R. F., Alvarez, G. L. M., Junior, P. R., Soccol, C. R.. (2004). *Azospirillum* sp. Inoculation in Wheat, Barley and Oats Seeds Greenhouse Experiments. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(6), 843-850.
- Spiertz, J. H. J. (2010). Nitrogen, sustainable agriculture, and food security. A review. *Agron. Sustain. Dev.* (30), 43-55
- Vijayalakshmi, N., Mahadeva, S. (2019). Morphological and biochemical characterization of *Azospirillum* isolates from rhizoplane of foxtail millet *Setaria italica* (L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 114-118.
- Walkley, A. and Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37(1), 29-38.

Isolation of Strains of Atmospheric Nitrogen-Fixing Bacteria from Hamima Soil in Aleppo Governorate and Testing their Effectiveness in Fixing Atmospheric Nitrogen

Ghufran Hujaira*⁽¹⁾, Omiema Nasser⁽¹⁾, and Nabila Kreidi⁽²⁾

(1). Department of Environmental Protection, Higher Institute for Environmental Research, Tishreen University, Lattakia, Syria.

(2). General Commission for Scientific Agricultural Research, Damascus, Syria.

(*Corresponding author: Ghufran Hujaira, E-mail: dr.mbenmahmoud@yahoo.com).

Received: 14/02/2022

Accepted: 26/05/2022

Abstract

In order to obtain pure isolates of atmospheric nitrogen-fixing *Azospirillum* bacteria from local soil, and testing their efficiency in the fixation process for use as a bio-fertilizer, ten bacterial strains were isolated from soil belonging to several sites in Hamima area in Aleppo governorate. Experiments were conducted at the Agricultural Research Center in Aleppo on the date of 2020, the effectiveness of these isolates was tested in fixing atmospheric nitrogen by inoculating them on nitrogen-free liquid environments, with a witness that was not inoculated with bacteria. The results showed the superiority of three isolates with atmospheric nitrogen fixation, where the percentage of atmospheric nitrogen fixation for the sixth, fourth and third three isolates, respectively, reached (12.4) (8.7) (6.2) mg N/g, while the characterization results showed that the sixth bacteria is *Azospirillum brasilense*, and the fourth is *Azospirillum lipoferum*, the third is *Azospirillum amazonense*.

Key words: nitrogen-fixing bacteria, *Azospirillum*, intimate soil, nitrogen.