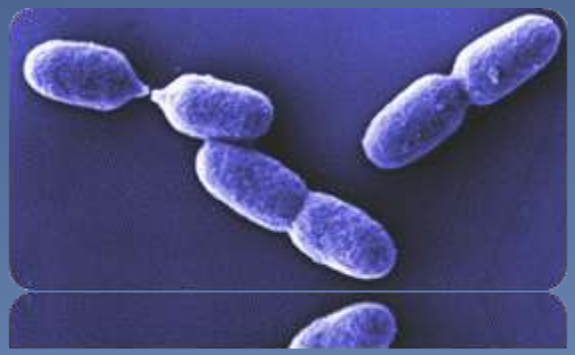
King Saud University
Department of Botany & Microbiology

بسم الله الرحمن الرحيم

إنتاج السماد حيوي من البكتيريا المثبتة للنيتروجين لا تكافلياً

The Production of Azotobacter sp. as a Biofertilizer



465 MIC

Amal Alghamdi
2014

أهمية الأزوتوباكتر في الصناعه

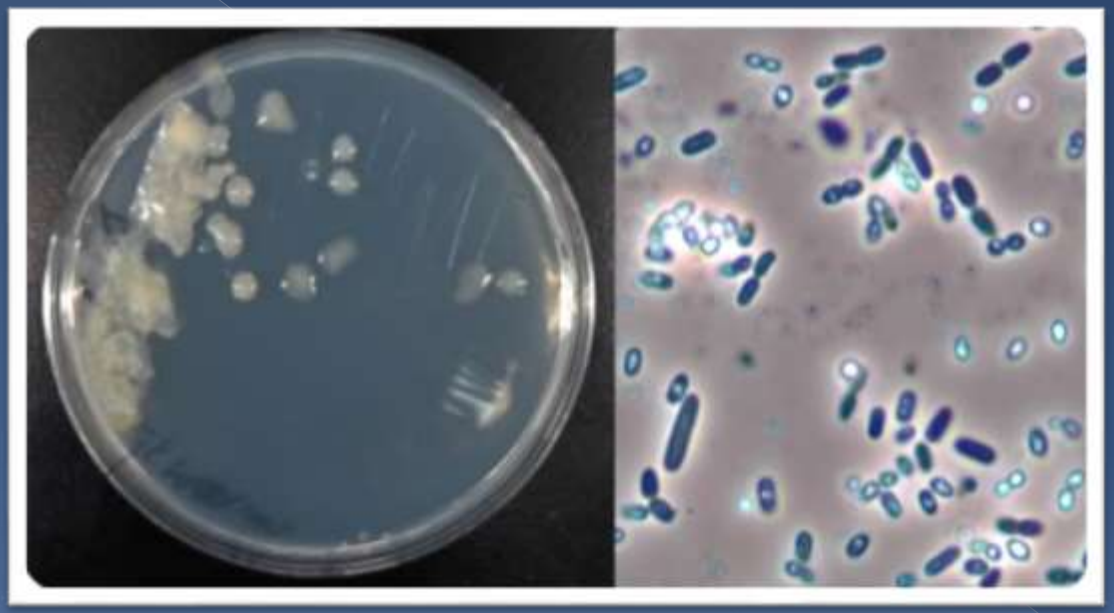
- التثبيت الحيوي للنيتروجين_ لاتكافلياً .
- مميزات بكتيريا *Azotobacter*.
- طريقة عزل بكتيريا *Azotobacter*.
- شكل البكتيريا عند الفحص مجهرياً بالميكروسكوب الضوئي .

أهمية النيتروجين في التربة

- يكون النيتروجين حوالي 78% من جو الأرض .

- ولكن على الرغم من هذه الوفرة في الجو فنادراً ما يوجد هذا العنصر في التربة على صورة نترات و أملاح الامونيوم بكمية تفي احتياجات النباتات الخضراء.

- من السهل عزل بكتيريا التأزت *Azotobacter* من التربة الزراعية ، أما عزله بحالة نقية فليس سهلاً



السبب :

لوجود طبقات مخاطية بها ميكروبات ، تغلف خلايا الأزوتوباكتر .

مميزات الأزوتوباكتر Azotobacter

1. سالبة الجرام
2. بكتيريا هوائية إجباراً .
3. تتميز بكبر حجمها.
4. عصوية الشكل وتتواجد غالبا في صورة أزواج.
5. تحاط الخلية بغلاف هلامي (capsule) وجوده يجعل من الصعب الحصول عليها بصورة نقية .
6. تعيش في بيئة خالية من النيتروجين وتحتاج في البيئة إلى مصادر كربونية حتى تنمو بصورة جيدة فيها مثل : السكروز .
7. تحتاج لعنصر P- Ca – K.
8. تحتاج إلى رطوبة وتهوية ورقم pH مناسب (6-7,5)
9. تتناسب كمية النيتروجين المثبتة مع كمية نمو الميكروب .

تثبيت النيتروجين في التربه

- يتم تثبيت النيتروجين بواسطة الإنزيم المعقد الذي يعتمد على وجود الأكسجين nitrogenase الذي ينشط عند توفر الظروف الملائمة للتثبيت النيتروجين الجوي.
- يختزل النيتروجين الجوي(N_2) إلى الأمونيا (NH_3)بواسطة إنزيم الـ nitrogenase تبعاً للتفاعل التالي:

- **$16\text{-}24\ ATP + 8H^+ + 8e^- + N_2$ ----------> $16\text{-}24\ ADP + Pi + 2NH_3 + H_2$**

تثبيت النيتروجين لاتكافلياً

- تمتاز بعض أجناس البكتيريا بقدرتها على تثبيت النيتروجين الجوي ، بشكل غير تكافلي وهي عملية ذات أهمية كبيرة من حيث خصوبة التربة واقتصاديات الإنتاج .

- ومن البكتيريا الهوائية المثبتة للنيتروجين الجوي ، في الحالة الحرة Free-living Bacteria (أي التي لاتشترك مع النبات في معيشتها) : الأنواع البكتيريه التابعة لجنس ***Azotobacter*** .

- وتقوم هذه البكتيريا بتخزين النيتروجين في خلاياها في صورة بروتينيه لتستعملها في غذائها ومن ثم تترسب في التربة بعد موتها وتحللها فيستفيد منها النبات.

إنتاج البكتيريا المثبتة للنيتروجين *Azotobacter sp.*

- يتم زراعة البكتيريا *Azotobacter sp.* على آجار صلب خالي من النيتروجين.
- للحفاظ على حيوية البكتيريا يجب نقلها بعد فترة من الزمن وإعادة زراعتها كل مره على الوسط الصلب.

إنتاج البكتيريا المثبتة للنيتروجين *Azotobacter sp.*

- ستم الإنتاج في مرحلتين:
- المزرعة الأم:
  - المزرعة النقية لأي كائن على مستوى محدود يسمى mother culture.
  - تكون عادة في دورق سعة 500-1000 مل ويتم استخدامها في المرحال التالية من الإنتاج.
  - حيث
  - يتم تلقيح 500 مل من وسط سائل خالي من النتروجين وتنقل المستعمرات بالإبرة ذات عقدة من المزرعة الأم (Pure or mother culture).
  - توضع في حضان هزاز من 70-90 ساعه للحصول على أفضل نمو للبكتيريا.
  - النمو المثالي للبكتيريا على هذا الوسط يعتبر هو المزرعة الابتدائية في الصناعه لذلك يجب إعدادها بدقة عالية. حيث يعتمد نقاوة وجودة السماد الحيوي Biofertilizer على هذه المزرعة.

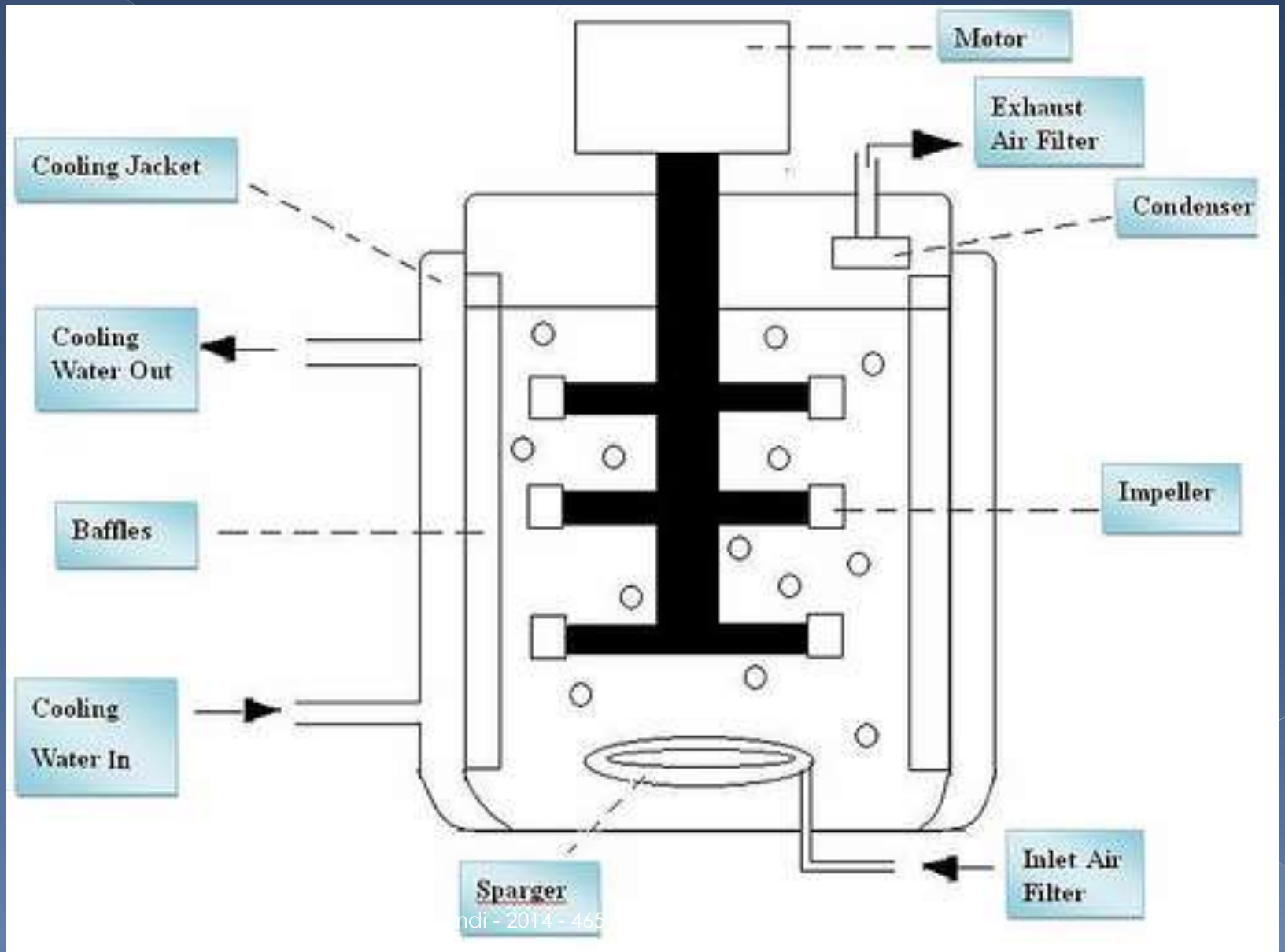
إنتاج البكتيريا المثبتة للنيتروجين *Azotobacter sp.*

- 2- الإنتاج بكميات كبيرة Large Scale Production :
  - باستخدام طريقتي الرج والتخمير.

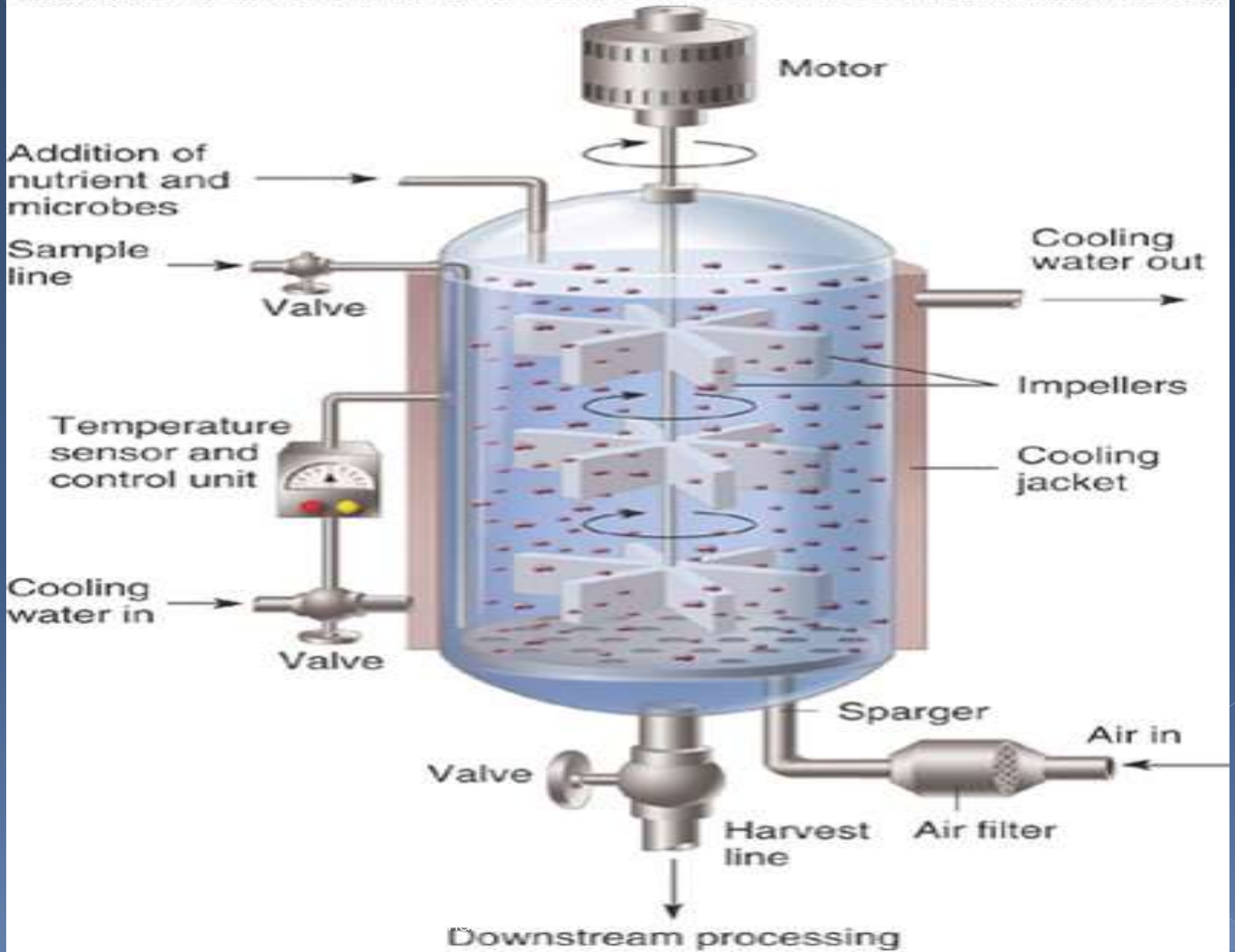
أولاً: طريقة التخمير Fermenter:

- يعتبر المخمر هو أسهل وأدق الطرق لمضاعفة أي كائن دقيق.
- في هذه الطريقة يتم نقل اوسط الملائم إلى المخمر ثم يعقم.
- بعد ضبط درجة الحموضه pH يتم إضافة 1% من المزرعة الأم. يتم ضبط درجة حرارة المخمر والتهوية الملائمة لأفضل نمو لبكتيريا *Azotobacter sp.* حتى نحصل على التركيز المطلوب من المزرعة السائلة.
- يتم خلط المزرعة المركزه مع حامل معقم ثم يحضر السماد الحيوي.

يتم إختيار المخمر الملائم Fermenter:



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



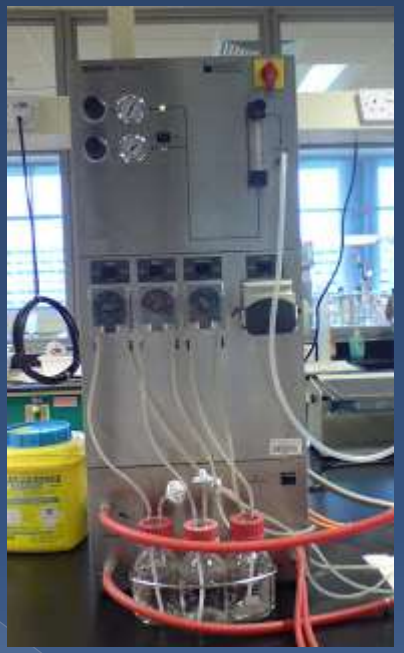
إنتاج البكتيريا المثبتة للنيتروجين *Azotobacter sp.*

- ثانياً: طريقة الرج Shaking:
  - تستخدم بيئة ملائمة ثم تنقل إلى دورق ذو سعة ملائمة وتعقم عند 121 م وضغط 15 بوصه/رطل2 لمدة 15 دقيقة.
  - تلقح كل منها بمقدار 10 مل من المزرعة الأم ثم تنقل إلى الحضان الهزاز لمدة 72 – 90 ساعه.
  - يخلط المزرعة السائلة مع حامل ملائم معقم ثم يحضر السماد الحيوي ويعبأ في أكياك بلاستيكية ويحفظ في درجة حرارة ملائمة.

إختيار الحامل الملائم

- هو مادة غنية بالمواد العضوية ولها قابلية ادمصاص عالية للماء وتدعم نمو الكائن الدقيق. يسهل الحامل عملية نقل السماد الحيوي وكذلك استخدامه.
- بشكل عام يعتبر الكمبوست والـ Lignite cool و تربة الـ peat soil حوامل جيدة للبكتيريا المثبتة للنيرتوجين لا تكافليا.
- أفضلها اللجنيت فهو منخفض التكلفه يحافظ على حيوية الكائن ولا يقل من كفاءة السماد الحيوي.

Lab Scale Production



Industry (Large Scale) Production

طريقة العمل :

- المطلوب :

عزل ***Azotobacter sp.*** من عينة تربة خصبة وذلك باستخدام بيئة Base77 .

الأدوات والمواد :

- أدوات العمل تحت ظروف التعقيم .
- عينة تربة زراعية خصبة (مصدر العزل) .
- ماصات معقمة 1مل.
- بيئة Base77 السائلة في دوارق مخروطية.

طريقة العمل :

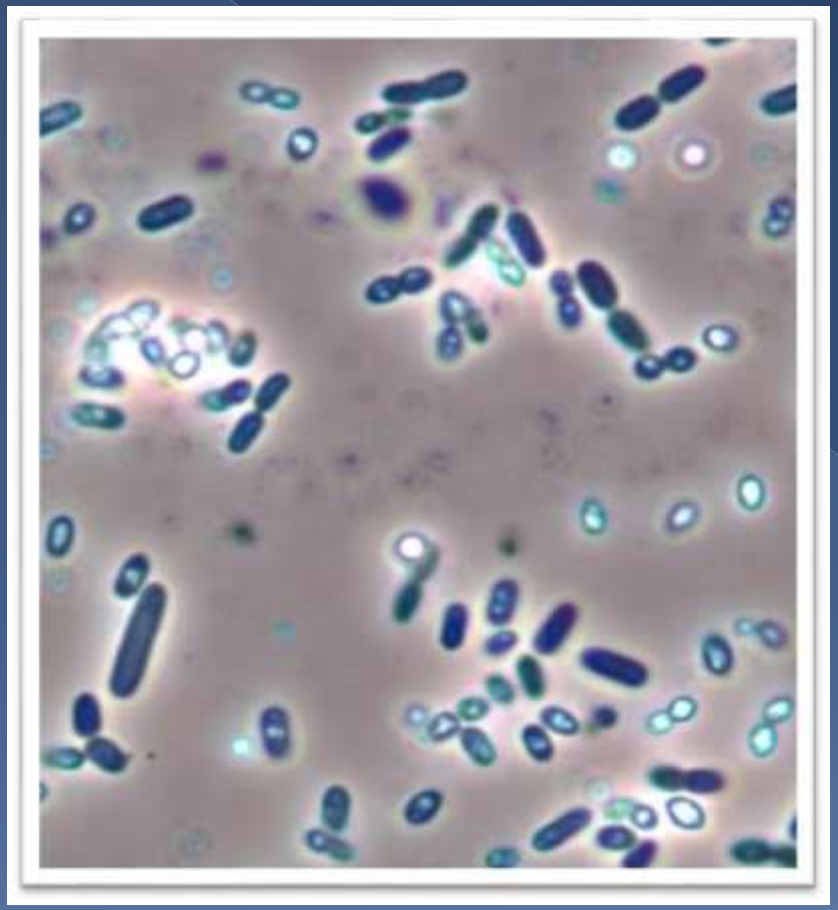
- في ظروف التعقيم، يتم تحضير معلق التربة بإضافة 1جم من تربة المصدر إلى 25 مل من الماء المقطر المعقم ثم يرج جيداً ويترك ليترسب.
- باستخدام الماصة المعقمة،ينقل 1 مل من المعلق ويضاف إلى الوسط الغذائي.
- تحضن الأوساط الغذائية الملقحه في الحضان عند 37 م .
- يتم ملاحظة النمو بعد 3 أيام – أسبوع .

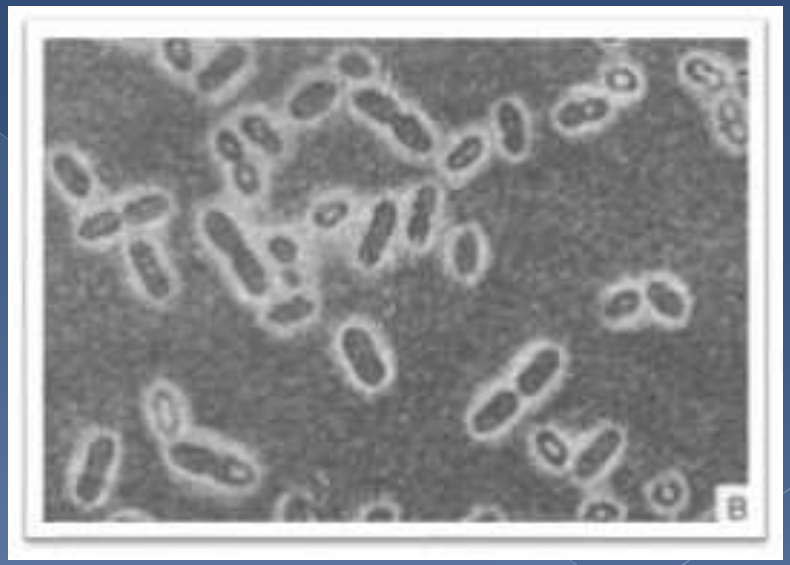
النتيجة :

- يمكن ملاحظة نمو البكتيريا على سطح البيئة السائلة على هيئة غشاء أو غلاف هلامي .
- يتم صبغ البكتيريا (صبغة جرام) وفحصها تحت المجهر وتسجيل النتائج

Nabil Abdel Aziz Al-Ahmadi 2015 ©

شكل بكتيريا *Azotobacter sp.* تحت المجهر :





Azotobacter sp.

Good luck