ميكروبيولوجيا إدارة المخلفات

الأستاذ الدكتور/ مظهر العيسوي الشريف

دكتوراه الميكروبيولوجي والبيوتكنولوجي – جامعة كيل – ألمانيا الاتحادية

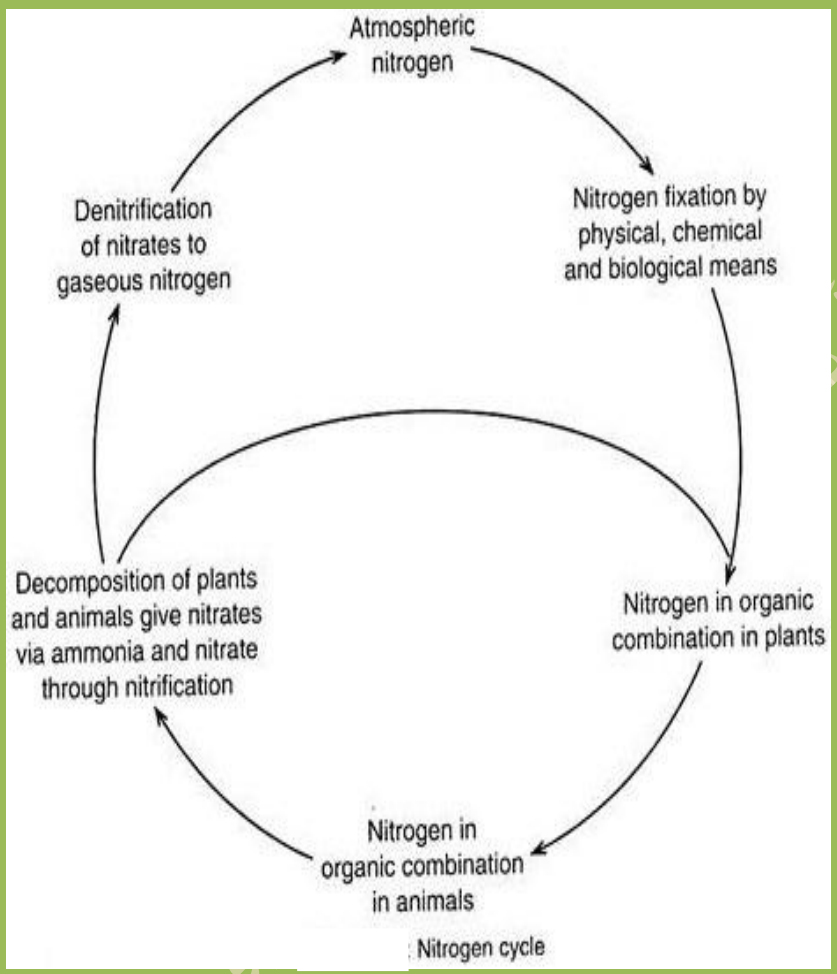
رئيس قسم الميكروبيولوجي – كلية الزراعة بسوهاج

النيتروجين

NITROGEN

خلال هذه الدورة يتنقل النيتروجين من الغلاف الجوي الى المحيط الحيوى (خلال كائنات حية مختلفة) ليعود مرة أخرى الى الغلاف الجوي. بكلمات أخرى، دورة النيتروجين (**شكل (120)**) مقصود بها دوران هذا العنصر بين الجو والتربة والنبات والحيوان. وتعتبر المركبات النيتروجينية من أكثر المركبات تعرضاً للتحولات البيولوجية في الطبيعة. وخلال هذه الدورة تظهر كل من الميكروبات المحللة Decomposers والتي تعمل على معدنة النيتروجين العضوي، بالإضافة الى الميكروبات المثبتة للنيتروجين المختلفة، وارتباطهما بالمرحلة المكملة لهذه الدورة وهي انطلاق وفقد النيتروجين.

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف



شكل (120): دورة النيتروجين في الطبيعة

اهمية النيتروجين Nitrogen

النيتروجين هو حجر الأساس في البروتين بدخوله في تركيب الأحماض الامينية وهي المكون الاساسي لبروتوبلازم جميع الخلايا الحية. وكذلك الحال في الاحماض النووية (DNA, RNA). ورغم أن غاز النيتروجين

هو أكثر الغازات في الغلاف الجوي (حوالي 80%)، الا ان الصورة الغازية للنيتروجين هي صورة غير ميسرة لكل من النبات والحيوان. وللإستفادة منه لابد من تثبيته أي تحويله من الصورة الغازية (N_2) الى الشكل المثبت في صورة أمونيا (NH_3) ويطلق على هذه العملية "تثبيت النيتروجين" Nitrogen Fixation. أي أن تثبيت النيتروجين الغازى هو العملية التى من شأنها اختزاله من الصورة الغازية (H_2) الى صورة المونيا (NH_3). وتتم عملية تثبيت النيتروجين بعدة طرق منها:

1.1.1 طرق تثبيت النيتروجين Nitrogen fixation

(i) طبيعياً من خلال:

- عملية البرق والرعد أو الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet (UV) في الجو حيث يتحد النيتروجين مع الهيدروجين مكوناً أمونيا، أو
- من خلال التثبيت الحيوي للنيتروجين Biological Nitrogen Fixation (BNF) (تتميز به الكائنات الحية الدقيقة بدائية النواة) بطرق:

أ- تكافلية Symbiotically

ب- لاتكافلية Asymbiotically

(ii) طرق صناعية Artificial methods من خلال ما يعرف بطريقة هابر بوش Haber- Bosch، وفي هذه الطريقة الكيماوية الشائعة يلزم قدر كبير من الطاقة والضغط والعوامل المساعدة.

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

يتم سنويا تثبيت نحو 255 مليون طن متري من النيتروجين، وتقوم البكتريا بتثبيت نحو 70% من هذه الكمية (Black, 1999). وهذه العملية تلي عملية البناء الضوئى من حيث الأهمية لاستمرار الحياة على سطح الأرض والتثبيت الحيوي للنيتروجين إضافة الى فوائده الإقتصادية المتمثلة فى توفير مصدر متجدد ومستدام من السماد النيتروجينى المجاني، فهو ايضاً ذو أهمية بيئية متمثلة في تقليل مشاكل التلوث البيئي وما يرتبط بها من تبعيات صحية خطيرة.

1.1.2 مصدر النيتروجين بالنسبة للكائنات الحية:

مصدر النيتروجين بالنسبة للكائنات الحية هو واحد من إثنين:

(i) الأول

هو تحليل المخلفات العضوية النيتروجينية (معدنة Miniralization) سواء كانت بقايا للكائنات الحية أو كائنات ميتة، فينطلق النيتروجين نتيجة لهذ التحلل الإنزيمي، ومن ثم تمتصه النباتات ومنها الى الحيوان، والحيوان يتغذي عليه حيوان آخر أو حيوان يجمع بين التغذية على النبات والحيوان (وبالتالي ينساب النيتروجين خلال تلك السلسلة،

(ii) الثاني

من خلال النيتروجين المثبت Fixation بالوسائل المختلفه (صناعياً وطبيعياً وميكروبيا). ليدخل في تركيب بروتوبلازم الخلايا الحية ويتنقل في

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

الدورة البيولوجية. ويمكن أن يحدث فقدٌ النيتروجين من التربة Soil Nitrogen Loss بطرق حيوية (بيولوجية) نتيجة عمليات الاختزال وانطلاق النتروجين، أو ان يتم تمثيله في النباتات والحيوانات لتكوين بروتوبلازم الخلايا، ويمكن أن يتم الفقد بطرق غير بيولوجية كيماوياً أوعن طريق الترشيح والغسيل مع مياه الري والأمطار الى المياة الجوفية، وكذلك عن طريق التطاير في صورة أمونيا.

1.1.2.1 معدنة النيتروجين العضوي

Mineralization Nitrogen

تعتبر الصورة المعدنية للنيتروجين ـ الأمونيا والنترات ـ هي المناسبة لتغذية النبات؛ فلا تستطيع النباتات الاستفادة من النيتروجين الموجود في صورته العضوية مثل البروتين، الاحماض النووية، السكريات الأمينية.. الخ، ولا حتى الصورة الغازية.

عملية معدنة النيتروجين تتم على مراحل لتحويل الشكل العضوي للنيتروجين ـ بواسطة الميكروبات ـ الى الشكل المعدني. لذلك فإن معدنة النيتروجين العضوي تعتبر أساسية لاتمام دورة النيتروجين من جهة وتغذية النبات من جهة أخرى. وهذه العملية تكون نشطة فى مدى واسع من الظروف البيئية (هوائية وغير هوائية، حرارة مرتفعة ومتوسطة ومنخفضة وعلى مدى

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

واسع من درجات الحموضة) وذلك للتنوع الكبير في الميكروبات التي تقوم بهذه العملية.

وتتضمن عملية المعدنة خطوتين أساسيتين هما: 1- النشدرة Ammonification، و 2- التأزت (النترتة) Nitrification

1.1.2.1.1 النشدرة Ammonification

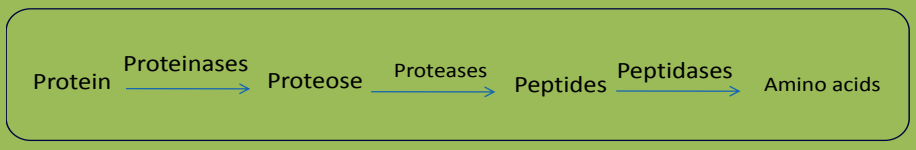
النشدرة هي تحليل النيتروجين العضوي لتكوين الأمونيا Ammonia (NH_3). وهناك العديد من الميكروبات التي تنتج واحد أو أكثر من الإنزيمات البروتينية الخارجية Extracellular proteinases التي تبدأ عملية تحلل البروتين الى أحماض أمينية مثل:

بكتريا *Clostridium sporogenes* و*Streptomyces*

الفطريات مثل *Alternaria, Aspergillus, Penicillium*. وتكون نواتج التحلل النهائية تحت الظروف الهوائية هي الأمونيا وثانى اكسيد الكربون والماء وغاز كبريتيد الهيدروجين H_2S. وفي حالة الظروف اللاهوائية يحدث تعفن وتظهر روائح غير مرغوبة وتتكون الأمونيا وأمينات وأحماض عضوية وثاني اكسيد الكربون وكبريتيد الهيدروجين

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي

وبعض المركبات الكبريتية.



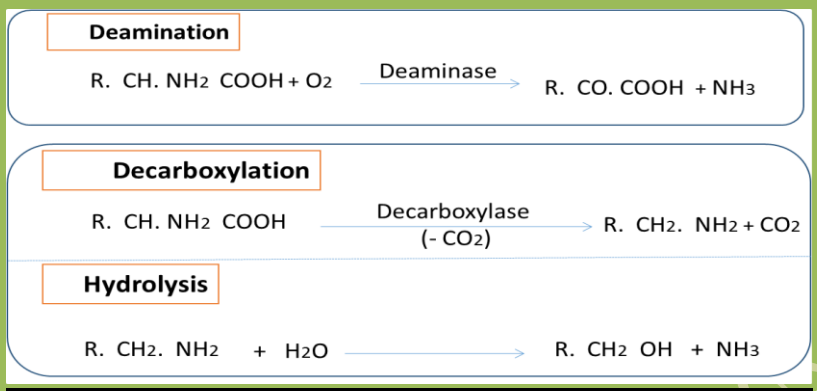
تستخدم الميكروبات العديد من الإنزيمات لتحلل البروتينات كإنزيمات البروتينيز Proteinases التي تحلل جزيئات البروتين الكبيرة، وإنزيمات الببتيديز Peptidases التي تحلل الروابط الببتيدية Peptide bonds لتنطلق الأحماض الامينية، ثم تعمل انزيمات "الدي أمينيز Deaminases" على إزالة مجموعات "الأمين Amin groups" من الأحماض الأمينية لتنطلق الأمونيا (NH_3) والتي تستخدم هذه الميكروبات جزءاً منها والباقي ينطلق الى التربة.

والأحماض الأمينية Amino acids تسلك احد اتجاهين:

الأول يستهلك بواسطة الميكروبات الغير ذاتية التغذية كمصدر للكربون والنيتروجين،

الثاني يتم تحليله بواسطة بعض الميكروبات بطرق مختلفة (حسب الظروف البيئية والميكروبات)؛ حيث يتم نزع مجموعة الأمين Deamination، أو يتم نزع مجموعة الكربوكسيل كما في المعادلات الآتية (ويلاحظ أن الامونيا الناتجة قد تتطاير، أو تذوب في التربة مكونة NH_4، أو تتأكسد الى نترات NO_3)

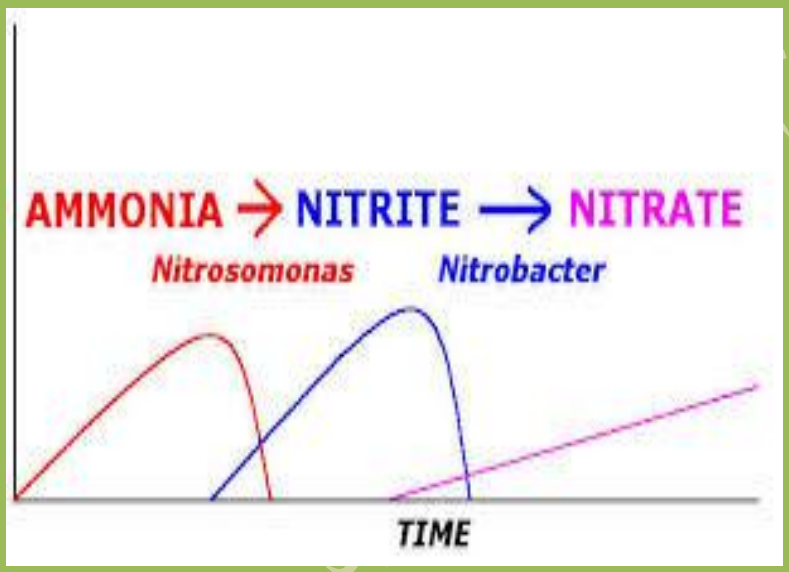
الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي التوقيع



الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

التأزت (النترتة) Nitrfication

وهي العملية التي من شأنها اكسدة الأمونيا الى نترات Nitrate (NO3)، **(شكل (121))** والنترات هي أكثر الصور استفادةً بواسطة النبات. الميكروبات



شكل (121): جنسى البكتريا المؤكسدة للامونيا مع الزمن

المؤكسدة التى تقوم بهذه العملية مجموعة من البكتريا المتخصصة الهوائية، توجد في التربة والمياه وتحصل على الطاقة اللازمة لها من خلال عملية الأكسدة.

بكتريا النترتة

. هناك مجموعتين من بكتريا النترتة هما:

(i) بكتريا النيتريت وهي البكتريا التي تحول النشادر الى نيتريت Nitrite،

(ii)بكتريا النترات وهي التي تحول النيتريت (السام للنبات في التو واللحظة) الى نترات.

البكتريا المؤكسدة للامونيا الى نتريت

حسب التفاعل:

$$2NH_3 + 3O_2 \longrightarrow 2HNO_2 + 2H_2O + energy$$

وتقوم بهذه الخطوة بعض الاجناس مثل:

Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosovibrio ويطلق على هذه البكتريا "مؤكسدات الأمونيا Amonium oxidizer " ويلاحظ أن النيتريت المتكون في هذه الخطوة يكون سام للنبات ولكنه لا يلبث أن يتحول الى صورة النترات الصالحة لتغذية النبات بواسطة مجموعة أخرى من البكتريا في المرحلة التالية.

البكتريا المؤكسدة "للنتريت الى نترات"

حسب التفاعل:

$$2HNO_2 + O_2 \longrightarrow 2HNO_3 + energy$$

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

ومن أمثلة البكتريا التي تؤكسد النتريت الى نترات *Nitrobacter,* *Nitrococcus* ويطلق على البكتريا المؤكسدة للنتريت " Nitrogen oxidizer".

تثبيت النيتروجين الغازي

Nitrogen Fixation

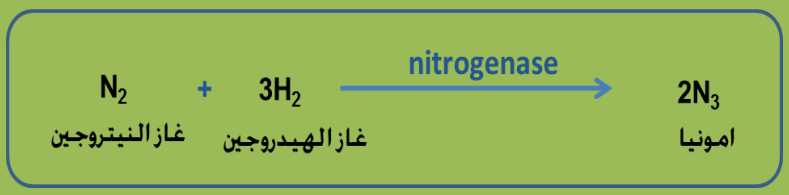
كما ذُكر آنفاً فإن تثبيت النيتروجين الغازي هو المصدر الموازي لمعدنة النيتروجين العضوي كمصدران اسايان للنيتروجين في تغذية النبات. وعملية تثبيت النيتروجين تتم اما بطرق صناعية (طريقة هابر بوش) والتي تتطلب طاقة كبيرة، أو طبيعياً من خلال عملية البرق، ولكن الغالبية العظمى لعملية تثبيت النيتروجين تتم حيوياً biologically بواسطة الكائنات الحية الدقيقة بدائية النواة prokaryotes، وهي البكتريا والبكتريا الشاذة. ويطلق على البكتريا التي لها القدرة على تثبيت النيتروجين diazotrophs (or Nitrogen fixing bacteria)

البكتريا المثبتة للنيتروجين

Nitrogen-Fixing bacteria

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

البكتريا التى تثبت النيتروجين **(شكل (122))** تحتوي على إنزيمات خاصة لها القدرة على تثبيت غاز النيتروجين يطلق عليه إنزيم



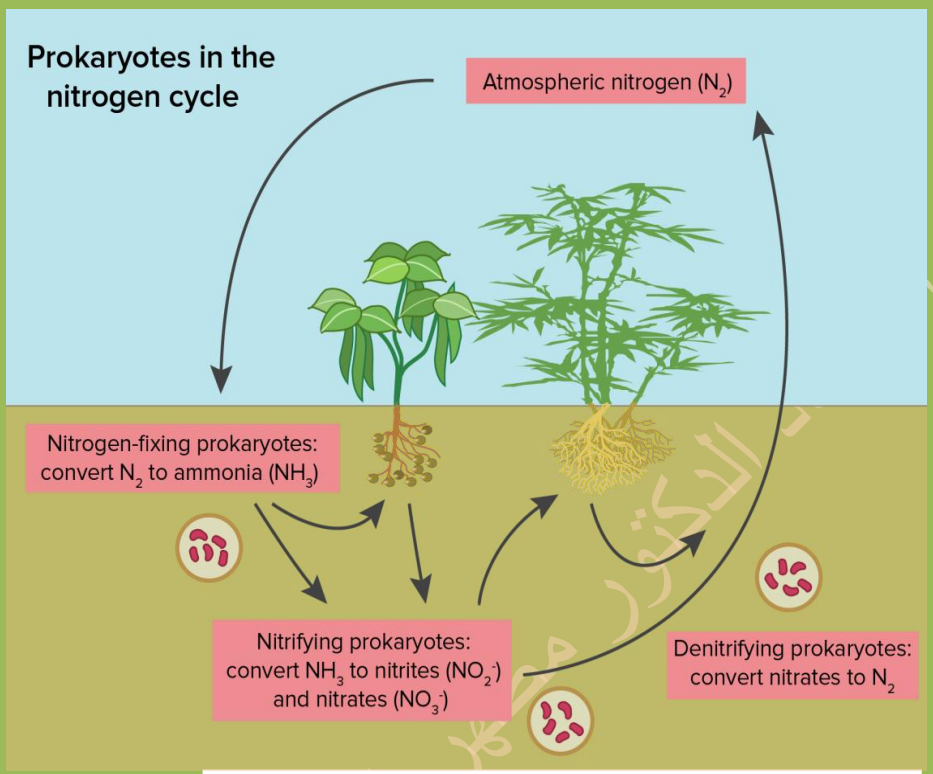
النيتروجينيز nitrogenase، الميكروبات التي تثبت النيتروجين تحت الظروف الهوائية aerobically لابد وأن تحتوي على ميكانيكية خاصة تحمي بها هذا الإنزيم من التثبيط بواسطة الأكسجين نظراً لكونه حساس له. البكتريا المثبتة قد تعيش حرة في التربة، أو تعيش تكافلية مع جذور النباتات البقولية ومنها ما تتكافل مع جذور نباتات غير بقولية. كما توجد السيانوبكتريا التي تثبت النيتروجين فى المياه. تستطيع البكتريا تثبيت النيتروجين تحت الظروف البيئية المختلفة، من المناطق القطبية Antractica شديدة البرودة الى العيون الحارة hot springs، من المستنقعات الحمضية Acid bogs الى المناطق الملحية، من الأراضى المغمورة الى الصحارى، في المياه العذبة والمالحة، وحتى في أمعاء بعض الحيوانات.

الطاقة المطلوبة لهذه العملية يمكن أن يتم الحصول عليها بطرق مختلفة منها عملية التخمر، والتنفس الهوائى، والبناء الضوئى. الميكروبات التي

تثبت النيتروجين في التربة (كلها بدائيات النواة) يمكن أن تعيش بصورة حرة (لا تكافلية) أو تكافلية.

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

شكل (122): تثبيت النيتروجين الغازى



شكل (123): دور الميكروبات بدائية النواة في دورة النيتروجين في الطبيعة

أولا الصورة الحرة (اللاتكافلية)

Free-Nitrogen fixers (asymbiotic-Nitrogen fixers)

هذه البكتريا تعيش حرة فى التربة وغير مرتبطة بالنبات (وإن كانت تتأثر به)، تقوم بتثبيت النيتروجين لبناء بروتوبلازم الخلية بغض النظر وجد النبات أم لا. النيتروجين المثبت بهذه الميكروبات لا يصبح متاحاً للنباتات ألا بعد موت هذه الميكروبات وحدوث تحلل ومعدنة لخلاياها وتحويل النيتروجين العضوى الى الصورة المعدنية في التربة. تتراوح

كمية النيتروجين المثبتة في التربة بهذه الطريقة ما بين 10 - 25 كجم/فدان سنوياً (**عبد الوهاب، وآخرون، 1996**)، كما تفرز هذه الميكروبات العديد من منشطات النمو والفيتامينات المفيدة للنباتات النامية، ويمكن تقسيم هذه البكتريا **حسب احتياجاتها من الأكسجين** الى بكتريا هوائية اجبارية Obligate aerobes ومن أمثلتها جنس الآزوتوباكتر *Azotobacter*، والبكتريا اللاهوائية إجباريا Obligate anaerobes مثل *Clsotridium sp, Desulfovibrio sp*، والبكتريا التى تتطلب كمية محدودة من الاكسجين مثل *Azospirillum sp, Plactonema sp*، و أيضا البكتريا اللاهوائية إختيارياً Facultative anaerobes مثل *Klebsiela sp, Enterobacter*. ويلاحظ أن الكليبسيلا يمكنها أن تثبت النيتروجين على السوق المدادة rhizomes (subsurface stems) لبعض النباتات البقولية مثل البازلاء peas والفاصوليا beans وأيضاً في القناة الهضمية للانسان والحيوان. كما يمكن تقسيم هذه الميكروبات اللاتكافلية **من حيث مصدر الكربون** الى قسمين هما:

(i) غير ذاتية التغذية Heterotrophs مثل الآزوتوباكتر والآزوسبيريللم والآزوموناس والبيارنكيا والكليبسيلا وغيرهم،

(ii) البكتريا ذاتية التغذية الضوئية Photoautrophic bacteria وتلعب دوراً هاماً فى الأراضى المنزرعة أرزاً، وتشمل مجموعتين الأولى الضوئية الأكسوجينية (السيانوبكتريا) مثل النوستوك والأنابينا، والثانية هي البكتريا الممثلة للضوء غير الأكسوجينية مثل أجناس *Rhodomicrobium*, Chromatium .

الميكروبات المثبتة للآزوت لا تكافليا في التربة

Free living nitrogen fixing organisms in soil

مع أن الدراسات بالنظائر المشعة أو بتقدير النيتروجين لم تثبت بوضوح زيادة واضحة في محتوى التربة من النيتروجين نتيجة التلقيح بهذه الميكروبات، الا ان الأثر على المحصول كثيرا ما يكون واضحاً، وهذا ادى الي ان أعزى كثير من الباحثين أثر التلقيح كونه ليس فقط نتيجة لتثبيت النيتروجين ولكن ايضاً لقدرة تلك الميكروبات على انتاج هرمونات ومنشطات نمو تشجع نمو النباتات وزيادة المحصول. وقد أمكن بالفعل عزل كثير من الاندولات والجبريلينات Indoles and Gibberellins من مزارع الآزوتوباكتر. ومن خلال التجارب الحقلية ثبت ان استخدام اللقاح اللاتكافلي بالآزوتوباكتر والآزوسبيريللم قد وفر مقدار 25% من كمية السماد النيتروجيني الموصى به لمحصول بنجر السكر دون حدوث نقص في الانتاج من اي من محصول الجذور أو

السكر و كذلك الحال بالنسبة لمحصول القمح وغيرهما من المحاصيل الحقلية غير البقولية.

- **العوامل المؤثرة على معدل تثبيت النيتروجين لا تكافلياً**

1- محتوى التربة من النيتروجين المعدني:

تستطيع اغلب الميكروبات المثبتة للنيتروجين أن تستخدم الأمونيا وأحياناً النترات وبعض صور النيتروجين الموجودة في التربة. وعلى ذلك فإن توافر هذه المركبات وخصوصاً أملاح الأمونيوم في التربة يحبط عملية تثبيت النيتروجين لحد كبير؛ حيث أن الميكروبات المثبتة سوف تجد امامها مصدراً جاهزاً للنيتروجين بدلاً من اجهاد التثبيت.

2 – توافر عناصر معدنية معينة:

تتطلب الميكروبات المثبتة للنيتروجين توفر بعض العناصر المعدنية اللازمة مثل المولوبيدنيم والحديد والكالسيوم والكوبلت.

3 – توافر مصادر الطاقة:

يعتبر توفر مصدر مناسب للطاقة من العوامل الهامة في عملية تثبيت النيتروجين في التربة. وقد وجد ان اضافة سكريات بسيطة أو السليلوز وقش ذو نسبة C/N ratio واسعة يزيد من عملية التثبيت كثيراً سواءًا تحت الظروف الهوائية او اللاهوائية.

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

4 – درجة الحموضة

ولها اثر واضح على معدل التثبيت في التربة؛ فالازوتوباكتر حساس للحموضة مما يجعله لا يكون موجوداً في الاراضي الحامضية وتماثله في التأثر بالحموضة السيانوبكتريا. أما البيرينكيا فانها ليست حساسة للحموضة وتستطيع النمو في درجات حموضة بينpH 3- 9. والكلوستريديا تقع بين الازوتوباكتر والبرينكيا من ناحية حساسيتها للحموضة. وعموماً يمكن القول بان افضل الاراضي من ناحية تثبيت النيتروجين هي المتعادلة المائلة قليلاً الى القلوية.

5 – الرطوبة:

تعتبر من العوامل الرئيسية المؤثرة على النشاط البيولوجي عموماً. وعملية التثبيت تتوقف في التربة الجافة وتزداد بزيادة الرطوبة وأعلى معدل للتثبيت يكون عند درجة رطوبة قريبة من السعة الحقلية، بل قد لوحظ أن الاراضي المغمورة يكون فيها معدل التثبيت عالياً. ومن هنا يتضح ان اعلى معدلات التثبيت تتم تحت الظروف اللاهوائية.

6 – درجة الحرارة:

لها تأثير واضح، ففي درجات الحرارة المنخفضة يكون المعدل منخفضاً ويزداد مع رفع درجة الحرارة الى ان يصل الى أعلى معدلاته عند درجة

25 – 30 درجة ثم ينخفض بسرعة بعد ذلك برفع درجة الحرارة عن المثلى.

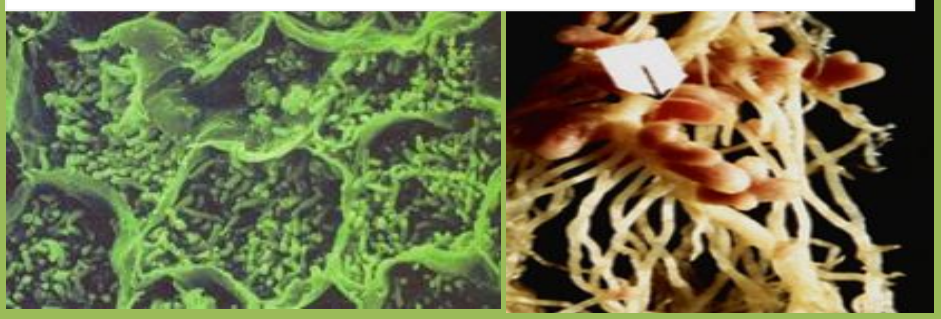
التثبيت التكافلي

Symbitic Nitrogen Fixation

وفيه تكون هناك علاقة تكافلية Symbiotic relationship بين البكتريا التي تقوم بتثبيت النيتروجين والعائل النباتي؛ فتوفر البكتريا إحتياجات النبات من النيتروجين المثبت بينما يوفر النبات للبكتريا ما تحتاجه من: سكريات، ومصادر للطاقة، ومواد عضوية، وغير عضوية. ويقدر ما يتم تثبيته من خلال الصورة التكافلية بنحو 5 الى 10 مرات ما يتم تثبيته من النيتروجين بواسطة البكتريا الحرة في التربة **(Lim, 1998)**

التثبيت التكافلي للنيتروجين يتم بتكوين عقد خاصة إما على الجذور **Root nodules** (الأكثر شيوعاً)، أو على عقد ساقية **Stem**

شكل (125): العقد الجذرية على نبات بقولي (يمين) وصورة بالميكروسكوب للميكروبات داخل العقد الجذرية (شمال)



nodules على ساق بعض النباتات **(شكل (124))**. أما العقد الورقية **Foliar nodules** والتي تظهر على بعض النباتات، فإن الميكروبات الموجودة في هذه العقد والتي تعيش في شكل تكافلي تمد النبات العائل ببعض العناصر الغذائية وبعض المواد المنشطة للنمو مثل السيتوكينين، ولكن لم يثبت دورها في عملية تثبيت النيتروجين. ومن البكتريا المعزولة من العقد الورقية *Bacillus folliicola, Klebsiella rubiacearum, Xanthomonas hororicola*

التثبيت التكافلي على الجذور

وفيها تُكوِن البكتريا علاقة تكافلية إجبارية مع جذور بعض النباتات فيما يعرف بالعقد الجذرية nitrogen-fixing nodules **(شكل (125))**، منها العقد التي تكونها البكتريا التابعة لجنسي *Rhizobium (R)* & *Bradyrhiyobium (Br)* مع النباتات البقولية، حيث تحتوي العقدة على نحو ألف مليون خلية من بكتريا الريزوبيم. تستطيع البكتريا من داخل العقد الجذرية تثبيت ما يقارب 84 كجم نيتروجين للفدان في العام **(Black, 1999)** وتقريباً تحتوي كل أنواع الأراضي على الريزوبيم. هذه البكتريا تكون غير قادرة على تثبيت النيتروجين خارج النبات. تقوم جذور النباتات البقولية بإفراز بعض المركبات الكيميائية التي تجذب بكتريا الريزوبيم

العصوية الشكل Rod-shaped rhizobia الى منطقة الريزوسفير ثم تبدأ هذه البكتريا بتكوين انبوبة لاختراق الجذر بآلية خاصة يلي ذلك دخول البكتريا مكونةً العقد الجذرية. وتختلف بكتريا الريزوبيم في كفاءتها في عملية تثبيت النيتروجين، فبعضها يتفوق بشكل كبير عن البعض، كما تتميز هذه البكتريا بتخصصها العالي؛ فمثلا البكتريا التي تنجح في تكوين عقد ـ فعالة قادرة على تثبيت النيتروجين ـ على جذور نباتات البرسيم الحجازي لا تنجح في تكوين هذه العقد الفعالة على جذور نباتات البرسيم المصرى. وقد قسمت بكتريا الريزوبيا حسب مجموعة العوائل التي تصيبها الى سبع مجموعات كما فى **جدول (4).**

جدول (4): مجاميع الريزويم الرئيسية و عوائلها

الميكروب	العائل
R. meliloti	Alfalfa group مثل البرسيم الحجازى ـ الحلبة
R. trifiolii	Clover group مثل البرسيم المصرى ـ البرسيم الأحمر
R. leguminosarium	Pea group مثل البسلة ـ العدس
R. phaseoli	Bean group مثل الفاصوليا
Br. japonicum	Soybean group مثل فول الصويا
Br. lupini	Lupine group مثل الترمس
Br. sp	Cowpea group مثل اللوبيا ـ الفول السودانى

- **طرز بكتريا العقد الجذرية**

بكتريا الريزوبيا العقدية لها طرزين مختلفين هما:

(1) **البكتيرويد (النشط)**: عندما تكون داخل العقدة الجذرية تأخذ اشكالاً متعددة تشبه الأحرف الانجليزية X, Z, Y, L, I, V ..وغيرها، وعند عزل البكتريا وفحصها في هذا الطور تظهر موجبة لصبغة جرام Gram positive.

وتكون هذه الخلايا في طورها النشط وذات حجم كبير نسبياً ويطلق عليها في هذه الحالة **بكتيرويد Bacteroid** ويتم من خلالها تبادل المنفعة مع جذور النبات العائل. ويستمر هذا الطور لنحو 7 أسابيع بعد تكوين العقد الجذرية،

(2) **طراز مترمم (غير نشط)**: الطراز الآخر هو الذي يظهر بعد انفجار العقد الجذرية (بعد 7 اسابيع) وتحرر البكتريا، حيث تنطلق البكتريا الى التربة وتتحول الى شكل عصوي قصير سالب لصبغة جرام Gram negative، وتفقد قدرتها على تثبيت النيتروجين. تستمر هذه الصورة (المترممة) في التربة حتى تصيب هذه البكتريا الشعيرات الجذرية للنبات المناسب في الزراعات اللاحقة ـ طبقا لآلية خاصة ـ وتبدأ في التحول مجدداً من الصورة العصوية الى صورة "الباكتيرويد". النشط في عملية تثبيت النيتروجين.

حالة البكتيرويد هذه تظهر في حالة النباتات البقولية والرايزوبيم (والبرادي ريزوبيم)

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي

أما الاكتينوميسيتات التي تكون عقد جذرية مع النباتات غير البقولية مثل بكتريا "الفرانكيا" فانها لا تُكون الباكتيرويد على الإطلاق وتبدو داخل العقد الجذرية بنفس الشكل المورفولوجي الذي تكون عليه في الصورة الحرة في التربة.

ومن خلال التثبيت التكافلي تستطيع نباتات البرسيم مثلاً أن تثبت نحو 147 كجم نتروجين للفدان في المناطق الباردة. يظهر التكافل أيضاً في جذور بعض النباتات غير البقولية non-legumin ous plants سواء معراة الجذور مثل نباتات

شكل (126): العقد الناتجة من الفرانكيا

السيكاس Cycas التي تتكافل معها السيانوبكتريا من نوع *Anabanena cycadeae* ، أو مغطاة البذور مثل اشجار الألناس *Alnus glutinosa* ، والكازورينا Casuarina ويتكافل معهما جنس الفرانكيا التابع لمجموعة الأكتينوميسيتات **(شكل (126))**. النباتات التي تكون علاقة تكافلية مع الفرانكيا يطلق عليها Actinorhizal plant. ويلاحظ أن أشجار الألدر المصابة بالفرانكيا Frankia-infected alder تستطيع النمو في المناطق الفقيرة في محتواها من النيتروجين في حين أن الأشجار الغير مصابة بها تنمو بشكل ضعيف، وتتكون عقد جذرية فعالة في تثبيت النيتروجين بميكانيكية مشابهة مع تلك التي تحدث بين الريزوبيا وجذور النباتات البقولية. ويطلق على هذا النوع من التكافل بالتكافل الداخلي **endosymbioses.**

هناك نوع آخر من التكافل يطلق عليه التكافل الخارجي **ectosymbiosis** والمثال على ذلك التكافل بين الأنابينا *Anabaena* (وهي سيانوبكتريا مثبتة للنيتروجين) مع نباتات الأزولا *Azolla* وهو نبات مائي سرخسي ينتشر بصفة خاصة في المناطق الإستوائية. في هذه العلاقة التكافلية تعيش الأنابينا داخل نبات الأزولا على شكل خيوط لزجة في فجوات توجد على السطح السفلي لنبات الأزولا وتستطيع الأنابينا في هذه الحالة أن تثبت نحو 250 كجم نتروجين للفدان/ الموسم في أراضي الأرز المغمورة بالمياة. وتقدر الإحصائيات أن ما يزيد عن 3 مليون إيكر (الإيكر

نحو 1046 متر مربع) من أراضي الأرز تزرع بالأزولا في الصين الشعبية والتي تعطي نحو 100 الف طن متري من السماد النيتروجيني والذي يقدر بما يزيد عن 100 مليون دولار سنويا (**Lim, 1998**).

التثبيت التكافلي على الساق

بعض البكتريا المثبتة للنيتروجين تكون عقد تكافلية على الساق stemnodulation تقوم بتثبيت النيتروجين بالاضافة الى قدرتها على القيام بتثبيت ثاني أكسيد الكربون (عملية البناء الضوئي). **شكل (127)**

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

شكل (127): العقد الساقية للبكتريا *Azorhizobium caulinodans* على نبات *Sesbania rostrata*

ونتعرض فيما يلي لنماذج من هذه الاسمدة الحيوية:

1.1.3 الاسمدة النيتروجينية

النيتروجين هو حجر الاساس للحياة بوجه عام، فهو اساسي لحياة كل من الانسان والحيوان والنبات والميكروبات على حد سواء. النيتروجين هو جحر الزاوية للاحماض الامينية التي بدورها تكون البروتينات، وبالتالي الانزيمات والبروتوبلازم الخلوي بما يحتويه من أحماض امينية (التي تمثل الجينوم أو المادة الوراثية للخلية DNA, RNA) وكذلك في تركيب

Coenzyemes وغيرها من المركبات الحيوية المهمة في عمليات التنفس والبناء الضوئي، ويمكننا القول ايضاً ان النيتروجين هو الحياة!

يختلف النيتروجين عن معظم العناصر المعدنية الموجودة في التربة في ان مصدره الاساسي هو الهواء الجوي في حين لا تحتوي الصخور الاصلية ومعادن التربة عليه ولا تستطيع النباتات النامية الاستفادة من النيتروجين الغازي الا بعد ان يتم تثبيته من الصورة الغازية الى الصورة المثبتة بواسطة الميكروبات بدائية النواة.

ولما كانت هذه الميكروبات لها من القدرة على تثبيت الآزوت الجوي دونما تلويث للنظام البيئي وبتكلفة أقل بكثير من السماد المعدني، فإن الاتجاه العالمي حالياً ينصح باستخدام السماد الحيوي (الميكروبي) الآمن صحيا وبيئياً ومجدي اقتصاديا.

الاسمدة النيتروجينية الحيوية عبارة عن مزارع ميكروبية لها القدرة على تثبيت نيتروجين الهواء الجوي يتم اضافتها على مادة حاملة مناسبة تحت ظروف التعقيم. ويطلق على الميكروبات التي لها القدرة على تثبيت النيتروجين في مجملها بـ "الديازوتروفس" Diazotrophs وعملية التثبيت الحيوي للنيتروجين Biological Nitrogen Fixation (BNF) تتم بواسطة تلك الميكروبات لبناء بروتوبلازم خلاياها الحية معتمدة في ذلك على الانزيم المتخصص في عملية التثبيت وهو انزيم النيتروجينيز Nitrogenase

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

والامونيا المثبتة داخل خلية الميكروب تمثل لبناء مواد بروتينية:

$$NH_3 + (\text{glutamate}) \xrightarrow[\text{Glutamic synthase}]{\text{Glutamine synthetase}} \text{Amino acids} \longrightarrow \text{Protein}$$

ويمكن القول ان عملية تثبيت النيتروجين تلي عملية البناء الضوئي من حيث الاهمية لاستمرار الحياة على وجه الأرض.

وعلى الجانب الآخر فإن عنصر النيتروجين من العناصر الكبرى الذي تحتاج اليه النباتات بكميات كبيرة، كما انه عرضة للفقد في التربة نتيجة لعمليات حيوية وغير حيوية منها الغسيل واختزال وانطلاق الآزوت، كما ان خصوبة التربة وانتاجيتها تتوقف بشكل كبير على مقدار ما تحتوية من ذلك العنصر. والمصدر الاساسي في تعويض ما يفقد من التربة هو تثبيت نيتروجين الهواء الجوي. ولا يُغفل في هذا المقام ما تسببه اضافة الاسمدة النيتروجينية المعدنية الى التربة من آثار خطيرة على المستوى الصحي والبيئي بالاضافة الى التكلفة الاقتصادية.

وللتمثيل، فانه لبيان الاهمية الاقتصادية لعملية التثبيت الحيوي على محصول واحد وهو الفول البلدي: فإنه بفرض ان عملية التثبيت البيولوجي توفر نحو 60 وحدة آزوت/ فدان تضرب في نحو مليون فدان على المستوى القومي ثم في سعر الوحدة الحالي ما يعني ملايين الجنيهات. وينطبق القول على المحاصيل البقولية الاخرى وحتى الغير بقولية تستفيد من عملية التثبيت ايضاً. إنَ التثبيت الحيوي للنيتروجين يعوض ما يزيد عن

الأستاذ الدكتور م / مظهر العيسوي التربة

90% من نيتروجين التربة على سطح الارض، ويأتي القدر الباقي (10%) من خلال التثبيت الصناعي والطبيعي.

يمكن تقسيم الاسمدة الحيوية النيتروجينية حسب علاقة الميكروب المستخدم فى اللقاح بالنبات الى: اسمدة حيوية تكافلية واسمدة حيوية لا تكافلية:

الأسمدة التكافلية Symbiosis

وتشكل البكتريا (اللقاح) في هذه الحالة نوعاً من تبادل المنفعة أو العلاقة التعاونية مع نباتات العائلة البقولية كما ان هناك تكافل مع غير البقوليات مثل الفرانكيا (اكتينوميسيتات) مع الكازورينا (اشجار غير بقولية)؛ حيث تقوم البكتريا بتثبيت النيتروجين الجوي وتجعله في صورة ميسرة للنبات (من خلال العقد الجذرية) مقابل حصول البكتريا على العناصر الغذائية اللازمة لنموها وتكاثرها من النبات.

تتم عملية التثبيت التكافلى مع العائلة البقولية بواسطة العديد من الاجناس البكتيرية مثل:

1- *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*

ويشمل جنس *Rhizobium* بكتريا سريعة النمو ومن اهم انواعها:

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

2- *R. meliloti* ويصيب البرسيم الحجازي

3- *R. trifolii* للبرسيم (المصري والأحمر والقرمزي)

4- *R. leguminosarum* ويصيب البسلة وبسلة الزهور والعدس والفول البلدي.

5- *R. phoseoli* يصيب الفاصوليا

أما جنس *Bradyrhizobium* فيشمل بكتريا بطيئة النمو ومن أنواعها:

6- *B. japonicum* يصيب فول الصويا

7- *B. lupine* ويصيب الترمس

8- مجموعة Cawpea rhizobia

فى حين ان جنس *Azorhizobium* فيكون عقد ساقية لتثبيت الآزوت على بعض البقوليات مثل السيسبان Sesbania

وقد قدرت كمية النيتروجين التي يمكن ان يتم تثبيتها عن طريق التثبيت التكافلي للنيتروجين بنحو 80-120 كجم/ فدان في الموسم الزراعي **(عبد المنعم، 2011).**

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

ولا يحدث التكافل فقط مع النباتات البقولية، ولكن قد يحدث مع اشجار ونباتات غير بقولية مثل ما يحدث بين اشجار الكازورينا وجنس الفرنكيا *Frankia* وهي احد اجناس الاكتينوميسيتات.

الأسمدة اللاتكافلية

Asymbioteic nitrogen fixers

وهي تلك الاسمدة التي تحوي الميكروبات التي تقوم بتثبيت النيتروجين بشكل لا تكافلي، أي وهي على الصورة الحرة في التربة بغض النظر كانت النباتات موجودة أم لا وان كان وجود النباتات يشجع هذه الميكروبات، وتقوم هذه الميكروبات بتثبيت النيتروجين لبناء بروتوبلازمها الخلوي ويتم تيسير هذا النيتروجين في التربة بعد موت الميكروب ومعدنة نيتروجينه العضوي الى صورة معدنية صالحة للنبات وتتم هذه المعدنة بواسطة ميكروبات أخرى.

وتتنوع الميكروبات اللاتكافلية المثبتة للنيتروجين في التربة من حيث احتياجاتها البيئية فمنها ما يتطلب ظروف هوائية مرتفعة مثل بكتريا الازوتوباكتر *Azotobacter sp* والبعض يتطلب الظروف اللاهوائية ويسود تحت الظروف الغدقة مثل ميكروبات *Clostridium sp*، وهناك

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

ميكروبات يناسبها توافر قدر محدود من الاكسجين مثل *Azospirillum sp*، وتختلف هذه الميكروبات ايضاً في درجات الحرارة التي تناسبها ومدى تحملها للملوحة ويمكن ان يستفاد من المعلومات الخاصة بكل ميكروب في تحديد نوع السماد الحيوي الذي يمكن استخدامة لمحصول ما تحت الظروف البيئية المختلفة وفي الحقل محل التطبيق. ومن الامثلة على ذلك ميكروبات السيانوبكتريا التي يمكن استخدامها فى تلقيح مزارع الأرز نظراً لقدرتها على تثبيت النيتروجين تحت الظروف المائية وتحملها لمدى واسع نسبياً من درجات الملوحة. وقد اثبتت الدراسات ان اضافة هذه البكتريا لمشتل الارز يمكن ان يوفر 15-20 وحدة نيتروجين.

وبصفةٍ عامة، فان كمية النيتروجين المثبتة بواسطة البكتريا غير التكافلية تقل بكثير عن تلك الكمية المثبتة بواسطة البكتريا التكافلية.

ومن الابحاث المبشرة في مجال الميكروبات المثبتة للنيتروجين تكافلياً انه امكن اجراء عملية تحول وراثي Transformation لبكتريا العقد الجذرية للفول البلدي *Rhizobium leguminosarium bv.viciae* باستخدام بلازميد معزول من بكتريا محبة للملوحة من تربة ملحية بمحافظة كفر الشيخ بمصر، واستطاعت البكتريا المحولة تكوين العقد الجذرية بكفاءة عالية على نباتات الفول المروية بماء به نصف بالمائة كلوريد صوديوم (دون تأثر في عدد ولا وزن العقد، ولا فروق معنوية في الوزن الاخضر

والجاف ولا نسبة النيتروجين للنباتات مقارنة بالنباتات المروية بماء الصنبور)، وهذه النتائج تبشر بامكانية استخدام تلك العزلات (المتحولة وراثياً) كسماد حيوي نيتروجيني تكافلي في الاراضي حديثة الاستصلاح وتحت الظروف المائلة للملحية السائدة في مصر **(Hammad, et al. 2017)**

- **تلقيح التربة بالميكروبات اللاتكافلية المثبتة للنيتروجين**

تلقح التربة أو البذور أو الشتلات بالازوتوباكتر (توجد اسمدة باسم ازوتوباكترين (Azotobacterin)) أو السيانوبكتريا ولها منتجات تجارية باسم (Algalization))، وقد اظهرت الدراسات ان تلقيح الذرة والطماطم والجزر والقطن وبنجر السكر و القمح و الشعير تستفيد من عملية التلقيح بالازوتوباكتر حتى تصل الزيادة الى 10% أو اكثر.

الأسمدة الحيوية الفوسفاتية (مذيبات الفوسفات)

اغلب الفوسفور الموجود في الاراضي المصرية هو على الصورة غير الميسرة لميل تلك الاراضي الى القلوية التي يكون فيها الفوسفور على الصورة المثبتة التي لا يستطيع النبات الاستفادة منها. تلعب الكائنات الحية الدقيقة دوراً هاماً ومحورياً في تحويله الى الصورة الذائبة الصالحة للنبات. ومن أمثلة هذه الميكروبات:

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف

- بكتريا من اجناس *Pseudomonas* و *Bacillus*
- فطريات *Piriformospora indica*, *Penicilium*, ,

Aspergillus، بالاضافة لفطريات الميكوريزا

وهذه الميكروبات ذات مقدرة على تحويل الفوسفور الغير ذائب الى صورة ذائبة نتيجة لافراز هذه الميكروبات لاحماض عضوية تساعد على خفض الـ pH ومن ثم اذابة الفوسفور المثبت. ويوجد فى السوق المحلية اسمدة حيوية فوسفاتية تستخدم لهذا الغرض وتحتوي هذه الاسمدة على بعض الميكروبات المعروفة بكفاءتها العالية فى تيسير الفوسفور مثل:

Bacillus megaterium var *phosphaticum*، ومن اشهر الفطريات المستخدمة ايضاً فى هذا الغرض فطر الميكوريزا ولكن يعاب على هذا الفطر الأخير وما يحد من استعماله على نطاق تجاري واسع هو انه اجباري التطفل؛ فلا يمكن تنميته على البيئات الصناعية المعملية، في حين ان الفطر *Piriformospora indica* يمكنه ان يقوم بنفس الدور الحيوي للميكوريزا بالاضافة الى تميزه بميزة اضافية تجعله قابل للتطبيق على النطاق التجاري الا وهي امكانية تنميته معملياً (culturable fungus) على البيئات الصناعية Artificial media كما تساعد هذه الميكروبات نتيجة لما تفرزه من منشطات في زيادة كفاءة وتنشيط

ميكروبات اخرى هامة كميكروبات تثبيت النيتروجين. تمثل هيفات فطر "البيريفورموسبورا انديكا" جذوراً اضافية للنبات تنتشر في منطقة الريزوسفير لتمتص الماء والعناصر الغذائية اضافة الى فوائدها العديدة الاخرى من زيادة حجم المجموع الجذري والخضري ومقاومة الامراض ..الخ

المخصبات الحيوية في مصر

هناك العديد من المخصبات الحيوية في مصر(**شكل (128)**) حالياً والتي تختلف في دورها االتسميدي والذي قد يمتد ايضاً الى المقاومة الحيوية، وازدادت ثقافة المزارعين حول هذه الاسمدة وكيفية ومجالات استخدامها. وفي الاسواق المحلية المصرية يوجد العديد من المسميات التجارية الخاصة بالاسمدة الحيوية مثل ريزوباكترين والذي يستخدم كمخصب حيوي نيتروجينى ويتفرع تحته العديد من المنتجات لتتناسب مع المحاصيل المختلفة. كما يوجد سماد حيوي تحت مسمى "فوسفورين" وهو مخصب حيوي مذيب للفوسفات. ومن الاسمدة الحيوية ايضاً ما يشيع استخدامه في مصر لتيسير البوتاسيوم تحت مسمى "بوتاسيوماج" وهذه الاسمدة الثلاثة السابقة تنتجها وزارة الزراعة المصرية - الهيئة العامة لصندوق الموازنة الزراعية.

الأستاذ الدكتور مظهر العيسوي الشريف