Rafidain Journal of Science
https://rsci.mosuljournals.com

Vol. 33, No.2, pp. 40-47, 2024

عزل وتشخيص بكتيريا *Bacillus* spp. المثبتة للنيتروجين واستجابتها لبعض المتغيرات البيئية

فوز عبد السلام الصفار
قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الموصل

p-ISSN: 1608-9391
e -ISSN: 2664-2786

Article information

Received: 10/ 9/ 2023
Revised: 5/11/2023
Accepted: 11/11/2023

DOI: 10.33899/rjs.2024.183434

corresponding author:
فوز عبد السلام الصفار
dr.fawz@uomosul.edu.iq

الملخص

تضمنت الدراسة محورين، الاول عزل وتشخيص بكتيريا الـ *Bacillus* spp. المثبته للنيتروجين الجوي من 10عينات ترب مختلفة المصدر من مدينة الموصل، وتشخيصها مجهرياً وزرعياً مع اجراء عدة فحوصات كيموحيوية، اختبرت فعاليتها لتثبيت النيتروجين بتلقيحها في وسط خال من النيتروجين مع وجود عينة المقارنة، واختيرت العزلة (F5) الافضل لأجراء المحور الثاني الذي هدف لمعرفة تأثير بعض العوامل البيئة مثل درجات الحرارة المختلفة وتأثير ارتفاع نسبة الاملاح ومديات مختلفة من الأس الهيدروجيني على قدرة بكتيريا *Bacillus* لتكوين انزيم Nitrogenase المهم في تثبيت النيتروجين. أظهرت النتائج ان النمو الامثل للعزلة (F5) كان على وسط Nutrient Agar بدرجة حرارة 37م° في مستوى pH7. نميت البكتريا بدرجات حرارة 40° م، 45° م و50° م، تحملت العزلة المنتخبة النمو الى درجة الحرارة 50° م اذ كان هنالك فرق معنوي بالمقارنة مع عينة السيطرة اضافة الى الاحتفاظ بقدرتها على تثبيت النيتروجين. نميت البكتريا في اوساط زرعية حاوية على تراكيز 6%، 7% و8% من محلول NaCl وتحملت النمو الى تركيز 8% وبفارق معنوي بسيط عن عينة السيطرة، احتفظت البكتريا بقدرتها على تثبيت النيتروجين عند 6%، 7% وعند تركيز 8% كان هناك فارق معنوي بسيط مقارنة مع عينة السيطرة. كذلك نميت على اوساط ذات دالة حامضية 4و5و6، كان هنالك فرق معنوي بسيط في مستوى pH 6 عند مقارنته مع عينة السيطرة بينما عند مستوى pH 5 كان هناك نمو ضعيف وبفارق معنوي كبير قياسا مع عينة السيطرة، ولم يظهر اي نمو بكتيري عند4 pH، ثبتت النيتروجين عند مستوى 6 ولم يكن هناك فارق معنوي مقارنة بعينة السيطرة، الا انه ثبتت كمية قليلة جدا من النيتروجين عند مستوى 5 وكان بفارق معنوي كبير مقارنة بعينة السيطرة.

الكلمات الدالة: *Bacillus* ، تثبيت النيتروجين، الاسمدة الحيوية.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

المقدمة

أستخدم الجنس البكتيري *Bacillus* وأنواعه في العديد من التطبيقات الحيوية لما تمتلكه هذه البكتيريا من خصائص أهمها النمو في الأوساط الفقيرة وان الحصول على عزلة من بكتريا الـ *Bacillus* قادرة على التأقلم والنمو بظروف الاجهاد العالية ذو أهمية، إذ ان التحمل الملحي او تحمل درجات الحرارة العالية ضرورة ملحة وله أسبقية في مستقبل الزراعة للتغلب على الظروف التي تؤدي إلى ترك مساحات الأراضي بسبب التملح (Gao *et al.*, 2023). ان لعملية تثبيت النيتروجين اهمية كبيرة في خصوبة التربة اذ تؤدي لزيادة محتوى التربة من المواد النيتروجينية من خلال دور البكتريا المثبتة للنيتروجين (التعايشية واللاتعايشية) التي تقوم بتحويل النيتروجين الجوي الى نيتروجين عضوي يسهل على النبات امتصاصه (Qaddawi *et al.*, 2023)، وبذلك تعوض النقص الناجم عن تطاير املاح الامونيا وعمليات الرشح والصرف وما يمتصه النبات، ومن هنا انصب الاهتمام لدراسة واستغلال انواع البكتريا المثبتة للنيتروجين اذ من خلال بناء اجسامها تقوم بتحويله لمواد بروتينية لاستخدامه في بناء البروتوبلازم، و بعد موت هذه البكتريا تتحلل ويتحرر النيتروجين منها للتربة ليأخذ صورة صالحة فيقدر النبات ان يمتصه ويستفيد منه (Stella and Suhaimi, 2010). اكتشف جنس *Bacillus* من قبل العالم Ehrenberg عام 1835 وأطلق عليه *Vibrio subtilis* وينتمي إلى عائلة Bacillaceae والتي تضم العديد من الاجناس (Berkeley *et al.*, 2008) وتضم ايضاً أفرادا واسعة الانتشار في البيئة وذات متطلبات نمو بسيطة ولها القدرة على انتاج مدى واسع من المواد منخفضة أو عديمة السمية والفعالة ضد الأحياء المجهرية الأخرى، مما جعل أفراد هذا الجنس محط اهتمام وأنظار الباحثين، ويضم جنس العصويات حوالي 148 نوعا منها ذات أثر هام في مجال زيادة خصوبة التربة نظرا لأهميتها في دورة النيتروجين (Hashem *et al.*, 2019). وتتصف خلاياها بانها عصوية الشكل، مستقيمة أو منحنية قليلاً وتظهر مفردة او بشكل أزواج وبعض مستعمراتها بشكل سلاسل وأحياناً تشبه الخيوط الطويلة، مكونة للسبورات الداخلية وتكون موجبة لصبغة كرام (Al-Rawi *et al.*, 2012)، تتحرك البكتريا بوساطة الأسواط المحيطية Peritrichous flagella أو تكون غير متحركة، هوائية أو لاهوائية اختيارية والقليل من أنواعها تشبه البكتريا اللاهوائية، تنمو على الأوساط الاعتيادية مثل الوسط المغذي الصلب Nutrient agar وأكار الدم Blood agar (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). وغالباً ما تعزل هذه البكتريا من التربة اذ تتواجد بكثرة في المنطقة المحيطة بالجذر (Agrawal and Agrawal, 2013) وبعض البيئات الأخرى مثل الماء والغذاء والعينات الطبية، ومعظم أنواعها تكون غير مرضية للإنسان أو الحيوان ماعدا *B.anthracis* المسببة للجمرة الخبيثة وبعض أنواعها تسبب التسمم الغذائي، وبعض سلالات *B. thuringiensis* تكون ممرضة للافقاريات (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). بالنظر لاختلاف قدرة الكائنات المجهرية في تثبيت النيتروجين هدف البحث لعزل وتشخيص بكتريا *Bacillus* ومدى استجابتها لبعض المتغيرات البيئية مثل درجات الحرارة ومستويات ملوحة مختلفة وكذلك تأثير الدالة الحامضة، وقدرتها على انتاج أنزيم النايتروجينيز المهم في تثبيت النيتروجين.

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص بكتيريا *Bacillus*

أخذت 10 عينات مختلفة من المنطقة المحيطة بالجذر لنباتات مزروعة في مواقع زراعية متعددة من مدينة الموصل. واجريت عدة تخافيف عشرية للعينات المأخوذة من التربة، أخذ 0.1 مل من التخفيف الاخير ونشر في اطباق حاوية على الوسط الغذائي الصلب Nutrient agar، التقطت المستعمرات النقية وتم اخذ حملة لوب واعادة زرعها على نفس الوسط بطريقة التخطيط، ثم شخصت خصائصها الزرعية المظهرية وفحصت مجهريا لمعرفة شكل وترتيب الخلايا وتفاعلها مع صبغة كرام وتكوينها للأبواغ.

الفحص المجهري

حضرت مسحة البكتيريا من مزرعة نقية على شريحة زجاجية وصبغت بصبغة كرام وفحصت تحت المجهر الضوئي (بقوة تكبير 1000x) ولوحظت صفاتها الشكلية الخارجية وترتيب الخلايا البكتيرية (Macfaddin, 2000).

1- الفحوصات الزرعية Cultural tests

لغرض تشخيص عزلات البكتريا تمت ملاحظة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية من حيث اشكالها وألوانها وسطح المستعمرات وحوافها ووجود روائح مميزة لها وشفافيتها وقوامها على سطح الاكار المغذيNutrient agar (Black,1965).

2- الفحوصات البايوكيميائية Biochemical tests

أجري فحص الاوكسيديز والكتاليز واستهلاك السترات والحركة حسب طريقة Macfaddin (2000) وكذلك انتاج الاندول وفوكاس بروسكار حسب ما جاء في (Murray *et al*., 2007) وفحص اختزال النترات (Speck,1976) وتسييل الجلاتين (Harrigan and McCance, 1976) وفحص تحلل اليوريا (Atlas, 2006).

اختبار تحمل نمو بكتريا الـ *Bacillus* في درجات الحرارة المختلفة

تم اختبار نمو العزلة (F5) والتحقق من قدرتها على تثبيت النيتروجين وذلك بزرعها على الوسط الخالي من النيتروجين Nitrogen-free broth (NF)، وحضنت عند درجات حرارية مختلفة وهي (40 و45 و 50)° م ولمدة (5 ايام) وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة مع عينة السيطرة وتم قياس النمو البكتيري بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600nm، والتحقق من قدرة انزيم النيتروجينيز على تثبيت النيتروجين بقياس النمو عند الطول الموجي 480nm باستخدام كاشف نسلر (Geckil, *et al*., 2005).

اختبار تحمل نمو بكتريا الـ *Bacillus* لتراكيز مختلفة من الـ NaCl

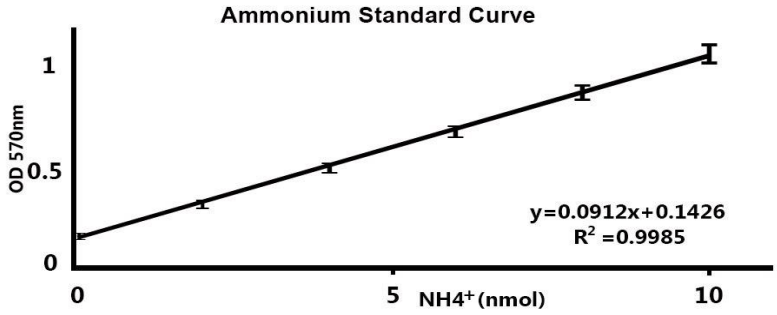
اضيف ملح كلوريد الصوديوم الى وسط Nitrogen-free broth (NF) بتراكيز مختلفة تضمنت (6 و7 و8 %)، وثم تعقيم الوسط واضافة اللقاح البكتيري له وعمل ثلاث مكررات لكل تركيز وحضنت على درجة 37° م لمدة خمسة ايام، وملاحظة وجود نمو بكتيري وفعالية انزيم النيتروجينيز كما في اعلاه.

اختبار تحمل نمو بكتريا الـ *Bacillus* في الوسط الحامضي:

اختبرت قابلية نمو العزلة (F5) على تحمل الاجهاد الحامضي وذلك بزراعة هذه العزلات على وسط (NF) Nitrogen-free broth عند الاس الهيدروجيني (4 و5 و6)، وكذلك ملاحظة النمو البكتيري بقياس الكثافة الضوئية (O.D.) بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600nm اما الطول الموجي 480nm فكان لمعرفة قابلية انزيم النيتروجينيز على تثبيت النيتروجين وباستخدام كاشف نسلر (Geckil *et al*., 2005).

اختبار قدرة البكتريا على تثبيت النيتروجين باستعمال كاشف نسلر

أجري قياس نمو العزلة (F5) على تثبيت النيتروجين بعد 5 ايام من تحضينها حسب ما جاء بطريقة (Geckil *et al*., 2005) وبالاعتماد على المنحنى القياسي لاختبار الامونيا.



الشكل 1: المنحنى القياسي للامونيا

التحليل الاحصائي

حللت البيانات باستخدام اختبار ANOVA ببرنامج Graph Prism Software V. 7.00 بمستوى احتمالية $p\leq0.05$.

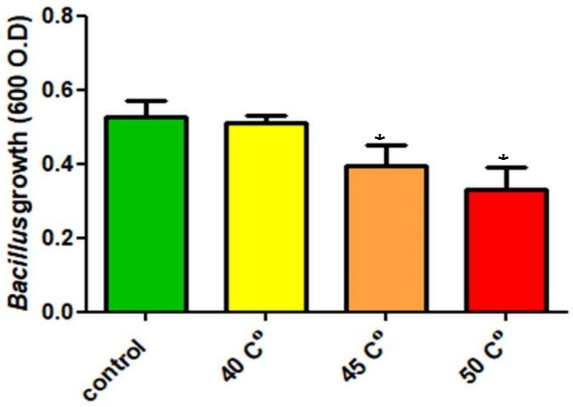
النتائج والمناقشة

انتخبت العزلة (F5) ذات الشكل العصوي المفرد المتسلسل والمتحركة الموجبة لصبغة كرام باستخدام المجهر الضوئي، اما الصفات الزرعية فكانت المستعمرات كروية الى دائرية محدبة بحافات منتظمة ولون ابيض مائل الى الكريمي، أظهر (الجدول 1) ان العزلة المنتخبة تحمل صفات بكتريا *Bacillus subtilius* التي استكملت بها تجارب المحور الثاني.

الجدول 1: الفحوصات البايوكيميائية لبكتريا *Bacillus subtilius* (F5)

الفحص	النتيجة
الاوكسيديز Oxidase test	+
الكاتاليز Catalase	+
استهلاك السترات Citrate Utilization test	+
الحركة Motility test	+
فوكاس بروسكار Vogus Proskauer test (VP)	+
اختزال النترات	+
انتاج الاندول Indol test	_
تسييل الجلاتين Gelatin liquefaction test	+
تحلل اليوريا Urease	_

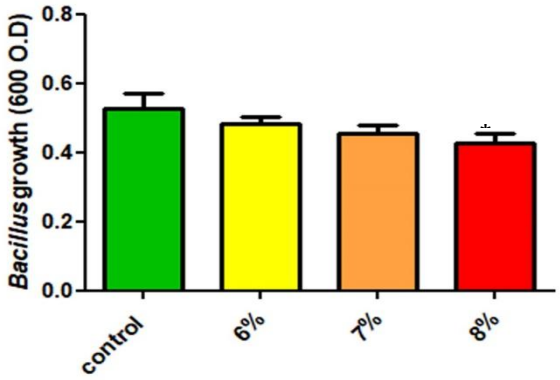
بينت نتائج الشكل (2) الخاص باختبار النمو البكتيري بدرجات الحرارة المختلفة عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$. عند درجة حرارة 40°م كان النمو جيدا ومقارباً الى مستويات النمو مقارنة مع عينة السيطرة وفي درجة حرارة 45° م كان هناك فرق معنوي بسيط مقارنة مع عينة السيطرة، بينما في درجة 50° م كان هنالك فرق معنوي بالمقارنة مع عينة السيطرة الا انه لازال النمو البكتيري جيدا وهذا يدل على تحمل البكتريا ونموها في مستويات مرتفعة من درجات الحرارة (Malkawi and Al-Omari, 2010). وقد يعزى السبب لسبورات هذه البكتريا ومقاومتها لدرجات الحرارة العالية والجفاف لاحتوائها على dipicolinic acid (Berendsen *et al*., 2015; Gao *et al*., 2023).



الشكل 2: النمو البكتيري بدرجات حرارة مختلفة

(*) فرق معنوي عند مستوى احتمال P≤0.05 بالمقارنة مع عينة السيطرة

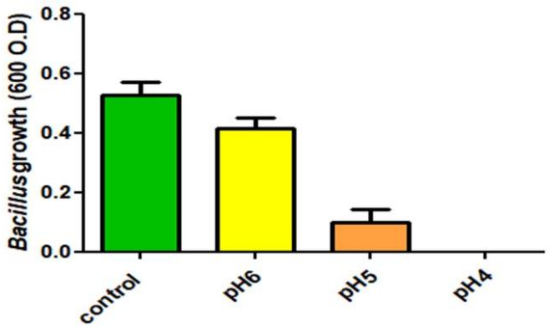
يوضح الشكل (3) قدرة نمو البكتريا بتراكيز مختلفة من الملوحة، اذ انه في التركيز 6% و7% قد نمت البكتريا وليس هناك فروق معنوية مقارنة بعينة السيطرة، بينما في التركيز 8% كان هناك فرق معنوي بسيط مقارنة بعينة السيطرة وهذا جاء موافق لما ذكره (Kawasaki, 2011) ان البكتريا التي تتحمل العيش بدرجات حرارية منخفضة تكون اقل تحملا لتراكيز الاملاح العالية وعلى العكس من ذلك فان نمو البكتريا بدرجات حرارية مرتفعة يمكنها من العيش بتراكيز ملحية عالية. وإن الأحياء المجهرية المتحملة لتراكيز مختلفة من الملوحة قادرة على تثبيت النتروجين الجوي وهذه الصفة لها دور في زيادة خصوبة التربة.



الشكل 3: النمو البكتيري بتراكيز ملحية مختلفة

(*) فرق معنوي عند مستوى احتمال P≤0.05 بالمقارنة مع عينة السيطرة

ولوحظ في نتائج اختبار تحمل بكتريا الـ *Bacillus* للدالة الحامضية ان في مستوى حامضية pH 6 هنالك فرق معنوي بسيط عند مقارنته مع عينة السيطرة بينما عند مستوى pH 5 كان هناك نمو ضعيف وبفارق معنوي كبير قياسا مع عينة السيطرة الشكل (4)، ولم يظهر اي نمو بكتيري عند pH 4، وهذا جاء موافقا لدراسة قام بها (Luo *et al*., 2015) اذ اشار فيها لقدرة بكتريا الـ *Bacillus* للنمو بين pH 6-9، وكذلك لما توصل اليه (Satapute *et al*., 2012) بكون الـ *Bacillus* لا تنمو بوسط حامضي او قاعدي عالي جدا.



الشكل 4: النمو البكتيري بدالة حامضية مختلفة

(*، **) فرق معنوي عند مستوى احتمال P≤0.05 بالمقارنة مع عينة السيطرة

يعتمد نجاح تثبيت النيتروجين الحيوي في الترب المعرضة لجهد ملحي او اجهاد بدرجات الحرارة او فيما يتعلق بدرجة الـ pH على قدرة نمو الكائن المجهري المثبت للنيتروجين في مثل هذه الظروف، وفي هذه الدراسة استطاعت العزلة المنتخبة (F5) النمو وتعتبر هذه سمات زراعية مرغوبة بها جدا ولاسيما بعد اجراء اختبار قدرة هذه العزلة لتثبيت النيتروجين (باستخدام كاشف نسلر)، اذ بينت النتائج ان نموها بتلك الظروف لم يعق قدرتها من انتاج انزيم النايتروجينيز (Satapute *et al.*, 2012). فمن (الجدول 2) نلاحظ ان البكتريا استطاعت تكوين انزيم النايتروجينيز درجة حرارة 40°م و45°م بشكل مقارب لعينة السيطرة وحتى بدرجة 50°م ايضا استطاعت من انتاج هذا الانزيم وبفارق معنوي ملحوظ عن عينة السيطرة، كذلك بتجربة اضافة الـ NaCl كانت اضافة 6% و7% مقاربة لعينة السيطرة اما تركيز 8% فجاء مختلفاً قليلاً وبفارق معنوي بسيط عن عينة السيطرة، اما فيما يتعلق باختبار الدالة الحامضية فكان تكوين انزيم النايتروجينيز عند مستوى 6 مقارب لعينة السيطرة لكن عند المستوى pH5 جاء بفارق معنوي كبير عن عينة السيطرة في حين انه لم يلاحظ عند pH4 قدرة البكتريا للنمو وعليه لم يتم انتاج النايتروجينيز.

الجدول 2: قدرة البكتريا على تثبيت النيتروجين في ظروف بيئية مختلفة

control	40 C°	45 C°	50 C°
0.9660±0.06353	0.9430±0.0.05174	0.8217±0.0.06200	0.6367±0.1266**
	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl
	0.9207±0.05460	0.7913±0.1214	0.6557±0.1005*
	pH6	pH5	pH4
	0.7714±0.1031*	0.05233±0.03669***	--

تأثير زيادة في درجات الحرارة وتراكيز NaCl ومستويات من الاس الهيدروجيني على قدرة البكتريا لتثبيت النيتروجين (*،**،***) فرق معنوي عند مستوى احتمال P≤0.05 بالمقارنة مع عينة السيطرة.

الاستنتاجات

1. لبكتريا الـ *Bacillus* المرضية القدرة على تثبيت النيتروجين الجوي لامتلاكها انزيم الـ Nitrogenase، والذي يمكن استخدام هذه الميزة في البكتريا كمخصب حيوي.
2. قدرة البكتريا على تحمل درجات الحرارة العالية لحد 50°م مع احتفاظها بقدرتها على تثبيت النيتروجين.
3. تمكنت البكتريا من النمو عند اختبارها على وسط يحتوي على ملح كلوريد الصوديوم NaCl وهذا يحث على استخدام هكذا بكتريا كمخصب حيوي للأراضي الزراعية المالحة خاصة وأنها استطاعت تثبيت النيتروجين ايضا.

4. النمو الامثل للبكتريا كان عند الوسط المتعادل للأس الهيدروجيني، وتمكنت من النمو على الوسط القاعدي pH 6 واحتفظت بقدرتها على تثبيت النيتروجين، لكنها اخفقت في النمو عند الوسط الحامضي pH 4.

5. قد يكون من الممكن ايجاد انواع اخرى من البكتريا المرضية التي بامكانها تثبيت النيتروجين

المصادر

Agrawal, D.P.K.; Agrawal, S. (2013). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*., **2**(10), 406-417.

Al-Rawi, A.M.; Mohammed, G.A.; Al-Allaf, M.A. (2012). Some metals removal by biomass of *Bacillus* and *Pseudomonas* from wastewater of second campus of Mosul University. *Raf. J. Sci*., **23**(4), 1-9. Doi: 10.33899/RJS.2012.64475.

Atlas, R.M. (2006). "Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food". 2nd ed. CRC Press Taylor and Francis Group, USA. 446 p. Doi tps://doi.org/10.1201/9781420039726.

Berendsen, E.M.; Krawczyk, A. O.; Klaus, V.; de Jong, A.; Boekhorst, J.; Eijlander, R.T.; Wells-Bennik, M.H.J. (2015). *Bacillus* thermoamylovorans spores with very-high-level heat resistance germinate poorly in rich medium despite the presence of ger clusters but efficiently upon exposure to calcium-dipicolinic acid. *Appl. Environm. Microbiol*., **81**(22), 7791–7801. Doi: https://doi.org/10.1128/AEM.01993-15

Berkeley, R.; Heyndrickx, M.; Logan, N.; De Vos, P. (2008). "Applications and Systematics of Bacillus and Relatives". Wiley-Blackwell Science Ltd. USA. 336 p. ISBN: 978-0-470-69674-3.

Black, C.A. (1965). "Methods of Soil Analysis". Part 2. Chemical and Microbiological Properties, Am. Soc. Agron. Inc. Madison, Wisconsin, USA. Doi: 10.3390/ijerph120911975.

Ehling-Schulz, M.; Lereclus, D.; Koehler, T.M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *J. Microb. Spectr.*, **7**(3), 1-35. Doi: https://doi.org/10.1128/AEM.01993-15.

Gao, Y.; Carmen, R.D.B.; Amon, J.D.; Ramírez-Guadiana, F.H.; Assaf, A.; Brock, K.P.; Marks, D.S.; Kruse, A.C.; David Z.; Rudner, D.Z. (2023). The spova membrane complex is required for dipicolinic acid import during sporulation and export during germination. *J. Gen. Dev.*, **36**, 634–646. Doi:10.1101/gad.349488.122.

Geckil, H.; Ates, B.; Gencer, S.; Uckun, M.; Yilmas, I. (2005). Membrane permeabilization of gram-negative bacteria with a potassium phosphate/ hexane aqueous phase system for the release of L- asparaginase: An enzyme used in cancer therapy. *J. Proc. Bioch.,* **40**, 573-579.

Harrigan, W.F.; McCance, M.E. (1976). "Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology". Academic Press, London.

Hashem, A.; Tabassum, B.; Fathi, E.A.A. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Bio. Sci*., **26**(6), 1291-1297.

Kawasaki, Y.; Aoki, M.; Makino, Y.; Sakai, H.; Tsuboi, Y.; Ueda, J.; Kurosawa, N. (2011). Characterization of moderately thermophilic bacteria isolated from saline hot spring in Japan. *J. Micr. Indonesia*, **5**(2), 2. Doi: 10.5454/mi.5.2.2.

Luo, X.; Yan, Q.; Wang, C.; Luo, C.; Zhou, N.; Jian, C. (2015). Treatment of ammonia nitrogen wastewater in low concentration by two-stage ozonation. *Intl. J. Env. Res. Publ. Health,* **12**, 11975-11987.

MacFaddin, J. F. (2000). "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria". 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.

Malkawi, H. I.; Al-Omari, M. N. (2010). Culture-dependent and culture independent approaches to study the bacterial and archaeal diversity from Jordanian hot springs. *J. African J. Micr. Res.*, **4**(10), 923-932.

Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Landry, M.L.; Pfaller, M.A. (2007). "Manual of Clinical Microbiology". 9th ed. Washington, DC. American Society for Microbiology, USA.

Qaddawi, Z.T.; Mohammed, A.A.; Onu, W. (2023). Detection of family specialty for *Microbacterium sp*. AJ-Z isolated from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) root rodules. *Raf. J. Sci*., **32**(1), 9-15. Doi:10.33899/RJS.2023.177283.

Satapute, P.P.; Olekar, H.S.; Shetti, A.A.; Kulkarni, A.G.; Hiremath, G.B.; Patagundi, B.I.; Shivsharan, C.T.; Kaliwal, B.B. (2012). Isolation and characterization of nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain as-4 from agricultural soil. *Int. J. Rec. Sci. Res*., **3**(9), 62 -765.

Speck, M.C. (1976). "Compendium of Methods for Micro- Biological Examination of Foods". 2nd ed., American Public Health Association Inc, Washington, D.C. USA, pp. 222 – 230.

Stella, M.; Suhaimi, M. (2010). Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. *J. Trop. Agric. Fd. Sci*., **38**(2), 211-219.

Isolation and Characterize of Nitrogen-Fixing Bacteria *Bacillus spp*. and their Response to some Environmental Variables

Fawz A. Al. Saffar

Department of Biology/ College of Education for Pure Science/ University of Mosul

ABSTRACT

The study included two axes: the first was isolation and diagnosis of *Bacillus spp*. that fixed atmospheric nitrogen from 10 different soil samples collected from the city of Mosul, diagnosed microscopically and culturally depending on several biochemical tests. Its effectiveness in fixing nitrogen was tested by inoculating it in a nitrogen-free medium with the presence of a control sample. The best isolate (F5) was chosen to conduct the second section, which aimed to determine the effect of environmental factors, such as different temperatures, the effect of high salt content and different pH ranges on the ability of *Bacillus* to produce nitrogenase, which is important in fixing nitrogen. The results showed that the optimal growth of the isolate (F5) was on Nutrient Agar at a temperature of 37°C and a pH of 7. The bacteria were grown at temperatures of 40°C, 45°C, and 50°C, the isolate (F5) tolerated growth to a temperature of 50°C, as there was a significant difference compared to control sample, in addition to retaining its ability to fix nitrogen. The bacteria were grown in culture media containing 6%, 7%, and 8% concentrations of NaCl, and they tolerated growth to a concentration of 8%, with a slight significant difference to the control sample. The bacteria retained their ability to fix nitrogen at 6%, 7%, and at a concentration of 8%, there was a slightly significant difference compared to the control sample. It was also grown on media with pH value of 6, 5 and 4. There was a slight significant difference in the level of pH 6 when compared to the control sample, while at the level of pH 5 there was weak growth with a large significant difference compared to the control sample, and no bacterial growth appeared at pH 4. Nitrogen was fixed at pH6 and there was no significant difference compared to the control sample. However, a very small amount of nitrogen was fixed at pH5 and it was with a large significant difference compared to the control sample.

Keywords: *Bacillus*, fix nitrogen, biofertilizers**.**