تأثير عامل الزمن والمولبدنم والبوتاسيوم في نمو البكتريا العقدية في تربة الجادرية المعقمة

*علي صبيح عبد الأمير السعدي**

استلام البحث 18، آذار، 2009
قبول النشر 1،تموز، 2009

الخلاصة:

نفذت تجربة مختبرية لدراسة تأثير الزمن والمولبدنم والبوتاسيوم والتداخل بينها في نمو بكتريا الرايزوبيا, اذ استهدفت دراسة تأثير مستويات المولبدنم صفر, 0.25, 2.50 ملغم Mo . كغم$^{-1}$ تربة معقمة ومستويات البوتاسيوم صفر, 25, 50, 100 ملغم K . كغم$^{-1}$ تربة معقمة في الكثافة العددية لبكتريا *Rhizobium leguminosarum* في التربة الطبيعية المعقمة مع إضافة عامل مدة التحضين (الزمن) بوصفها عاملاً ثالثاً لنمو البكتريا بعد (3, 9, 15, 21) يوم من التحضين بدرجة 28°C. اذ أوضحت ألنتائج تفوق مستوى المولبدنم 2.50 ملغم Mo . كغم$^{-1}$ تربة معقمة والبوتاسيوم 50 ملغم K . كغم$^{-1}$ تربة معقمة بصورة معنوية على باقي المستويات خصوصاً عند مستوى مدة التحضين 15 يوماً اذ سجلت عند تداخلها أعلى متوسط كثافة عددية للبكتريا بصورة معنوية إذ بلغ 49.2×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة.

الكلمات المفتاحية : مولبدنم ، بوتاسيوم ، إنزيم النتروجينيز ، الروابط الببتيدية

المقدمة:

أن التقنيات الجزيئية الحديثة أظهرت إن تثبيت N_2 حيوياً يؤدي دور المحافظ على الحياة في الأرض وان الأنظمة البيئية الطبيعية الأكثر كفاءةً المثبتة للنتروجين الجوي الصديقة للبيئة هي البكتريا من جنس الرايزوبيوم العقدية [1]. فقد أكد [2] إن تكامل النظرات الجزيئية بدراسات أساسها المختبر والحقل والفسلجة والكيمياء الحيوية مطلوبة لتحسين فهم الأهمية البيئية والاقتصادية لاستجابة الرايزوبيا للعناصر المغذية. إذ إن سماد النتروجين الكيميائي هو الأكثر كلفة واستهلاكاً للطاقة وتلويثاً للبيئة [3 ، 4].

إن تأثير عنصر البوتاسيوم (K^+) في تثبيت N_2 حيوياً يمكن أن يكون حرجاً وذلك لأن K^+ عنصر أساسي وضروري لكل الكائنات الحية ويعد منظماً مهماً وضرورياً لأيض الإنسان والحيوان والنبات ومن دونه لا يكون في العالم حياة للإنسان والحيوان أو للنبات فهو مهم لعمليات الحياة [5]. وهو ضروري لنمو البكتريا [2]. ولبكتريا الرايزوبيوم الحرة المعيشة أيضاً [2 ، 5]. وذلك بسبب وظائفه الضرورية في الرايزوبيا, إذ أن الرايزوبيا تحتوي على 1% K^+ على الأقل من وزنها الجاف وهو من العناصر الكبرى الموجودة في حالة ايون موجب في خلية الرايزوبيا وله ادوار متنوعة في الايض وبوصفه عاملاً مساعداً للإنزيمات ومؤشراً كيميائياً [2]. وأشار الأخير إلى أن K^+ هو الايون الخلوي المعدني الموجب اللاعضوي الرئيس المطلوب من كل الكائنات الحية لأدائه بعض الوظائف الإنزيمية خصوصاً تنشيط الإنزيمات المشتركة في تكوين الروابط الببتيدية في أثناء تمثيل جزيئة البروتين في الخلية. وأن المعلومات المنشورة في تأثيرات هذا العنصر في تثبيت N_2 بوساطة الرايزوبيا تبقى قليلة [5].

أما المولبدنم فهو من المغذيات الضرورية مع حاجة مباشرة له في أيض الرايزوبيا لتتمكن من البقاء والنمو بوصفها أحياء حرة المعيشة ويواجد في المحلول في حالة ايون سالب MoO_4^{-2}, وهو عنصر أساسي لتثبيت N_2 الجوي بوساطة الرايزوبيا بسبب دوره في نظام إنزيم النايتروجينيز المثبت للنتروجين الجوي [2]. إذ أن له أثراً أساسياً في المواقع الفعالة للإنزيم [6]. ويعد المولبدنم مكوناً واحداً من اثنين يكونان بروتينات إنزيم النتروجينز Mo-nitrogenase [7].

وعلى الرغم من الأهمية البيئية والاقتصادية لفهم بيئة واستجابة بكتريا الرايزوبيوم للعناصر المغذية السابقة فانه وعلى ما يبدو لا توجد دراسات علمية موثقة حول التأثيرات المتداخلة بين المولبدنم والبوتاسيوم وعامل الزمن في نمو بكتريا الرايزوبيا وكخطوة أولى في هذا المجال أجريت الدراسة الحالية بهدف دراسة استجابة هذه البكتريا في التربة الطبيعية المعقمة لتتبعها لاحقاً دراسة ذلك في بيئتها الطبيعية غير المعقمة.

*كلية العلوم للبنات \جامعة بغداد

المواد وطرائق العمل:

1- التعقيم: لأجل منع حدوث أي تلوث بقتل جميع الميكروبات غير المرغوب فيها.

1-1- الزجاجيات: الأدوات والأواني الزجاجية مثل الأطباق والماصات و الدوارق المخروطية وأنابيب الاختبار وغيرها تم تعقيمها بوساطة الفرن (الحرارة الجافة) بدرجة 180°C لمدة ساعتين.

1-2- الأوساط الغذائية السائلة والصلبة والماء المقطر والقطن الطبي والتربة: تم تعقيمها بوساطة جهاز الموصدة تحت ضغط 15 باوند\ الانج المربع ودرجة حرارة $^{\circ}$121C ولمدة 20 دقيقة للكميات السائلة التي يقل حجمها عن لتر واحد ولمدة تصل إلى ساعة للكميات السائلة من1-5 لتر, أما التربة والمواد المضافة لها في الدوارق المخروطية سعة 300 مل فكان تعقيمها لمدة ساعة \ يوم لمدة ثلاثة أيام متتالية.

1-3- الأدوات المعدنية: السكين والملقط عقمت بطريقة (1) ثم بالغمس بالكحول والإمرار على لهب المشعل الغازي Bunsen burner واستعمالها فوراً عند زوال اللهب والتبريد الخفيف.

1-4- اليدان وسطح المناضد وصندوق التعقيم: Laminar flow Bench (Hood) وذلك عن طريق تجفيف الخلايا الميكروبية Dehydration agent وتخثير البروتين الخلوي لها, الأمر الذي يقتلها باستعمال الكحول الاثيلي 70 % قبل بدء العمل ألمختبري.

1-5- الهواء في صندوق التعقيم وفوهات الحاويات عند فتحها: عقمت بوساطة لهب المشعل الغازي الهادئ (المصباح Bunsen burner) وخصوصاً حول الفوهات أو قربها.

1-6- إبرة التلقيح (الانشوطة) Loop: عقمت بوساطة الجزء الساخن من لهب المشعل الغازي حتى تتلون باللون البرتقالي الساخن واستعمالها فوراً بعد تبريدها بغمس رأسها في حافة الوسط الغذائي المتصلب (YMA) المعقم وفي داخل صندوق التلقيح.

2- الأوساط والمحاليل الغذائية الصناعية المستعملة لتنمية البكتريا:

A- وسط مستخلص الخميرة- مانيتول السائل Yeast Mannitol Broth (YMB): أذيبت هذه المكونات في 900 مل ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.0 ثم أكمل الحجم إلى لتر وعقم بالموصدة [8 ، 9].

B- وسط مستخلص الخميرة- مانيتول أكار Yeast Mannitol agar (YMA): الإجراء نفسه في الفقرة A.

C- وسط مستخلص الخميرة- مانيتول أكار+ صبغة الكونغو الحمراء (YM Kongo red A).

3- السُلالة : أستعملت السلالة البكتيرية تتبع *Rhizobium leguminosarum* , تم الحصول عليها من مركز إباء للأبحاث سابقاً وقد أُجريت عليها عمليات التنشيط والفحص للتأكد من خواصها الحيوية.

4- التربة: أخذت عينة من الأفق A (0 - 30) سم لتربة رسوبية عائدة الى تحت المجموعة Typic Torrifluvent, وان معادن الأطيان فيها بحسب السيادة هي I, P, CL, Mt من منطقة الجادرية - مجمع جامعة بغداد, اذ جففت نماذج التربة هوائيا وطحنت ثم نخلت بمنخل قطر فتحاته 2 ملم ثم مزجت للحصول على التجانس وأجري لها بعض التحليلات الكيميائية والفيزيائية والإحيائية, جدول (1).

جدول(1): نتائج التحليلات الكيميائية والفيزيائية والإحيائية للتربة المستعملة

A-الصفات الكيميائية		القيم
درجة تفاعل التربة (pH)		7.45
درجة التوصيل الكهربائي (EC) ديسي سيمنز.م$^{-1}$		2.9
المادة العضوية	غم.كغم$^{-1}$	16.6
كاربونات الكالسيوم (الكلس)		233.0
النتروجين الجاهز	ملغم. كغم$^{-1}$	37.6
الفسفور الجاهز		5.20
المولبدنم الجاهز		0.67
السعة التبادلية للأيونات الموجبة (CEC)	سنتي مول+. كغم$^{-1}$	24.3
البوتاسيوم الذائب K^+		0.07
B- الصفات الفيزيائية		
نسبة الرطوبة عند 33 كيلو باسكال	25.5%	
التوزيع الحجمي لدقائق التربة %	الطين	31 %
	الغرين	53 %
	الرمل	16 %
النسجة : مزيجة طينية غرينية Silt Clay loam		
C- التقديرات المايكروبايولوجية		
عدد الأحياء المجهرية خلية. غم$^{-1}$ تربة جافة	البكتريا الكلية	5.6×10^6
	الفطريات الكلية	12.3×10^4

5- الفحوصات المخبرية والعملية :

1-5- الفحص بالمجهر الضوئي: وصف شكل الخلايا بعد أن صبغت بصبغة كرام وفحصت مجهرياً .

2-5- التنشيط: أعيد زرع السلالات كل لوحده على الوسط ألزرعي الصلب المضاف له صبغة احمر كونغو الموجود في أطباق زجاجية معقمة بطريقة التخطيط لملاحظة المستعمرات وتشخيصها.

3-5- دليل BTB: إن هذا الفحص هو للتأكد عملياً من جنس البكتريا, فقد زرعت البكتريا على وسط مستخلص الخميرة- المانيتول الصلب (YEMA) الذي أضيف إليه صبغة Bromothymol Blue (بتحضير محلول ستوك 0.5 % لهذا الدليل في 0.016 N هيدروكسيد الصوديوم عند pH=6.8 ليؤخذ منه 5 مل منه ويضاف إلى 1 لتر من الوسط قبل التعقيم بالموصدة) [8] . فالبكتريا *Rhizobium* تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأصفر, أما البكتريا *Bradyrhizobium* فتحوله إلى الأزرق.

6- الحفظ النظامي: إن هذه العملية هي لأجل توفير مزارع ساندة بانتظام لمدة 2-3 شهر لاستعمالها في أثناء مدة إجراء التجارب, وذلك بتلقيح قناني زجاجية خاصة لها فوهة وغطاء لولبي حاوية على وسط (YEMA) المائل بالبكتريا من مستعمرات مثالية بطريقة التخطيط وحضنها بدرجة حرارة 28°C مدة 24 ساعة ويحكم إغلاقها لمنع التلوث ثم تحفظ بدرجة حرارة 4°C في الثلاجة وتستمر هذه العملية دورياً.

7- تحضير مزارع سائلة Broth culture:
حُضر اللقاح السائل في ظروف التعقيم بعد تنشيط السلالات البكتيرية, بأخذ جزء متساوي من المستعمرات النقية المثالية النامية في أطباق التنشيط باستعمال انشوطة التلقيح المعقمة وزرعها في بيئة وسط مستخلص الخميرة السائل (YMB) المعقم السائل المُحضر سابقاً في الدوارق المخروطية الزجاجية المغلقة فوهتها بالقطن الطبي والورق المعدني, ثم وضعت المزارع السائلة في الحاضنة الهزازة وضُبطت عند 100 دورة\ دقيقة عند درجة حرارة 28°C لمدة ثلاثة أيام [10] , بعدها تحفظ في البراد عند درجة حرارة 4°C.

8- العد المكروبي :

8-1- العد المباشر بطريقة التخفيف والعد بالأطباق: يجب أولا تحضير أنابيب اختبار زجاجية كافية يوضع فيها 9 مل ماء مقطر تغلق فوهتها بالقطن الطبي وتعقم بالموصدة وتبرد لأجراء حساب الخلايا الحية البكتيرية في 1مل من المزرعة السائلة, اذ حُضرت سلسلة من التخافيف المضاعفة للمزرعة البكتيرية التي يراد اخذ اللقاح السائل منها, وذلك لاستخراج معدل عدد الخلايا الحية في 1مل من المزرعة السائلة, كما ورد في [8 ، 9].

8-2- العد غير المباشر بطريقة قياس الامتصاصية لمعلقات المزرعة البكتيرية النقية: الغاية من هذه العملية هو تقدير عدد الخلايا البكتيرية في المزرعة السائلة, اذ يتم إيجاد علاقة بين أعداد البكتريا الحية في 1مل من المزرعة السائلة المحسوبة بطريقة التخفيف والعد بالأطباق لكل تخفيف وقراءة امتصاصيتها (كثافة المزرعة البكتيرية مقابل كل تخفيف) باستعمال جهاز الطيف الضوئي عند طول موجي 580 نانوميتر وباستعمال برنامج Excel ترسم هذه العلاقة بشكل منحنى, لكي يستعمل هذا المنحنى لاحقاً في تقدير أعداد البكتريا في مزارعها السائلة, ويجب غسل أنابيب القراءة Cuvettes الخاصة بالجهاز جيداً بالماء المقطر بين كل قراءة وأخرى.

8-3- حساب خلايا البكتريا الحية في 1غم تربة جافة: تم بالعملية السابقة نفسها ولكن تحضير التركيز الأول ضمن سلسلة التخافيف المضاعفة يتم بإضافة 180 مل ماء مقطر معقم ومبرد إلى 20غم تربة, ثم يرج الخليط لمدة 10 دقائق للحصول على محلول متجانس تركيزه 10^{-1} تتفكك فيه التربة وتنطلق الخلايا البكتيرية إلى المحلول, وهكذا أجريت سلسلة التراكيز المخففة لمحلول التربة بوساطة أنابيب الاختبار المحضرة ومن ثم استخراج معدل عدد الخلايا في 1مل محلول التربة, ثم يحول إلى 1 غم تربة جافة كما في [8].

9- التجربة المختبرية:
استهدفت هذه التجربة معرفة تأثير مستويات المولبدنم بهيئة $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}\ .\ 4\ H_2O$ (54 % Mo) والبوتاسيوم بهيئة K_2SO_4 (41.5 % K) وعامل الزمن والتداخل بينها في نمو بكتريا الرايزوبيا في التربة المعقمة, اذ بلغت عدد الدوارق المستخدمة 144 دورق وهذا العدد ناتج من تدخل ثلاثة مستويات من المولبدنم (0 ,0,25 ,2,50) ملغم Mo\ كغم وأربعة مستويات من البوتاسيوم (0 ,25 ,50 ,100) ملغم K\ كغم وأربع مدة تحضين (3, 9, 15, 21) يوم وثلاثة مكررات لكل معاملة, اذ عقمت الدوارق مع التربة والمواد المضافة بصورة سائلة بعد سدها بسدادات قطنية وغطيت رؤوس الدوارق بالورق المعدني وعقمت باستعمال جهاز الموصد، ثم أضيف في ظروف التعقيم 1مل من اللقاح البكتيري من مزرعة بكتيرية سائلة (Broth culture) بعمر ثلاثة أيام [10], لكل دورق ومن ثم رطبت التربة بنحو 1/3 بار وتم الحفاظ على رطوبة التربة الموجودة في الدورق خلال مدة البحث بالطريقة الوزنية بتسجيل وزن الدورق والتربة والرطوبة والمعاملة على كل دورق وتعويض الفقد, وحسبت أعداد البكتريا في اللقاح بطريقة التخفيف والعد بالأطباق وكان العدد 1.5×10^8 خلية. مل$^{-1}$ لقاح وحضنت جميع المعاملات بالحاضنة على درجة 28°C وحسبت أعداد بكتريا الرايزوبيا باوقات التحضين المذكورة سابقاً بطريقة التخفيف والعد في أطباق.

10- التصاميم الإحصائية :-
أتبع في التجربة التصميم تام التعشية CRD (Complete Randomization Desgin), وتم تحليل التجارب إحصائياً على وفق طريقة تحليل التباين ANOVA وقورنت المتوسطات بحسب اختبار اقل فرق معنوي (Least Significant Difference) LSD عند المستوى المعنوي 0.01 [11].

النتائج والمناقشة:

1- الفحوصات المختبرية:

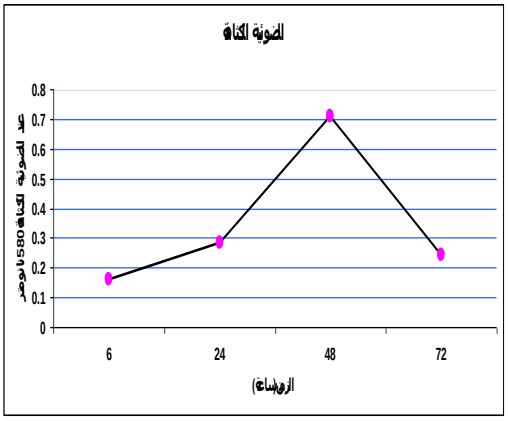
1-1- الوصف المجهري لبكتريا *Rhizobium*:
أظهرت نتائج الفحص المجهري للبكتيريا بعد تنشيطها باستعمال طريقة التخافيف المتسلسلة Serial dilution وطريقة التخطيط على الأطباق

Streaking للحصول على مستعمرات نقية, أنها سالبة لصبغة كرام وتترتب بشكل أزواج عصوية ثنائية وقسم منها عصوية مفردة الشكل, منفردة مكونة الشكل Y ومتحركة.

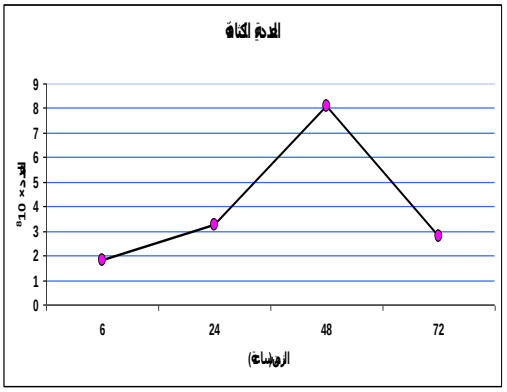
2-1- فحص احمر كونغو Kongo red Agar: ظهرت خلايا البكتريا في أطباق التنمية التي حضنت بصورة مقلوبة عند درجة حرارة 28°C ولمدة ثلاثة أيام, بشكل مستعمرات بيضاء اللون ذات قوام مخاطي على سطح الوسط ألزرعي YEMA المضاف له صبغة احمر الكونغو، إذ لم تمتص مستعمرات البكتريا هذه الصبغة, مع العلم إن هذه الصبغة تذوب بالماء وفي الكحول الاثيلي, وان امدصاصها يتأثر بطبيعة الوسط وظروف عملية التحضير والزرع.

3-1- فحص Bromothymole blue (BTB): أظهر فحص (BTB) إن البكتريا تعود إلى الجنس *Rhizobium* إذ استطاعت تحويل لون الوسط ألزرعي من اللون الأخضر إلى الأصفر.

4-1- منحنى النمو القياسي: حدد منحنى النمو القياسي وكان طور النمو اللوغارتمي يبدأ قبل الساعة السادسة ويمتد إلى نحو الساعة السادسة والثلاثين تقريباً ثم يعقبه طور الثبوت stationary phase من الساعة السادسة والثلاثين إلى نحو الساعة خمسين تقريباً (الشكل 1 و2), أن الطور اللوغارتمي يبدأ عندما تكون سرعة النمو ثابتة وخلاله تكون جميع الخلايا حية وحجمها ثابت تقريباً وتنقسم عند أقصى معدلاتها ويكون نمو بكتريا الرايزوبيا حساساً ويحتاج وسطاً غنياً وميلها الشديد إلى التجمع (aggregates) إلى أسفل الوسط وهذا ما أشار إليه [12]. إن هذه النتائج تؤكد ان البكتريا السابقة وحسب نظام التصنيف ألأحدث Bergey`s Manual سريعة النمو (*Rhizobium*) إي إن زمن الجيل من 2-4 ساعات في الوسط السائل وتظهر مستعمرات في الوسط الصلب في 3-5 أيام وتستعمل مدى واسع من الكربوهيدرات بينما تنتج مواداً أيضية حامضية وهي ليست بطيئة النمو ((*Bradyrhizobium*) زمن الجيل 6-8 ساعات مع نمو مستعمري مرئي بعد 5-8 أيام تستعمل سكريات ألPentose بوصفها مصدر للكاربون وتنتج مواداً أيضية قاعدية) [8].



شكل (1) الكثافة الضوئية لمنحنى النمو البكتريا.



شكل (2) الكثافة العددية لمنحنى نمو البكتريا.

2- التجربة المختبرية:

2-1- تأثير مدة التحضين في الكثافة العددية لبكتريا الرايزوبيا في التربة.

يظهر من الجدول (2) أن أعداد الخلايا الحية قد ازدادت خلال مدة التحضين الأربع (3, 9, 15, 21) يوماً مقارنة بالأعداد التي سجلت في بداية التجربة وبدأت بالانخفاض قليلاً في المدة الأخيرة إذ بلغت الكثافة العددية لخلايا الرايزوبيا عند الزمن صفر من التجربة 1.5×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة وقد ازدادت الأعداد بعد مرور 3 أيام من التحضين لتصل إلى 15.7×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة ثم ارتفعت في مدة التحضين الثانية بعد مرور 9 أيام إلى 24.3×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة اذ بلغ أعلى معدل لأعداد البكتريا وانخفضت قليلاً بعد مرور 15 يوماً من مدة التحضين ولكن دون فرق معنوي عن المعاملة السابقة لتصبح 22.9×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, بينما انخفضت معنوياً خلال مدة التحضين الأخيرة إلى 14.6×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, اذ سجلت اقل متوسط لها إلا أنها بقيت أعلى مما كانت عليه في الزمن صفر. أن سبب انخفاض العدد بعد مرور 9 أيام من التحضين قد يعود إلى موت بعض الخلايا لتناقص العناصر الغذائية في التربة, فضلاً عن انه بعد مرور 9-21 يوماً من التحضين ربما حصلت تغيرات غير ملائمة في

بيئة نمو البكتريا مما ظهر في خفض أعداد البكتريا خلال مدة التحضين الأخيرة. وهذا يتماشى مع النتائج التي حصلت عليها [13].

جدول (2) تأثير عامل الزمن (أوقات التحضين) والمولبدنم والبوتاسيوم في نمو بكتريا الرايزوبيا وأعدادها (الأعداد ×10^8غم تربة جافة)

Mo ملغم. كغم$^{-1}$	تحضين (يوم)	مستويات K ملغم. كغم$^{-1}$ 0	25	50	100	Mo×T	معدل Mo
0	3	4.3	9.8	16.9	13.3	11.1	
	9	11.4	16.0	25.8	19.6	18.2	
	15	9.1	14.4	29.1	16.8	17.4	
	21	6.8	10.6	21.8	12.2	12.9	
Mo×K (0)		7.9	12.7	23.4	15.5		14.9b
0.25	3	7.4	12.9	18.3	15.9	13.5	
	9	13.2	20.0	29.4	23.4	21.5	
	15	10.4	17.4	38.0	18.9	21.2	
	21	8.3	12.3	15.9	13.6	12.5	
Mo×K (0.25)		9.8	15.7	25.4	18.0		17.2b
2.5	3	10.8	21.1	33.6	23.6	21.7	
	9	22.3	34.0	40.3	36.1	33.2	
	15	18.8	23.2	49.2	29.0	30.1	
	21	12.1	15.6	27.9	18.4	18.5	
Mo×K (2.5)		16.0	23.5	37.8	26.8		26.0a
معدل K		11.2c	17.3b	28.9a	20.1b	معدل T	
K×T	3	7.5	14.6	22.9	17.6	15.7b	
	9	15.6	23.3	31.8	26.4	24.3a	
	15	12.8	18.3	38.8	21.6	22.9a	
	21	9.1	12.8	21.9	14.7	14.6b	
0=T							1.5

Mo=2.498	K=2.885	T=2.885	LSD 0.01
Mo×K=8.597	Mo×T=11.481	K×T=10.735	Mo×K×T= 18.423

2-2- تأثير البوتاسيوم ومدة التحضين في الكثافة العددية الرايزوبيا في التربة.

أوضحت نتائج الجدول (2) ارتفاع عدد خلايا الرايزوبيا مع زيادة مدة التحضين حتى 9 أيام من التحضين وعند جميع مستويات K ثم انخفضت بعد تلك المدة على نحو عام. وكان لإضافة K تأثيراً ايجابياً معنوياً في الكثافة العددية للرايزوبيا, فقد أدت إضافة 50 ملغم K . كغم$^{-1}$ إلى حصول أعلى زيادة معنوية في عدد خلايا البكتريا مقارنةً بباقي المستويات بلغت 28.9×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, تلتها معاملة البوتاسيوم 100 ملغم K . كغم$^{-1}$ التي سجلت 20.1×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة ومن دون فارق معنوي عن معاملة البوتاسيوم 25 ملغم K . كغم$^{-1}$ التي أعطت 17.3×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة وسجل اقل متوسط أعداد بصورة معنوية عند مستوى البوتاسيوم 0 ملغم K . كغم$^{-1}$ بلغ 11.2 ×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة إلا أنها كانت أعلى من الأعداد في بداية التجربة (الزمن صفر).

أن بكتريا الرايزوبيا حساسة لنقص K وتكون استجابتها واضحة لإضافة هذا العنصر والسبب قد يعزى إلى دور K في تنشيط إنزيمات الروابط الببتيدية في أثناء تمثيل جزيئة البروتين [2 ، 14] , وبين [15] أن الترب تختلف في قابليتها لامتزاز البكتريا إذ أن الترب المشبعة بالاكتيونات الثلاثية الشحنة لها امتزاز عالي وقلة في الفعالية البكتيرية بينما الترب المشبعة بالاكتيونات الأحادية الشحنة مثل البوتاسيوم يكون لها امتزاز قليل, ذلك أن فعل الامتزاز يؤدي إلى موت بعض الخلايا. كما أن زيادة تركيز K^+ في التربة يوازن سمية ايون Na^+ وCl^- ويخفف تأثير الملوحة في التربة إذ أن مستويات K في خلايا الرايزوبيا *R. meliloti* و*R. Fredii* و*R. leucaena* وغيرها تزداد إلى أكثر من 6 مرات في بضع دقائق باستعمال آلية التكيف التنافذي وهكذا فان الرايزوبيا سريعة النمو *Rhizobium* أكثر تحملاً للملوحة من البطيئة النمو *Bradyrhizobium* [16]. وهذا يتفق مع [17] على أن كفاءة امتصاص K كانت أعظم في الرايزوبيا سريعة النمو من البطيئة النمو وذلك باستعمال تقنية النظائر المعلمة. وان كلاً من البكتريا *R. trifolii* و*R. meliloti* أظهرتا نمواً مقيداً عند حذف K من الوسط الغذائي الخاص بالرايزوبيا [2] . وان سبب انخفاض متوسط النمو عند المعاملة 100 ملغم K.كغم$^{-1}$ مقارنةً بالمعاملة 50 ملغم K.كغم$^{-1}$ ربما يكون بسبب تأثير زيادة تركيز K على امتصاص العناصر الغذائية الأخرى [18 ، 19].

كان تأثير التداخل بين K ومدة التحضين ايجابياً جداً إذ بلغت أعداد البكتريا ذروتها عند مستوى البوتاسيوم 50 ملغم K . كغم$^{-1}$ وذلك بعد 15 يوماً من التحضين اذ سجلت 38.8×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, على عكس مستويات K الأخرى التي بلغت ذروتها بعد 9 أيام من التحضين, وكان اقل عدد للبكتريا في مدة التحضين نفسها عند معاملة المقارنة إذ كانت أعدادها 12.8×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, مما قد يدل على أن هذا التداخل قد وفر بيئة أفضل وتوازناً غذائياً لاستمرار نمو البكتريا مقارنةً بباقي المعاملات.

2-3- تأثير المولبدنم ومدة التحضين في الكثافة العددية لبكتريا الرايزوبيا في التربة.

أظهرت نتائج الجدول (2) استمرار أعداد خلايا البكتريا بالزيادة حتى مدة 9 أيام من التحضين وتحت جميع مستويات Mo المستخدمة ثم بدأت بالانخفاض بعد تلك المدة. إذ أدت إضافة مستوى المولبدنم 2.50 ملغم Mo.كغم$^{-1}$ إلى زيادة الأعداد معنوياً على مستوى احتمالية 0.01 فقد بلغ

متوسط الأعداد تحت هذه المعاملة 26.0×10^8 خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة, تلتها وبفارق معنوي معاملة المولبدنم 0.25 ملغم Mo . كغم$^{-1}$ التي سجلت 17.2×10^8 خلية غم$^{-1}$ تربة جافة, ثم متوسط الأعداد للمعاملة 0 ملغم Mo.كغم$^{-1}$ وبصورة غير معنوية إذ بلغ 14.9×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة.

حصل [20] على نتائج مشابهة. وذكر [7 ، 21 ، 22] أن Mo يؤدي دوراً مهماً في تنشيط عمل إنزيم النتروجينيز في البكتريا المعتمدة على تثبيت N_2 الجوي للحصول على النتروجين مثل الرايزوبيا. إذ يمتلك Mo دوراً رئيسياً في تثبيت N_2 بوساطة الرايزوبيا بوصفه مكوناً وجودياً (تأسيسياً) لإنزيم النتروجينز ذلك أن نقص المولبدنم يؤدي إلى تأخير أو منع تكون وفعالية إنزيم النتروجينز [6].

من جانب آخر أشارت النتائج إلى وجود علاقة ايجابية معنوية بين مستوى Mo ومدة التحضين إذ وصل متوسط الأعداد للبكتريا إلى 33.2×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة عند مستوى المولبدنم 2.50 ملغم Mo . كغم$^{-1}$ و9 أيام من التحضين, بينما سجل اقل عدد للبكتريا خلال مدة التحضين نفسها عند معاملة المقارنة التي بلغت 18.2×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, وقد اظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية للتداخل بين مستويات Mo ومدة التحضين عند مستوى احتمال0.01.

2-4- تاثير المولبدنم والبوتاسيوم في الكثافة العددية لبكتريا الرايزوبيا في التربة .

بينت النتائج في الجدول (2) ونتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية على مستوى 0.01 نتيجة إضافة كل من Mo وK معاً, فقد أدت إلى زيادة متوسط أعداد خلايا البكتريا الحية, اذ كانت معاملة التداخل 2.50 ملغم Mo.كغم$^{-1}$+50 ملغم K.كغم$^{-1}$ أفضل المعاملات وبفارق معنوي عن باقي المعاملات إذ بلغت الكثافة العددية تحت هذه المعاملة 37.8×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, تلتها بفارق معنوي معاملة التداخل2.50 ملغمMo.كغم$^{-1}$ + 100 ملغم K.كغم$^{-1}$ التي بلغ معدل الأعداد تحتها 26.8×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, بينما كان المتوسط تحت معاملة المقارنة 7.9×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, أن أسباب زيادة الأعداد عند التداخل بين K وMo يعود إلى تأثير هذين العنصرين المهمين في الكثير من الفعاليات الحيوية لهذه الأحياء, إذ أن التداخل قد زاد على ما يبدو هذا التأثير ومن ثم اثر إيجاباً في قراءة كثافة نمو البكتريا العددية.

2-5- تأثير المولبدنم والبوتاسيوم ومدة التحضين في الكثافة العددية لبكتريا الرايزوبيا في التربة.

يتضح من الجدول (2) تأثير التداخل بين Mo وK ومدة التحضين إذ وصلت أعداد البكتريا العقدية إلى ذروتها عند معاملة التداخل 2.50 ملغم Mo.كغم$^{-1}$+ 50 ملغم K.كغم$^{-1}$ بعد 15 يوماً من التحضين, اذ بلغت 49.2×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة في مدة التحضين نفسها التي سجلت 18.8×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, تلتها معاملة التداخل 0.25 ملغم Mo.كغم$^{-1}$+ 50 ملغم K.كغم$^{-1}$ بعد 15 يوماً, إذ سجلت 38.0×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة في المدة نفسها التي بلغت 10.4×10^8 خلية. غم$^{-1}$ تربة جافة, بينما سجلت معاملة المقارنة في الزمن صفر 1.5×10^8 خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة, وهي اقل من معاملة التداخل صفر ملغم Mo.كغم$^{-1}$+ صفر ملغم K.كغم$^{-1}$ في مدة التحضين 3 أيام التي سجلت 4.3×10^8 خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة, التي كانت اقل معاملات التداخل.

المصادر:

1. **Elmerich, C.; A. Kondorosi and W. E. Newton. 1998**. Biological nitrogen fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers. Paris.
2. **O'Hara, G. W. 2001.** Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation : a review. Aust. J. of Exp. Agri., 41, 417-433.
3. **Franco, A. A. 1998**. Importance of biological N_2 fixation in sustainable agriculture. EMBRADA-Agrobiologia, Km 47, Seropcdica Rj, 23851-970 Brazil. Cited from Elmerich et al, 1998, p. 615.
4. **Shukla, R.S., Chandel, P.S. 2009.** A Textbook of Plant Ecology. Dep. Of Botany and Microbiology, Gurukui Kangri University, New Delhi, India, S. Chanda & Copany LTD. P. 517-526
5. **Sangkkara, U. R.; U. A. Hartwig and J. Nösberger. 1996**. Soil moisture and potassium affect the performance of symbiotic nitrogen fixation in faba bean and common bean. Plant & Soil, 148,123-130.

318.

15. **Santoro, T. and G. Stotzky, 1967.** Sorption between microorganisms and clay minerals as determined by the electrical sensing zone particle analyzer. Can. J. Microbiol., 14, 299-307.
16. **Zahran, H. H. 1999**. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. American Society for Microbiology. p. 968–989 Vol. 63, No. 4
17. **Tan, I. K. P. and W. J. Broughton., 1982.** Rhizobia in tropical legumes-XIV. Ion uptake differences between fast- and slow-growing strains. Soil Bio. Biochem., 14, 295-299.
18. **Johnston, A. E. 2006,** Understanding Potassium and its Use. European Fertilizer Manufacturers Association. Avenue E. Van Nieuwenhuyse 4, B-1160 Brussels. Belgium. - Email
19. **Aarons S. R., Graham P. H. 2006**. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. Rhizobium Research Laboratory, Department of Soil Science, University of Minnesota, USA .
20. **Bzheumkhov, V. S.; Kashukoev M. V.; Tokbaev, M. M 1999.** Nitrogen-fixing activity of Lucerne in relation to soil moisture, activity of *Rhizobium* strain and supply of mineral nutrition elements**.** *Izvestiya Timiryazevskoĭ Sel'skokhozyaĭstvennoĭ Akademii* 1999. No. 4, 176-179 Department of Plant Growing, K. A. Timiryazeva Agricultural Academy, Moscow, Russia.
21. **Rahman M. M., Bhutyan M. M. H., Sutradhar G. N. C., Rahman M. M. and Paul A. K. 2008.** Effect of Phosphorus, Molybdenum and Rhizobium Inoculation on Yield and Yield
6. **Jongruaysup S., O'Hara, G. W., Dell B 1993**. Effects of low Mo on nodule initiation, development and N_2 fixation. Plant & Soil 155/156, 345-348.
7. **Shah, V. K. ugalde, R.A., Imperial, J. and Brill, W. J. 1984.** Molybdenum in nitrogenase. Annual Review of Biochemistry 53, 231-257.
8. **Beck, D.P; L. A. Materon and F.A . Fadi. 1993**. Practical *Rhizobium* Legume technology manual . Technical No .19 . ICARDA, Syria.
9. **Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. 2009.** A Textbook of Microbiology. Dep. Of Botany and Microbiology, Gurukui Kangri University, New Delhi, India, S. Chanda & Copany LTD**.** P. 754-853.
10. **Novak, K., P. Chovanec, V. Skrdleta, M. Kropacova, L. Lisa and M. Nemcova. 2002.** Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). J. of Experimental Botany, V. 53, No. 375., P. 1735-1745.
11. **Wuensch's K. 2005.** Static Analysis Solution Programs (S.A.S.).Department of Psychology East Carolina University, USA..
12. **Thorae, S. H. and H. D. Williams. 1999**. Cell density-Dependent starvation survival of *Rhizobium* by *Phaseoli* Identfction. .Applied and Environmental Microbiology, 71(5):218-227.
13. **Marwa, S. Adbel . Hamid ; Sh .M. Selim ; A.A. Ragab and E.A. Saleh. 2002**. Inculation time as aprime factor affectcg successful No Nodulation of Common bean (*phaseolus vulgaris* L.) Arab Vniv .J. Agric . sci ., Ain Shams Uniu., Cairo, 10 (2) :521 – 241.
14. **Rastogi, V.B., 2008**. Fundamentals of Molecular Biology. Ane Books INDIA, New Delhi, India. p.303-

Molybdenum on the Growth Development and yield of peanut. Plant Nutrition and Fertilizer Science.8:2, 233.

Attributes OF Mungbean. Int. J. Sustain. Crop Prod. 3(6):26-33

22. **Qiong D. Y., Rong L. X., Hua H. J., Zhiyao H. and Hong Z. X., 2002.** Effect of Boron and

Effect of Time Factor, Molybdenum and Potassium on *Rhizobium* Growth in the Soil

Ali Sabeeh Abdulameer*

*****College of Science for Women, University of Baghdad

Abstract

An experiment was carried out to study the effects of Time Factor**,** potassium and Molybdenum on *Rhizobium* growth. The objective of the experiment, which conducted under laboratory conditions, was to investigate the interaction effects of using three levels of Molybdenum (0, 0.25, 2.50 mg Mo . Kg^{-1} sterile soil) and four levels of potassium (0, 25, 50, 100 mg K . Kg^{-1} sterile soil) on the viable counts of *Rhizobium* growth in the sterile soil after 3, 9, 15 and 21 days of incubation at 28°C. The results indicated that Molybdenum level 2.50 mg Mo . Kg^{-1} sterile soil and potassium level 50 mg K . Kg^{-1} sterile soil recorded the biggest significant increase in the viable counts of *Rhizobium* growth in the sterile soil especially after 15 days of incubation at 28°C which got 49.2×10^8 cell.gm^{-1} dry soil.