

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، إذ استهدفت دراسة تأثير مستويات المولبدنم صفر، 0.25، 2.50 ملغم Mo⁻¹ . كغم⁻¹ تربة معقمة ومستويات البوتاسيوم صفر، 25، 50، 100 ملغم K⁻¹ . 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. إذ أوضحت ألتائج تفوق مستوى المولبدنم 2.50 ملغم Mo⁻¹ . كغم⁻¹ تربة معقمة والبوتاسيوم 50 ملغم K⁻¹ . كغم⁻¹ تربة معقمة بصورة معنوية على باقي المستويات خصوصاً عند مستوى مدة التحضين 15 يوماً إذ سجلت عند تداخلها أعلى متوسط كثافة عددية للبكتريا بصورة معنوية إذ بلغ 49.2×10⁸ خلية غم⁻¹ تربة جافة.

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

المقدمة:

الحياة لأدائه بعض الوظائف الإنزيمية خصوصاً تنشيط الإنزيمات المشتركة في تكوين الروابط البيئية في أثناء تمثيل جزيئة البروتين في الخلية. وأن المعلومات المنشورة في تأثيرات هذا العنصر في تثبيت N₂ 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 ويوجد في المحلول في حالة ايون سالب MoO₄⁻²، وهو عنصر أساسي لتثبيت N₂ 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 النتروجينيز 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 لتنبعها لاحقاً دراسة ذلك في بيئتها الطبيعية غير المعقمة.

أن التقنيات الجزيئية الحديثة أظهرت إن تثبيت N₂ حيوياً يؤدي دور المحافظ على الحياة في الأرض وأن الأنظمة البيئية الطبيعية الأكثر كفاءة 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 سمد النتروجين الكيميائي هو الأكثر كلفة واستهلاكاً للطاقة وتلوياً للبيئة [3 ، 4].

إن تأثير عنصر البوتاسيوم (K⁺) في تثبيت N₂ حيوياً يمكن أن يكون حرجاً وذلك لأن K⁺ عنصر أساسي وضروري لكل الكائنات الحية وبعد منتظماً 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

*كلية العلوم للنبات \جامعة بغداد

عليها من مركز إباء للأبحاث سابقاً وقد أجريت 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 Torrifluent، وان معادن الأطيان فيها بحسب السيادة هي I، P، CL، Mt من منطقة الجادرية - مجمع جامعة بغداد، اذ جفت نماذج التربة هوائياً 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	
7.45	درجة تفاعل التربة (pH)
2.9	درجة التوصيل الكهربائي (EC) ديسي سيمنز.م ⁻¹
16.6	المادة العضوية
233.0	كاربونات الكالسيوم (الكلس)
37.6	النتروجين الجاهز
5.20	الفسفور الجاهز
0.67	الموليدنم الجاهز
24.3	السعة التبادلية للأيونات الموجبة (CEC)
0.07	البوتاسيوم الذائب K ⁺
B- الصفات الفيزيائية	
25.5%	نسبة الرطوبة عند 33 كيلو باسكال
31 %	الطين
53 %	الغرين
16 %	الرمال
النسجة : مزيج طينية غرينية Silt Clay loam	
C- التقديرات المايكروبيولوجية	
10 × 5.6 ⁶	البيكتريا الكلية
10 × 12.3 ⁴	الفطريات الكلية

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 الزراعي 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.

المواد وطرائق العمل:

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

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

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

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

4-1- اليدان وسطح المناضد وصندوق التعقيم:

Laminar flow Bench (Hood) وذلك عن طريق تجفيف الخلايا الميكروبية Dehydration agent وتخثير البروتين الخلوي لها، الأمر الذي يقللها باستعمال الكحول الايثيلي 70 % قبل بدء العمل المخبري.

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

6-1- إبرة التلقيح (الانشوطة) Loop: عقت 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): أذيت 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- السُّلَّالة : أُستعملت السلالة البكتيرية تتبع *Rhizobium leguminosarum* ، تم الحصول

تربة، ثم يرج الخليط لمدة 10 دقائق للحصول على محلول متجانس تركيزه 10^{-1} تتفكك فيه التربة وتطلق الخلايا البكتيرية إلى المحلول، وهكذا أجريت سلسلة التراكيز المخففة لمحلول التربة بواسطة أنابيب الاختبار المحضرة ومن ثم استخراج معدل عدد الخلايا في [مل محلول التربة، ثم يحول إلى 1 غم تربة جافة كما في] 8 .

9- التجربة المختبرية:

استهدفت هذه التجربة معرفة تأثير مستويات المولبدنم بهيئة $4 \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot (\text{NH}_4)_6$ (54) K_2SO_4 (41.5 %) (Mo %) والبوتاسيوم بهيئة K وعامل الزمن والتداخل بينها في نمو بكتريا الرايزوبيا في التربة المعقمة، إذ بلغت عدد الدوارق المستخدمة 144 دوارق وهذا العدد ناتج من تدخل ثلاثة مستويات من المولبدنم (0, 0.25, 2.50) ملغم Mo \ 0, 25, 50, 100) ملغم K \ 0, 3, 9, 15, 21) يوم وثلاثة مكررات لكل معاملة، إذ عقت الدوارق مع التربة والمواد المضافة بصورة سائلة بعد سدها بسدادات قطنية وغطيت رؤوس الدوارق بالورق المعدني وعقت باستعمال جهاز الموصد، ثم أضيف في ظروف التعقيم 1 مل من اللقاح البكتيري من مزرعة بكتيرية سائلة (Broth culture) بعمر ثلاثة أيام [10]، لكل دوارق ومن ثم ربطت التربة بنحو 1/3 بار وتم الحفاظ على رطوبة التربة الموجودة في الدوارق خلال مدة البحث بالطريقة الوزنية بتسجيل وزن الدوارق والتربة والرطوبة والمعاملة على كل دوارق 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 Design)، 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 المجهرى لبكتريا *Rhizobium*: أظهرت نتائج الفحص المجهرى للبكتريا بعد تنشيطها باستعمال طريقة التخفيف المتسلسلة

6- الحفظ النظامي: إن هذه العملية هي لأجل توفير مزارع سائدة 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 لمدة 24 ساعة وبحكم إغلاقها لمنع التلوث ثم تحفظ بدرجة حرارة 4°C في الثلاجة وتستمر هذه العملية دورياً.

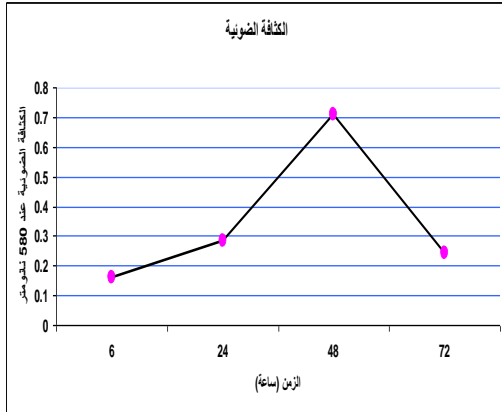
7- تحضير مزارع سائلة Broth culture: حُضِر اللقاح السائل في ظروف التعقيم بعد تنشيط السلالات البكتيرية، بأخذ جزء متساوي من المستعمرات النقية المثالية النامية في أطباق التنشيط باستعمال أنشطة التلقيح المعقمة وزرعها في بيئة وسط مستخلص الخميرة السائل (YMB) المعقم السائل المحضّر سابقاً في الدوارق المخروطية 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 :

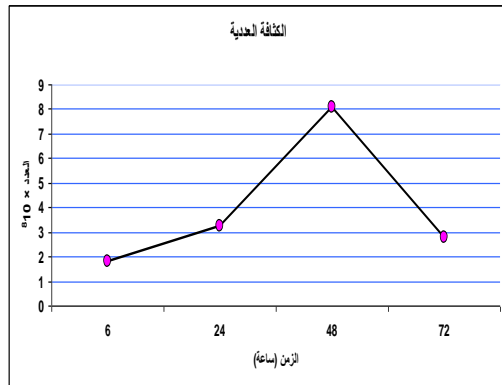
8-1- العد المباشر بطريقة التخفيف والعد بالأطباق: يجب أولاً تحضير أنابيب اختبار زجاجية كافية يوضع فيها 9 مل ماء مقطر تغلق فوهتها بالقطن الطبي وتعقم بالموصدة وتبرد لأجراء حساب الخلايا الحية البكتيرية في [مل من المزرعة السائلة، إذ حُضرت سلسلة من التخفيف المضاعفة للمزرعة البكتيرية التي يراد اخذ اللقاح السائل منها، وذلك لاستخراج معدل عدد الخلايا الحية في 1 مل 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، إذ يتم إيجاد علاقة بين أعداد البكتريا الحية في 1 مل 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 نانومتر 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 1 غم تربة جافة: تم بالعملية السابقة نفسها ولكن تحضير التركيز الأول ضمن سلسلة التخفيف المضاعفة يتم بإضافة 180 مل ماء مقطر معقم ومبرد إلى 20 غم



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 10×1.5 خلية.غم⁻¹ تربة جافة وقد ازدادت الأعداد بعد مرور 3 أيام من التحضين لتصل إلى 10×15.7 خلية.غم⁻¹ تربة جافة ثم ارتفعت في مدة التحضين الثانية بعد مرور 9 أيام إلى 10×24.3 خلية.غم⁻¹ تربة جافة إذ بلغ أعلى معدل لأعداد البكتريا وانخفضت قليلاً بعد مرور 15 يوماً من مدة التحضين ولكن دون فرق معنوي عن المعاملة السابقة لتصبح 10×22.9 خلية.غم⁻¹ تربة جافة، بينما انخفضت معنوياً خلال مدة التحضين الأخيرة إلى 10×14.6 خلية.غم⁻¹ تربة جافة، إذ سجلت أقل 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

Serial dilution وطريقة التخطيط على الأطباق Streaking للحصول على مستعمرات نقية، أنها سائلة لصبغة كرام وتترتب بشكل أزواج عصوية ثنائية وقسم منها عصوية مفردة الشكل، مفردة 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 الأزرق YEMA المضاف له صبغة احمر الكونغو، إذ لم تمتص مستعمرات البكتريا هذه الصبغة، مع العلم إن هذه الصبغة تذوب بالماء وفي الكحول الايثيلي، 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 الأزرق 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 و 2)، أن الطور اللوغارتمي يبدأ عندما تكون سرعة النمو ثابتة وخلالها 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 الأحدث 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 مستعمرات مرئي بعد 5-8 أيام تستعمل سكريات الـ Pentose بوصفها مصدر للكربون وتنتج مواداً أيضية قاعدية [8].

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 بالاكثيونات الثلاثية الشحنة لها امتزاز عالي وقلة في الفعالية البكتيرية بينما الترب المشبعة بالاكثيونات 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 أيون Na^+ و Cl^- ويخفف تأثير الملوحة في التربة إذ أن مستويات K في خلايا الرايزوبيا *R. meliloti* و *R. Fredii* وغيرها تزداد إلى أكثر من 6 مرات في بضع دقائق باستعمال آلية التكيف التنازلي وهكذا فإن 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. وإن كلاً من البكتريا *R. meliloti* و *R. trifolii* أظهرتا نمواً مقيداً عند حذف K من الوسط الغذائي الخاص بالرايزوبيا [2]. وإن 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 إذ سجلت $10^8 \times 38.8$ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، على عكس مستويات K الأخرى التي بلغت ذروتها بعد 9 أيام من التحضين، وكان أقل عدد للبكتريا في مدة التحضين نفسها عند معاملة المقارنة إذ كانت أعدادها $10^8 \times 12.8$ 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

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 10^8 غم تربة جافة)

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

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 $10^8 \times 28.9$ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، تلتها معاملة البوتاسيوم 100 ملغم K . كغم⁻¹ التي سجلت $10^8 \times 20.1$ خلية.غم⁻¹ تربة جافة ومن دون فارق معنوي عن معاملة البوتاسيوم 25 ملغم K . كغم⁻¹ التي أعطت $10^8 \times 17.3$ خلية.غم⁻¹ تربة جافة وسجل أقل متوسط أعداد بصورة معنوية عند مستوى البوتاسيوم 0 ملغم K . كغم⁻¹ بلغ 11.2

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

يتضح من الجدول (2) تأثير التداخل بين Mo و K 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، إذ بلغت 10×49.2⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة في مدة التحضين نفسها التي سجلت 10×18.8⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، تلتها معاملة التداخل 0.25 ملغم Mo. كغم⁻¹ + 50 ملغم K. كغم⁻¹ بعد 15 يوماً، إذ سجلت 10×38.0⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة في المدة نفسها التي بلغت 10×10.4⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، بينما سجلت معاملة المقارنة في الزمن صفر 10×1.5⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، وهي أقل من معاملة التداخل صفر ملغم Mo. كغم⁻¹ + صفر ملغم K. كغم⁻¹ في مدة التحضين 3 أيام التي سجلت 10×4.3⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، التي كانت أقل 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 N₂ fixation in sustainable agriculture. EMBRADA-Agrobiologia, Km 47, Seropedica 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, Gurukul 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.

متوسط الأعداد تحت هذه المعاملة 10×26.0⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، تلتها وبفارق معنوي معاملة المولبدنم 0.25 ملغم Mo. كغم⁻¹ التي سجلت 10×17.2⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، ثم متوسط الأعداد للمعاملة 0 ملغم Mo. كغم⁻¹ وبصورة غير معنوية إذ بلغ 10×14.9⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة.

حصل [20] على نتائج مشابهة. وذكر [7] ، 21 ، [22] أن Mo يؤدي دوراً مهماً في تنشيط عمل إنزيم النتروجيناز في البكتريا المعتمدة على تثبيت N₂ الجوي للحصول على النتروجين مثل الرايزوبيا. إذ يمتلك Mo دوراً رئيسياً في تثبيت N₂ بوساطة الرايزوبيا بوصفه مكوناً وجوياً (تأسيسياً) لإنزيم النتروجيناز ذلك أن نقص المولبدنم يؤدي إلى تأخير أو منع تكون وفعالية إنزيم النتروجيناز [6].

من جانب آخر أشارت النتائج إلى وجود علاقة ايجابية معنوية بين مستوى Mo ومدة التحضين إذ وصل متوسط الأعداد للبكتريا إلى 10×33.2⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة عند مستوى المولبدنم 2.50 ملغم Mo. كغم⁻¹ و9 أيام من التحضين، بينما سجل أقل عدد للبكتريا خلال مدة التحضين نفسها عند معاملة المقارنة التي بلغت 10×18.2⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، وقد اظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية للتداخل بين مستويات Mo ومدة التحضين عند مستوى احتمال 0.01.

2-4- تأثير المولبدنم واليوتاسيوم 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 و K معاً، فقد أدت إلى زيادة متوسط أعداد خلايا البكتريا الحية، إذ 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 10×37.8⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، تلتها بفارق معنوي معاملة التداخل 2.50 ملغم Mo. كغم⁻¹ + 100 ملغم K. كغم⁻¹ التي بلغ معدل الأعداد تحتها 10×26.8⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، بينما كان المتوسط تحت معاملة المقارنة 10×7.9⁸ خلية.غم⁻¹ تربة جافة، أن أسباب زيادة الأعداد عند التداخل بين K و Mo 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.

- 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 Nieuwenhuysse 4, B-1160 Brussels. Belgium. - Email
 19. **Aarons S. R., Graham P. H. 2006.** Response of *Rhizobium leguminosarum* by *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 Timiryazevsko ĭ Sel'skokhozya ĭstvenno ĭ 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 N₂ 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.** Inoculation 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.