Journal of Environmental Studies [JES] 2012. 8: 17-23

Original Paper

تأثير عامل الزمن والبوتاسيوم والكوبلت في نمو البكتريا الجذرية في تربة مزيجة طينية غرينية

علي صبيح عبد الأمير[١]، منذر محمد علي المختار[٢]، حسن علي عبد الرضا[٣]، زينب طالب الشريفي[٤]

[١] قسم علوم الحياة، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد، بغداد، عراق.
[٢] قسم علوم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، عراق.
[٣] قسم الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، بغداد، عراق.
[٤] قسم هندسة البيئة، كلية الهندسة، الجامعة المستنصرية، بغداد، عراق.

إستلام: ١٦ سبتمبر ٢٠١١، قبول: ٧ أكتوبر ٢٠١١

الملخص:
نفذت تجربة مختبرية لدراسة تأثير الزمن والكوبلت والبوتاسيوم والتداخل بينها في نمو بكتريا الرايزوبيا, حيث استهدفت دراسة تأثير مستويات الكوبلت صفر, 0.375, 0.75 ملغم Co. كغم$^{-1}$ ومستويات البوتاسيوم صفر, 25, 50, 100 ملغم K. كغم$^{-1}$ في الكثافة العددية لبكتريا *Rhizobium leguminosarum* في تربة مزيجة طينية غرينية مع إضافة عامل أوقات التحضين (الزمن) كعامل ثالث لنمو البكتريا بعد (3, 6, 12, 18) يوم من التحضين بدرجة 28°C. حيث أوضحت ألنتائج تفوق مستوى الكوبلت 0.375 ملغم Co. كغم$^{-1}$ والبوتاسيوم 50 ملغم K. كغم$^{-1}$ بصورة معنوية على باقي المستويات خصوصاً عند مستوى زمن التحضين 12 يوم حيث سجلت عند تداخلها أعلى متوسط كثافة عددية للبكتريا بصورة معنوية إذ بلغ 24.00×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة.

كلمات مفتاحية: الزمن، البوتاسيوم، الكوبلت، بكتريا الرايزوبيوم

المقدمة:

أن الزمن عامل مهم جداً رغم انه من اقل العوامل المدروسة في الأبحاث العلمية (Abdulameer, 2010, 2011). كما أن تثبيت النتروجين حيويا يمكن أن يكون بديلا عملياً عن أسمدة النتروجين الغالية والملوثة للبيئة ، إذ إن سماد النتروجين الكيميائي هو الأكثر كلفة واستهلاكاً للطاقة وتلويثاً للبيئة (Franco, 1998)، كما إنه يتعرض إلى عمليات فقد تصل إلى نسبة ٥٠ % في الماء الأرضي والتحول إلى صورة غير جاهزة في التربة، لذا لجاء إلى استعمال أنظمة حيوية صديقة للبيئة مسئولة عن عملية تثبيت النتروجين الجوي حيوياً لتجهيز النتروجين (Abdulameer, 2011)، وان التقنيات الجزيئية الحديثة أظهرت إن تثبيت النتروجين حيوياً يلعب دور المحافظ على الحياة في الأرض وان الأنظمة البيئية الأكثر كفاءةً هي البكتريا من جنس الرايزوبيوم (Elmerich *et al.*, 1998). فقد أكد (O'Hara, 2001) إن تكامل النظرات الجزيئية بدراسات أساسها المختبر والحقل والفسلجة والكيمياء الحيوية مطلوبة لتحسين فهم الأهمية البيئية والاقتصادية لاستجابة الرايزوبيا للعناصر المغذية.

إن تأثير عنصر البوتاسيوم (K^{+}) على تثبيت N_2 حيوياً يمكن أن يكونا حرجاً. ذالك أن K^{+} عنصر أساسي وضروري لكل الكائنات الحية ويعد منظماً مهماً وضرورياً لأيض الإنسان والحيوان والنبات وبدونه لا يكون في العالم حياة للإنسان والحيوان أو للنبات فهو مهم لعمليات الحياة (Sangkkara *et al.*, 1996). وهو ضروري لنمو البكتريا ولبكتريا الرايزوبيوم الحرة المعيشة أيضاً. وذلك بسبب وظائفه الضرورية في الرايزوبيا، إذ أن الرايزوبيا تحتوي على 1% K^{+} على الأقل من وزنها الجاف وهو من العناصر الكبرى الموجودة كايون موجب في خلية الرايزوبيا وله ادوار متنوعة في الايض وكعامل مساعد للإنزيمات وكمؤشر كيميائي (O'Hara, 2001). وأشار الأخير إلى أن K^{+} هو الايون الخلوي المعدني الموجب اللاعضوي الرئيسي المطلوب من قبل كل الكائنات الحية لأدائه بعض الوظائف الإنزيمية خصوصاً تنشيط الإنزيمات المشتركة في تكوين الروابط الببتيدية أثناء تمثيل جزيئة البروتين في الخلية. وأن المعلومات المنشورة في تأثيرات هذا العنصر في تثبيت N2 بواسطة الرايزوبيا تبقى قليلة (Sangkkara *et al.*, 1996).

أما الكوبلت فيعد من العناصر الأساسية لعملية تثبيت النيتروجين الجوي. إذ إنه يشجع هذه العملية بواسطة البقوليات وينشط نمو بكتريا الرايزوبيا في التربة الملاصقة للمجموع الجذري. وإن الدور الضروري للكوبلت هو وظيفته كعنصر مفتاح في فيتامين B_{12} وتوجد عدة أدلة على تأثيرات مفيدة لكميات صغيرة من هذا المعدن في نمو وتطور العديد من النباتات والحيوانات والأحياء المجهرية الدقيقة فان له موقع فريد بين المعادن الثقيلة الأقل ندرة والموجودة في الأنظمة الحيوية (Young, 1979).

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

المواد وطرائق العمل:

التعقيم:

لأجل منع حدوث أي تلوث بقتل جميع الميكروبات غير المرغوب فيها.

١- الزجاجيات: الأدوات والأواني الزجاجية كالأطباق والماصات و الدوارق المخروطية وأنابيب الاختبار وغيرها تم تعقيمها بواسطة الفرن (الحرارة الجافة) بدرجة 180°C لمدة ساعتين.

* Corresponding author:
Dr. Ali Sabeeh Abdulameer
✉ alisabeehh@live.com

٢- الأوساط الغذائية السائلة والصلبة والماء المقطر والقطن الطبي والتربة: تم تعقيمها بواسطة جهاز الموصدة تحت ضغط 15 باوند\ الانج المربع ودرجة حرارة $121C^{\circ}$ ولمدة 20 دقيقة للكميات السائلة التي يقل حجمها عن لتر واحد ولمدة تصل إلى ساعة للكميات السائلة من٥-١ لتر، أما التربة والمواد المضافة لها في الدوارق المخروطية سعة 300 مل فكان تعقيمها لمدة ساعة \ يوم لمدة ثلاثة أيام متتالية.

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

٤- اليدين 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.

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

6- إبرة التلقيح (الانشوطة) Loop: عقمت بواسطة 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.

الأوسط والمحاليل الغذائية الصناعية المستعملة لتنمية البكتريا:

A- وسط مستخلص الخميرة- مانيتول السائل (YMB) Yeast Mannitol Broth: أذيبت هـــذه المكونات فـــي 900 مـــل ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.0 ثم أكمل الحجم إلى لتر وعقم بالموصدة (Beck *et al.,* 1993 و Dubey & Maheshwari, 2009).

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

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

السُلالة:

أستعملت سلالتين (889) و(1865) للبكتريا العقدية تتبع *Rhizobium leguminosarum* , تم الحصول عليهما من مركز إباء للأبحاث الزراعية وقد أجريت عليهما عمليات التنشيط والفحص للتأكد من خواصهما الحيوية.

التربة:

أخذت عينة من الأفق A (0 - 30) سم لتربة رسوبية عائدة إلى تحت المجموعة Typic Torrifluvent, وان معادن الأطيان فيها حسب السيادة هي I, P, CL, Mt من منطقة الجادريـــة - مجمع جامعة بغداد, حيث جففت نماذج التربة هوائيـا وطحنت ثـم نخلـت بمنخل قطـر فتحاته 2 ملم ثم مزجت للحصول على التجانس وأجري لها بعض التحليلات الكيميائية والفيزيائية والإحيائية، جدول (١).

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
الكوبلت الجاهز		0.20
السعة التبادلية للأيونات الموجة (CEC)	سنتي مول+. كغم$^{-1}$	24.3
البوتاسيوم الذائبK^{+}		0.07
B- الصفات الفيزيائية :		
نسبة الرطوبة عند 33 كيلو باسكال	25.5%	
التوزيع ألحجمي 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}

جدول (١): نتائج التحليلات الكيميائية والفيزيائية والإحيائية للتربة المستعملة

الفحوصات المخبرية والعملية :

١- الفحص بالمجهر الضوئي: وصف شكل الخلايا بعد أن صبغت بصبغة كرام وفحصت مجهرياً، إذ استعملت صبغة غرام المحضرة وفقاً لما ذكره Atlas & Cerniglia, 1995).

٢- 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.

٣- 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) Beck *et al.,* 1993) و Dubey & Maheshwari, 2009). فالبكتريا Rhizobium تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأصفر، أما البكتريا *Bradyrhizobium* فتحوله إلى الأزرق.

الحفظ النظامي:

إن هذه العملية هي لأجل توفير مزارع ساندة بانتظام لمدة 2-3 شهر لاستعمالها أثناء فترة إجراء التجارب، وذلــك بتلقيــح قناني زجاجية خاصة لها فوهة وغطاء لولبي حاويـــة على وسـط (YEMA) المائل بالبكتريـا من مستعمرات مثالية بطريقة التـخطيط وحضـنها بدرجـة حـــرارة 28°C مـــدة 24 ساعـة ويحكم إغلاقها لمنع التلوث ثم تحفظ بدرجة حرارة 4°C في الثلاجة وتستمر هذه العملية دورياً.

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 (Novak *et al.,* 2002)، بعدها تحفظ في البراد عند درجة حرارة 4°C.

العد الميكروبي:

١- 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, حيث 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 (Beck *et al.,* 1993 و Dubey & Maheshwari, 2009).

٢- العد غير المباشر بطريقة قياس الامتصاصية لمعلقات المزرعة البكتيرية النقية: الغاية من هذه العملية هو لتقدير عدد الخلايا البكتيرية في المزرعة السائلة, حيث 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.

٣- حساب خلايا البكتريا الحية في 1غم تربة جافة: تم بنفس العملية السابقة 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 بواسطة أنابيب الاختبار المحضرة ومن ثم استخراج معدل عدد الخلايا في 1مل محلول التربة، ثم يحول إلى 1 غم تربة جافة كما في (Thorae & Williams, 1999).

التجربة المختبرية:

استهدفت هذه التجربة معرفة تأثير مستويات البوتاسيوم بهيئة كبريتات البوتاسيوم والكوبلت بهيئة كبريتات الكوبلت وعامل الزمن والتداخل بينها في نمو بكتريا الرايزوبيا في التربة المعقمة, حيث بلغت عدد الدوارق المستخدمة 144 دورق وهذا العدد ناتج من تدخل ثلاث مستويات من الكوبلت (0.75, 0.375, 0) ملغم Co\ كغم وأربع مستويات من البوتاسيوم (100, 50, 25, 0) ملغم K\ كغم وأربع أوقات تحضين (18,12,6,3) يوم وثلاثة مكررات لكل معاملة, حيث 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 (Novak *et al.,* 2002)، لكل دورق ومن ثم رطبت التربة بحدود 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 بفترات التحضين المذكورة في أعلاه بطريقة التخفيف والعد في أطباق.

التصاميم الإحصائية:

أتبع في التجربة التصميم تام التعشية CRD (Complete Randomization Design)، وتم تحليل التجارب إحصائياً على وفق طريقة تحليل التباين ANOVA وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي LSD (Least Significant Difference) عند المستوى المعنوي 0.01 باستعمال البرنامج SAS (2005).

النتائج والمناقشة:

الفحوصات المختبرية:

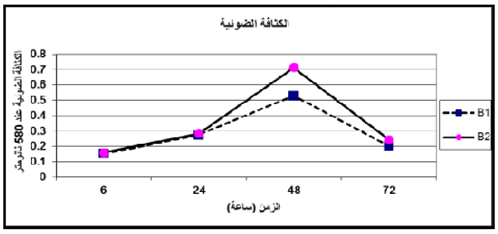
١- الوصف المجهري: أظهرت نتائج الفحص المجهري للبكتريا بعد تنشيطها باستعمال طريقة التخافيف المتسلسلة Serial dilution وطريقة التخطيط على الأطباق Streaking للحصول على مستعمرات نقية, أنها سالبة لصبغة كرام وتترتب بشكل أزواج عصوية ثنائية وقسم منها عصوية مفردة الشكل, منفردة مكونة الشكل Y ومتحركة.

٢- فحص احمر كونغو Kongo red Agar: ظهرت خلايا البكتريا في أطباق التنمية التي حضنت بصورة مقلوبة عند درجة حرارة 28°C ولمدة ثلاث 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, وأن امتصاصها يتأثر بطبيعة الوسط وظروف عملية التحضير والزرع.

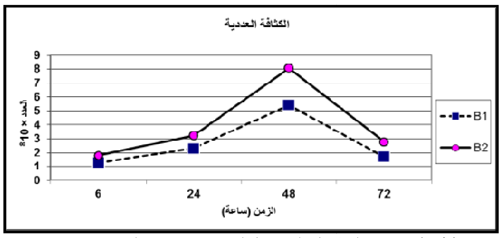
٣- فحص (Bromothymole blue (BTB: أظهر فحص (BTB) إن البكتريا تعود إلى الجنس *Rhizobium* إذ استطاعت تحويل لون الوسط ألزرعي من اللون الأخضر إلى الأصفر.

٤- منحنى النمو القياسي: حدد منحنى النمو القياسي وكان طور النمو اللوغارتمي يبدأ قبل الساعة السادسة ويمتد إلى حدود الساعة السادسة والثلاثون تقريباً ثم يعقبه طور الثبوت stationary phase من الساعة السادسة والثلاثون إلى حدود الساعة خمسون تقريباً ولكلا السلالتين (الشكل ١ و٢)، 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 (Thorae & Williams, 1999). إن هذه النتائج تؤكد كون البكتريا أعلاه 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 مواد أيضية حامضية وهي ليست بطيئة النمو ((*Bradyrhizobium*) زمن الجيل 6-8 ساعات مع نمو مستعمري مرئي بعد 5-8 أيام تستعمل سكريات أل Pentose كمصدر للكاربون وتنتج مواد أيضية قاعدية) (Beck *et al.*, 1993).



الشكل (١) الكثافة الضوئية لمنحنى النمو البكتريا.



الشكل (٢) الكثافة العددية لمنحنى نمو البكتريا.

التجربة المختبرية:

١- تأثير أوقات التحضين في الكثافة العددية لبكتريا الرايزوبيا في التربة:

يظهر من جدول (٢) أن أعداد الخلايا الحية قد ازدادت بصورة معنوية وعلى مستوى 0.01 خلال أوقات التحضين الأربع (3, 6, 12, 18) يوماً مقارنة بالأعداد التي سجلت في بداية التجربة الزمن صفراً وبدأت بالانخفاض قليلاً في المدة الأخيرة إذ بلغت الكثافة العددية لخلايا الرايزوبيا عند الزمن صفر 1.50 × 10^{8} خلية . غم$^{-1}$ تربة جافة وقد ازدادت الأعداد بعد مرور 3 أيام من التحضين لتصل إلى 11.41 × 10^{8} خلية. غم$^{-1}$ تربة جافة ثم ارتفعت في زمن التحضين الثاني بعد مرور 6 أيام إلى 17.11 × 10^{8} خلية. غم$^{-1}$ تربة جافة وازدادت أيضاً بعد مرور 12 يوماً من زمن التحضين وأصبحت 18.70 × 10^{8} خلية. غم$^{-1}$ تربة جافة إذ بلغ أعلى معدل لأعداد البكتريا , بينما انخفضت خلال زمن التحضين الأخير 18 يوماً إلى 16.79 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة, إلا أنها بقيت أعلى مما كانت عليه في الزمن صفر وقد يعود سبب انخفاض العدد بعد مرور 12 يوماً من التحضين إلى موت بعض الخلايا لتناقص العناصر الغذائية في التربة, فضلاً عن انه بعد مرور 12-18 يوماً من التحضين ربما حصلت تغيرات غير ملائمة في البيئة لنمو البكتريا مما ظهر في خفض أعداد البكتريا خلال زمن التحضين الأخير بعد 18 يوماً, وهذا يتماشى مع النتائج التي حصلت عليها (Abdulameer, 2010, 2011 و Marwa *et al.*, 2002).

Co ملغم. كغم$^{-1}$	تحضين (يوم)	مستويات K ملغم . كغم$^{-1}$ 0	25	50	100	Co×T	معدل Co
0	3	4.30	9.10	11.80	13.90	**9.78**	
	6	8.20	13.60	18.00	20.80	**15.15**	
	12	11.00	15.80	21.00	23.10	**17.73**	
	18	7.80	13.20	19.40	21.80	**15.55**	
K×Co (0)		**7.83**	**12.92**	**17.55**	**19.90**		**14.55c**
0.375	3	7.40	13.30	17.00	12.60	**12.58**	
	6	13.30	19.40	23.40	17.80	**18.47**	
	12	14.40	20.00	22.90	19.70	**19.25**	
	18	12.20	18.90	24.00	16.90	**18.00**	
K×Co (0.375)		**11.83**	**17.90**	**21.82**	**16.75**		**17.08a**
0.75	3	7.10	11.40	15.60	13.40	**11.88**	
	6	11.80	17.70	21.30	20.00	**17.70**	
	12	13.30	19.00	23.20	21.10	**19.15**	
	18	10.50	17.40	20.90	18.50	**16.83**	
K×Co (0.75)		**10.67**	**16.38**	**20.25**	**18.25**		**16.39b**
معدل K		**10.11d**	**15.73c**	**19.87a**	**18.30b**	**معدل T**	
K×T	3	6.26	11.27	14.80	13.30	**11.41c**	
	6	11.10	16.90	20.90	19.53	**17.11b**	
	12	12.90	18.26	22.36	21.30	**18.70a**	
	18	10.17	16.50	21.43	19.07	**16.79b**	
0=T							**1.5**

جدول (٢): تأثير عامل الزمن والكوبلت والبوتاسيوم في نمو بكتريا الرايزوبيا وأعدادها (الأعداد ×10^{8}غم تربة جافة)

LSD 0.01	T=0.52	Co=0.45	K=0.52
Co×K×T= 18.0	**K×T=3.45**	**Co×T=1.99**	**Co×K=2.50**

٢- تأثير البوتاسيوم وأوقات التحضين في الكثافة العددية الرايزوبيا في التربة:

أوضحت نتائج جدول (٢) ارتفاع عدد خلايا بكتريا العقد الجذرية مع زيادة زمن التحضين حتى 12 يوماً وعند جميع مستويات البوتاسيوم ثم انخفضت بعد ذلك الزمن. وكان لإضافة البوتاسيوم تأثير ايجابي في الكثافة العددية لبكتريا العقد الجذرية، فقد أدت إضافة 50 ملغم K . كغم$^{-1}$ إلى زيادة عدد خلايا بكتريا العقد الجذرية معنوياً إذ بلغ 19.87 ×10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة تلتها معاملة البوتاسيوم 100 ملغم K. كغم$^{-1}$ حيث بلغت أعدادها 18.30 × 10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة ثم معاملة البوتاسيوم 25 ملغم K. كغم$^{-1}$ إذ سجلت 15.73 × 10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة وبلغ متوسط الأعداد في معاملة المقارنة 10.11 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة إلا أنها كانت أعلى من الأعداد في بداية التجربة (الزمن صفر) التي بلغت 1.50 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة.

أن بكتريا الرايزوبيا حساسة لنقص K وتكون استجابتها واضحة لإضافة هذا العنصر والسبب قد يعزى إلى دور K في تنشيط إنزيمات الروابط الببتيدية أثناء تمثيل جزيئة البروتين (O'Hara, 2001) و(Rastogi *et al.*, 2008), وبين (Santoro & Stotzky, 1967) أن الترب تختلف في قابليتها لامتزاز البكتريا إذ أن الترب المشبعة بالاكتيونات الثلاثية الشحنة لها أمتزاز عالي وقلة في الفعالية البكتيرية بينما الترب المشبعة بالاكتيونات الأحادية الشحنة كالبوتاسيوم يكون لها أمتزاز قليل، ذلك أن فعل الأمتزاز 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 تحمل للملوحة من البطيئة النمو *Bradyrhizobium* (Zahran, 1999). وهذا يتفق مع (Tan & Broughton., 1982) على أن كفاءة امتصاص K كانت أعظم في الرايزوبيا سريعة النمو من البطيئة النمو وذلك باستعمال تقنية النظائر المعلمة. وان كل من البكتريا *R. trifolii* و*R. meliloti* أظهرتا نمو مقيد عند حذف K من الوسط الغذائي الخاص بالرايزوبيا (O'Hara, 2001). وان سبب انخفاض متوسط النمو عند المعاملة 100 ملغم K.كغم$^{-1}$ بالمقارنة مع المعاملة 50 ملغم K.كغم$^{-1}$ ربما يكون بسبب تأثير زيادة تركيز K على امتصاص العناصر الغذائية الأخرى (Johnston, 2006).

كان تأثير التداخل بين البوتاسيوم وأوقات التحضين ايجابياً إذ بلغت أعداد البكتريا ذروتها عند مستوى البوتاسيوم 50 ملغم K. كغم$^{-1}$ وذلك بعد 12 يوماً من التحضين إذ بلغت أعدادها 22.36 × 10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة وكان اقل عدد للبكتريا في زمن التحضين نفسه عند معاملة المقارنة إذ كانت أعدادها 12.90×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة وقد اظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال 0.01 للتداخل بين مستوى السماد وزمن التحضين.

٣- تأثير الكوبلت وأوقات التحضين في الكثافة العددية لبكتريا الرايزوبيا في التربة:

أوضحت نتائج جدول (٢) استمرار أعداد خلايا البكتريا بالزيادة حتى زمن 12 يوماً من التحضين وتحت جميع مستويات الكوبلت المستعملة ثم انخفضت بعد ذلك الزمن إذ أدت إضافة مستوى الكوبلت 0.375 ملغم Co. كغم$^{-1}$ إلى زيادة أعداد أحياء التربة بفرق معنوي بين المعاملات على مستوى احتمالية 0.01 فقد بلغ متوسط الأعداد تحت هذه المعاملة 17.08 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة تلتها معاملة الكوبلت 0.75 ملغم Co. كغم$^{-1}$ التي سجلت 16.39 × 10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة ثم متوسط الكثافة العددية تحت معاملة المقارنة التي بلغت 14.55 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة. توضح هذه النتائج دور الكوبلت في زيادة أعداد خلايا بكتريا العقد الجذرية وفي هذا المجال حصل (Pattanayak *et al.*, 2000 و Dash, *et al.*, 2000 وMarkova, 1996) على نتائج مشابهة عند دراستهم للبكتريا العقدية المتخصصة على نبات الفاصولياء وكذلك (Riley & Dilworth 1985) عند دراستهما للبكتريا العقدية المتخصصة على نبات الترمس إذ أن هذا العنصر يعد من العناصر المهمة لنمو البكتريا, وان أضافته إلى الوسط الغذائي والتربة تؤدي إلى زيادة في نمو البكتريا وزيادة أعدادها (Young, 1979). عند غياب الكوبلت لم تحصل أي زيادة في أعداد هذه البكتريا (Pattanayak *et al.*, 2000). كذلك ذكر (Markova, 1996) أن إضافة الزنك والكوبلت إلى التربة سوية تؤدي إلى زيادة أعداد بكتريا العقد الجذرية وبشكل ملحوظ, أما أضافتها منفردة فكان الكوبلت متفوقاً في زيادة الأعداد ويليه الزنك.

من جانب أخر أشارت النتائج إلى وجود علاقة ايجابية بين مستوى الكوبلت وأوقات التحضين إذ وصل متوسط الكثافة العددية للبكتريا العقدية 19.25×10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة عند مستوى الكوبلت 0.375 ملغم Co.كغم$^{-1}$ و 12 يوماً من التحضين بينما سجل اقل عدد للبكتريا خلال زمن التحضين نفسه عند معاملة المقارنة إذ بلغت 17.73×10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة وقد اظهر التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية للتداخل بين مستويات الكوبلت وأوقات التحضين عند مستوى احتمال 0.01 ووجود فروق معنوية عند مستوى احتمال 0.1 .

٤- تأثير الكوبلت والبوتاسيوم في الكثافة العددية لبكتريا الرايزوبيا في التربة:

بينت نتائج جدول (٢) ونتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية على مستوى 0.01 نتيجة إضافة كل من الكوبلت والبوتاسيوم معاً، فقد أدت إلى زيادة متوسط أعداد خلايا بكتريا العقد الجذرية الحية، إذ كانت معاملة التداخل 0.375 ملغم Co. كغم$^{-1}$ + 50 ملغم K. كغم$^{-1}$ أفضل المعاملات وبفارق عالي المعنوية عن معاملة المقارنة إذ بلغت الكثافة العددية تحت هذه المعاملة 21.82 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة, بينما كان المتوسط تحت معاملة المقارنة 7.83 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة, تلتها ودون فارق معنوي معاملة التداخل 0.75 ملغم Co. كغم$^{-1}$ + 50 ملغم K. كغم$^{-1}$ فقد بلغ معدل الأعداد تحتها 20.25 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة, وأظهرت معاملة التداخل 0.75 ملغم Co .كغم$^{-1}$ + صفر ملغم K . كغم$^{-1}$ اقل متوسط للأعداد بعد معاملة المقارنة بلغ 10.67 × 10^{8} خلية. غم$^{-1}$ تربة جافة. أن أسباب زيادة الأعداد عند التداخل بين البوتاسيوم والكوبلت يعود إلى تأثير هذين العنصرين المهمين في الوسط الزرعي الذي فيه البكتريا العقدية وذلك لدور هذين المغذيين في الكثير من الفعاليات الحيوية لهذه الأحياء وبعض الإنزيمات المهمة للأحياء.

٥- تأثير الكوبلت والبوتاسيوم وأوقات التحضين في الكثافة العددية لبكتريا الرايزوبيا في التربة:

يتضح من جدول (٢) تأثير التداخل بين الكوبلت والبوتاسيوم وأوقات التحضين إذ وصلت أعداد البكتريا العقدية إلى ذروتها عند معاملة التداخل 0.375 ملغم Co. كغم$^{-1}$ + 50 ملغم K. كغم$^{-1}$ بعد 18 يوم من التحضين إذ بلغت 24.00 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة في زمن التحضين نفسه التي سجلت 7.80 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة تلتها معاملة التداخل 0.375 ملغم Co. كغم$^{-1}$ + 50 ملغم K. كغم$^{-1}$ بعد 6 أيام، إذ سجلت 23.40 × 10^{8} خلية.غم$^{-1}$ تربة جافة وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة في الزمن نفسه التي بلغت 8.20 × 10^{8} خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة بينما سجلت معاملة المقارنة في الزمن صفر 1.50 × 10^{8} خلية . غم$^{-1}$ تربة جافة وهي اقل من معاملة التداخل صفر ملغم Co. كغم$^{-1}$ + صفر ملغم K. كغم$^{-1}$ في زمن التحضين 3 أيام التي سجلت 4.30 × 10^{8} خلية. غم$^{-1}$ تربة جافة التي كانت اقل معاملات التداخل. أن سبب عودة ارتفاع أعداد الخلايا الحية في معاملة التداخل 0.375 ملغم Co. كغم$^{-1}$ + 50 ملغم K. كغم$^{-1}$ في الزمن الأخير بعد انخفاضها في الزمن السابق قد يعود ربما إلى تحلل الخلايا الميتة بحيث أمكن الاستفادة منها مصدراً غذائياً للخلايا الحية الأخرى وهذا يتماشى مع النتائج التي حصل (Alkrtani, 2005) في دراسته للبكتريا العقدية المتخصصة على الحمص، فضلاً عن دور المغذيات ومستوياتها المضافة للتربة في تشجيع النمو.

المصادر:

Abdulameer, A.S. (2010). Effect of Time Factor, Molybdenum and Potassium on *Rhizobium* Growth in the Al-jaderya Soil. Baghdad Science Journal. Vol.7, No. 3.

Abdulameer, A.S. (2011). Influence of Time Factor, Spray Feeding of Copper and Iron in the Relation between the Nitrogen Content in the Shoot and the Average of 100 Seeds Weigh of Bean Plants. Al-Mustansriyah Journal of Sci. Vol. 22, No. 1.

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.

Elmerich, C., Kondorosi, A. and Newton, W.E. (1998). Biological nitrogen fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers. Paris.

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.

Sangkkara, U.R., Hartwig, U.A. and Nösberger, J. (1996). Soil moisture and potassium affect the performance of symbiotic N_2 fixation in faba bean and common bean. Plant&Soil, 148,123-130.

Young, R.S. (1979). Cobalt in biology and biochemistry. Consulting Chemical Engineer, Victoria, B.C., Canada. Academic Press. New York. A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.

Beck, D.P., Materon, L.A. and Fadi, F.A. (1993). Practical *Rhizobium* Legume technology manual. Technical No. 19. ICARDA, Syria.

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.

Atlas, R.M. and Cerniglia, C.E. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. BioScience 45: 332-338.

Novak, K., Chovanec, P., Skrdleta, V., Kropacova, M., Lisa, L. and Nemcova, M. (2002). Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea. J. of Experimental Botany, V. 53, No. 375., P. 1735-1745.

Thorae, S.H. and Williams, H.D. (1999). Cell density-Dependent starvation survival of *Rhizobium* by *Phaseoli* Identfction. .Applied and Environmental Microbiology, p. 218-227, v. 71, No. 5.

Marwa, S.A., Selim, S.M., Ragab, A.A. and Saleh, E.A. (2002). Inculation time as aprime factor affectcg successful No Nodulation of Common bean Arab Vniv .J. Agric . sci ., Ain Shams Uniu., Cairo, 10 (2) . p. 521–241.

Rastogi, V.B. (2008). Fundamentals of Molecular Biology. Ane Books INDIA, New Delhi, India. p. 303-318.

Santoro, T. and Stotzky, G. (1967). Sorption between microorganisms and clay minerals as determined by the electrical sensing zone particle analyzer. Can. J. Microbiol., 14, 299-307.

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

Tan, I.K.P. and Broughton, W.J. (1982). Rhizobia in tropical legumes-XIV. Ion uptake differences between fast- and slow-growing strains. Soil Bio. Biochem., 14, 295-299.

Johnston, A.E. (2006). Understanding Potassium and its Use. European Fertilizer Manufacturers Association. Avenue E. Van Nieuwenhuyse 4, B-1160 Brussels.Belgium.

Pattanayak, S.K., Dash, D., Jena, M.K., Nayak, R.K. (2000). Seed treatment of green gram with molybdenum and cobalt: Effect on nodulation, biomass production and N

mineral nutrition of *Phaseolus Vulgaris* with nitrogen, zink and cobalt. Soil Sci. Agrochemistry and Ecology. V (31), 33-35.

Riley, I.T. and Dilworth, M.J. (1985). Cobalt status and the effects on soil population of *Rhizobium lupine*, rhizosphere colonization and nodule initiation. Soil Biol. Biochem., 17, 81-85.

Alkrtani, R. (2005). Effect of Iron and Phosphorus on *Rhizobium* Efficiency and on Growth and Yield of Cowpea. M.Sc. Thesis, College of Agriculture - University of Baghdad. Iraq.

uptake in an acid soil. J. of the Indian Soc. Of Soil Sci., 48 (4), 769-773. CABI Publishing CAB International New York USA, Fax: +1 (212) 686 7993.

Dash, D., Pattanayak, S.K., Jena, M.K., Nayak, R.K. (2000). Effect of green gram seed treatments with different doses of molybdenum and cobalt on seed yield, biomass production and their incorporation as partial green manure crop to benefit subsequent maize crop in the sequence. *Intern. J. of Tropical Agric.,* 18 (2) 101-111. CABI Publishing CAB International New York USA, Fax: +1 (212) 686 7993.

Markova, A. (1996). Efficiency of selected and spontaneous nodule bacteria depending on

Effect of Time factor, Potassium and Cobalt on the efficiency of *Rhizobium* growth in the Silt Clay loam Soil.

Ali Sabeeh Abdulameer[1], Munther Mohamed Ali Al-Mukhtar[2], Abdul Ratha Hassan Ali[3], Zainab Talib Al-Sharify[4]

[1]Biology Dept., College of Science for Women, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
[2]Soil & Water Science Dept., College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq
[3]Microbiology Dept., College of Veterinary, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
[4]Environmental Engineering Dept., College of Engineering, Al-Mustansiryiah University, Baghdad, Iraq.

Abstract

An experiment was carried out to study the effects of Time Factor**,** potassium and cobalt on *Rhizobium* growth. The objective of the experiment, which conducted under laboratory conditions, was to investigate the interaction effects of using three levels of cobalt (0, 0.375, 0.75 mg Co. 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 Silt Clay loam soil after 3, 6, 12 and 18 days of incubation at 28°C. The results indicated that cobalt level 0.375 mg Co. Kg^{-1} and potassium level 50 mg K . Kg^{-1} recorded the highest significant increase in the viable counts of *Rhizobium* growth in the sterile soil especially after 12 days of incubation at 28°C which got 24.00 $\times 10^8$ cell.$gram^{-1}$ dry soil.