مجلة الزراعة العراقية مجلد15 عدد2 ص 1-9 تشرين الأول/2010

# تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في نشاط وأعداد بعض السلالات المحلية والأجنبية للرايزوبيا المتخصصة على الماش

علي حسين البياتي* امل نعوم يوسف** أيناس خالد القيسي***

## الملخص

نفذت تجربة عاملية بأستخدام التصميم العشوائي الكامل وبثلاثة مكررات لدراسة تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في نشاط وأعداد ست عزلات محلية من بكتريا العقد الجذرية المتخصصة على نبات الماش *R.leguminosarum*، عزلت من مناطق مختلفة في محافظتي بغداد والأنبار وهي أبو غريب وخان ضاري والرضوانية والكرمة الصقلاوية والحلابسة Hl, Sk, Kr, Ra, Kh, Ab على التوالي، فضلا عن التلقيح بسلالة مستوردة M10 وذلك بتقيم نموها في وسط زرعي (مستخلص الخميرة- منيتول السائل) والمحتوية على ستة مستويات من الملوحة هي 1.05، 2.75، 4.05، 5.97، 6.85 و8.54 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ حضرت بأستخدام مياه بزل ملوحتها 16 ديسي سيمنز.م$^{-1}$. لقحت الأوساط بالمزارع البكتيرية أعلاه ثم حضنت في حاضنة هزازة على درجة 28 سْ ولمدة 7 أيام، تم خلالها قياس النمو البكتيري من خلال قياس كثافتها الضوئية بأستخدام جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي 540 نانوميتر.

أظهرت النتائج ان زيادة مستوى الملوحة في الوسط الزرعي السائل من 1.05 الى 8.54 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ قد أثر معنويا في خفض الكثافة العددية للبكتريا العقدية وبنسبة تزيد على 70%، وان أعلى قراءة للكثافة الضوئية للمزارع البكتيرية 0.82 قد سجلت عند العزلة Ra في حين أقل قراءة 0.47 وجدت في المعاملة M10. سجلت جميع المزارع البكتيرية المدروسة أعلى كثافة عددية بعد مرور 5 أيام على التحضين، وان أعلى كثافة ضوئية 1.66 قد سجلت للعزلة Ra عند المستوى الملحي1.05 ديسي سيمنز.م$^{-1}$.

## المقدمة

يعد عنصر النيتروجين من أهم العناصر الغذائية بعد الكاربون والهيدروجين والاوكسجين. وبالرغم من أن الغلاف الجوي يحتوي على مايعادل $3.8\times10^{15}$طن بشكل غاز خامل الاأن محتوى الترب الزراعية منه قليل جدا ولايتجاوز 0.5-0.1% نيتروجين وان الجاهز منه أقل من هذا بكثير. لذا وجب أيجاد البدائل العلمية والتقانات الاحيائية في التوصل الى آيجاد الطرائق الحيوية في مساعدة النباتات وخاصة البقولية لتزويدها بالنتروجين عن طريق تثبيته حيويا. أن دور الأحياءالمجهرية في تجهيز النباتات البقولية بما تحتاجه من النتروجين من الهواء الجوي عن طريق تحفيزات لقاحية بكتيرية (Rhizobium – Inoculation) من سلالات ذات كفاءه عالية لتثبت النتروجين العضوي حيوياً. علما بأن كمية النتروجين المثبتة بالطرائق الحيوية تقدر بحوالي 175 مليون طن/نتروجين على سطح الكرة الارضية، وتبلغ الكمية المثبتة بوساطة البكتريا العقدية للبقوليات 80 مليون طن/نتروجين. اي أن 50% من تثبيت النتروجين العالمي يكون عن طريق التثبت الحيوي من خلال العلاقة التعايشية بين البكتريا العقدية (الرايزوبيا) والنباتات البقولية (5). لقد أجريت العديد من الدراسات حول تأثير الملوحة في نمو بعض سلالات بكتيريا الرايزوبيا

* كلية الزراعة- جامعة الانبار- الانبار، العراق.
** الهيئة العامة للبحوث الزراعية- وزارة الزراعة - بغداد، العراق.
*** هيئة التعليم التقني - معهد التكنلوجيا- بغداد، العراق.
تاريخ تسلم البحث: اب/2008.
تاريخ قبول البحث: ت1 /2009.

من قبل العديد من الباحثين فقد أشار Mohammed وجماعته (15) الى تباين قابلية سلالات بكتريا الرايزوبيا المتخصصة على الجت *Mediago sativa* L. في احداث العكارة المستخدمة كمعيار لنمو البكيريا في الوسط الزرعي بأختلاف تركيز الاملاح في الوسط, أذ وجدوا بأن 42 سلالة بكتيرية من أصل 92 كانت حساسة للملوحة (7.04 $dS.m^{-1}$) بينما أظهرت 49 سلالة قابليتها على النمو تحت هذا التركيز الملحي، لهذا قسموا السلالات الى مجموعتين الاولى حساسة للملوحة والثانية متحملة لها. درس Mashhady وجماعته (14) تحمل ثلاث سلالات محلية Am، SA107 وRm4 وسلالتين مستوردتين هما NRG183 وCan A2 من بكتريا الرايزوبيا المتخصصة على الجت عند الايصالية الكهربائية 0، 2، 4، 6، 8 و10 $dS.m^{-1}$ ولاحظوا ان 6 $dS.m^{-1}$ قد ادى الى أنخفاض النمو مع أستمرار الانخفاض الى أنعدامه عند المستوى 8 $dS.m^{-1}$، وكانت السلالات المحلية أكثر تحملا للملوحة من السلالات المستوردة. لقد درس Daranelli وجماعته (10) تحمل ثلاث سلالات من بكتريا الرايزوبيا المتخصصة على نبات فول الصويا وهي 118، 209 و110 للملوحة ولاحظوا بأن زيادة الملوحة من 1.0–10.0 $dS.m^{-1}$ أدى الى أنخفاض وتوقف نموها. ووجد Lai and Khanna (12) في دراستهما ان عزلتين فقط من بين 35 عزلة لبكتريا الرايزوبيا *M. plurifarium* عزلت من نباتات الاكاسيا *Acacia nilotica* كانت مقاومتين لمستوى الملوحة 8.5 $dS.m^{-1}$ في حين ان أحدى العزلات قد توقف نموها عند ds.m-13.0. أشار Zurayk وجماعته (18) الى ان أستعمال مستويات ملحية مختلفة تراوحت مابين 10.2 الى 20.0 $dS.m^{-1}$ حضرت من مزج ملحي NaCl و NaSO4 أدى الى تقليل طور التطبيع او التاقلم وخفض طور اللوغارتمي للرايزوبيا *S. Medicae* . وقد بين Brhada وجماعته (7) ان آليات الحماية الأزموزية (protection osmotic) تكون من خلال أفراز مركبات معينة مثل Choline وGlycincbetane التي تحسن نمو البكتريا تحت ظروف الأجهاد الملحي. لقد أوضح كل من Chittoni وBueno (8) تأثير عدة مستويات من الملوحة 0.17، 1.0، 2.0، 4.0 و5.0 $dS.m^{-1}$ على سلالة بكتريا الريزوبيا ATcc51466 المعزولة من نبات الفستق ولاحظا حدوث زيادة معنوية في زمن جيلها بمقدار الضعفين أضافة الى تضاعف زمن الطور ألأسي ثلاث مرات بزيادة ملوحة الوسط الى 4.0 $dS.m^{-1}$ في حين توقف النمو عند 5.0 $dS.m^{-1}$. ووجد Lioret وجماعته (13) ان سلالة من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* المتخصصة على نبات النفل *Trifolium ssp.* المتحملة للملوحة تستطيع النمو في وسط ذي ملوحة 50 $dS.m^{-1}$ وقد لاحظوا تغيرا في تركيب Lipopolysaccharide للبكتريا وان هذا التغير يمكن البكتريا من التاقلم والعيش في الظروف الملحية العالية.اما حسن (3) فقد وجد ان أعداد البكتريا المتخصصة على نبات الماش *Vigna radiate* L. أنخفضت بزيادة مستويات الملوحة وان أقل عدد للبكتريا قد سجل عند المستوى 9 $dS.m^{-1}$ ومدة التحضين 8 أيام, ولم يلاحظ فروق معنوية بين السلالة M10 والعزلة A1 عند جميع مستويات الملوحة، وان أعلى عدد للبكتريا سجل عند المستوى 1.4 $dS.m^{-1}$ ومدة التحضين 13 يوما.

كما أوضح Rafiq (16) بأن بكتريا الرايزوبيا المتخصصة على الحمص *Cicer artietinum* L. قد تأثر نموه سلباً وبصورة معنوية بزيادة التركيز الملحي لوسط النمو. وان اكثر غزارة نمو قد سجل عند المستويات الملحية مابين (0.62 – 1.25) $dS.m^{-1}$. ومحدودية الدراسات العلمية حول تأثير الملوحة في مدى تحمل البكتريا العقدية المتخصصة لنبات الماش والمستوطنة أصلا في التربة. أجريت هذه الدراسة التي تهدف الى التعرف على قابلية بعض العزلات المتخصصة على محصول الماش والموجودة اصلا في ترب بعض المناطق الزراعية في محافظتي بغداد والأنبار للنمو تحت مستويات مختلفة من الملوحة في أوساط زرعية سائلة وتحت ظروف المختبر.

## المواد وطرائق البحث

اختيرت ست مناطق مزروعة بمحصول الماش *Vigna radiate* L. ضمن محافظتي بغداد والأنبار وهي أبوغريب (Ab) وخان ضاري (Kh) والرضوانية (Ra) والكرمة (Kr) والصقلاوية (Sk) وأخيرا الحلابسة (Hl) وذلك لعزل البكتريا المتخصصة على هذا النبات. أنتقيت ستة نباتات نامية بشكل جيد عشوائيا في كل منطقة مع الحصول على نموذج تربة من الطبقة السطحية (0–30 سم) عند كل موقع لتقدير بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية للتربة (جدول 1).

جدول 1: بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية لترب المناطق التي أخذت منها النباتات*

| المنطقة | الرمز | تاريخ أخذ النماذج | $ECe$ $dS.m^{-1}$ | pH | N الجاهز | P الجاهز | K الجاهز | النسجة |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ملغم.كغم$^{-1}$ تربة | | | |
| أبو غريب | Ab | 2006/8/12 | 3.12 | 7.90 | 66.7 | 8.73 | 89.5 | طينية مزيجة |
| خان ضاري | Kh | 2006/6/22 | 3.45 | 7.61 | 31.5 | 1.77 | 174.7 | مزيجة |
| الرضوانية | Ra | 2006/8/10 | 8.53 | 7.83 | 30.6 | 9.60 | 73.0 | طينية |
| الكرمة | Kr | 2006/8/7 | 3.25 | 7.63 | 17.5 | 9.02 | 77.2 | مزيجة غرينية |
| الصقلاوية | Sk | 2006/8/5 | 4.89 | 7.62 | 35.0 | 2.32 | 107.6 | مزيجة غرينية |
| الحلابسة | Hl | 2006/8/2 | 1.90 | 7.64 | 31.5 | 5.06 | 85.0 | مزيجة غرينية |

*قدرت الصفات الكيميائية والفيزيائية للتربة حسب الطرائق المذكورة في Zurayk *et al* ( 18 ).

رطبت التربة حول النباتات قبل قلعها لتقليل التأثيرات الميكانيكية التي تحدث على الجذور. ثم أزيلت التربة المحيطة بالمجموع الجذري. تم عزل البكتريا من العقد الجذرية حسب طريقة Beck وجماعته (5) باستخدام شفرة حلاقة معقمة مع مراعاة قطع جزء من الجذر الموجودة عليه وغسله بماء الحنفية عدة مرات ثم غمره في محلول كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) تركيزه 0.1% لمدة 5 دقائق ثم الكحول الأثيلي ذو التركيز 95% لمدة 3 دقائق. بعدها غسلت ولعدة مرات متتالية بالماء المقطر المعقم، وفي المرة الأخيرة تركت العقدة داخل طبق بتري معقم مع كمية قليلة من الماء المقطر المعقم ،أذ سحقت تحت ظروف التعقيم بوساطة ملعقة وزن باستخدام عروة التلقيح, ثم نقل جزء من معلق العقدة الجذرية المسحوقة ونشرها على طبق بتري تحتوي في وسط مستخلص الخميرة المانيتول الصلب (YEM) باستخدام طريقة التخطيط (Streaking), حضنت الأطباق بعدها في الحاضنة على درجة 28 سْ لمدة 48–72 ساعة. تقل بعدها جزء من المستعمرات البكتيرية والتي لم تأخذ الصبغة الحمراء او تلك التي ظهرت بلون أحمر باهت والذي يعد الدليل الأولي على أن المستعمرة هي للبكتريا العقدية (رايزوبيا) ولجميع العزلات على آكار مائل (Slant agar) من الوسط الزراعي نفسه وتحضينها لمدة 48 ساعة في درجة 28 سْ في الحاضنة. حفظت المزارع البكتيرية في الثلاجة لحين استخدامها في الاختبارات البكتريولوجية اللاحقة.

أجري اختبار صبغة كرام (Gram stain test) وفحص دليل البروموثايمول الأزرق ( Bromthymol blue test) للتأكد من ان العزلات تعود الى الجنس *Rhizobium* وحسب ما بينه Beck وجماعته (5). حضرت شرائح زجاجية تحتوي على مسحات من كل من العزلات التي تم الحصول عليها وتثبيتها على الشرائح بواسطة اللهب.

صبغت الشرائح بصبغة السفرانين (Safranin) ثم فحصت تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية وبناءً على نتائج هذه الاختبارات البكتريولوجية اختيرت ست عزلات تمثل كل منها أحدى المناطق التي عزلت منها . نفذت تجربة عاملية وفق التصميم العشوائي الكامل Steel وTorri (17) لدراسة استجابة العزلات المحلية أعلاه للملوحة أضافة الى العزلة المستوردة M10 ومعاملة المقارنة (عدم التلقيح)، من خلال تقدير الكثافة العددية لكل منها بأستخدام الوسط الزرعي YEM السائل (جدول 2) وحسب ما أشار اليه Beck وجماعته (5) باستثناء عدم إضافة كاربونات

الكالسيوم اليه وذلك تجنباً لاحتمالات تأثير هذا الملح في قراءة الكثافة الضوئية (بسبب قلة ذوبانه) والتي أعتمـــدت في قياس الكثافة العددية للمزارع البكتيرية المدروسة.

جدول 2: مكونات وسط مستخلص الخميرة – المانيتول (YEM)*

| المكونات | الوزن |
|---|---|
| Mannitol | 10.0 غم |
| K2HPO4 | 0.5 غم |
| MgSO4-7H2O | 0.2 غم |
| NaCl | 0.1 غم |
| Yeast extract | 0.5 غم |
| Agar | 15.0 غم |
| Distilled water | 1.0 لتر |

* مع ضبط درجة التفاعل عند 7.

استخدمت مياه بزل ملوحتها 16.0 $dS.m^{-1}$ (جدول 3) في تحضير 6 مستويات من الملوحـــة في الوســـط الزرعي وذلك بأستخدام نسب ماء بزل: الوسط الزرعي السائل وكمامبين في الجدول (4).

جدول 3: التحليل الكيميائي لمياه البزل المستخدمة في الدراسة

| الصفة* | القيمة |
|---|---|
| EC $dS.m^{-1}$ | 16.0 |
| pH | 7.8 |
| الآيونات الموجبة (مليمكافئ.لتر$^{-1}$) $Ca^{++}$ | 29.4 |
| $Mg^{++}$ | 12.4 |
| $Na^{+}$ | 50.1 |
| $K^{+}$ | 0.3 |
| الآيونات السالبة (مليمكافئ.لتر$^{-1}$) $SO4^{=}$ | 77.3 |
| $HCO_3^{-}$ | 3.6 |
| $CO_3^{=}$ | Nil |
| $Cl^{-}$ | 11.2 |
| $NO_3$ | Nil |
| SAR | 10.65 |
| Adj.SAR | 40.47 |

*تمت جميع التقديرات حسب الطرائق الواردة في Zurayk *et al* ( 18 ).

جدول 4: تحضير معاملات المستويات الملحية للأوساط الزرعية المستخدمة في التجربة

| رمز المعاملة | حجم ماء البزل (مل) | حجم الوسط السائل (مل) | الحجم الكلي (مل) | التوصيل الكهربائي (ديسيسيمنيز.م$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| S1 المقارنة | 0.0 | 150.0 | 150.0 | 1.05 |
| S2 | 16.7 | 133.3 | 150.0 | 2.75 |
| S3 | 37.5 | 112.5 | 150.0 | 4.05 |
| S4 | 50.0 | 100.0 | 150.0 | 5.97 |
| S5 | 75.0 | 75.0 | 150.0 | 6.85 |
| S6 | 100.0 | 50.0 | 150.0 | 8.54 |

وزعت الاوساط الزرعية ذوات المستويات الملحية المختلفة أعلاه في دوارق مخروطية زجاجية سعة 250 مـــل وبمعدل 150 مل .دورق$^{-1}$, ثم عقمت في الموصدة على درجة حرارة 121 سْ لمدة 20 دقيقة.

لقحت الاوساط الزرعية بالعزلات البكتريا المحلية والسلالة المستوردة التي سبق تنميتها على الوسط الســـائل YEM وحسب المعاملات أعلاه أضافة لمعاملة المقارنة وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملـــة وبمعـــدل 5 مـــل.دورق$^{-1}$ وذلك بأستخدام ماصات معقمة حجمها 5 مل ثم حضنت في حاضنة هزازة (100 دورة.دقيقة$^{-1}$) وعلى درجة حرارة 28 سْ لمدة 7 أيام تم خلالها قياس كثافة نمو كل منها يوميا بأستخدام طريقة الكثافة الضوئية وذلك بأخذ حجم ثابـــت ومناسب من كل مكرر تحت ظروف التعقيم عند كل مدة قياس (24 ساعة) وقياسه باستخدام جهاز المطياف الضـــوئي Spectrophotometer ماركة LG وعلى طول موجي 540 نانوميتر Beck وجماعته (5).

## النتائج والمناقشة

يتضح من الجدول (5) ان زيادة ملوحة الوسط الزرعي سببت أنخفاضاً معنوياً في الكثافة العددية (الكثافة الضوئية O.D) على الطول الموجي nm540 وكان هذا الأنخفاض طردياً مع مستوى الملوحة، إذ سجل أعلى متوسط للكثافة الضوئية للمزارع البكتيرية عند مستوى الملوحة S1 (1.04 ديسي سيمنز.م$^{-1}$) معاملة المقارنة بلغ عندها 0.86 في حين وجد أقل متوسط (0.24) عند المعاملة S6 (8.54 ديسي سيمنز.م$^{-1}$) أي بنسبة أنخفاض 72.1% ومثل هذا الأتجاه في تأثير الملوحة قد لاحظه Rafiq (16) في كثافة نمو البكتريا العقدية Rhizobium بزيادة تركيز ملوحة الوسط الزرعي على 2 ديسي سيمنز.م$^{-1}$، بينما لوحظ أفضل نمو عند المستوى الملحي (0.63 – 1.25 ديسي سيمنز.م$^{-1}$). أن سبب أنخفاض أعداد البكتريا في الوسط الملحي قد يعود الى أرتفاع الضغط الأزموزي الناتج من أرتفاع تركيز الأملاح خارج الخلية وحدوث حركة للماء من داخل الخلية الى خارجها مما يقلل من عدد الخلايا الحية وبالتالي يسبب انخفاضاً في الكثافة الضوئية (7).

اما بالنسبة لمعاملات العزلات المحلية والسلالة المستوردة، فأن نتائج الجدول (5) تظهر وجود فروق معنوية فيما بينها في متوسط الكثافة الضوئية إذ أظهرت العزلة (Ra) أعلى متوسط كثافة ضوئية بلغت 0.82 في حين أقل كثافة سجلت عند السلالة (M10) 0.47، أي بنسبة أنخفاض 42.7% عن العزلة (Ra). وهذا يتفق مع ماتوصل اليه حسن (3) إذ لاحظ أنخفاض الكثافة الضوئية للبكتريا العقدية المعزولة من نبات الماش وأعداد الخلايا الحية في الوسط الزرعي السائل نتيجة لزيادة تركيز الأملاح وكانت العزلة المحلية A1 أكثر تحملا للملوحة من السلالة المستوردة M10. أن تحمل العزلات المحلية للمستويات الملحية العالية يعود الى أمتلاكها ميكانيكية تمكن الخلية من خلالها تقليل تأثير الأجهاد الملحي وذلك بأفرازها موادخاصة ترفع الضغط الأزموزي داخل الخلية لغرض مجابهة الضغط الأزموزي للمحيط الخارجي بذلك تعمل على حماية الخلية بميكانيكية تسمى Osmoportection (6، 7, 11).

اما تاثير مدد التحضين في كثافة نمو العزلات والسلالة المدروسة فقد اوضحت النتائج (جدول 5) تفوق الكثافة العددية بعد 5 أيام من التحضين (معاملة T5) على باقي مدد التحضين، إذ بلغ متوسط الكثافة الضوئية 0.79 في حين ان أقل قراءة لوحظت بعد 24 ساعة من التحضين (المعاملة T1).كما لوحظ ان الكثافة الضوئية أخذت بالانخفاض عند زيادة مدة التحضين عن 5 أيام (T5) وقد تزامن هذا الأنخفاض مع مدة التحضين حيث بلغت إدناها 0.49 بعد سبعة أيام من التحضين (T7). ان سبب الانخفاض في الكثافة الضوئية بعد 5 أيام من التحضين قد يكون بسبب نقص كمية العناصر الغذائية في الوسط نتيجة لأستهلاكها من قبل البكتريا في الوسط الزرعي و/أو تراكم بعض المركبات الناتجة عن مختلف الفعاليات الأيضية للخلايا البكتيرية والتي قد يكون لها تأثير مباشر في موت الخلايا البكتيرية او غير مباشر من خلال أحداث تغيرات في الظروف البيئية للوسط كتغير درجة تفاعل الوسط (pH).

اما تأثير التداخل بين العزلات البكتيرية ومعاملات الملوحة (SxV) فيلاحظ من الجدول (6) تفوق العزلتين Ra وAb عند مستوى الملوحةS1 (1.04 ديسي سيمنز.م$^{-1}$) على باقي معاملات هذا التداخل فقد بلغ متوسط كل من هاتين المعاملتين 1.04 بينما أدنى متوسط 0.07 وجد عند المستوى الملحي S6 (8.54 ديسي سيمنز.م$^{-1}$) والتلقيح بالسلالة M10 أي بنسبة انخفاض مقداره 93.2%. كما بينت النتائج عدم أستطاعة أي من العزلات المحلية النمو عند المستوى الملحي الأعلى من 5.97 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ في حين كانت السلالة M10 أكثر حساسية في هذا المجال إذ لم تستطع النمو بمستوى ملحي يزيد على 4.05 ديسي سيمنز.م$^{-1}$. ان هذا التفاوت بين العزلات المحلية والسلالة المستوردة في قابليتها على النمو تحت مستويات ملوحة مختلفة قد يعزى الى تأقلم العزلات المحلية على الوجود والنمو في ترب متأثرة بالملوحة والمنتشرة في المناطق التي عزلت منها هذه العزلات.

جدول 5: تأثير مستويات الملوحة والعزلات البكتيرية ومدد التحضين في الكثافة العددية للبكتريا بدلالة الكثافة الضوئية على طول موجي 540 نانومتر

| مستويات الملوحة(S) | العزلات البكتيرية(V) | مدد التحضين (T) يوم | | | | | | | متوسط مستويات الملوحة |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| S1 | M10 | 0.45 | 0.52 | 0.70 | 0.83 | 0.73 | 0.64 | 0.46 | 0.86 |
| | Ra | 0.81 | 0.89 | 1.32 | 1.66 | 1.18 | 0.98 | 0.66 | |
| | Sk | 0.72 | 0.80 | 1.21 | 1.29 | 1.17 | 0.97 | 0.64 | |
| | Kh | 0.71 | 0.75 | 0.99 | 1.03 | 0.95 | 0.83 | 0.59 | |
| | Kr | 0.28 | 0.56 | 0.91 | 1.31 | 1.17 | 0.97 | 0.66 | |
| | Hl | 0.41 | 0.46 | 0.68 | 0.82 | 1.05 | 0.87 | 0.46 | |
| | Ab | 0.20 | 0.38 | 0.51 | 1.22 | 1.47 | 1.07 | 0.66 | |
| S2 | M10 | 0.43 | 0.50 | 0.74 | 0.87 | 0.96 | 0.78 | 0.52 | 0.76 |
| | Ra | 0.71 | 0.76 | 0.98 | 0.01 | 0.40 | 0.96 | 0.76 | |
| | Sk | 0.47 | 0.66 | 0.87 | 0.71 | 0.67 | 0.57 | 0.39 | |
| | Kh | 0.60 | 0.79 | 0.91 | 1.27 | 1.10 | 0.95 | 0.68 | |
| | Kr | 0.44 | 0.50 | 0.66 | 0.79 | 0.97 | 0.89 | 0.73 | |
| | Hl | 0.25 | 0.35 | 0.70 | 0.79 | 0.85 | 0.69 | 0.51 | |
| | Ab | 0.40 | 0.47 | 0.66 | 1.26 | 1.03 | 0.85 | 0.70 | |
| S3 | M10 | 0.30 | 0.61 | 0.79 | 0.82 | 0.71 | 0.64 | 0.51 | 0.74 |
| | Ra | 0.82 | 0.82 | 0.96 | 1.31 | 1.34 | 0.99 | 0.89 | |
| | Sk | 0.44 | 0.60 | 0.78 | 0.96 | 1.33 | 0.98 | 0.69 | |
| | Kh | 0.65 | 0.85 | 0.97 | 0.01 | 0.96 | 0.89 | 0.72 | |
| | Kr | 0.37 | 0.41 | 0.48 | 0.55 | 0.93 | 0.83 | 0.69 | |
| | Hl | 0.29 | 0.39 | 0.67 | 0.89 | 0.79 | 0.69 | 0.58 | |
| | Ab | 0.23 | 0.56 | 0.55 | 0.56 | 0.76 | 0.73 | 0.67 | |
| S4 | M10 | 0.64 | 0.52 | 0.67 | 0.86 | 0.93 | 0.79 | 0.66 | 0.76 |
| | Ra | 0.54 | 0.94 | 0.76 | 0.98 | 1.51 | 0.77 | 0.87 | |
| | Sk | 0.37 | 0.65 | 0.79 | 1.03 | 1.15 | 1.01 | 0.89 | |
| | Kh | 0.49 | 0.60 | 1.20 | 1.30 | 0.81 | 0.63 | 0.53 | |
| | Kr | 0.52 | 0.77 | 1.05 | 1.13 | 1.00 | 0.97 | 0.88 | |
| | Hl | 0.45 | 0.53 | 0.66 | 0.79 | 0.83 | 0.64 | 0.48 | |
| | Ab | 0.51 | 0.69 | 0.98 | 1.14 | 1.05 | 0.84 | 0.73 | |
| S5 | M10 | 0.07 | 0.11 | 0.15 | 0.17 | 0.12 | 0.08 | 0.04 | 0.35 |
| | Ra | 0.40 | 0.45 | 0.71 | 0.81 | 0.73 | 0.62 | 0.57 | |
| | Sk | 0.23 | 0.39 | 0.45 | 0.39 | 0.37 | 0.34 | 0.29 | |
| | Kh | 0.28 | 0.30 | 0.34 | 0.37 | 0.35 | 0.29 | 0.22 | |
| | Kr | 0.35 | 0.37 | 0.43 | 0.44 | 0.38 | 0.34 | 0.21 | |
| | Hl | 0.20 | 0.24 | 0.28 | 0.29 | 0.35 | 0.26 | 0.12 | |
| | Ab | 0.13 | 0.27 | 0.43 | 0.49 | 0.63 | 0.81 | 0.70 | |
| S6 | M10 | 0.02 | 0.06 | 0.11 | 0.13 | 0.09 | 0.06 | 0.03 | 0.24 |
| | Ra | 0.30 | 0.34 | 0.46 | 0.49 | 0.44 | 0.30 | 0.16 | |
| | Sk | 0.08 | 0.15 | 0.30 | 0.27 | 0.23 | 0.19 | 0.15 | |
| | Kh | 0.23 | 0.27 | 0.35 | 0.29 | 0.28 | 0.24 | 0.19 | |
| | Kr | 0.28 | 0.29 | 0.32 | 0.34 | 0.30 | 0.25 | 0.15 | |
| | Hl | 0.12 | 0.15 | 0.23 | 0.27 | 0.19 | 0.14 | 0.10 | |
| | Ab | 0.07 | 0.12 | 0.25 | 0.41 | 0.50 | 0.29 | 0.14 | |

| متوسط العزلات(V) | M10 | Ra | Sk | Kh | Kr | Hl | Ab |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.47 | 0.82 | 0.67 | 0.66 | 0.62 | 0.49 | 0.62 |
| متوسط مدد التحضين (T) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | 0.38 | 0.50 | 0.64 | 0.77 | 0.79 | 0.65 | 0.49 |

أقل فرق معنوي للملوحة(S)= 0.0058 ، أقل فرق معنوي للعزلات(V)=0.0063، أقل فرق معنوي لفترات التحضين(T)=0.0063 ، أقل فرق معنوي للتداخل S x V x T =0.041

جدول 6: التداخل بين مستويات الملوحة والعزلات البكتيرية

| مستويات الملوحة(S) | العزلات البكتيرية(V) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M10 | Ra | Sk | Kh | Kr | Hl | Ab |
| S1 | 0.62 | 1.04 | 0.97 | 0.84 | 0.84 | 0.68 | 1.04 |
| S2 | 0.69 | 0.82 | 0.62 | 0.90 | 0.71 | 0.59 | 0.87 |
| S3 | 0.63 | 1.02 | 0.83 | 0.87 | 0.61 | 0.61 | 0.74 |
| S4 | 0.70 | 0.91 | 0.84 | 0.79 | 0.90 | 0.62 | 0.85 |
| S5 | 0.10 | 0.61 | 0.38 | 0.31 | 0.36 | 0.25 | 0.49 |
| S6 | 0.07 | 0.36 | 0.20 | 0.26 | 0.27 | 0.17 | 0.33 |

0.0131= LSD.0.05 for S x V

اما التداخل بين مستويات الملوحة ومدد اللتحضين (S×T) وكما يتضح من الجدول (7) تفوق المعاملة (S1T4 ) إذ اعطت أعلى متوسط لكثافة ضوئية 1.17 متفوقة بذلك على باقي المعاملات، في حين سجل أقل متوسط عند معاملة التداخل (S6T7) والذي بلغ 0.13 ويبدو من هذه النتائج ان مستوى الملوحة 8.54 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ (S6) لم يكن ملائما لنمو هذه العزلات ويمكن أعتباره مثبطا لنمو الخلايا البكتيرية بسبب عدم قدرة خلايا هذه العزلات على تحمل هذا المستوى الملحي لمدة أطول.

جدول 7: التداخل بين مستويات الملوحة ومدد التحضين المدروسة

| مستويات الملوحة (S) | مدد التحضين (T) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |
| S1 | 0.41 | 0.62 | 0.90 | 1.17 | 1.10 | 0.89 | 0.59 |
| S2 | 0.47 | 0.58 | 0.79 | 0.96 | 0.99 | 0.81 | 0.61 |
| S3 | 0.44 | 0.61 | 0.74 | 0.73 | 0.97 | 0.82 | 0.68 |
| S4 | 0.48 | 0.67 | 0.88 | 1.03 | 1.04 | 0.81 | 0.72 |
| S5 | 0.24 | 0.31 | 0.34 | 0.42 | 0.42 | 0.39 | 0.31 |
| S6 | 0.16 | 0.20 | 0.30 | 0.31 | 0.29 | 0.21 | 0.13 |

0.0109 = LSD.0.05 for S x T

اما تأثير التداخل بين العزلات البكتيرية ومدد التحضين (VxT) فقد أظهرت النتائج في الجدول (8) ان أفضل وقت تحضين للعزلة Ra كان بعد 5 أيام (T5)، إذ بلغ المتوسط 1.10. في حين أقل متوسط للكثافة الضوئية لوحظ عند العزلة Ab بعد يوم واحد من التحضين (T1)، إذ بلغ متوسط الكثافة الضوئية لها 0.26، وهذا يتفق مع مالاحظه الساعدي (2) بأن أعداد الخلايا لبكترية لرايزوبيا ***Bradyrhizobium*** قد أزدادت عند التلقيح بالسلالة M10 بعد يوم من التحضين مقارنة بالزمن 0 (بداية التجربة)، وأشار الى ان السبب في ذلك يعود الى ان الزيادة في أعداد الخلايا بعد مرور 24 ساعة أكثر من ثلاثة أضعاف أعدادها عند بداية التجربة وهذا يعود الى ان البكتريا بعد فترة التطبع الفسيولوجي (Adaptation phase) في الوسط الزرعي تبدأ أحجام خلاياها بالزيادة نتيجة أنقسام هذه الخلايا ودخول المزرعة البكتيرية مرحلة النمو السريع (4). كذلك أشار الأمين (1) الى ان أضافة اللقاح البكتيري قد سبب زيادة في أعداد بكتريا الرايزوبيا وان أعلى كثافة للبكتريا $8\times41^{10}$ وحدة تكوين مستعمرة/مل بيئة سائلة قد سجلت بعد مرور خمسة أيام على التحضين مع تفوق العزلة المحلية على المستوردة في أعداد الخلايا الحية.

أظهرت نتائج التحليل الأحصائي وكمامبين في الجدول (5) وجود تأثير معنوي للتداخل بين عوامل الدراسة الثلاثة وهي مستويات الملوحة والتلقيح البكتيري ومدد التحضين (S×V×T) في كثافة أعداد البكتريا العقدية إذ ان أعلى كثافة ضوئية (1.66) لوحظت عند المعاملة (S1RaT4). اما أقل متوسط للكثافة الضوئية (**Optical density**) قد لوحظ عند المعاملة (S6M10T1) بلغت 0.02، في حين أقل كثافة للعزلات المحلية عند المستوى نفسه من الملوحة ومدة التحضين وجدت عند التلقيح بالعزلة Hl، إذ بلغت 0.10. ويمكن تفسير ذلك لدور آيونات

الصوديوم والكلور الموجودة في مياه المبزل جدول (3) في التأثير المباشر في المادة الاساس لأنتاج DNA النواة والأنزيمات المسؤولة عن هذه العملية والعمليات التي تعقبها او تحوير هذه المادة ممايؤدي الى عدم نجاح عملية تكاثر الرايزوبيا في الظروف الأعلى من الحد الحرج لتحمل البكتريا،كما ان لآيونات الصوديوم والكلور تأثير ازموزي عالٍ يؤدي الى انفجار الخلايا في مديات معينة وحسب نوع الخلية وأمكانية تكيفها (9).

جدول 8: التداخل بين العزلات المدروسة ومدد التحضين

| العزلات البكتيرية(V) | مدد التحضين (T) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |
| M10 | 0.32 | 0.39 | 0.53 | 0.61 | 0.59 | 0.49 | 0.37 |
| Ra | 0.59 | 0.70 | 0.87 | 1.03 | 1.10 | 0.77 | 0.65 |
| Sk | 0.39 | 0.54 | 0.73 | 0.87 | 0.82 | 0.68 | 0.51 |
| Kh | 0.49 | 0.59 | 0.79 | 0.71 | 0.74 | 0.64 | 0.49 |
| Kr | 0.37 | 0.48 | 0.64 | 0.76 | 0.79 | 0.71 | 0.55 |
| Hl | 0.29 | 0.35 | 0.54 | 0.64 | 0.68 | 0.55 | 0.37 |
| Ab | 0.26 | 0.42 | 0.56 | 0.85 | 0.91 | 0.77 | 0.60 |

.0.0188= LSD.0.05 for V x T

## المصادر


1- الأمين، صادق صاحب هادي (1999). تأثير محتوى التربة من الطين في نشاط بكتريا اللقاح العقدية. رسالة ماجستير–كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

2- الساعدي، علي سعدون فاضل (2001). تأثير إضافة الفسفور والحديد على نشاط بكتريا العقد الجذرية ونمو وحاصل الماش. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

3- حسن، علاء عيدان (2004). تأثير الملوحة في كفاءة (*Brady rhizobium* ssp.) في نبات الماش. أطروحة دكتوراه– كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

4- عبد الرضا، حسن علي (1997). تأثير الحديد والمولبدنيوم في كفاءة بكتريا الرايزوبيا وفي نمو وحاصل فول الصويا. أطروحة دكتوراه–كلية الزراعة – جامعة بغداد، العراق.

5- **Beck, D.P.; L.A. Materon and F. Afandi (1993). Practical Rhizobium Legume technology manual. Technical manual. (9). ICARDA.**

6- **Bouhmuch, I.; F. Brhada; A. Maltouf and J. Aurag (2005). Selection of osmotolerant and effective strains of Rhizobiaceae for inoculation of common bean (*Phasedus vulgaris*) in Moroccan saline soils. Agronomie, 21:591- 599.**

7- **Brhada, F.; M.C. Poggi; G.V. Sype and dulier (2001). Osmoprot- ection michanism in rhizobia isolated from Vicia faba var.major and cicerarietinum. Agonomie, 21:583-590.**

8- **Chittoni, N.E. and M.A. Bueno (1995). Peanut rhizobia under salt stress role of trehalose accumulation in strain ATCC 51 466- Can. J. Microbial, 41:1021-1030.**

9- **Daranelli, M.; M. Woelke; P. Gonzales; M. Bueno and N. Chitton, (1997). The effects of nonionic hyperosmolarity of high temperature oncell associated molecular weight saccharides from two peanut rhizobia strain– symbiosis. 23:73-84.**

10- **Fayez, M., M.E. Hassan; N.M. Ghalab and M.T. Zahra (1998). Survival of *Brady rhizobium japanicum* as effected by soil texture and NaCl concentration .Egyption J. Microbiol.25(1):63- 75.**

11- **Graig, G.F.A.; C.A. Tkines and D.T. Bell (1998). Effect of salinity on growth of four strains Rhizobium. There infectivity effectiveness on two species of Acacia plant soils.133:253 -262.**

12- **Lai, B. and S. Khanna (1994). Select of salt tolerant Rhizobium isolates of Acacia nilotica. World J. Microbial 10:637 -639.**

13- **Lloret, J., L. Bolamos; M.M. Lucas; J.M. Peart; N.J. Brewin; I. Bonilla and Rivilla (1995). Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a Rhizobium meliloti.**

Iraqi J. Agric. Vol.15 No.2 pp.1–9 Oct./2010

14- Mashhady, A.S.S.; S.H. Alem; F.N. Barakah; A.M. Hieggo (1998). Effect of salinity of on survival and symbiotic performance between *Rhizobium meliloti* and *Medicago sativa* L. in Saudi Arabian Soils. Arid Soil Research and Rehabilitation, 12:3-14.
15- Mohammed, R.M.; M.A. Khavan; W.F. Camphell; M.D. Rumbagh (1991). Identification of salt and drought tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. Plant and soil., 134:271-276.
16- Rafiq, S. (2002). Effects of different salt concentrations on the growth of Rhizobium Seated from Internet. strain. Appl. Environm. Microbial. 61(10) :3701-3704
17- Steel, R.G. and J.H. Torri (1980). Principles and procedures of statistics. MC. Graw. Hill, New York.
18- Zurayk, R.; M. Aldan; R. Baalbaki and M.C. Saxena (1998). Interactive effects of salinity and biological nitrogen fixation on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth .J. of Agro. And Crops Sci., 180(4)249-258.

# EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF SALINITY ON NUMBER AND ACTIVITY OF SOME LOCAL AND FOREIGN STRAINS OF MUNGBEAN RHIZOBIUM

A.H. Al-Bayate* A.N. Yosief** E.K. Al-Qaisi***

## ABSTRACT

Factorial experiment was conducted with complete randomized experiment with three replicates to evaluate the response of six local strains of *Rhizobium leguminosarum* specialized on Mungbean *Vigna radiate* L. which are isolated from plants cultured at different locations at Baghdad and Al-Anbar governorates, (Abu-Graib, Khan dariy, Al-Radwaney, Al-Karma, Al-Saqlawiya and Al-Halabsi. Ab, Kh, Ra, Kr, Sk and Hl ) respectively, in addition to an imported strain M10 to evaluate their growth in yeast extract -mannitol broth containing different levels of salinity (1.05, 2.75, 4.05 , 5.97, 6.85 and 8.54 dS.m-1) prepared by using drainage water with salinity (EC) of 16 $dS.m^{-1}$after inoculation with the corresponding rhizobial cultures. The flaks inoculated in a rotary shaker at 28C° for seven days. Every 24 hours each flask was especially sampled and used for measuring rhizobial growth (optical density) by using a spectrophotometer at wave length 540 nm. The results of experiment indicated that increasing salinity level of the YEM broth from 1.05 to 8.54 $dS.m^{-1}$ caused in more than 70% decrease in rhizobial population density. The highest mean (optical density) reading 0.82 was recorded with isolate Ra. While the lowest 0.47 was found with strain M10.Generally all examined rhizobial cultures, showed the highest growth after 5 days of incubation, the highest optical density reading 1.66 was recorded after 4 days with isolate Ra under the salinitylevel of 1.05 $dS.m^{-1}$.

* Collage of Agric. -Anbar Univ.- Anbar, Iraq.
** State Board of Agric. Res.- Ministry of Agric. - Baghdad, Iraq.
*** Technical Institution – Baghdad, , Iraq.