تأثير الملوحة في نمو و بعض صفات *Bradyrhizobium japonicum*

ادهام علي العسافي و ياس خضير حمزة و دينا ثامر حمودي
كلية الزراعة جامعة الانبار

الخلاصة

تعد العلاقة بين بكتريا العقد الجذرية والعائل البقولي من العلاقات المعقدة ويمكن تحديدها بعوامل عدة يؤثر كل منها على فعالية العزلة بتثبيت النتروجين، اجريت محاولة لعزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لنبات فول الصويا من حقول مختلفة في محافظتي الانبار وبغداد، فحصت العزلات وشخصت البكتريا وكشف عن العزلات المتحملة للملوحة باستعمال تقنية الطـبق متدرج التركـيز من ملح كلوريد الصوديوم، ثم عرضت لتراكيز ملحية مختلفة ومتدرجة خلال مدة التنمية. ، واختبرت قدرتها على اذابة مركبات الفوسفات وفحص بعض مكونات الخلية قبل وبعد التطبع للملوحة، كما فحصت قدرة العزلات تكوين العقد الجذرية لنبات فول الصويا.أظهرت النتائج الحصول على 15 عزلة تعود *B. japonicum* انتخب منها العزلات التي اعطيت الرموز المحلية Kd2 وKr3 وKr2 التي نمت بكثافة ++ عند بتركيز NaCl بين (3-5)% مع تغيير لون المستعمرات الى اللون البني المصفر. واظهرت العزلتان Kd2 و Kr2 افضل تحمل للتراكيز الملحية المتدرجة وذات قدرة للتطبع مع زيادة التركيز الملحي تتدرج من 2.05 الى 4.43 و 3.08 الى 6.71 ديسي سيمنز.م$^{-1}$. ادت عملية التطبيع للعزلات الى زيادة نسبة البروتين الخام في خلايا العزلتين Kd2A وKr2A بعد التطبع بنسبة 6.9% و 7.84% مع انخفاض في وزن الكتلة الحية 12.4% و 9.9%، وزيادة في نسبة المادة النووية DNA للعزلتين بنسبة تراوحت (3.35-3.82)% مع انخفاض المادة النووية للبلازميدات بنسبة 27.9% و42.22% للعزلتين Kd2 وKr2 على التوالى.واظهرت العزلة Kd2 تفوق معنوي في اذابة مركبات الفوسفات تحت وجود تراكيز من الفوسفور الذائب وبنسبة اذابة 96.8% ،و اظهرت العزلتان Kd2A وKr2A قدرة على تكوين العقد الجذرية مع جذور نبات فول الصويا تحت الظروف الملحية 4.86 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ بمعدل 18 و16 عقدة منها 14 و13 عقدة فعالة للعزلتين على التوالي.

The effect of salinity on growth and some character of *Bradyrhizobium japonicum*

. I. A. Assaffii , Asst.prof. Y. A. Hamzia ,.T.Hamoodia
Coll. Agric.,UNV.Anbar

Abstract

The relationship between root nodulation bacteria and legume host is complicated and usually determined by several factors each one effect on isola ability to fixate nitrogen , thus an attempt to isolate rhizobium bacteria from soybean plant roots from different field in Baghdad and Anbar governorates was carried out and identified as *Bradyrhizobium japonicum*. These isolates were tasted for salinity tolerance, ability to symbiosis with rhizosphere organisms was examined, ability to dissolve phosphate compounds, making nodules on soybean roots and all changes occurred on same cell components before and after adaptation to salinity were recorded,

Results showed the following :15 isolates belong to *B. japonicum* were obtained .Isolates Kd2, Kr3, Kr2 showed there intensive ability of growth (++) at salt concentration of NaCl (3-5)% with change in color of colonies to yellowish brawon.Isolates Kd2 and Kr2 showed the highest ability of tolerance to gradual salt concentration tendency for adaptation with salt concentration 2.05, 3.24, 6.71 ds/m respectively.The process of Isolates adaptation increase crud protein ratio in isolates cell by 6.9% and 7.84% , decrease biomass 12.4% and 9.9% , increase DNA ratio by (3.82-3.35)% with decries plasmids nuclear by 27.9% and 42.22% for Kd2 and Kr2 respectively.Isola Kd2 showed significantly in superiority in dissolving phosphate compounds in existence of concentration of soluble phosphor by dissolving ratio 96.8%.Isolates Kd2A and Kr2A showed ability to form root nodules with soybean roots under salinity conditions of 4.86 ds/m with rates 18 and 16 nodules among them 14 and 13 nodules of active nodules for both isolates respectively.

المقدمة

تعاني اغلب الترب العراقية من ارتفاع الملوحة وقلة المادة العضوية التي تؤدي الى قلة الكثافة الاحيائية لبعض الاجناس مثل البكتريا المتخصصة على فول الصويا، اذ ان عتبة الملوحة لمحصول فول الصويا هي 4 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ (1) ، ويتوقع تحت ظروف ملحية بمستوى 4 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ او اعلى ان تخلو التربة من بكتريا *Bradyrhizobium japonicum*، وان اللقاح المضاف لا يبقى في التربة بكثافة عالية الا لمدة (2-3) مواسم باعتبار ان الظروف ملائمة لبقاءها. وكثافة اللقاح التي يستجاب لها نبات فول الصويا 9.0 log cfu/ml واقل استجابة عند 5.0 Log cfu/ml (2). وتؤثر الامـلاح فـي تكـوين العقـد الجذرية لانها تثبط فعالية الانزيمات المكونة للمواد المحفزة لاصابة الجذور بالبكتريا، كمـا يـؤثر الاجهـاد الملحي في نمو وكفاءة بكتريا الرايزوبيا(3). كما ان التأثيرات السلبية للاملاح في الاحياء المجهرية قد تعزى الى تأثير ايونات الاملاح والضغط الازموزي مما يؤثر على فسلجة الخلية والمسارات الايضـية فيـه(4) . واشارة لدراسة قام به(5) عن تأثيرالملوحة على تكون العقد الجذرية وتثبيت النتروجين تبين ان الملوحـة لا تؤثر على مستعمرات الرايزوبيا داخل الجذور التي نمت مبكرا في ظروف غير ملحية ثم نقلت الى ظـروف ملحية ولكنها قللت من كفاءة العقد الموجودة ومنعت تكون عقد جديدة على جذور النبات. ولاهمية محصـول فول الصويا اقتصاديا كمحصول زيتي تصل نسبة الزيت في بذوره الى (18-24)% وبروتين بحدود 45 % جاءت الحاجة للبحث عن اساليب جديدة لادخال بكتريا *B. japonicum* المتخصصة عليه ضـمن ظـروف محيطه الجذري وبكثافة كافية لاحداث الاصابة.لذا جاءت دراستنا بهدف عزل وتشخيص البكتريا المتخصصة على فول الصويا *Bradyrhizobium japonicum* من ترب سـبق ان زرع فيهـا نبـات فـول الصـويا واستعملت فيها اللقاحات الحيوية. وتنمية العزلات وتطبيعها على اوساط ملحية واختبار العزلـة الكفـؤة فـي تحمل الملوحة العالية وفحص قدرتها على اقامة علاقة تعايشية مع النبات.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

اختيرت ثمانية مناطق مزروعة بمحصول فول الصويا ستة منها ضمن محافظة الانبار وهي الكرمة والصقلاوية والرمادي والعامرية والخالدية والجزيرة، واثنان ضمن محافظة بغداد، ابو غريـب والرضـوانية وذلك لعزل البكتريا العقدية المتخصصة على نبات فول الصويا، تم اختيار عشر نباتات لفول الصـويا ناميـة بشكل جيد وبعمر (35-50) يوم لكل منطقة (عدد العينات 80 عينة)، رطبت التربة حول النباتات قبل قلعها لتقليل التاثيرات الميكانيكية على الجذور بعدها ازيلت التربة المحيطة بالمجموع الجذري، بتعريضها لتيار ماء معتدل لتسهيل عملية فصل العقد الجذرية ونقلت العينات من الجذور الحاوية على العقد الجذرية الى المختبـر لغرض عزل بكتريا الرايزوبيا. واتبعت الطريقة الموصوفة من (6) في عزل البكتريا مـن العقـد الجذريـة وحفظت المزارع البكتيرية في الثلاجة لحين استعمالها في التجارب اللاحقة، وتم الحصول علـى 15 عزلـة اعطيت الرموز Ga1 وRa1 و Ra2 وKd1 و Kd2 وSg1 و Am2 و Kr3 و Kr2 وKr1 و Rt3 و Rt2 و Rt1 و Ab2 و Ab1.اجريت بعض الاختبارات للتاكد من ان العزلات تعود الى الجـنس Rhizobium وحسب ما ورد في (6) وتضمنت الاختبارات اختبار ملون كرام وفحص دليل البروموثايمول الازرق.

اختبار قدرة بكتريا الرايزوبيا على تحمل الملوحة

حضر وسط YEMA بتركيز 10% NaCl وضبط الرقم الهيدروجيني للوسـط علـى 7 وصـب بمعدل 12 ملليتر.طبق$^{-1}$ وترك ليتصلب بشكل مائل، ثم اكمل حجم الوسط في الطبق الـى 24 ملليتـر مـن الوسط YEMA الاعتيادي لتحضير طبق متدرج التركيز وترك ليتصلب(7) بعدها نقلت البكتريا بوساطة ابرة الزرع الى اطباق YEMA الصلب، وزرعت بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق على درجة حـرارة 28 ± 2 م لمدة (3-5) ايام، بعدها اجري الكشف عن نمو بكتريا الرايزوبيا، اذ عدت مستعمرات البكتريا النامية في التراكيز الملحية العالية بانها متحملة للملوحة(8) .

تطبيع العزلات على تحمل التركيز الملحي المتدرج

استعمل مستخلص التربة الرملية مزيجية 7.33 دي سيمنز\م في تحضير الوسط متـدرج التركيـز الملحي واستعملت العزلات التي تمكنت من النمو ++ بتركيز(3-5)% NaCl في التجربة السابقة وهـي Kd1 وKd2 وKr2 وKr3 وAb1. وزعت الاوساط المحضرة بتراكيز ملحية مختلفة (جدول1) فـي دوارق مخروطية الشكل سعة 250 مل وبمعدل 150 مل . دورق$^{-1}$ وعقمت بالموصدة على درجة حـرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة.

جدول (4) تحضير معاملات بتراكيز ملحية مختلفة ومتدرجة اثناء الحضن

EC ديسي سيمنز. م $^{-1}$ للوسط / ساعة			حجم وسط YEM/مل	حجم مستخلص التربة المضاف للوسط / ساعة		المعاملة
72	48	24		48	24	
1.26	1.15	1.05	150	0.0	0.0	**T1**
4.22	4.21	4.05	112	0.0	38.0	**T2**
4.43	4.40	2.05	112	19.0	19.0	**T3**
6.89	6.87	6.85	80	0.0	70.0	**T4**
6.71	**6.68**	**3.08**	**80**	**35.0**	**35.0**	**T5**

لقحت الاوساط الزرعية بالعزلات البكتيرية المستعملة بمعـدل 2 مـل لكـل دورق (6 Log cfu/ml) ليصل العدد البكتيري الاولي في الوسط 3.03 Log cfu/ml وحضرت المعاملات بواقع 3 مكررات لكـل معاملة وحضنت في حاضنة هزازة (100 دورة . دقيقة$^{-1}$) على درجة 28 ± 2 م لمدة 72 ساعة، تم خلالها قياس كثافة النمو يوميا باستعمال طريقة الكثافة الضوئية(6).

تقدير الاحماض النووية وبعض مكونات خلايا العزلات قبل وبعد التطبيع

اجريت التجربة في مختبرات معهد الهندسة الوراثية في جامعة بغداد حيث :

نميت العزلتين Kd2 وKr2 قبل وبعد التطبيع في وسـ ـط لوريا السائل Luria-Bertani medium (9) وقدرت الاحماض النووية حسب طريقة (10) وتم تحييد البلازميدات في الخلايا للعزلات البكتيرية المنتخبة قبل وبعد التطبيع باستعمال حامـ ـض السالسليك (11) وعد الفـرق فـي المـادة النوويـة هـو DNA البلازميدي. كما استعملت طريقة(12) لتقدير البروتين الخام في الكتلة الحيوية المجففة.

اختبار قدرة العزلات على تحمل تراكيز ايونية للفوسفات

وزع وسط بيكوفسكايا السائل بمعدل 30 مللتر في دوارق مخروطية حجم 100 مللتر جهز بكميـة من $Ca_3(PO_4)_2$(تحتوي 40 ملغرام P . لتر$^{-1}$) مع تجهيز الدوارق بكميات مختلفة من KH_2PO_4 بتراكيز 0 و8 و16 و24 و32، ملغم P . لتر$^{-1}$، عقم الوسط وضبط الرقم الهيدروجيني على 7 ثم لقح مـن عزلتـي الاختبار Kd2 و Kr2 قبل وبعد التطبيع بمعدل 6.0 Log cfu/ml مع ترك معاملة سيطرة وبثلاثة مكررات لكل معاملة (13). حضنت جميع المعاملات في درجة حرارة 28 ± 2 م لمدة 4 يوم بعد ذلك رسب المتبقـي من مركب$Ca_3(PO_4)_2$ غير الذائب في الوسط بالطرد المركزي (300 دورة.دقيقة$^{-1}$) لمدة 15 دقيقة جفـف الراسب بدرجة حرارة 105 م لمدة 20 دقيقة، ثم اذيب الراسب بحامض الكبريتيك H_2SO_4 لمدة 18 سـاعة ورشح المحلول واخذ 2 مل من الراشح ونقل الى 100 مل ماء مقطر وقدر فيه الفسفور باسـتعمال طريقـة المطياف الضوئي الموصوفة من قبل(14) ، وقدر نشاط العزلات باذابة الفسفور من احتساب الفرق في كميـة الفسفور غير الذائب المتبقي في $Ca_3(PO_4)_2$.

اختبار قابلية العزلات على التعايش مع احياء مستخلص التربة

حضر وسط من مستخلص تربة رملية مزيجة 7.33 دي سيمنز\م ، بهدف اختبار قـدرة العـزلات المنتخبة من التجربة السابقة في النمو في منطقة الرايزوسفير والتعايش مع احياءها، جهز الوسط بمقدار 5 غم كلوكوز.لتر$^{-1}$ ثم وزع بمعدل 15 مل في انابيب اختبار، عقمت بالموصدة ثم لقحت الانابيب من لقاح العزلتين Kr2 وKd2 قبل وبعد التطبيع لتصل كثافة الوسط الميكروبية 3 Log cfu/ml، كما لقحت انابيـب اخـرى تحتوي نفس الوسط بلقاح مزدوج من لقاح العزلتين Kr2 وKd2 قبل وبعد التطبيع بكثافـة 3 Log cfu/ml مع لقاح من مستخلص التربة بكثافة 3 Log cfu/ml للوسط، وحضنت في درجة حرارة 28 ± 2 م وبسرعة رج 100 درجة.دقيقة$^{-1}$ لمدة 72 ساعة ثم حسبت الكثافة المكروبية الكلية بدلالة الكثافـة الضـوئية، وكثافـة عزلات الرايزوبيا المثبتة للنتروجين باستعمال وسط YEMA اذ عدت المسـتعمرات الناميـة علـى وسـط YEMA والتي لم تأخذ الصبغة الحمراء او التي ظهرت بلون باهت بأنها مستعمرات رايزوبيا والمستعمرات الاخرى هي بكتريا مثبتة للنتروجين بصورة حرة بطريقة التخفيف وصب الاطباق.

قابلية العزلات على تكوين عقد جذرية لنبات فول الصويا تحت ظروف ملحية

نفذت تجربة مختبرية باستعمال اصص بلاستيكية وضع في كل منها 1.0 كغم مـن تربـة رمليـة مزيجة 7.33 ديسي سيمنز . م$^{-1}$ غسلت التربة بالماء المقطر للحصول على ايصالية كهربائيـة EC 3.65 و4.86 ديسي سيمنز . م$^{-1}$ عقمت التربة بالموصدة على درجة 121 م لمدة 30 دقيقة و لثلاثة ايام متتالية، ثم عقم السطح الخارجي لكمية من بذور فول الصويا حسب طريقة (6)،وزرعت البذور على اطباق، ثم اضيف لها لقاح بعمر 48 ساعة من العزلتين Kd2 وKr2 قبل وبعد التطبيع بمعدل Logcfu/ml 6.0 مـع اضـافة محلول سكري 20% لزيادة لزوجة الخلايا البكتيرية على سطح البذور، ورجت البذور جيدا لتمتزج مع اللقاح ثم نقلت الى التربة في الاصص بمعدل 8 بذرة.اصيص$^{-1}$ مع ترك معاملة سيطرة بدون لقاح، رطبت التربـة بالماء المعقم للحصول على 50% من السعة الحقلية ووضعت الاصص في ظلة خشـبية، تـم ري النباتـات بالماء المعقم بالطريقة الوزنية عند استهلاك 50% من الماء الجاهز وحسبت نسبة وسرعة الانبات ثم خفـت النباتات بعد 10 يوم الى 1 بادرة.اصيص$^{-1}$. استمرت التجربة لمدة 35 يوم، ثم رطبت التربة وقلعت النباتات مع مجموعها الجذري وحسبت عدد العقد الجذرية الكلية والفعالة.

التحليلات الكيميائية و القياسات

قدرت الصفات الاتية حسب ما ورد في (14) وشملت :النسـبة المئويـة لحجـوم دقـائق التربـة والايصالية الكهربائية للتربة والاوساط والنتروجين الكلي والفسفور الجاهز والذائب ،اجري التحليل الاحصائي باستعمال قيمة اقل فرق معنوي بين المتوسطات L.S.D عند مسـتوى معنويـة 0.05 باسـتعمال برنـامج Genstat 332.

النتائج والمناقشة

تواجد وانتشار بكتريا الرايزوبيا في العينات

اظهرت نتائج فحص العينات التي جمعت من ثمان مناطق تقع اثنان منها في محافظة بغداد وستة في محافظة الانبار لعزل بكتريا الرايزوبيا من جذور نبات فول الصويا ،ان بكتريا الرايزوبيا تواجدت واصـابت جذور النبات بنسبة 18.61% حيث حصل على15 عزلة من العينات وتباينت نسب الاصابة حسب المنـاطق اذ بلغت الاصابة نسبة 30 % في حقول منطقتي الرضوانية والكرمة تلتها نسبة اصابة 20 % في كل مـن حقول ابو غريب والخالدية والرمادي بينما بلغت 10 % لكل الحقـول الاخـرى (جدول2). وقد اوضحت النتائج ان تواجد وانتشار العزلات ارتبط مع استعمال اللقاح الرايزوبي في الحقل قبل سنتين او ثلاثة او مـع زراعة الحقل بمحصول فول الصويا قبل عام (جدول1). ان عملية استعمال اللقاحات البكتيرية ذات تأثير على تواجدها واحداث الاصابة في جذور النباتات، كذلك ادت زراعة الحقل بالنبات العائل لسنوات سابقة ادت الى تواجد بكتريا الرايزوبيا في التربة والتي سببت اصابة للمحصول في السنة اللاحقة بنسبة 10%، وتؤكد هـذه النتائج على ضرورة استعمال اللقاح الرايزوبي عند زراعة محصول فول الصويا في الحقـل بعـد دورتـين زراعية على الاقل لضمان تواجد البكتريا بكثافة تمكنها من اصابة جذور المحصول الجديد وتكـوين العقـد الجذرية وهذا يتفق مع ما ذكر في (1).

جدول (2) الصفات الكيميائية و الفيزيائية و الدورة الزراعية لمناطق جمع العينات

المنطقة	الرمز	عدد العزلات	EC ديسي سيمنز.م $^{-1}$	النسجة	الدورة الزراعية
ابو غريب	Ab	2	3.15	طينية مزيجة	بور-بصل- فول الصويا
الرضوانية	Rt	3	3.65	مزيجية	بور-بطاطا- فول الصويا
الكرمة	Kr	3	3.61	مزيجية	ذرة – بور – فول الصويا
العامرية	Am	1	3.82	مزيجية رملية	فول الصويا – بور – فول الصويا
الصقلاوية	Sg	1	3.68	رملية مزيجية	فول الصويا – بور – فول الصويا
الخالدية	Kd	2	3.25	طينية مزيجية	جت – جت – فول الصويا
الرمادي	Rm	2	3.81	مزيجية	خضر – بور – فول الصويا
الجزيرة	Ga	1	3.61	طينية	فول الصويا –خس – فول الصويا

واظهرت الفحوصات الميكروبية التي اجريت ان جميع العزلات سالبة لملون كرام وغيرت لون الوسط YEMA مع دليل البروموثايمول من الازرق المخضر الى اللون الاصفر جدول ، وتراوح لون المستعمرات بين الحليبي والحليبي المصفر والتبني، وقد يعود هذا التباين في اللون الى الصفات التي تمتلكها العزلات، كما وجدت المستعمرات بمظهر شفاف وبعض الخلايا كانت بلون وردي باهت وهذا دليلا على ان العزلات تعود لجنس بكتريا *Rhizobium* العقدية كما جاء في(6).

تحمل عزلات الرايزوبيا للملوحة

اظهرت جميع عزلات الرايزوبيا قدرتهاعلى النموَ(+++) في الوسط عند تركيز تراوح بين (1-2) % NaCl (جدول 3)، اما عند تركيز (2-3) % حافظت العزلات Ab1 وAb2 وKr2 وKr3 وKd1 وKd2 على مستوى نمو بكثافة (+++) NaCl، اما العزلات Rt1 وRt3 وKr1 وAm2 كان نموها اقل كثافة وبمستوى (++)، الا ان العزلات Rt2 و Ra2 و Sg1 Ra1 و Ga1 كان نموها بكثافة قليلة (+). وابدت العزلات Kr2 وKr3 وKd1 اكثر تحملا لزيادة التركيز(3-5) % الملحي ونمت (++). ومما تجدر الاشارة اليه ان المستعمرات التي حافظت على كثافة نمو متوسطة (++) بعد زيادة التركيز الملحي اظهرت تغيراً في لون مستعمراتها وقوامها اصبح اكثر لزوجة وتغير لون المستعمرات Ab1 و Ab2 وKr1 من اللون الحليبي الى اللون التبني المصفر، وهذه التغيرات التي تطرأ على الصفات المظهرية للبكتريا تكون نتيجة للتغيرات في الغشاء الخلوي وانتاجها للصبغات وزيادة البروتين الخام والمواد التي تقوم الخلية بافرازها والاليات التي تعمل من خلالها البكتريا على حماية خلاياها تحت الظروف المتطرفة، وبرهن ذلك من خلال نتائج فحوصات الخلايا من زيادة نسبة البروتين الخام والمادة النووية بعد تطبيعها للنمو في التراكيز الملحية (15).

جدول (3) قدرة تحمل عزلات الرايزوبيا للملوحة

NaCl%	حالة النمو			
	- لا يوجد	+ قليل	++ متوسط	+++ عالي
2-3	--	Rt2, Sg1, Ra1, Ra2, Ga1 (5)	Rt1, Rt3, Kr1, Am2, (4)	Ab1, Ab2, Kr2, Kr3, Kd1, Kd2(6)
3-5	Rt2,Rt3, Am2, Sg1, Ra1, Ra2, Ga1(6)	Ab1,Ab2, Rt1, Kr1, Kd1(5)	Kr2, Kr3, Kd2(3)	--

تأثير التركيز الملحي المتدرج على الكثافة الميكروبية

يتضح من الجدول 4 انخفاض عدد الخلايا للعزلات مع زيادة تركيز **NaCl** وقل عدد الخلايـا جدا مع زيادة تركيز **NaCl** ،وتحققت أفضل معدلات للنمو5.03 - 5.05 Log cfu/ml في المعاملـة T1 (1.05-1.26 ديسي سيمنز. م$^{-1}$) بعد 24 ساعة ، وازدادت كثافة الخلايا بعد 48 سـاعة بنسـبة (6.05 - 6.45 Log cfu/ml في حـين بلغـت الكثافـة 6.88 - 7.20 Log cfu/ml بعـد 72 سـاعة وتميـزت العزلتين Ab1 وKr2 بأعلى معدلات للنمو (7.2 و 7.08) Log cfu/ml على التوالي ، وعنـد تعـريض العزلات للمعاملة T2 (4.05-4.22 ديسي سيمنز. م$^{-1}$) وصلت كثافة الخلايا للعزلات في الوسـط بعـد 24 ساعة حضن الى 3.65 - 4.36 Log cfu/ml إذ حققت العزلتين Kd وKd2 اعلى معدلات نمـو معنويـة بلغت 4.36 و4.22Log cfu/ml . الا ان الامر تغير في المعاملة T3 (2.05 -4.43) ديسي سيمنز. م$^{-1}$ حيث ازداد عدد الخلايا في الوسط بعد 24 ساعة حضن ليصل 4.04 – 4.19 Log cfu/ml وازداد بعد 72 ساعة ليصل 5.10 و 5.94 Log cfu/ml أما عند استعمال المعاملة T4 (6.85-8.82 ديسي سيمنز. م$^{-1}$) فقد سجلت جميع العزلات ادنى معدل كثافة لها ليصل بعد 24 ساعة حضن 3.26 و3.42 Log cfu/ml .

جدول (4) الكثافة البكتيرية للعزلات النامية في التراكيز الملحية المتدرجة Log cfu/ml

المعاملة	EC ديسي سيمنز/م^{2}	مدة الحضن ساعة	Ab1	Kr2	Kr3	Kd1	Kd2
T1	1.05	24	5.03	5.05	5.05	5.05	5.03
	1.15	48	6.43	6.45	6.13	6.05	6.10
	1.26	72	7.20	7.08	6.89	6.88	6.92
T2	4.05	24	3.65	3.81	3.70	4.36	4.22
	4.04	48	4.15	4.36	4.60	5.10	4.96
	4.22	72	4.91	4.96	4.65	5.13	5.01
T3	2.05	24	4.04	4.05	4.19	4.16	4.12
	4.40	48	4.53	5.05	4.95	5.03	5.09
	4.43	72	5.10	5.89	5.18	5.90	5.94
T4	6.85	24	3.26	3.31	3.16	3.41	3.42
	6.87	48	3.85	3.86	3.66	3.91	3.95
	6.89	72	3.96	3.99	3.98	4.21	4.20
T5	3.08	24	3.44	3.34	3.59	3.64	3.64
	6.68	48	4.02	3.98	4.66	4.70	4.75
	6.71	72	4.81	5.03	4.91	4.98	5.03

L.S.D (P > 0.05) ، T = 0.310 ، time = 0.420 ، Is = 0.260

كذلك أظهرت العزلات استجابة في قدرتها على زيادة اعدادها في الوسط عند المعاملة T5 (3.08 – 6.71 ديسي سيمنز.م$^{-1}$) يمكن اعتبار زيادة ملوحة الوسط عن المستوى 4.0 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ هو مثـبط لنمو الخلايا بسبب عدم قدرتها على تحمل المستوى الملحي الذي زاد عند 4.0 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ لمدة زمنية اطول. وقد أظهرت العزلات Kd2 وKr2 أفضل معدلات للنمو عند زيادة ملوحة الوسط بشكل تـدريجي في المعاملات T3 وT5. ان هذا التفاوت بين العزلات في قابليتها على النمو والتطبع تحت مستويات ملوحـة مختلفة قد يعزى الى تباين تأقلم العزلات على النمو والتكاثر في ترب متأثرة بالملوحة، وان سبب انخفـاض اعداد الخلايا في الوسط قد يعود لتأثير ايونات الصوديوم والكلور الموجودة في الوسط، والتي اثرت سلبيا في انتاج المادة الأساس لتكوين النيوكلاويتايد الداخل في المادة النووية والإنزيمات المسؤولة عن عملية الانقسـام، مما يؤدي الى عدم نجاح عملية الانقسام والتكاثر عند زيادة التركيز الملحي فوق الحد الحرج لتحملهـا مـن الملوحة ، بدليل ان الخلايا لم تصل الى حالات الانفجار في الوسط واحتفظت بحيويتها عند حساب اعـدادها بعد 72 ساعة. وتباين ذلك حسب قدرة الخلية وامكانية تكييفها للظروف الملحية الجديدة (16).

تأثير تطبيع العزلتين Kd2 و Kr2 للملوحة في بعض مكونات الخلية

أظهرت النتائج المبينة في جدول 5 حصول انخفاض في وزن الكتلة الحية في الوسط للعزلتين بعـد التطبيع، اذ بلغ معدل وزنهما قبل التطبيع 2.22 و 2.21 غم. لتر$^{-1}$ وبعد التطبيع انخفـض ليصـل 1.95 و 1.99 غم .لتر$^{-1}$ على التوالي، بينما وجد زيادة في نسبة البروتين الخام بلغت 6.9% و 7.84 % بعد التطبيع العزلتين للظروف الملحية على التوالي جدول.كذلك حصلت زيادة في نسبة المادة النوويـة الكليـة للعـزلتين Kd2A و Kr2A بنسبة تراوحت (3.65- 3.35)% مقارنة مع نسبتها قبل التطبيع وعند احتسـاب نسـبة حامض DNA تبين وجود زيادة فيها بعد التطبيع وصـلت الـى 1.96 % و1.17% للعـزلتين Kr2A و Kd2A، بينما بلغت الزيادة في نسبة حـامض RNA 4.51 و5.95% للعـزلتين Kr2A و Kd2A علـى التوالي (جدول 5)، بينما وجد انخفاض في نسبة المادة النووية للبلازميدات في الخلايا بعد التطبيـع، والتـي انخفضت بنسبة 27.90% و42.25% للعزلتين Kd2A وKr2A، وتدل هذه النتائج ان خلايا العـزلتين لـم تتمكن من النمو بشكل جيد عند تعرضها للشد الملحي في الوسط وانخفض نموها بنسـبة 9.9% و12.16% للعزلتين Kd2A وKr2A على التوالي.

جدول (5) بعض الصفات المقدرة للاحماض النووية و البروتين للعزلات قبل و بعد التطبيع

L.S.D p>0.05	Kd2A	Kr2A	Kd2	Kr2	الصفة
0.23	1.99	1.95	2.21	2.22	وزن الكتله غم/لتر
2.4	63.20	64.14	58.60	60.00	البروتين الخام %
0.36	6.90	6.81	6.82	6.62	DNA الكلي %
0.45	6.05	6.25	5.71	5.68	% RNA
0.41	12.95	13.06	12.53	12.60	الأحماض النووية الكلية %
0.16	0.62	0.41	0.86	0.71	DNA % البلازميدي

وقد زادت العزلتان من تكوين البروتين الخام في مكوناتها لتقاوم تأثير الشد الملحي ، الامـر الـذي ادى الى خفض المادة النووية البلازميدية المسؤولة عن انتاج انزيم النايتروجنيز المسؤول عن عملية تثبيـت النتروجين من الهواء الجوي ،الذي انخفض بنسبة 42.25% في العزلـة Kr2A و27.90% فـي العزلـة

Kd2A، وهذا يتفق مع ما جاء به(17) Miller (1972) و(18)(Campbell، 1983) اللذان اكدا ان عملية التكيف البكتيري للملوحة اثرت على مكونات الخلية الداخلية نتيجة لتعرضها لظروف مغايرة لبيئاتها الطبيعية.

تأثير تراكيزمختلفة من الفوسفور الذائب في قدرة العزلتين في اذابة مركبات الفسفور

اظهرت العزلة Kd2 تفوقاً معنوياً في قدرتها على اذابة مركبات الفوسفور في الوسط تحت وجـود تراكيز مختلفة من الفسفورالذائب في الوسط وتمكنت من اذابة مركبـات الفوسـفات **$Ca_3(PO_4)_2$** بنسـبة 100% لحد تركيز 16 ملغم P. لتر$^{-1}$ ،وبلغت نسبة الاذابة 95.8% و91.17% عند وجود تركيـز24 و32 ملغم P ذائب. لتر$^{-1}$، بينما وجد ان كفائتها قلت بعد التطبيع على اذابة مركبات الفسفور في الوسط بنسبة اذابة بلغت 64.22% عند تركيز 32 ملغم P ذائب. لتر$^{-1}$، الا انها اذابت اكثر من نصف الكمية لمركبات الفوسفات في الوسط، وبلغت قدرتها على اذابة 78.37% عند تركيز 16 ملغم P ذائب. لتر$^{-1}$ (جدول 6).

بينما اعطت العزلة Kr2 قدرة على الاذابة اقل مقارنة بالعزلة Kd2 قبـل وبعـد التطبيـع باذابـة مركبات الفوسفات، اذ بلغت نسبة الاذابة لها 81.87% و59.62% عند تركيـز 16 و 32 ملغـم P ذائـب. لتر$^{-1}$، في حين انخفظت قدرتها بعد التطبيع لتصل 69.62% و49.509% عنـد تركيـز 16 و32 ملغـم P ذائب. لتر$^{-1}$ وهذا التغير في كفاءة العزلات بعد التطبيع قد يعود الى بعض التغيرات الحاصـلة فـي فعاليـة الخلايا البكتيرية الرايزوبية بعد التطبيع بسبب تغيرات طرأت داخل الخلايا من زيادة تركيز البروتين الخام (جدول5) او تغير في النشاط الانزيمي لمواجهة الظروف المتطرفة وهذا ما اكده (13) حيث توصلا الـى ان بكتريا *Rhizobium* لها القدرة على اذابة مركبات الفوسفات بوجود 25 ملغمP ذائب.لتر$^{-1}$ واذابة اكثر مـن 95.37% من الفوسفور غير الذائب والنمو في تركيز 63 ملغم P ذائب. لتر$^{-1}$.

جدول(6) كمية الفسفور غير الذائب من $Ca_3(PO_4)_2$ في الوسط تحت ظروف التراكيز المختلفة من الفسفور الذائب KH_2PO_4 والعزلات المنتخبة

تركيز P ملغم ذائب.لتر$^{-1}$					العزلات
32	24	16	8	0	
3.53	1.65	0.0	0.0	0.0	**Kd2**
16.15	12.61	7.25	6.35	1.79	**Kr2**
14.31	12.25	8.65	5.32	1.60	**Kd2A**
20.20	16.21	12.15	8.65	2.15	**Kr2A**
40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	**Control**

L.S.D $P > 0.05$ I = 1.95 ، IC = 3.86 ، C = 2. 64

قدرة العزلتين Kd2 وKr2 على النمو مع احياء مستخلص التربة

اظهرت نتائج الكثافة العددية للعزلتين قبل وبعد التطبيع قدرتهما على النمو فـي وسـط مسـتخلص التربة و ان معدل عدد الخلايا للعزلتين بعد التطبع اقل كثافة معنويا مع عددها قبل التطبيع وبلغ 6.99 و6.82 و6.40 و6.38 Log cfu/ml للعزلتين Kd2 وKr2 قبل وبعد التطبيع على التوالي"(جدول7)، وقـد بينـت النتائج عند اضافة لقاح من مستخلص التربة مع لقاح العزلتين Kd2 وKr2 قبل وبعد التطبيـع زيـادة فـي الكثافة المايكروبية الكلية والتي بلغت 8.33 و8.26 و7.85 و7.63 Log cfu/ml على التوالي. /ml .

جدول (7) الكثافة المكروبية للعزلات في وسط مستخلص التربة Log cfu/ml

الكثافة في وسط YEMA		الكثافة في وسط ESA بدلالة الكثافة الضوئية	العزلات	المعاملات
others	Rhizobia			
-	7.18	6.99	Kd2	لقاح العزلتين
-	7.02	6.82	Kr2	
-	6.81	6.40	Kd2A	
-	6.51	6.38	Kr2A	
3.16	6.31	8.33	Kd2	لقاح العزلتين مع لقاح من مستخلص التربة
3.23	6.15	8.26	Kr2	
3.16	5.98	7.85	Kd2A	
3.20	5.25	7.63	Kd2A	

L.S.D (P > 0.05) IS = 0.153 ، Adaptation = 0.261 ، Inoculation = 0.561 ، N fix =N عزلات مثبتة

واظهرت النتائج انخفاض اعداد العزلتين Kd2 وKr2 المحسوبة بطريقة التخفيف وصب الاطباق على وسط YEMA اذ بلغت 6.31 و6.15 و5.98 و5.25 Log cfu/ml قبل وبعد التطبيع، كما اظهرت النتائج تواجد خلايا بعض العزلات المثبتة للنتروجين غير الرايزوبيا وبكثافة مايكروبية تراوحت بين (3.16 -3.23) Log cfu ، وان اضافة مستخلص التربة مع لقاح العزلتين كان تأثيره ايجابيا على الرايزوبيا، اذ ادى الى زيادة كثافة الرايزوبيا ولجميع العزلات في وسط مستخلص التربة، وهذا قد يعود الى ان بعض احياء منطقة الرايزوسفير لها القدرة على افراز بعض المواد المفيدة للرايزوبيا في الوسط كالاستفادة من نواتج تحلل المواد الغذائية المستعملة من انواع اخرى من الاحياء، ، اما عند مقارنة معاملة اللقاح من العزلتين ولقاح المستخلص مع معاملة اللقاح بدون مستخلص المحتوي وسط YEMA نجد ان الكثافة الرايزوبية قد انخفضت بشكل معنوي ولجميع العزلات قبل وبعد التطبيع، وهذا قد يعود الى تنافس الرايزوبيا مع العزلات الاخرى المثبتة للنتروجين (التي ظهرت في الوسط YEMA) على المواد الغذائية والعناصر الظرورية ، وهذا ماكده (16) حيث اشارا الى ان التنافس المايكروبي يكون بالاساس في الحصول على المواد الغذائية خصوصا عندما تكون بكميات محددة.

قدرة العزلتين على تكوين عقد جذرية لنباتات فول الصويا تحت ظروف ملحية

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (8) تميز في نسبة وسرعة الإنبات للمعاملات المنفذة في التربة ذات الملوحة 3.65 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ وتراوحت بين 88% و87% خلال 5 او 6 ايام عدى معاملة السيطرة خلال 8 ايام. وهذا يؤكد ان العزلتين قد ادت الى تحسين نسبة الانبات بنسبة قدرها 15.78% عن معاملة السيطرة، كذلك وجد تباين في نشاط العزلتين قبل وبعد التطبيع انعكس على قدرتهما في إصابة الجذور لنبات فول الصويا وتكوين العقد الجذرية، التي تراوحت بين (19-23) عقدة وبلغت عدد العقد الفعالة منها بين (15-18) عقدة، والتي اختفت في جذور نباتات معاملة السيطرة غير الملقحة (جدول 8) عند مستوى ملحي 3.65 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ في التربة.بينما نجد ان المحتوى الملحي للتربة 4.86 ديسي سيمنز. م$^{-1}$ قد اثر سلبا على نسبة وسرعة الانبات الذي تراوح بين (61% - 54%) خلال 8 و9 ايام للعزلتين Kd2 وKr2، إلا ان العزلتين Kd2A وKr2A حققت نسبة وسرعة انبات بلغت 76% و70% خلال 7 و6 ايام على التوالي (جدول 8)، الامر الذي انعكس على عملية تكوين العقد الجذرية على جذور النباتات، والتي بلغت 15 عقدة مع العزلتين Kd2 وKr2 منها 9 و8 عقد فعالة على التوالي بينما بلغ عدد العقد المتكونة 18 و16 عقدة منها

14 و13 عقدة فعالة مع لقاح العزلتين Kd2A وKr2A، في حين لم تتكون العقد في غياب اضـافة اللقـاح لمعاملة السيطرة.

وتؤكد هذه النتائج التأثير السلبي للملوحة على اصابة الجذور وتكوين العقد الجذرية ووجد ان الامر الهام ليس تكوين العقد الجذرية فحسب بل فعالية هذه العقد، اذ اتضح ان عدد العقد الفعالة للعـزلتين Kd2 و Kr2 قد انخفض بنسبة 50% تحت المستوى الملحي 4.86 ديسي سيمنز. م $^{-1}$ بينما كانت نسـبة الانخفـاض بتكوين العقد الفعالة مع العزلتين Kd2A وKr2A تحت الظروف 4.86 ديسي سيمنز. م $^{-1}$ بنسـبة 12.9% و13.3% على التوالي واعطت تفوق معنوي بتكوين العقد الفعالة على العزلتين غير المطبعة بنسـبة 35.7% و38.4% تحت المستوى الملحي 4.86 ديسي سيمنز. م $^{-1}$، وتؤكد هذه النتائج ان عمليـة تطبـع وتحضـير العزلات المستعملة كلقاحات للظرف البيئي في المختبر ضرورية لإجراء تطبيع للخلايا وجعلها قـادرة علـى تحمل الظروف البيئية في الحقل لتكون اكثر ملائمة ونجاح، وهذا ما اكد عليـه(19) و(20)حيـث وجـد ان الرايزوبيا تستجيب للجهد الملحي وتقوم بتراكم وتجمع عدد من المواد الاخرى للتغلب على الضغط الازموزي الناتج من الاملاح.

جدول (8) قدرة العزلات قبل وبعد التطبيع على اقامة علاقة تعايشية مع جذور نبات فول الصويا

المعاملات دي سيمنز. م $^{-1}$	العزلات	نسبة الانبات بعد 15 يوم %	سرعة الانبات/يوم	عدد العقد الجذرية	العقد الفعالة/عقدة
3.65	Control	76	8	-	-
	Kd2	88	5	23	18
	Kr2	88	6	22	17
	Kd2A	86	6	20	16
	Kr2A	83	6	19	15
4.86	Kd2	61	8	15	9
	Kr2	54	9	15	8
	Kd2A	76	6	18	14
	Kr2A	76	7	16	13
	Control	58	10	-	-
L.S.D p>0.05 ملوحة		3.65	0.95	2.01	1.21
عزلات		2.69	1.25	2.23	1.31
تداخل		4.15	2.15	3.45	2.61

المصادر

- F.A.O. (1984). Fertilizer and plant nutrition guide. Fertilizer and plant nutrition service and water development division. Bulletin. No. 9, Rome, Italy.
- Sadowsky , Michael J. and Siriluck Jitacksorn (2008). Nodulation Gene Regulation and Quorum Sensing Control Density-Dependent Suppression and Restriction of Nodulation in the *Bradyrhizobium japonicum* - Soybean Symbiosis, 3749-3756, Vol. 74, No. 12.
- Singleton, P. W. & Bohlool , B.B. (1984). effect of salinity on nodule formation by soy bean . plant . physio 74 , 72-76.
-Prior, B.A. ; C.P. Kenyon ; M.V. Veen and J.P. Mildenhall (1987). Water relations of solute accumulation in Pseudomonas fluorescens. J. of Appl. Bacter. 62 : 119-128.

-Rao, D.L.N ; K.E. Giller ; A.R. Yeo ; T.J. Flowers (2002). The effects of salinity and sodicity upon nodulation nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*).

-Beck, D. P. ; Materon, L. A. and Afandi ,F .(1993) .Practical Rhizobium legumetechnology manual. Technical manual No. 19.ICARDA.

-Balatti, A.P. (1982). Culturing Rhizobium in large scale fermentors. P. 127-132. In P.H. Graham and S.C.Karris (eds) BNF Technology for Tropical Agriculture. CIAT, Cali, Colombia.

-Mohammed, R.M. Khavan, MA. Camphell, W.F. Rumbagh, M.D. (1991). Identification of salt and drought tolerant Rhizobium meliloti L. strains. Plant and soil. 134:271-276.

-Sambrook, J. ;Fritgah , E. and Mahiatis , T. (1989). molecular cloning , alaboratoryman nal, Cold spring Harbour laboratory . Newy ork .

- Pospiech A. and Neuman S. (1995). Salting out procedure for isolation of genomic DNA. Bioresource Technol. 90:134-141.

-Domenico, P.; Schwartz, S., and Cunha , B. C. (1989). Reduction of capsular polysaccharide predu ction in *Klebsiell aphenmoniae* by Sodium salicylate. infect . Immun . 57:3778-3782.

-Bremner, J.M. (1965). Total nitrogen In : "Methodes of soil analysis" American society of Agronomy. Madison Wisconsin , USA.

-Mikanova, O. ; Novakova, J.(2002). Evluation th p_solu bilizing activity of soil microoryanisms and its.sensitvity to soluble phosphatel Rostlinna vyroba; 48 , (9): 397-400 .

-Murphy, J.P.; Riley J.P. (1962). Amodified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chem. Acta,27 : 31-36.

-Black, C.A. (1965). Methods of soil analysis. Part2. chemical and microbiological properties. Am. Soc. Agron, Inc. Madison, Wiseonson, USA.

-Bouhmuch, I.; F.Brhada ; A.Maltouf and J.Aurag (2001). Selection of osmotolerant and effective strains of *Rhizobiaceae* for inoculation of common bean *(phasedus vulgaris)* in Moroccan saline Soils. Agronomie . 21:591-599.

-Arora, N. K. ; R. Naraia and D. K. Maheshwari (2008). Sawdust as a superior carrier for production of multipurpose bioinoculant using plant growth promoting rhizobial and pseudomonad strains and their impact on productivity of *Trifolium repense* Gurukula Kangri University Hardwar 249- 404, India.

- Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics . Cold Spring Harbor : New York .

- Campbell, R. (1983). Microbiol Ecology . Blak well Scientific Publications : Oxford and London .

-Talibart, R.;M. Jabbar ; G. Gouesbet; S. Himd-Kabbab ; H. Wroblewski; C. Blanco & T. Bernaard (1994). Osmoadptation in rhizobia : Ectoine-induced salt tolerance. J. of Bacteriology . 176(17) : 5210-5217 .

-Nogales, J. R. Campos, H. BenAbdelkhalek, , J. Olivares, C. Lluch, and J. Sanjuan (2002). Rhizobium tropici Genes Involved in Free-Living Salt Tolerance are Required for the Establishment of Efficient Nitrogen-Fixing Symbiosis with Phaseolus vulgaris , E-18008 Granada, Spain.