دراسة مدى تحمل بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* لعدة مستويات من الملوحة

محمد إبراهيم الطائي

كلية علوم البيئة وتقاناتها

جامعة الموصل

e-mail: mohibo_1978@yahoo.com

الاستلام	القبول
09 / 11 / 2007	13 / 01 / 2008

Abstract

The effect of different Concentration (1% -5%) of NaCl on growth of *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* was studied by their addition to Manitol yeast extract agar medium and observing the bacterial growth and tolerance to exceeding salt concentration comparing to the control. The bacterium showed higher growth rate than control at 1% concentration, while the rates decreased at other concentration , with no growth at 5% concentration.

الخلاصة

تم في هذا البحث دراسة تأثير عدة تراكيز من ملح NaCl 1%-5% في نمو بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* من خلال إضافتها إلى وسط اكار سكر المانيتول ومستخلص الخميرة وملاحظة مدى النمو وتحمل البكتريا لزيادة تركيز الملح مقارنة بمعاملة السيطرة. أظهرت البكتريا معدلا للنمو اكبر من معاملة السيطرة عند تركيز 1% بينما انخفض النمو مع زيادة التركيز تدريجيا في حين انعدم تماما عند تركيز 5% .

المقدمة

تعد بكتريا *Rhizobium* التي تعود إلى عائلة Rhizobiaceae المسؤولة عن تكوين العقد Nodules في جذور النباتات البقولية واختزال غاز النتروجين إلى امونيا ليقوم بـدوره في عمليات ايض النبات (1).

الرايزوبيا هي من احياء مجهرية التربة والتي تؤدي دورا مهما في العلاقات التعايشية المتخصصة على النباتات البقولية، معظم هذه البكتريا تكون حساسة جدا لنقص ماء التربة. ان 23% من الترب الزراعية تعاني من الملوحة العالية، معظم المحاصـيل الزراعيـة تكـون حساسة للتراكيز الواطئة من الملوحة وبالنسبة للنباتات البقولية هناك مشكلة أخرى تتمثل بتأثر البكتريا التعايشية بالملوحة أيضاً سواء في حالتها حرة المعيشة ام التكافلية، وبالنظر لأهميـة هذه البكتريا من الناحية الاقتصادية للتربة والنبات على حد سواء فلقد انـصب العديـد مـن الدراسات لتحديد الظروف المثلى لنمو هذه البكتريا بصورة ايجابية وفاعلة (2). تعد التربـة البيئة الطبيعية لنمو هذه البكتريا والقيام بنشاطها وعلى هذا فان هذه البكتريا تتأثر بما تحتويـه التربة من عناصر ومواد كيمياوية والتي تكون بتراكيز مختلفة حسب طبيعة التربـة وتـؤثر بصورة مباشرة على النشاط الحيوي لأحياء مجهرية التربة، تعد الملوحة إحدى مكونات التربة الأساسية والتي يختلف تركيزها حسب طبيعة وموقع ومكونات التربة إذ ان الأراضي المالحة تكون سائدة في البيئات الجافة وشبه الجافة، ان زيادة نسبة الملوحة يعـود سـببها إلـى قلـة الأمطار وعملية التبخر المستمر للمياه نتيجة لارتفاع درجات الحرارة (3)، وتكـون معظـم المحاصيل حساسة نسبيا للمستويات المنخفضة للملوحة وفي حالة المحاصـيل البقليـة هنـاك عاملان يؤثران عليها الأول هو تأثرها بالملوحة والثاني هو تأثر البكتريـا التعايـشية والتـي تكون حساسة للملوحة خلال مراحل نموها الأولية والذي يكون بشكل حر، وكذلك أثناء عملية التكافل مع النبات البقولي العائل (4).

قد تحد الملوحة من العلاقات التعايشية بواسطة التأثير في مقاومة بكتريا الرايزوبيـوم وتكاثرها في التربة وفي منطقة الرايزوسفير، وأيضاً تثبط عملية إحداث الإصابة في جـذور النبات البقولي وتكوين العقد الجذرية بالإضافة إلى اختزال نمو النبات وعدم كفاءة عملية البناء الضوئي (5).

ان الهـدف مـن إجـراء هـذه الدراسـة هـو تحديـد قابليـة بكتريـا *R. leguminosarum bv.viciae* المعزولة من نبات الباقلاء لتحمل عدة تراكيز من الملح والذي يعكس مدى تأثر نشاط هذه البكتريا بملوحة التربة النامية فيها بالإضـافة إلـى إيجـاد أفضل تركيز للنمو الأمثل مقارنة بمعاملة السيطرة.

المواد وطرائق العمل

العزلة البكتيرية :

استخدمت في الدراسة بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* المعزولة من العقد الجذرية لنبات الباقلاء *Vicia faba* والمشخصة سابقا في كلية العلوم / قسم علوم الحياة (6). استخدم وسط اكار المانيتول وخلاصة الخميرة (Manitol Yeast Extract Agar MYA) لتنمية وادامة العزلة الجرثومية (7)، (8).

تأثير تركيز الملح NaCl في نمو بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* :

تقدير نمو بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* بواسطة طريقة التخطيط على الأطباق :

تمت زراعة جرثومة *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* 0.1 مل على وسط (MYA) المحضر باستخدام سكر المانيتول ومستخلص الخميرة والاكار مع عدة تراكيز من ملح NaCl (1% - 5%) إذ تم زراعة البكتريا باستخدام لوب معقم بطريقة التخطيط وبمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز، تم التحضين عند درجة حرارة 30°م لمدة 3 – 4 أيام، بعد انتهاء فترة التحضين تمت قراءة النتائج حسب كثافة النمو في الطبق مقارنة بمعاملة السيطرة التي كان تركيز الملح فيها 0.06 % ومع باقي التراكيز الأخرى من الملح إذ تم تحديد كثافة النمو بواسطة العين المجردة حيث مثلت كثافة النمو العالية بعدد اكبر من إشارات الزائد (+) وكلما قلت كثافة النمو قل عدد الإشارات بالمقارنة مع بعضها البعض و مثل اختفاء النمو بإشارة الناقص (-) (9) .

تقدير النمو باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer :

تم تحضير وسط المانيتول ومستخلص الخميرة السائل بتراكيز مختلفة من ملح NaCl 1% - 5% (وزن / حجم) في قنان صغيرة Vail سعة 20 مل (10 مل لكل قنينة) وبمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز فضلا عن معاملة السيطرة الذي كان تركيز الملح فيه 0.06% . تم تحضير بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* بتلقيحها على وسط (MYA) بالتخطيط وبعد مرور 24 ساعة تم نقل حملة لوب من المزرعة البكتيرية إلى وسط (MY) السائل وبعد مرور 24 ساعة من التحضين عند درجة حرارة 30°م تم تلقيح التراكيز المختلفة بـ (0.1) مل من المعلق البكتيري (10)، حضنت القناني الزجاجية عند درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة قيست بعدها كثافة النمو باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجي 600 nm (11).

النتائج والمناقشة

لقد أشار العديد من البحوث إلى التأثيرات السلبية لزيادة مستوى الملوحة في أحياء مجهرية التربة وخصوصا البكتريا التعايشية ومنها بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* (12). ان زيادة مستوى الملوحة في التربة تعمل على اختزال الكتلة الحية للنبات وتقليل أعداد العقد الجذرية وعملية تثبيت النتروجين وزيادة نسبة الجذر إلى الساق، وأيضا تعمل على زيادة السكر الذائب والأحماض الامينية الحرة داخل النبات (13). لذا تم في هذا البحث التحري عن مدى تحمل بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* لزيادة تركيز الملح في محتوى الوسط الذي تنمو فيه، فقد استخدمت طريقة التخطيط على وسط MYA بملاحظة كثافة نمو بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* على الطبق حسب تركيز الملح المضاف الى الوسط كما في الجدول (1).

الجدول (1): نسبة النمو حسب تركيز الملح المضاف إلى وسط (MYA)

تركيز NaCl	كثافة النمو في الطبق
Control	++++
% 1	+++++
% 2	+++
% 3	++
% 4	+
% 5	-

اذ يوضح الجدول ان زيادة تركيز NaCl 1 % أدت إلى زيادة كثافة النمو مقارنة بمعاملة السيطرة وكان هذا التركيز أفضل قيمة لنمو البكتريا بصورة مثالية، في حين أدت زيادة التركيز أكثر من ذلك إلى تثبيط نمو بكتريا *R. leguminosarum bv.viciae* بصورة كبيرة وعند الوصول إلى تركيز 5 % لم يظهر النمو إطلاقاً مما يدل على ان هذا التركيز يكون قاتلا للبكتريا.

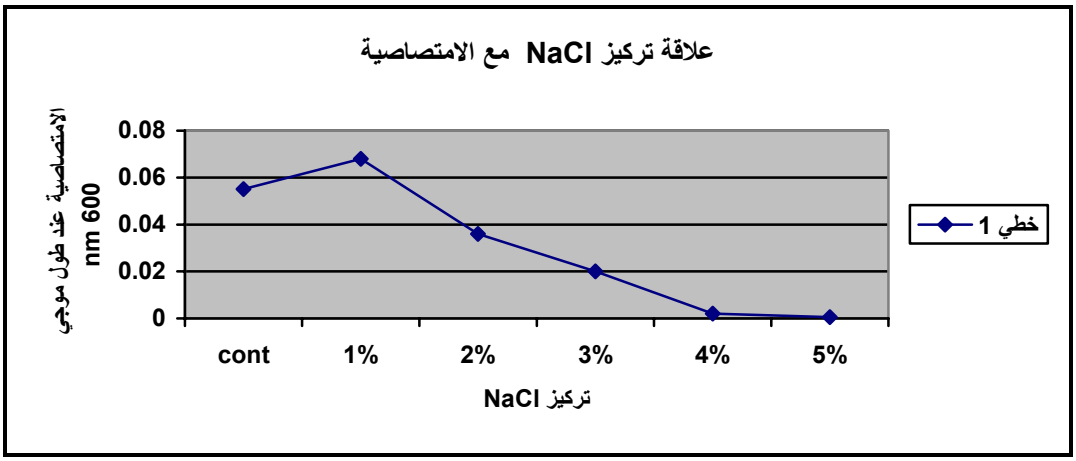
أما الطريقة الثانية فتتضمن استخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer لقياس كثافة النمو البكتيري في وسط (MY) السائل المضاف إليه تراكيز مختلفة من الملح NaCl وكما هو مذكور في المواد وطرق العمل ، يوضح الجدول (2) كثافة النمو المقاسة عند طول موجي 600 nm باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

الجدول (2) معدل الامتصاص للنمو البكتيري في وسط (MY) السائل المضاف له تراكيز مختلفة من الملح

تركيز NaCl	معدل الامتصاص عند طول موجي 600nm
Control	0.055
% 1	0.068
% 2	0.036
% 3	0.020
% 4	0.002
% 5	0.0005

تؤكد هذه النتائج ما أوضحته الطريقة الأولى من أن زيادة تركيز الملح 1 % أدت إلى زيـادة نمو بكتريا *R. Leguminosarum bv.viciae* مقارنة بمعامل السيطرة في حـين انخفـض معدل النمو مع الاستمرار في زيادة التركيز. ويمكن توضيح هذه العلاقة بالشكل (1).

شكل (1) العلاقة بين تركيز NaCl المضاف إلى الوسط السائل وكثافة النمو البكتيري



هذه النتائج جاءت مطابقة لما ذكره (4) من ان تركيز NaCl أعطى أعلى نتيجة نمو لبكتريا *R. Leguminosarum bv.viciae* عند تركيز 0.0125M مقارنة بمعاملة السيطرة إذ أن لكل كائن مجهري متطلبات حيوية يكون نموه عندها بصورة مثالية. وعند زيادة تركيز الملح إلى أعلى من التركيز المثالي للنمو يؤدي إلى تأثير سلبي في الكائن المجهري وهذا مـا

لـوحظ فـي نتـائج البحـث إذ أدت زيـادة تركيـز الملـح إلـى تثبـيط نمـو بكتريـا *R. Leguminosarum bv.viciae* وهذا قد يعود إلى أن زيادة تركيز الملح تؤدي إلى تغير في الضغط الازموزي مما تؤثر في نفاذية الجدار الخلوي وأيضا تعمل على تغييـر تركيـز طبقة السكريات المتعددة الدهنية Lipopolysaccaride للبكتريا استجابة لتأثير الملح وأيضاً تراكم بعض المحاليل للتغلب على الجهد الازموزي الناتج عن وجود الملح (4). ان نتائج هذا البحث يمكن ان توضح ان تغير الضغط الازموزي يؤثر في قابلية تثبيـت النتـروجين مـن بكتريا *R. Leguminosarum bv.viciae* والذي بدوره ينعكس على نمو النبـات اذ مـن المعروف ان عملية تثبيت النتروجين من هذه الكائنات تتم عن طريـق اختـزال النتـروجين الجوي إلى امونيا بمساعدة انزيم النتروجنيز حيث ذكر (14) أن الجهد الملحي يختزل بصورة كبيرة عملية تثبيت النتروجين وتكوين العقد الجذرية، إن زيادة تركيز الملح عمل على تقليـل نشاط بكتريا العقد الجذرية إذ أشار (15) إلى أن جهد الملح ربما يقلل فعالية تكـوين العقـد الجذرية بواسطة اختزال نمو النبات وعملية التركيب الضوئي وعدم امتصاص النتروجين من التربة بواسطة اختزال قدرة تحمل ونمو بكتريا الرايزوبيا في التربة وطبقة الرايزوسـفير او بواسطة تثبيط تكوين العقد الجذرية في مراحلها الأولى، وعلى هذا يجب متابعة ملوحة التربة دوريا لما أشار إليه (16) إذ أن الملح قد يؤدي إلى عرقلة تكوين العقد الجذرية وكذلك يعمـل على تثبيط انزيم النتروجنيز، واختزال نمو النبات وتبين أن عميلة تكـوين العقـد الجذريـة وتثبيت النتروجين تكون أكثر حساسية للملح مقارنة بالنمو وهذا يعطي مؤشرا للفلاحين إلـى انه حتى في التراكيز القليلة من الملـح قـد يتثـبط نمـو بكتريـا *R. Leguminosarum bv.viciae* في حين أن نمو النبات يتأثر فقط بالتراكيز العالية (100 ملي مولر). ان نتائج هذه الدراسة يمكن ان تساعد على فهم تأثير تغيير الضغط الازموزي الناتج عن الملـح فـي قابلية بكتريا *R. Leguminosarum bv.viciae* لتثبيت النتروجين والتي تعكس التـأثيرات في نمو النبات بواسطة عملية التعايش Symbiosis (4) ، بالإضافة إلى ان الدراسات أكدت ان زيادة تركيز الملح يغير من شكل الشعيرات الجذرية ويعمل على تجعيدها بالإضافة إلـى اختزال عدد بكتريا الرايزوبيا التي تكون بتماس مع الشعيرة الجذرية وأيضاً تقلص حجم العقدة الجذرية كذلك كمية النتروجين المثبتة لكل وحدة وزن للعقدة الجذرية ينخفض مع زيادة الجهد الملحي (2) . إن نتائج هذا البحث لا تمثل جميع أنواع جنس *Rizobium* لما ذكره (3) مـن أن تأثير الملح في نمو بكتريا Rhizobia يعتمد على نوع السلالة نفسها إذ أن البكتريا التـي تكون سريعة النمو مكونه للحامض هي أكثر تحملا للملح من البكتريا بطيئـة النمـو مكونـة للقاعدة.

المصـادر

1. Vincent, J. "The genus *Rhizobium*". In Starr, M.P.; Stolp, H.; Truper, H.G.; Balows, A and Schilegel, H.G.(eds). “The Prokaryotes”. Vol.1, Springer-Verlang, U.SA, pp.818-837. (1981).
2. Haffez, F.y.; Aslam, Z and malik, K.A.; nuclear Institute for agriculture and biology, Faisalabad, pakitan. (1987).
3. Abdel Moumen, H., Filali – Maltou, F.; Neyra, M.; Belabed, A. and Elidrissi, M., journal of Applied Microbiology, 86, 889-898 (1999).
4. Rafig, S., Journal of Bacteriology, 176(17):5211-5217. (2007).
5. Sinoloton, P.W.; Elswaify, S.A. and Bohlod, B. Applied and Environmental Microbiology p(884-890). (1982).
6. الحسو، د. محمود زكي و محمد إبراهيم الطائي. مقبول للنشر، مجلة التربية والعلم (2007).
7. Prescott, L.M.; Harley, J.P. and Klein, D.A. "Microbiology". 3rd ed., Wm.C. Brown Communication, Inc., Iowa, USA, (1996).
8. Black, C.A.; Evans, D.D.; Ensmingev, L.E.; White, J.L.; Clark, J.E. "Methods in soil analysis". part 2: Chemical and Microbiology properties American Society of Agronomy, Inc. U.S.A. (1979).
9. Benson, H.J., "Microbiological Application", 8th ed. McGraw. U.S.A. (2002).
10. Faituri, M.Y.; El-Mahi, Y.E. and El-Hassan, G.A.. Can. J.Microbiol. 47(9): 807-812(2001).
11. Tejera, N., campos, R.; Sanjuan, J. and Luch, C., J. of Plant nutrition vol.28 : 123-127p (2007).
12. Kucuk, C.; Kivane, M. and Kinaci, E. Turk. J. Biol. 30: 127-132. (2006).
13. Foth, H. D. "Fundamental of Soil Science". 8th ed. John Wiley and Sons Inc.U.S.A. (1990)
14. Soussi, M.; Ocana, A. and luch, C. J. of Experimental Botany vol. 49, No 325 pp1329-1337. (1998).
15. قاسم، د.غياث محمد ود. مضر عبد الستار. "علم أحياء التربة المجهرية"، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، العراق (1989).
16. Lal, B. and Khanna, S. Word Journal of Microbiology and Biotechnology vol. 10 no. 637-639 (1994).