استجابة كثافة نمو بكتريا الرايزوبيوم الضوئية لمستويات مختلفة من Mo وK والتداخل بينهما في الوسط الغذائي السائل

Optical *Rhizobium* Growth Density Responding to different levels of Mo and K and their interaction in the Liquid Media

علي صبيح عبد الأمير
كلية العلوم للبنات \جامعة بغداد

Ali Sabeeh Abdulameer
College of Science for Women, University of Baghdad

المستخلص

نفذت تجربة مختبرية لدراسة تأثير المولبدنم والبوتاسيوم في نمو بكتريا الرايزوبيوم ، حيث استهدفت دراسة تأثير مستويات المولبدنم صفر ، 0.25 ، 2.50 ملغم Mo . لتر$^{-1}$ ومستويات البوتاسيوم (صفر ، 25 ، 50، 100) ملغم K . لتر$^{-1}$ والتداخل بينهما في صافي الكثافة الضوئية لنمو المزرعة البكتيرية السائلة العائدة للبكتريا *Rhizobium leguminosarum* بعد ثلاثة أيام من التحضين بدرجة 28 م .

Abstract

An experiment was carried out to study the effects of potassium and Molybdenum on *Rhizobium* growth. The objective of the experiment, which conducted under laboratory conditions was to investigate the interaction effects of using three levels of Molybdenum (0, 0.25, 2.50) mg Mo .L^{-1} and four levels of potassium (0, 25, 50, 100) mg K.L^{-1} on the optical density of *Rhizobium* growth in the liquid medium (broth media), which is belong to *R. leguminosarum* after three days of incubation at 28°C.

المقدمة

تمثل الأسمدة نسبة كبيرة من إجمالي تكاليف إنتاج الغذاء [1] ، إذ إن سماد النتروجين الكيميائي هو الأكثر كلفة واستهلاكاً للطاقة وتلويثاً للبيئة [2] ، كما إنها تتعرض إلى عمليات فقد تصل الى نسبة 50 % ، لذا لجأ إلى استعمال أنظمة حيوية صديقة للبيئة مسؤولة عن عملية تثبيت النتروجين الجوي حيوياً لتجهيز النتروجين [3] ، 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 [4] . فقد أكد [5] إن تكامل النظريات الجزيئية بدراسات أساسها المختبر والحقل والفسلجة والكيمياء الحيوية مطلوبة لتحسين فهم الأهمية البيئية والاقتصادية لاستجابة الرايزوبيا للعناصر المغذية . ويعد البوتاسيوم من العناصر الغذائية الأساسية والضرورية والأكثر أهمية بسبب وظائفه الفسلجية والكيميائية الحيوية [6] . وان تأثير هذا العنصر على تثبيت النيتروجين حيوياً يمكن أن يكونا حرجاً [7 ،8] . ذلك أن البوتاسيوم عنصر أساسي وضروري لكل الكائنات الحية [5 ، 7 ،8] . أما المولبدنم فقد ظهرت أهميته البيولوجية للرايزوبيا سنة 1930 عندما أبدت هذه البكتريا نمواً ضعيفاً عند تنميتها على بيئة ينقصها المولبدنم [13] . إذ يعد عنصراً غير اعتيادي في تركيبة إنزيم النتروجينيز في بكتريا الرايزوبيا إذ أن له أثراً أساسياً في المواقع الفعالة للإنزيم [18 ، 20] . علماً أن هذا الإنزيم هو المسؤول عن تثبيت النتروجين بشكل أساسي بواسطة البكتريا [5] .

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 المولبدنم والبوتاسيوم في نمو بكتريا الرايزوبيا وكخطوة أولى في هذا المجال أجريت الدراسة الحالية بهدف دراسة استجابة هذه البكتريا في الوسط الغذائي السائل المعقم ليتبعها لاحقاً دراسة ذلك في بيئتها الطبيعية .

المواد وطرائق العمل

1. الأوسط والمحاليل الغذائية الصناعية المستعملة لتنمية البكتريا:

أ- وسط مستخلص الخميرة- مانيتول السائل Yeast Mannitol Broth (YMB): أذيبت هـذه المكونات فـي 900 مـل ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.0 ثم أكمل الحجم إلى لتر وعقم بالموصدة بدرجة حرارة 121 م وتحـت ضغط مقداره 15 باوند / أنج^2 ولمدة 15 دقيقة [11 ، 21] .

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

ج- وسط مستخلص الخميرة- مانيتول أكار+ صبغة الكونغو الحمراء (YMA+ Congo red A) .

2. **السُلالة :** أُستعملت السلالة البكتيرية تتبع *Rhizobium leguminosarum* ، تم الحصول عليهما من مركز إباء للأبحاث سابقاً وقد أُجريت عليها عمليات التنشيط والفحص للتأكد من خواصها الحيوية .

3. **الفحوصات المختبرية والعملية**

أ- **الفحص بالمجهر الضوئي :** وصف شكل الخلايا بعد أن صبغت بصبغة كرام وفحصت مجهرياً ، إذ استعملت صبغة كرام المحضرة وفقاً لما ذكره [9] .

ب- **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 .

ت- **دليل BTB :** للتأكد عملياً من جنس البكتريا فيما إذا كانت *Rhizobium* أو *Bradyrhizobium* ، فقد زرعت البكتريا على وسط مستخلص الخميرة- المانيتول الصلب (YMA) 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) [11] . فالبكتريا *Rhizobium* تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأصفر، أما البكتريا *Bradyrhizobium* فتحوله إلى الأزرق .

4. **الحفظ النظامي :** إن هذه العملية هي لأجل توفير مزارع ساندة بانتظام لمدة 2-3 شهر لاستعمالها أثناء فترة إجراء التجارب، وذلـك بتلقيـح قناني زجاجية خاصة لها فوهة وغطاء لولبي حاويـة على وسـط (YEMA) المائل بالبكتريـا من مستعمرات مثالية بطريقة التـخطيط وحضـنها بدرجـة حـرارة 28 م مـدة 24 ساعـة ويحكم إغلاقها لمنع التلوث ثم تحفظ بدرجة حرارة 4 م في الثلاجة وتستمر هذه العملية دورياً .

5. **تحضير مزارع سائلة Broth culture :** حُضر اللقاح السائل في ظروف التعقيم بعد تنشيط السلالات البكتيرية ، بأُخذ 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 م لمدة ثلاثة أيام [10] ، بعدها توضع في البراد عند درجة حرارة 4 م لتصبح مزارع سائلة جاهزة .

6. **العد المكروبي**

أ- **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 التخفيف المضاعفة للمزرعة البكتيرية التي يراد اخذ اللقاح السائل منها ، وذلك لاستخراج معدل عدد الخلايا الحية في 1 مل من المزرعة السائلة كما في [11] .

ب- **العد غير المباشر بطريقة قياس الامتصاصية لمعلقات المزرعة البكتيرية النقية :** الغاية من هذه العملية هو لتقدير عدد الخلايا البكتيرية في المزرعة السائلة النقية (كثافة اللقاح) ، حيث يتم إيجاد علاقة بين أعداد البكتريا الحية في 1 مل من المزرعة السائلة المحسوبة بطريقة التخفيف والعد بالأطباق لكل تخفيف وقراءة امتصاصيتها (كثافة المزرعة البكتيرية مقابل كل تخفيف) باستعمال جهاز الطيف الضوئي عند طول موجي 580 نانوميتر وباستعمال برنامج Excel ترسم هذه العلاقة بشكل منحنى ، لكي يستعمل هذا المنحنى لاحقاً في تقدير أعداد البكتريا في مزارعها السائلة في أي وقت ، ويجب غسل أنابيب القراءة الزجاجية Cuvettes الخاصة بالجهاز جيداً بالماء المقطر بين كل قراءة وأخرى .

7. التجربة المختبرية :

استهدفت هذه التجربة معرفة تأثير مستويات المولبدنم بهيئة مولبدات الامونيوم $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}\ .\ 4\ H_2O$ (54% Mo) والبوتاسيوم بهيئة كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4 (41.5 % K) والتداخل بينهما في نمو بكتريا الرايزوبيا في المزرعة البكتيرية السائلة باستعمال التصميم التام التعشية CRD ، حيث بلغت عدد الدوارق المستخدمة 36 دورق وهذا العدد ناتج من تدخل ثلاث مستويات من المولبدنم (صفر، 0.25 ، 2.50) ملغم Mo \ لتر وأربع مستويات من البوتاسيوم (صفر، 25 ، 50 ، 100) ملغم K \ لتر وثلاثة مكررات لكل معاملة ، إذ تم وضع 100 مل من بيئة مستخلص الخميرة- المانيتول السائلة الحاوية على تراكيز المستويات المكافئة المستعملة في دوراق حجم 300 مل ، عقمت الدوارق بالموصدة على درجة حرارة 121 م وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 20 دقيقة ، بردت بعد ذلك ولقحت هذه البيئة السائلة بإضافة 1 مل من مزرعة بكتيرية سائلة (Broth culture) بعمر ثلاثة أيام ليعطي كثافة عددية في الزمن صفر مقدارها 1.5×10^8 خلية . مل . إذ وضعت الدوارق في الحاضنة على درجة حرارة 28 م وبعد مرور ثلاثة أيام اخذ 1 مل من كل مكرر وتم قياس الكثافة الضوئية Optical Density باستعمال جهاز الطيف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجي 580 نانوميتر وُطرحَ البلانك (الوسط الغذائي مع المعاملة بدون تلقيح) من قراءة كل معاملة، حيث يتم تصفير قراءة الجهاز باستعمال نفس الوسط الغذائي السائل (YMB) المعقم غير الملقح والذي قراءته تمثل نقطة الصفر في المنحنى .

8. التصاميم الإحصائية

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

النتائج والمناقشة

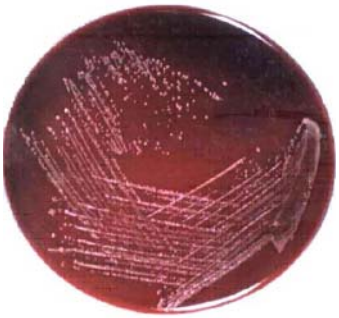
1. الفحوصات المختبرية

أ- الوصف المجهري لبكتريا *Rhizobium*

أظهرت نتائج الفحص المجهري للسلالات البكتيرية بعد تنشيطها باستعمال طريقة التخافيف المتسلسلة Serial dilution وطريقة التخطيط على الأطباق Streaking لغرض الحصول على مستعمرات نقية ، أنها سالبة لصبغة كرام وتترتب بشكل أزواج عصوية ثنائية وقسم منها أحياناً عصوية مفردة الشكل، منفردة مكونة الشكل Y ومتحركة .

ب- فحص احمر كونغو Congo red Agar

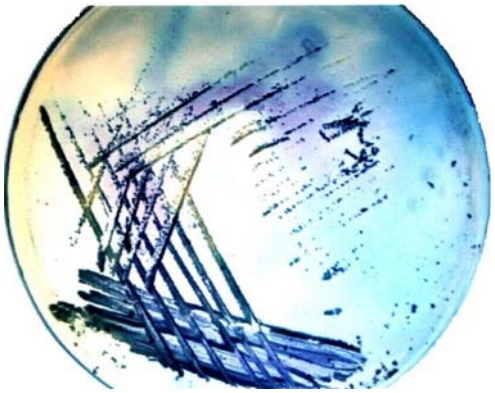
ظهرت خلايا البكتريا في أطباق التنمية التي حضنت بصورة مقلوبة عند درجة حرارة 28 م ولمدة ثلاث أيام ، بشكل مستعمرات بيضاء اللون ذات قوام مخاطي على سطح الوسط ألزرعي YMA المضاف له صبغة احمر الكونغو، إذ لم تمتص مستعمرات البكتريا هذه الصبغة شكل (1) ، مع العلم إن هذه الصبغة تذوب بالماء وفي الكحول الاثيلي ، وان امدصاصها يتأثر بطبيعة الوسط وظروف عملية التحضير والزرع .



شكل (1) : نمو بكتريا الرايزوبيوم على وسط Congo red Agar

ج- فحص Bromothymole blue (BTB)

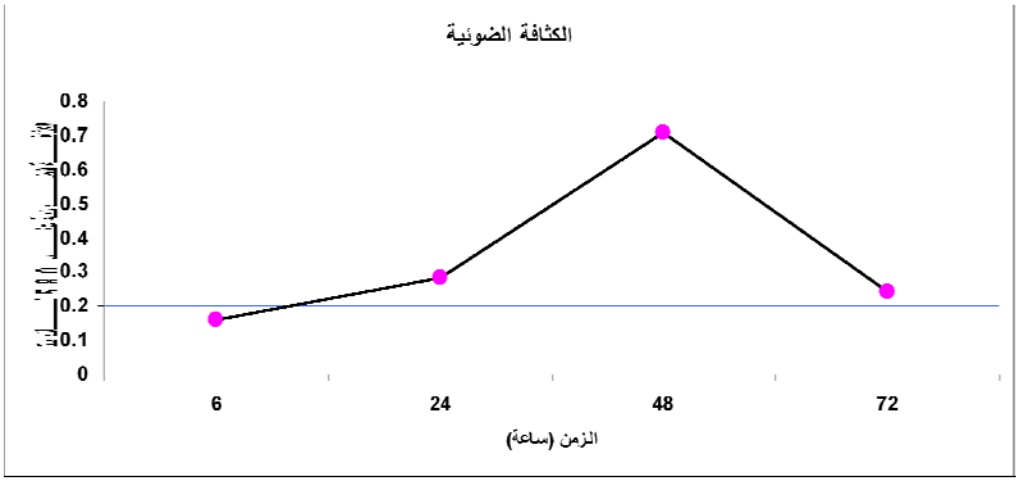
أظهر فحص (BTB) إن البكتريا تعود إلى الجنس *Rhizobium* إذ استطاعت تحويل لون الوسط ألزرعي من اللون الأخضر إلى الأصفر شكل (2) .



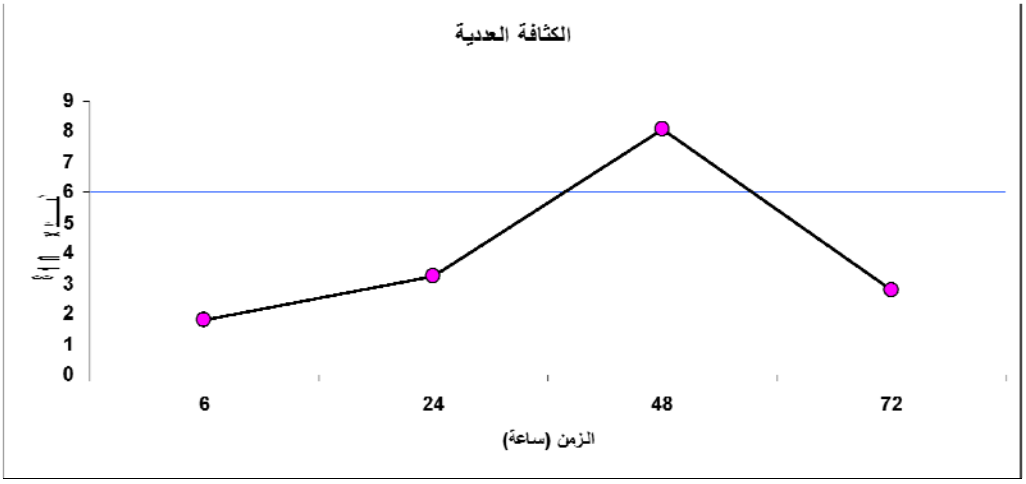
شكل (2) : نمو بكتريا الرايزوبيا على وسط BTB

د.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 شكل (3 ، 4) ، 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 [12] . إن هذه النتائج تؤكد كون البكتريا أعلاه وحسب نظام التصنيف 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) يوم وتستعمل مدى واسع من الكربوهيدرات بينما تنتج مواد أيضية حامضية وهي ليست بطيئة النمو ((*Bradyrhizobium*) زمن الجيل (6-8) ساعة مع نمو مستعمري مرئي بعد (5-8) يوم تستعمل سكريات البنتوز (Pentose) كمصدر للكاربون وتنتج مواد أيضية قاعدية [11] .



شكل (3) : الكثافة الضوئية لمنحنى النمو البكتريا



شكل (4) : الكثافة العددية لمنحنى نمو البكتريا

2. التجربة المختبرية

تأثير المولبدنم والبوتاسيوم والتداخل بينهما في صافي الكثافة الضوئية للمزرعة البكتيرية السائلة

بينت نتائج التحليل الإحصائي في جدول (1) وشكل (5) أن للمولبدنم تأثير معنوي واضح في الكثافة الضوئية لنمو البكتريا . إذ لوحظ زيادة في قراءة كثافتها مع زيادة تركيز المولبدنم في الوسط الغذائي السائل . حيث وصلت الكثافة الضوئية ذروتها عند مستوى المولبدنم 2.50 ملغم Mo . لتر$^{-1}$ فكانت 0.336 وبفارق معنوي عن باقي معاملات المولبدنم وعلى مستوى 0.01 ثم تلتها معاملة المولبدنم 0.25 ملغم Mo. لتر$^{-1}$ إذ سجلت 0.245 ، في حين اقل كثافة ضوئية كانت عند معاملة المقارنة التي بلغت 0.179 . وحصل [17] على نتائج مشابهة . وذكر كل من [18 ، 20] أن المولبدنم يلعب دوراً هاماً في تنشيط عمل إنزيم النتروجينيز في البكتريا المعتمدة على تثبيت النتروجين الجوي للحصول على النتروجين كالرايزوبيوم .

أظهرت النتائج من جدول (1) وشكل (5) والتحليل الإحصائي أن للبوتاسيوم دوراً إيجابياً ومعنوياً في زيادة الكثافة الضوئية لنمو البكتريا ، إذ أن نمو البكتريا وتكاثرها كان بصورة أفضل تحت المستوى 50 ملغم K . لتر$^{-1}$ حيث بلغ متوسط قراءة كثافة مزرعتها 0.320 وبفارق معنوي عن متوسطات جميع المعاملات وعلى مستوى 0.01 تلتها معاملة البوتاسيوم 25 ملغم K . لتر$^{-1}$ إذ بلغ متوسط قراءة كثافتها 0.297 ثم المعاملة 100 ملغم K . لتر$^{-1}$ التي سجلت 0.288 وبدون فرق معنوي مع المعاملة 25 ملغم K . لتر$^{-1}$ ، أما اقل معدل للكثافة الضوئية فقد كان عند معاملة المقارنة التي بلغ متوسطها 0.106 وأيضاً بفارق معنوي بين المعاملات على مستوى 0.01 . وكما يبدو 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 [5 ، 22] , ذلك انه من المعروف أن البوتاسيوم ضروري لنمو البكتريا [5] . وهو من المغذيات الضرورية لنمو بكتريا الرايزوبيوم الحرة المعيشة أيضاً [5 ، 13 ، 14] ، وحصل [13] على نتائج مشابهة عند دراسته لبكتريا الرايزوبيوم *R. trifolii* و *R. Meliloti* في المزرعة البكتيرية السائلة ، وكذلك [15] في دراستهم التي أجروها لمقارنة امتصاص المغذيات باستعمال النظائر المعلمة في ثلاث سلالات رايزوبيا سريعة وثلاث أخرى بطيئة ، و[16] في دراستهم على الـ *Bradyrhizobium* . وان سبب انخفاض متوسط النمو عند المعاملة 100 ملغم K .لتر$^{-1}$ بالمقارنة مع باقي معاملات البوتاسيوم ربما يكون بسبب اختلال التوازن الغذائي- الملحي المناسب للنمو في الوسط وتأثير زيادة تركيز البوتاسيوم على امتصاص العناصر الغذائية المهمة الأخرى [19 ، 23] .

أوضحت نتائج التحليل الإحصائي المبينة في جدول (1) وشكل (5) إن هناك تأثير ايجابي معنوي للتداخل بين البوتاسيوم والمولبدنم في الكثافة الضوئية لنمو البكتريا في الوسط الغذائي السائل . إذ أدت إضافة البوتاسيوم والمولبدنم معاً إلى زيادة قراءة كثافة نمو البكتريا الضوئية إذ سجلت معاملة التداخل 50 ملغم K . لتر$^{-1}$ + 2.50 ملغم Mo . لتر$^{-1}$ أعلى معدل كثافة ضوئية وبفارق معنوي عن جميع المعاملات على مستوى 0.01 حيث سجلا 0.437 . أما اقل كثافة ضوئية سجلت لنمو البكتريا فكانت عند معاملة المقارنة إذ بلغت 0.061 . أن أسباب زيادة قراءة الكثافة عند معاملة التداخل 50 ملغم K .لتر$^{-1}$ +2.50 ملغم Mo .لتر$^{-1}$ ربما يعود إلى تأثير هذين

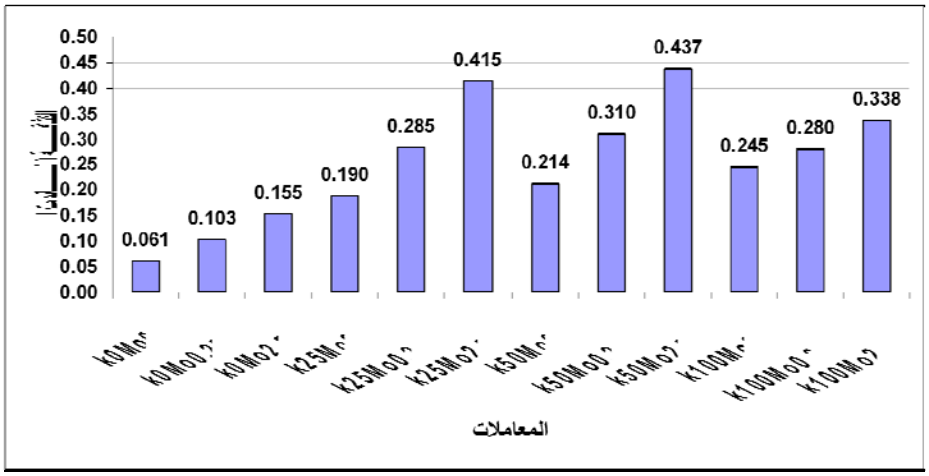
العنصرين المهمين لنمو البكتريا ، إذ أن التداخل قد زاد على ما يبدو هذا التأثير وبالتالي اثر إيجاباً في قراءة كثافة نمو البكتريا الضوئية .

جدول (1): تأثيرالموليبدنم والبوتاسيوم والتداخل بينهما في صافي الكثافة الضوئية لمزرعة بكتيرية سائلة بعمر ثلاثة أيام .

مستويات المولبدنم ملغم . لتر$^{-1}$	مستويات البوتاسيوم ملغم . لتر$^{-1}$				المتوسط
	صفر	25	50	100	
صفر	0.061	0.190	0.214	0.245	c0.178
0.25	0.103	0.285	0.310	0.280	b0.245
2.50	0.155	0.415	0.437	0.338	a0.336
المتوسط	0.106 c	b0.297	a0.320	b0.288	

K*Mo=0.0036 Mo=0.0018 K=0.0021 LSD 0.01

*** معدل قراءة كثافة البلانك (الوسط الغذائي بدون تلقيح) = 0.245**



شكل (5) : تأثير التداخل بين الموليبدنم والبوتاسيوم في صافي الكثافة الضوئية لمزرعة بكتيرية سائلة بعمر ثلاثة أيام .

المصادر:

1. Havlin, J. L.; J. D. Beaton; S. L. Tisdale and W. L. Nelson. 1999. Soil fertility and fertilizers (sixth edition). An Introduction to Nutrient Management.
2. Franco, A. A. 1998. Importance of biological N_2 fixation in sustainable agriculture. EMBRADA-Agrobiologia, Km 47, Seropcdica Rj, 23851-970 Brazil.
3. ديمرجي، صالح محمود. 1985. الندوة الأولى في بايولوجية تثبيت النتروجين (التثبيت البايولوجي للنتروجين). مركز بحوث علوم الحياة. قسم الأحياء المجهرية. بغداد. العراق.
4. Elmerich, C.; A. Kondorosi and W. E. Newton. 1998. Biological nitrogen fixation for the 21st Century. Kluwer Academic Publishers. Paris.
5. O'Hara, G. W. 2001. Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. Centre for *Rhizobium* Studies, School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Murdoch, WA 6150, Australia. Aust. J. of Exp. Agri., 41, 417-433. e-mail: gohara@central.murdoch.edu.au
6. ألنعيمي، سعد الله نجم. 1999. الأسمدة وخصوبة التربة , مطبعة دار الكتب, وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . كلية الزراعة والغابات . جامعة الموصل .
7. Sangkkara, U. R. ; U. A. Hartwig and J. Nösberger. 1996a. Growth and symbiotic nitrogen fixation of Vicia faba and Phaseolus vulgaris as affected by fertilizer potassium and temperature. J. of the Sci. Food Agric., 70, 315-320. e-mail: e-lib@univ.kiev.edu.au

8. Sangkkara, U. R.; U. A. Hartwig and J. Nösberger. 1996b. Soil moisture and potassium affect the performance of symbiotic nitrogen fixation in faba bean and common bean. Plant & Soil, 148,123-130. e-mail: hartwig@ipw.agrl.ethz.ch

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

10. Novak, K., P. Chovanec, V. Skrdleta, M. Kropacova, L. Lisa and M. Nemcova. 2002. Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). J. of Experimental Botany, V. 53, No. 375., P. 1735-1745., E-mail: Novak@biomed.cas.cz

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

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

13. O'Hara, G. W., N. Boonkerd and M.J. Dilworth. 1988. Mineral constrains to nitrogen fixation. Plant and Soil, 108, 93-110.

14. Giller, K. E. and Wilson K.J., 1991. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. (CAB International: Wallingford, UK).

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

16. Gober, J. W. and Kashket, E. R., 1987. K^+ regulates bacteroid-associated functions of *Bradyrhizobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4650-4654.

17. Bzheumkhov, V. S.; Kashukoev M. V.; Tokbaev, M. M 1999. Nitrogen-fixing activity of Lucerne in relation to soil moisture, activity of *Rhizobium* strain and supply of mineral nutrition elements. *Izvestiya Timiryazevskoĭ Sel'skokhozyaĭstvennoĭ Akademii* (1999) No. 4, 176-179 [Ru, 5 ref.] Department of Plant Growing, K. A. Timiryazeva Moscow Agricultural Academy, Moscow, Russia.

18. Shah, V. K. Ugalde, R.A., Imperial, J. and Brill, W. J. 1984. Molybdenum in nitrogenase. Annual Review of Biochemistry 53, 231-257.

19. 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

20. Jongruaysup S., O'Hara, G. W., Dell B 1993. Effects of low Mo on nodule initiation, development and N2 fixation. Plant & Soil 155/156, 345-348.

21. 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. schand@vsni.com P. 754-853.

22. Rastogi, V.B., 2008. Fundamentals of Molecular Biology. Ane Books INDIA, New Delhi, India. anebooks@vasi.com p.303-318.

23. Johnston, A. E. 2006, Understanding Potassium and its Use. European Fertilizer Manufacturers Association. Avenue E. Van Nieuwenhuyse 4, B-1160 Brussels. Belgium. - Email main@efma.be