



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

عزلٌ وتشخيصُ أنواعٍ من بكتريا الرايزوبيوم من نباتاتٍ محليةٍ مختلفةٍ
ودراسةُ فعاليتها المضادةٍ لعددٍ من المايكروباتِ

عمر حماد جمعة

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور مهدي صالح عبد الرحمن

الأستاذ المساعد

الدكتور رعد حساني سلطان علاوي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
﴿وَلَقَدْ آتَيْنَا دَاوُودَ وَسُلَيْمَانَ عِلْمًا وَقَالَا الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي فَضَّلَنَا عَلَى
كَثِيرٍ مِّنْ عِبَادِهِ الْمُؤْمِنِينَ﴾

سورة النمل الآية (15)

شكر وتقدير

الحمد لله الذي بفضلہ تنمّر النعم، والصلاة والسلام على سيدنا محمد أشرف المرسلين وعلى آله وأصحابه
ذوي الفضائل والقيم...

لا يسعني في هذا المقام إلا أن أتقدم بخير الشكر والعرفان إلى والدي والديتي اللذان كان
لدعائهما المستم أثر كبير في حياتي فجزاهما الله عني خير الجزاء وأمدهما بالصحة والقوة...

وأنا أهني نخشي هذا لا يسعني إلا أن أتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى من كان له الفضل بعد الله عز
وجل في إنجاز هذا العمل المنوَّض وأخصُّ بالذكر الأستاذ الفاضل الدكتور **مرعد حساني سلطان** والأستاذ
الفاضل الدكتور **صالح عبد الرحمن** من خلال توجيهاتهما وإرشادهما طيلة مدّة البحث، جعلها الله في ميزان
حسناتهما وجزاهما الله عني خير الجزاء...

وأوجه بخير الشكر والتقدير إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل وعمادة كلية
العلوم/جامعة دهوك للجهود الطيبة، وإلى رئاسته قسم علوم الحياة لما قدمته من تسهيلات أسهمت بشكل فعّال
في إنجاز هذا البحث، كما أتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى أساتذتي الأفاضل وأخصُّ بالذكر الأستاذ الدكتور
عطا الله همد محلف والأستاذة الفاضلة الدكتورة **نجوى إبراهيم البرهاوي** والدكتور **عس عبد العزيز احمد** لما قدموا
لي من نصائح وتوجيهات التي كان لها الأثر الكبير في إتمام هذا البحث، وأقدم شكري وتقديري إلى الأستاذ
الفاضل الدكتور **كمال بيامين أيشو** لما بذل من جهود طيبة...

ولا يفوتني أن أتقدم بالشكر والتقدير لجميع منسبي كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل
وإكل من أسهم بجهدهم أو أعان بنصح...

ولقد وجدت في إشراقة الأمل والبسمة في وجوه زوجتي وابني عوناً لي لإكمال نخشي هذا وإني لأجد
نفسني عاجزاً عن تقديم شكري وتقديري وامثنائي لهم.

وعذراً لمن فاتني ذكرهم

الباحث

الخلاصة:

أُجري في هذه الدراسة عزل وتنقية 42 عزلة من بكتريا الرايزوبيوم من العقد الجذرية لنباتات مثبتة للنايتروجين مختلفة والتي جُمعت من مناطق زراعية وبيئية مختلفة من محافظات نينوى والأنبار وبغداد ودهوك/العراق، وكانت عزلات الرايزوبيوم OJ27 و OJ29 التي عُزلت في هذه الدراسة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. لم يتم تثبيت جنسها ونوعها في المصادر لحد الآن. ولأوّل مرة في العالم تم تسجيل عزل بكتريا الرايزوبيوم OJ30 من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا *Catalpa speciosa* L. وإذ لم يتم تسجيل مثل هذه العلاقة التعايشية في العالم (على حد علمنا) كما ولم يُؤشر هذا مسبقاً في المراجع العلميّة، وأظهرت الاختبارات البايوكيميائية قابلية جميع عزلات الرايزوبيا قيد الدراسة على النمو على وسط الرايزوبيا الأدنى Rhizobial Minimal Medium. كما أظهرت النتائج قدرة جميع عزلات الرايزوبيوم على استغلال السترات كمصدر وحيد للكربون، ماعدا العزلات *R. grahamii* OJ26, OJ35 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الليوسينيا *Leucaena leucocephala* L. والعزلة OJ29 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. وتباينت قابلية العزلات على تمييع الجلاتين، كما أظهرت أغلب عزلات الرايزوبيا قيد الدراسة نتيجة موجبة لاختبار ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron، أظهرت جميع عزلات الرايزوبيوم المدروسة نتيجة موجبة لاختبار الكاتاليز والأوكسيديز، أظهرت نتائج اختبار استغلال سكريات مختلفة أنّ عزلات الرايزوبيا لها القابلية على استغلال الكلوكوز والكالكتوز والارابينوز والفركتوز والمالتوز والزيلوز واللاكتوز وبدرجات متباينة، في حين أفضل مصدر كربوني للنمو كان سكر الكحول المانيتول، وإنّ جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة أظهرت قابليتها على تحمل تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl ولحد تركيز 6.0% ما عدا العزلة *Mesorhizobium loti* OJ33 إذ كانت حساسة لملاح كلوريد الصوديوم عند هذا التركيز، فيما تباينت الحساسية والمقاومة للمضادات الحياتية المدروسة، إذ أظهرت جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة الحساسية تجاه المضاد الحيوي Ciprofloxacin بتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك تباينت مقاومة عزلات الرايزوبيا المدروسة للمعادن الثقيلة المختلفة؛ إذ أظهرت معظم العزلات تحملاً واضحاً لملاح المعدن الثقيل خلات الرصاص الثنائي $Pb(CH_3COO)_2$ وبتركيز 100 مايكروغرام/مل، وأظهرت جميع عزلات الرايزوبيا نتيجة موجبة لإنتاج جزيئات سطح الخلية وأفضل إنتاج للسكر المتعدد الخارجي كان بمعدل 280 ملغم/مل من العزلة *R. leguminosarum* bv. *viciae* OJ4. وأظهرت نتيجة دراسة الفعاليّة المضادة المايكروبية للراشح الزراعي الخام لعزلات الرايزوبيا فعاليّة لأغلب العزلات المرضية المدروسة؛ إذ بلغ أعلى

معدل قطر تثبيط 15.3 ملم عند تطبيق راشح مزرعة التخمر لبكتريا *R. grahamii* العزلة OJ31 تجاه العزلة المرضية *Klebsiella pneumoniae* AS63 في حين أعلى معدل قطر تثبيط بلغ 16.6 ملم عند تطبيق راشح مزرعة التخمر للعزلة OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا *Parkinsonia aculeata* L. تجاه العزلة المرضية لداء المبيضات *Candida albicans* AS43 وأعلى معدل قطر تثبيط بلغ 13.3 ملم عند تطبيق راشح مزرعة التخمر للعزلة OJ6 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* تجاه العزلة الممرضة للنبات *Aspergillus niger* BI1، وأظهرت نتائج تطابق تسلسل القواعد النايتروجينية للجين 16S rRNA لأربع عزلات رايزوبية منتخبة، وهي العزلة الأولى OJ27 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل والعزلة الثانية OJ30 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا والعزلة الثالثة OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا والعزلة الرابعة OJ32 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الالبيزيا، ان نسبة التطابق للعزلات كانت للعزلة الأولى OJ27 98.55% مع العزلة القياسية *Rhizobium nepotum* 39/7 NR 117203.1، أمَّا العزلة الثانية OJ30 فقد تطابقت بنسبة 98.12% مع العزلة القياسية *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370 NR_118339.1، وفيما يخص العزلة الثالثة فقد تطابقت وبنسبة 98.42% مع العزلة القياسية *Rhizobium glycinendophyticum* NR_165782.1. أمَّا العزلة الرابعة فقد تطابقت وبنسبة 97.89% مع العزلة القياسية *Rhizobium leguminosarum* strain LMG 14904.

ثبت المحتويات

الصفحة	الموضوع
أ	الخلاصة
نا	ثبت المحتويات
ز	ثبت الجداول
س	ثبت الأشكال
ش	ثبت الصور
ص	ثبت المختصرات
الفصل الأوّل المقدمة	
1	المقدمة
3	أهداف هذه الدراسة
الفصل الثاني استعراض المراجع	
5	1-2 النباتات المثبتة للنايتروجين
5	1-1-2 النباتات البقولية
5	1-1-1-2 اللوبيا
5	2-1-1-2 الحلبة
6	3-1-1-2 العدس
6	4-1-1-2 الحمص
6	5-1-1-2 الفاصوليا

6	6-1-1-2 الهرطمان
7	7-1-1-2 فول الصويا
7	8-1-1-2 الجت
7	9-1-1-2 الماش
8	10-1-1-2 الليوسينيا
8	11-1-1-2 السيسبان
8	12-1-1-2 خف الجمل
9	13-1-1-2 الباركنسونيا
9	14-1-1-2 الالبيزيا
9	2-1-2 النباتات غير البقولية
9	1-2-1-2 الكاتالبا
10	2-2 بكتريا الرايزوبيوم
11	3-2 تصنيف الرايزوبيا
11	1-3-2 عائلة الـ <i>Rhizobiaceae</i>
12	1-1-3-2 جنس الـ <i>Rhizobium</i>
13	2-1-3-2 جنس الـ <i>Ensifer</i>
14	3-1-3-2 جنس <i>Shinella</i>
14	4-1-3-2 جنس الـ <i>Neorhizobium</i>
14	2-3-2 عائلة الـ <i>Phyllobacteriaceae</i>
14	1-2-3-2 جنس الـ <i>Mesorhizobium</i>
15	4-2 إصابة بكتريا الرايزوبيوم للنبات
16	5-2 تبادل الإشارات المبكرة ما بين النباتات البقولية وبكتريا الرايزوبيوم

17	6-2 إشارات عامل التعقيد والمسار العام التعايشي
17	7-2 الفلافونويدات كإشارات للرايزوبيا
18	8-2 جينات تثبيت النايروجين
18	9-2 جينوم الرايزوبيوم
19	1-9-2 الحامض النووي الكروموسومي
21	2-9-2 البلازميدات التكافلية
23	10-2 السكريات المتعددة الرايزوبية
24	11-2 السكر المتعدد الخارجي الرايزوبي
25	12-2 التركيب الكيميائي للسكر المتعدد الخارجي لبكتريا <i>Ensifer meliloti</i>
26	13-2 دور السكريات المتعددة الخارجية الرايزوبية في العلاقة التعايشية
27	14-2 أهمية السكريات المتعددة الخارجية الرايزوبية في مجالات أخرى
28	15-2 مقاومة المضادات الحياتية
30	16-2 مقاومة المعادن الثقيلة
32	17-2 البكتريوسينات
33	18-2 البكتريا المرضية قيد الدراسة
33	<i>Escherichia coli</i> 1-18-2
34	<i>Staphylococcus aureus</i> 2-18-2
35	<i>Salmonella typhi</i> 3-18-2
35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4-18-2
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5-18-2
37	19-2 أنواع الفطريات المرضية قيد الدراسة
37	<i>Aspergillus niger</i> 1-19-2

37	<i>Fusarium solani</i> 2-19-2
38	<i>Penicillium</i> spp. 3-19-2
38	<i>Candida albicans</i> 4-19-2
39	20-2 الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا تجاه العزلات المرضية
40	21-2 تفاعل البلمرة المتسلسل PCR
41	22-2 خطوات تقنية الـ PCR
الفصل الثالث	
المواد وطرائق العمل	
43	1-3 الأجهزة والمواد المستخدمة
44	2-3 الأوساط الغذائية
44	1-2-3 وسط المانيتول ومستخلص الخميرة
44	2-2-3 وسط التربتون ومستخلص الخميرة
44	3-2-3 وسط الرايزوبيا الأدنى
45	4-2-3 وسط الجيلاتين
45	5-2-3 وسط سيمون ستريت
45	6-2-3 وسط الحديد والسكريات الثلاثية
45	7-2-3 وسط السكريات
45	8-2-3 وسط اختبار الحركة
45	9-2-3 وسط آكار الماكونكي
45	10-2-3 وسط الآكار المغذي
46	11-2-3 وسط المرق المغذي

46	12-2-3 وسط آكار الدم
46	13-2-3 وسط ايوسين مثيلين الأزرق
46	14-2-3 وسط مولر-هنتون
46	15-2-3 وسط سابرويد دكستروز الصلب
46	16-2-3 وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار
47	3-3 قياس الدالة الحامضية
47	4-3 التعقيم
47	5-3 الكواشف والصبغات والمحاليل
47	1-5-3 كاشف الكاتاليز
47	2-5-3 كاشف الاوكسيدز
47	3-5-3 المحلول الوظيفي
48	4-5-3 صبغة كرام Gram stain
48	6-3 عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية للنباتات المثبتة للنايتروجين
52	7-3 تنقية العزلات البكتيرية بطريقة التخطيط
53	8-3 اِدامة عزلات الرايزوبيوم
53	9-3 الجراثيم المرضية المدروسة
53	10-3 الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا الرايزوبيوم
53	1-10-3 اختبار صبغة كرام
54	2-10-3 اختبار الحركة
54	3-10-3 قابلية نمو عزلات الرايزوبيا على وسط الرايزوبيا الأدنى
54	4-10-3 اختبار استهلاك السترات
55	5-10-3 اختبار تمييع الجيلاتين

55	3-10-6 اختبار النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد
55	3-11-7 اختبار الكاتاليز
55	3-11-8 اختبار إنتاج أنزيم الاوكسيديز
56	3-11-11 استغلال عزلات الرايزوبيا لسكريات مختلفة
56	3-12-12 تحمل عزلات الرايزوبيا لكلوريد الصوديوم
56	3-13-13 اختبار مقاومة عزلات الرايزوبيا للمضادات الحياتية
57	3-14-14 اختبار مقاومة عزلات الرايزوبيا للمعادن الثقيلة
57	3-15-15 اختبار إنتاج جزيئات سطح الخلية لعزلات بكتريا الرايزوبيوم
57	3-15-1 اختبار إنتاج كلوكونات (1→2) β الحلقيية
58	3-15-2 اختبار إنتاج كلوكونات (1→3) β الحلقيية
58	3-15-3 اختبار إنتاج ليبيفات السليلوز
58	3-16-16 إنتاج السكريات المتعددة الخارجية لعزلات بكتريا الرايزوبيا
59	3-16-1 تحضير لقاح عزلات الرايزوبيا
59	3-16-2 تحضير الوسط الزراعي لإنتاج السكر المتعدد الخارجي
59	3-17-17 طرائق التحليل
59	3-17-1 ضبط وقياس الرقم الهيدروجيني
60	3-17-2 تقدير إنتاج الكتلة الحيوية لعزلات الرايزوبيا
60	3-17-3 استخلاص وتقدير كتلة السكر المتعدد الخارجي
60	3-18-18 اختبار الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيوم
61	3-18-1 تحضير راشح المعلق الخالي من خلايا بكتريا الرايزوبيوم
61	3-18-2 اختبار منطقة تثبيط البكتريا المرضية داخل الزجاج
62	3-18-3 اختبار منطقة تثبيط داء المبيضات المرضية داخل الزجاج

62	3-18-4 اختبار التثبيط داخل الزجاج للفطريات الخيطية
63	3-19 استخلاص وتنقية الحامض النووي الجينيومي من عزلات بكتريا الرايزوبيوم
64	3-20 عملية الترحيل الكهربائي للحامض النووي الديوكسي رايبوزي باستعمال هلام الأكاروز
65	3-21 التقانات الخاصة بالتفاعل التضاعفي لسلسلة الحامض النووي
66	3-22 التشخيص الجزيئي لبكتريا الرايزوبيوم بالاعتماد على الجين 16S rRNA
67	3-23 استخلاص الحامض النووي من هلام الأكاروز
68	3-24 تحديد تتابع النيوكليوتيدات للجين 16S rRNA باستعمال تقنية الـ DNA Sequencing
68	3-25 التحليل الإحصائي
الفصل الرابع	
النتائج والمناقشة	
69	4-1 عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية للنباتات المثبتة للنايتروجين
72	4-2 الاختبارات التشخيصية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة
72	4-2-1 الصفات المظهرية والزراعية لعزلات الرايزوبيا المدروسة
73	4-2-2 الاختبارات البايوكيميائية لتشخيص عزلات الرايزوبيا المدروسة
76	4-3 قابلية عزلات بكتريا الرايزوبيوم لأستغلال السكريات المختلفة
79	4-4 اختبار تحمل عزلات الرايزوبيا لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم
81	4-5 مقاومة عزلات بكتريا الرايزوبيا للمضادات الحياتية
86	4-6 مقاومة عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة المعادن الثقيلة
91	4-7 اختبار إنتاج جزيئات سطح الخلية لعزلات بكتريا الرايزوبيا
93	4-8 تقدير كمية السكر المتعدد الخارجي لعزلات بكتريا الرايزوبيا
97	4-9 الفعالية المضادة الميكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات من البكتريا المرضية

106	10-4 الفعالية المضادة الميكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات من الفطريات المرضية
114	11-4 استخلاص وتوصيف الـ DNA المورث من مجاميع عزلات الرايزوبيا المحلية قيد الدراسة باستعمال الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز
115	12-4 تقانة التفاعل التضاعفي للمورث 16S rRNA
117	13-4 تحديد تسلسل القواعد النايروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص PCR
الفصل الخامس	
الاستنتاجات والتوصيات	
124	الاستنتاجات والتوصيات
125	المصادر
A	Summary

ثبت الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
(1-3)	الأجهزة والمواد المستعملة في الدراسة	43
(2-3)	مكونات مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بتضخيم الجين 16 S rRNA	66
(3-3)	البيانات الخاصة والمستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR	66
(4-3)	مراحل عمل جهاز Thermocycler	67
(1-4)	أرقام عزلات الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة والاسم العلمي لبكتريا الرايزوبيا والنباتات المضيفة لها ومناطق جمع النباتات	70
(2-4)	الاختبارات الكيموحيوية والحركة لتشخيص عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة	75
(3-4)	قابلية استهلاك عزلات الرايزوبيا المعزولة لسكريات مختلفة	78
(4-4)	قابلية تحمل عزلات الرايزوبيا المدروسة لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl	80
(5-4)	مقاومة وحساسية عزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة للمضادات الحيوية	82
(6-4)	مقاومة عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة للمعادن الثقيلة	87
(7-4)	اختبار إنتاج جزيئات سطح الخلية لعزلات بكتريا الرايزوبيا	92
(8-4)	إنتاج السكر المتعدد الخارجي لعزلات الرايزوبيا المدروسة في وسط YEM السائل	95
(9-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات من البكتريا المرضية على وفق معدل قطر منطقة التثبيط (ملم)	98
(10-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات من الفطريات المرضية على وفق معدل قطر منطقة التثبيط (ملم)	107

ثبت الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
(1-2)	تصنيف بكتريا الرايزوبيا	12
(2-2)	السيطرة الهرمونية لتثبيت النايتروجين بشكل تعايشي ما بين بكتريا الرايزوبيوم والنباتات البقولية المضيفة	15
(3-2)	رسم تخطيطي يوضح السكريات المتعددة الموجودة على بكتريا الرايزوبيوم	24
(3-2)	التركيب الكيميائي للسكر المتعدد الخارجي (EPS) الرايزوبي لبكتريا <i>E. meliloti</i>	25
(1-4)	الترحيل الكهربائي لمحتوى الحامض النووي الذي اوكسي رايبوزي (DNA) الجينومي في هلام الأكاروز بتركيز 1.0% لعشرة عزلات رايزوبيا منتخبة قيد الدراسة	114
(2-4)	نتائج تفاعل البلمرة المتسلسلة PCR باستعمال البادئات المتخصصة لبكتريا الرايزوبيوم.	116
(3-4)	المخطط التشجري للانماط الوراثية باستعمال نتائج تسلسل القواعد النايتروجينية 16 rRNA للعزلة الأولى باستعمال برنامج Mole Blast.	120
(4-4)	المخطط التشجري للانماط الوراثية باستعمال نتائج تسلسل القواعد النايتروجينية 16 rRNA للعزلة الثانية باستعمال برنامج Mole Blast.	121
(5-4)	المخطط التشجري للانماط الوراثية باستعمال نتائج تسلسل القواعد النايتروجينية 16 rRNA للعزلة الثالثة باستعمال برنامج Mole Blast.	122
(6-4)	المخطط التشجري للانماط الوراثية باستعمال نتائج تسلسل القواعد النايتروجينية 16 rRNA للعزلة الرابعة باستعمال برنامج Mole Blast.	123

ثبت الصور

رقم الصورة	عنوان الصورة	الصفحة
(1-3)	النباتات التي تم عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية التابعة لها والتي تم التطرق لها لأول مرة محليا.	50
(2-3)	العقد الجذرية (Root nodules) على جذور النباتات البقولية المعزولة من مناطق مختلفة من محافظات نينوى والنجار وبغداد ودهوك_كرديستان/العراق	51
(1-4)	صورة توضح كل من اختبار صبغة كرام واختبار الحركة	73
(2-4)	عزلات الرايزوبيا المحلية المدروسة التي أظهرت إنتاج وافر من السكر المتعدد الخارجي (EPS) والمزروعة على وسط YEM	94
(3-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة المرضية <i>Klebsiella pneumoniae</i>	101
(4-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة المرضية <i>Salmonella typhi</i>	102
(5-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة المرضية <i>Staphylococcus aureus</i>	103
(6-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة المرضية و <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	104
(7-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة المرضية <i>E. coli</i>	105
(8-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه عزلة داء المبيضات <i>C. albicans</i>	110
(9-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة المرضية <i>Aspergillus niger</i>	111
(10-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة المرضية <i>Fusarium solani</i>	112
(11-4)	الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة المرضية <i>Penicillium spp.</i>	113

ثبت المختصرات

المختصر	المصطلح
AMS	Antimicrobial substances
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
EPSs	Exopolysacchraides
EMB	Eosin methylene blue agar
Fix gene	Fixation gene
GC	Guanine/Cytosine
HIV-1	Human Immunodeficiency Viruses
Kbp	Kilo base pair
LAB	Lactic acid bacteria
Mbp	Mega base pair
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MC	Mcfarland
NCBI	National Center For Biotechnology Information
Nod gene	Nodulation gene
N.S	Normal saline
nod	Nodulation
Nif	Nitrogen Fixation gene
PCR	Polymerase chain reaction
pSym	Symbiosis plasmid
PHB	Poly-β-hydroxybutyrate
RMM	Rhizobial Minimal Media
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SDA	Saboiraud Dextrose Agar
TBE	Tris-Borate-EDTA-buffer
TSI	Triple sugar iron
TY	Treptone Yeast Extract
UTI	Urinary Tract Infection
YEMA	Yeast Extract Mannitol Agar
YEMB	Yeast Extract Mannitol Broth

الفصل الأوَّل

المقدِّمة

Introduction

الفصل الاول

المقدمة: Introduction

يتضمن التثبيت الحيوي للنايتروجين (B.N.F.) Biological nitrogen fixation تحويل النايترودجين الجوي بواسطة مجموعة من كائنات بدائية النواة من ضمنها بكتريا الرايزوبيا وCyanobacteria ويطلق عليها جميعاً بالـ Diazotrophs. يمكن تقسيم البكتريا المثبتة للنايتروجين بالاعتماد على مدى المشاركة أو المرافقة مع النباتات إلى ثلاثة أقسام رئيسية:

1. حرة المعيشة مثل: *Azotobacter vinelandii* و *Klebsiella pneumoniae* و *Rhodospirillum rubrum*.

2. المشاركة للنباتات مثل: *Azospirillum spp.*

3. تعايشية مثل: *Ensifer* و *Rhizobium* و *Bradyrhizobium* و *Azorhizobium* و *Frankia* (Berrada and Fikri-Benbrahim, 2014).

تعدُّ بكتريا الرايزوبيوم *Rhizobium* من الأحياء المجهرية التي تعيش في التربة وتمتاز بميزة فريدة وهي قابليتها على المثول حول جذور النباتات البقولية والنباتات المضيفة لها، وتصيب بكتريا الرايزوبيوم جذور النباتات المضيفة لها؛ لذا تؤدي إلى تحفيز وتكوين العقد الجذرية على جذور هذه النباتات. داخل هذه العقد الجذرية تتم عملية التثبيت الحيوي للنايتروجين من ما يعرف بالبكترويدات *Bacteroides* وهو الشكل المحور للرايزوبيوم. إذ تقوم البكترويدات باختزال النايترودجين الجوي إلى أمونيا الذي يستغل من النبات المضيف في عملية التغذية (Long, 1989). فضلاً عن عملية التثبيت الحيوي للنايتروجين، أشارت دراسات عديدة إلى إمكانية استعمال بكتريا الرايزوبيوم كعامل سيطرة حيوية تجاه الأحياء المجهرية الممرضة التي توجد في التربة (Parveen et al., 2019). كما ان لبكتريا الرايزوبيا خصائص فريدة من حيث تحملها للمعادن الثقيلة فضلاً عن قابليتها على إزالة سموم أملاح المعادن الثقيلة (Lebrazi and Fikri-Benbrahim, 2018). وقد أشارت البحوث إلى أنّ لجزيئات سطح خلية الرايزوبيوم دوراً مميزاً في الأحداث المبكرة لإصابة النباتات البقولية المضيفة، فقد أظهرت البحوث أنّ للسكر المتعدد الخارجي (EPS) Exopolysaccharide دور مميز في عملية تكوين واستطالة خيط الإصابة خلال غزو العقد الجذرية (Oldroyd et al., 2011). كذلك أشارت البحوث إلى إمكانية التطبيقات للسكر المتعدد الخارجي الرايزوبي في مجالات مختلفة وكما هو الحال مع بقية السكريات المتعددة المايكروبية التي لها أهمية كبيرة في الصناعات

الطبية والصيدلانية والغذائية والزراعية (Rana and Upadhyay, 2020). في السنوات الأخيرة تم أحداث تغييرات كبيرة وجوهية في تصنيف بكتريا الرايزوبيا نتيجة لإضافة أجناس وأنواع جديدة لهذه البكتريا المميزة، إذ إن الدراسات الأخيرة أظهرت وجود تنوع كبير ما بين البكتريا المثبتة للنتروجين والمعرولة من نباتات بقولية مختلفة، إذ يوجد حالياً أكثر من 98 نوع التي تعود إلى 14 جنس α و β و γ لـ Proteobacteria التي وصفت على أنها بكتريا الرايزوبيوم. إذ يضم الصنف α -proteobacteria عدة عوائل أهمها عائلة الـ *Rhizobiaceae* والتي تضم كل من الأجناس الآتية: *Rhizobium* و *Ensifer* (سابقاً *Sinorhizobium*) و *Shinella* و *Neorhizobium*. في حين يضم الصنف الثاني β -Proteobacteria عائلة الـ *Burkholderiaceae*. أما الصنف الثالث γ -Proteobacteria والذي يضم بدوره عائلة واحدة هي *Pseudomonaceae*. إذ إن جميع الأجناس التي ذكرت تعرف بمتعايشات النباتات البقولية. وتشير الدلائل العلمية إلى أنه لازال هنالك الكثير من أنواع بكتريا الرايزوبيا ينتظر الكشف عنه لظالماً أن 23% فقط من النباتات المثبتة للنايتروجين تم تشخيصها بشكل خاص التي تدخل بعلاقات تكافلية مع بكتريا الرايزوبيوم، واكتشاف متعايشات بكتريا الرايزوبيا جديدة ضروري جداً لإعطاء رؤية بعيدة الأمد لتصنيف الرايزوبيا (Berrada and Fikri-Benbrahim, 2014).

من خلال الفحص المجهرى تمتاز خلايا البكتريا التابعة لعائلة *Rhizobiaceae* بأنها سالبة لصبغة كرام، خلاياها عصوية الشكل، تعيش في التربة، هوائية، أبعادها تبلغ ما بين 0.5-0.9 × 1.2 - 3 مايكروميتر (Vincent et al., 1979). بكتريا الرايزوبيوم تخزن داخل خلاياها حبيبات Poly β -hydroxybutyrate، غير مكونة السبورات وتتحرك بواسطة أسواط تتوزع حول جسم الخلية أو بواسطة أسواط قطبية الموقع أو تحت قطبية توجد على هيئة أزواج أو مفردة (Jordan and Allen, 1974). عند استعمال المانيتول Mannitol بوصفه مصدر للكربون والطاقة، وخلصا الخميرة Yeast extract بوصفها مصدر للنايتروجين، فضلاً عن بعض الأملاح غير العضوية فان بكتريا الرايزوبيوم تنمو على هيئة مستعمرات شفافة لزجة أو مخاطية القوام على الأوساط الغذائية الصلبة (Burdass, 2002). ودرجة الحرارة المثلى لنمو بكتريا الرايزوبيوم تبلغ من 28-31°م، والعديد منها لا تتمكن من النمو عند درجة حرارة 37°م، والذالة الحامضية (pH) تكون ما بين 5.0-8.5 (Graham, 1992).

فيما يخص جينوم بكتريا الرايزوبيوم، فقد تم دراسته إذ تم تحديد التسلسل النيوكليوتيدي الكلي فضلاً عن دراسة البلازميدات التعايشية لها فقد وجد في جنس الـ *Rhizobium* وأنواع من جنس الـ *Ensifer* أنها تحتوي على الجينات الخاصة بالتحفيز على تكوين العقد الجذرية *nod genes* والجينات الخاصة بالثبوت الحيوي للنايتروجين *fix genes* و *nif genes* التي تقع على بلازميد يطلق عليه بالبلازميد التكافلي العملاق Symbiotic plasmid، إذ تمتلك البكتريا *Ensifer meliloti* اثنين من البلازميدات العملاقة واللذان يمثلان نصف الجينوم الخاص بها تقريباً ويطلق على الأول Mega plasmid A الذي يصل حجمه إلى 1.35 Mbp أما الثاني فيطلق عليه Mega plasmid B الذي يصل حجمه إلى 1.68 Mbp. إذ ان وظيفة البلازميد العملاق Mega plasmid A تكافلية ويحتوي على جينات *nod genes* و *nif genes* و *fix genes* في حين ان البلازميد العملاق الثاني Mega plasmid B يحمل جينات ضرورية لإنتاج السكريات المتعددة الخارجية التي لها دور مميز في العلاقة التعايشية لهذه الأنواع. أشارت دراسة سابقة أن سلالتين من جنس الـ *Rhizobium* تمتلك بلازميدات أقل حجماً ولكنها متعددة إذ وجد ان السلالة *R. leguminosarum* 3841 تحتوي على ستة بلازميدات وتمثل 40% من الجينوم الكلي تقريباً الذي يصل حجمه إلى 7.8 Mbp أما السلالة الثانية *R. etli* CFN42 فانها تحتوي على ستة بلازميدات تعايشية صغيرة أيضاً تمثل ثلث حجم الجينوم الكلي تقريباً الذي يصل حجمه إلى 6.5 Mbp (Iyer and Rajkumar, 2018).

أهداف هذه الدراسة:

هدفت هذه الدراسة إلى تحقيق كل ما يأتي:

1. عزل سلالات من بكتريا الرايزوبيا المختلفة والعائدة إلى عائلة الـ *Rhizobiaceae* من العقد الجذرية لنباتات بقولية ومضيفة مختلفة كما تضمنت الدراسة التحري عن نباتات أخرى غير بقولية تميزت بوجود عقد جذرية على جذورها وعزل بكتريا الرايزوبيا منها والمزروعة في مناطق زراعية وبيئية مختلفة لأكثر من محافظة في القطر. وتشخيصها بالاعتماد على الصفات المظهرية والمزرعية فضلاً عن إجراء الاختبارات البايوكيميائية المختلفة لها.
2. إجراء اختبار المقاومة والحساسية للمضادات الحياتية والمعادن الثقيلة ولمختلف العزلات قيد الدراسة وبالاعتماد على النتائج يمكن تحديد العلام الوراثية Genetic markers.

3. دراسة الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا قيد الدراسة تجاه عدد من عزلات البكتريا الممرضة للإنسان وبعض عزلات الفطريات الممرضة للنبات والإنسان وذلك بتحديد قطر منطقة التثبيط.
4. دراسة قابلية عزلات الرايزوبيا قيد الدراسة على إنتاج السكر المتعدد الخارجي (Rhizobial exopolysaccharide) وانتخاب العزلات ذات الإنتاج الغزير منها وذلك بالاعتماد على القوام اللزج أو المخاطي على الوسط الصلب.
5. التشخيص الجزيئي لعدد عزلات الرايزوبيا المدروسة وتحديد تسلسل القواعد النايروجينية وذلك من خلال دراسة نواتج التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR من أجل مقارنتها مع التسلسلات القياسية المؤرشفة في بنك الجينات (الأمريكي)؛ وذلك من أجل الكشف عن مدى التطابق والاختلاف الوراثي بين العزلات المنتخبة في هذه الدراسة والعزلات المثبتة في بنك الجينات.

الفصل الثاني
استعراض المراجع
**literature
review**

الفصل الثاني استعراض المراجع

1-2 النباتات المثبتة للنيتروجين: *Plants fixer nitrogen*

1-1-2 النباتات البقولية: *The leguminous plants*

إنَّ العائلة البقولية Legumenaceae من أبرز العوائل النباتية؛ إذ تنتشر بشكل واسع وتسمى أيضا باسم Fabaceae إذ تتميز نباتات العائلة البقولية بإنتاجها بذور ذات محتوى عالي من البروتين وان أغلب أجناس هذه العائلة لها القدرة على تثبيت النيتروجين عن طريق تكوين العقد الجذرية وبشكل تكافلي مع بكتريا الرايزوبيوم الموجودة في التربة، إذ تضم هذه العائلة 135 جنس و2800 نوع تقريبًا تنتشر في كل أنحاء العالم (Iyer and Rajkumar, 2018).

1-1-1-2 اللوبيا: *Vigna unguiculata L.*

تُعدُّ اللوبيا Cowpea (*Vigna unguiculata L.*) من أكثر أجناس نباتات العائلة البقولية Fabaceae انتشارًا بعد نبات الباقلاء، إذ تحتوي بذور نبات اللوبيا على نسبة من البروتينات تبلغ بين 22-33 % ونسبة 56.53-57.36 % من المواد الكربوهيدراتية، فضلًا عن تحملها للملوحة (Sebuwufu, 2013)، كما تساعد اللوبيا على تحسين خواص التربة كونها من النباتات التي تعمل على تثبيت النيتروجين الجوي لذلك فهي تؤدي دورًا مميزًا في توفير النيتروجين للنباتات الأخرى عند زراعتها بالتناوب معها خاصة في المناطق التي تقل فيها خصوبة التربة، ممَّا يقلل من كميات الأسمدة النيتروجينية الكيميائية المضافة (Sheahan, 2012) فضلًا عن ذلك فإنَّ زراعة هذا المحصول تقلل من الأثر الضار لاستعمال الاسمدة الكيميائية (Jensen et al, 2012).

2-1-1-2 الحلبة: *Trigonella foenum-graecum*

يُعدُّ نبات الحلبة Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) أحد النباتات المهمة إذ تستخدم بذور الحلبة في علاج مرض النقرس والروماتيزم وعلاج الإمساك والربو وآلام الظهر وزيادة إدرار الحليب لدى النساء المرضعات وفقر الدم وزيادة السمنة، فهو يوفر الألياف الغذائية الطبيعية والعناصر الغذائية الأخرى المطلوبة في جسم الإنسان، يساعد هذا أيضًا في تثبيت النيتروجين وتحسين التربة وتحتوي بذور الحلبة على زيوت متطايرة وقلويدات ثبت أنها سامة للبكتيريا والطفيليات والفطريات، (Thomas et al., 2011).

Lens esculentum L.

3-1-1-2 العدس:

يُعدُّ العدس *Lens esculentum* L. من المحاصيل الاقتصادية المميّزة، إذ يحتوي على كميات كبيرة نسبياً من السعرات الحرارية والمواد الكربوهيدراتية والبروتينات مقارنة بالبقوليات الأخرى، ويعد كذلك الأكثر رواجاً بسبب المحتوى العالي من البروتين إذ تقدر كمية البروتين الموجودة فيه بحدود 23-25%، كما يحتوي على الكالسيوم والمغنيسيوم والفسفور والزنك والحديد والألياف، والعدس يحتوي على الماء بنسبة 11% كذلك فإنّ نبات العدس يوفر للجسم جزء من فيتامين A و B ويسد النقص الحاصل في البروتين الحيواني (Zafar et al., 2003).

Cicer arietinum L.

4-1-1-2 الحمص:

يُعدُّ الحمص Chickpea (*Cicer arietinum* L.) من النباتات الاقتصادية المميّزة جداً، كما يُعدُّ الأكثر استعمالاً في الشرق الأوسط ويحتل المرتبة الثالثة في العالم من حيث الأهمية بعد البازليا والبقلاء وذلك بسبب ارتفاع نسبة هضم البروتين فيه مقارنة بالبقوليات الأخرى وارتفاع نسبة الأحماض الأمينية الأساسية، إذ يعمل على زيادة خصوبة التربة عن طريق تثبيت النتروجين الجوي (Bejandi et al., 2012)، لأنّ مجموعته الجذري يمتد عميقاً في التربة، الأمر الذي يمكنه من الوصول إلى الماء الموجود في الأعماق البعيدة في التربة (Jan, 2010).

Phaseolus vulgaris L.

5-1-1-2 الفاصوليا:

تعد الفاصوليا الخضراء Green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) من النباتات ذات القيمة الغذائية المهمة؛ إذ تُعدُّ قارة أمريكا الجنوبية موطنها الاصلي وتُعدُّ الفاصوليا من المحاصيل الغنية بالمواد الكربوهيدراتية والفيتامينات والالياف وتحتوي على عدد من المعادن مثل الكالسيوم والمغنيسيوم والحديد والنحاس والزنك كما تحتوي على بعض المركبات المميّزة للجسم مثل الفلافونيدات والكاروتينات وكذلك لها دور مميّز في تثبيت النتروجين الجوي عن طريق العقد الجذرية ومن ثمّ تحسين خصوبة التربة (Laura et al., 2010).

Lathyrus sativus L.

6-1-1-2 الهرطمان:

يُعدُّ نبات *Lathyrus sativus* L. أو البازلاء العشبية Grass pea الذي يضم بحدود 160 نوعاً من النباتات ذات القيمة الغذائية العالية وينتشر جنس *Lathyrus* في جميع أنحاء

العالم. إذ تُعدُّ البازلاء العشبية من المحاصيل المميّزة التي تتميز بمكانتها في الدورات الزراعيّة وكمصادر للغذاء والأعلاف منذ العصور القديمة إذ تمتلك البازلاء العشبية إمكانات إنتاجية عالية وتُعدُّ من أكثر المصادر الواعدة غير المستغلة من السرعات الحرارية والبروتين للسكان في المناطق المعرضة للجفاف والهامشية في آسيا وأفريقيا (Hillocks and Maruthi, 2012) كما يمكن أن توفّي البقوليات العلفية دورًا مميّزًا في الحفاظ على إنتاجية نظام الزراعة القائم على الحبوب في بلدان البحر الأبيض المتوسط خاصة في بيئة شبه قاحلة (Laghari et al., 2016).

***Glycine max L.* 7-1-1-2 فول الصويا:**

يعد محصول فول الصويا *Glycine max L.* من المحاصيل ذات الأهمية الغذائية والصناعية الكبيرة في معظم دول العالم، ويأتي الاهتمام به لكونه المحصول الوحيد الذي تحتوي بذوره على كافة الأحماض الأمينية الأساسية لنمو الإنسان والحيوان، وتحتوي بذوره على نسبة عالية من الزيت تقع ما بين 14-24% ونسبة البروتين تبلغ ما بين 30-50% إذ يستخدم من قبل الأشخاص المصابين بمرض السكر؛ لأنّ نسبة النشا تكون قليلة فيه كما يعمل على زيادة وتحسين خصوبة التربة عن طريق تثبيت النروجين الجوي (Vahedi, 2011).

***Medicago sativa L.* 8-1-1-2 الجت:**

يُعدُّ نبات الجت *Medicago sativa L.* من المحاصيل العلفية الخضر التي تزرع في مناطق زراعية مختلفة في العراق ويُعدُّ من أبرز محاصيل العلف البقولية على مستوى العراق والعالم، وهو من النباتات العشبية المعمرة؛ إذ تتميز هذه النباتات بامتلاكها جذور وتدية تمتد عميقًا في التربة، إذ يكون نمو الجذور أسرع في الأرض من بقية أجزاء النبات العلوية (Lesins and Lesins, 1979)، ويمتاز نبات الجت بإنتاجيته العالية وقيّمته الغذائية المرتفعة، وهو مصدر بروتيني مميّز في علف الدواجن، فضلًا عن دوره المميّز في تحسين خصوبة التربة (علي، 2006).

***Vigna radiata L.* 9-1-1-2 الماش:**

يُعدُّ نبات الماش *Mungbean (Vigna radiata L.)* من النباتات العشبية البقولية تكون بذوره ذات شكل إسطواني ولونها أخضر ويزرع في أغلب محافظات العراق وتُعدُّ حبوبه

مصدرًا بروتينيًا مميّز ورخيصة الثمن؛ إذ تبلغ نسبة البروتين فيه 19-29% كما تحتوي حبوبه على الفيتامينات والكاربوهيدرات والعناصر المعدنية مثل الحديد والزنك والكالسيوم فضلًا عن احتوائه على مركبات الـ Isoflavonoides المضادة للأمراض الميكروبية والسرطانية وكذلك المضادة للأكسدة وتُعدُّ حبوب الماش مميّزة إذ تستخدم كغذاء للإنسان وعلف للحيوانات وكذلك يدخل في الدورات الزراعيّة وذلك لكونه يعمل على تثبيت النايروجين وتحسين خصوبة التربة، (Kole, 2011).

10-1-1-2 الليوسينيا: *Leucaena leucocephala* L.

يعرف نبات الليوسينيا *Leucaena leucocephala* L. باسم الشجرة المعجزة والتي قد يصل ارتفاعها الى 20 متر وتُعدُّ أوراق وقرون هذا النبات من المحاصيل العلفية المفضلة للماشية والأغنام تتميز أوراقها باحتوائها على نسبة عالية من البروتين تقدر بحدود 65 %، ولهذه الشجرة القدرة على البقاء في المناطق الجافة التي تكون تربتها من النوعية الرديئة؛ لأنها تستطيع تثبيت النيتروجين في التربة عن طريق الجذور التي تتكافل مع بكتريا الرايزوبيوم وتُعدُّ الاخشاب والأوراق والأغصان النخيفة ذات قيمة علاجية مميّزة (Tadros et al., 2011).

11-1-1-2 السيسبان: *Sesbania herbacea* L.

تُعدُّ شجرة السيسبان *Sesbania herbacea* L. من النباتات البقولية ويشتمل جنس *Sesbania* على ما يقدر بـ 70 نوعًا وقد يصل ارتفاعها إلى 7 أمتار تكون قوية لكنّها قصيرة العمر؛ تتميز شجرة السيسبان بقدرتها على تحسين خصوبة التربة وذلك عن طريق تثبيت النايروجين وتشكل عقيدات مثبتة للنيتروجين على الجذور وهي شجرة ذات قيمة غذائية؛ إذ إنّ زهورها تصلح للاكل. سُجّلت العقد الجذرية لـ 27 نوعًا من 70 نوعًا في نبات السيسبان، وأجريت دراسات مكثفة وذلك للتعرف على الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من العقد الجذرية لنبات *S. herbacea* من الحقول التي غمرتها الفيضانات على أنها *Neorhizobium huautlense* (Wang, 2000).

12-1-1-2 خف الجمل: *Bauhinia purpurea* L.

تُعدُّ شجرة خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. من النباتات التي تنتمي إلى البقوليات لكن الموطن الأصلي لشجرة خف الجمل هو الهند وماليزيا وبورما وجنوب الصين وفي

الوقت الحالي فُتزرع في أغلب محافظات العراق وبعض الدول العربية؛ إذ تعمل على تحسين وزيادة خصوبة التربة؛ لأنها تقوم بتثبيت النتروجين عن طريق الجذور فضلاً عن ذلك فإنَّ لأجزاء هذه الشجرة العديد من الفوائد والخصائص الاقتصادية والطبية وتتميز أوراقها بأنَّها بسيطة وتكون قمة الورقة غائرة؛ إذ تشبه خف الجمل ومن هنا أتت التسمية وتُعدُّ من أشجار الزينة لأنَّ أزهارها جميلة (Pais et al., 2012).

***Parkinsonia aculeata* L. 13-1-1-2 الباركنسونيا:**

تنتمي شجرة الباركنسونيا *Parkinsonia aculeata* L. إلى عائلة Caesalpineaceae وهي شجرة كبيرة شوكية أو شجرة صغيرة يصل ارتفاعها إلى أكثر من 4 أمتار. إذ تتميز بقدرتها على البقاء والنمو في ظل الظروف البيئية المتغيرة وفي تربة مختلفة كما تتميز بوجود أنواع مختلفة من المركبات مثل الفلافونويدات والكلايكوسيدات والقلويدات والستيرويدات والكربوهيدرات والأحماض الأمينية والدهنية الحرة (Sharma et al., 2014).

***Albizia odoratissima* L. 14-1-1-2 البيزيا:**

تعد شجرة البيزيا *Albizia odoratissima* L. من أشجار الزينة إذ يشمل هذا الجنس بحدود 150 نوعاً، معظمها من الأشجار والشجيرات التي تنتشر في المناطق المدارية؛ إذ تتميز هذه الشجرة بتحملها للجفاف والآفات (Migahed, 1996). تستخدم أوراقها كعلف للحيوانات ويُعدُّ نبات البيزيا من النباتات التي لها قيمة طبية كبيرة؛ إذ يستخدم لحاء شجرة البيزيا لعلاج السعال والتهاب الشعب الهوائية والروماتيزم ومرض السكري (Kumar et al., 2011)، تستخدم بذور البيزيا في علاج البواسير والإسهال والسيلان (Gundamaraju et al., 2014).

The non leguminous plants 2-1-2 النباتات غير البقولية

***Catalpa speciosa* L. 1-2-1-2 الكاتالبا:**

تنتمي شجرة الكاتالبا (*Catalpa speciosa* L. (Catawba Tree) إلى عائلة الشفويات Bignoniaceae ويحتوي الجنس على العديد من الأنواع، وهي إحدى أنواع الأشجار المتساقطة الأوراق العريضة في وسط وشرق الولايات المتحدة وتزرع على نطاق واسع في الصين وبعض أجزاء من أوروبا استُعملت بوصفها شجرة تظليل كبيرة للزينة وُزرعت على نطاق واسع في المناطق الحضرية كشجرة في الشوارع (Zolgharnein et al., 2015). من المعروف أن

مستخلصات الأوراق من أنواع الكاتالبا الأخرى، بما في ذلك *C. ovata* و *C. fargesii* و *C. bignonioides* و *C. bungei*، لها نشاط مضاد للأكسدة وتركيبية فينولية عالية (Xu et al., 2014).

2-2 بكتريا الرايزوبيا: Rhizobial bacteria

تشمل عائلة *Rhizobiaceae* مجموعة متنوعة وراثيا ومتباينة فسلجيا من كائنات مجهرية تعيش في التربة وبشكل عام تدعى بالرايزوبيا *Rhizobia* (Somasegaran and Hoben, 1994). أن مصطلح رايزوبيا *Rhizobia* يستخدم لوصف عدد من أجناس بكتريا التربة تتضمن: *Rhizobium* و *Bradyrhizobium* و *Mesorhizobium* و *Allorhizobium* و *Azorhizobium* التي لها القابلية على الدخول في علاقة تعايشية والتحفيز على تكوين العقد الجذرية على جذور نباتات العائلة البقولية Leguminosae (Howieson and Ballard, 2004). هناك اختلاف كبير في قابلية التخصص في التفاعل ما بين النبات البقولي المضيف مع بكتريا الرايزوبيوم قد لوحظ في أنواع مختلفة من النباتات البقولية. فبعض العلاقات التعايشية ما بين بكتريا الرايزوبيوم_النبات البقولي المضيف (*Rhizobium-legumine*) تكون متخصصة جدًا، والنبات البقولي سوف يكون عقد جذرية فقط عند حدوث الإصابة بالرايزوبيوم المتخصصة *Specific Rhizobium*، في حين أن بقوليات أخرى تكون عقد جذرية في مدى أوسع من أنواع الرايزوبيا (Broughton et al., 2000)

قسّمت بكتريا الرايزوبيا اعتمادًا على خصائص وطبيعة نموها على الوسط المغذي إلى قسمين وكما يأتي:

1. مجموعة بكتريا الرايزوبيوم بطيئة النمو *Slow growing Rhizobium*: إذ تتصف هذه المجموعة بأنها تقوم بإنتاج القلويات وتحتاج من 3-5 أيام لتنتج عكورة معتدلة في الوسط الذي تنمو فيه ويبلغ متوسط وقت تضاعف هذه المجموعة ما بين 6-7 ساعات ومعظم الخلايا تكون عصوية الشكل إمامًا حركتها فتكون بواسطة سوط قطبي واحد أو شبه قطبي .

2. مجموعة بكتريا الرايزوبيوم سريعة النمو *Fast growing Rhizobium*: تمتاز هذه المجموعة بأنها تعمل على إنتاج الأحماض التي تؤدي بدورها إلى زيادة نسبة العكورة في الوسط الذي تنمو فيه وذلك خلال مدة تبلغ ما بين 2-3 أيام إذ يبلغ متوسط تضاعف هذه المجموعة من 2-4 ساعات وخلاياها تكون عصوية الشكل أو متعددة الأشكال، إمامًا قطر

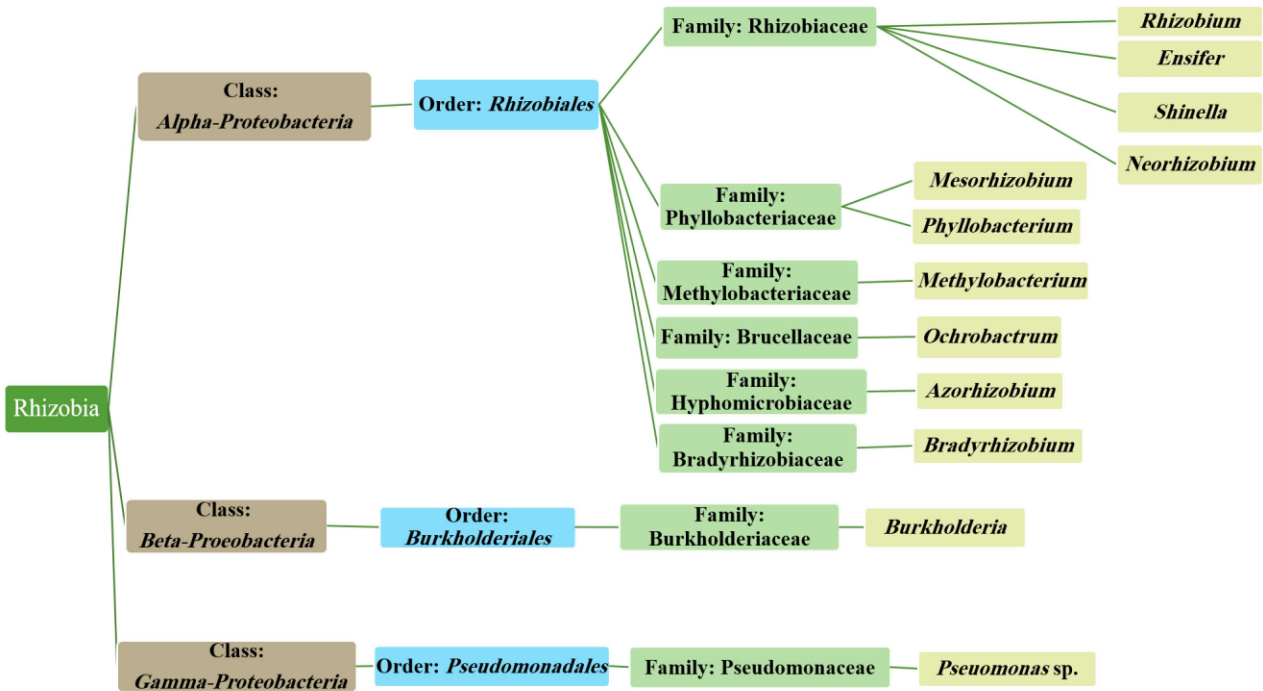
الخلايا فيبلغ ما بين 0.5-0.9 مايكرومتر أمّا طولها فيبلغ ما بين 1.2-3.0 مايكرومتر والحركة تكون بواسطة أسواط محيطية عديدة تبلغ أعدادها ما بين 2-6 أسواط (Chhetri et al., 2019).

3-2 تصنيف الرايزوبيا: Rhizobial taxonomy

يضم الصنف *Alpha-proteobacteria* رتبة *Rhizobiales* التي تضم عدة عوائل وهي: *Rhizobiaceae* و *Phyllobacteriaceae* و *Methylobacteriaceae* و *Brucellaceae* و *Hyphomicrobiaceae* و *Bradyrhizobiaceae*. تم تقسيم عائلة *Rhizobiaceae* إلى أجناس عديدة وتشمل *Rhizobium* و *Ensifer* و *Shinella*، في حين ان عائلة الـ *Phyllobacteriaceae* تضم الأجناس *Mesorhizobium* و *Phyllobacterium*، أمّا العائلة *Methylobacteriaceae* فقد ضمت جنسي *Methylobacterium* و *Microvirga*، في حين شملت العائلة *Brucellaceae* على جنس واحد هو *Ochrobactrum*، أمّا عائلة الـ *Hyphomicrobiaceae* فتضم جنسين هما *Azorhizobium* و *Devosia*. اما العائلة *Bradyrhizobiaceae* فقد ضمت جنس *Bradyrhizobium*، أمّا الصنف الثاني *Beta-Proteobacteria* فيضم رتبة *Burkholderiales* والتي تضم بدورها عائلة واحدة هي *Burkholderiaceae* التي تضم جنسي *Burkholderia* و *Cupriavidus*. في حين ان الصنف الثالث *Gamma-Proteobacteria* الذي يضم رتبة *Pseudomonadales* التي بدورها تضم عائلة واحدة هي *Pseudomonaceae* (Berrada and Fikri-Benbrahim, 2014).

3-2-1 عائلة الـ *Rhizobiaceae*

تم تقسيم عائلة الـ *Rhizobiaceae* إلى الأجناس *Rhizobium* و *Ensifer* سابقا والذي كان يعرف بـ *Sinorhizobium* (de Lajudie et al., 1994) والجنس *Shinella* (Lin et al., 2012) ووضعت الأجناس هذه في مجموعتين المجموعة الأولى هي البكتريا المشجعة على نمو النبات (PGPR) *Plant growth-promoting rhizobacteria* في حين ان المجموعة الثانية تقع ضمن الكائنات الممرضة للإنسان والحيوان اذ تشمل *Ochrobactrum* و *Brucella* و *Bartonella* او بكتريا التربة *Mycoplana*.



الشكل 1-2 يوضح تصنيف بكتريا الرايزوبيا (Berrada and Fikri-Benbrahim, 2014).

1-1-3-2 جنس الـ *Rhizobium*:

يقسم جنس بكتريا الرايزوبيوم إلى تحت جنس أول والذي يضم مجموعة تتكون من 34 نوعاً توجد في مضائف نباتية مختلفة اذ تتضمن *R. tropici* و *R. leguminosarum* ، *R. gallicum* ، (Martinez-Romero et al., 1991) ، (Amarger et al., 1997) ، *R. etli* ، (Segovia et al., 1993) ، *R. undicola* ، (de Lajudie et al., 1998) ، *R. mongolense* (Van Berkum et al., 1998) ، و عدة أنواع أخرى كانت تسمى سابقاً بـ *Agrobacterium*. والبكتريا العائدة لهذا الجنس هي بكتريا سالبة لصبغة كرام، عصوية الشكل، تتراوح أبعادها ما بين 0.5-0.9 مايكروميتر في العرض و 1.2-3.0 مايكروميتر في الطول، اذ توجد مناطق غير ملونة في داخل خلاياها عادة والسبب يعود الى وجود حبيبات بيتا-بولي هايدروكسي بيوتيريت (PHB) Poly- β -hydroxylbutyrate ، حيث ان هذه البكتريا غير مكونة للأبواغ الداخلية غير انها تتحرك بواسطة أسواط قطبية وحول قطبية تتراوح اعدادها ما بين 4-6، هوائية، تغذيتها تكون عضوية، الا انها تتغير في تغذيتها عندما تكون الظروف غير المناسبة (Prescott et al., 2007).

2-1-3-2 جنس الـ *Ensifer*:

يقع هذا الجنس ضمن تحت صنف *Al-phaproteobacteria* في رتبة *Rhizobiales* ضمن عائلة الـ *Rhizobiaceae*. سابقا كان يطلق عليه *Sinorhizobium* ومن أهم أنواع هذا الجنس نوع *E. fredii* والذي يضم ضربين الأول يعرف بـ *E. fredii* bv. *fredii* حيث تم عزل هذا النوع من العقد الجذرية لكل من النباتات الأتية: *Glycine* و *Vigna* و *Caganus* (Scholla et al., 1984). أما الضرب الثاني فيعرف بـ *E. fredii* bv. *siensis* إذ تم عزل هذا الضرب من العقد الجذرية لنبات *Glycine* (Chen et al., 1988). وكذلك النوع *E. meliloti* وتم عزل هذا النوع من العقد الجذرية لكل من النباتات الأتية: *Medicago* و *Melilotus* و *Trigonella* (Dangeard, 1926). أما النوع الثالث فيعرف بـ *E. sahelense* (de Lajudie et al., 1994) حيث تم عزله من العقد الجذرية لكل من النباتات *Medicago truncatula* و *Melilotus* (Rome et al., 1996). أما النوعان الخامس والسادس فيعرفان بـ *E. kostiense* و *E. arboris* والذان يصيبان كل من نباتي *Acacia* و *Prosopis*، على التوالي (Nick et al., 1999). وهذه البكتريا عصوية الشكل يتراوح عرضها ما بين 0.5 إلى 0.9 مايكروميتر وطولها ما بين 1.2 إلى 3.0 مايكروميتر، تتحرك بواسطة سوط قطبي واحد أو عدة اسواط محيطية، وتكون سالبة لصبغة كرام، هوائية، وتوجد في داخلها حبيبات (PHB) Poly-β-hydroxybutyrate، حيث ان درجة الحرارة المثلى لنمو هذا الجنس يتراوح ما بين 25-30°م، والدالة الحامضية المثلى لها تتراوح ما بين 6-8 وتتحمل تركيز 10 غرام/لتر من كلوريد الصوديوم (Berrada and Fikri-Benbrahim, 2014).

في السابق تم فصل جنس الـ *Sinorhizobium* عن الجنس *Bradyrhizobium* و *Rhizobium* حيث تم اقتراحه كجنس جديد لبكتريا الرايزوبيا سريعة النمو. وان هذا التصنيف لم يعتمد على أساس الصفات المظهرية كالتصنيف العددي وتركيب السكر المتعدد الخارجي ومعلومات التحليل المصلي ونماذج البروتين فقط بل اعتمد كذلك على النمط الوراثي مثل محتوى GC وكذلك معلومات التهجين DNA-DNA. بعد ذلك تم نقل جنس *Sinorhizobium* إلى جنس *Ensifer* طالما أنَّ وجود جنس *Ensifer* كان قد سبق وجود جنس *Sinorhizobium* (Berrada and Fikri-Benbrahim, 2014).

2-3-1-3 جنس *Shinella*:

ان جنس الـ *Shinella* هو تحت الفرع الثالث للعائلة *Rhizobiaceae* والذي يتضمن بدوره نوع واحد هو *S. kummerowiae*، والتي تعد بكتريا تكافلية تعمل على تحفيز تكوين العقد الجذرية في نبات البرسيم الكوري *Kummerowia stipulacea*. اذ تكون خلايا هذه البكتريا سالبة لصبغة كرام، هوائية إجبارية، لا تكون السبورات، ومتحركة، شكلها عصوي قصير (Lin et al., 2012).

2-3-1-4 جنس *Neorhizobium*

أنواع هذا الجنس سابقا كانت مصنفة ضمن جنس الـ *Rhizobium* وحاليا تم نقلها الى جنس منفصل وهو *Neorhizobium* ويشمل على الأنواع الأتية: *N. galega* والذي يصيب نبات الـ *Galega* (Terefework et al., 1998). والنوع الثاني *N. huautlense* والذي يصيب نبات السيسبان *Sesbania herbacea* (Wang et al., 1998). والنوع الثالث *N. alkalisoli* والذي يصيب نبات الـ *Caragana intermedia* (Lu et al., 2009).

2-3-2 عائلة *Phyllobacteriaceae*

2-3-2-1 جنس *Mesorhizobium*:

يُعدُّ جنس الـ *Mesorhizobium* جنس جديد تم اقتراحه سنة 1997 م ويشمل أنواعا من الرايزوبيا معتدلة النمو والتي سمّيت بـ *Mesorhizobium*، وقد وضع ضمن عائلة *Phyllobacteriaceae* الذي يشمل الجنس السابق كذلك *Phyllobacterium* والذي يتضمن نوع واحد هو *Phyllobacterium trifolii* والذي تم عزله من العقد الجذرية لنبات البرسيم الأحمر أو برسيم المروج *Trifolium pratense*. ان جنس الـ *Mesorhizobium* يضمُّ 30 نوعاً، حيث انها من الناحية الوراثية قد تتقارب او تختلف عن المجموعة الوراثية التي تضم كل من الاجناس *Rhizobium* و *Sinorhizobium* و *Agrobacterium* (Jarvis et al., 1997)، حيث تم تشخيصها بالاعتماد على معدل نموها في الوسط ما بين الرايزوبيا بطيئة وسريعة النمو. اذ تعد بكتريا عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام، تتحرك بواسطة سوط قطبي واحد او تحت قطبي، هوائية، تعمل على تراكم حبيبات البولي هيدروكسي بيوتيريت (PHB) Poly-β-hydroxybutyrate، وتستطيع كذلك تمثيل

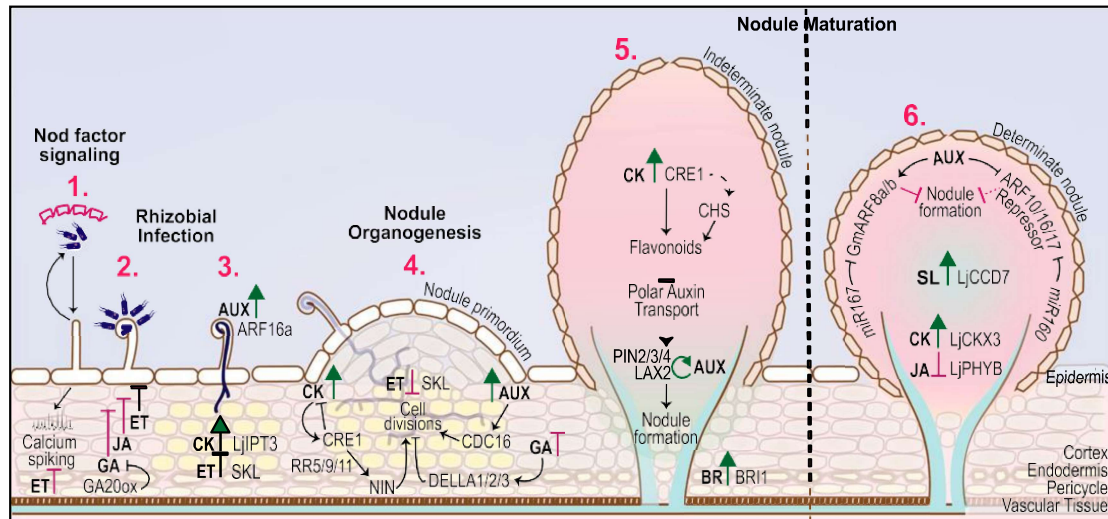
كل من السكريات *Glucose* و *Rhamnose* و *Sucrose* مع إنتاج الحامض
(Berrada, H. and Fikri-Benbrahim, 2014).

4-2 إصابة بكتريا الرايزوبيوم للنبات:

Infection of rhizobial bacteria of plant

إنَّ أكثر الطرائق شيوعاً لدخول بكتريا الرايزوبيوم إلى داخل الشعيرات الجذرية هي خلال خلايا البشرة التابعة للشعيرات الجذرية، إذ إنَّ بكتريا الرايزوبيوم قد تعمل على احداث الإصابة في النبات من خلال التشققات الموجودة في سطوح جذور النبات. وكذلك قد تغزو بكتريا الرايزوبيوم النباتات البقولية من خلال الفراغات الموجودة بين الخلايا. إذ إنَّ التصاق بكتريا الرايزوبيوم مع خلايا الشعيرات الجذرية يؤدي إلى حدوث تشوهات في الشعيرات الجذرية *Root hair curead* ومن ثمَّ تكوين ما يعرف بخيط الإصابة *Infection thread (IT)*، الذي يحتوي على مستعمرات بكتريا الرايزوبيوم المنقسمة (Oldroyd *et al.*, 2011).

بعد ذلك تبدأ خيوط الإصابة التي تكونت في داخل الشعيرات الجذرية المصابة ببكتريا الرايزوبيوم بالتلاشي ثم يتم غزو الخلايا المجاورة ودخول بكتريا الرايزوبيوم المتضاعفة داخلها، ثم تبدأ خلايا الدائرة المحيطة وخلايا القشرة بالانقسام وبشكل متعاقب وبذلك تتكون العقد الجذرية التي تكون مصابة ببكتريا الرايزوبيوم. وممَّا تجدر الإشارة إليه أنَّ الهرمونات النباتية تؤدي دوراً مميّزاً في السيطرة على العمليات التي تؤدي إلى تكوين العقد الجذرية (Roy *et al.*, 2020).



الشكل (2-2) السيطرة الهرمونية لتثبيت النايتروجين بشكل تعايشي ما بين بكتريا الرايزوبيوم والنباتات البقولية المضيفة
(Roy *et al.*, 2020).

إنَّ نسب السايتوكاينينات Cytokinins وتراكيزها والأوكسينات Auxins هي التي تحدد أين ومتى يحدث انقسام الخلايا النباتية، إذ إنَّ السايتوكاينينات تعمل على تنظيم العقيدات الجذرية وكذلك يتم تحسس الإشارات من مستقبل السايتوكاينين MtCRE1/LjLHK1 (Tirichine *et al.*, 2007). إذ إنَّ الشعيرات الجذرية تتحرر من خيوط الإصابة وذلك بعد دخول بكتريا الرايزوبيوم إلى داخلها ثم تبدأ بالانقسام مكونة ما يدعى بـ البكتيريويديات Bacteroids؛ إذ يتخصَّص الغشاء النباتي الذي يحيط بها الذي يدعى بـ Peribacteroid membrane (Iyer and Rajkumar, 2018).

تقوم بكتريا الرايزوبيوم المتحورة إلى بكتيريويديات Bacteroids وبمساعدة أنزيم النيتروجيناز Nitrogenase بميزة تحويل النايتروجين الجوي إلى أمونيا، إذ إنَّ هذا الأنزيم عادة ما يكون محمي من عوامل الأكسدة وذلك لوجود الهيموكلوبين البقولي Leghemoglobin الذي يضيف لونا ورديا للعقد الجذرية (Brewin, 1998). ان الـ Bacteroids قد تتخذ أشكالاً مختلفة وعادة ما تكون ذات شكل عصوي Rod-shaped وأحياناً قد تتخذ أشكالاً مختلفة فمثلاً في نباتات اللوبيا عسوية الشكل Rod-shaped أمماً في نبات الفول السوداني Peanut فتكون كروية Spherical، أمماً في نباتي البازلاء والبرسيم فقد تتخذ شكل شبيه بالهراوة Club shaped وقد تتخذ أشكالاً متعددة Pleomorphic (Iyer and Rajkumar, 2018). أمماً شكل العقدة الجذرية فيعتمد على نوع النبات المضيف إذ ان نوع العقد المتكونة في النباتات البقولية قد تكون عقداً محدودة Determinate Nodules أو عقداً غير محدودة Indeterminate، والعقد غير المحدودة عادة ما تكون طويلة وتتكون في الأنسجة المرستيمية الدائمة Meristematic tissues في حين أنَّ العقد المحدودة تتكون في الأنسجة المرستيمية المؤقتة Atransient meristem. والعقد المحدودة موجودة في جميع الأجناس العائدة إلى العائلة Mimosoideae والعائلة Caesalpinioideae، بينما في عائلة Papilionoideae معظم القبائل التابعة لها تكون العقد موجودة فيها وتكون من النوع غير المحدود باستثناء قبائل Phaseoleae و Psoraleae و Desmodieae وكذلك بعض الأفراد التابعة لقبيلة Loteae، إذ تكون فيها العقد من النوع المحدودة (Andrews and Andrews, 2017).

2-5 تبادل الإشارات المبكرة ما بين النباتات البقولية وبكتريا الرايزوبيوم:

Early signal exchange between leguminous plants and rhizobial bacteria

في الترب المحدودة النايتروجين عادة ما يحدث تفاعل بين بكتريا الرايزوبيوم الموجودة مع النباتات البقولية المزروعة وذلك عندما تقوم النباتات البقولية بإفراز بعض المواد التي تسمى الفلايفونيدات Flavonoids (Peters *et al.*, 1986). و تقوم بكتريا

الرايزوبيوم بتميز هذه المواد بوصفها إشارات ستؤدي إلى صنع وتحرير مركبات Lipochitooligosaccharides أو عوامل Nod وذلك عن طريق بروتينات Nod أو جينات *nod* (Dénarié and Cullimore, 1993)، إذ يمكن عدّ عوامل Nod بمثابة "بطاقة اتصال" لكي تقوم بإبلاغ النبات عن وجود متعايش قد يكون مفيد للنبات؛ لذا يؤدي ذلك إلى تفاعل النبات وتميز بكتريا الرايزوبيوم؛ إذ تؤدي هذه العملية إلى سلسلة من الاستجابات من النبات من أجل استقبال البكتريا (D'Haese and Holsters, 2002).

6-2 إشارات عامل التعقيد والمسار العام التعايشي:

Nod Factor signals and general symbiotic pathway

يُعدّ عامل التعقيد *nodulin* factor الرايزوبي من العوامل الضرورية من أجل التحفيز على نمو وتطور العقد الجذرية للنباتات البقولية وحتى في غياب بكتريا الرايزوبيوم (Truchet *et al.*, 1991). عُزلت جينات الإشارات التعايشية وجينات التحفيز على تكوين العقد الجذرية في النباتات البقولية. إذ تتفاعل عوامل التعقيد مع النبات البقولي الذي يؤدي إلى تغيرات في الجريان الأيوني وإزالة القطبية من الغشاء الخلوي، وتتضمن هذه التغيرات تذبذباً في تركيز الكالسيوم في خلايا الأدمة التابعة للشعيرات الجذرية؛ لذا يؤدي إلى حدوث تغيير في التعبير الجيني الأمر الذي يؤدي إلى إصابة بكتريا الرايزوبيوم للشعيرات الجذرية ونشوء وتطور العقد الجذرية (Charpentier and Oldroyd, 2013). وإصابة بكتريا الرايزوبيوم للشعيرات الجذرية يليه تشويه العقد الجذرية Deformation of root hairs والتعبير الجيني للجين المسؤول عن التعقيد المبكر Early nodulin gene ثم يتم تكوين بوادئ العقد الجذرية فضلاً عن عوامل التعقيد، ثم تبدأ مستقبلات الغشاء البلازمي لجذور النباتات البقولية تقوم بتميز السكريات المتعددة لسطح بكتريا الرايزوبيوم (Roy *et al.*, 2020).

7-2 الفلافونويدات كإشارات للرايزوبيا: Flavonoids as signals to rhizobia

الفلافونويدات Flavonoids عبارة عن إفرازات جذور النباتات البقولية تعمل كإشارات كيميائية موجهة من النبات إلى بكتريا الرايزوبيوم في ظروف نقصان النايتروجين N في التربة (Liu and Murray, 2016). إذ تعمل هذه المواد مع مركبات Isoflavones للإشارة على تخصص النبات المضيف، فقد وجد أنّ كل من المركبات Daidzein و Genistein الموجودة في مفرزات جذور نباتات *P. vulgaris* و *G. max*، تعمل على تحفيز جينات *nod* في بكتريا الرايزوبيوم التي تكون ذات علاقة تعايشية متوافقة معها في كل من *Bradyrhizobium japonicum* و *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* على التوالي (Bolaños-Vásquez and Werner, 1997). يعتقد بأنّ الفلافونويدات المتخصصة

بالنبات المضيف تتفاعل مع بروتين الرايزوبي NodD، الذي يُعدُّ عامل الاستساخ Transcription factor (TF) الذي يعمل على التحفيز على التعبير الجيني لجينات *nod* العامة؛ لذا يؤدي إلى إنتاج عوامل Lipochitooligosaccharide التي تحفز تكوين العقد الجذرية على الجذور (Lerouge et al., 1990).

8-2 جينات تثبيت النيتروجين: Nitrogen fixation genes

يمكن تقسيم الجينات المسؤولة عن تثبيت النيتروجين إلى قسمين، القسم الأول يضم الجينات التي تماثل في أنظمتها أنظمة تثبيت النيتروجين الموجودة في البكتريا ذات المعيشة الحرة مثل بكتريا *Klebsiella* وتدعى بالجينات المثبتة للنيتروجين *nif* genes. إذ تُعدُّ هذه الجينات مميزة جدًا من أجل تثبيت النيتروجين، في حين يضم القسم الثاني الجينات التي لا تماثل مع جينات تثبيت النيتروجين الموجودة في البكتريا حرة المعيشة التي يطلق عليها *fix* genes (Arnold et al., 1988). وجينات *nif* و *fix* توجد على الكروموسوم في كل من بكتريا *Azorhizobium* spp. و *Bradyrhizobium* spp. و *Mesorhizobium loti* وهذه الجينات يكون موقعها على البلازميد التعايشي في بكتريا *Rhizobium* spp. NGR234 و *E. meliloti* و *R. leguminosarum* bv. *Trifolii*. في بكتريا *E. meliloti* يوجد بلازميدان كبيران يطلق عليهما Megaplasmid وهما البلازميد الأول يبلغ حجمه 1700 kb تقريبًا ويسمى pSymB أو Megaplasmid II في حين يبلغ حجم البلازميد الثاني 1400 kb تقريبًا ويسمى pSymA أو Megaplasmid I (Hynes et al., 1986)، وتمتلك بكتريا *E. meliloti* كروموسوم كبير يصل حجمه إلى 3650 kb إذ يحتوي هذا الكروموسوم على الجينات المسؤولة عن تصنيع الأحماض الأمينية وقواعد البيورين و البايريمدين وبعض جينات تثبيت النيتروجين *fix* genes وجينات مقاومة للمضادات حيائية وجينات *exoC*، *exoD*، *exoR*، *exoS* و *mucR* (Skorupska et al., 2006).

9-2 جينوم الرايزوبيوم: The Rhizobium genome

بكتريا الرايزوبيا لها القدرة على تثبيت النيتروجين بشكل تكافلي مع النباتات البقولية إذ ان بعض أنواعها تكون حاوية على جينوم واحد يضم كروموسومًا واحدًا، فضلًا عن احتوائها على بلازميد واحد أو أكثر ذات أحجام كبيرة وتبلغ أحجام البلازميدات ما بين 100 Kbp إلى 2Mbp (Sullivan et al., 2002). ومن الصفات المميزة لجينوم بكتريا الرايزوبيا أنَّ الجينات التي تشارك في تثبيت النيتروجين وتكوين العقد الجذرية تقع إِمَّا على جزيئات مستقلة من الـ DNA تدعى البلازميدات التكافلية (pSym) Symbiotic plasmids أو تكون

موجودة ضمن كروموسوم البكتريا نفسه على شكل جزر تكافلية Symbiotic islands (Palacios and Newton, 2005).

يكون حجم الجينوم في جرثومة الرايزوبيوم كبير كما في *R. leguminosarum* *bv* *S. meliloti* إذ يبلغ حجمه 6.7 Mbp وفي *R. etli* يبلغ حجمه 6.5 Mbp وفي *viciae* يبلغ حجمه 6.7 Mbp وتتكون من البلازميدات والكروموسومات الأساسية التي تشكل نحو 50% من الجينوم الكلي (Gonzalez *et al.*, 2006)، وهناك بعض الأدلة التي تشير إلى أن هذه الجينومات عبارة عن تراكيب ديناميكية تحدث فيها عملية إعادة توليف الأمر الذي يؤدي إلى بناء نسخ جديدة من قطع الـ DNA الفردية المتماثلة (Guo *et al.*, 2003). فضلاً عن ذلك هناك أجزاء كبيرة من البلازميد غير التكافلي الذي يوجد في داخل خلايا بكتريا الرايزوبيوم تُعدُّ ضرورية لإنشاء علاقة تكافلية فعالة للرايزوبيوم (Galibert *et al.*, 2001). وأثبتت إحدى الدراسات انتقال البلازميدات التكافلية بين السلالات الرايزوبية في محيط المنطقة الجذرية (Broughton *et al.*, 1987). وأشارت دراسة أخرى إلى أن انتقال الجينات جانبياً يؤثر بشكل كبير في تطور وتنوع بكتريا الرايزوبيوم (Souza *et al.*, 1992). إذ يتكون جينوم بكتريا الرايزوبيوم من الحامض النووي الديوكسي رايبوزي الكروموسومي والديوكسي رايبوزي البلازميدي التكافلي.

2-9-1 الحامض النووي الديوكسي رايبوزي الكروموسومي: Chromosomal DNA

يتكون كروموسوم بكتريا الرايزوبيوم من آلاف الجينات التي تكون على شكل سلسلة من النيوكليوتيدات التي تكون مسؤولة عن التعبير الجيني وتضاعف جزيئة الـ DNA وكذلك استنساخ المعلومات الوراثية، وهذا الكروموسوم يكون حاوياً على نيوكليوتيدات تدعى بالتسلسلات المكررة Repetitive sequences إذ توجد أنواع عديدة من هذه البكتريا بين مواقع الجينات وتؤدي دوراً مميزاً في التعبير الجيني وتضاعف الـ DNA وإعادة تكوين الاتحادات الوراثية Recombinations، فضلاً عن ذلك توجد تسلسلات أخرى تسمى بأصل التضاعف Origin of replication تؤدي دوراً رئيساً في عملية بدء تضاعف DNA الخلية البكتيرية، علاوة على ذلك فإن كروموسوم بكتريا الرايزوبيوم يحتوي على جينات بين جينات التضاعف تسمى Intergenic regions إذ لا يمكن استنساخ هذه الجينات (Robert, 2005).

يبلغ طول هذا الكروموسوم 1 مليمتر تقريبًا وحجمه يبلغ بين 160 kbp إلى 12200 kbp (Thanbichler *et al.*, 2005) إذ تؤثر العوامل البيئية في حجم الجينوم (Bentley and Parkhill, 2004)، وسبب اختلاف أحجام الكروموسومات يعود إلى وجود DNA خارج كروموسومي إضافي يدعى البلازميد Plasmid (Young *et al.*, 2006). وتبلغ أحجام الجينوم في بكتريا الرايزوبيا المدروسة ما بين 5.4 Mbp إلى 9.2 Mbp وإعداد البلازميدات من 1 إلى 7 بلازميد غير إنَّ أكبر جينوم تم اكتشافه في بكتريا الرايزوبيوم الذي يعود إلى السلالة *Bradyrhizobium japonicum* يكون غير حاوٍ على البلازميدات، وبسبب الحجم الكبير للبلازميدات الموجودة في جرثومة الرايزوبيا ففي كثير من الأحيان يزيد طول الـ Mega plasmids فيها عن 500 kbp وتحمل الجينات الأساسية أحيانًا؛ لذا صار من الصعوبة التمييز بينها وبين الكروموسومات؛ إذ اقترحت في المُدَّة الأخيرة فئة جديدة من النسخ المتماثلة البكتيرية حتى مع الخصائص الهجينة في كل من الكروموسومات والـ Mega plasmids التي تدعى Chromids (Laranjo *et al.*, 2014).

تحتوي بكتريا *B. japonicum* USDA110 على كروموسوم يبلغ حجمه 9.2 Mbp يتألف من 8.317 جين من ضمنها الجينات المسؤولة عن بناء أنزيم النيتروجيناز *nif genes* والجينات المسؤولة عن تكوين العقد الجذرية *nod* و *noI* و *noe* والجينات المسؤولة عن تثبيت النترجين *fix genes* فضلًا عن RNAs. وفي بكتريا الرايزوبيا بطيئة النمو مثل *B. japonicum* تقع الجينات على جزر تكافلية Symbiotic islands توجد في داخل الكروموسوم يبلغ حجمها 410 kbp إذ تم دراسة قطعة من جزيئة الـ DNA الكروموسومية حجمها 681 kbp وتم تشخيصها بأنَّها جزيئة تكافلية حاوية على قطعة من الـ DNA يبلغ حجمها 410 kbp تضم الجينات المسؤولة عن تثبيت النيتروجين وتكوين العقد الجذرية كما أنَّ هناك أدلة تثبت طبيعة هذه الجينات؛ إذ إنَّ لها القابلية على أن تكتسب عن طريق انتقال الجين جانبيًا بواسطة الاقتران. إذ تم تحديد 655 جين في هذه القطعة من الـ DNA كما أنَّ عدد الجينات المسؤولة عن تثبيت النيتروجين وانتقال الـ DNA يبلغ بحدود 301 جين. بينما الجينات التي تشفر للعناصر القافرة Transposon يبلغ عددها 167 جين 60 % منها يقع في الجزيرة التكافلية التي تشكل بحدود 7.5 % من الجينوم الكلي (Göttfert *et al.*, 2001).

أمَّا في بكتريا الرايزوبيا سريعة النمو مثل *E. meliloti* فإنَّها تحتوي على كروموسوم كبير يبلغ حجمه 3.7Mbp (Galibert *et al.*, 2001) يكون حاويًا على الجينات المسؤولة

عن البناء الحيوي لعوامل تكوين العقد الجذرية *nod* و *noe* و *nol* والجينات المسؤولة عن تثبيت النيتروجين *fix genes* والجينات المسؤولة عن بناء أنزيم النيتروجينيز *nif genes* على البلازميد التكافلي pSymA بينما تقع الجينات المسؤولة عن البناء الحيوي للسكريات المتعددة الخارجية Exopolysaccharide واستغلال C4-dicarboxylic acid على البلازميد التكافلي pSymB (Hynes and McGregor, 1990)، وهذا الكروموسوم يحتوي على الجينات المسؤولة عن الاستنساخ التي تقع بين جينات التضاعف وتعرف بـ Intergenic regions إذ يتم التحكم بهذه الجينات عن طريق نظام يدعى الـ Operon الذي يحتوي على جين واحد أو أكثر من الجينات الواقعة تحت سيطرة مشتركة تتمثل بمشغل واحد One operator ومشجع واحد One promoter لكن الـ operon يكون بنائياً Biosynthetic operon أو يكون تقويمياً Degradative operon (Schumann, 2006).

2-9-2 البلازميدات التكافلية: Symbiotic plasmids

البلازميدات عبارة عن جزيئات DNA حلقية بشكل سلسلة مزدوجة تقع خارج الكروموسوم البكتيري اكتشفت لأول مرة في البكتريا المعوية التي تعود إلى العائلة Enterobacteriaceae وتتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف الكروموسوم البكتيري داخل الخلية المضيفة، قد يصل طولها إلى أكثر من 100 Kb (Miljkovic-selimovic et al., 2007). إذ تم استعمال كلمة Plasmid أول مرة في عام 1952م من العالم Joshua Lederberg للدلالة على هذه الجزيئات التي تحمل الجينات والعلامات الوراثية Genetic markers الخاصة بكل جنس بكتيري كما ان هذه الجزيئات البلازميدية توجد كذلك في كل من الخمائر والفطريات (Allison, 2007).

توجد البلازميدات التكافلية Symbiotic plasmids في عائلة Rhizobiaceae ويرمز لها pSym و يبلغ حجمها بين 150 kbp إلى 400 kbp وتحمل هذه البلازميدات في الكثير من الأنواع جينات التكافل Symbiotic genes، فقد أشارت إحدى الدراسات إلى احتواء بكتريا *R. leguminosarum bv, Vicia 3841* و *R. etli CFN42* و *R. fedii NGR 234* على الجينات المسؤولة عن البناء الحيوي لعوامل تكوين العقد الجذرية *nod* و *noe* و *nol* والجينات المسؤولة عن تثبيت النيتروجين *fix genes* (Galibert et al., 2001)، فضلاً عن ذلك تم الكشف عن جينات تكافلية على الجزر التكافلية

الكروموسومية ذات المحتوى المنخفض من القواعد النيتروجينية CG وذلك باستعمال شفرات تكون أكثر تشابهاً مع البلازميدات إذ تم وصف هذه الجزر أول مرة في السلالة *M. loti* ICMP3153 اعتماداً على التشابه بينها وبين الكثير من الجزر التي تسبب أمراضاً في أنواع أخرى من البكتريا السالبة لصبغة كرام (Sullivan and Ronson, 1998).

وأشارت دراسة أخرى إلى أنّ هذه الجزر توجد في جينومات أنواع أخرى من بكتريا الرايزوبيا كما في الجنس *Bradyrhizobium* (Kaneko et al., 2002). وتتباين أحجام هذه الجزر التكافلية من 500 kbp في السلالة ICMP3153 *M. loti* إلى 681 kbp في السلالة *B. diazoefficiens* USDA110 (Giraud et al., 2007). ولكن لا توجد أدلة كافية على أن البلازميدات التكافلية توجد في كل السلالات التابعة للجنس *Bradyrhizobium* ما عدا بعض السلالات من *Photosynthetic bradyrhizobia* التي تعمل على تكوين العقد الجذرية بشكل مستقل عن عوامل تكوين العقد Nod factors (Laranjo et al., 2014).

كما أشارت العديد من الدراسات إلى أنّ البلازميدات التكافلية pSym تكون غير مرتبطة بشكل وثيق مع الكروموسوم البكتيري للخلية (Nandasena et al., 2007). كما اثبت الباحث (Barcellos et al., 2007) إلى إمكانية انتقال البلازميدات التكافلية بين السلالات والأجناس المختلفة كانتقالها من جنس *Sinorhizobium* إلى جنس *Bradyrhizobium* إذ إنّ الجنس *Sinorhizobium* يكون معرض بشكل أكبر للانتقال الجانبي للجينات (Kunin et al., 2005).

كذلك أشار الباحث (Yost et al., 2006) إلى أنّ هناك ستة بلازميدات موجودة في *R. leguminosarum* وأن أربعة بلازميدات منها تُعدُّ ضرورية من أجل التنافس لتكوين العقد الجذرية في نباتي العدس والبالزاء. كما أشارت إحدى الدراسات إلى أنّ ثلاثة من هذه البلازميدات وهي pRleVF39e و pRleVF39c و pRleVF39d تُعدُّ ضرورية لتكوين عقد جذرية مثبتة للنيتروجين بينما البلازميد الكبير pRleVF39f فيُعدُّ غير ضروري لتكوين العقد الجذرية المثبتة للنيتروجين (Hynes and McGregor, 1990). فضلاً عن البلازميد التكافلي pSym فإنّ أنواعاً عديدة من بكتريا الرايزوبيا تحتوي على واحد أو أكثر من البلازميدات الإضافية Accessory plasmids (Gonzalez et al., 2006).

وأشار الباحث (Brom et al., 2000) إلى أنّ هناك تداخلاً وظيفياً بين البلازميدات الإضافية والبلازميدات التكافلية pSym وذلك عن طريق تحييد البلازميدات الموجودة في بكتريا

R. etli من أجل التحقق من قدرتها على تكوين عقد جذرية مثبتة للنتروجين. كما أشارت دراسات أخرى تم إجراؤها على أنواع عديدة من بكتريا الرايزوبيا إلى أنّ هناك صفات تنافسية مميزة مثل تكوين proline (Jimenez-zurdo *et al.*, 1995) و Trigonelline (Goldmann *et al.*, 1991) و Rhamnose (Oresnik *et al.*, 1998) و Rhizopines (Heinrich *et al.*, 1999) و Erythritol (Yost *et al.*, 2006) و Calystegines (Guntli *et al.*, 1999).

كما قام الباحث (Stiens *et al.*, 2006) بعملية تحديد تسلسل البلازميد الاضافي في السلالة *E. meliloti* إذ تم اكتشاف أنّ الجينات تشفر بشكل مختلف عن الأنزيمات التقويضية والانظمة الخاصة بالنقل كما تم تحديد الجين المشفر لـ ACC deaminase الذي يؤدي دوراً مميزاً في تكوين العقد الجذرية. كذلك أشارت دراسة أخرى إلى أنّ تحديد الصفات التنافسية يتم من البلازميدات والمحددات الجينومية (Hynes and McGregor, 1990)، وأشارت احدى الدراسات إلى أنّ بعض المحددات الجينية لهذه الصفات توجد في البلازميد التكافلي pSym الذي يحمل بدوره الجينات المسؤولة عن تكوين العقد الجذرية المثبتة للنتروجين كما في السلالة *R. leguminosarum* bv. *viciae* وكذلك يحمل المحددات الجينية المسؤولة عن تحليل المركبات العضوية التي تفرز في محيط المنطقة الجذرية لنبات البازلاء فضلاً عن جينات بناء وتقويض Rhizopine (Murphy *et al.*, 1995).

والعديد من الدراسات تشير إلى وجود أنواع أخرى من البلازميدات منها بلازميد الجنس Sex plasmid أو عامل الخصوبة Fertility factor (Banu and Prasad, 2017)، والبلازميدات التقويضية Degradative plasmids (Stolz, 2014)، وبلازميدات المقاومة Resistance plasmids (Ahluwalia, 2009)، وبلازميدات الضراوة Virulence plasmids (Broothaerts *et al.*, 2005) وكذلك بلازميد الكوليسين Colicin plasmids (Rozwadowicz *et al.*, 2018).

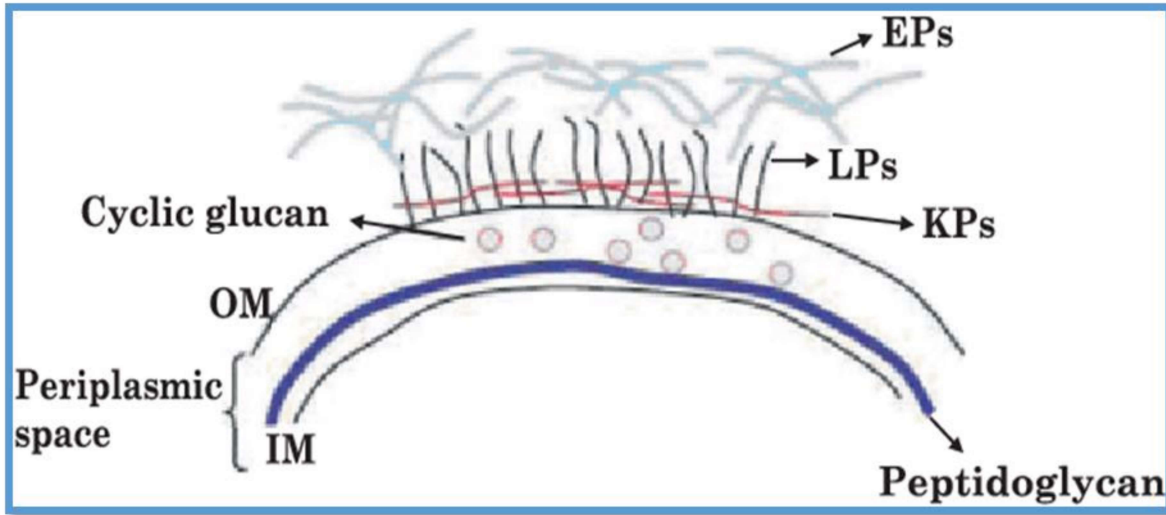
10-2 السكريات المتعددة الرايزوبية: Rhizobial polysaccharides

بكتريا الرايزوبيوم تنتج أنواعاً مختلفة من السكريات المتعددة Polysaccharides، إذ إنّ الكثير من البحوث الحديثة أشارت إلى أنّ السكريات المتعددة توجد على سطح خلية بكتريا

الرايزوبيوم، وتُعدُّ ذات أهمية كبيرة في إنشاء علاقة تعايشية ذات تخصص عالٍ ما بين بكتريا الرايزوبيوم والنباتات البقولية (Spaink, 2000). وتضم هذه السكريات:

1. السكريات المتعددة الكابولية (KPS): Capsular polysaccharides (KPS)
2. السكريات المتعددة الخارجية (EPS): Exopolysaccharides (EPS)
3. السكريات المتعددة الدهنية (LPS): Lipopolysaccharides (LPS)
4. الكلوكونات الحلقية: Cyclic glucans

أمَّا النوع الآخر من هذه السكريات توجد في الفراغ حول الغشاء البلازمي أو يتم إفرازها إلى الأوساط الزرعية وكما في الشكل 2-2.



الشكل (2-3) رسم تخطيطي يوضح السكريات المتعددة الموجودة على بكتريا الرايزوبيوم. IM: الغشاء الداخلي، OM: الغشاء الخارجي (Lepek and D'Antuono, 2005).

11-2 السكر المتعدد الخارجي الرايزوبي:

Rhizobial exopolysaccharides (EPS)

تُعدُّ السكريات المتعددة الخارجية الرايزوبية Rhizobial exopolysaccharides (EPS) من النواتج خارج خلوية، ذات طبيعة حامضية وأوزانها الجزيئية عالية. تتجمع على السطح الخارجي للخلية وتم تفرزها إلى المحيط الخارجي للخلية، إذ ترتبط بالسطح الخارجي لغشاء البكتريا بصورة خفيفة (Spaink, 2000). إذ إنّ كل سلالة أو نوع من البكتريا تفرز نوع خاص من السكريات المتعددة الخارجية الرايزوبية (EPS) ويكون من النوع المتباين Heteropolysaccharide. قد توجد في بكتريا الرايزوبيوم تراكيب كيميائية عديدة وذلك اعتماداً

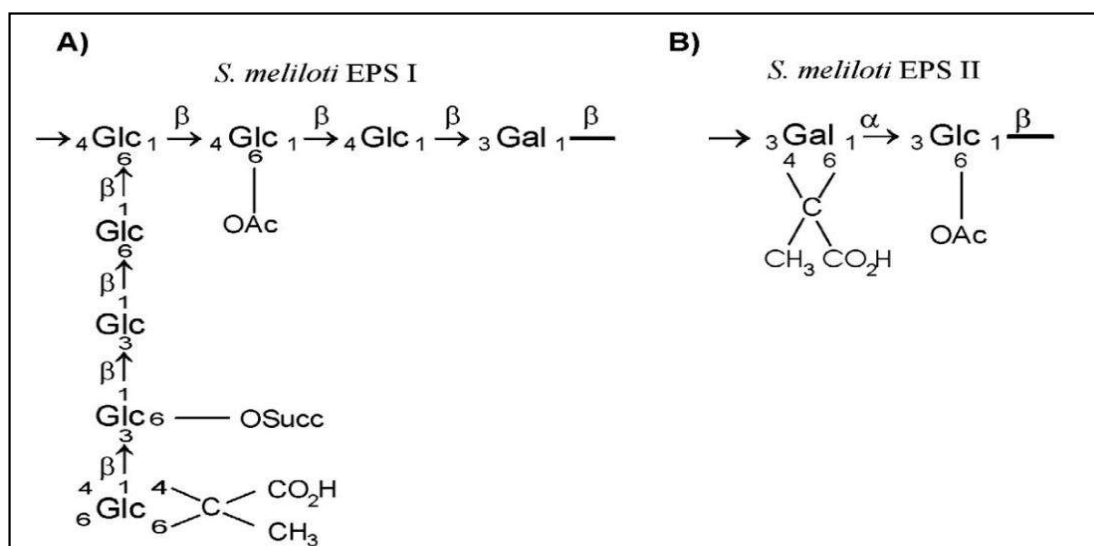
على شدة البلمرة وكذلك حجم الوحدة المتكررة فضلاً عن المجاميع غير الكربوهيدراتية الموجودة فيها (Laus *et al.*, 2005).

2-12 التركيب الكيميائي للسكر المتعدد الخارجي لبكتريا الـ *Ensifer meliloti*:

Chemical structure of *Ensifer meliloti* exopolysaccharide

تفرز بكتريا *E. meliloti* نوعين من السكريات المتعددة الخارجية النوع الأول يعرف بـ Succinoglycan (EPS I) الذي ينتج من أنواع عديدة تابعة لهذه البكتريا (Reinhold *et al.*, 1994) التي تتكون من ثمانية وحدات سكرية مكررة تحتوي على وحدة واحدة من سكر الكالاكتوز وعلى سبع وحدات من سكر الكلوكوز وبنسبة مولارية 1:7 وترتبط بأصرة كلايكوسيدية من نوع β -(1→3)، β -(1→4)، β -(1→6) وكما في الشكل 2-3، إذ يتضح مرافقة مجاميع Pyruvyl و Acetyl و Succinyl.

إنَّ بكتريا *E. meliloti* كذلك تعمل على إنتاج سكر متعدد خارجي آخر مختلف يطلق على هذا النوع بـ Galactoglycan أو (EPS II) (Zevenhuizen, 1997). ولا يتم إنتاج هذا النوع من السكريات المتعددة الخارجية إلا تحت ظروف خاصة مثل نفاذ الفوسفات، أو قد يتم إنتاجه عند حدوث تطفير في واحد من الجينين المنظمين *mucR* (Martin *et al.*, 2000) أو *expr* (Pellock *et al.*, 2002). ويختلف هذا النوع من السكريات المتعددة الخارجية في التركيب الكيميائي عن النوع الأول (EPS I).



الشكل (2-4) التركيب الكيميائي للسكر المتعدد الخارجي (EPS) الرايزوبي لبكتريا *E. meliloti*
 (A) *E. meliloti* succinoglycan (EPS I), (B) *E. meliloti* galactoglycan (EPS II)
 Glu: كلوكوز، Gal: كالاكتوز، Suss: Succinate، Ac: acetyl (Skorupska *et al.*, 2006).

اذ أن النوع الثاني من السكر المتعدد الخارجي (EPS II) يُعدُّ عبارة عن بوليمر يتكون من وحدة واحدة مكررة من السكر الثنائي الذي يتكون من وحدة واحدة من سكر الكالكتوز الذي ترتبط بها مجموعة Pyruvyl، ووحدة واحدة من سكر الكلوكوز الذي ترتبط به مجموعة acetyl، اللتان ترتبطان بأصرة كلايكوسيدية من نوع β -(1→3) و α -(1→3) وكما في الشكل 2-3. إذ يصل الوزن الجزيئي للسكر المتعدد الخارجي الرايزوبي الذي تنتجه بكتريا *E. meliloti* لكلا النوعين EPS I و EPS II من 10^6 - 10^7 دالتون (Wang et al., 1999).

13-2 دور السكريات المتعددة الخارجية الرايزوبية في العلاقة التعايشية:

Role of rhizobial exopolysaccharides in symbiosis

تؤدي السكريات المتعددة الخارجية دوراً مميزاً في تكوين العلاقة التعايشية ما بين النباتات البقولية وبكتريا الرايزوبيوم، إذ يكون دورها ميكانيكياً في حماية البكتريا ضد الإجهادات البيئية، وكذلك تساعدها على الالتصاق بالأسطح، فضلاً عن تجميع المغذيات (Gray and Rolfe, 1990). كما أنه في بداية حدوث الإصابة بالعقد الجذرية للنبات المضيف يكون لها دور مميز الذي يتضمن التصاق بكتريا الرايزوبيوم على جذور النبات المضيف، كما يكون لها دور تركيبى مميز في تكوين خيط الإصابة، ثم بعد ذلك تتحرر البكتريا من خيط الإصابة وتتطور البكترويدات Bacteroids، لذا إيقاف الاستجابات الدفاعية للنبات المضيف، وكذلك تعمل على حماية بكتريا الرايزوبيوم من بعض المركبات التي ينتجها النبات التي تدعى المركبات المضادة للمايكروبات Antimicrobial compounds و phytoalexins (Fraysse et al., 2003; D’Haeze and Holsters, 2002).

وأشارت العديد من الأبحاث إلى أن السكريات المتعددة الخارجية لها دور مميز في تحديد الخصوصية للنبات المضيف وذلك لتحفزه على تكوين العقد الجذرية، إذ تعمل على التواء الشعيرات الجذرية بشكل كامل؛ لذا تكوين خيط الإصابة، بعد ذلك تعمل بكتريا الرايزوبيوم على تطور البكترويدات Bacteroids وبذلك تعمل على تحفيز تكوين العقد الجذرية الفعّالة. توصل بعض الباحثين إلى أن الخلل الذي تحدثه طفرات *exo* - من حيث التواء الشعيرات الجذرية وكذلك تكوين خيط الإصابة يمكن إصلاحه وذلك بإضافة كميات قليلة من السكر المتعدد الخارجي (Pellock et al., 2000).

وأظهرت العديد من الأبحاث أنَّ طفرات *exo* - التي تحدثها بكتريا *E. meliloti* لا تستطيع ان تغزو نسيج العقد الجذرية؛ إذ تم تكوين عقد جذرية حاوية على البكترييدات Bacteroids المثبتة للنايتروجين وذلك عند وجود EPS I و EPS II. في حين تمكنت بكتريا *R. leguminosarum* bv. *trifolii* من اصلاح الخلل الحاصل في العلاقة التعايشية الذي احدثته طفرات *exo* - وذلك بإضافة السكر المتعدد الخارجي المنقى (Wang et al., 1999).

وقد تمكن باحثون مؤخرًا من إصلاح الخلل الحاصل في التحفيز على تكوين العقد الجذرية لطافرات *exo* - للبكتريا *Rhizobium* sp. NGR234 و *E. meliloti* و *R. leguminosarum* bv. *trifolii* وذلك عن طريق تلقيح هذه العزلات الطافرة مع عزلات أخرى مماثلة، إذ لا تستطيع تحفيز تكوين العقد الجذرية ولكنها تتمكن من إنتاج السكر المتعدد الخارجي EPS، إذ إنَّ هذه النتائج تثبت الدور المميّز للسكر المتعدد الخارجي في العلاقة التعايشية الناجحة (Krol et al., 1998).

توصّل الباحث (Pellock et al., 2000) إلى أنَّ الصيغة الكيميائية الصحيحة للسكريات المتعددة الخارجية يعد ضرورياً من أجل إيقاف الاستجابة الدفاعية للنبات، وهذه التغييرات في الصيغ التركيبية للسكريات المتعددة الخارجية التي توجد على سطح بكتريا الرايزوبيوم يؤدي إلى زيادة الحساسية تجاه المركبات المضادة للبكتريا بشكل عام التي يتم إنتاجها من النبات المضيف، وأخيراً فإن الدراسات أظهرت أنَّ طافرات بكتريا *E. meliloti* تؤدي إلى إنتاج EPS I لكنّها تعمل على تحفيز تكوين العقيدات الجذرية الكاذبة Pseudonodules وهذا ما أدى إلى تحفيز الاستجابة الدفاعية لنبات الجت (Niehaus et al., 1996).

2-14 أهمية السكريات المتعددة الخارجية الرايزوبية في مجالات أخرى:

Importance of rhizobial exopolysaccharides in other fields

إنَّ دور السكريات المتعددة الخارجية الرايزوبية Rhizobial exopolysaccharides لا يقتصر على العلاقة التعايشية ما بين بكتريا الرايزوبيوم والنبات، بل قد تكون لها أهمية أخرى في بعض الصناعات مثل بقية السكريات المتعددة المايكروبية التي تدخل في الصناعات الغذائية والصيدلانية (Roberts, 1995). إذ سجلت العديد من الأبحاث أنَّ هناك أنواعاً عديدة من بكتريا الرايزوبيوم لها القابلية على إنتاج سكريات متعددة خارجية التي يكون لها تأثير تثبيطي

ضد فايروس نقص المناعة المكتسبة (HIV-1) في الإصابات خارج الجسم *in vitro* infection وجد أنّ السكريات المتعددة الخارجية β -glucans تعمل على زيادة المقاومة ضد الأمراض المايكروبية والأورام الخبيثة وكذلك تعمل على تحفيز المناعة، إذ أظهرت فعالية ضد مرض السرطان، وكذلك تعمل على تثبيط تطور أورام الساركوما Sarcoma tumours 180 (Bohn and Bemiller, 1995).

كذلك توصل الباحث (Foster et al., 2000) إلى أنّ للبكتريا *R. etli* M4 والسكر المتعدد الخارجي (EPS) الذي ينتج منها القابلية على الارتباط بأنواع مختلفة من المعادن، ومن هذه النتيجة هناك أمل في إمكانية المعالجة الحيوية للمياه التي تطرح من المصانع وكذلك التطبيقات التجارية للسكريات المتعددة الميكروبية التي تدخل في صناعة الألبان؛ إذ تؤدي إلى أن يكون القوام ثابتاً فضلاً عن تحسينها لطعم منتجات الألبان (Rana and Upadhyay, 2020).

2-15 مقاومة المضادات الحيوية: Antibiotics resistance

يشير المصطلح Antibiotic إلى العديد من المركبات الكيميائية التي تعمل على تثبيط نمو البكتريا أو قتلها، وبسبب الاستعمال المفرط لهذه المركبات الكيميائية في القرن الماضي، فقد قامت البكتريا بتطوير العديد من اساليبها الدفاعية للتغلب على تأثير المضادات الحيوية وبذلك اكتسبت صفة المقاومة لها، إذ ان بكتريا *Staphylococcus aureus* تُعدّ مقاومة لكل من المضادات Penicillin و Ampicillin في حين كانت حساسة لهذه المضادات سابقا (Munck and sommer, 2014).

تختلف المضادات الحيويّة في آلية عملها فمنها ما يتداخل مع تخليق الحامض النووي RNA و DNA مثل: Rifampin و Quinolone في حين يعمل القسم الآخر على تثبيط تخليق البروتينات مثل: Tetracycline و Chloramphenicol و Streptothricin و Aminoglycoside و Macrolide كما أنّ هناك قسمًا آخر منها يعمل على تثبيط تصنيع الجدار الخلوي للبكتريا كما في Glycopeptide و β -lactam (Davies, 1994). وعند استعمالها أول مرة تم افتراض أنّ المقاومة للمضادات الحيوية تكون غير محتملة إذ تم الاستناد على هذا الافتراض بناءً على أنّ تتابع حدوث الطفرات التي تؤدي إلى إنتاج البكتريا التي تمتلك صفة المقاومة للمضادات الحيوية كان ضئيلاً جداً ولكن مع مرور الزمن تم اثبات عكس هذا

الافتراض؛ لأنَّ البكتريا كَيِّفَتْ نفسها مع ظروف البيئة المتغيرة؛ وذلك عن طريق مقاومتها للمضادات الحياتية وذلك باستعمالها آليات متنوعة فضلاً عن ذلك فإنَّ قدرة البكتريا على تبادل الجينات التي تسمى حالياً بالانتقال الأفقي للجينات Horizontal gene transfer كانت غير متوقعة بهذا الشكل وهناك آليات عديدة التي من خلالها تتمكن البكتريا من مقاومة المضادات الحياتية ومنها:

1. التحورات الأنزيمية في المضادات الحيوية.
2. تحليل العوامل المضادة للبكتريا.
3. تقوم بتغيير نفاذية الجدار الخلوي البكتيري.
4. التحورات في أهداف المضادات الحيوية.
5. التدفق الفعّال للمضادات الحيوية من الناحية البكتيرية.
6. اكتساب بعض المسارات الأخرى للتمثيل الأيضي تكون بديلة لتلك التي يثبطها الدواء.
7. الإفراط في إنتاج الأنزيمات المستهدفة (Magnet and Blanchard, 2005).

إنَّ طفرات الـ DNA الكروموسومية يمكن أن تحدث في الكائنات المجهرية ممّا يؤدي إلى إكسابها صفة المقاومة للمضادات الحياتية، وهذه الطفرات تقوم بتغيير البروتينات الموجودة عن طريق التحولات الوراثية أو نتيجة لاكتساب أو نقل مواد جينية جديدة ما بين البكتريا من نفس النوع أو بين أنواع أو أجناس مختلفة (Van Hoek *et al.*, 2011). والعديد من الدراسات البحثية أشارت إلى أنَّ الطفرات التلقائية (Spontaneous mutations) لها تأثير كبير على صفة المقاومة للمضادات الحياتية وفي إحدى الدراسات تم الإشارة إلى أنَّ مثل هذه الطفرات لها دور كبير على مقاومة المضادات الحياتية كما في الـ Rifampin في حين أنَّ تأثيرها كان أقل في القدرة التنافسية وذلك عند تكوين العقيدات الجذرية في نبات الجب *Medicago sativa* من السلالة *E. meliloti* وذلك بوجود البلازميد pTA2 (Bromfield *et al.*, 1985).

وكذلك تمكّنت إحدى الدراسات من اختيار 48 سلالة من بكتريا *R. japonicum* وذلك لاستجابتها للمضادات الحياتية المستخدمة بشكل كبير؛ إذ أظهرت النتيجة أنَّ أكثر من 47% من هذه السلالات كانت مقاومة للمضادات الحيوية Penicillin-G و Neomycin وأكثر من 60% من السلالات المدروسة كانت تمتلك صفة المقاومة للمضادات الحياتية Erythromycin و Chloramphenicol و Polymyxin B في حين ظهرت المجموعة

الأكثر مقاومة من السلالات المدروسة هي المقاومة المشتركة للمضادات الحيوية Penicillin- و Streptomycin و Chloramphenicol و Neomycin و Tetracycline إذ كانت بحدود 25% من المجموع الكلي للسلالات التي تمت دراستها (Cole and Elkan, 1979). كما وجد أنَّ السلالات FB-1018 و MAR-1435 و FB-1035 التابعة لبكتريا *Rhizobium* والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباقلاء *Faba bean* (*Vicia faba* L.) وكذلك العقد الجذرية لنبات فول الصويا *Soy bean* (*Glycine max* L.) كانت مقاومة للمضادات الحيوية Amoxicillin و Cloxacilline و Ampicillin بينما السلالة SB-12 كانت تمتلك صفة المقاومة لكل من المضادين الحيائيين Ampicillin و Cloxacilline (Abera et al., 2015).

بينما أشارت دراسات أخرى إلى أنَّ الجينات التي تقع على الكروموسوم البكتيري وكذلك على البلازميد البكتيري يمكن ان يحصل لها انتقال ما بين السلالات المختلفة وذلك لكي تشفر لمجموعة من الأنزيمات التي تقوم بدورها باضفاء صفة المقاومة للسلالات المنقولة إليها (Stoczko et al., 2006). وقد توصلت الدراسة التي قام بها الباحثان الحسو والطائي، 2008 إلى أنَّ بكتريا *Rhizobium leguminosarum* تمتلك القدرة على إنتاج أنزيم β -lactamase الذي يقوم بعملية تحليل المضاد الحيوي β -lactam؛ لذا جعله غير قادر على التأثير على الخلية البكتيرية. كما قام الباحث (Wadhwa et al., 2017) بدراسة الحساسيّة والمقاومة لبكتريا الرايزوبيوم التي عُزلت من العقد الجذرية لنبات الحمص النامي في الأراضي الزراعية الهندية إذ وجد أنَّها تمتلك صفة المقاومة للمضاد الحيوي الـ Kanamycin بصورة كبيرة، بينما كانت هذه العزلات أقل مقاومة للمضاد الحيوي الـ Chloramphenicol.

16-2 مقاومة المعادن الثقيلة: Heavy metals resistance

تُعَدُّ المعادن الثقيلة من المواد التي توجد بشكل طبيعي في التربة وأية زيادة في تراكيزها يُعَدُّ ملوثاً للتربة وهناك أسباب عديدة تعمل على تلوث التربة بالمعادن الثقيلة منها الأنشطة البشرية مثل: تلوث الغلاف الجوي والتعدين وبعض الممارسات الزراعية والنفايات الصناعية، إذ تُعَدُّ عمليات التجوية للصخور التي تتكون من المعادن الثقيلة أحد أسباب التلوث الطبيعي (Fagorzi et al., 2018)، فضلاً عن عمليات التخلص من بعض المعادن الثقيلة والسامة مثل: الرصاص Pb^{+2} و الزنك Zn^{+2} والزرنيق Hg^{+2} و النحاس Cu^{+2} والنيكل Ni^{+2} والكاديوم

Cd^{+2} والفضة Ag^{+2} التي يتم إنتاجها كمخلفات من العمليات الصناعية المختلفة وبذلك يتم إضافة هذه المواد بصورة مستمرة إلى التربة؛ مما يؤدي إلى زيادة تراكيزها إلى مستويات خطيرة وضارة للنبات والحيوان وكذلك على الإنسان (Sharma and Agrawal, 2005)، والخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة تتأثر بالمعادن الثقيلة مثل الدالة الحامضية وعمليات الأكسدة وأكاسيد الفلزات المائية ودرجة الحرارة ومحتوى الماء والمادة العضوية والقدرة على التخزين المؤقت وبعض الخصائص الحيوية مثل: المواد التي تفرز من الجذور (Jung, 2008).

وأشارت العديد من الدراسات إلى دور المعادن الثقيلة أيضًا في عملية تثبيت النايروجين بصورة تكافلية؛ لأنَّ أنزيم النايروجيناز Nitrogenase له دور رئيس في عملية تثبيت النايروجين بصورة تكافلية الذي يعتمد على عوامل مساعدة عديدة تتألف من الحديد والموليبديوم FeMo-co أو الحديد والفناديوم VFe-co أو قد يتألف من جزأين من الحديد FeFe-co (Gonzalez-Guerrero et al., 2014).

وقد توصلت دراسة أخرى إلى أنَّ هناك دورًا رئيسًا لعنصر النيكل Ni^{+2} في التحفيز على عملية تثبيت النايروجين مما يساعد في نمو نبات فول الصويا (*Soy bean Glycine max L.*) وكذلك يعمل على زيادة نشاط أنزيم الهيدروجيناز Hydrogenase في سلالة *R. leguminosarum bv. Viciae* (Lavres et al., 2016). وكذلك بيّنت دراسة أخرى بأنَّ الزيادة في تراكيز المعادن الثقيلة يؤثر سلبًا على العلاقة التعايشية ما بين بكتريا الرايزوبيوم والنباتات البقولية الأمر الذي يؤدي إلى تقليل عدد ومعدل تكوين العقد الجذرية في النبات. كما ويقلل من معدل عملية تثبيت النايروجين وذلك عندما تمت دراسة 47 سلالة من بكتريا *Mesorhizobium* التي عزلت من العقد الجذرية والتربة النامية فيها التي كانت ملوثة بمستويات مختلفة من عنصر النيكل Ni^{+2} ، إذ تبين بأنَّ معظم التغيرات التي ترتبط بعملية التكيف للمعادن الثقيلة يكون موقعها على جزء الجينوم غير الأساسي للبكتريا. وهذا قد يُعدُّ دليلًا على أنَّ تكيف النبات لتحمل المعادن الثقيلة يكون معزلاً بالنقل الأفقي للجينات (Fagorzi et al., 2018) Horizontal gene transfer.

والتأثير التثبيطي للمعادن الثقيلة على العلاقة التعايشية ما بين بكتريا الرايزوبيوم والنبات البقولية يمكن أن يكون بسبب التأثير السام المباشر لهذه المعادن الثقيلة على عملية تكوين العقد أو صبغات البناء الضوئي (Wani et al., 2006) أو يكون بسبب التأثير بشكل غير مباشر على بكتريا الرايزوبيا التي تكون موجودة على السطوح الجذرية للنباتات البقولية، لأنَّ هذه

المعادن تعمل على منع بناء الجزيئات الحيوية الأساسية لنمو وتكاثر بكتريا الرايزوبيا وكذلك تسبب إنتاج مركبات وسطية مثل الأوكسجين الأحادي O وجذر الهيدروكسيل الحر OH الذي يتفاعل مع الأوكسجين (Breen and Murphy, 1995).

كما أشار الباحث Paul *et al.*, (2018) بأن التراكم الحيوي للمعادن الثقيلة في البيئة وزيادة سميتها يؤثر على الكائنات الحية بصورة كبيرة، إذ إن العمليات الكيميائية والبيولوجية لا تتمكن من تفكيك المعادن الثقيلة، ولكن يمكنها أن تحولها إلى مواد ذات سمية أقل على العكس من بعض الملوثات العضوية التي بالإمكان تفكيكها إلى مواد أبسط. فقد وجد أن بعض سلالات بكتريا الرايزوبيوم التي عزلت من العقد الجذرية لنبات الحمص النامي في أراضي زراعية في الهند، كانت حساسة لكلوريد الزئبق بينما كانت مقاومة لكبريتات الزنك إلى حد ما (Wadhwa *et al.*, 2017).

Bacteriocins

17-2 البكتريوسينات:

وهي عبارة عن سموم بروتينية يتم إفرازها من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام، إذ ان لها مدى مثبط ضيق تجاه البكتريا التي تكون قريبة منها في النسب التصنيفي؛ والكثير من البكتريوسينات التي يتم إنتاجها من بكتريا حامض اللاكتيك (LAB) Lactic acid bacteria لها مدى تثبيطي يمتد إلى ما بعد مستوى الجنس، وكذلك لها قدرة كامنة للدفاع ضد المايكوفلورا Micoflora غير المرغوب فيها (Chatterjee and Raichaudhuri, 2017).

وقد تم التعرف على البكتريوسينات قبل 100 سنة بوصفها بكتريوسينات مقاومة للحرارة في المزارع التابعة لسلالة بكتريا *Escherichia coli* VT إذ كانت سامة للسلالة البكتيرية *E. coli* S وقد أطلق عليها اسم كوليسين Colicin وذلك لكي يتم تمييزها عن الأنواع المنتجة لها. وغالبًا يتم تصنيع هذه البكتريوسينات من الرايبوسومات. وان الجينات التي تشفر لإنتاج البكتريوسين تكون منتظمة بشكل عناقيد Clusters وتسمى Epichromosomal operon غير إن بعضها يتم تشفيرها من الكروموسوم كما في العزلة 5 *Lactobacillus saki* التي تقوم بإنتاج نوعين من البكتريوسينات المشفرة من الكروموسوم (Sahl and Bierbaum, 1988).

وقد جذبت هذه الببتيدات المتعددة الانتباه وذلك بسبب استعمالها كعوامل مضادة لبعض أنواع البكتريا لعلاج العديد من الأصابات، فضلاً عن ذلك فإنه يمكن أن تستخدم في تغذية الحيوان وكذلك في حفظ الأغذية. وعائلة البكتريوسينات تحتوي أعدادًا متنوعة من البروتينات

طبقاً إلى الهدف الميكروبي، الحجم، طبيعة الفعل، فضلاً عن التحرر من البكتريا والآليات المناعية وبناءً على ذلك يمكن تقسيمها إلى قسمين رئيسين: الأولى تلك التي تنتجها البكتريا السالبة لصبغة كرام أمّا الثانية فهي التي يتم إنتاجها من البكتريا الموجبة لصبغة كرام (Gordon and O'Brien, 2006).

تُعدُّ بكتريا *Rhizobium leguminosarum* من البكتريا السالبة لصبغة كرام وتدخل في علاقة تكافلية مع نباتات العائلة البقولية؛ لذا ينتج عن هذه العلاقة التحفيز على تكوين عقد جذرية على جذور هذه النباتات إذ تعمل على تثبيت النايروجين. وقد أظهرت عزلات من هذه البكتريا قابليتها على إنتاج البكتريوسينات التي تم تصنيفها إلى صغيرة ومتوسطة وكبيرة الوزن الجزيئي.

قام الباحث (Butt et al., 2011) بدراسة التركيب الثلاثي للبروتين التابع للبكتريوسين والمشفّر من الجين الذي عُزل من العزلة العائدة لبكتريا *R. leguminosarum* bv. *viceae* LC-31 كما أنّ الدراسات قد أظهرت أنّ الإنتاج الكمي للبكتريوسين لا يرتبط بالصفات التعايشية لعزلة الرايزوبيا، فضلاً عن ذلك فقد وجد الباحثان (Gross and Vidavar 1978) أنّ هناك تسع عزلات غير فعّالة في تثبيت النيتروجين غير انها تنتج البكتريوسين في بكتريا *R. japonicum* بينما كانت هناك ثمانى عزلات من هذه البكتريا تُعدُّ غير قادرة على إنتاج البكتريوسين لكنها قامت بالتحفيز على تكوين عقد جذرية فعّالة على جذور نبات فول الصويا، بينما كانت عزلة واحدة فقط فعّالة في تثبيت النايروجين.

18-2 البكتريا المرضية قيد الدراسة: Pathogenic bacteria used in this study

1-18-2 الايشيريشية القولونية: *Escherichia coli*

تم تسمية هذه البكتريا بهذا الاسم نسبة إلى العالم الألماني Escherich الذي اكتشفها عام 1885م وتكتب اختصاراً *E. coli*، إذ تنتمي هذه البكتريا إلى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) إذ تسبب حدوث مرض الاسهال Diarrhea وتسبب العديد من الأمراض التي تشكل بحدود 90 % منها إصابات المسالك البولية (Terlizzi et al., 2017). وهي بكتريا عصوية الشكل Rod shaped ومتحركة بواسطة الاسواط المحيطية وسالبة لصبغة كرام وغير مكونة للأبواغ إذ إنّ عدداً من السلالات التابعة لهذا النوع من البكتريا تمتاز بتكوينها للمحفظة Capsule (Kaper et al., 2004). وهذه البكتريا

لاهوائية اختيارية موجبة لاختبار الاندول والمثيل الأحمر وسالبة لاختبار السترات والفوكس بروسكاور ولا تنتج غاز H_2S وتنتج غاز عند تخميرها لسكر الكلوكوز وتكون مخمرة لسكر اللاكتوز ودرجة الحرارة المثلى لنموها هي 37 °م وتظهر بلون أخضر معدني على وسط الايوسين المثلين الأزرق الصلب (Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) (Elliot et al., 2007).

توجد هذه البكتريا كفلورا طبيعية في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان وتعد أكثر أجناس العائلة المعوية من حيث الأهمية فهي بكتريا انتهازية؛ إذ لها القدرة على إحداث التهاب المعدة والأمعاء (Brooks et al., 2010). كما تمتلك هذه البكتريا البكتريوسين الذي يدعى Colicin الذي يعمل على قتل الأجناس البكتيرية الأخرى مما يؤدي إلى حماية البكتريا (Soltani et al., 2018). وتتملك هذه البكتريا أيضاً عوامل الالتصاق Adherence factor مثل الأهداب وإفرازها عدد من الأنزيمات مثل أنزيم Hemolysinase وبعض سلالات *E. coli* تسبب حالات إسهال للأطفال ومنها Vallance and Entero pathogenic *E. coli* و (EPEC) و (EHEC) *Enterohemorrhage E. coli* إذ تؤدي إلى إحداث إسهال دموي عند الأطفال (Alvarez-Uria, G et al., 2018).

2-18-2 المكورات العنقودية الذهبية: *Staphylococcus aureus*

هي بكتريا كروية غير متحركة موجبة لصبغة كرام تنتظم بشكل عناقيد غير مكونة للابواغ هوائية أو لا هوائية اختيارية، يمكنها النمو في وسط حاوي على 5-10% من كلوريد الصوديوم إذ انها تمتلك القدرة على تخمير بعض أنواع السكريات ولها القدرة كذلك على إنتاج حامض بدون الغاز ولا تتأثر بأملاح الصفراء وتتلون باللون الأصفر الذهبي على وسط الاكار المغذي Nutrient agar (Prescott and Harley, 1996). وتكون هذه البكتريا سالبة لاختبار الاوكسيديز لكنّها تكون موجبة لاختبار المثيل الاحمر واختبار الفوكس بروسكاور كما انها تقوم بتحليل اليوريا وذلك بإنتاج أنزيم اليوريز Urease ودرجة الحرارة المثلى لنمو هذه البكتريا هي 37 °م والذالة الحامضية المثلى (pH) هي ما بين 7.4-7.6. إذ يمكن لهذه البكتريا أن تنمو على الأوساط الاعتيادية، كما أنّ بعض أنواع المكورات العنقودية الذهبية هي السبب الرئيس لعدوى المستشفيات التي تسمى المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين-Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) والمكورات العنقودية الذهبية المقاومة

للفانكوميسين Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) (Zarazaga, M *et al.*, 2018) وتمتاز هذه البكتريا بامتلاكها العديد من عوامل الضراوة ومنها الأنزيم الحال للدهون Lipase وأنزيم الفوسفاتيز Phosphatase وأنزيم البيتا لاكتيميز Beta lactamase (Jawetz *et al.*, 2004).

Salmonella typhi

3-18-2 بكتريا السالمونيلا:

تم تسمية هذه البكتريا بهذا الاسم نسبة إلى العالم دانيال سالمون Salmon الذي قام بعزل عصيات سالمونيلا من الخنازير عام 1885م وتعد المسبب الرئيس لمرض التيفوئيد، إذ تعود هذه البكتريا إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae. وهي عبارة عن عصيات سالبة لصبغة كرام صغيرة الحجم متحركة بواسطة أهداب محيطية هوائية أو لاهوائية اختياريًا وغير مكونة للسبورات وغير محاطة بمحفظة Capsule. لكنّها تستطيع تخمير سكر الكلوكوز وإنتاج الغاز والحامض فضلًا عن ذلك فهي قادرة على إنتاج غاز الكبريت (Savran *et al.*, 2007). إنّ هذه البكتريا تستطيع أن تنمو على الأوساط الصلبة وتتمكّن من إنتاج أنزيم اليوريز Urease وتعطي نتيجة موجبة لاختبار المثل الأحمر وسالبة لاختبار الأوكسيديز وسالبة لاختبار فوكس بروسكاور وكذلك يمكنها استعمال السترات مصدرًا للكربون (Baron and Finegold, 1990). وتمتاز بكتريا السالمونيلا بمقاومتها لبعض أنواع المركبات الكيميائية مثل تيتراثايونات الصوديوم والأخضر البراق المثبطة لنمو الأجناس البكتيرية المعوية الأخرى (Carey *et al.*, 2018). وأغلب أنواع جنس السالمونيلا تكون ممرضة للإنسان والحيوان أمّا مصادر العدوى فتكون عن طريق الأطعمة الملوثة والمياه مثل اللحوم والأشخاص الحاملين (Indar *et al.*, 2001).

Pseudomonas aeruginosa

4-18-2 الزائفة الزنجارية:

هي بكتريا سالبة لصبغة كرام غير مكونة للأبواغ وبعض أنواعها تكوّن الحافظة في ظروف خاصة، تتحرك بواسطة سوط أو أكثر من الأسواط القطبية Polar flagella (Ben *et al.*, 2011). وتكون هذه البكتريا هوائية إختيارية Facultative aerobic وتنتج عدد من الصبغات، ودرجة الحرارة المثلى لنمو هذه البكتريا هي 37° م وتعدّ هذه الصفة مميزة لهذا النوع عن الأنواع الأخرى التابعة لجنس *Pseudomonas*، كما تستطيع هذه البكتريا إنتاج الصبغة الخضراء المزرقّة التي تنتشر في

الوسط الزراعي؛ إذ تظهر المستعمرات بلون أخضر مزرق على وسط اكار المغذي Nutreint agar بينما تكون ذات لون شاحب على وسط Macconkey agar (Ryan *et al.*, 2010). تعطي هذه البكتريا نتيجة موجبة لاختبار الكتاليز Catalase والاكسيديز Oxidase بينما تعطي نتيجة سالبة لاختبار الفوكس بروسكاور والاندول والمثيل الأحمر وتعطي نتيجة موجبة لاختبار استهلاك السترات بينما تكون متغايرة في إنتاجها لأنزيم اليوريز Urease (Altheide, 2020). تمتاز هذه البكتريا بانتشارها بشكل واسع في مختلف البيئات؛ إذ توجد في الماء والتربة وفي النباتات والحيوانات كما يمكن أن توجد أيضًا كفلورا طبيعية في جلد الأشخاص الطبيعيين وكذلك تنتشر بكثرة في البيئات الرطبة للمستشفيات وتكون بذلك المسبب الرئيس لعدوى المستشفيات Nosocomial infection كما في إصابات الحروق Burns infection وكذلك إصابات الجروح Wounds infection (Hilliam *et al.*, 2020).

2-18-5 الكلبسيلا الرئوية: *Klebsiella pneumoniae*

تم تسمية هذه البكتريا بهذا الاسم نسبة إلى العالم الألماني Edwan Klebs الذي قام باكتشافها في عام 1834م، تعود بكتريا الكلبسيلا *Klebsiella* إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae. ثم قام بعد ذلك العالم FriedLanders عام 1882م بتشخيصها لأول مرة وسميت بعصيات فريدلاند FriedLanders Bacilli تكريما لجهوده، تُعدُّ من أبرز أنواع الأحياء المجهرية التي يمكن أن توجد في بيئات مختلفة وبذلك تسبب تلوث المياه والتربة، إذ تؤدي أحداث أمراض عديدة سواء في الإنسان أو الحيوان أو النبات، وهي سالبة لصبغة كرام وتُعدُّ من البكتريا الانتهازية؛ لأنها تتسبب في الكثير من الأمراض المكتسبة في المستشفيات كالتهاب الرئة المكتسب Community acquired pneumonia والتهاب القناة البولية Urinary Tract Infection وغيرها من الأمراض، وتعزى قدرة هذه البكتريا في أحداث الإصابة إلى امتلاكها لصفة المقاومة لأنواع مختلفة من المضادات الحيوية مثل مضادات البيتا لاكتام β -Lactam antibiotic المحللة للسيفالوسبورينات والبنسلينات الأمر الذي يشكل مشكلة عالمية كبيرة (Chan *et al.*, 2009).

19-2 أنواع الفطريات المرضية المدروسة:

Types of studied pathogenic fungi

Aspergillus niger

1-19-2 الرشاشية السوداء:

يُعدُّ فطر *Aspergillus niger* من أبرز الفطريات الخيطية الكيسية وهي واسعة الانتشار؛ إذ تستطيع أن تنمو في ظروف مختلفة وبيئات مختلفة وتوجد على المواد العضوية المتحللة والأخشاب الرطبة وفي الهواء والتربة وتعود قابلية الانتشار الكبيرة لهذا الفطر إلى الأعداد الكبيرة من السبورات Spores التي ينتجها فضلاً عن إنتاجه أنزيمات خارج خلوية عديدة التي تعمل على تحليل المواد إلى مكوناتها الأساسية ليتمكن الفطر من امتصاصها بسهولة (السهيلي وآخرون، 1980)، إذ تستخدم هذه الفطريات في التخمرات الصناعية ومعالجة الأغذية وكذلك لها أهمية طبية واقتصادية كبيرة. ويعد *A. niger* أحد سلالات جنس الـ *Aspergillus* السائدة؛ إذ يستطيع إنتاج العديد من الأنزيمات التي تحفز عملية التمثيل الغذائي للمركبات الكيميائية مثل تحويل بوليفينول الشاي Tea polyphenols إلى ثيرونين نشط بيولوجياً (Ma et al., 2020) Bioactive theabrownins.

Fusarium solani

2-19-2 المغزلي المغذي:

يُعدُّ جنس الـ *Fusarium* الذي اكتشف من العالم Link عام 1809م من الأجناس الفطرية المميّزة اقتصادياً؛ إذ يضم العديد من الأنواع الممرضة للإنسان والنبات والحيوانات الداجنة. ينتمي هذا الفطر *Fusarium solani* إلى صنف الفطريات الناقصة Deuteromycetes إذ ينتشر بشكل واسع في التربة ويعيش بصورة رمية مسبباً العديد من الأمراض النباتية (السهيلي وآخرون، 1980)، ومن أبرز الأمراض النباتية التي يسببها الفطر *Fusarium solani* مرض موت البادرات Seedling damping-off disease وكذلك مرض تعفن الجذور كما يصيب البذور في غرب كندا وشمال وغرب أمريكا. يتكاثر الفطر لا جنسياً بواسطة الأبواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة، أمّا التكاثر الجنسي فهو غير معروف لذلك ما زال يوجد جنس الـ *Fusarium* في معظم أنحاء العالم خاصة في التربة أو في البقايا النباتية بشكل مترمم أو داخل النسيج النباتي (Costa et al., 2021).

2-19-3 نوع البنسليوم:

Penicillium spp.

يُعدُّ جنس *Penicillium* من الأجناس واسعة الانتشار؛ إذ يعيش بصورة رمية على المواد العضوية كما ينمو بعض أنواع هذا الجنس على الفواكه والخضروات مما يسبب تلفها فضلاً عن وجود أنواع كثيرة منه في الهواء والتربة (Samson et al., 2010). تمتاز مستعمرات الفطر *Penicillium* بكونها سريعة النمو، مسطحة الشكل كثيفة، خيطية ذات تركيب مخلي صوفي أو قطني تكون في بداية النمو ذات لون أبيض ثم مع الوقت تصبح خضراء مزرققة، خضراء رمادية أو زيتونية رمادية وأحياناً صفراء أو وردية أمّا خلفية المستعمرات عادة تكون شاحبة أو مصفرة وقد تكون في بعض الأنواع حمراء أو بنية (Malik et al, 2021). لا يسبب هذا الفطر الأمراض للإنسان بصورة مباشرة إلا في بعض الحالات الانتهازية Opportunistic infection التي يمكن أن تسبب بعض الأمراض مثل التهاب القرنية الفطري mycotic keratitis وكذلك أمراض الإذن الفطرية Otomycosis. وتمتاز العديد من أنواعه بقابليتها على إفراز بعض المركبات الحيوية التي تعمل على تثبيط العديد من البكتريا المرضية كما في المضاد الحيوي البنسلين *Penicillin* الذي تم استخراجه أول مرة من السلالة، *P. notatum* إذ تم اكتشافه من العالم Alexander-fleming عام 1929م. ثم قام بعد ذلك العالم Anest chian و Heward flory باستخلاص وتنقية هذا المضاد كمركب سنة 1930م وبذلك تمكن هذا العلاج من إنقاذ حياة أعداد كبيرة من الجنود الجرحى خلال الحرب العالمية الثانية وبسبب هذا الاكتشاف العظيم حصل كل من الباحثين على جائزة نوبل في الطب سنة 1945م (Dayalan et al. , 2011).

2-19-4 المبيضة البيضاء:

Candida albicans

تُعدُّ خميرة *Candida albicans* من الكائنات الحية الدقيقة التي توجد كفلورا طبيعية على الجلد وكذلك على الأغشية المخاطية في الأشخاص الطبيعيين؛ إذ تُعدُّ من الفطريات الانتهازية Opportunistic fungi التي تسبب مرض يعرف باسم داء المبيضات Candidiasis في 30-50% من الأشخاص الطبيعيين في العالم، إذ إنّ داء المبيضات يتمكن من أن يتطور من إصابة سطحية بسيطة Superficial infection في الأشخاص الطبيعيين إلى إصابة خطيرة يمكن أن تعمل على تهديد حياة الأفراد كما في الأشخاص الذين تكون مناعتهم منخفضة Immunocompromised والعوامل التي تساعد خميرة *C. albicans* في

إحداث الأمراض هي عوامل الضراوة Vinulence factors وهذه الفطريات لها القدرة على الالتصاق Adhesion بأسطح الكائن المضيف وأنسجته وتكوين الهياضات Hyphae formation وكذلك اختراق سطح الخلية Penetration والتبديل المظهري Phenotypic switching وكذلك تكوين الأغشية الحيوية Biofilm formation فضلاً عن قدرتها على إفراز الأنزيمات المحللة مائياً (Burgain et al., 2019).

20-2 الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا تجاه العزلات المرضية:

Antimicrobial activity of rhizobial isolates against pathogenic isolates

إنّ بعض الدراسات التي انجزت من الباحثين (Joseph et al., 1983) أظهرت على أنّ بكتريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* العزلة Rel-1 والعزلة IARI تقوم بإنتاج مواد (AMS) Antimicrobial substances التي تمتلك فعالية ذات مدى واسع وضيق ضد بعض الأجناس البكتيرية المرضية مثل: *Escherichia* و *Staphylococcus* و *Bacillus* و *Shigella* و *Proteus* و *Serratia* و *Salmonella* وبعد تشخيص هذه المادة تبين أنّها مادة مشابهة للـ بكتريوسين (BLS) Bacteriocin-Like substances. كما أنّ التشخيص الأولي للمادة التي انتجتها العزلة IARI أظهر أنّها تُعدّ مقاومة لدرجات الحرارة المرتفعة نسبياً التي تبلغ ما بين 75-80°م ولمدة 45 دقيقة، تكون كذلك مقاومة للتربسين Trypsin ولأنزيم Lysozyme والـ DNase I والـ RNase A، بينما تكون المادة المنتجة من العزلة Rel-1 حساسة لدرجات الحرارة المرتفعة نسبياً التي تبلغ ما بين 75-80°م ولمدة 45 دقيقة وكذلك حساسة للتربسين، بينما تكون مقاومة لأنزيم Lysozyme، DNase I والـ RNase A.

كما قام الباحث (Bhattacharya et al., 2013) بعزل بكتريا الـ *Rhizobium* وتشخيصها من العقد الجذرية لنبات الباقلاء (*Vicia faba*)، وكذلك درس الفعاليّة الحيوية للراشح المستخلص من نمو بكتريا *Rhizobium* إذ توصل إلى أنّها تكون ذات فعالية مضادة تجاه الأجناس البكتيرية المرضية *E. coli* و *Streptococcus* وبين بان الجينات المسؤولة عن إنتاج هذه المركبات تقع على البلازميد.

21-2 تفاعل البلمرة المتسلسل: Polymerase chain reaction (PCR)

إنَّ تفاعل البلمرة المتسلسل يُعدُّ من التقنيات المختبرية التي تقوم على مبدأ تصنيع عدد كبير من النسخ من قطع الـ DNA خارج جسم الكائن الحي *in vitro* باستعمال جهاز البلمرة الحراري Thermocycler إذ يعمل عند درجة حرارة تبلغ ما بين (95-98 °م) مما يؤدي إلى فك التحام شريط الـ DNA المزدوج إلى شريطين منفردين ثم يضاف أنزيم *Taq Polymerase* مع مكونات أخرى التي تؤدي إلى إنتاج ملايين من النسخ الأصلية ولدورات عديدة، كما يمكن تعريف تقنية الـ PCR طريقة مشابهة لعملية تضاعف الـ DNA اثناء الانقسام الخلوي Cell division (Liu et al, 2018)، وتقنية الـ PCR تتطلب توفر عدد من المواد الضرورية لإتمام التفاعل وهي:

1. العينة المستخدمة في التفاعل DNA Sample أو قالب الحامض النووي DNA Template.

2. بادئات Primers وتُعدُّ عبارة عن تسلسلات من القواعد النيتروجينية Nitrogenous bases التي توجد في شريط قصير واحد من الـ DNA تبلغ أطوالها ما بين (20-25) قاعدة نيتروجينية. وتكون على نوعين الأمامي Forward والعكسي Reverse التي تقوم بإكمال تتابع القواعد النيتروجينية في بداية الجزء المراد تصحيحه في الحامض النووي.

3. أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA Polymerase، ودرجات الحرارة العالية تؤدي إلى تلف هذا الأنزيم ولهذا السبب تم الاعتماد على أنزيم *Taq Polymerase* الذي تم استخراجه من بكتريا *Thermus aquaticus* التي تعيش في الينابيع الحارة بشكل طبيعي.

4. القواعد النيتروجينية Nitrogenous bases dNATP التي تتضمن Cytosine و Adenine Guanine و Thymine إذ تترتب هذه القواعد في مواقعها اثناء عملية الاستنساخ.

5. وسط التفاعل أو المحلول المنظم الذي يحتوي على بعض الأيونات أبرزها ايون المغنيسيوم Mg^{+2} ، إذ إنَّ هذا المحلول يختلف من تفاعل إلى آخر.

6. جهاز المدور الحراري Thermocycler ومبدأ عمل هذا الجهاز هو تغيير درجة الحرارة بشكل سريع ودقيق وبشكل منتظم (Liu et al, 2018).

Steps of the PCR technique

22-2 خطوات تقنية ال PCR:

إنَّ كل دورة واحدة تتضمن ثلاث خطوات وكما يأتي:

1. مرحلة المسخ Denaturation، يتم رفع درجة الحرارة في هذه المرحلة ما بين 95-98°م من أجل فك التحام شريط الحامض النووي المزدوج DNA ولمدة تبلغ ما بين (3-5) دقائق وذلك لضمان تكسر جميع الأواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي ال DNA مع بعضهما.
 2. مرحلة ارتباط البادئات Primers annealing يتم خفض درجة الحرارة في هذه المرحلة إلى ما بين 55-60°م، إذ تُعدُّ درجة الحرارة هذه مثلى لكي تلتحم البادئات مع قالب ال DNA بواسطة الأواصر الهيدروجينية.
 3. مرحلة الاستطالة Extension يتم رفع درجة الحرارة في هذه المرحلة من 72 إلى 75°م لكي يقوم أنزيم بلمرة الحامض النووي Taq Polymerase ببناء قطع ال DNA الجديدة وبوجود الروابط الهيدروجينية (Mullis, 1990).
- إذ تمثل المراحل الثلاث المذكورة آنفاً دورة كاملة ومن خلال دورات عديدة يتم تضاعف الحامض النووي ال DNA الأصل، وكمية ال DNA الناتجة تعتمد على عدد الدورات بشكل رئيس (Gopalakrishuan and Winston, 2019).
- ان تفاعل البلمرة المتسلسل PCR يتضمن تطبيقات عديدة أبرزها اكتشاف وجود طفرات وراثية وذلك عن طريق وضع بادئات خاصة للطفرات الوراثية لتضخيم الجينات الخاصة بها. كما يمكن أن يستخدم في تعيين البصمة الوراثية Genetic fingerprint وفي تشخيص بعض الأمراض الناتجة عن البكتيريا أو الفايروسات، وهذه التقنية تُعدُّ أدق وأفضل التقنيات في عملية تحديد الجنس والنوع للميكروب (Munshi, 2012). كما تُعدُّ عنصراً مميزاً في عملية تجميع الجينات وتكوين الاتحادات DNA Recombination عن طريق إنتاج أعداد كبيرة من النسخ من الجين المراد ربطه مع الحامض النووي DNA أو البلازميد Plasmid. كما يمكن أن تستخدم في تقدير طول الحامض النووي وتعمل على تغيير النهايات التابعة للجين لتكون متوافقة مع الأنزيمات القاطعة Restriction enzyme، وتُعدُّ كذلك من الخطوات الرئيسية في عملية تحديد التابع للقواعد النيتروجينية في الحامض النووي DNA الذي يعرف بـ DNA sequencer وكذلك تحديد الجين المطلوب من خليط الجينات (Green, 2019). كما تستخدم أيضاً في لطفة ساوثيرن Southern blot وهي طريقة تستخدم للكشف عن ال

DNA، وتم استعمال هذه التقنية أيضاً في ارتباط الحامض النووي DNA مع البروتين DNA- protein interaction، ولها دور مميّز في تشخيص الأمراض السرطانية Cancerous diseases (Mohar *et al.*, 2016).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

**Materials and
Methods**

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

1-3 الأجهزة والمواد المستخدمة

جدول (1-1) الأجهزة والمواد المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة	الأجهزة والمواد المستخدمة	ت
Qean (Egypt)	Refrigerator	1 الثلاجة
Mednif YXQ.SG41.280A (China)	Autoclave	2 المؤصدة
Mettler (Switzerland)	Sensitive balance	3 الميزان الحساس
Radiometer (konnemark)	pH meter	4 جهاز قياس الرقم الهيدروجيني
Memmert (Germany)	Oven	5 فرن كهربائي
Memmert (Germany)	Incubater	6 الحاضنة
Memmert (Germany)	Shaking incubator	7 حاضنة هزاة
Meheco (China)	Loop	8 العروة
Promega (USA)	Test tube	9 أنابيب الاختبار
Meheco (China)	Flask	10 دورق زجاجي
Gallenkamp (England)	Millipor filter	11 المرشحات الدقيقة
Thermo (USA)	Vortex	12 المازج الكهربائي
Memmert (Germany)	Spectrophotometer	13 جهاز الطيف الضوئي وقياس الأشعة فوق البنفسجية
Brand (Germany)	Centrifuge	14 جهاز الطرد المركزي
Hoefer (USA)	Gel electrophoresis	15 جهاز الترحيل الكهربائي
Meheco (China)	Slides	16 شرائح زجاجية
Meheco (China)	Micropipete	17 ماصة دقيقة
Meheco (China)	Spreader	18 ناشر
Meheco (China)	Foreceps	19 ملقط
Meheco (China)	Petri dishes	20 أطباق بتري
Addbio (Korea)	DNA ladder (100 bp)	21 المؤشر
GeNetBio (Korea)	2X Master mix	22 محلول مزيج التفاعل الرئيس
Gena Bioscience (Germany)	Bacteria DNA preparation kit	23 استخلاصات عديدة للحامض النووي
BioRad (USA)	Gel documentation system	24 جهاز تصوير الهلام
BioRad (USA)	Thermocycler	25 جهاز المدوار الحراري
Gemmy (Taiwan)	Water bath	26 حمام مائي

2-3 الأوساط الغذائية:

The nutrient media

1-2-3 وسط المانيتول ومستخلص الخميرة: Yeast extract mannitol medium

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 1 غم من خلاصة الخميرة Yeast extract، و10 غم من مادة Mannitol و0.10 غم من NaCl و0.20 غم من $MgSO_4 \times 7 H_2O$ و0.50 غم من مادة KH_2PO_4 و16 غم من الآكار في لتر واحد من الماء المقطر ثم تم ضبط الدالة الحامضية pH عند 6.8 ثم عُقِّمَت بالمؤصدة (Khanuja and Kumar, 1988).

2-2-3 وسط التريبتون ومستخلص الخميرة: Tryptone yeast extract (TY) medium

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 3 غم من خلاصة الخميرة Yeast extract و0.12 غم من مادة $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ و5 غم من مادة Tryptone في لتر واحد من الماء المقطر وتم ضبط الدالة الحامضية pH عند 7.0 ثم عُقِّمَت بالمؤصدة (Khanuja and Kumar, 1988).

3-2-3 وسط الرايزوبيا الأدنى: Rhizobial minimal media (RMM)

حُضِرَ هذا الوسط حسب طريقة الباحث (Singh *et al.*, 1984)، إذ يتكون هذا الوسط من محلولين:

محلول A:

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 0.45 غم من مادة $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ و2.00 غم من مادة $(NH_4)_2SO_4$ و0.10 غم من مادة $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و0.04 غم من مادة $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ و2.00 غم من مادة $FeCl_3$ ثم يكمل الحجم إلى 900 مل الماء المقطر وتضبط الدالة الحامضية pH عند 7.2 ثم تُعَقَّم بالمؤصدة.

محلول B:

يتكون هذا المحلول من إضافة 20 غم من سكر الكلوكوز إلى 100 مل من الماء المقطر وتضبط الدالة الحامضية pH عند 7.0 ثم تُعَقَّم بالمرشح الغشائي Millipor filter بقطر 0.20 مايكروميتر ويضاف السكر إلى المحلول الأول.

Gelatin medium

4-2-3 وسط الجيلاتين:

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 128 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن تم ضبط الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2.

Simmon citrate medium

5-2-3 وسط سيمون ستريت:

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 23 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن تم ضبط الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2.

Triple sugar iron agar (TSI)

6-2-3 وسط الحديد والسكريات الثلاثية:

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 65 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن تم ضبط الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2.

Sugars medium

7-2-3 وسط السكريات:

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 10 غم من سكريات مختلفة و 1 غم من خلاصة الخميرة Yeast extract، و 0.20 غم من $MgSO_4 \times 7 H_2O$ و 0.10 غم من NaCl و 0.50 غم من مادة KH_2PO_4 و 16 غم من الآكار Agar في لتر واحد من الماء المقطر وتم ضبط الدالة الحامضية pH عند 6.8 ثم عُقِمَت بالمؤصدة (Khanuja and Kumar, 1988).

Motility test medium

8-2-3 وسط اختبار الحركة:

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 1.3 غم من وسط التريبتون وخلاصة الخميرة شبه الصلب في 100 مل من الماء المقطر ثم اضيف له 0.5 غم من الآكار Agar وتم ضبط الدالة الحامضية pH عند 7.2 ثم عُقِمَت بالمؤصدة (Collee et al., 1996).

MacConkey agar medium

9-2-3 وسط آكار الماكونكي:

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 51.5 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن ضُبِطَت الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2.

Nutrient agar medium

10-2-3 وسط الآكار المغذي:

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 28 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن تم ضبط الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2.

Nutrient broth medium

11-2-3 وسط المرق المغذي:

حُصِرَ هذا الوسط بإذابة 13 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن ضُبِطت الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2.

Blood agar medium

12-2-3 وسط آكار الدم:

حُصِرَ هذا الوسط بإذابة 35 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن يتم ضبط الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2 ثم أُضيف إليه دم مأخوذ من الإنسان بنسبة 5% وذلك بعد أن تنخفض درجة حرارة الوسط إلى درجة حرارة مناسبة (Forbes *et al.*, 2007).

Eosin methylene blue medium

13-2-3 وسط الايوسين مثيلين الأزرق:

حُصِرَ هذا الوسط بإذابة 30 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن ضُبِطت الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2.

Muller-Hinton agar medium

14-2-3 وسط مولر-هنتون:

حُصِرَ هذا الوسط بإذابة 35 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن تم ضبط الدالة الحامضية pH عند درجة 7.2.

Sabouraud dextrose agar (SDA)

15-2-3 وسط سابرويد دكستروز الصلب:

حُصِرَ هذا الوسط بإذابة 62 غم منه في لتر واحد من الماء المقطر وتم ضبط الدالة الحامضية pH عند 5.6 ثم عُقِمَ بالمؤصدة وترك إلى أن تنخفض درجة حرارة الوسط إلى 45-50 °م بعد ذلك تم إضافة المضاد البكتيري Streptomycin sulphate بتركيز 100 مايكروغرام/مل من الوسط (MacFaddin, 1980).

Potato dextrose agar

16-2-3 وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار:

حُصِرَ هذا الوسط بإذابة 200 غم من خلاصة البطاطا potato extract و 20 غم من سكر الدكستروز و 20 غم من الاكار في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بعد أن تم ضبط الدالة الحامضية pH عند درجة 7.0.

3-3 قياس الدالة الحامضية:

Measurement of hydrogen ion Value (pH)

تم استعمال جهاز قياس الدالة الحامضية pH meter لضبط الاس الهيدروجيني للأوساط الغذائية عند الدرجة المناسبة.

Sterilization

4-3 التعقيم:

عُقِّمَت الأوساط الغذائية باستعمال جهاز التعقيم المؤسدة Autoclave عند درجة حرارة 121°م وضغط 1 جو ولمدة ربع ساعة أمَّا الزجاجيات فتُعقَّم باستعمال الفرن الكهربائي Oven عند درجة حرارة 170°م بينما عُقِّمَت المحاليل والمواد التي تتأثر بالحرارة عن طريق استعمال مرشحات Millipore filters ذات قطر 0.20-0.45 ميكرومتر (Jenneman *et al.*, 1986).

5-3 الكواشف والمحاليل والصبغات: Reagents, solvents and stains

Catalase reagent

1-5-3 كاشف الكاتاليز:

حُضِرَ هذا الكاشف وذلك بإضافة 3 مل من بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂ إلى 97 مل من الماء المقطر المعقم Distilled Water (Harley and Prescott, 2002).

Oxidase reagent

2-5-3 كاشف الاوكسديز:

حضر هذا الكاشف بإذابة 1 غم من مادة *N, N, N, N*-tetramethyl-*p*-phenylene diamine في 100 مل من الماء المقطر Distilled Water وتحفظ في قنينة زجاجية معتمة عند درجة حرارة 25-30°م (Brown, 2007).

Normal saline solution

3-5-3 المحلول الوظيفي (الفسلجي):

حُضِرَ المحلول الفسلجي المعقم NaCl بتركيز 0.85 % لتخفيف نمو المزارع البكتيرية وذلك عن طريق إضافة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم النقي إلى 100 مل من الماء المقطر ثم عُقِّمَت باستعمال جهاز المؤسدة.

4-5-3 صبغة كرام Gram stain وتضم المحاليل الآتية:

1. محلول الكريستال البنفسجي Crystal violet solution

2. محلول السفرانين Safranin solution

3. محلول الأيودين Grams iodine solution

4. محلول قاصر الألوان Decolorizer solution

3-6 عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية للنباتات المثبتة للنايتروجين:

Isolation of rhizobial bacteria from root nodules of nitrogen fixing plants

جُمعت أنموذجات النباتات البقولية والنباتات المثبتة للنايتروجين من مواقع بيئية وزراعية مختلفة لمحافظة نينوى، بغداد، الأنبار ودهوك- كردستان/العراق. إذ تم جلب قسم من النباتات أو جلب العقد الجذرية من الأشجار المثبتة للنايتروجين من المواقع المختلفة محفوظة في المحلول الفسلجي المعقم إلى مختبر بحوث الأحياء المجهرية/الوحدة البحثية لقسم علوم الحياة وكما يأتي: اللوبيا (*Vigna unguiculata* L. (Cowpea) و الحلبة (Fenugreek) و *Trigonella foenum-graecum* L. و العدس (*Lens culinaris* L. (Lental) و الحمص و *Phaseolus vulgstris* L. (Green bean) و الهريمان (*Lathyrus sativus* L. (Grass pea) و فول الصويا (*Glycine max* L. و الماش (*Vigna radiata* L. و الجت (*Medicago sativa* L. (Alfalfa) و اللبوسينيا (*Leucaena leucocephala* و السيسبان (*Sesbania herbacea* و خف الجمل (*Bauhinia purpurea* L. و الكاتالبا (*Catalpa speciosa* L. (Catawba tree) و الباركنسونيا (*Parkinsonia aculeata* L. و البيزيا (*Albizia odoratissima* L. وقد تم التأكد من اجناس وأنواع النباتات والتي تم أخذ العقد الجذرية منها وذلك بجلب أنموذج من كل نبات وتم عرضها على مختصين في علم تصنيف النبات في كل من كلية الزراعة والغابات وكلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل.

وبعد اتباع طريقة عزل بكتريا الرايزوبيوم وتنقيتها كما جاء في طرائق العمل الفقرة 3-6. فقد تم الحصول على 42 عزلة الجدول (4-1) من بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية (الصورة 4-2) من النباتات المثبتة للنايتروجين والنامية في المحافظات الأربع المختلفة المذكورة آنفًا.

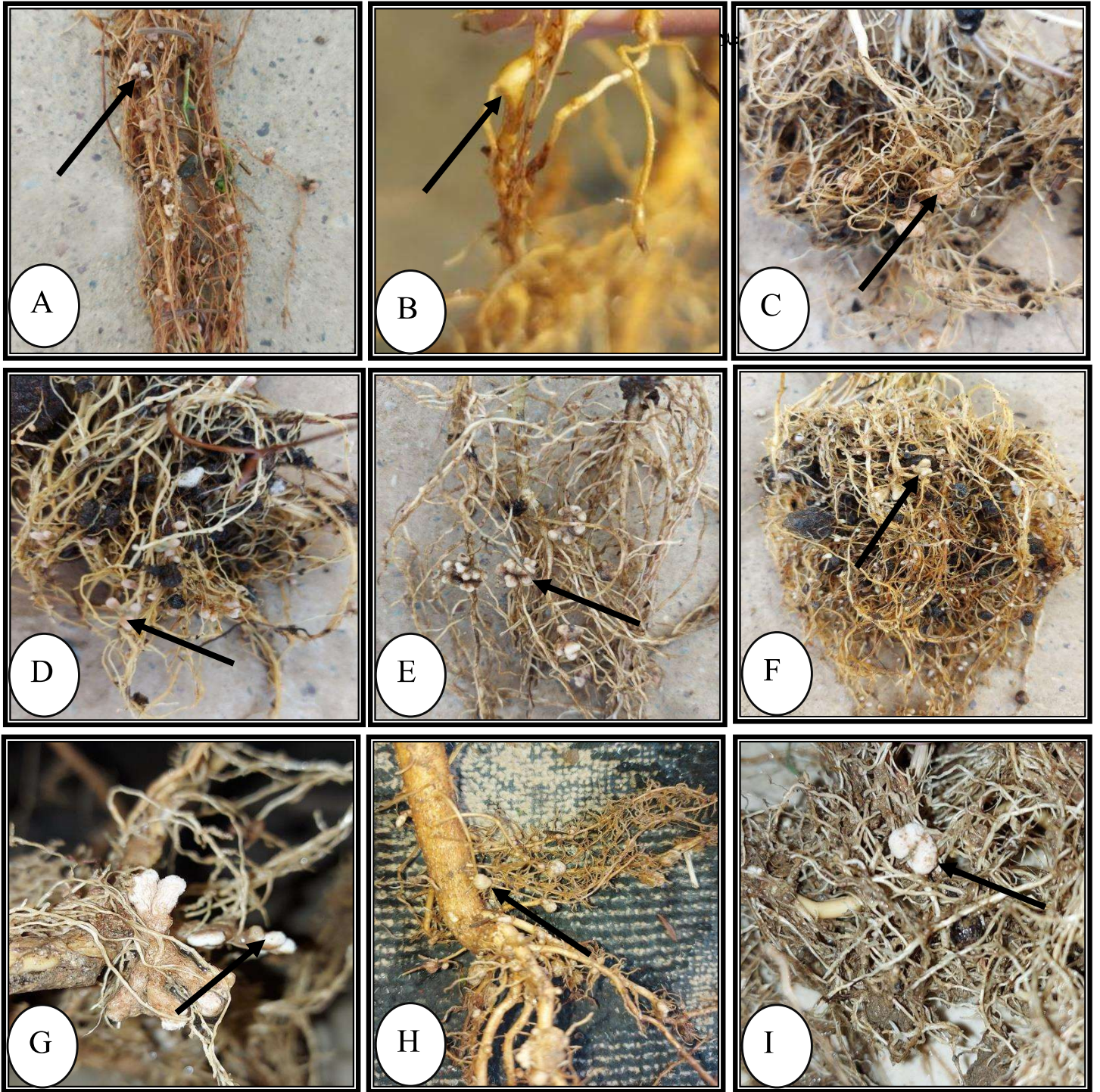
نُقِيَّت هذه العزلات بطريقة التخطيط وُجِدَّت العزلات كل أربعة أسابيع وتم حفظها عند درجة حرارة 4 °م للقيام بالتجارب اللاحقة، وبالاعتماد على العلاقة التعايشية عالية التخصص ما بين النبات المثبت للنايتروجين وبكتريا الرايزوبيوم فقد تم تحديد جنس بكتريا الرايزوبيوم ونوعها.

أُخذت النباتات البقولية الحاوية على بكتريا الرايزوبيوم مع القليل من التربة المحيطة بالمنطقة الجذرية للنبات لكي لا يتم فقدان العقد الجذرية Root nodules من الجذور وبعدها تم غُسل الجذور بالماء الجاري تحت صنوبر المياه Faucet لنتخلص من التربة العالقة بجذور النبات من دون فقدان العقد الجذرية من الجذور. ثم قطعَت العقد الجذرية السليمة غير التالفة عن طريق مقص واختبرت عقدة جذرية واحدة مع إبقاء جزء صغير الذي يربط العقدة الجذرية بالجذور وبعدها غُمرت العقد الجذرية المقطوعة في الماء المقطر المعقم Distilled water أكثر من مرة وذلك لغسل العقدة الجذرية (Vincent, 1970, 1982). ثم غُمرت العقد الجذرية في الكحول الايثيلي Ethyl alcohol بتركيز 70% ولمدة 2-4 دقيقة ثم تم غسل العقدة الجذرية بالماء المقطر المعقم باستعمال الـ Bottle wash لمرات عديدة للتخلص من أثر الايثانول بعد ذلك غمرت العقدة الجذرية في محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl تركيز 3% ولمدة 15 دقيقة (Petit et al., 1987).

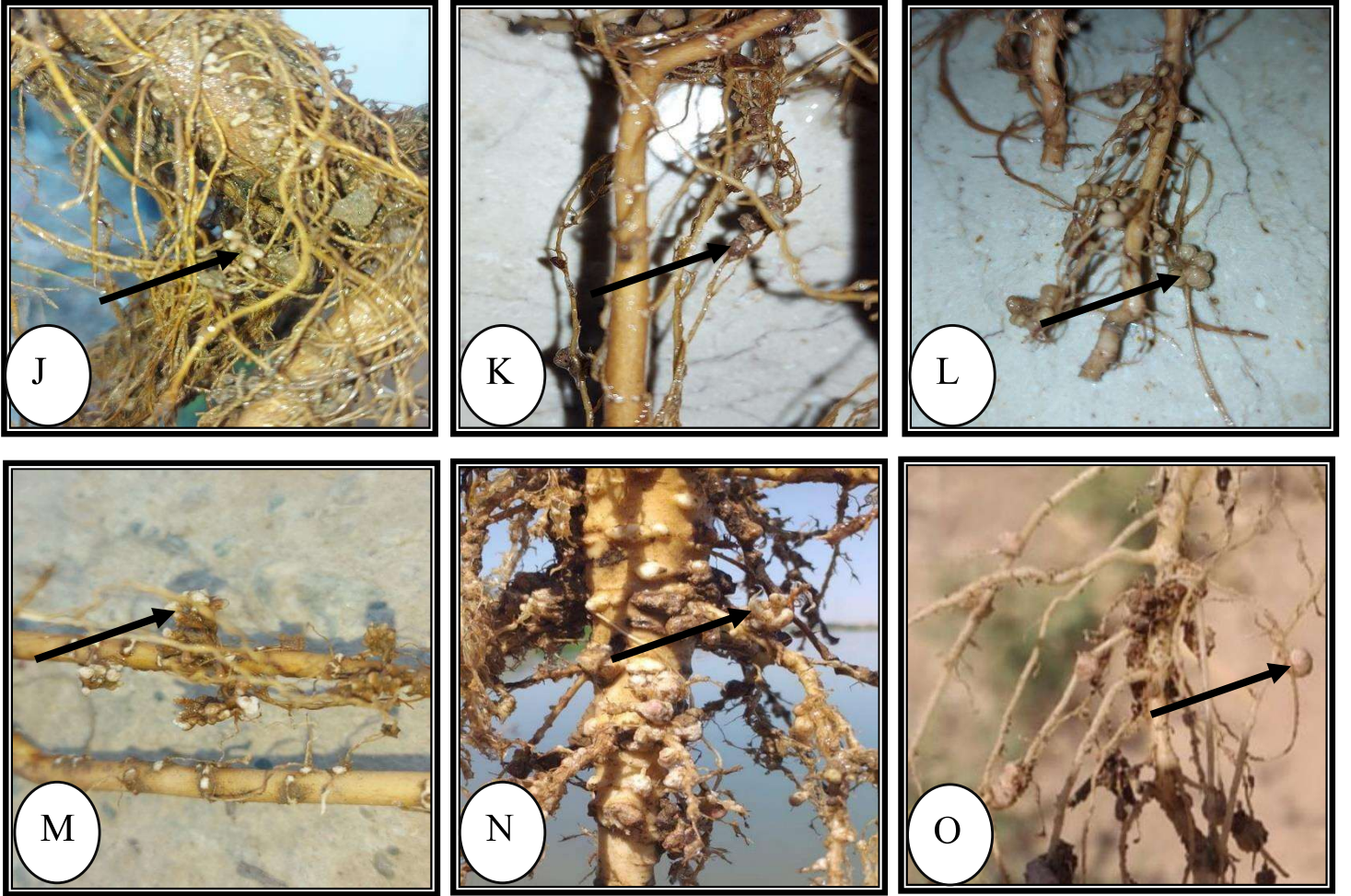
غسلت العقد بالماء المقطر المعقم Distilled water أكثر من مرة وذلك للتخلص من أثر هايبوكلورات الصوديوم NaOCl ولكي يتم التأكد من كفاءة التعقيم للعقد الجذرية، وضعت العقد الجذرية هذه على ورق الترشيح المعقم لنتخلص من الماء الزائد العالق بها. بعد ذلك تم نقل العقد الجذرية باستعمال ملقط معقم إلى طبق حاوي على الوسط الغذائي Trptone Yeast TY Extract الصلب ثم وضع الطبق في الحاضنة تحت درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24-48 ساعة وبعد التأكد من كفاءة التعقيم تم سحق العقدة الجذرية في 1.0 مل من المحلول الفسلجي Normal saline باستعمال قضيب زجاجي معقم Glass rod لكي نحصل على معلق بكتيري ثم تم نشر 0.1 مل من هذا المعلق باستعمال ناشر زجاجي Spreader على الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والتربتون (TY) الصلب وبعد ذلك حُضنت الأطباق في حاضنة النمو بدرجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 2-4 أيام.



الصورة (1-3): النباتات التي تم عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية التابعة لها والتي تم التطرق لها لأول مرة محليا.
A. خف الجمل: *Bauhinia purpurea* L. B. السيسبان *Sesbania herbacea* L. C. اللبوسينيا *Leucaena leucocephala* L.
D. البيزيا *Albizia odoratissima* L. E. الكاتالبا *Catalpa speciosa* L. (Catalpa tree). F. الباركنسونيا *Parkinsonia aculeate* L. G. الهرطمان *Lathyrus sativus* L. (Grass pea)



الصورة (1-3) تشير الأسهم إلى العقد الجذرية (R.N.) على جذور النباتات المثبتة للنايتروجين المعزولة من مناطق زراعية مختلفة من محافظات نينوى والأنبار ودهوك- كردستان وبغداد/العراق والنباتات كما يأتي:
 A. الحلبة (*Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugreek) ، B. الكاتالبا (*Catalpa speciosa* L. (Catalpa tree) ، C. الماش (*Vigna radiata* L. (Mungbean) ، D. العدس (*Lens culinaris* L. (Lental) ، E. الحمص (*Cicer arietinum* L. (Chickpea) ، F. الهرطمان (*Lathyrus sativus* L. (Grass pea) ، G. البيزيا (*Albizia odoratissima* L. (Bissia) ، H. اللوبيا (*Vigna unguiculata* L. (Cowpea) ، I. اللبوسينيا (*Leucaena leucocephala* L. (Leucaena leucocephala)



J. خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. ، K. الباركسنونيا *Parkinsonia aculeata* L. ،
 L. الفاصوليا *Phaseolus vulgstris* L. (green bean) ، M. الجت *Medicago sativa* L. (alfalfa) ،
 N.السيسبان *Sesbania herbacea* L. ، O. فول الصويا *Glycine max* L.

7-3 تنقية العزلات الرايزوبية بطريقة التخطيط:

Purification of rhizobial isolates by streaking method

لتنقية بكتريا الرايزوبيوم التي عُزلت من العقد الجذرية Root nodules للنباتات البقولية، تم استعمال الناقل ذي العروة loop لأخذ المستعمرات المنفردة ذات المظهر المخاطي أو اللزج وتم زراعتها بطريقة التخطيط على الوسط الغذائي التربتون وخلاصة الخميرة Tryptone Yeast Extract (TY). تم تخطيط الطبق من 3-4 مراحل إذ يُعَمَّم الناقل ذي العروة باستعمال اللهب في كل مرحلة من مراحل التخطيط وبعدها حُضنت الأطباق على درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24-48 ساعة.

8-3 إدامة العزلات الرايزوبية: Maintenance of rhizobial isolates

تم تنمية عزلات الرايزوبيا المفردة وحفظها وإدامتها التي عُزلت من العقد الجذرية Root nodules للنباتات البقولية على شكل موائل Slants الحاوية على الوسط الغذائي الصلب TY، ثم تم تحضينها على درجة حرارة 28 ± 2 °م ولمدة 24-48 ساعة بعد ذلك تم حفظها في الثلاجة تحت درجة حرارة 4 °م وتم تجديدها في كل شهر.

9-3 الجراثيم المرضية المدروسة: Studied pathogenic isolates

تم الحصول على عزلات البكتريا المرضية وعزلة الخميرة المرضية الآتية:

Pseudomonas و *Escherichia coli* AS37 و *Staphylococcus aureus* AS38 و *Salmonella typhi* AS43 و *Klebsiella pneumoniae* AS63 و *aeruginosa* AS60 و *Candida albicans* AS65 من قسم علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة الموصل مشخصة ونقية. كما حصلنا على الفطريات الممرضة للنبات الآتية:

Penicillium spp. و *Fusarium solani* BI2 و *Aspergillus niger* BI1

BI3 من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم /جامعة الموصل مشخصة ونقية، وتم التأكد من هذه العزلات وذلك باجراء التشخيصات المزرعية والبايوكيميائية لها وتم تنقية جميع العزلات المرضية وذلك بالزرع بطريقة التخطيط Streaking.

10-3 الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا الرايزوبيا:

Biochemical tests for rhizobial bacteria

أُجريت بعض الاختبارات البايوكيميائية لتشخيص عزلات بكتريا الرايزوبيوم والمعزولة في هذه الدراسة وكما يأتي:

1-10-3 اختبار صبغة كرام: Gram stain test

أُجري هذا الاختبار وذلك بتحضير شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة وبإضافة 1-2 قطرة من الماء المقطر المعقم على الشريحة ومن ثم نقلت مستعمرات فتية ونقية من بكتريا الرايزوبيوم إلى الشريحة ومزجت مع الماء المقطر ثم مررت على اللهب ثلاث مرات من أجل تثبيت المسحة بعدها غمرت الشريحة بصبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet لمدة دقيقة واحدة. ثم غسلت الشريحة بالماء الجاري ثم اضيف المحلول المثبت Gram's iodine لمدة دقيقة واحدة. ثم تم الغسل بالماء الجاري ثم اضيف المحلول القاصر Decolorizer (الايثانول 95%) لمدة

نصف دقيقة ولحد نزول آخر قطرة ملونة. ثم غسلت بالماء الجاري ثم تم إضافة الصبغة المعاكسة Counterstain (Safranin) لمدة نصف دقيقة ثم غسلت بالماء الجاري وجففت على ورق الترشيح وبعد ذلك فُحصت بالمجهر الضوئي تحت العدسة الزيتية بقوة 100x ويستدل على ان البكتريا سالبة لصبغة كرام من خلال ظهور خلايا البكتريا بلون وردي إلى أحمر أمّا الموجبة لصبغة كرام فيستدل عليها من خلال تلون الخلايا باللون البنفسجي أو الارجواني (الطائي و بهجت، 2007).

Motility test 2-10-3 اختبار الحركة:

أُجري الاختبار بتلقيح أطباق بتري الحاوية على الوسط الغذائي التربتون وخلصا الخميرة TY شبه الصلب بمستعمرات فتية ونقية من بكتريا الرايزوبيا عن طريق استعمال الناقل ذي العروة Loop وحضنت عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24 ساعة وتم الاستدلال على الحركة من خلال انتشار النمو بعيدًا عن منطقة التلقيح فيما دل بقاء النمو في منطقة التلقيح نفسها فقط على عدم قدرة البكتريا على الحركة (Collee *et al.*, 1996; Harley and Prescott, 2002).

3-10-3 قابلية نمو عزلات الرايزوبيا على وسط الرايزوبيوم الأدنى:

Ability of rhizobial isolates to grow on RMM

أُجري هذا الاختبار من أجل معرفة قابلية بكتريا الرايزوبيوم للنمو على وسط الرايزوبيوم الأدنى (RMM) Rhizobial Minimal Media، إذ تم نقل مستعمرة فتية من بكتريا الرايزوبيوم إلى الوسط ثم تم تحضينها تحت درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24-48 ساعة (Prasad *et al.*, 2000).

Citrate utilization test (CUT) 4-10-3 اختبار استهلاك السترات:

أُجري هذا الاختبار وذلك بتلقيح الوسط الغذائي Simmon's Citrate Agar بمستعمرات فتية من عزلات بكتريا الرايزوبيوم وتم تحضينها تحت درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 48 ساعة، وتكون النتيجة موجبة وذلك بتغير لون الوسط الغذائي من الأخضر إلى اللون الأزرق نتيجة لقدرة هذه البكتريا على استهلاك مادة سترات الصوديوم كمصدر كاربوني ونتيجة لذلك تتحرر كاربونات الصوديوم؛ مما يؤدي الى ارتفاع الدالة الحامضية pH باتجاه القاعدية (Koneman *et al.*, 1997).

3-10-5 اختبار تمييع الجيلاتين: Gelatin liquification test (GM)

أُجري هذا الاختبار وذلك بتلقيح وسط الجيلاتين (GM) الموجود في انبوبة اختبار Test tube بمستعمرة فتية من بكتريا الرايزوبيوم إذ تم الثقب باستعمال أبرة التلقيح، ثم تم تحضين الوسط تحت درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 48-72 ساعة، النتيجة الموجبة تظهر بتمييع الوسط بسبب إنتاج أنزيم Gelatinase وذلك بعد التحضين لمدة نصف ساعة في الثلاجة عند درجة حرارة 4 °م (Aneja, 2003).

3-10-6 اختبار النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد:

Triple sugar iron agar test (TSIA)

أُجري هذا الاختبار بتلقيح وسط ثلاثي السكر والحديد (TSIA) بمستعمرة فتية من بكتريا الرايزوبيوم وتم تحضينها عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 48-72 ساعة، إذ إنَّ النتيجة الموجبة تسجل اعتمادا على تغير لون الوسط الزرعي إلى اللون الأصفر (Harley and Prescott, 2002).

3-10-7 اختبار الكتاليز: Catalase test

أُجري هذا الاختبار وذلك بوضع مستعمرة فتية من بكتريا الرايزوبيوم التي عُزلت على شريحة زجاجية نظيفة ثم أُضيف إليها 1-2 قطرة من محلول H_2O_2 بتركيز 3% ويستدل على النتيجة الموجبة في حالة ظهور فقاعات غاز الأوكسجين المتصاعدة دلالة على قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم الكتاليز Catalase الذي يؤدي إلى تحلل مركب بيروكسيد الهيدروجين السام H_2O_2 إلى H_2O و O_2 ؛ مما يؤدي إلى تحرير غاز الأوكسجين (Chhetri et al., 2019).

3-10-8 اختبار إنتاج أنزيم الاوكسيديز: Cytochrom oxidase test

أُجري هذا الاختبار وذلك بنقل مستعمرة فتية من بكتريا الرايزوبيوم التي عُزلت على ورقة ترشيع تم تبليلها بقطرات عديدة من كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent إذ إنَّ ظهور اللون الارجواني ثم البنفسجي الغامق إلى الأسود بعد مرور 5 دقائق الذي يُعدُّ دليلاً على قابلية هذه البكتريا على إنتاج انزيم الاوكسيديز Cytochrom oxidase الذي يعمل على أكسدة هذا الكاشف وينتج Indophenol (Hossain et al., 2019).

11-3 استغلال عزلات الرايزوبيا لسكريات مختلفة:

Utilization of different sugars by rhizobial isolates

لتحديد قدرة بكتريا الرايزوبيوم على استعمال السكريات المختلفة مصدرًا للكربون إذ تم إضافة كل من السكريات الآتية: الكلوكوز و الكالاكتوز والفركتوز والمالتوز والارابينوز واللاكتوز والمانيتول والزايلوز والمانوز كل على حدة إلى الوسط الغذائي خلاصة الخميرة YE Agar، علماً ان التراكيز المضافة من المصادر الكربونية كانت 1% (وزن/حجم). ثم تم ضبط الدالة الحامضية pH عند 6.8 وتم تسجيل النتائج بعد مرور 48 ساعة من تحضينها عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24-48 ساعة.

12-3 تحمل عزلات الرايزوبيا لكلوريد الصوديوم:

Sodium chloride tolerance of rhizobial isolates

لتحديد قابلية بكتريا الرايزوبيوم على النمو بوجود تراكيز مختلفة من مادة كلوريد الصوديوم Sodium chloride (NaCl) وذلك من خلال نقل 0.1 مل من مزرعة بكتريا الرايزوبيوم الفتية بعمر 24 ساعة ثم نشره على الوسط الغذائي Tryptone Yeast Extract Agar (TY) الحاوي تراكيز مختلفة من ملح الطعام وكما يأتي: (2.0 و 4.0 و 6.0 و 8.0 % (وزن/حجم) ثم تم تحضينها عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24-48 ساعة (Sadowsky *et al.*, 1983).

13-3 اختبار مقاومة عزلات الرايزوبيا للمضادات الحيوية:

Antibiotic resistance test of rhizobial isolates

اختبرت قابلية العزلات التابعة لبكتريا الرايزوبيوم على مقاومة المضادات الحيوية الآتية: Tetracycline (TE) بتركيز 10 مايكروغرام/مل، Amikacin (AK) بتركيز 10 مايكروغرام/مل، Ceftriaxone (CRO) بتركيز 10 مايكروغرام/مل، Erythromycin (E) بتركيز 10 مايكروغرام/مل، Ciprofloxacin (CIP) بتركيز 10 مايكروغرام/مل، Rifampin (RA) بتركيز 10 مايكروغرام/مل، عن طريق نقل أقراص المضادات الحيوية المستخدمة والمجهزة من الشركة Turkey Bioanalyase بواسطة ملقط معقم إذ تم توزيع أقراص المضادات على الوسط الغذائي Muller-Hinton agar (MHA) بعد ان تم فرش العزلات المراد اختبار مقاومتها للمضادات الحيوية ثم تم تحضينها تحت درجة حرارة 28 ± 2 °م ولمدة 48-72 ساعة، إذ تم تحديد المقاومة والحساسية لعزلات بكتريا الرايزوبيوم تجاه المضادات

الحيوية المختلفة من خلال ظهور هالة شفافة حول أقراص المضادات الحيوية (CLSI, 2015).

14-3 اختبار مقاومة عزلات الرايزوبيا للمعادن الثقيلة:

Heavy metals resistance test of rhizobial isolates

تم تحضير المحاليل الخزينة لبعض أملاح المعادن الثقيلة مثل (كلوريد النيكل $NiCl_2$ ، كلوريد الزئبق $HgCl_2$ ، كلوريد الكوبلت $CoCl_2$ ، كلوريد الكاديوم $CdCl_2$ ، خلات الرصاص $Pb (CH_3COO)_2$ وكبريتات الزنك $ZnSO_4$) وذلك لتحديد المقاومة والحساسية لعزلات بكتريا الرايزوبيوم تجاه المعادن الثقيلة؛ إذ عُمِّت محاليل أملاح المعادن الثقيلة عن طريق إمرارها خلال أغشية الترشيح Membrane filter ذات مسامات قطرها $0.22 \mu m$ إذ تم إضافة أملاح المعادن الثقيلة بتركيز نهائي 100 مايكروغرام/مل إلى الوسط الغذائي Trptone Yeast Extract Agar (TY) الذي تم تبريده إلى درجة حرارة $45-50^\circ C$ (Ernst and Chan , 1985).

15-3 اختبار إنتاج جزيئات الخلية السطحية لعزلات بكتريا الرايزوبيوم:

Production of cell surface molecules test of rhizobial bacterial isolates

أجريت هذه الاختبارات لإنتاج جزيئات السطح خلوية لجميع عزلات بكتريا الرايزوبيوم التي عُزلت خلال هذه الدراسة وكما يأتي:

1-15-3 اختبار إنتاج كلوكونات ($1 \rightarrow 2$) β الحلقية:

Cyclic $\beta (1 \rightarrow 2)$ glucans production test

لتحديد قدرة عزلات بكتريا الرايزوبيوم على إنتاج جزيئات ($1 \rightarrow 2$) β الحلقية تم عمل لطح Spots من المزارع البكتيرية على الوسط الغذائي التربتون وخالصة الخميرة Tryptone Yeast Extract Agar (TY) شبه الصلب والحاوي على 0.2% من مادة الآكار بعدها تم نقل كمية قليلة من المزرعة البكتيرية على الوسط (TY) شبه الصلب. ثم تم تحضينها عند درجة حرارة $28 \pm 2^\circ C$ لمدة 18-24 ساعة. ويستدل على النتيجة الموجبة من خلال انتشار النمو البكتيري بصورة عشوائية نتيجة حركة البكتريا مما يدل على إنتاجها لجزيئات المركبات $\beta (1 \rightarrow 2)$ الحلقية (Swamynathan and Singh, 1995).

2-15-3 اختبار إنتاج كلوكونات (1→3) β الحلقيّة:

Cyclic β (1→3) glucans production test

استُعملت طريقة التخطيط لزراعة عزلات بكتريا الرايزوبيوم على الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA) الذي يحتوي على 0.02% من الصبغة Aniline blue. ثم تم تحضين الأطباق عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24-48 ساعة ويستدل على النتيجة الموجبة من خلال ظهور اللون الأزرق مما يدل على اصطبغ بكتريا الرايزوبيوم بصبغة أزرق الأنلين (Swamynathan and Singh, 1995).

3-15-3 اختبار إنتاج لبيفات السليلوز:

Test for cellulose microfibrils production

أُجري هذا الاختبار عن طريق إضافة صبغة Congo red بنسبة 0.1% ملغم/مل إلى الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA) الصلب وذلك لتحديد قابلية بكتريا الرايزوبيوم لإنتاج لبيفات السليلوز إذ تم نقل مستعمرة فتية ونقية من بكتريا الرايزوبيوم ونشرت بطريقة التخطيط على الوسط الصلب، ثم تم تحضينها عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24-48 ساعة ويستدل على النتيجة الموجبة من خلال تلون مستعمرات بكتريا الرايزوبيوم باللون الأحمر نتيجة لوجود صبغة Congo red دلالة على قابلية بكتريا الرايزوبيا على إنتاج لبيفات السليلوز (Swamynathan and Singh, 1995).

3-16 إنتاج السكريات المتعددة الخارجية لعزلات بكتريا الرايزوبيا:

Production of exopolysaccharide by rhizobial isolates

تم متابعة الصفات الزرعية والنمو لعزلات بكتريا الرايزوبيوم التي عُزلت على الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA) الصلب عن طريق العين المجردة وتم ملاحظة أنّ أغلب عزلات بكتريا الرايزوبيوم تميزت بإنتاجها للسكريات المتعددة الخارجية وقسم منها كان ذات قوام مخاطي ولزج جداً ويبدو غزارة إنتاجها للسكر المتعدد الخارجي وعليه تم انتخاب هذه العزلات لدراسة إنتاجها للسكريات المتعددة الخارجية (Jackson *et al.*, 2018).

3-16-1 تحضير لقاح عزلات الرايزوبيا:

Preparation of inoculum of rhizobial isolates

حُضِرَ لقاح عزلات بكتريا الرايزوبيوم التي تم انتخابها وذلك عن طريق نقل مستعمرات فنية ونقية من المزرعة البكتيرية لكل عذلة نامية في الوسط الغذائي التريتون وخلصا الخميرة (TY) الصلب إلى دورق زجاجي ذو حجم 100 مل يحتوي على 25 مل من الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول YEM السائل المعقم. بعد ذلك تم تحضير الدوارق الحاوية على مزارع عزلات بكتريا الرايزوبيوم في الحاضنة الهزازة ن وبمعدل 150 دورة/دقيقة عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24 ساعة (Ghosh and Basu, 2001).

3-16-2 تحضير الوسط الزراعي لإنتاج السكر المتعدد الخارجي:

Preparation of exopolysaccharide production culturel medium

حُضِرَ الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول (YEM) Yeast Extract Mannitol السائل المعقم لتنمية عزلات بكتريا الرايزوبيوم المنتخبة وإنتاج السكريات المتعددة الخارجية وتم ضبط الدالة الحامضية ال pH عند 6.8. ثم تم توزيع هذا الوسط في دوارق زجاجية ذات حجم 100 مل وبمقدار 25 مل في كل دورق و تم عمل ثلاث مكررات لكل عذلة بكتيرية. ثم غلقت فوهة الدورق بإحكام باستعمال سدادات قطنية، ثم عقت الدوارق عن طريق استعمال جهاز المؤصدة تحت ضغط 1 جو ودرجة حرارة 121 °م ولمدة 20 دقيقة. تركت الدوارق لتبرد بعد انتهاء التعقيم ثم تم تلقيحها بلقاح المستخلص من عزلات بكتريا الرايزوبيوم بعمر 24 ساعة وبنسبة 2%. ثم وضعت الدوارق الزجاجية في حاضنة هزازة وبمعدل 150 دورة/دقيقة وعند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 48 ساعة (Ghosh and Basu, 2001).

Analytical methodes

3-17 طرائق التحليل:

3-17-1 ضبط وقياس الرقم الهيدروجيني:

Adjustment and measurement of pH

تم معايرة الدالة الحامضية ال pH للأوساط الزراعية Cultural media التي تم استعمالها في هذه الدراسة وذلك عند تحضير الوسط الغذائي أي الدالة الحامضية ال pH الأولية (Initial pH) أو قياس الدالة الحامضية النهائية (Final pH) وبعد انتهاء التجربة عن طريق جهاز قياس الدالة الحامضية pH meter طراز PW9421 Philips، إذ صُفِرَ الجهاز عن

طريق استعمال محلول التنظيم 7 و 9 كما استخدم محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH عياري ومحلل حامض الهيدروكلوريك HCL 1 عياري لضبط الدالة الحامضية الـ pH (Jackson *et al.*, 2018).

3-17-2 تقدير إنتاج الكتلة الحيوية لعزلات الرايزوبيا:

Biomass production determination of rhizobial isolates

لتقدير إنتاج الكتلة الحيوية تم إخراج الدوارق الزجاجية الحاوية على المزارع البكتيرية السائلة من الحاضنة الهزازة بعد أن تم تحضينها لمدة 48 ساعة؛ إذ تم قياس الدالة الحامضية النهائية Final pH لكل دورق بعد انتهاء عملية التحضين. بعد ذلك تم عمل طرد مركزي لسائل المزرعة البكتيرية وبمعدل 6000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة. وترك الرائق جانباً لكي يتم تقدير السكريات المتعددة الخارجية (EPS). أمّا راسب الكتلة الحيوية المتبقي في أسفل أنبوبة الطرد المركزي فجمعت في أطباق صغيرة معلومة الكتلة وتم تجفيفها في الفرن Oven عند درجة حرارة 80 °م ولمدة 24 ساعة. ثم تم حساب الكتلة الحيوية Biomass بفارق الكتلتين باستعمال جهاز الميزان الحساس Metlar طراز PC180 (Jackson *et al.*, 2018).

3-17-3 استخلاص وتقدير كتلة السكر المتعدد الخارجي:

Extraction and determination of rhizobial exopolysaccharide

سُحِبَ 5 مل من الرائق الناتج من عملية الطرد المركزي لمزرعة بكتريا الرايزوبيوم والخالي من الخلايا البكتيرية إذ أُضيف 10 مل من محلول الاسيتون الى انبوبة الاختبار الحاوية على 5 مل من سائل المزرعة الرائق (Navarini *et al.*, 1997). لترسيب السكريات المتعددة الخارجية. ثم مزج الخليط جيداً وبعد ذلك أُجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 9000 دورة/دقيقة ولمدة 30 دقيقة. ثم تم سكب الرائق جانباً وجمع الراسب الذي يمثل السكريات المتعددة الخارجية في أطباق معلومة الكتلة، ثم وضعت الأطباق في الفرن الكهربائي Oven عند درجة حرارة 80 °م ولمدة 24 ساعة. بعد أن جفت الأطباق تم حساب كتلة السكريات المتعددة الخارجية EPS بفارق الكتلتين (Duta *et al.*, 2006).

3-18 اختبار الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيوم:

Antimicrobial activity test for rhizobial isolates

أجري اختبار الفعالية المضادة المايكروبية Antimicrobial activity test لعزلات بكتريا الرايزوبيوم على مرحلتين المرحلة الأولى حُصِرَ راشح التخمر الذي يكون خالياً من

خلايا بكتريا الرايزوبيوم، أمَّا المرحلة الثانية فتتضمن اختبار التثبيط داخل الزجاج *In vitro* Inhibition zone test وكما يأتي:

3-18-1 تحضير راشح المعلق الخالي من خلايا بكتريا الرايزوبيوم:

Preparation of filtrate of free rhizobial cells

حُصِر الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول Yeast Extract mannitol (YEM) السائل بعد ذلك تم نقل 25 مل من الوسط الغذائي السائل إلى ورق حجمه 100 مل ثم تم تلقيح الوسط بعد التعقيم ببكتريا الرايزوبيوم وبعدها وضع الدورق في الحاضنة عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24-48 ساعة. بعدها تم عمل طرد مركزي بقوة 6000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة بعدها تم امرار العالق من خلال مرشحات دقيقة Millipore filters بقطر 0.2 نانوميتر من أجل الحصول على راشح خالي من الخلايا البكتيرية (Kohlmeier *et al.*, 2022).

3-18-2 اختبار منطقة تثبيط البكتريا المرضية داخل الزجاج:

In vitro test of inhibition zone of pathogenic bacteria

اختبرت الفعاليَّة المضادة لراشح عزلات بكتريا الرايزوبيوم تجاه البكتريا المرضية وذلك بتنمية البكتريا المرضية في الوسط الغذائي Nutrient broth medium السائل عند درجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة ثم تم تحضير أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي Muller-Henton Agar وبواقع 20 مل لكل طبق. بعد ذلك تم نقل 0.1 مل من مزرعة البكتريا المرضية السائلة وفرشت على الوسط Muller-Henton Agar ثم وضعت الأطباق في الثلاجة لمدة ساعة لكي يتم تشرب أو امتصاص الوسط الغذائي للقاح. ثم تم عمل حفر في الأطباق بقطر 6 ملم باستعمال ثاقبة فلين معقمة وعلى عدد عزلات بكتريا الرايزوبيوم. ثم تم نقل 100 مايكروليتر من راشح بكتريا الرايزوبيوم الخالي من خلايا البكتريا إلى كل حفرة، بعد ذلك وضعت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة وسجلت النتائج بقياس أقطار التثبيط حول الحفرة بوحدة مليميتر (Joseph *et al.*, 1983). إذ تم عمل ثلاث مكررات لكل معاملة بينما تم إضافة 0.1 مل من المحلول الفسلجي المعقم كمجموعة سيطرة سالبة لإحدى الحفر.

3-18-3 اختبار منطقة تثبيط خميرة المبيضات البيضاء المرضية داخل الزجاج:

In vitro test of inhibition zone of *Candida albicans*

اختبرت الفعالية المضادة لراشح عزلات بكتريا الرايزوبيوم تجاه الخمائر المرضية إذ تم تنمية الخمائر المرضية في الوسط الغذائي Sabouraud Dextrose Broth (S.D.B.) السائل عند درجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة ثم تمت مقارنة كثافة النمو مع محلول McFarland Standard (MC) تركيز 0.5 بحيث يكون عدد الخلايا مساويا لـ 1×10^6 خلية لكل 1 مل من الوسط ثم تم تحضير أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي Muller-Hinton Agar وبواقع 20 مل لكل طبق. بعد ذلك تم نقل 0.1 مل من مزرعة الخميرة السائلة بعد ضبط كثافة النمو مع محلول (MC) وتم فرشها على الوسط باستعمال الناشر Spreader ثم تركت الأطباق عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة لتجف. ثم تم عمل حفر في الأطباق بقطر 6 ملم باستعمال ثاقبة فلين معقمة وعلى عدد عزلات بكتريا الرايزوبيوم. ثم تم نقل 100 مايكروليتر من راسح بكتريا الرايزوبيوم الخالي من خلايا البكتريا إلى كل حفرة، بعد ذلك وضعت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة وسجلت النتائج بقياس أقطار التثبيط حول الحفرة بوحدة مليميتر (Asmerom *et al.*, 2020). تم عمل ثلاث مكررات لكل معاملة بينما تم إضافة 0.1 مل من المحلول الفسلجي المعقم بوصفها مجموعة سيطرة سالبة لإحدى الحفر.

3-18-4 اختبار التثبيط داخل الزجاج ضد الفطريات الخيطية:

In vitro inhibition zone test of filamentous fungi

اختبرت الفعالية المضادة لراشح عزلات بكتريا الرايزوبيوم تجاه بعض أجناس الفطريات الخيطية إذ تم تنمية الفطريات الخيطية في الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar (P.D.A.) الصلب عند درجة حرارة 28+2°م لمدة 4 أيام وبعد الحصول على نمو يغطي كامل الطبق، تم إضافة 10 مل من الماء المقطر المعقم على الطبق وباستعمال ناشر زجاجي معقم Spreader، تم تحريك الماء داخل الطبق للحصول على العالق البوغي ثم تم سحب العالق البوغي بواسطة ماصة معقمة بعد ذلك نقل العالق إلى قنينة زجاجية صغيرة معقمة Vial ثم تم قياس كثافة العالق باستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجة 640 نانوميتر بحيث تكون القراءة مقارنة إلى 0.08-0.1 للحصول عالق بوغي بكثافة 10^6 بوغ لكل 1 مل ثم تم سحب 0.1 مل من العالق البوغي وتم فرشها على الوسط الغذائي Muller-

Hinton agar وواقع 20 مل/ لكل طبق باستعمال الناشر Spreader ثم تركت الأطباق عند درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة لكي تجف ثم تم عمل حفر في الأطباق بقطر 6 ملم باستعمال ثاقبة فلين معقمة وعلى عدد عزلات بكتريا الرايزوبيوم. ثم نقلت تراكيز مختلفة من راشح بكتريا الرايزوبيوم الخالي من خلايا البكتريا إلى الحفر، بعد ذلك وضعت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 4 أيام وسجلت النتائج بقياس معدل أقطار مناطق التثبيط حول الحفرة بوحدة مليمتر (Daoud *et al.*, 2019). تم عمل ثلاث مكررات لكل معاملة بينما أضيف 0.1 مل من المحلول الفسلجي المعقم كمجموعة سيطرة سالبة لاحدى الحفر.

3-19 استخراج وتنقية الحامض النووي الجينيومي من عزلات بكتريا الرايزوبيوم:

Extraction and purification of genomic DNA from rhizobial isolates

تم استعمال المواد المجهزة من الشركة الأمريكية Bio Rad لاستخلاص الحامض النووي DNA من عزلات بكتريا الرايزوبيوم وبحسب الخطوات الآتية:

1. تم نقل مستعمرة فتية من البكتريا المكونة للعقد الجذرية إلى أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول (YEMA) Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA) الصلب وبعدها وضعت في الحاضنة عند درجة حرارة 28 ± 2 °م لمدة 24 ساعة.
2. بعد ذلك باستعمال الناقل ذي العروة Loop تم نقل 2-3 حملات من المزرعة البكتيرية الفتية إلى أنبوبة ابندروف Eppendorf tube حجم 1.5 مل ثم تم إضافة 300 مايكروليتر من محلول Cell lysis solution من أجل تحليل الجدار الخلوي للخلايا البكتيرية ثم تم مزجهما جيدا باستعمال جهاز المازج Vortex ولمدة 10 ثوانٍ.
3. ثم تم إضافة 1.5 مايكروليتر تركيز 4 mg من محلول RNase إلى العينة وتم مزجها جيدا باستعمال اليد ولمرات عديدة وذلك للتخلص من الحامض النووي RNA بعد ذلك وضعت الأنابيب على جهاز المازج Vortex ولمدة 10 ثوانٍ ثم وضع الأنابيب في الحمام المائي على درجة حرارة 37 °م ولمدة 30 دقيقة ثم برد في الثلج لمدة دقيقة واحدة.
4. تم إضافة 100 مايكروليتر من محلول Protein precipitation solution إلى الأنابيب وذلك لترسيب البروتينات ثم وضعت الأنابيب في جهاز المازج Vortex لمزج العينات مع المحلول وبالسرية العالية ولمدة 30 ثانية بعدها أدخلت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المبرد Centrifuge بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق.

5. ثم نقل الراشح Supernatant إلى أنبوبة ابندورف جديدة ومعقمة حجم 1.5 مل ثم تم إضافة 300 مايكروليتر من الكحول المطلق Absolute Isopropanol، ومزجت العينة باستعمال جهاز المازج ولمدة 10 ثوانٍ في حين أنّ الراسب تم التخلص منه.
6. بعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة لترسيب الـ DNA (في هذه المرحلة يمكن رؤية الحامض النووي على شكل راسب أبيض White pellet). ثم تم التخلص من الراشح وضيف 500 مايكروليتر من محلول Washing Buffer إلى الأنابيب الحاوية على راسب الـ DNA وتم رج الأنابيب باليد وذلك لغسل الـ DNA من أي ملوثات (سائتوبلازم أو جدار الخلية أو بروتينات).
7. تم إضافة 75 مايكروليتر من محلول DNA hydration solution إلى الحامض النووي الجاف في أنبوبة ابندورف وترك في الحمام المائي على درجة حرارة 70°م ولمدة ساعة واحدة بعد ذلك حفظت الأنابيب الحاوية على الحامض النووي المستخلص في الفريزر على درجة حرارة -20°م.

20-3 عملية الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA باستعمال هلام الآكاروز:

Electrophoresis of DNA by Agarose gel

اتبعت طريقة Kado and Liu (1981) على وفق الخطوات الآتية:

1. حُضِر هلام الآكاروز Agarose بتركيز 1.5% لترحيل الحامض النووي النقي والكشف عنه وذلك بإذابة 1.5 غم من مسحوق الآكاروز Agarose powder في 100 مل من محلول Tris Borate EDTA buffer (TBE) بقوة 1X في دورق زجاجي حجم 250 مل، بعدها تم رج الدورق للتأكد من مزج المحلول بالمسحوق، وتم وضعه في جهاز المايكروويف ولمدة دقيقة ونصف إلى درجة الغليان ثم ترك ليبرد إلى درجة 50-60°م ثم تم إضافة 3 مايكروليتر من صبغة Gel red مع تحريك الدورق ليتم مزج الصبغة مع المحلول بشكل جيد.
2. بعد ذلك تم صب محلول هلام الآكاروز في حوض الترحيل Casting tray الخاص بجهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis الذي يحتوي على المشط Comb، ويجب أن تكون عملية صب المحلول بشكل هادئ وذلك لمنع تكون الفقاعات بعدها ترك الهلام ليتصلب لمدة 15-20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة بعدها تم سحب المشط من الاكار

المتصلب بعناية تاركاً حفرًا فارغة وجاهزة، وتم إضافة 700 مل من دارئ TBE بقوة 1X حتى ينغمر هلام الأكاروز بالكامل.

3. حُضِرَت عينات الترحيل الكهربائي وذلك عن طريق إضافة 5 مايكروليتر من عينة الـ DNA الجينيومي مع 1 مايكروليتر من صبغة التحميل DNA Loading Dye ثم مزجت الصبغة مع الـ DNA بشكل جيد.

4. ثم تم تحميل هذه العينات في الحفر وأخيرًا تم إضافة DNA ladder في الحفرة الخاصة بها لتعمل مقياسًا لحجم حزم الحامض النووي DNA. وبعد ذلك تم تشغيل جهاز الترحيل الكهربائي بفرق جهد 5 فولت/سم لمدة 60 دقيقة.

5. بعد ذلك تم غسل الهلام Gel بالماء المقطر ووضع في جهاز خاص بتصوير الهلام Gel documentation system الذي يسقط الأشعة فوق البنفسجية U.V. للكشف عن الـ DNA الجينيومي وأيضًا ناتج تفاعل الـ البلمرة المتسلسل PCR (Kado and Liu, 1981).

21-3 التقانات الخاصة بالتفاعل التضاعفي لسلسلة الحامض النووي:

Specific amplification of DNA

إنَّ التركيز المطلوب للحامض النووي DNA لإكمال تفاعلات البلمرة المتسلسلة Polymerase chain reaction (PCR) هو 50 نانوغرام/مايكروليتر إذ تم ضبط هذه التراكيز لجميع العينات المدروسة باستعمال المحلول TE Buffer وذلك لتخفيف التركيز، إذ حُضِرَ خليط التفاعل الرئيسي Master reaction لكل تفاعل من الـ PCR يكون عن طريق مزج البادئات الخاصة بالجين 16S rRNA وعينة من الحامض النووي DNA مع مكونات الـ Master mix الذي يتكون من (dNATPs, DNA polymerase, Buffer and MgCl₂) داخل أنبوبة ابندروف معقمة حجم 0.2 مل الذي جُهِّز من الشركة الإنكليزية Biolabs. إذ تم تثبيت حجم التفاعل إلى 20 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم Distillid Water، ثم وضع المزيج في جهاز الطرد المركزي Microcentrifuge لمدة 3-5 ثوانٍ، لتمزج مكونات التفاعل بعد ذلك أُدخلت الأنابيب في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لإجراء التفاعل التضاعفي عن طريق استعمال البرنامج الخاص بكل تفاعل (Green, 2019). ثم تم تحميل هذه العينات في الحفر Wells الموجودة داخل هلام الأكاروز الذي حُضِرَ مسبقاً بتركيز 2%

مع إضافة الدليل الحجمي DNA ladder في إحدى هذه الحفر وتم إجراء تحليل العينات عن طريق استعمال جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمدة 60 دقيقة بعد ذلك تم غسل الهلام بالماء المقطر ثم وضع في جهاز تصوير الهلام Gel documentation وبالأشعة فوق البنفسجية لتصوير هلام الآكاروز.

22-3 التشخيص الجزيئي لبكتريا الرايزوبيوم بالاعتماد على الجين 16S rRNA:

Molecular identification of rhizobial bacteria depends on the 16S rRNA gene

تم الكشف عن الجين 16S rRNA لعزلات البكتريا المعزولة والتي عزلت من العقد الجذرية للنباتات قيد الدراسة تم الكشف عنها عن طريق إضافة 4 مايكروليتر بما يعادل 100 نانوغرام من الحامض النووي DNA القالب الذي تمكنا من الحصول عليه من خلال عملية استخلاص وتنقية الحامض النووي DNA و 1 مايكروليتر (10 بيكومول) من كل من البادئات الخاصة Primers إلى محتويات خليط التفاعل الرئيس Master mix وكما في الجدول (2-3).

الجدول (2-3) يوضح مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بتضخيم الجين 16 S rRNA

Material	Volume	Concentration
M.M	10	1x
F.	1	10 BM/ μ
R.	1	10 BM/ μ
PCR water	4	
DND Template	4	
Total	20	μ

الجدول (3-3) البادئات الخاصة والمستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

Primers	Name	Sequences
Forward	pA	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
Revers	pH	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'

(Edwards *et al.*, 1989).

وبعدها تم إدخال الأنابيب الحاوية على المزيج في جهاز المدوار الحراري Thermocycler ليُجرى التفاعل التضاعفي وذلك باستعمال برنامج خاص بالتفاعل التضاعفي وكما موضح في الجدول (3-3).

الجدول (3-4) مراحل عمل جهاز Thermocycler

No.	Stage	Temperature	Time	Cycle number
1	Initial denaturation	95	10 min	1
2	denaturation	95	45 sec	35
3	Annealing	62	45 sec	
4	Extension	72	1 min	
5	Final extension	72	5 min.	1

3-23 استخراج الحمض النووي من هلام الاكاروز:

Extraction of DNA from agarose gel

أُجريت عملية استخراج الحمض الناتجة من تفاعلات البلمرة المتسلسلة PCR من الهلام وتم تنقيتها ومن ثم تم إرسالها للكشف عن تسلسل تتابعات النيوكليوتيدات باستعمال المواد المجهزة من الشركة الأمريكية Bio Rad وحسب المراحل الآتية:

1. تم تقطيع حزم من هلام الأكاروز Agarose gel عن طريق استعمال مشروط معقم مع إزالة كمية كبيرة من هلام الاكاروز الذي يحيط بكل حزمة.

2. تم نقل 300 ملغم تقريبًا من قطعة هلام الاكاروز وتوضع في أنبوبة ابندروف جديدة ومعقمة سعة 1.5 مل ثم يتم إضافة 500 مايكروليتر من المحلول المنظم DF إليها ومزجها جيدا باستعمال جهاز المازج Vortex بعد ذلك تم تحضين هذه الأنابيب عند درجة حرارة ما بين 55-60 ° لمدة 15 دقيقة وذلك ليتم إذابة كامل قطعة هلام الاكاروز كما يجب تقليب الأنابيب بشكل مستمر كل 3 دقائق في مُدَّة التحضين ثم تركت الأنابيب في درجة حرارة الغرفة لكي تبرد.

3. تم نقل 800 مايكروليتر تقريبًا من الخليط إلى العمود DF والمثبت في أنبوبة الجمع ثم تم إجراء عملية الطرد المركزي في جهاز Centrifuge المبرد وبسرعة 16000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية.

4. تم التخلص من الراشح الناتج وتم إعادة تثبيت العمود DF مرة أخرى في أنبوبة الجمع ثم تم إضافة 600 مايكروليتر من محلول الغسل Washing Buffer إليه وتركت الأنبوبة لمدة دقيقة واحدة، ثم تم إعادة عملية الطرد المركزي في جهاز Centrifuge المبرد وبسرعة 16000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية.

5. تم إعادة العملية السابقة مرة أخرى ثم أُجريت عملية الطرد المركزي في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 3 دقائق لكي يتم التأكد من جفاف العمود DF. ثم تم نقل العمود DF إلى أنبوبة ابندروف جديدة ومعقمة سعة 1.5 مل وتم التخلص من أنبوبة الجمع.

6. تم إضافة 20-50 مايكروليتر من محلول الإذابة Elution buffer إلى وسط العمود. ثم تركت لمدة 2 دقيقة لكي يتم امتصاص محلول الإذابة. ثم أُجريت عملية الطرد المركزي في جهاز Centrifuge وبسرعة 16000 دورة/ دقيقة لمدة 2 دقيقة مرة أخرى للحصول على الحامض النووي DNA المذاب.

24-3 تحديد تتابع النيوكليوتيدات للجين 16S rRNA باستعمال تقنية الـ DNA

Sequencing

Determining the nucleotide sequence of 16S rRNA gene using DNA sequencing technology

لدراسة نواتج التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR والخاصة لعشر عزلات رايوزبية وكما يأتي: OJ8 و OJ10 و OJ11 و OJ40 و OJ25 و OJ27 و OJ28 و OJ30 و OJ31 و OJ32 من بقية العزلات قيد الدراسة التي اختيرت كونها عزلات منتجة للسكر المتعدد الخارجي فضلاً عن أنها نباتات لم يتم التطرق إليها كثيراً، وأُرسلت نتائج تفاعلات البلمرة المتسلسلة PCR والمتخصص لأربع عزلات وهي OJ27 و OJ30 و OJ31 و OJ32 مع البادئات الخاصة Primers بالحزم الناتجة والمستخدم في التفاعل إلى شركة Macrogen/South Korea وذلك للكشف عن تسلسل القواعد النايروجينية وإجراء عملية Sequencing.

إذ تم مطابقة هذه التسلسلات الخاصة بالجينات مع تسلسلات الجينات الأصلية والمسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحياتية (NCBI) National Center for Biotechnology Information وحُللت النتائج عن طريق استعمال برنامج Blast.

25-3 التحليل الإحصائي: Statistical analysis

أُجري تحليل البيانات Standard deviation عن طريق استعمال الرزمة الإحصائية الجاهزة SAS عند مستوى معنوية 5% (عنتر، 2010).

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة
Results and
Discussion

الفصل الرابع النتائج والمناقشة

1-4 عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية للنباتات المثبتة للنايتروجين:

Isolation of rhizobial bacteria from root nodules of nitrogen fixing plants

تم الحصول في هذه الدراسة على 9 عزلات من بكتريا الرايزوبيوم *Ensifer fredii* bv.

fredii وهي OJ1 و OJ3 و OJ7 و OJ12 و OJ13 و OJ20 و OJ21 و OJ22 و OJ23 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات اللوبيا (*Vigna unguiculata* L. (Cowpea). في حين حصلنا على عزلة واحدة من بكتريا *Ensifer meliloti* وهي OJ2 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات الحلبة (*Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugreek).

وفي هذه الدراسة كذلك تم الحصول على عزلتين من بكتريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* وهي OJ4 و OJ9 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات العدس (*Lens culinaris* L. (Lental). كما حصلنا على عزلتين من بكتريا الرايزوبيوم *Mesorhizobium loti* وهي OJ5 و OJ33 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات الحمص (*Cicer arietinum* L. (Chickpea) الجدول (1-4). كما تم الحصول على عزلة واحدة من بكتريا الرايزوبيوم *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* وهي OJ6 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الفاصوليا (*Phaseolus vulgstris* L. (Green bean). كذلك تم الحصول على عزلة واحدة من بكتريا الرايزوبيوم *R. leguminosarum* OJ8 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات الهرطمان (*Lathyrus sativus* L. (Grass pea). كما تم الحصول على عزلتين من بكتريا الرايزوبيوم *R. japonicum* وهي OJ10 و OJ38 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات فول الصويا *Glycine max* L.

كما تم عزل عزلتين من بكتريا الرايزوبيوم *R. vignae* وهي OJ11 و OJ40 والتي عزلت من العقد الجذرية لنبات الماش (*Vigna radiata* L. (Mungbean). أمّا من العقد الجذرية لنبات الجت (*Medicago sativa* L. (Alfalfa) فقد تم الحصول على ست عزلات من بكتريا الرايزوبيوم *Ensifer meliloti* وهي OJ14 و OJ15 و OJ16 و OJ17 و OJ18 و OJ19. كما عزلت خمس عزلات من بكتريا الرايزوبيوم *R. grahamii* وهي OJ24 و OJ26 و OJ28 و OJ35 و OJ36 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات اللبوسينيا (*Leucaena leucocephala* L. أمّا من العقد الجذرية لنبات السيسبان (*Sesbania herbacea* L. فقد تم عزل خمس عزلات من بكتريا الرايزوبيوم *Neorhizobium huautlense* وهي OJ25 و OJ37 و OJ39 و OJ41 و OJ42.

الجدول (1-3) أرقام عزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة والاسم العلمي لبكتريا الرايزوبي والنباتات المضيفة لها ومناطق جمع النباتات

رقم العزلة	جنس ونوع بكتريا الرايزوبيوم	النباتات المضيفة	مناطق جمع النباتات المضيفة
OJ1	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/شندوخة
OJ2	<i>Ensifer meliloti</i>	الحلبة	جامعة الموصل/كلية الزراعة والغابات
OJ3	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/شندوخة
OJ4	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	العدس	جامعة الموصل/كلية الزراعة والغابات
OJ5	<i>Mesorhizobium loti</i>	الحمص	جامعة الموصل/كلية الزراعة والغابات
OJ 6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	الفاصوليا	دهوك/رشانكي
OJ7	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/رشانكي
OJ8	<i>R. leguminosarum</i>	الهرطمان	جامعة الموصل/كلية الزراعة والغابات
OJ9	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	العدس	جامعة الموصل/كلية الزراعة والغابات
OJ10	<i>R. japonicum</i>	فول الصويا	موصل/الكفاءات الأولى
OJ11	<i>R. vignae</i>	المائش	جامعة الموصل/كلية الزراعة والغابات
OJ12	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/كوندك نبي
OJ13	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/كوندك نبي
OJ14	<i>Ensifer meliloti</i>	الجت	موصل/حاوي الكنيسة
OJ15	<i>Ensifer meliloti</i>	الجت	موصل/حاوي الكنيسة
OJ16	<i>Ensifer meliloti</i>	الجت	موصل/حاوي الكنيسة
OJ17	<i>Ensifer meliloti</i>	الجت	موصل/حاوي الكنيسة
OJ18	<i>Ensifer meliloti</i>	الجت	موصل/حاوي الكنيسة
OJ19	<i>Ensifer meliloti</i>	الجت	موصل/حاوي الكنيسة
OJ20	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/مانكيش
OJ21	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/مانكيش
OJ22	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/نلكيشكي
OJ23	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i>	اللوبياء	دهوك/نلكيشكي
OJ24	<i>R. grahamii</i>	الليوسينيا	موصل/فيصلية
OJ25	<i>Neorhizobium huautlense</i>	السيبيان	موصل/فيصلية
OJ26	<i>R. grahamii</i>	الليوسينيا	موصل/فيصلية
OJ27	**	خف الجمل	بغداد/مشارتل
OJ28	<i>R. grahamii</i>	الليوسينيا	موصل/فيصلية
OJ29	**	خف الجمل	بغداد/مشارتل
OJ30	***	الكاتاليا	جامعة الموصل/كلية الزراعة والغابات
OJ31	**	الباركنسونيا	موصل/فيصلية
OJ32	<i>R. mesosinicum</i>	البيزيا	موصل/فيصلية
OJ33	<i>Mesorhizobium loti</i>	الحمص	جامعة الموصل/كلية الزراعة والغابات
OJ34	<i>R. mesosinicum</i>	البيزيا	موصل/فيصلية
OJ35	<i>R. grahamii</i>	الليوسينيا	دهوك/ماسيكي
OJ36	<i>R. grahamii</i>	الليوسينيا	موصل/فيصلية
OJ37	<i>Neorhizobium huautlense</i>	السيبيان	الأبيار/القائم
OJ38	<i>R. japonicum</i>	فول الصويا	الأبيار/القائم
OJ39	<i>Neorhizobium huautlense</i>	السيبيان	الأبيار/القائم
OJ40	<i>R. vignae</i>	المائش	الأبيار/القائم
OJ41	<i>Neorhizobium huautlense</i>	السيبيان	الأبيار/القائم
OJ42	<i>Neorhizobium huautlense</i>	السيبيان	الأبيار/القائم

** : لم يتم تسجيل جنس ونوع بكتريا الرايزوبيوم في المراجع العلمية لحد الان.

كذلك تم الحصول على عزلتين من بكتريا الرايزوبيوم وهي OJ27 و OJ29 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. ولم يتم تثبيت اسم الجنس والنوع

لبكتريا الريزوبيوم ولم يتم ذكره في المراجع العلمية لحد الآن في حين حصلنا على عزلة واحدة من بكتريا الرايزوبيوم وهي OJ30 التي عُزلت من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا *Catalpa speciosa* L. (Catawba tree). وتُعَدُّ هذه الدراسة هي الأولى عالمياً (حد علمنا) في تسجيل علاقة تعايشية بين نبات الكاتالبا غير البقولي مع بكتريا الريزوبيوم إذ لم تُؤشر المراجع العلمية إلى أنَّ نبات الكاتالبا يدخل في علاقة تعايشية مع بكتريا الريزوبيوم واسم جنس ونوع الريزوبيا غير مثبت لحد الآن، وكذلك تم عزل عزلة واحدة من بكتريا الريزوبيوم وهي OJ31 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا *Parkinsonia aculeata* L. كذلك لم يتم تثبيت اسم الجنس والنوع لبكتريا الريزوبيوم ولم يتم ذكره في المراجع العلمية لحد الآن. أمَّا من العقد الجذرية لنبات البيزيا *Albizia odoratissima* L. فقد تم عزل عزلتين من بكتريا الريزوبيوم *R. mesosinicum* وهي OJ32 و OJ34 (الجدول 1-4).

فيما يخص عزل بكتريا الريزوبيوم فلقد نجح الباحث شريف (2008) والباحث سليمان (2021) من عزل عزلات من بكتريا الريزوبيا المحلية من العقد الجذرية لنباتات الباقلاء والبالزاء والجت والبرسيم والكشون والحمص والعدس والحلبة والترمس والفاصوليا والمزروعة في مناطق زراعية وبيئية مختلفة. كما بينت دراسات عالمية سابقة إمكانية الحصول على عزلات مختلفة من بكتريا الريزوبيا التي عزلت من العقد الجذرية لنباتات بقولية مختلفة ومن مناطق بيئية مختلفة فلقد عزل الباحث (2018) Fuskhah et al. ستة أنواع مختلفة من بكتريا الريزوبيا من ستة نباتات بقولية علفية. كما عزل الباحث (2018) Duangk et al. 11 عزلة من بكتريا الريزوبيا من العقد الجذرية لنبات *Clitoria ternatca* منها عشر عزلات تعود إلى البكتريا *Bradyrhizobium*. وفي دراسة أخرى تم الحصول على 41 عزلة رايزوبيا من العقد الجذرية لنبات الفاصوليا المتسلقة والمزروعة في مناطق زراعية في شرق كينيا إذ قام الباحث Hossain et al. (2019) بعزل وتنقية عزلة من بكتريا الريزوبيا التي تعزز من إنتاجية نبات فستق الحقل. كما عُزلت أنواع من الريزوبيا وشُخصت من العقد الجذرية لجذور نبات الحمص وكانت فعالة من حيث التحفيز على تكوين عقد جذرية على نبات الماش *Vigna radiata* L. والمزروع في بعض المناطق الزراعية في شمال اثيوبيا (Beshah and Assefa, 2019). كذلك عُزلت 77 عزلة من بكتريا الريزوبيا وشُخصت والتي تم الحصول عليها من العقد الجذرية لنبات فول الصويا Soybean المزروع في 18 موقع أجواء باردة في أوروبا إذ أظهرت الدراسة ان 71% من العزلات تعود لجنس الـ *Bradyrhizobium* و 29% تعود لجنس الـ *Rhizobium* (Yuan et al., 2020). كما نجح الباحث (2021) Wekesa et al., بعزل العزلتين B3, S2 لبكتريا *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* من ترب زراعية في كينيا إذ كانت ذات كفاءة عالية في التحفيز على تكوين عقد جذرية على جذور نبات الفاصوليا.

2-4 الاختبارات التشخيصية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة:

Identification tests of studied rhizobial isolates

تم الحصول على مستعمرات نقية من عزلات الرايزوبيا والتي عُزلت في هذه الدراسة وأُجريت عملية التشخيص المظهري والزرعي عليها فضلاً عن التشخيص البايوكيميائي وكما يأتي:

1-2-4 الصفات المظهرية والزرعية لعزلات الرايزوبيا المدروسة

Morphological and cultural characteristics of studied rhizobial isolates

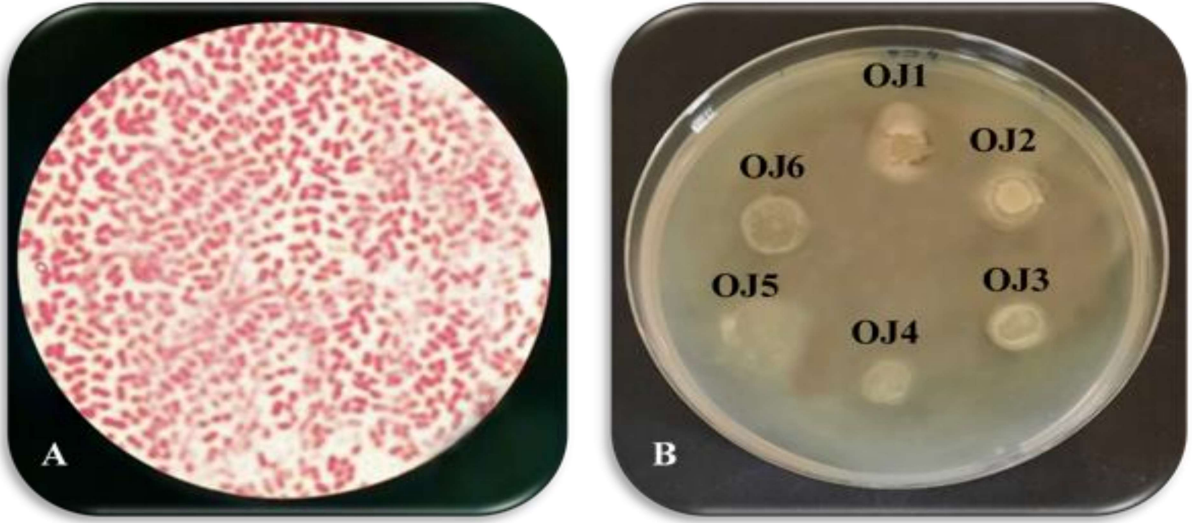
أظهر الفحص المظهري بالعين المجردة لمستعمرات بكتريا الرايزوبيا ولمختلف العزلات المدروسة التي تم تنميتها على الوسط الغذائي YEMA الصلب ان المستعمرات كانت شفافة ودائرية الشكل وذات حافات ملساء مما يشير إلى أنّ هذه المستعمرات تعود لبكتريا الرايزوبيا (Hamza and Alebego, 2017).

كما أظهر الفحص بالعين المجردة ان أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة لها القابلية على إنتاج السكر المتعدد الخارجي الرايزوبي (EPS) Rhizobial exopolysaccharide، وقد تميزت بكتريا الرايزوبيا *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلتين OJ4 و OJ9 وبكتريا الـ *Mesorhizobium loti* العزلة OJ5 وبكتريا الـ *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلتين OJ7 و OJ23 وبكتريا الـ *R. leuguminisarm* العزلة OJ8 وبكتريا الـ *R. japonicum* العزلة OJ10 وبكتريا الـ *Ensifer meliloti* العزلة OJ16 وبكتريا الـ *R. grahamii* العزلة OJ26، بقوام مخاطي ولزج وغزير، إذ بينت دراسات سابقة قدرة بعض عزلات الرايزوبيا على إنتاج السكر المتعدد الخارجي EPS بغزارة (Rasulov et al., 2020).

فيما يخص قابلية عزلات الرايزوبيا المدروسة على الاصطبغ بصبغة كرام Gram stain فقد أظهر الفحص المجهرى ان جميع عزلات الرايزوبيا ذات لون وردي مما يدل على انها بكتريا سالبة لصبغة كرام Gram negative bacteria (الصورة 4-3/A). من المعلوم أن بكتريا الرايزوبيوم سالبة لصبغة كرام (Iyer and Rajkumar, 2018).

كما أظهر اختبار الحركة أنّ جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة كانت موجبة لهذا الاختبار إذ ظهرت هالات النمو المتوسعة لعزلات الرايزوبيا بعد مرور 24 ساعة من تحضينها في أطباق بتري الحاوية على وسط التريتون وخالصة الخميرة TY شبه الصلب والمجهز بالاكار بنسبة

0.4% (الصورة 4-3). أظهرت نتيجة دراسة سابقة قدرة جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا على الحركة (Bhattacharya et al., 2013).



الصورة (4-1): صورة توضح كل من اختبار صبغة كرام واختبار الحركة
 A. مسحة لبكتريا *Ensifer meliloti* العزلة OJ17 مصبوغة بصبغة كرام تحت العدسة الزيتية وبقوة (1000X).
 B. اختبار الحركة على وسط TY شبه الصلب للعزلات OJ1 و OJ2 و OJ3 و OJ4 و OJ5 و OJ6.

2-2-4 الاختبارات البايوكيميائية لتشخيص عزلات الرايزوبيا المدروسة:

Biochemical tests for identification of studied rhizobial isolates

يظهر الجدول (2-4) نتائج الاختبارات البايوكيميائية أنّ جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة لها القابلية للنمو على وسط الرايزوبيوم الأدنى Rhizobial Minimal Medium (RMM) مما يشير إلى أنّ جميع هذه العزلات غير طافرة تغذويا هي (Prototroph) ولا تعاني من أي خلل في المسارات الأيضية الخاصة بتصنيع الاحماض الامينية والقواعد النايتروجينية البيورينية أو البايريميدينية كما أنّ المسارات الخاصة بتصنيع الفيتامينات لاتعاني من أي خلل (Prasad et al., 2000).

كما أظهرت نتائج اختبار استهلاك السترات قدرة جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة على استغلال السترات ما عدا بكتريا الـ *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* العزلة OJ6 وبكتريا الـ *R. grahamii* العزلتين OJ26 و OJ35 والبكتريا المعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل العزلة OJ29 فقد أظهرت عدم قدرتها على استغلال مادة السترات؛ إذ إنّ هذه النتيجة تتوافق مع ما توصل إليه الباحث Datta et al. 2015 إذ حصل على نتائج متباينة فيما يخص قابلية عزلات الرايزوبيا على استغلال السترات بوصفها مصدراً وحيداً للكربون إذ أظهرت العزلة

العزلة *R. trifoli* STR والعزلة *R. phaseoli* SRP نتيجة موجبة لهذا الاختبار في حين أظهرت العزلة *Bradyrhizobium japonicum* SBJ والعزلة *R. leguminosarum* SRL نتيجة سالبة لهذا الاختبار. كما أنّ هذه الدراسة قد أظهرت أنّ عزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة لها القابلية على تمييع الجلاتين باستثناء العزلات *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* والعزلة OJ6 وبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلات OJ7 و OJ21 و OJ22 و OJ23 وبكتريا *Ensifer meliloti* العزلة OJ16 وبكتريا *R. grahamii* العزلات OJ26 و OJ35 وبكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل العزلة OJ29 وبكتريا *Mesorhizobium loti* العزلة OJ33 وبكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلات OJ39 و OJ41 و OJ42، كذلك تباينت نتائج دراسات سابقة فيما يخص قابلية عزلات الرايزوبيا على تمييع الجلاتين إذ أظهرت نتائج الباحث *Bhattacharya et al.* (2013) عزلات بكتريا الرايزوبيا لها القابلية على تمييع الجلاتين في حين أظهرت نتائج الباحث (Deora and Singhal, 2010) عدم قدرة عزلات الرايزوبيا المدروسة على تحلل الجلاتين.

كذلك أظهرت نتائج اختبار استغلال الكلوكوز والسكروز واللاكتوز بوصفها مصادر كاربونية على وسط ثلاثي السكر والحديد (TSI) الصلب والحاوي على الحديد وبعد تلقیح الوسط بمستعمرات فتية من عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة، إنّ جميع عزلات الرايزوبيا لها القدرة على استغلال الكلوكوز والسكروز بوصفها مصادر كاربونية بدلالة تحوّل لون الوسط إلى الأصفر ما عدا بكتريا الـ *R. leguminosarum* bv. *viciae* العزلتين OJ4 و OJ9 وبكتريا الـ *R. vignae* العزلة OJ40 فقد أظهرت عدم قدرتها على استغلال السكريات المذكورة آنفًا فضلًا عن ظهور عزلة واحدة لبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* وهي OJ13 لها القدرة على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S بدلالة ظهور اللون الأسود في وسط النمو مما يشير إلى قدرة هذه العزلة على إنتاج الأنزيم *Cystine desulfurase* الذي يعمل على تحليل الحامض الأميني الـ *Cystine* محررًا كبريتيد الهيدروجين وان هذه النتيجة اتفقت مع نتائج (Bhattacharya et al., 2013) (الجدول 4-2). كما أظهرت نتائج اختبار الكاتاليز وبعد إضافة 1-2 قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى مستعمرة فتية لكل عزلة من عزلات بكتريا الرايزوبيا تكوّن فقاعات غاز الأوكسجين نتيجة لتحلل مركب H_2O_2 السام إلى H_2O و O_2 مما يدل أنّ هذه العزلات موجبة لهذا الاختبار إذ تتوافق نتيجة هذه الدراسة مع نتائج الباحث (Chhetri et al., 2019).

الجدول (2-4) الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة

الاختبار الاوكسيديز	الاختبار الكاتاليز	الاختبار ثلاثي السكر والحديد	تميع الجلوتين	استهلاك السترات	النمو على RMM	رقم العزلة
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ1
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ2
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ3
+	+	-	+	+	+	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
+	+	+	+	+	+	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
+	+	+	-	-	+	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> OJ6
+	+	+	-	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
+	+	+	+	+	+	<i>R. leguminosarum</i> OJ8
+	+	-	+	+	+	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
+	+	+	+	+	+	<i>R. japonicum</i> OJ10
+	+	+	+	+	+	<i>R. vignae</i> OJ11
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ12
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ13
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ14
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ15
+	+	+	-	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ17
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ18
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ19
+	+	+	+	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ20
+	+	+	-	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ21
+	+	+	-	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ22
+	+	+	-	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
+	+	+	+	+	+	<i>R. grahamii</i> OJ24
+	+	+	+	+	+	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ25
+	+	+	-	-	+	<i>R. grahamii</i> OJ26
+	+	+	+	+	+	OJ27
+	+	+	+	+	+	<i>R. grahamii</i> OJ28
+	+	+	-	-	+	OJ29
+	+	+	+	+	+	OJ30
+	+	+	+	+	+	OJ31
+	+	+	+	+	+	<i>R. mesosinicum</i> OJ32
+	+	+	-	+	+	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ33
+	+	+	+	+	+	<i>R. mesosinicum</i> OJ34
+	+	+	-	-	+	<i>R. grahamii</i> OJ35
+	+	+	+	+	+	<i>R. grahamii</i> OJ36
+	+	+	+	+	+	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ37
+	+	+	+	+	+	<i>R. japonicum</i> OJ38
+	+	+	-	+	+	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ39
+	+	-	+	+	+	<i>R. vignae</i> OJ40
+	+	+	-	+	+	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ41
+	+	+	-	+	+	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ42

(+): الاختبار الموجب (-): الاختبار السالب

أمّا نتائج اختبار إنتاج أنزيم Cytochrome oxidase فقد أظهرت نتائج إيجابية ولجميع عزلات الرايزوبيا المدروسة وبدلالة ظهور اللون الارجواني أو البنفسجي؛ إذ إنّ هذا الأنزيم يعمل على اكسدة كاشف الاوكسيديز منتجا مركب Indophenol. وهذه النتيجة تتوافق مع نتائج دراسات سابقة (Wadhwa et al., 2017; Hossain et al., 2019).

3-4 قابلية عزلات بكتريا الرايزوبيوم لاستغلال السكريات المختلفة:

Ability of rhizobial bacteria isolates to utilize different sugars

أظهرت نتائج اختبار استغلال عزلات بكتريا الرايزوبيوم المعزولة ان لها القابلية على استغلال السكريات المدروسة المختلفة. الجدول 3-4 يوضح أنّ جميع عزلات الرايزوبيا نمت بشكل جيد جداً على أطباق بتري الحاوية على وسط سكر المانيتول بينما تباينت عزلات الرايزوبيا في قدرتها على النمو على وسط خلاصة الخميرة YE والحاوي على سكر الكلوكوز بدلاً من المانيتول، إذ أظهرت النتائج أنّ عزلات بكتريا الرايزوبيا *Ensifer fredii* bv. *fredii* OJ1 و OJ13 و OJ20 وبكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلة OJ25 وبكتريا *R. mansoncum* العزلة OJ32 وبكتريا *Mesorhizobium loti* العزلة OJ33 كان نموها بشكل جيد جداً في حين اختلفت بقية العزلات في قابليتها على النمو بين الجيدة والمتوسطة في الوسط المذكور آنفاً. بينما تباين نمو عزلات بكتريا الرايزوبيا على وسط خلاصة الخميرة YE والحاوي على سكر الكالاكتوز بدلاً من المانيتول؛ إذ أظهرت النتائج أنّ بكتريا *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* العزلة OJ6 وبكتريا *Ensifer meliloti* العزلتين OJ15 و OJ17 وبكتريا *R. grahamii* العزلة OJ36 وبكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلتين OJ39 و *R. vignae* العزلة OJ40 كان نموها جيداً على هذا الوسط بينما اختلفت باقي العزلات في قابليتها على النمو بين المتوسطة والجيدة جداً.

كما أظهرت النتائج أنّ عزلات بكتريا الرايزوبيا *Mesorhizobium loti* العزلتين OJ5 و OJ33 وبكتريا *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* العزلة OJ6 وبكتريا *R. leguminosarum* bv. *viciae* العزلة OJ9 وبكتريا *R. grahamii* العزلة OJ36 وبكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلتين OJ37 و OJ41، كان نموها بشكل جيد على وسط خلاصة الخميرة YE والمجهز بسكر الفركتوز بدلاً عن المانيتول بينما نمت بقية العزلات بصورة متوسطة وجيدة جداً. كذلك أظهرت النتائج أنّ بكتريا *Ensifer meliloti* العزلة OJ2 وبكتريا *Mesorhizobium loti* العزلتين OJ5 و OJ33 وبكتريا *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*

العزلة OJ6 وبكتريا *R. grahamii* العزلتين OJ24 و OJ36 وبكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلة OJ39 وبكتريا *R. vignae* العزلة OJ40، كان نموها بصورة جيدة على وسط YE والمجهز بسكر اللاكتوز بدلاً عن المانيتول بينما كانت بقية العزلات متباينة في قابليتها على النمو بين المتوسط والجيدة جداً على هذا الوسط.

كما أظهرت النتائج أنَّ بكتريا الرايزوبيا *Mesorhizobium loti* العزلة OJ5 وبكتريا *R. leguminosarum* bv. *viciae* العزلة OJ6 وبكتريا *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* العزلة OJ9 وبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ21 وبكتريا *R. grahamii* العزلتين OJ35 و OJ36 وبكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلة OJ39 وبكتريا *R. vignae* العزلة OJ40 كان نموها بصورة جيدة على وسط خلاصة الخميرة YE والمجهز بسكر المانوز بدلاً من المانيتول بينما نمت بقية العزلات بصورة متوسطة وجيدة جداً على هذا الوسط. كذلك إنَّ وسط YE والمجهز بسكر المالتوز بدلاً عن المانيتول فقد أعطى نتائج مختلفة إذ أنَّ العزلات *R. vignae* OJ40 و *R. grahamii* OJ35 و *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* OJ6 كان نموها بصورة جيدة على هذا الوسط في حين نمت بقية العزلات بصورة متوسطة وجيدة جداً.

ونتيجة النمو على وسط خلاصة الخميرة YE والمجهز بسكر الارابينوز بدلاً عن المانيتول قد أظهرت أنَّ بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ3 وبكتريا *R. leguminosarum* bv. *viciae* العزلة OJ9 وبكتريا *Ensifer meliloti* العزلات OJ14 و OJ16 و OJ17 و OJ19 وبكتريا *R. mesosinicum* العزلة OJ34، كان نموها بصورة متوسطة على هذا الوسط في حين نمت بقية العزلات بصورة جيدة وجيدة جداً. كذلك أظهرت النتائج أنَّ بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلات OJ1 و OJ13 و OJ20 وبكتريا *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* العزلة OJ6 وبكتريا *Ensifer meliloti* العزلة OJ18 وبكتريا *R. grahamii* العزلات OJ24 و OJ35 و OJ36 وبكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلة OJ39 كان نموها بصورة جيدة على وسط خلاصة الخميرة YE والمجهز بسكر الزايلوز بدلاً عن المانيتول بينما نمت بقية عزلات الرايزوبيا بصورة متوسطة وجيدة جداً.

إنَّ نتائج هذه الدراسة كانت متباينة مع نتائج الباحث (Janczarek et al. (2015)، إذ إنَّ نتائج دراسة الباحث قد أظهرت أنَّ Glycerol ومن ثم Sorbitol و Glucose تُعدُّ أفضل مصدر كاربوني لنمو عزلات بكتريا الرايزوبيا،

الجدول (3-4) قابلية استهلاك عزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة لسكريات مختلفة.

Xyl	Ara	Mal	Man	Lac	Frc	Gal	Glu	Mannitol	رقم العزلة
++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ1
+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ2
+	+	+	+	+++	+	+	+	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ3
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
+	++	+++	++	++	++	+++	++	+++	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
++	++	++	++	++	++	++	+	+++	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> OJ6
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
-	-	-	+++	-	+	+++	+	+++	<i>R. leguminosarum</i> OJ8
+	+	+	++	+	++	+++	++	+++	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	<i>R. japonicum</i> OJ10
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	<i>R. vignae</i> OJ11
+	-	+	+	+	-	-	-	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ12
++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ13
+	+	+	+	+	-	+	-	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ14
+	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ15
+	+	-	-	+	-	-	-	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
+	+	+	+	+	+	++	+	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ17
++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ18
+	+	+	-	+	-	-	-	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ19
++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ20
-	-	-	++	-	+	+	+	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ21
-	-	-	-	-	-	-	-	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ22
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ24
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ25
-	-	+	-	-	-	-	-	+++	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ26
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	OJ27
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ28
-	-	-	-	-	-	-	-	+++	OJ29
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	OJ30
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	OJ31
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>Rhizobium mesosinicum</i> OJ32
+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ33
-	+	-	-	+	+	+	-	+++	<i>R. mesosinicum</i> OJ34
++	++	++	++	+	+	+	+	+++	<i>R. grahamii</i> OJ35
++	++	+++	++	++	++	++	++	+++	<i>R. grahamii</i> OJ36
+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ37
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	<i>R. japonicum</i> OJ38
++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ39
+++	++	++	++	++	+	++	+	+++	<i>R. vignae</i> OJ40
+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ41
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ42

Man: Mannitol, Glu: Glucose, Gal: Galactose, Frc: fructose, Lac: Lactose, Man: Mannose, Mal: Maltose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose
 (+) نمو متوسط ، (++) نمو جيد، (+++) نمو جيد جداً، (-): لا يوجد نمو.

في حين ان سكر المانيتول Mannitol يعد أفضل مصدر كاربوني لنمو جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا في هذه الدراسة. كما تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث Gauri (2011) *et al.* إذ أظهرت نتائج دراسته قابلية عزلات الرايزوبيا على استغلال سكريات الكالاكتوز والارابينوز والزايلوز واللاكتوز.

4-4 اختبار تحمل عزلات الرايزوبيا لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم:

Tolerance test of rhizobial isolates to different concentrations of sodium chloride

أظهرت نتائج اختبار تحمل تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl أن جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا قيد الدراسة كانت متباينة في تحملها لهذا الملح وإلى التركيز 6.0% ما عدا بكتريا *Mesorhizobium loti* العزلة OJ33، إذ أظهرت الدراسة عدم تحملها للتركيز 6.0% إذ أدى هذا التركيز إلى تثبيط نمو هذه العزلة تمامًا، كذلك أظهرت النتائج أنه عند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم NaCl عن 6.0% أدى إلى تثبيط نمو بكتريا *R. grahamii* العزلتين OJ24 و OJ35 عند التركيز 8.0% (الجدول 4-4).

إنّ التثبيط الحيوي للنايتروجين يتأثر بعوامل عديدة منها الملوحة Salinity ومن المعلوم أنّ بكتريا الرايزوبيوم لها القدرة على تحمل نسب ملوحة أكثر بالمقارنة مع النباتات المضيف وتعدّ الملوحة أحد أبرز العوامل المحددة لنمو النباتات في الأراضي المروية وشبه المروية (Vanderlinde *et al.*, 2010). كما أظهرت الدراسات أنّ عزلات بكتريا الرايزوبيوم تكون مختلفة في تحملها لكلوريد الصوديوم NaCl إذ إنّ قسم من عزلات بكتريا الرايزوبيا تتحمل تراكيز عالية نسبيًا من الملوحة في حين ان عزلات أخرى من بكتريا الرايزوبيا لا تتمكن من تحمل الا تراكيز منخفضة من الملوحة فقط.

كما أشارت الدراسة التي أجراها الباحث Wadhwa *et al.* (2017) إلى أنّ عزلات بكتريا الرايزوبيا قد أظهرت معدلات متباينة من النمو في تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl وقد أظهرت دراسة الباحث أنّ أفضل نمو كان عند التركيز 1.0% (وزن/حجم) من كلوريد الصوديوم وأقل نمو كان عند تركيز 4.0% (وزن/حجم) من كلوريد الصوديوم. في حين أظهرت نتائج هذه الدراسة إنّ عزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة لها القدرة على تحمل تراكيز أعلى من كلوريد الصوديوم NaCl، إذ تحملت تراكيز تصل إلى نسبة 6.0% بعد ذلك بدأ النمو بالتأثر بتراكيز الملوحة، (الجدول 4-4).

الجدول (3-4) قابلية تحمل عزلات الرايزوبيا المحلية لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl (وزن/ حجم %).

تركيز NaCl %				رقم العزلة
8.0	6.0	4.0	2.0	
++	++	++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ1
++	+++	+++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ2
+	++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ3
++	+++	+++	+++	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
++	++	+++	+++	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
+	+	+	++	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> OJ6
+++	+++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
+	++	+++	+++	<i>R. leguminosarum</i> OJ8
+	+	+++	+++	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
++	++	++	+++	<i>R. japonicum</i> OJ10
+	++	++	+++	<i>R. vignae</i> OJ11
++	++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ12
++	+++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ13
++	++	+++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ14
+	++	+++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ15
+	+	++	++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
++	++	++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ17
+	+	+++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ18
+	++	++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ19
++	+++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ20
+	++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ21
++	++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ22
++	+++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
-	++	++	+++	<i>R. grahamii</i> OJ24
+	++	++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ25
++	++	++	+++	<i>R. grahamii</i> OJ26
++	++	+++	+++	OJ27
+	++	++	+++	<i>R. grahamii</i> OJ28
++	++	++	++	OJ29
+	+	+	+++	OJ30
++	++	++	+++	OJ31
++	++	++	+++	<i>R. mesosinicum</i> OJ32
-	-	+	+++	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ33
++	++	+++	+++	<i>R. mesosinicum</i> OJ34
-	+	+	++	<i>R. grahamii</i> OJ35
+	++	+++	+++	<i>R. grahamii</i> OJ36
++	++	+++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ37
+	++	+++	+++	<i>R. japonicum</i> OJ38
+	+++	+++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ39
+	++	+++	+++	<i>R. vignae</i> OJ40
++	+++	+++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ41
++	+++	+++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ42

(+) نمو متوسط (++) نمو جيد (+++) نمو جيد جداً (-) لا يوجد نمو

كذلك توصل الباحث (Dong et al. 2017) إلى أنَّ *Bradyrhizobium* العزلة RJS9-2 كانت عالية التحمل لكلوريد الصوديوم وبين الباحث أنَّ سبب هذا التحمل قد تحقق بالاشتراك مع إنتاج المركب (IAA) Indol-3-acetic acid إذ ان تراكم هذا المركب في داخل البكتريا يعمل على حمايتها من الازموزية Osmosis.

5-4 مقاومة عزلات بكتريا الرايزوبيا للمضادات الحياتية:

Antibiotic resistance of rhizobial isolates

يبين الجدول 4-5 قابلية عزلات بكتريا الرايزوبيا المختلفة على مقاومة المضادات الحياتية المختلفة التي تم استعمالها في هذه الدراسة، إذ أظهرت النتائج أنَّ بكتريا الـ *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ9 وبكتريا *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلات OJ13 و OJ21 وبكتريا الـ *Ensifer meliloti* العزلة OJ17 وبكتريا الـ *Neorhizobium huautlense* العزلة OJ25 وبكتريا الـ *R. grahamii* العزلة OJ26 وبكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل العزلة OJ27 وبكتريا الـ *R. mesosinicum* العزلة OJ32 كانت مقاومة للمضاد الحيوي الـ Tetracycline وبتركيز 10 مايكروغرام/مل في حين كانت بقية عزلات بكتريا الرايزوبيا حساسة لهذا المضاد الحيوي. بينما كانت جميع هذه العزلات مقاومة للمضاد الحيوي Erythromycin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. في حين كانت بكتريا *Rhizobium leguminosarum* العزلة OJ8 وبكتريا الـ *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلة OJ9 وبكتريا *R. japonicum* العزلتين OJ10 و OJ38 وبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ13 وبكتريا الـ *R. grahamii* العزلتين OJ28 و OJ35 وبكتريا الـ *R. mesosinicum* العزلتين OJ32 و OJ34 مقاومة للمضاد الحيوي Ceftriaxone وبتركيز 10 مايكروغرام/مل بينما كانت بقية عزلات بكتريا الرايزوبيا حساسة تجاه هذا المضاد الحيوي.

الجدول (4-5) مقاومة وحساسية عزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة للمضادات الحيوية.

تراكيز المضادات الحيوية (مايكروغرام/مل)						رقم العزلة
RA 10	AK 10	CIP 10	CRO 10	E 10	TE 10	
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ1
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer meliloti</i> OJ2
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ3
S	S	S	S	R	S	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
R	S	S	S	R	S	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
R	S	S	S	R	S	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> OJ6
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
R	R	S	R	R	S	<i>R. leguminosarum</i> OJ8
S	R	S	R	R	R	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
R	S	S	R	R	S	<i>R. japonicum</i> OJ10
R	S	S	S	R	S	<i>R. vignae</i> OJ11
S	S	S	S	R	S	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ12
S	S	S	R	R	R	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ13
S	S	S	S	R	S	<i>Ensifer meliloti</i> OJ14
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer meliloti</i> OJ15
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
S	S	S	S	R	R	<i>Ensifer meliloti</i> OJ17
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer meliloti</i> OJ18
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer meliloti</i> OJ19
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ20
R	S	S	S	R	R	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ21
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ22
R	S	S	S	R	S	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
R	S	S	S	R	S	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ24
R	S	S	S	R	R	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ25
R	S	S	S	R	R	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ26
R	S	S	S	R	R	OJ27
R	R	S	R	R	S	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ28
R	S	S	S	R	S	OJ29
S	S	S	S	R	S	OJ30
R	S	S	S	R	S	OJ31
R	S	S	R	R	R	<i>Rhizobium mesosinicum</i> OJ32
S	R	S	S	R	S	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ33
R	S	S	R	R	S	<i>R. mesosinicum</i> OJ34
R	R	S	R	R	S	<i>R. grahamii</i> OJ35
R	S	S	S	R	S	<i>R. grahamii</i> OJ36
R	S	S	S	R	S	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ37
R	S	S	R	R	S	<i>R. japonicum</i> OJ38
R	S	S	S	R	S	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ39
S	S	S	S	R	S	<i>R. vignae</i> OJ40
R	S	S	S	R	S	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ41
R	S	S	S	R	S	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ42

TE : Tetracycline, E: Erythromycin, CRO: Ceftriaxone, CIP: Ciprofloxacin, AK: Amikacin, RA : Rifampin

S :Sensitive (حساس) ، R:Resistant (مقاوم).

في حين كانت جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة حساسة تجاه المضاد الحيوي Ciprofloxacin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. كما أظهرت النتائج أنّ بكتريا *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلة OJ8 وبكتريا الـ *R. grahamii* العزلتين OJ28 و OJ35 وبكتريا الـ *Mesorhizobium loti* العزلة OJ33 كانت مقاومة للمضاد الحيوي Amikacin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل بينما كانت بقية عزلات بكتريا الرايزوبيا حساسة تجاه هذا المضاد الحيوي. كذلك أظهرت النتائج أنّ بكتريا الـ *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلتين OJ4 و OJ9 وبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلات OJ12 و OJ13 وبكتريا الـ *Ensifer meliloti* العزلة OJ14 و OJ17 وبكتريا الرايزوبيا المعزولة في العقد الجذرية لنبات الكاتالبا العزلة OJ30 وبكتريا الـ *Mesorhizobium loti* العزلة OJ33 وبكتريا *R. vignae* العزلة OJ40 كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي Rifampin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل بينما أظهرت بقية عزلات بكتريا الرايزوبيا مقاومتها تجاه هذا المضاد الحيوي. تباينت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (Gauri et al. (2011 إذ توصل إلى أنّ 33% من عزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة كانت مقاومة للمضاد الحيوي الـ Tetracycline بتركيز 10 مايكروغرام/مل، في حين تم التوصل في هذه الدراسة إلى أنّ 19.04% من عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت مقاومة تجاه هذا المضاد الحيوي.

توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج كل من الباحث (Dhull et al. (2018 إذ أظهرت دراسته أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة للمضاد الحيوي الـ Tetracycline وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (Khalid et al. (2020 إذ توصل إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة للمضاد الحيوي الـ Tetracycline وبتركيز 5 مايكروغرام/مل. كما بينت نتائج الباحث (Mir et al. (2020 أنّ جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة حساسة للمضاد الحيوي الـ Tetracycline بتركيز 10 مايكروغرام/مل. كما ان نتائج هذه الدراسة كانت متقاربة مع ما توصل إليه الباحث (Abdel-Hakim et al. (2022 إذ توصل إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة للمضاد الحيوي الـ Tetracycline وبتركيز 10 مايكروغرام/مل.

كذلك تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (Gauri *et al.* (2011) من حيث مقاومة عزلات بكتريا الرايزوبيا للمضاد الحيوي الـ Erythromycin بتركيز 10 مايكروغرام/مل إذ بيّنت دراسته أنّ عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت مقاومة تجاه المضاد الحيوي الـ Erythromycin بنسبة 93%. كما توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث Küçük *et al.* (2006)، إذ توصل إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المعزولة (30 عزلة) من *Rhizobium* sp. كانت مقاومة للمضاد الحيوي الـ Erythromycin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (Singh *et al.* (2008) عند دراسته للمقاومة والحساسية لعزلات من بكتريا الرايزوبيوم *Rhizobium* spp. المعزولة، إذ ان جميع عزلات الباحث كانت مقاومة تجاه المضاد الحيوي الـ Erythromycin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل.

كما ان نتائج هذه الدراسة كانت متوافقة مع ما توصل إليه الباحث (Tanim *et al.* (2019) عند دراسته للمقاومة والحساسية لعزلات من بكتريا الرايزوبيوم *Rhizobium* sp. المعزولة، إذ ان أغلب عزلات الباحث أظهرت مقاومتها تجاه المضاد الحيوي الـ Erythromycin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. في حين تباينت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه (Beshah and Assefa, (2019) إذ توصلوا إلى أنّ 33% من عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت مقاومة للمضاد الحيوي الـ Erythromycin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي توصل إليها الباحث (Teresa *et al.*, (2021) إذ توصل إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المعزولة كانت مقاومة للمضاد الحيوي الـ Erythromycin بتركيز 10 مايكروغرام/مل.

اتفقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (Chauhan *et al.* (2017) إذ توصل إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المعزولة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Ceftriaxone وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (Zhang *et al.* (2017)، إذ توصلوا إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المعزولة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Ceftriaxone وبتركيز 30 مايكروغرام/مل. وتوافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (Abdel-Hakim *et al.* (2022) إذ توصلوا إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المعزولة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Ceftriaxone بتركيز 30 مايكروغرام/مل.

توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (Mihaylova *et al.* (2014) إذ توصل إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Ciprofloxacin

بتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث Tyagi *et al.* (2017)، إذ توصلوا إلى أن جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Ciprofloxacin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. كما توافقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة سابقة تم إجرائها من الباحث (Kuchibiro *et al.*, 2018) إذ أظهرت أن بكتريا الـ *Rhizobium pusense* كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Ciprofloxacin وبتركيز 1 مايكروغرام/مل. تباينت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (Tanim *et al.*, 2019) إذ توصلوا إلى أن جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Ciprofloxacin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (Subudhi *et al.* 2020) إذ توصل إلى أن أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Ciprofloxacin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل.

فيما يخص نتائج المقاومة للمضاد الحيوي الـ Amikacin فقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (Chauhan *et al.* 2017) إذ توصل إلى أن أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Amikacin وبتركيز 30 مايكروغرام/مل. كما توافقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة تم إجرائها من الباحث (Kuchibiro *et al.* 2018) إذ أظهرت ان بكتريا الـ *Rhizobium pusense* كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Amikacin وبتركيز 1 مايكروغرام/مل. كذلك تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (Subudhi *et al.* 2020) إذ توصل إلى أن أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Amikacin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. وقد اختلفت نتيجة هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (Teresa *et al.* 2021) إذ أظهرت دراسة الباحث ان أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت مقاومة للمضاد الحيوي الـ Amikacin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. في حين أظهرت نتائج هذه الدراسة ان أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Amikacin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل.

تباينت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (Gauri *et al.* 2011) من حيث المقاومة والحساسية للمضاد الحيوي الـ Rifampicin إذ توصلوا إلى أن 44% من عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت مقاومة تجاه المضاد الحيوي الـ Rifampicin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل، في حين أظهرت نتائج هذه دراسة نسبة مقاومة 79% لهذا المضاد الحيوي من عزلات الرايزوبيا المدروسة. وقد اختلفت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (Mihaylova *et al.* 2014)

إذ توصل إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي الـ Rifampcin وبتركيز 5 مايكروغرام/مل، في حين أظهرت نتائج هذه الدراسة ان أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت مقاومة تجاه المضاد الحيوي الـ Rifampcin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث Tanim *et al.* (2019) إذ توصلوا إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت مقاومة تجاه المضاد الحيوي الـ Rifampcin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (Teresa *et al.* 2021) إذ توصلوا إلى أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كانت مقاومة تجاه المضاد الحيوي الـ Rifampcin وبتركيز 10 مايكروغرام/مل.

هناك آليات عديدة لمقاومة بكتريا الرايزوبيا للمضادات الحيوية ويمكن ان توصف بالفعّالة، إذ ان بكتريا الرايزوبيا التي تُعدّ من البكتريا السالبة لصبغة كرام إذ انها تحتوي على حوامل بروتينية متخصصة على الغشاء الخارجي. والمقاومة الفعّالة تشمل ثلاث آليات الأولى هي تحويل الموقع الهدف للمضاد الحيوي، أمّا الثانية فتتمثل بالضح الفعّال للمضاد الحيوي خارج بكتريا الرايزوبيوم، أمّا الثالثة فتتضمن التحويل الأنزيمي للمضاد الحيوي فضلاً عن تفكيك المضاد الحيوي. في حين ان آليات المقاومة الأخرى تتمثل في تحويل المسارات الايضية داخل بكتريا الرايزوبيا، فضلاً عن إنتاج أنزيمات تعمل ضد الموقع الهدف وهو المضاد الحيوي وكذلك التغيرات في نفاذية الجدار الخلوي لبكتريا الرايزوبيا (Naamala *et al.*, 2016).

4-6 مقاومة عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة للمعادن الثقيلة:

Resistance of studied rhizobial bacterial isolates to heavy metals

بيّنت نتائج اختبار المقاومة والحساسية لعزلات بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية من مناطق مختلفة لمحافظة نينوى وبغداد والأنبار ودهوك/العراق تجاه بعض أملاح المعادن الثقيلة (الجدول 4-6) أنّ أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة مقاومة لأملاح المعادن الثقيلة المختلفة قيد الدراسة وبتركيز 100 مايكروغرام/مل. فيما يخص المقاومة لمُح المعدن الثقيل كلوريد النيكل $NiCl_2$ فقد تباينت مقاومة عزلات الرايزوبيا المدروسة لهذا المعدن الثقيل ما عدا بكتريا الـ *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلات OJ3 و OJ20 وبكتريا الـ *Mesorhizobium loti* و OJ4 والعزلتين *R. leuguminisarm* bv. *viciae* OJ9 وبكتريا الـ *R. grahamii* العزلات OJ24 و OJ26 و OJ36 وبكتريا الـ *Neorhizobium huautlense* العزلات OJ37 و OJ42 إذ أظهرت حساسيتها تجاه هذا الملح الثقيل وبتركيز 100 مايكروغرام/مل وكما في الجدول 4-6.

الجدول (4-6) مقاومة عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة للمعادن الثقيلة

CoCl ₂	ZnSO ₄	HgCl ₂	CdCl ₂	Pb (CH ₃ COO) ₂	NiCl ₂	العزلة
تركيز 100 مايكروغرام/مل						
-	+	++	++	+++	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ1
+++	+++	+++	++	+++	++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ2
++	++	+	-	+++	-	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ3
++	++	++	++	+++	-	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
+	-	++	+	+++	-	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
++	++	++	++	+++	+	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> OJ6
+++	++	++	++	+++	++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
++	+++	++	++	+++	++	<i>R. leguminosarum</i> OJ8
+++	+	+++	-	+++	-	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
++	++	+	++	+++	+	<i>R. japonicum</i> OJ10
+	++	++	++	+++	+	<i>R. vignae</i> OJ11
++	+++	+++	+	++	++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ12
++	+++	++	+++	++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ13
+	+	++	+	++	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ14
+	++	++	++	+++	++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ15
++	+	+++	+	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
+	++	-	++	+++	++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ17
+	++	++	++	+++	++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ18
++	+++	++	+	++	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ19
-	++	-	++	+++	-	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ20
-	-	+	-	+	++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ21
+	+	+	+	+	++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ22
+	++	++	++	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
+	++	+	++	+++	-	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ24
++	+++	++	+++	+++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ25
+	-	+	-	-	-	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ26
-	+	++	+	+++	++	OJ27
++	+++	++	+++	+++	++	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ28
+	+	-	+	+	+	OJ29
+++	+++	+	+++	+++	+	OJ30
++	++	+++	+	++	++	OJ31
+	++	+	+++	+++	+++	<i>Rhizobium mesosinicum</i> OJ32
-	+	++	-	+	-	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ33
-	+	+	+	+++	++	<i>R. mesosinicum</i> OJ34
+	+	+++	++	+++	+	<i>R. grahamii</i> OJ35
+++	++	-	++	+++	-	<i>R. grahamii</i> OJ36
+	++	++	+	+++	-	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ37
+	+	++	-	++	++	<i>R. japonicum</i> OJ38
++	+++	++	+++	+++	++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ39
+++	+++	+	+++	+++	++	<i>R. vignae</i> OJ40
++	++	-	+	+++	++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ41
-	++	++	++	+++	-	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ42

(+): نمو متوسط ، (++) : نمو جيد ، (+++) : نمو جيد جداً ، (-) : لا يوجد نمو .

أمّا نتائج المقاومة لمُح المعدن الثقيل ثنائي خلات الرصاص $Pb(CH_3COO)_2$ فقد أظهرت جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة مقاومتها لهذا المعدن الثقيل باستثناء العزلة *R. grahamii* العزلة OJ26 إذ كانت حساسة لهذا المعدن الثقيل. في حين أظهرت ست عزلات من عزلات الرايزوبيا المدروسة وهي بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلتين OJ21 و OJ3 و بكتريا الـ *Mesorhizobium loti* العزلة OJ9 و بكتريا الـ *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلة OJ33 و بكتريا *R. grahamii* العزلة OJ26 و بكتريا الـ *R. japonicum* العزلة OJ38 حساسيتها تجاه ملح المعدن الثقيل كلوريد الكاديوم $CdCl_2$ وبتركيز 100 مايكروغرام/مل.

كذلك أظهرت نتائج المقاومة لمُح المعدن الثقيل كلوريد الزئبق $HgCl_2$ أنّ هناك مقاومة متباينة ولأغلب العزلات المدروسة تجاه هذا المعدن الثقيل ما عدا بكتريا الـ *Ensifer meliloti* العزلة OJ17 و بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ20 و بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل OJ29 و بكتريا *R. grahamii* العزلة OJ36 و بكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلة OJ41. أظهرت ثلاث عزلات من عزلات الرايزوبيا المدروسة وهي بكتريا *Mesorhizobium loti* العزلة OJ5 و بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ21 و بكتريا *R. grahamii* العزلة OJ26 استثناء من المقاومة لمُح المعدن الثقيل كبريتات الخارصين $ZnSO_4$ إذ أظهر فحص النمو أنّها غير قادرة على النمو في الوسط YEMA والمجهز بهذا المعدن الثقيل وبتركيز 100 مايكروغرام/مل.

في حين أظهرت عزلات الرايزوبيا الاتية: وهي بكتريا الـ *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلات OJ1 و OJ20 و OJ21 و بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل OJ27 و بكتريا الـ *Mesorhizobium loti* العزلة OJ33 و بكتريا الـ *R. mesosinicum* العزلة OJ34 و بكتريا الـ *Neorhizobium huautlense* العزلة OJ42 الحساسية تجاه ملح المعدن الثقيل كلوريد الكوبلت $CoCl_2$ وبتركيز 100 مايكروغرام/مل بينما أظهرت باقي العزلات تباينا في مدى مقاومتها لهذا المعدن الثقيل. وقد تباينت المقاومة لعزلات الرايزوبيا الأخرى ولأملاح المعادن الثقيلة المختلفة المدروسة (الجدول 4-6).

بيّنت نتائج الباحث (Rubio-Sanz et al. (2018 أنّ هناك تأخراً واضحاً في نمو عزلات بكتريا الرايزوبيا في وسط التريبتون وخلاصة الخميرة TY السائل والمجهز بـ 1.5 ملي مايكروميتر من ملح المعدن الثقيل كلوريد النيكل $(NiCl_2)$ أو 0.75 ملي مايكروميتر من ملح المعدن الثقيل كلوريد الكوبلت $(CoCl_2)$.

كما أظهرت نتائج الباحث (2019) Stedel *et al.* بأنَّ العزلة *Rhizobium giardinii* CR-B22 والعزلة *Ensifer sp.* CR-B26 لها القابلية على تحمّل ملح المعدن الثقيل كلوريد الكوبلت (CoCl_2) وبتركيز 15 PPM، في حين أظهرت العزلتين CR-*Rhizobium giardinii* B13 والعزلة *Rhizobium sp.* CR-B15 القابلية على تحمّل ملح المعدن الثقيل ثنائي خلات الرصاص $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

إنَّ نتائج هذه الدراسة لم تكن متوافقة مع ما توصل إليه الباحث (2017) Wadhwa *et al.*، إذ أظهرت نتائج الدراسة التي اجراها أنَّ جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا كانت حساسة تجاه الملح الثقيل كلوريد الزئبق HgCl_2 . في حين كانت نتائج هذه الدراسة متقاربة مع ما توصل إليه الباحث فيما يخص ملح المعدن الثقيل كبريتات الخارصين، إذ أظهرت نتائج دراسته أنَّ الملح الثقيل كبريتات الخارصين ZnSO_4 له تأثير على عزلات بكتريا الرايزوبيا بصورة أقل، ونتائج هذه الدراسة كانت متقاربة إلى حد ما مع ما توصل إليه الباحث العبيدي (2020)، الذي توصل إلى أنَّ عزلات بكتريا الرايزوبيا كانت مقاومة لكل من الملح الثقيلين كلوريد الكوبلت CoCl_2 وكلوريد الكاديوم CdCl_2 ونسبة 100%. في حين تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث فيما يخص المقاومة للملح الثقيل كلوريد النيكل NiCl_2 إذ كانت عزلته مقاومة ونسبة 77.7% بينما كانت نسبة المقاومة لعزلات الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة 73.80%.

ونتايج هذه الدراسة كانت متوافقة من حيث تحمّل عزلات بكتريا الرايزوبيوم المعزولة لمُح المعدن الثقيل كلوريد الزئبق HgCl_2 مع النتائج التي توصل إليها الباحث (2012) Ruiz-Diez *et al.* من خلال عزل بكتريا الرايزوبيوم التعايشية من النباتات المثبتة للنايتروجين النامية في تربة ملوثة بعنصر الزئبق في مدينة المادن Almaden في إسبانيا لإنتاج مجموعة من بكتريا الرايزوبيا يمكنها التكيف مع الظروف البيئية لهذه المنطقة بصورة جيدة، إذ تمكن من الحصول على 19 عزلة من بكتريا الرايزوبيوم التي لها القدرة على تحمّل كلوريد الزئبق HgCl_2 ، إذ عُزلت هذه العزلات من العقد الجذرية لـ 11 نبات من النباتات البقولية وتم تمييز هذه العزلات بناءً على نموها في الأوساط الغذائية المضاف إليها أملاح المعدن الثقيل كلوريد الزئبق وتم تصنيفها إلى ثلاث مجاميع بالاعتماد على قابليتها لتحمّل كلوريد الزئبق؛ إذ حدد الباحث التركيز المثبط الأدنى والتركيز الفعالة التي تنتج أنماط تحمل كلوريد الزئبق HgCl_2 بنسبة 50%

إذ أظهرت هذه الدراسة أنَّ 15 عزلة من العزلات المدروسة لها القدرة على تحمل كلوريد الزئبق. كما ان أنواع عديدة من البكتريا تستطيع نقل المواد السمية إلى خارج الخلية عن طريق آلية النقل الفعال Active transport ومثالها آلية التدفق الفعال ATPase efflux ومضخات الايونات، والجينات المتطلبة لهذه العملية تشفر من البلازميدات بشكل عام (Caracciolo and Terenzi, 2021).

كذلك وضح الباحث Chan *et al.* (2009) أنَّ بكتريا الرايزوبيا تعمل على حماية نفسها من التأثيرات السامة لأملح المعادن الثقيلة من خلال آليات عديدة التي يتم من خلالها التخلص من أيونات أملاح المعادن الثقيلة من خلال ضخها وقذفها خارج الخلية عن طريق عملية مسيطر عليها من DNA البلازميدي والكروموسوم وكذلك اختزال أيونات المعادن الثقيلة وتحويلها إلى صورة أقل سمية، كما أنَّ لها القابلية على تكوين معقدات لأيونات أملاح المعادن الثقيلة في داخل الخلية لتتخلص من سميتها. كما أشار الباحث Silver (1992) إلى أنَّ مقاومة الأحياء المجهرية في التربة تتطور كنتيجة للتأثيرات السامة لأملح المعادن الثقيلة كما أنَّ هذا التطور في البكتريا السالبة لصبغة كرام يمكن ان يحدث أحيانا بسبب وجود الحامض النووي البلازميدي Plasmid DNA، كذلك تعمل البلازميدات Plasmids على زيادة التكييفات للبكتريا واكتساب صفات وراثية جديدة بسبب الظروف البيئية الملوثة، وعلى هذا الأساس يمكن تفسير مقاومة عزلات الرايزوبيا لأملح المعادن الثقيلة المستخدمة في هذه الدراسة.

والعلاقة التعايشية ما بين بكتريا الرايزوبيا والنباتات البقولية جذبت انتباه الباحثين وذلك للامكانية البايوكيميائية والبيئية من خلال قدرة بكتريا الرايزوبيوم على تحليل وإزالة الملوثات العضوية الموجودة في التربة، إذ تميزت هذه البكتريا بقدرتها على مقاومة أملاح المعادن الثقيلة الذي يجعل من هذه البكتريا أداة كفوءة من خلال إعادة تأهيل واستصلاح الترب الملوثة بالمعادن الثقيلة (Lebrazi and Fikri-Benbrahim, 2018).

وضح الباحث Fagorzi *et al.* (2018) الآليات المعتمدة في مقاومة بكتريا الرايزوبيا للمعادن الثقيلة ومنها المعدن الثقيل الكوبلت (Co) والنيكل (Ni) إذ تم التعرف على هذه الآليات في العديد من أنواع بكتريا الرايزوبيا المقاومة للمعادن الثقيلة وذلك من خلال تشخيص الجينات المماثلة التي تشفر للبروتينات ذات الصلة بمقاومة المعادن الثقيلة في بكتريا *Cupriavidus metallidurans* العزلة CH34. إذ تم التعرف على البروتين المشفر DmeF

في بكتريا الرايزوبيا *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلة UPM791. ان هذا البروتين له علاقة بتسهيل الانتشار للأيونات الموجبة (Cation) عبر الغشاء الخلوي ويعرف بـ (CDF) Cation diffusion facilitator.

7-4 اختبار إنتاج جزيئات سطح الخلية لعزلات بكتريا الرايزوبيا:

Production of cell surface molecules of rhizobial isolates

أظهرت نتائج اختبار إنتاج جزيئات سطح الخلية لعزلات الرايزوبيا المدروسة قابلية جميع عزلات الرايزوبيا على إنتاج ليفيات السليلوز Cellulose fibrils وذلك بدلالة قابلية هذه العزلات على الاصطباغ بصبغة احمر الكونكو Congo red، كما أظهرت هذه العزلات قابليتها على إنتاج جزيئات كلوكونات β (1→3) الحلقية، وذلك بدلالة قابلية اصطباغها بصبغة أزرق الانلين Aniline blue. وقد تباينت إنتاجية ليفيات السليلوز وجزيئات كلوكونات β (1→3) الحلقية بدلالة شدة الاصطباغ لعزلات الرايزوبيا المختلفة (الجدول 4-7). كما أظهر اختبار إنتاج السكر المتعدد الخارجي EPS من عزلات الرايزوبيا المدروسة أنّ هناك تبايناً في إنتاج السكر المتعدد الخارجي؛ إذ أظهرت عزلات بكتريا الرايزوبيا *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلتين OJ4 و OJ9 وبكتريا الـ *Mesorhizobium loti* العزلة OJ5 وبكتريا الـ *Ensifer fredii* العزلتين OJ7 و OJ23 وبكتريا الـ *R. leuguminisarm* العزلة OJ8 وبكتريا *R. japonicum* العزلة OJ10 وبكتريا *Ensifer meliloti* العزلة OJ16 وبكتريا *R. grahamii* توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (1995) Swamynathan and Singh، إذ أظهرت نتائج الدراسة التي أجريت من الباحثين أنّ عزلات الرايزوبيا كانت موجبة لإنتاج جزيئات سطح الخلية لكل من ليفيات السليلوز وجزيئات كلوكونات β (1→3) الحلقية. كذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث (2021) Purwaningsih *et al.* إذ قام بعزل 11 عزلة من بكتريا الرايزوبيا وأظهر اختبار الاصطباغ بأحمر الكونكو Congo red نتيجة موجبة على وسط YEMA.

تباينت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الباحث (2019) Hossain *et al.* إذ أظهر اختبار اصطباغ عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة بصبغة أحمر الكونكو نتيجة سلبية. كما توافقت نتائج هذه الدراسة مع توصل إليه الباحث (2005) Hussein *et al.* إذ توصل إلى أنّ عزلات الرايزوبيا المتحملة للملوحة أظهرت نتيجة موجبة لاختبار إنتاج ليفيات السليلوز. العزلة OJ26 إنتاجاً غزيراً ووافراً؛ إذ كان نمو هذه العزلات ذا قوام لزج ومخاطي.

الجدول (4-7) اختبار إنتاج جزيئات سطح الخلية لعزلات بكتريا الرايزوبيا

اختبار إنتاج EPS	اختبار Aniline blue	اختبار Congo red	العزلة
++	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ1
++	+	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ2
++	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ3
+++	+	++	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
+++	+	+	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
+	+	++	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> OJ6
+++	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
+++	+	+	<i>R. leguminosarum</i> OJ8
+++	+	+	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
+++	++	+++	<i>R. japonicum</i> OJ10
++	++	+++	<i>R. vignae</i> OJ11
++	++	++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ12
+	+	++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ13
++	+++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ14
++	+	++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ15
+++	++	+	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
++	++	++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ17
+	+++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ18
++	++	+++	<i>Ensifer meliloti</i> OJ19
+	+++	+++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ20
++	+	++	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ21
++	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ22
+++	+	+	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
++	++	++	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ24
++	++	+++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ25
+++	+++	+++	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ26
++	+	++	OJ27
++	+	++	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ28
++	+	+	OJ29
+	++	+++	OJ30
++	+++	++	OJ31
++	+++	++	<i>Rhizobium mesosinicum</i> OJ32
++	+	+	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ33
++	++	+	<i>R. mesosinicum</i> OJ34
+	+	+	<i>R. grahamii</i> OJ35
++	+	+	<i>R. grahamii</i> OJ36
++	+	+	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ37
++	+	+	<i>R. japonicum</i> OJ38
+	+	+	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ39
++	+++	+++	<i>R. vignae</i> OJ40
++	+	++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ41
+	+	++	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ42

(+): إنتاج متوسط ، (++) : إنتاج جيد ، (+++) : إنتاج جيد جداً.

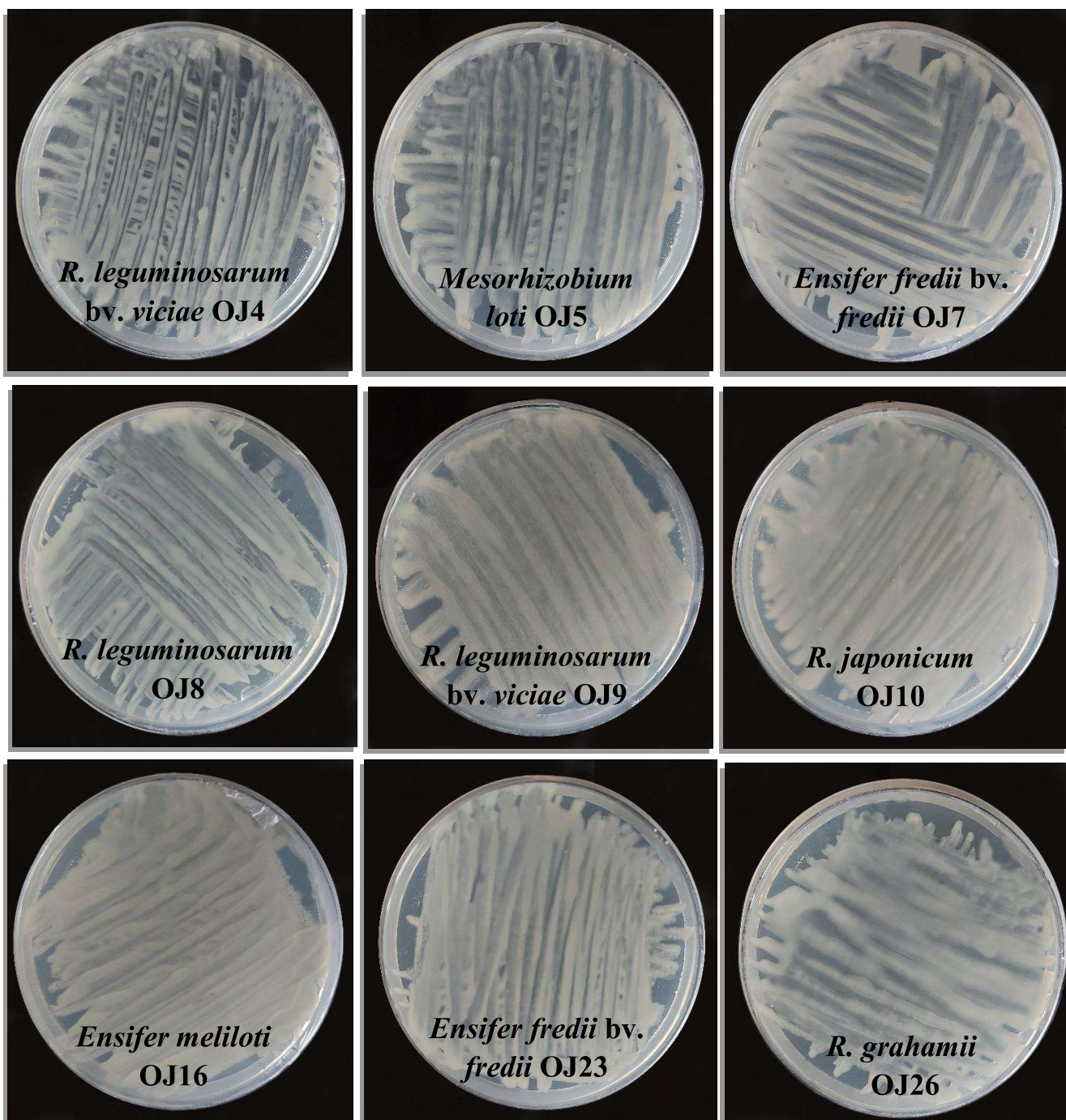
كما أظهرت دراسة سابقة أنَّ عزلات الرايزوبيا المتحملة للملوحة لها القابلية على إنتاج جزيئات كلوكونات (3→1) β الحلقية (Hussein et al., 2005). بيّن الباحث Janczarek et al. (2015) أنَّ السكر المتعدد الخارجي الحامضي EPS ضروري من أجل إقامة علاقة تعايشية فعّالة ما بين بكتريا الرايزوبيا والنباتات المضيفة لها.

8-4 تقدير كمية السكر المتعدد الخارجي لعزلات بكتريا الرايزوبيا:

Production of exopolysaccharide by rhizobial bacteria isolates

بالاعتماد على المظهر المخاطي لنمو عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة عند زراعتها على الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA) الصلب، وبعد الفحص بالعين المجردة فقد أظهرت 9 عزلات من عزلات بكتريا الرايزوبيا التي عُزلت في هذه الدراسة من بين 42 عزلة رايزوبية الصورة (3-4) قدرتها على إنتاج كميات وفيرة من السكر المتعدد الخارجي وهي كما يأتي: بكتريا الـ *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلتين OJ4 و OJ9 وبكتريا الـ *Mesorhizobium loti* العزلة OJ5 وبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ7 و OJ23 وبكتريا الـ *R. leuguminisarm* العزلة OJ8 وبكتريا الـ *R. japonicum* العزلة OJ10 وبكتريا الـ *Ensifer meliloti* العزلة OJ16 وبكتريا الـ *R. grahamii* العزلة OJ26.

ومن أجل تقدير كمية السكر المتعدد الخارجي المنتج Extracellular exopolysaccharide فقد تم اتباع طريقة العمل المذكورة في الفقرة (3-17) من طرائق العمل وبعد يومين من التحضين في الحاضنة الهزازة تم تقدير معدل إنتاج السكر المتعدد الخارجي وتقدير وزن الخلية الجاف Cell dry weight وقياس الدالة الحامضية النهائية Final pH الجدول (4-8).



الصورة (2-4) عزلات الرايزوبيا المحلية قيد الدراسة التي أظهرت إنتاج وافر من السكر المتعدد الخارجي (EPS) والمزرعة على وسط YEM.

الجدول (4-8) إنتاج السكر المتعدد الخارجي لعزلات الرايزوبيا المنتخبة والمدروسة في وسط YEM السائل.

Final pH	C.D.W	EPS	رقم العزلة
	mg/L		
5.2±(0.15)*	280±(0.22)	230±(0.33)	<i>R. leuguminisarm</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
4.7±(0.23)	110±(0.09)	80±(0.18)	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
4.7±(0.17)	200±(0.18)	170±(0.12)	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
4.6±(0.09)	230±(0.15)	150±(0.19)	<i>R. leuguminisarm</i> OJ8
4.7±(0.19)	230±(0.18)	190±(0.21)	<i>R. leuguminisarm</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
4.3±(0.17)	190±(0.26)	160±(0.29)	<i>R. japonicum</i> OJ10
3.9±(0.16)	130±(0.17)	100±(0.18)	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
4.5±(0.11)	120±(0.12)	70±(0.25)	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
3.8±(0.21)	130±(0.13)	100±(0.21)	<i>R. grahamii</i> OJ26

* كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات، أمّا الأرقام بين القوسين فتمثل الانحراف المعياري S.D.

EPS : السكر المتعدد الخارجي ، C.D.W: وزن الخلية الجاف.

أظهرت النتائج وكما في الجدول (4-8) أنّ بكتريا الـ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* العزلة OJ4 أعطت أفضل معدل إنتاجية للسكريات المتعددة الخارجية، إذ بلغت الإنتاجية 230 ملغم/لتر، بينما كان أقل معدل إنتاج للسكريات المتعددة الخارجية كان في بكتريا الـ *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ23 إذ بلغت 70 ملغم/لتر، في حين أنّ أعلى معدل وزن جاف كان 280 ملغم/لتر من بكتريا الـ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* العزلة OJ4. بينما كان أقل معدل وزن جاف في بكتريا الـ *Mesorhizobium loti* العزلة OJ5 إذ بلغ 110 غم/لتر، في حين انخفض معدل الدالة الحامضية لجميع أوساط التخمير لعزلات الرايزوبيا المدروسة.

اعتمد الباحث (1997) Navarini et al. هذه الطريقة وبناءً على الملاحظات البصرية وباستعمال العين المجردة اختار العزلة *R. hedysari* HCNT1 كأفضل عزلة منتجة للسكريات المتعددة الخارجية عند دراسة إنتاج السكريات المتعددة الخارجية وذلك بعد زراعة العينات في الوسط الغذائي YEM السائل والتحصين لمدة 24-48 ساعة.

في دراسة سابقة تم الحصول على معدل إنتاجية للسكر المتعدد الخارجي إذ أشارت الدراسة إلى أنّ العزلة *Rhizobium* sp. VMA301 كانت أفضل عزلة من حيث إنتاج السكريات

المتعددة الخارجية؛ إذ بلغت 346 ملغم/لتر (Mandal *et al.*, 2007). كذلك اختبر الباحث (2009) Mallaiah and Prabhavati قابلية 32 عزلة من بكتريا الرايزوبيا على إنتاج السكر المتعدد الخارجي EPS في وسط YEM السائل وتوصل إلى أنّ أفضل إنتاجية بلغت 4690 مايكروغرام/مل من العزلة HGR12 بعد ثلاثة أيام من التحضين وباستعمال المانيتول 1% بوصفه مصدرًا كربونيًا.

كذلك بيّنت دراسات سابقة إمكانية الحصول على عزلات من بكتريا الرايزوبيا منتجة للسكريات المتعددة الخارجية EPS بقيم 280 ملغم/لتر (Zhou *et al.*, 2014) و2100 غم/لتر (Priyanka *et al.*, 2015). كما لاحظ الباحث (2009) Kumari *et al.* أنّ هنالك تباينًا في إنتاجية السكر المتعدد الخارجي ما بين عزلات الرايزوبيا المختلفة. كذلك توصل الباحث (2005) Ghosh *et al.* إلى أنّ المانيتول يُعدُّ أفضل مصدر كربوني لإنتاج السكريات المتعددة الخارجية إذ حصل على إنتاجية بلغت 765 مايكروغرام/مل.

توافقت نتائج هذه الدراسة فيما يخص تباين إنتاجية الكتلة الحيوية لبكتريا الرايزوبيا إذ إنّ الباحث (2017) Castellane *et al.* توصل إلى أنّ تباين مقدار الكتلة الحيوية المنتجة للبكتريا *Rhizobium tropici* العزلة SEMIA4080 والعزلة MUTZC3 وكذلك توافقت من حيث انخفاض الدالة الحامضية لأوساط التخمر ولكلا العزلتين.

درس الباحث (2019) Primo *et al.* إنتاجية السكر المتعدد الخارجي من البكتريا *Enisifer meliloti* لعزلات مختبرية وأخرى معزولة من البيئة ودرس ظروف تلقيح البكتريا للنبات المضيف ووجد أنّ جزيئات سطح الخلية ومن ضمنها السكر المتعدد الخارجي يؤدي دورًا مهمًا في العلاقة التعايشية ما بين بكتريا الرايزوبيا والنباتات المضيفة وبين ان الجين *expR* الفعال الذي يضيفي القوام المخاطي لنمو الرايزوبيا كان له الأثر الفعال في إنتاجية السكر المتعدد الخارجي. كما درس الباحث (2018) Shahzad *et al.* الصفات الكيميائية والفيزيائية للسكريات المتعددة الخارجية لبكتريا الرايزوبيوم وأستنتج بان السكريات المتعددة الخارجية لها دور مميز في اصلاح تركيبة التربة وان وجود مجاميع الكبريتات والفوسفات تساعد في إزالة سمية المعادن الثقيلة. ذكر الباحث (2019) Castellane *et al.* أنّ السكر المتعدد الخارجي المنتج بواسطة بكتريا *Rhizobium spp* يعد منتج مميز للصناعة والبيئة والسكر المتعدد الخارجي الرايزوبي يُعدُّ عاملاً جديدًا يدخل في علاج السرطان.

9-4 الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات البكتريا المرضية:

Antimicrobial activity of rhizobial isolates against isolates of pathogenic bacteria

أُجري اختبار الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا والمعزولة في هذه الدراسة تجاه البكتريا المرضية التي تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل مشخصة ونقية شملت على الأنواع والعزلات الآتية: *Pseudomonas* و *Klebsiella pneumoniae* AS63 و *Staphylococcus aureus* AS38 و *aeruginosa* AS60 و *E. coli* AS37 و *Salmonella typhi* AS43. واختبرت الفعاليّة المضادة المايكروبية وذلك بعمل حفر في الوسط الحاوي على البكتريا باستعمال الثاقب الفليني؛ إذ ظهرت النتيجة من خلال تكوّن هالات شفافة حول هذه الحفر وتم تقدير الفعاليّة المضادة المايكروبية وفق منطقة التثبيط Inhibition zone مقاسة بالملم وكما في الجدول (4-9).

أظهرت نتائج اختبار الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا قيد الدراسة أنّ الراشح الرايزوبي لعزلات الرايزوبيا المختلفة قد تباين في تأثيره تجاه البكتريا المرضية *Klebsiella pneumoniae* العزلة AS63 وقد تباينت معدلات أقطار التثبيط كذلك إذ بلغ أقصى معدل منطقة تثبيط Inhibition zone 15.3 ملم عند تطبيق راشح بكتريا *R. grahamii* العزلة OJ28، في حين بلغ أدنى معدل منطقة تثبيط 7.0 ملم عند تطبيق راشح بكتريا *R. mesosinicum* العزلة OJ32. لم تلاحظ أيّ فعاليّة مضادة مايكروبية من بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلات OJ3 و OJ12 و OJ21 و OJ22 و OJ23 و بكتريا *R. leuguminisarm* bv. *viciae* العزلة OJ9 و بكتريا *Ensifer meliloti* العزلات OJ14 و OJ16 و OJ17 و OJ18 و OJ19 و بكتريا *R. grahamii* العزلتين OJ26 و OJ36 و بكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل العزلة OJ29 و البكتريا المعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا العزلة OJ31 و بكتريا *Mesorhizobium loti* العزلة OJ33 و بكتريا *Neorhizobium huautlense* العزلات OJ37 و OJ39 و OJ41 و OJ42 و بكتريا *R. vignae* العزلة OJ40، تجاه البكتريا المرضية *Klebsiella pneumoniae* AS63 (الصورة 4-3).

الجدول (9-4) الفعالية المضادة للميكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات من البكتريا المرضية على وفق معدل قطر منطقة التثبيط Inhibition zone (مم)

<i>E. coli</i> AS37	<i>P. aeruginosa</i> AS60	<i>S. aureus</i> AS38	<i>S. typhi</i> AS43	<i>K. pneumoniae</i> AS63	رقم العزلة
00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	مجموعة السيطرة السالبة (المحلول الوظيفي)
7.3	0.0	0.0	10.3	10.3	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ1
9.3	7.0	9.3	0.0	10.6	<i>Ensifer meliloti</i> OJ2
7.0	7.6	10.3	0.0	0.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ3
10.3	7.3	0.0	9.6	9.6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
10.0	0.0	0.0	0.0	10.6	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
0.0	11.3	7.0	0.0	10.6	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> OJ6
7.0	11.6	7.3	0.0	8.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
9.6	13.6	9.6	10.3	11.3	<i>R. leguminosarum</i> OJ8
0.0	7.3	11.0	0.0	0.0	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
9.6	11.6	10.0	0.0	9.3	<i>R. japonicum</i> OJ10
14.3	11.3	0.0	11.3	9.0	<i>R. vignae</i> OJ11
0.0	9.3	10.3	0.0	0.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ12
12.6	13.6	12.6	11.0	13.6	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ13
0.0	7.3	11.3	0.0	0.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ14
9.0	0.0	10.6	0.0	10.3	<i>Ensifer meliloti</i> OJ15
0.0	11.3	0.0	0.0	0.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
7.0	9.0	0.0	0.0	0.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ17
0.0	0.0	9.6	0.0	0.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ18
8.0	7.3	9.0	0.0	0.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ19
0.0	10.3	9.3	7.0	10.6	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ20
0.0	9.6	9.6	8.0	0.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ21
0.0	0.0	11.0	0.0	0.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ22
0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
0.0	0.0	7.0	7.0	8.6	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ24
11.0	7.3	11.0	0.0	9.6	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ25
0.0	10.0	10.3	0.0	0.0	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ26
12.0	7.0	12.3	0.0	11.0	OJ27
11.3	9.6	11.3	0.0	15.3	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ28
0.0	11.0	10.0	0.0	0.0	OJ29
8.3	7.3	0.0	0.0	9.6	OJ30
0.0	0.0	10.3	0.0	0.0	OJ31
0.0	10.3	0.0	9.0	7.0	<i>Rhizobium mesosinicum</i> OJ32
0.0	0.0	0.0	7.0	0.0	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ33
0.0	0.0	11.3	0.0	10.6	<i>R. mesosinicum</i> OJ34
8.3	10.3	12.3	0.0	7.3	<i>R. grahamii</i> OJ35
7.3	9.6	0.0	0.0	0.0	<i>R. grahamii</i> OJ36
0.0	0.0	9.3	0.0	0.0	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ37
11.0	0.0	8.6	0.0	10.3	<i>R. japonicum</i> OJ38
7.3	0.0	9.6	0.0	0.0	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ39
13.3	0.0	12.3	10.3	0.0	<i>R. vignae</i> OJ40
8.0	0.0	10.3	0.0	0.0	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ41
9.6	0.0	10.3	10.6	0.0	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ42

عند تطبيق راشح مزرعة التخمر لعزلات الرايزوبيا تجاه البكتريا المرضية *Salmonella typhi* AS43 أظهرت النتائج تباينا في معدلات أقطار التثبيط؛ إذ بلغ أقصاه 11.3 ملم وذلك عند تطبيق راشح بكتريا *R. vignae* العزلة OJ11، في حين بلغ اقل معدل قطر تثبيط 7.0 ملم عند تطبيق راشح بكتريا *Mesorhizobium loti* العزلة OJ33 وبكتريا *R. grahamii* العزلة OJ24 وبكتريا الـ *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ20، في حين لم يلاحظ لعزلات رايزوبية أخرى أية فعالية مضادة تجاه البكتريا المرضية *Salmonella typhi* العزلة AS43 (الصورة 4-4).

عند تطبيق رواشح مزارع التخمر لعزلات الرايزوبيا تجاه البكتريا المرضية *Staphylococcus aureus* العزلة AS38 فإن أفضل معدل منطقة تثبيط حصلنا عليه بلغ قطره 12.6 ملم وذلك عند تطبيق راشح بكتريا الـ *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ13، تلتها العزلة OJ27 بمعدل منطقة تثبيط بلغ 12.3 ملم، في حين أدناها بلغ 7.0 ملم وذلك عند تطبيق راشح بكتريا الـ *R. grahamii* العزلة OJ24. تباينت بقية العزلات في فعاليتها المضادة تجاه هذه العزلة المرضية، في حين لم يسجل لبعض العزلات أية فعالية مضادة مايكروبية تجاه البكتريا المرضية *Staphylococcus aureus* العزلة AS38 (الجدول 4-8؛ الصورة 4-5).

أفضل معدل منطقة تثبيط بلغ 13.6 ملم عند تطبيق راشح مزرعة التخمر لبكتريا *R. leuguminisarm* العزلة OJ8 وبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ13 تجاه البكتريا المرضية *Pseudomonas aeruginosa* العزلة AS60 تلاهما راشح بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ7 بمعدل قطر منطقة تثبيط بلغ 11.6 ملم. أمّا أدنى معدل قطر تثبيط حصلنا عليه فقد بلغ 7.0 ملم عند تطبيق راشح بكتريا *Ensifer meliloti* العزلتين OJ2 و OJ27. تباينت بقية العزلات في تأثيرها تجاه البكتريا المرضية *Pseudomonas aeruginosa* العزلة AS60، في حين لم تُظهر عزلات أخرى تأثيراً على نمو هذه العزلة المرضية (الجدول 4-8؛ الصورة 4-6).

أظهرت العديد من عزلات الرايزوبيا قيد الدراسة فعالية مضادة مايكروبية تجاه البكتريا المرضية *E. coli* العزلة AS37؛ إذ بلغ اقصى معدل قطر تثبيط 14.3 ملم وذلك عند تطبيق راشح بكتريا *R. vignae* العزلة OJ11، تلاها راشح مزرعة البكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ13 إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 12.6 ملم. بينما أقل تأثير تثبيطي بلغ 7.0 ملم عند تطبيق راشح بكتريا *Ensifer meliloti* العزلة OJ17. كذلك تباينت بقية عزلات

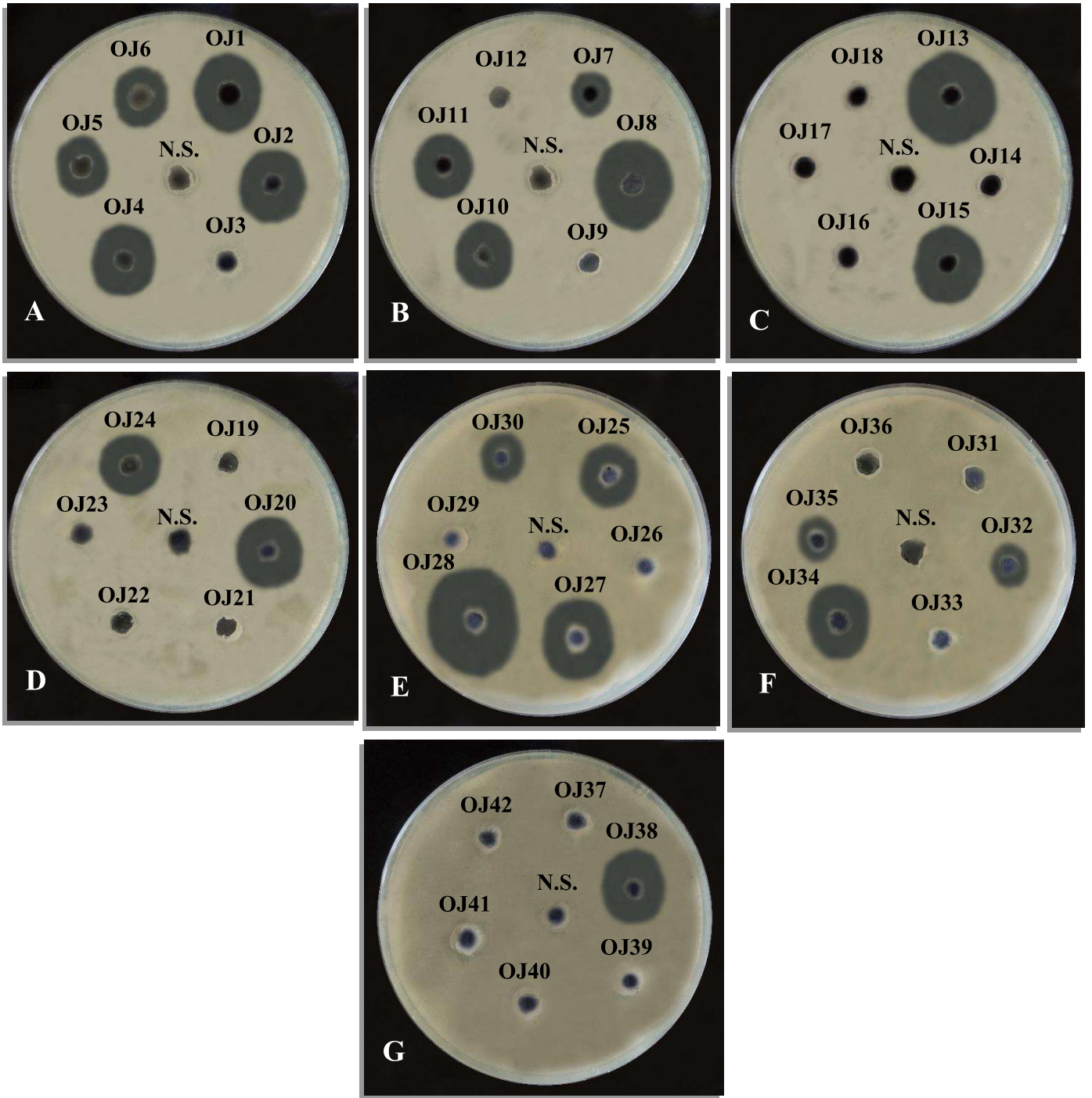
الرايزوبيا المدروسة في تأثيرها التثبيطي تجاه البكتريا المرضية *E. coli* العزلة AS37، فيما لم يلاحظ أي تأثير تثبيطي لعزلات رايزوبية أخرى (الجدول 4-8 ؛ الصورة 4-7).

تفوقت نتائج هذه الدراسة على نتائج الباحث (Kuznetsova et al. (2020) عند دراسته للفعالية المضادة المايكروبية لبكتريا الـ *Rhizobium legumiosarum* تجاه كل من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* وبكتريا الايشيريشية القولونية *E. coli* إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 1.8 و 3.0 ملم على التوالي. في حين تباينت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث سليمان، (2021) إذ لم يلاحظ الباحث أي فعالية مضادة لراشح مزارع عزلات الرايزوبيا تجاه هذه البكتريا المرضية، بينما أظهرت نتائج هذه الدراسة أن أغلب عزلات الرايزوبيا لها تأثير تثبيطي تجاه البكتريا المرضية *Staphylococcus aureus*.

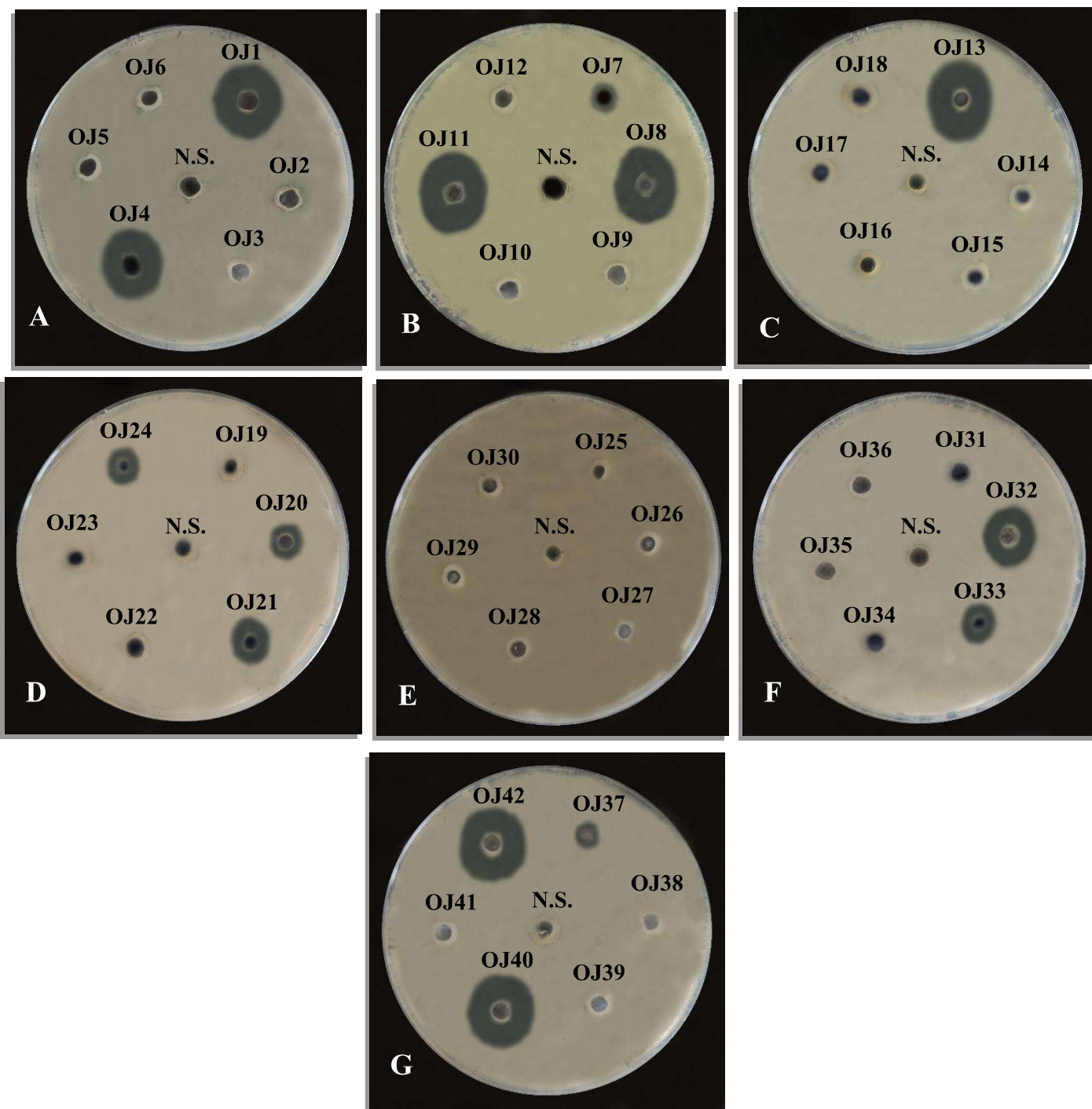
توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث الـ جوجانة، (2018) من إذ ان راشح مزرعة التخمر لأغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة كان له تأثير تثبيطي تجاه البكتريا المرضية الايشيريشية القولونية *E. coli*. كما تفوقت نتائج هذه الدراسة على نتائج الباحث (Kuznetsova et al. (2020) عند دراسته للفعالية المضادة المايكروبية لبكتريا الـ *Rhizobium legumiosarum* تجاه بكتريا الايشيريشية القولونية *E. coli* إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 3.0 ملم. كما أظهرت نتائج دراسة سابقة ان للبكتريا *Rhizobium Radiobacter* فعالية مضادة مايكروبية تجاه بكتريا الـ *E. coli* إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 9.0 ملم (Rozi et al., 2018).

تفوقت عزلات الرايزوبيا قيد الدراسة على بكتريا *R. leuguminisarm* bv. *trifoli* العزلة IARI والعزلة Rel-1 المدروسة من الباحث (Joseph et al. (1983) إذ درس إنتاج المواد ذات الفعالية المضادة للمايكروبات والمواد الشبيهة بالبكتريوسين؛ إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 6.0 ملم تجاه البكتريا المرضية *Salmonella typhi* A, B.

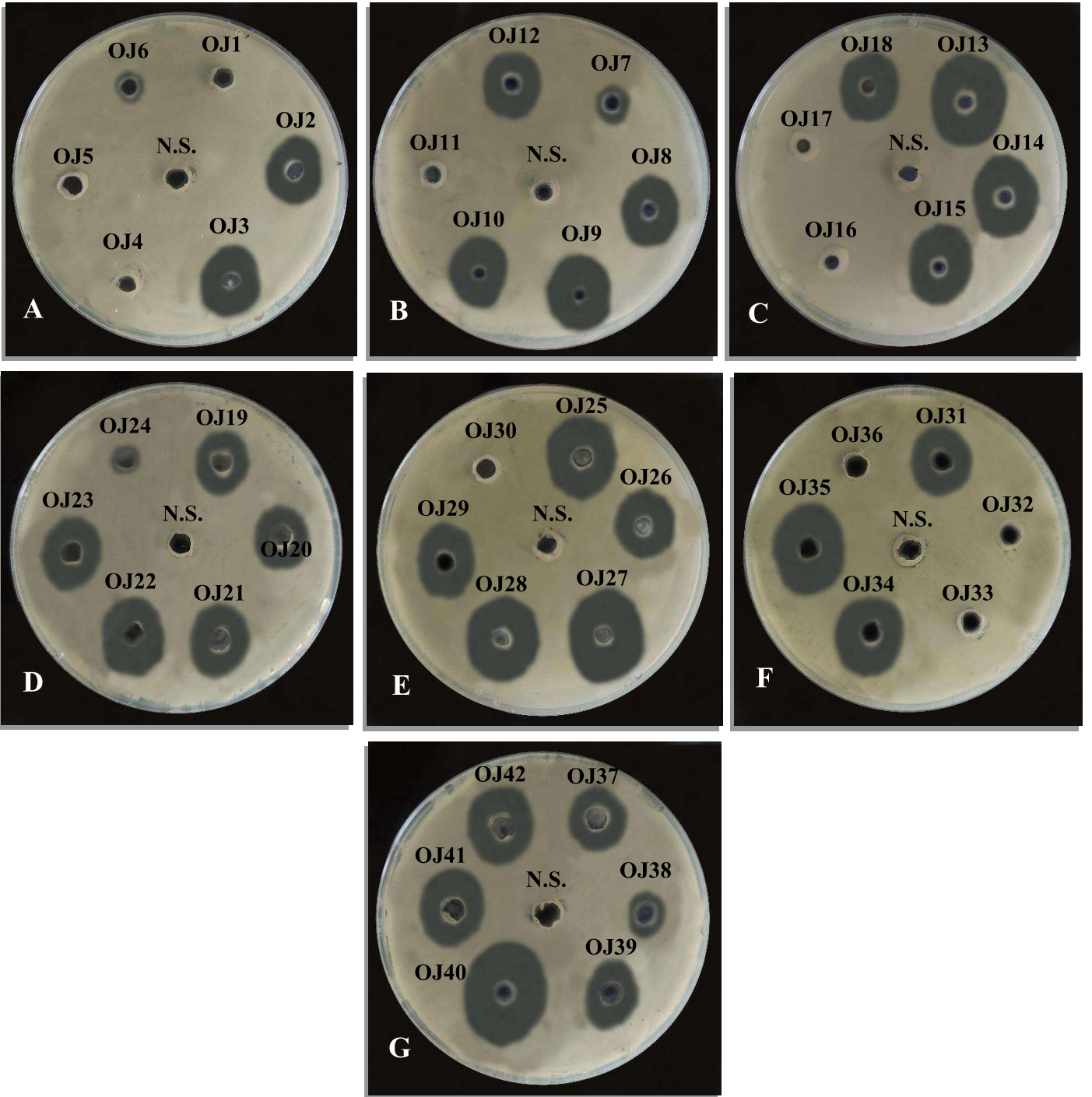
اختلفت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الباحث الـ جوجانة (2018) وسليمان (2021) إذ ان نتائج الباحثين كانت سلبية تجاه البكتريا المرضية *Pseudomonas aeruginosa*، في حين أظهرت العديد من عزلات الرايزوبيا المدروسة فعالية مضادة تجاه هذه البكتريا المرضية. تباينت نتائج هذه الدراسة مع دراسة الباحث سليمان، (2021) فيما يخص تأثير راشح مزارع التخمر لعزلات الرايزوبيا تجاه البكتريا المرضية *Klebsiella pneumoniae* AS63 إذ إن نصف عدد عزلات هذه الدراسة كان له تأثير تثبيطي تجاه هذه البكتريا المرضية.



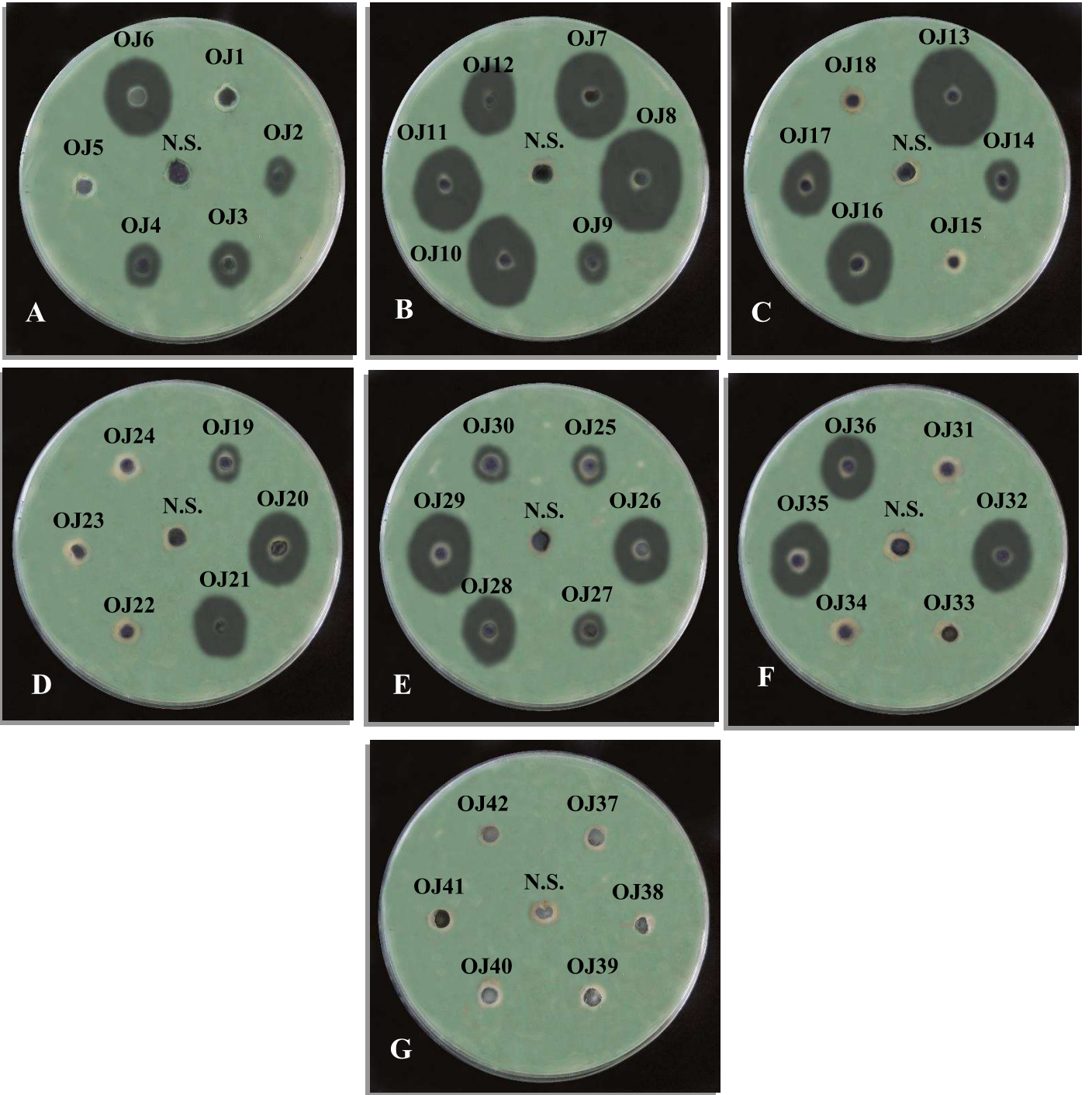
الصورة (3-4) الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه البكتريا المرضية *K. pneumoniae* العزلة AS63 تظهر أعلى فعالية مضادة مايكروبية عند تطبيق الراشح الخام لعزلة الرايزوبيا *Rhizobium grahamii* OJ28، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 15.3 ملم.



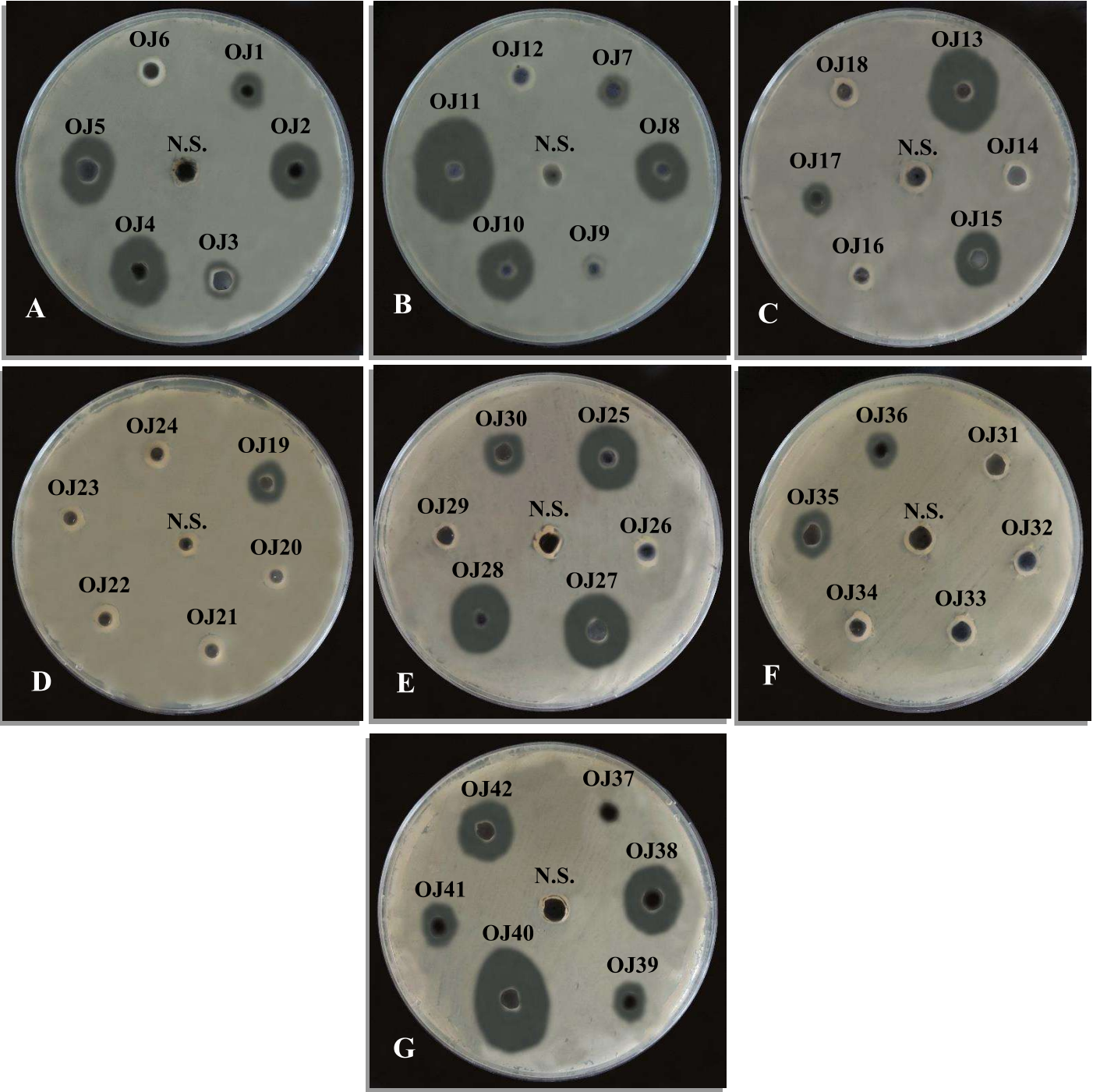
الصورة (4-4) الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه البكتريا المرضية *S. typhi* العزلة AS43 تظهر أعلى فعاليّة مضادة مايكروبية عند تطبيق راسح مزرعة الرايزوبيا *Rhizobium vignae* OJ11، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 11.3 ملم.



الصورة (4-5) الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه البكتريا المرضية العزلة *S. aureus* AS38 تظهر أعلى فعالية مضادة مايكروبية عند تطبيق راشح مزرعة عزلة الرايزوبيا *Ensifer fredii* bv. *fredii* OJ13، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 12.6 ملم.



الصورة (4-6) الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه البكتريا المرضية *P. aeruginosa* العزلة AS60 تظهر أعلى فعالية مضادة مايكروبية عند تطبيق راشح مزرعة عزلة الرايزوبيا *Ensifer fredii* bv. *fredii* OJ13، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 13.3 ملم.



الصورة (4-7) الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه البكتريا المرضية *E. coli* العزلة AS37 تظهر أعلى فعاليّة مضادة مايكروبية عند تطبيق راشح مزرعة عزلة الرايزوبيا *R. vignae* OJ11، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 14.3 ملم.

10-4 الفعاليّة المضادة الميكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات الفطريات المرضية:

Antimicrobial activity of rhizobial isolates against isolates of pathogenic fungi

أُجري اختبار الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات الفطريات المرضية التي تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة الموصل مشخصة ونقية شملت على الأنواع الآتية: *Candida albicans* AS65 و *Aspergillus niger* BI1 و *Fusarium solani* BI2 و *Penicillium spp.* BI3 واختبرت الفعاليّة المضادة وذلك بعمل حفر في الوسط الحاوي على الفطريات باستعمال الثاقب الفليني إذ تم تقدير أقطار الهالات الشفافة حول هذه الحفر.

يُظهر الجدول 10-4 نتائج اختبار الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا قيد الدراسة أنّ الراشح الرايزوبي للعديد من عزلات الرايزوبيا كان له تأثير تثبيطي تجاه خميرة المبيضات المرضية *Candida albicans* العزلة AS65، وقد بلغ أقصى معدل منطقة تثبيط 16.6 ملم عند تطبيق راشح العزلة OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا *Parkinsonia aculeatae* L. وتلاه معدل منطقة تثبيط بلغ 14.6 ملم عند تطبيق راشح العزلة OJ30 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا *Catalpa speciose* L. في حين أقل معدل قطر منطقة تثبيط بلغ 7.0 كان من قبل بكتريا *Mesorhizobium loti* العزلة OJ5. وقد تباينت عزلات الرايزوبيا الأخرى في قدرتها التثبيطية تجاه خميرة المبيضات المرضية *Candida albicans* العزلة AS65. فيما لم تُظهر بعض العزلات أي تأثير تثبيطي (الصورة 4-8).

كما أظهرت نتائج هذه الدراسة تبايناً في معدلات أقطار التثبيط تجاه الفطر المرضي تخمير البكتريا *Aspergillus niger* العزلة BI1 إذ بلغ أقصاه 13.3 ملم عند تطبيق راشح مزرعة تخمير البكتريا *R. leuginisarm* bv. *phaseoli* العزلة OJ6. تلاها راشح البكتريا *R. vaginae* العزلة OJ11 إذ بلغ 11.3 ملم. في حين أنّ أدنى معدل منطقة تثبيط سجل عند تطبيق راشح مزرعة تخمير البكتريا *R. leguminosarum* bv. *viciae* العزلة OJ4 وبكتريا *E. meliloti* العزلة OJ15 إذ بلغ 7.0 ملم. وتباينت بقية العزلات في مدى تأثيرها التثبيطي بينما لم تُظهر بعض العزلات تأثير مضاد مايكروبي (الجدول 10-4 ؛ الصورة 4-9).

الجدول (10-4) الفعالية المضادة للميكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه عزلات من الفطريات المرضية على وفق معدل قطر منطقة التثبيط Inhibition zone (مم)

<i>Penicillium</i> spp. BI3	<i>F. solani</i> BI2	<i>A. niger</i> BI1	<i>Candida albicans</i> AS65	رقم العزلة
00.0	00.0	00.0	00.0	مجموعة السيطرة السالبة (المحلول الوظيفي)
11.6	9.3	11.0	11.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ1
0.0	0.0	0.0	9.3	<i>Ensifer meliloti</i> OJ2
9.6	7.3	0.0	11.3	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ3
10.0	10.6	7.0	0.0	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ4
8.3	0.0	0.0	7.0	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ5
0.0	0.0	13.3	8.0	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> OJ6
8.0	7.6	10.3	10.3	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ7
7.6	11.3	9.6	11.3	<i>R. leguminosarum</i> OJ8
9.6	0.0	0.0	7.3	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> OJ9
10.0	0.0	0.0	0.0	<i>R. japonicum</i> OJ10
9.3	0.0	11.3	0.0	<i>R. vignae</i> OJ11
8.0	7.0	0.0	0.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ12
8.6	13.6	10.6	14.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ13
7.6	7.0	7.3	0.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ14
8.3	7.3	7.0	10.6	<i>Ensifer meliloti</i> OJ15
0.0	8.3	0.0	8.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ16
7.3	11.3	0.0	11.3	<i>Ensifer meliloti</i> OJ17
9.0	7.3	9.0	0.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ18
7.0	0.0	0.0	0.0	<i>Ensifer meliloti</i> OJ19
9.3	9.6	0.0	0.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ20
9.0	7.3	8.3	0.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ21
7.6	0.0	0.0	11.0	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ22
7.3	0.0	7.6	11.6	<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>fredii</i> OJ23
7.3	11.0	8.0	0.0	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ24
7.0	0.0	8.3	0.0	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ25
8.6	0.0	0.0	11.6	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ26
0.0	0.0	0.0	0.0	OJ27
9.0	0.0	10.3	11.6	<i>Rhizobium grahamii</i> OJ28
0.0	7.0	9.6	12.3	OJ29
7.0	7.0	11.0	14.6	OJ30
12.6	7.3	10.0	16.6	OJ31
10.0	10.6	0.0	0.0	<i>Rhizobium mesosinicum</i> OJ32
7.6	0.0	7.3	0.0	<i>Mesorhizobium loti</i> OJ33
0.0	7.6	10.0	7.3	<i>R. mesosinicum</i> OJ34
8.3	11.0	0.0	8.3	<i>R. grahamii</i> OJ35
7.6	9.6	0.0	0.0	<i>R. grahamii</i> OJ36
7.3	0.0	8.6	7.3	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ37
10.3	0.0	8.3	11.6	<i>R. japonicum</i> OJ38
0.0	12.0	7.3	0.0	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ39
0.0	10.6	9.6	12.3	<i>R. vignae</i> OJ40
0.0	0.0	10.3	11.6	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ41
0.0	10.3	11.3	11.0	<i>Neorhizobium huautlense</i> OJ42

إنّ راسح مزرعة التخمير للعديد من عزلات بكتريا الرايزوبيا كان له تأثير تثبيطي تجاه الفطر المرضي *Fusarium solani* العزلة BI2، إذ تباينت معدلات أقطار التثبيط من أعلى قيمة 13.6 ملم عند تطبيق راسح مزرعة البكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة OJ13 إلى أقل قيمة 7.0 ملم عند تطبيق راسح مزرعة العزلة OJ29 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpuria* L. والعزلة OJ30 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا وبكتريا *Ensifer meliloti* العزلة OJ14. في حين تباينت بقية العزلات في قدرتها التثبيطية، بينما لم تبد بعض العزلات أي تأثير تثبيطي تجاه الفطر المرضي *Fusarium solani* العزلة BI2 (الجدول 4-10؛ الصورة 4-10).

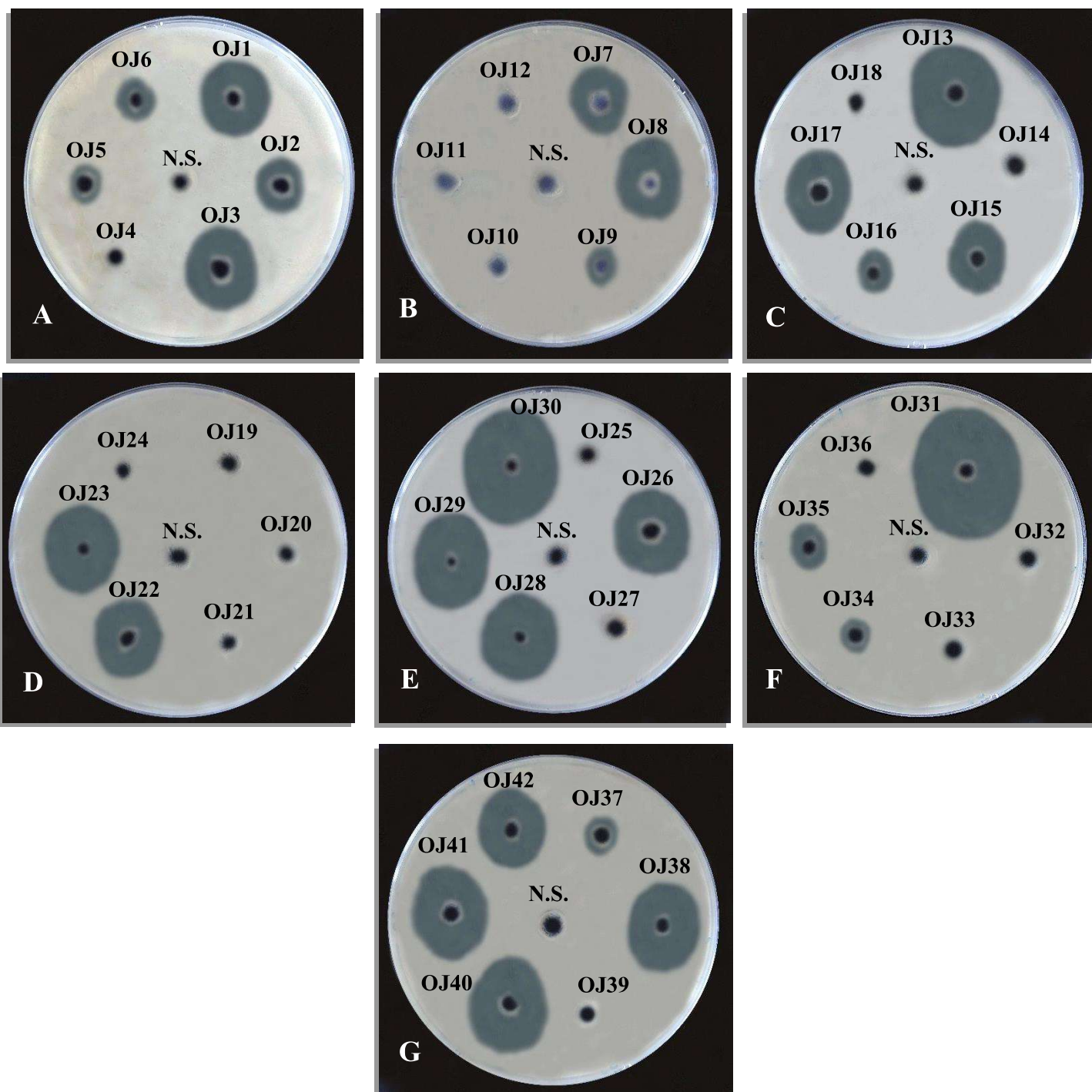
أظهرت نتائج هذه الدراسة تباينا في معدلات أقطار التثبيط إذ بلغ أقصى حد 12.6 ملم عند تطبيق راسح مزرعة التخمير للعزلة OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا *Parkinsonia aculeatae* L. تجاه الفطر المرضي *Penicillium* Spp. العزلة BI3 في حين بلغ أدنى حد 7.0 ملم عند تطبيق راسح مزرعة بكتريا *Ensifer meliloti* العزلة OJ19 وبكتريا *N. huaultense* العزلة OJ25 والعزلة OJ30 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا. كذلك تباينت بقية العزلات في قدرتها التثبيطية، ولم يلاحظ أية قابلية تثبيطية لبعض رواسح عزلات الرايزوبيا المعزولة تجاه الفطر المرضي *Penicillium* spp. العزلة BI3 (الصورة 4-11).

توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث سليمان، (2021) إذ أظهر راسح مزارع التخمير لأغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة تأثير تثبيطي تجاه خميرة المبيضات البيضاء *Candida albicans* العزلة AS65 تفوقت نتائج بعض عزلات هذه الدراسة على نتائج الباحث (2015) *Rasulov et al.* إذ درس الفعاليّة المضادة المايكروبية لبكتريا الرايزوبيا *Bradyrhizobium japonicum* 36 تجاه خميرة *Candida albicans* العزلة ATCC10231 وتوصل إلى أنّ لعزلات الرايزوبيا تأثير مثبط تجاه هذه الخميرة إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 8 ملم. توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة الباحث (2019) *Sowmya et al.* إذ أظهرت نتائج الباحث أنّ لراسح مزرعة التخمير لبكتريا ال *Rhizobium* spp. تأثيرًا تثبيطيًا تجاه الخميرة *Candida albicans* إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 11 ملم، كما أظهرت نتائج دراسات سابقة أنّ للبكتريا *Rhizobium Radiobacter* فعاليّة مضادة مايكروبية تجاه *Candida albicans* إذ بلغ قطر منطقة التثبيط 8 ملم (2018) *(Rozi et al.)*.

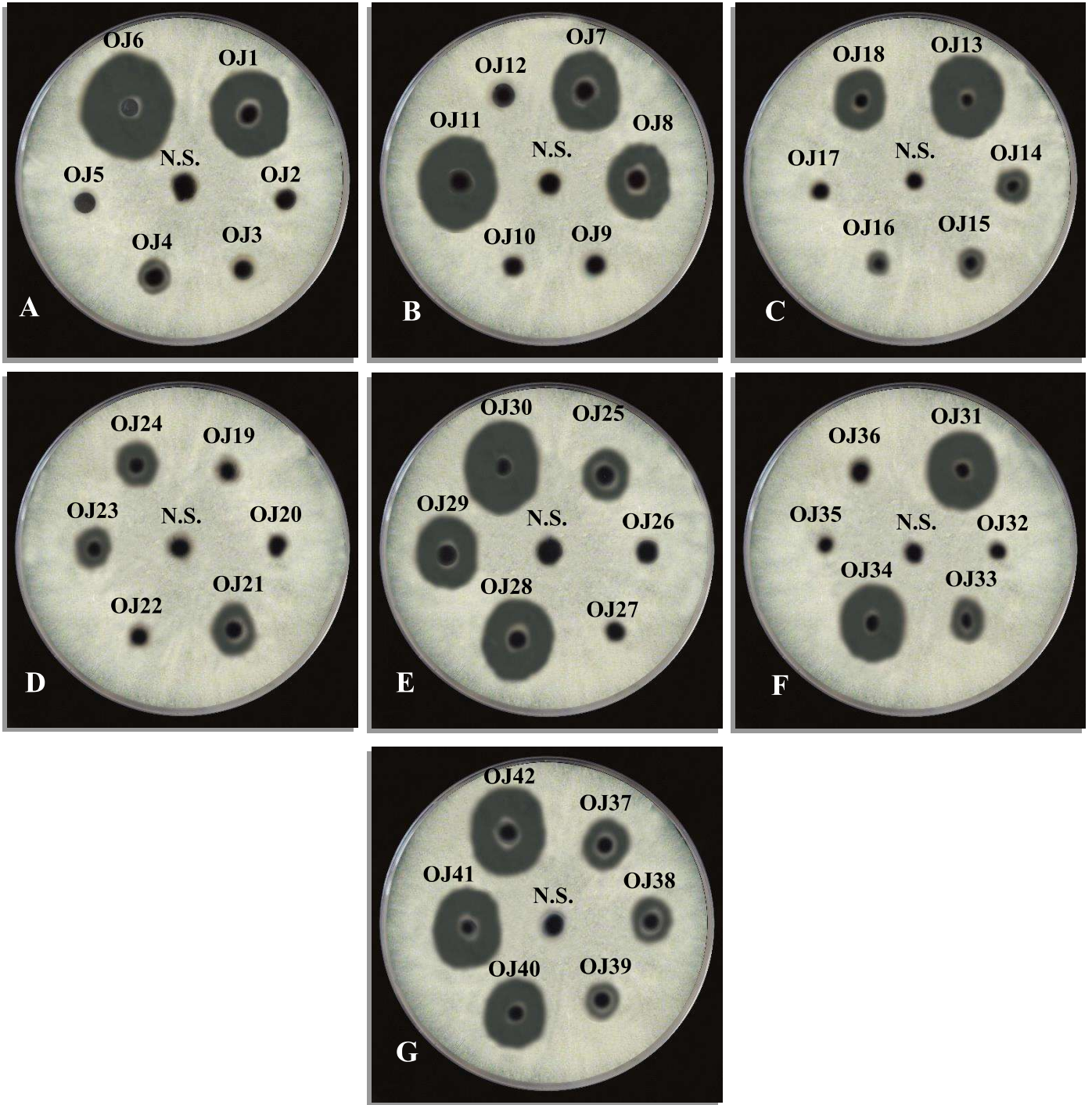
توافقت نتائج هذه الدراسة على نتائج الباحث (Sowmya et al. (2019، إذ قام الباحث بدراسة الفعالية المضادة المايكروبية لبكتريا الـ *Rhizobium spp.* تجاه الفطر *Aspergillus niger* وتوصل إلى أنّ لراشح مزرعة التخمر لبكتريا الـ *Rhizobium spp.* تأثير تثبيطي تجاه هذا الفطر؛ إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 6.5 ملم.

تقاربت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث (AL-Ani et al. (2012 إذ درس الباحث استعمال بكتريا الـ *Rhizobium japonicum* كعامل سيطرة حيوي تجاه مرض تعفن جذور نبات فول الصويا *Glycine max* الذي يسببه الفطر *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* وتوصل إلى أنّ هناك فعالية مضادة مايكروبية تجاه هذه الفطريات إذ بلغت نسبة التثبيط 65.58%، و64.04% على التوالي. وقد ذكر الباحث أنّ آلية الفعالية المضادة لبكتريا الرايزوبيا تجاه الفطر *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* قد تكون ناتجة من تجمع بكتريا الرايزوبيا في منطقة المجموعة الجذرية للنبات مستغلة إفرازات جذور النبات للنمو وتصنيع المؤيضات التي تحمي جذور النبات من الممرضات النباتية من خلال التضاد الحيوي فضلاً عن تحليل وتحطيم المركبات المفردة من الفطريات الممرضة وتؤدي إلى تثبيط انبات السبورات الفطرية الممرضة وكذلك تحفيز اليات الدفاعات النباتية.

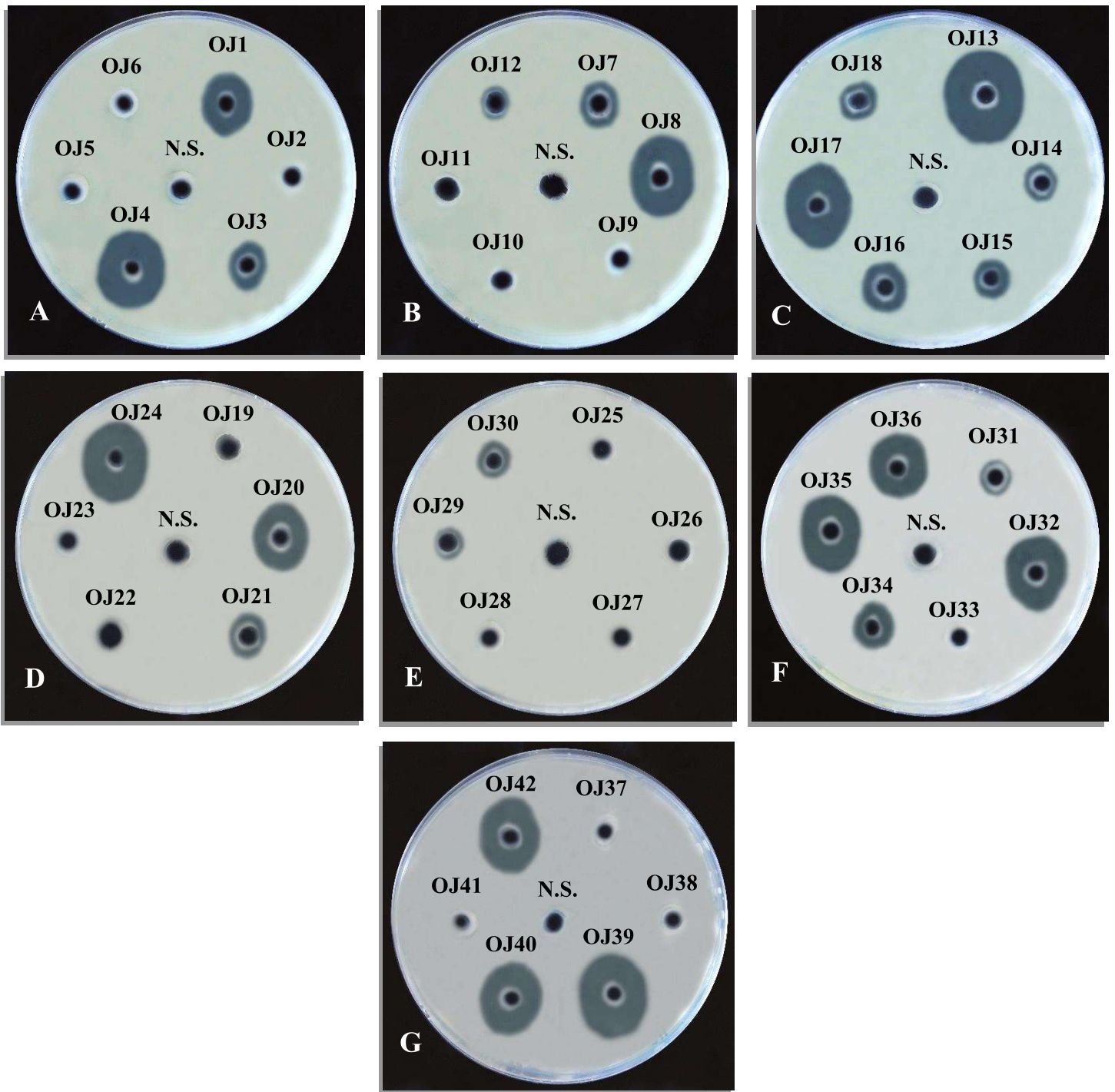
درس الباحث (Nandi et al. (2019 الفعالية المضادة المايكروبية لبكتريا الـ *Rhizobium japonicum* و *Bradyrhizobium japonicum* تجاه ممرضات نباتية فطرية إذ أظهرت نتائج الدراسة ان هنالك فعالية مضادة مايكروبية لبكتريا الرايزوبيا تجاه كل من الفطر *Aspergillus niger* و *Fusarium oxysporum* إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 8.3 ملم و 7.4 ملم على التوالي وذلك عند تطبيق راشح بكتريا *Rhizobium japonicum*. أمّا عند تطبيق راشح مزرعة التخمر لبكتريا *Bradyrhizobium japonicum* فقد بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 9.2 ملم و 7.6 ملم على التوالي، وعدّ الباحث أنّ هذه النتائج دلالة على أنّ بكتريا الـ *Rhizobium japonicum* و *Bradyrhizobium japonicum* تُعدّ بمثابة عوامل سيطرة بايولوجية، كما أوصى الباحث بإجراء دراسات معمقة في مجال الهندسة الوراثية من أجل ادخال الجينات المشفرة لتصنيع مؤيضات الفعالية المضادة للبكتريا والفطريات إلى عزلات الرايزوبيا المنتخبة من أجل استعمالها كعوامل سيطرة بايولوجية.



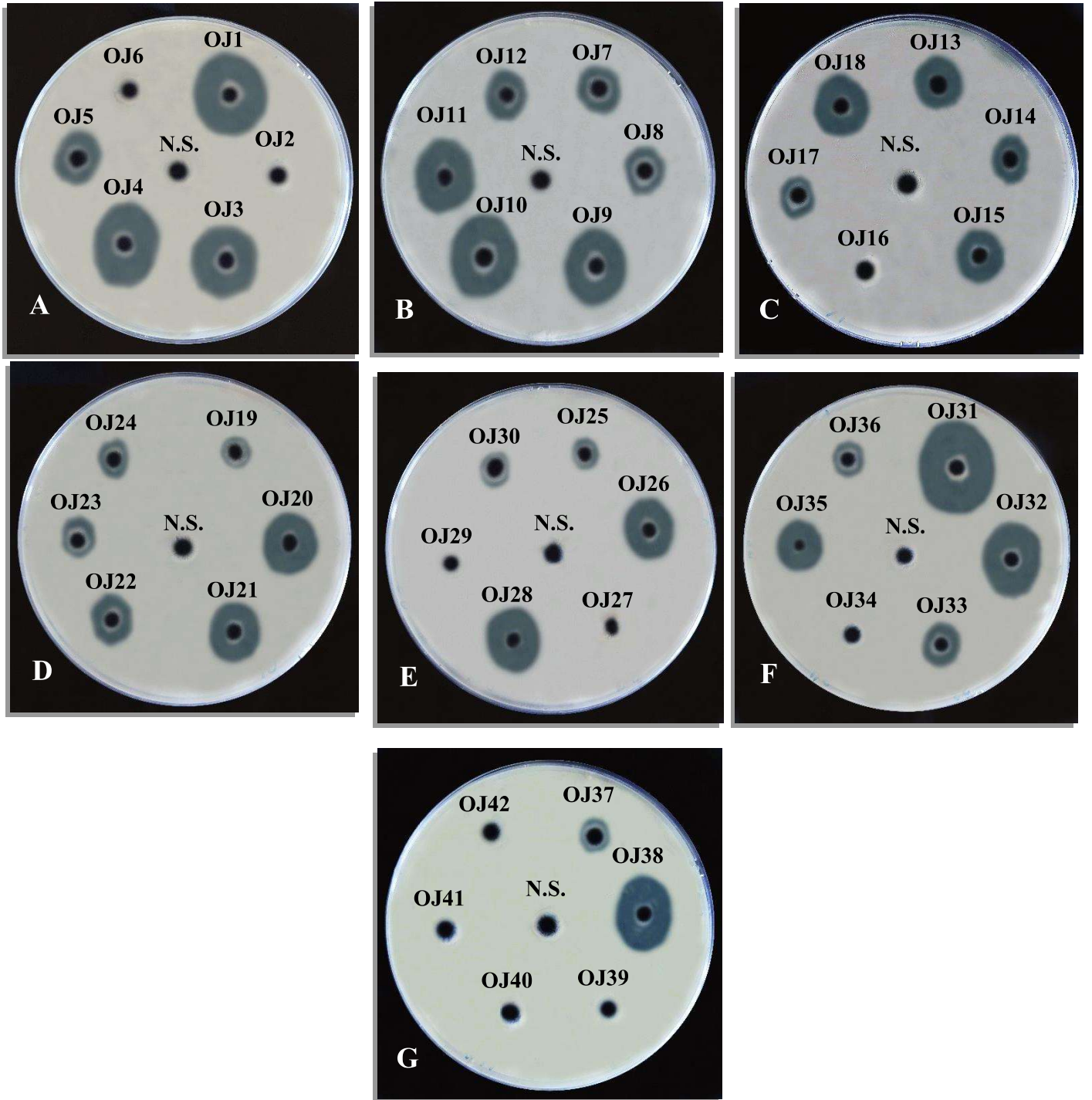
الصورة (4-8) الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة في هذه الدراسة تجاه عذلة خميرة المبيضات *C. albicans* AS65 تظهر أعلى فعاليّة مضادة مايكروبية عند تطبيق الراشح الخام لعزلة الرايزوبيا OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 16.6 ملم.



الصورة (4-9) الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة الممرضة للنبات *A. niger* B11 تظهر أعلى فعاليّة مضادة مايكروبية عند تطبيق راشح مزرعة عزلة الرايزوبيا *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* OJ6 ، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 13.3 ملم.



الصورة (4-10) الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة الممرضة للنبات *Ensifer fredii* bv. *fredii* تظهر أعلى فعاليّة مضادة مايكروبية عند تطبيق راشح مزرعة لعزلة الرايزوبيا *Ensifer fredii* bv. *fredii* OJ13 ، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 13.6 ملم.



الصورة (4-11) الفعاليّة المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه العزلة الممرضة للنبات *Penicillium spp. BI3* تظهر أعلى فعاليّة مضادة مايكروبية عند تطبيق راشح مزرعة عزلة الرايزوبيا OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 12.6 ملم.

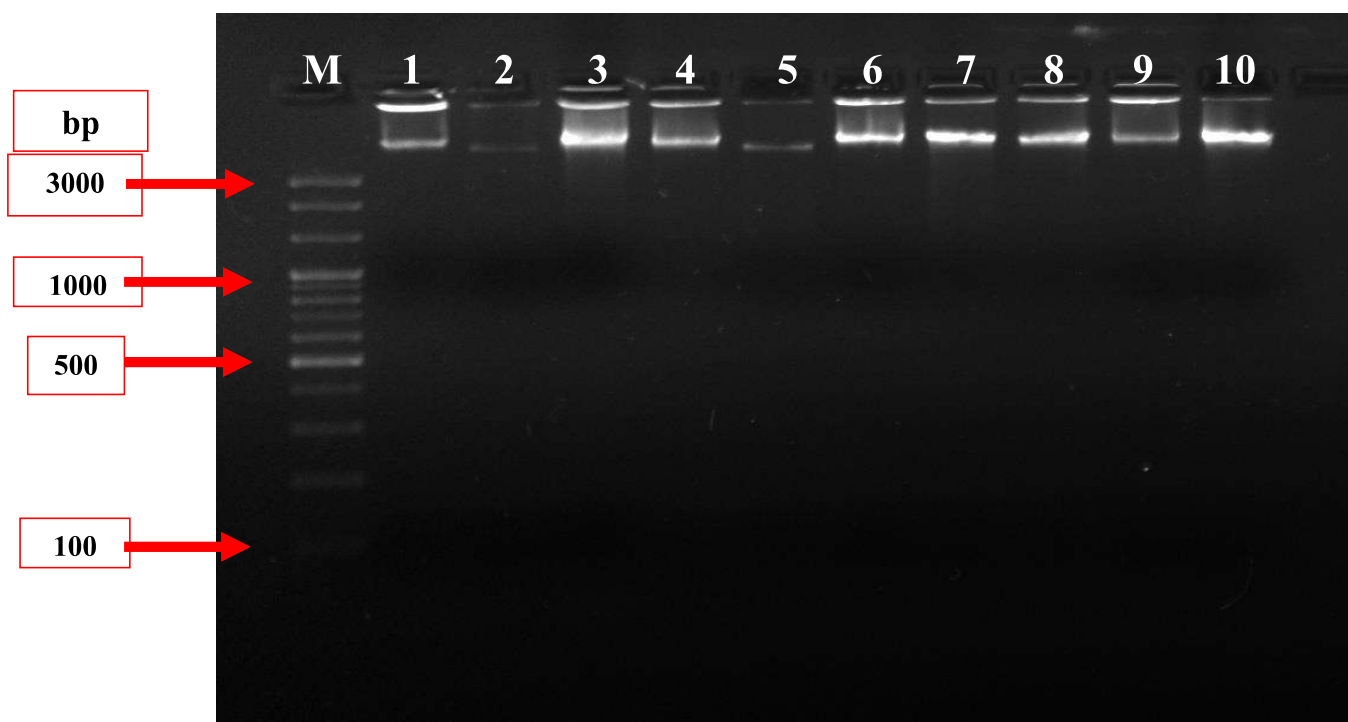
11-4 استخراج وتوصيف الحامض النووي الديوكسي رايبوزي (DNA) الجينومي من عزلات

الرايزوبيا المنتخبة قيد الدراسة باستعمال الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز:

Extraction and characterization of genomic DNA from selected rhizobial isolates under study using electrophoresis in agarose gel

بيّنت نتائج الترحيل الكهربائي الشكل 1-4 لعزلات الرايزوبيوم المنتخبة وكما يأتي:

و *R. vignae* OJ11, OJ40 و *R. japonicum* OJ10 و *R. leguminosarum* OJ8
Neorhizobium huautlense OJ25 وبكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات خف
الجمال العزلة OJ29 و *Rhizobium grahamii* OJ28 وبكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد
الجذرية لنبات الكاتالبا العزلة OJ30 وبكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا
العزلة OJ31 و *R. mesosinicum* OJ32 وجود حزم الـ DNA الجينومي بأحجام كبيرة
ومتساوية تقدر بأكثر من 3000 زوج قاعدي إذ قطعت مسافة قصيرة وتمثل الحامض النووي
الديوكسي رايبوزي الجينومي والمستخلص بشكل نقي من عزلات الرايزوبيا المنتخبة التي تم ذكرها
آنفاً.



الشكل (1-4) الترحيل الكهربائي لمحتوى الحامض النووي الذي اوكسي رايبوزي (DNA) الجينومي في هلام الأكاروز
بتركيز 1.0% لعشرة عزلات رايزوبيا منتخبة قيد الدراسة، والأعمدة الأتي:

M: المقياس الحجمي (Reference marker)

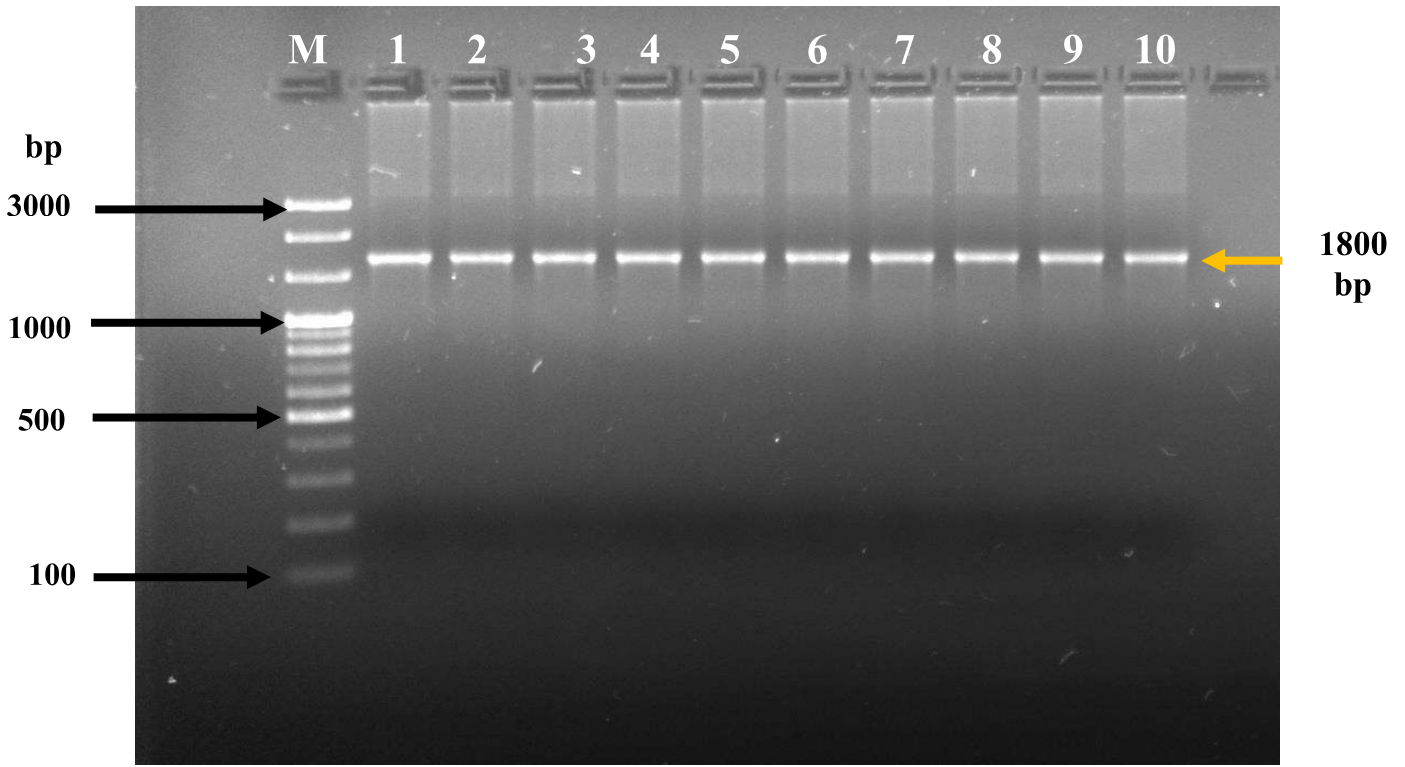
1. *Neorhizobium huautlense* OJ25 .4 *R. vignae* OJ11 .3 *R. japonicum* OJ10 .2 *R. leguminosarum* OJ8 .1
5. OJ29 .6 *Rhizobium grahamii* OJ28 .7 OJ30 .8 OJ31 .9 *R. mesosinicum* OJ32 .10 *R. vignae* OJ40

توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الباحث سليمان (2021)، إذ بينت نتائجه وجود حزم DNA بأحجام متساوية وكبيرة نتيجة قربها من حفر هلام الأكاروز بدلالة ازاحتها لمسافات قصيرة عن الحفر المحقونة فيها وتمثل هذه الحزم الـ DNA الجينومي لعزلات بكتريا الرايزوبيا المحلية والمعزولة من العقد الجذرية لنباتات بقولية مختلفة.

12-4 تقانة التفاعل التضاعفي المتخصص للمورث 16S rRNA:

Specific PCR technique of 16S rRNA gene

أجريت تقانة التفاعل التضاعفي المتخصص لعينات الـ DNA الجينومي النقية والمستخلصة من عشر عزلات من بكتريا الرايزوبيا قيد الدراسة وكما يأتي: *R. leguminosarum* OJ8 و *R. japonicum* OJ10 و *R. vignae* OJ11, OJ40 و *Neorhizobium huautlense* OJ25 و *Rhizobium grahamii* OJ28 و *Rhizobium* OJ29 العزلة و *Rhizobium* OJ30 و *R. mesosinicum* OJ32 و *R. mesosinicum* OJ31 العزلة و *R. mesosinicum* OJ32 و *Lathyrus sativus* L. وفول الصويا *Glycine max* L. والماش *Vigna radiata* L. والسيببان *Sesbania herbacea* L. وخف الجمل *Bauhinia purpurea* L. والليوسينيا *Leucaena leucocephala* L. والكاتالبا *Catalpa speciosa* L. والباركنسونيا *Parkinsonia aculeata* L. والبيزيا *Albizia odoratissima* L.، على التوالي. إذ أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص باستعمال البادئ المتخصص الأمامي (pA forward) والخلفي (pH Reverse) وبعد ترحيل نواتج التفاعل التضاعفي المتخصص باستعمال هلام الأكاروز وبتركيز 2.0% الشكل 2-4.



الشكل (2-4) ناتج تفاعل البلمرة المتسلسلة PCR باستعمال البادئات المتخصصة لبكتريا الرايزوبيوم. تمثل الأعمدة حزم الـ DNA المتضخمة لعزلات بكتريا الرايزوبيا المنتخبة وكما يأتي:

M: المقياس الحجمي (Reference marker)

1. *R. leguminosarum* OJ8 .2. *R. japonicum* OJ10 .3. *R. vignae* OJ11 .4. *Neorhizobium huautlense* OJ25 .5. *R. mesosinicum* OJ32 .6. *Rhizobium grahamii* OJ28 .7. *Rhizobium grahamii* OJ28 .8. *Rhizobium grahamii* OJ28 .9. *Rhizobium grahamii* OJ28 .10. *Rhizobium grahamii* OJ28

يُوضح الشكل 2-4 وجود حزمة DNA مضخمة يقدر حجمها 1500 bp تقريباً لكل عذلة رايزوبية منتخبة مدروسة التي تم ذكرها آنفاً، تتطابق نتيجة هذه الدراسة مع ما توصل إليه الباحث سليمان، (2021)؛ إذ حصل على حزم DNA متضخمة كبيرة الحجم ومتساوية وسبب ظهور حزم الـ DNA بهذا الحجم نتيجة التفاعل التضاعفي المتسلسل والمتخصص لعينات الحامض النووي الديوكسي رايبوزي الجينومي والمستخلصة من عزلات بكتريا الرايزوبيا المنتخبة المدروسة، وظهور حزم الـ DNA النقية هذه هو نتيجة وجود تسلسلات مشتركة أو متشابهة في تسلسل القواعد النايروجينية الموجودة في البادئات المتخصصة مع القواعد النايروجينية الموجودة في الـ DNA الجينومي لعزلات الرايزوبيا المدروسة ونتيجة لهذا التشابه يتم مطابقة القواعد النايروجينية الموجودة في الـ DNA الجينومي لعزلات الرايزوبيا مع تسلسلات البادئات المتخصصة (pA و pH) المستخدمة في هذه الدراسة وإكمال التفاعل التضاعفي المتخصص وإنتاج حزم الـ DNA ذات أحجام متساوية (Liu et al, 2018).

شخص الباحث Niang et al. (2018) تنوع بكتريا الرايزوبيا Rhizobia والبكتريا المشجعة لنمو النبات Rhizobacteria بتحديد تسلسلات الجين 16S rRNA وباستعمال البادئين الأمامي pA والخلفي pH وتمكن من عزل وتشخيص 59 عذلة بكتيرية تعود لأنماط وراثية

مختلفة. وقد بينت الدراسة ان جنس *Bradyrhizobium* كان بنسبة 14.89%، في حين كان نسبة الجنس *Ensifer* 8.5%. كما تم استعمال ذات البادئات المتخصصة المستخدمة في هذه الدراسة من الباحث (Paudel et al. (2020) وذلك عند عزل السلالة *Bradyrhizobium* LB8 من العقد الجذرية لنبات الفول السوداني إذ نجح الباحث في استعمال هذه البادئات المتخصصة في تحديد تسلسل الجين 16 S rRNA لهذه السلالة.

13-4 تحديد تسلسل القواعد النايروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتسلسل

Detection of nitrogenous bases sequence of specific PCR Products

تم اختيار العزلة OJ27 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. والعزلة OJ30 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا *Catalpa speciosa* L. والعزلة OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا *Parkinsonia aculeata* L. والعزلة OJ32 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الالبيزيا *Albizia odoratissima* L. من أجل تحديد تسلسل القواعد النايروجينية لنواتج تفاعل الـ DNA التضاعفي المتخصص. وسبب اختيار هذه العزلات كونها لأول مرة تعزل من النباتات المضيفة والمزروعة محلياً، أو ان من هذه العزلات لم يثبت اسم الجنس والنوع لها. أمّا بالنسبة للعزلة OJ30 فهذه الدراسة أول مرة (حد علمنا) يتم تسجيل وجود العلاقة التعايشية ما بين بكتريا الرايزوبيوم ونبات الكاتالبا. وكانت نتائج تحديد تسلسلات القواعد النايروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR لعينات الـ DNA النقية وللعزلات الأربعة المنتخبة كما يأتي:

العزلة الأولى: OJ27

```
ACCTAGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATT  
TAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGT  
ATGGAAGAGGTAAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACA  
CCAGTGGCGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC  
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTATAC  
TGTTCCGTTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA  
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGT
```

العزلة الثانية: OJ30

GGAAAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC
TACCAAGGCGACGATCCATAGCTGCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCAAACTCCTACAGGCAGCAGTGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGT
ATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTA
GCGTTGTTGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAA
TCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAG
TGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
G

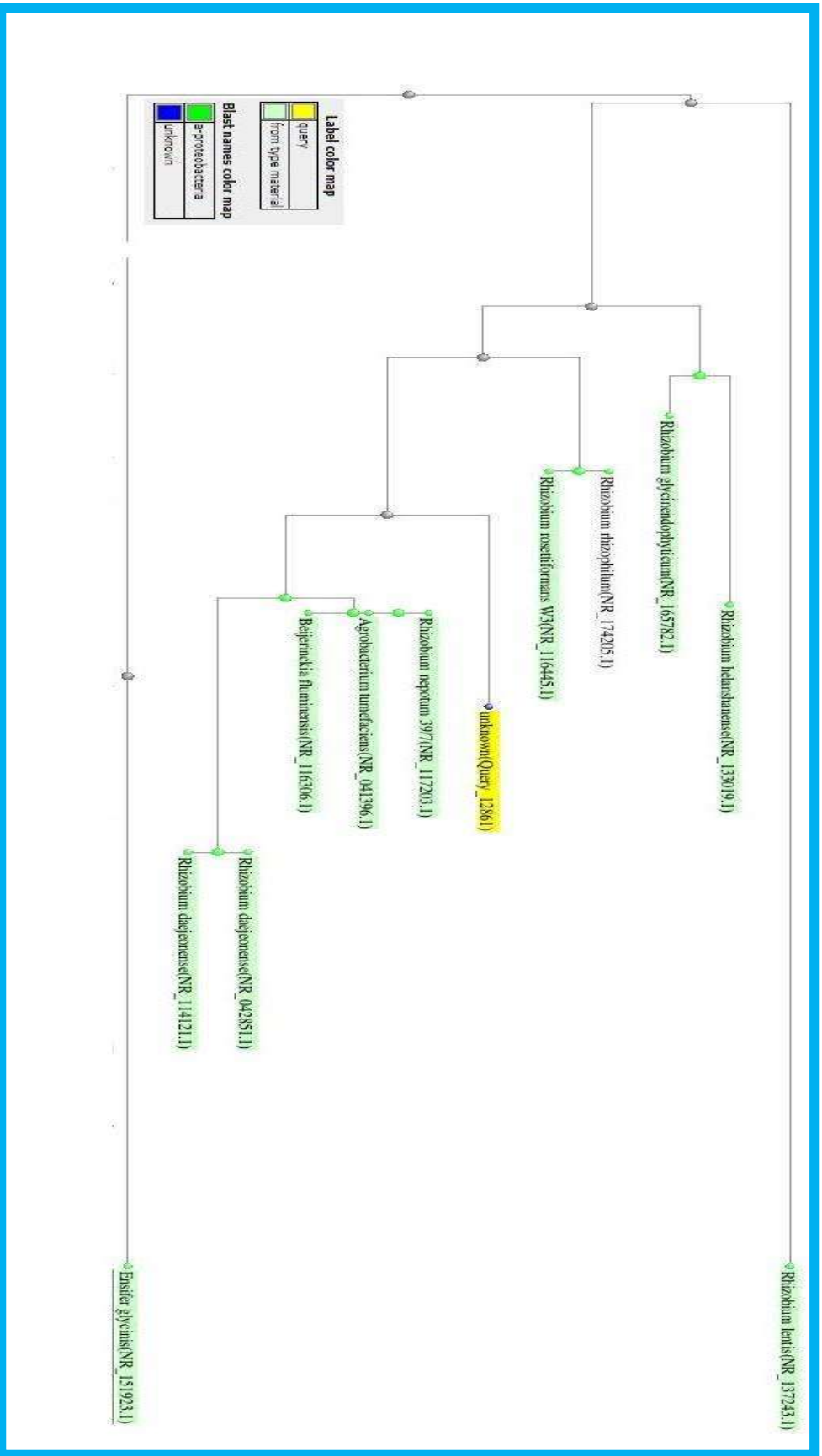
العزلة الثالثة: OJ31

AATAGCTCCGGGAAACTGGAATTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGATTATCGGGA
AGGATTGGCGCCGTTGGATTAGCTAGITSGTGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAG
CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGATGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGAAGA
AGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAA
TTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCAGCTCAA
CTGCGGA

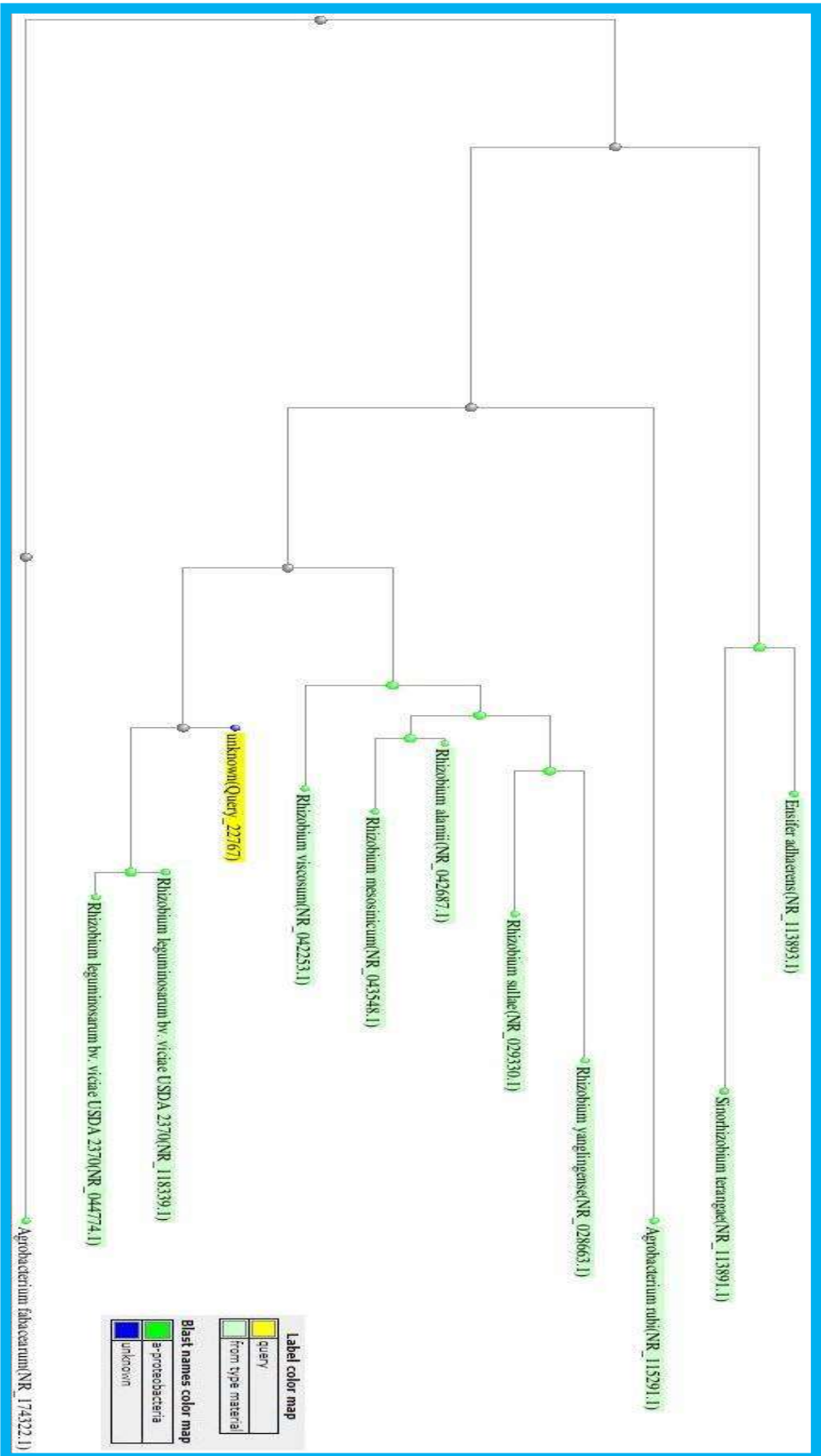
العزلة الرابعة: OJ32

ACCCTTGACTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGA
AAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC
CAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGG
CCCAAACCTCCTACGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAA
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCAT
GCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGG
TATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCT
AGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAA
ATCCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTAGTATGGAAGAGGTGAG
TGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTATACTGTTCCGTGG
CGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAAC
CTTACCAGCCCTTGACATGCCCGGCTACTTGCAGAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGACCGGG
ACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTGTTGGTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTG
ATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGC
AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACC
GGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATC
GATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTGATCTG
GAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCG

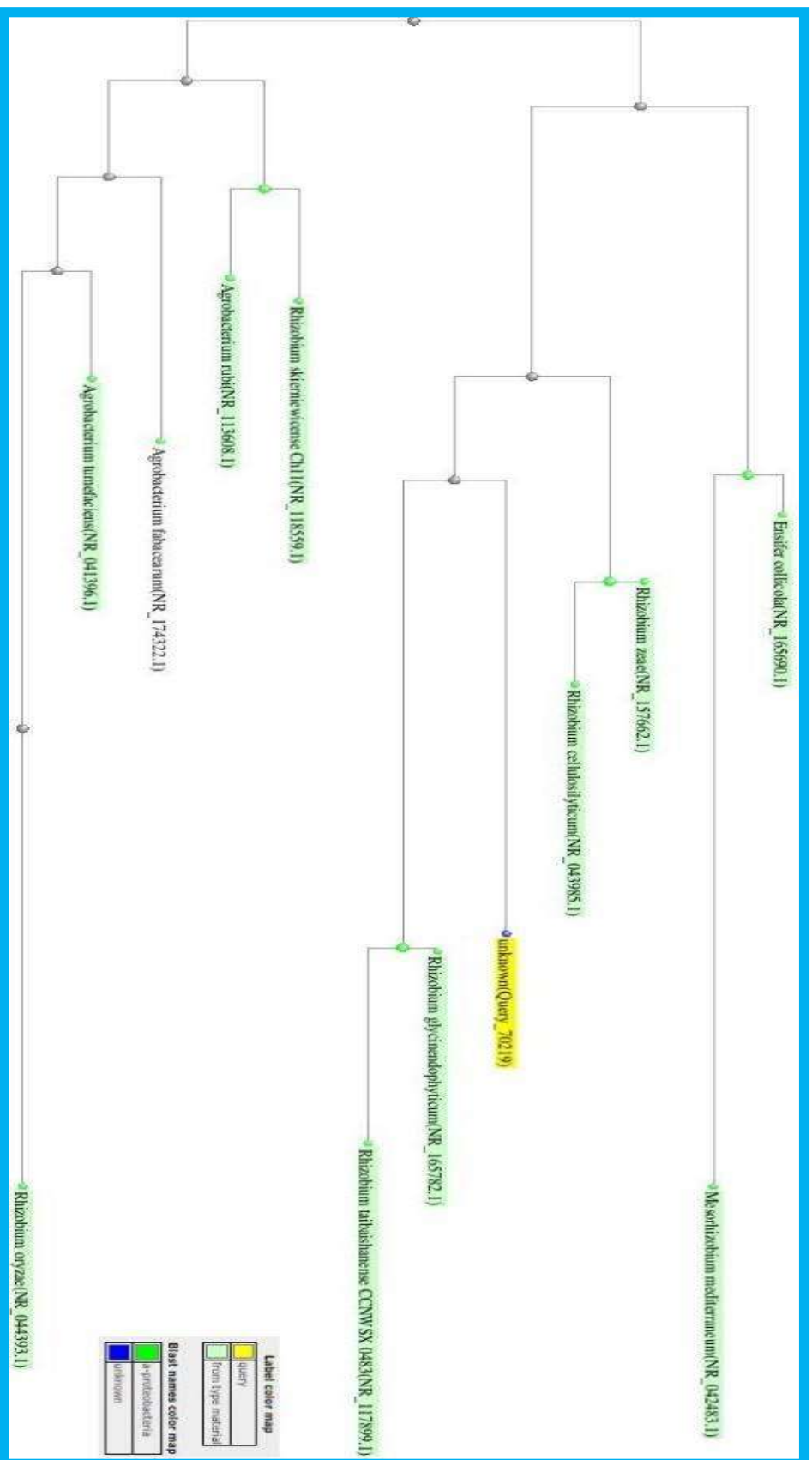
بيّنت نتائج تحديد تطابق تسلسل القواعد النايتروجينية وباستعمال البادئين pA الأمامي و pH الخلفي والخاص بالتسلسل الجزيئي للجين 16S rRNA لأربع عزلات رايزوبية منتخبة معزولة في هذه الدراسة والمرسلة إلى شركة Macrogen الكورية الجنوبية من أجل الحصول على تتابعات القواعد النايتروجينية وبعد تحليل النتائج باستعمال برنامج Mole Blast للتعرف على المخطط الشجري للأنماط الوراثية تبين أن العزلة الأولى Unknown Query_12861 التي عُزلت من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. كانت مطابقة بنسبة 98.55% من السلالات القياسية المسجلة في بنك الجينات *Rhizobium nepotum* 39/7 NR_117203.1 والسلالة *Beijerinckia* والسلالة *Agrobacterium tumefaciens* NR_041396.1 والسلالة *Rhizobium daejeonense* NR_116306.1 والسلالة *Rhizobium daejeonense* NR_114121.1 (الشكل 4-3). فيما يخص العزلة الثانية Unknown Query_22767 التي عُزلت من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا *Catalpa speciosa* L. فقد بين المخطط الشجري قربها بنسبة 98.12% من السلالات القياسية والمسجلة في بنك الجينات *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370 والسلالة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370 NR_118339.1 (الشكل 4-4). في حين كانت نتيجة العزلة الثالثة Unknown Query_70219 (الشكل 4-4). في حين كانت نتيجة العزلة الثالثة Unknown Query_70219 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا *Parkinsonia aculeata* L. قريبة وبنسبة 98.42% من السلالات القياسية والمسجلة في بنك الجينات *Rhizobium lycinendophyticum* NR_165782.1 (الشكل 4-5). أمّا العزلة الرابعة Lel Query_16169 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الالبيزيا *Albizia odoratissima* L. فقد أظهر المخطط الشجري أنها قريبة بنسبة 97.89% من السلالات القياسية والمسجلة في بنك الجينات *Rhizobium leguminosarum* strain LMG 14904 والسلالة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370 والسلالة *Rhizobium indigoferae* strain NBRC 100398 والسلالة *Rhizobium tropici* CIAT 899 والسلالة *anhuiense* strain CCBAU 23252 (الشكل 4-6).



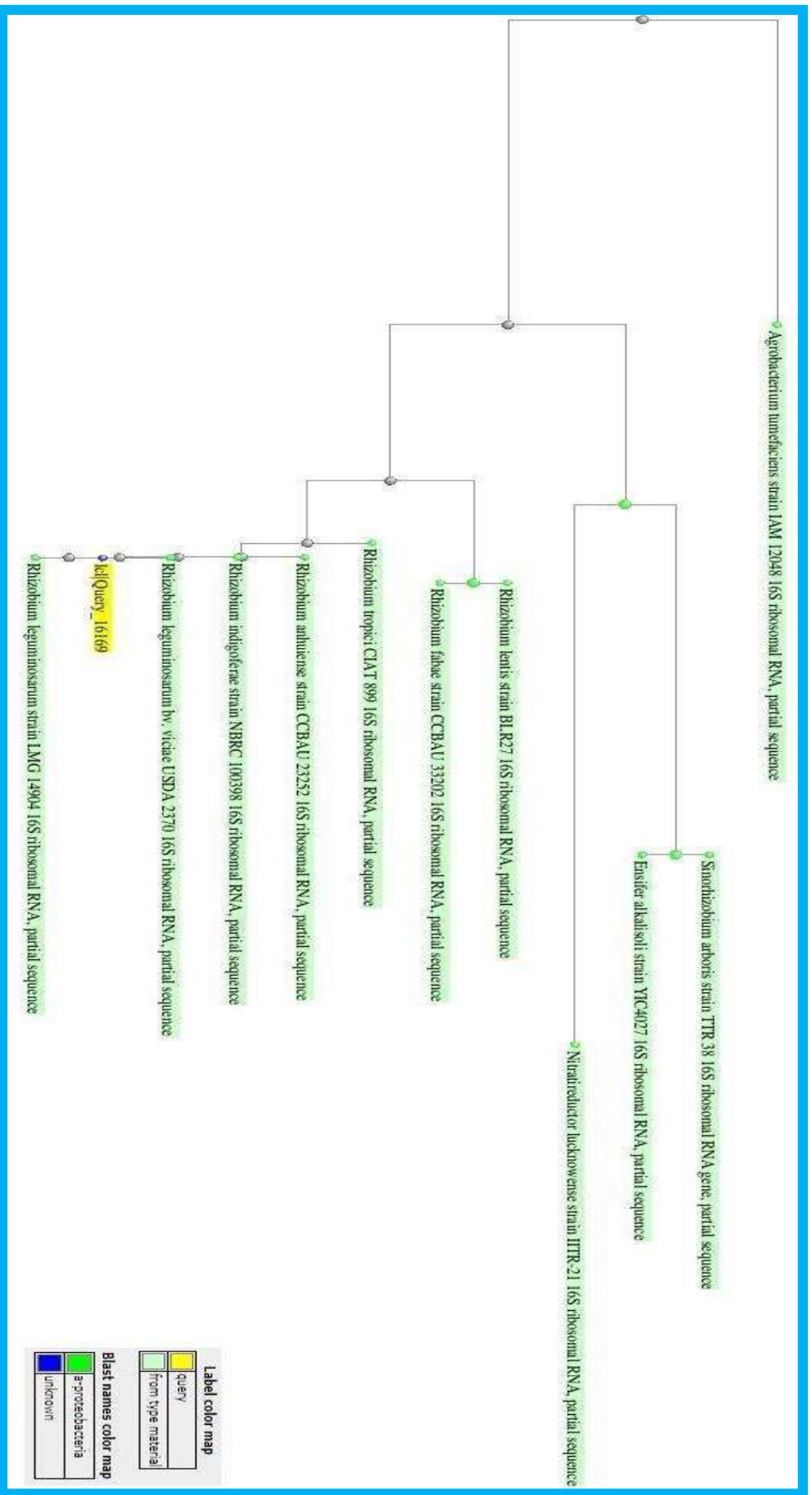
الشكل (3-4) المخطط الشجري للانماط الوراثية باستعمال نتائج تسلسل القواعد النايروجينية 16S rRNA للعرلة OJ27 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpuraria* L. باستخدام برنامج Mole Blast.



الشكل (4-4) المخطط الشجري للانماط الوراثية باستعمال نتائج تسلسل القواعد النايكروجنينية 16S rRNA للتعزلة OJ30 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا *Catalpa speciosa* L. وباستخدام برنامج Mole Blast.



الشكل (5-4) المخطط الشجري للانحطاط الوراثية باستعمال نتائج تسلسل القواعد النيتروجينية 16S rRNA للموتة OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا *Parkinsonia aculeata* L. وباستخدام برنامج Mole Blast.



الشكل (4-6) المخطط الشجري للانحط الوراثية باستعمال نتائج تسلسل القواعد النايروجينية 16S rRNA للمزعة OJ32 والمزولة من العقد الجزرية لنبات الألبيزيا *Albizia odoratissima* L. وباستخدام برنامج Mole Blast.

الاستنتاجات

والتوصيات

**Conclusions and
Recommendations**

الاستنتاجات

1. إمكانية الحصول على عزلات رايزوبيا محلية غير معروفة الجنس والنوع ولم تسجل في المراجع العلمية مسبقا مثل العزلات OJ27 و OJ29 والمعزولة من نبات *Bauhinia purpuria* L.
2. تسجيل علاقة تعايشية على مستوى العالم ولأول مرة ما بين بكتريا الرايزوبيا العزلة OJ30 ونبات الـ *Catalpa speciose* L.، إذ لم يتم تسجيلها مسبقا.
3. إمكانية الحصول على عزلات رايزوبيا محلية ذات علائم وراثية مختلفة كالحساسية والمقاومة للمضادات الحياتية المدروسة تتحمل تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl وأملاح المعادن الثقيلة.
4. إمكانية الحصول على عزلات رايزوبيا ذات إنتاج وافر من السكر المتعدد الخارجي EPS الذي يمكن أن يدخل في تطبيقات صناعية وطبية وزراعية مختلفة.
5. أظهرت نتائج دراسة الفعالية المضادة المايكروبية Antimicrobial activity لأغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة نتائج مشجعة جدًا ولاسيما العزلة *Ensifer fredii* bv. *fredii* OJ13 تجاه الممرضات البشرية والنباتية المدروسة.

التوصيات:

1. إجراء مسح ميداني لمناطق زراعية وبيئية أخرى مختلفة لم تشملها هذه الدراسة.
2. دراسة الظروف التي تؤثر على إنتاج السكر المتعدد الخارجي EPS وضبط ظروف الإنتاج مثل درجة الحرارة وإضافة عناصر مغذية إلى الوسط الزراعي.
3. إمكانية إجراء تجارب أخرى موسعة على هذه العزلات من ناحية متابعة قابليتها على زيادة إنتاج السكر المتعدد الخارجي وذلك بإجراء تطهير باستعمال مطفرات مختلفة.
4. إجراء دراسة تحليلية مفصلة من أجل تحديد وفصل المركب الفعال في رشح مزارع التخمر لبكتريا الرايزوبيوم.
5. استعمال مضادات حيوية أخرى لم يتسن استعمالها في هذه الدراسة لمعرفة تأثير باقي المضادات على عزلات بكتريا الرايزوبيا.
6. تطبيق أنواع بكتيرية وفطرية مرضية أخرى لمعرفة تأثير الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا.

المصادر

References

المصادر

المصادر العربية

- آل جوجانة، رغيد سعيد شمعون. (2018). دراسة فعالية المضادة الميكروبية لعزلات الرايزوبيا المحلية تجاه عزلات من البكتريا المرضية. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.
- الحسو، محمود زكي والطائي، محمد إبراهيم (2008). تقدير حساسية البكتريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* لمجموعة المضادات البيتا لاكتام. مجلة التربية والعلم، المجلد (21) العدد (3)، 66-75.
- السهيلي، ابراهيم عزيز خالد، قيصر نجيب صالح واسماعيل عبد اللطيف سالم. (1980). الفطريات. مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. 320 صفحة.
- الطائي، أنمار أحمد وبهجت، شباية عبد اللطيف. (2007). الأحياء المجهرية العملي. قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق.
- العبيدي، وسام جهاد حسين. (2020). دراسة جزيئية لبكتريا *Rhizobium* sp. المعزولة من العقد الجذرية لبعض النباتات البقولية في محافظة نينوى/العراق. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.
- سليمان، أحمد علي محمد. (2021). العزل والتشخيص الجزيئي لعدد من أجناس جرثومة الرايزوبيا ودراسة فعاليتها الميكروبية المضادة تجاه عدد من أنواع الجراثيم المرضية. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.
- شريف، انتظار ذنون أحمد. (2008). دراسة العوامل المؤثرة في إنتاج السكر المتعدد الخارجي لبكتريا الرايزوبيا وتأثره على بعض الصفات المظهرية لنبات الجت *Medicago sativa*. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.
- علي، هشام سرحان (2006). تأثير تغذية الورقة بالزنك والحدود ومواعيد إضافتهما في حاصل البذور ومكوناته للجت *Medicago sativa* L. ومكوناته للجت *Trifolium.alexandrinum* L. أطروحة دكتوراه؛ جامعة بغداد؛ بغداد، العراق.
- عنتر، سالم حمادي (2010). التحليل الاحصائي في البحث العلمي وبرنامج SAS. دار الكتب للطباعة والنشر/ كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل، الموصل، العراق، ص192.

- Abdel-Hakim, M. M.; Dakhly, O. F.; and Sameh, A. M. (2022). Characterization of some plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugar beet rhizosphere. **J. Mod. Res.**, 4: 6-13.
- Abera, T.; Semu, E.; Debele, T.; Wegary, D. and Kim, H. (2015). Determination soil *Rhizobium* populations, intrinsic antibiotic resistance, nodulation and seed yield of faba bean and soybean in Western Ethiopia. **World J. Agric. Sci.**, 11(5): 311-324.
- Ahluwalia, K. B. (2009). **Genetics**, 2nd ed, New Age, Int. Ltd., Publishers., p: 223-230. U. S. A.
- Al-Ani, R. A.; Adhab, M. A.; Mahdi, M. H. and Abood, H. M. (2012). *Rhizobium japonicum* as a biocontrol agent of soybean root rot disease caused by *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina*. **Plant Protect. Sci.**, 48(4): 149-155.
- Allison, L. (2007). **Fundamental Molecular Biology**, Black Well Publishing Ltd., p: 2-5. U. S. A.
- Altheide, S. T. (2020). Biochemical and culture-based approaches to identification in the diagnostic microbiology laboratory. **American Society for Clinical Laboratory Science**.
- Alvarez-Uria, G., Gandra, S., Mandal, S., & Laxminarayan, R. (2018). Global forecast of antimicrobial resistance in invasive isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Int. J. infectious diseases**, 68, 50-53.
- Amarger, N.; Macheret, V. and Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 47: 996- 1006.
- Andrews, M. and Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. **Int. J. Mol. Sci.**, 18(705): 1-39.
- Aneja, K. R. (2003). **Experiments in Microbiology Plant Pathology and Biotechnology**, 4th edition, New Age Int. Publishers, New Delhi, India.
- Arnold, W.; Rump, A.; Klipp, W.; Perieffer, V.B. and Puhler, A. (1988). Nucleotide sequence of a 24, 206 base pair DNA fragment carrying entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Mol. Biol.**, 203: 715-738.

- Asmerom, D.; Kalay, E.; Tesfay, H. and Tafere, G. G. (2020). Antibacterial and antifungal activities of the leaf exudate of aloe megalacantha Baker. **Int. J. Microbiol.**, 88: 408-414.
- Banu, H. and Prasad, K. P. (2017). *Role of plasmids in microbiology*. **J. Aquac. Res. Develo.**, 8 (1): 1-8.
- Barcellos, F. G.; Meuna, P; Batista, J. S. and Hungria, M. (2007). Evidence an of horizontal transfer of symbiotic genes from *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, 73 (8): 2635-2643.
- Baron, E. J. and Finegold, S. M. (1990). **Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology**. 8th ed., C.V. Mosby Company. Inc., U. S. A.
- Bejandi, T. K.; Sharifii, R. S.; Sedghi, M. and Namvar, A. (2012). Effects of plant density, Rhizobium inculcation and microelements on nodulation, chlorophyll content and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **J. Sch. Res. Library**. 3(2): 951-958.
- Ben, H. K. A.; Moissenet, D.; Vu Thien, H. and Khedher, M. (2011). Virolence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. **Ann. Biol. Clin. Paris France**. 69(4): 393-403.
- Bentley, S. D. and Parkhill, J. (2004) Comparative genomic structure of prokaryotes. **Annu. Rev. Genet.**, 38: 771-792.
- Berrada, H. and Fikri-Benbrahim, K. (2014). Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. **British Microbiol. J.**, 4(6): 616-639.
- Beshah, Asnake. and Assefa, Fassil. (2019). Isolation, identification and characterization effective *Rhizobium* species nodulating mung bean (*Vigna radiata* L.) from some places of North Shewa. **Environ. Sci. Nat. Res.**, 2572-1119.
- Bhattacharya, C.; Deshpande, B. and Pandey, B. (2013). Isolation and characterization of *Rhizobium* spp. form root of legume plant (*Pisum sativum*) and Its antibacterial activity against different bacterial strains. **Int. J. Agri. Food Scie.**, 3(4): 138-141.
- Bohn, J. A. and Bemiller, J. N. (1995). (1-3)- β -glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationship. **Carbohydrate Polymers**, 28: 3-14.
- Bolaños-Vásquez, M. C. and Werner, D. (1997). Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on nod gene-inducing

- flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 10: 339–346.
- Breen, A. P. and Murphy, J. A. (1995). **Reaction of oxyl radicals with DNA**. *Free Radical. Biol. Med.*, 18(6): 1033-1077.
- Brewin, N. J. (1998). Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In *The rhizobiaceae*. **Springer, Dordrecht.**, 4: 417-429.
- Brom, S.; Garcia, E.; De los Santos, A.; Cervantes, L.; Palacios, R. and Romro, D. (2000). In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. **Plasmid.**, 44 (1): 34-43.
- Bromfield, E. S. P.; Lewis, D. M. and Barran, L. R. (1985). Cryptic plasmid and rifampin resistance *Rhizobium meliloti* influencing in nodulation competitiveness. **J. Bacteriol.**, 164(1): 410-413.
- Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J. S. and Mores, S. A. (2010). Jawetz Melnick and Adelberg's **Medical Microbiology**. 25th ed. Lange, McGraw-Hill. U. S. A., Pp250-252.
- Broothaerts, W; Mitchell, H. J.; Weir, B.; Kaines, S.; Smith, L. M.; Yang, W.; Mayer, J. E.; Roa-Rodríguez, C. and Jefferson, R. A. (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**, 433 (7026): 629-633.
- Broughton, W. J.; Jabbouri, S. and Perret, X. (2000). **Keys to symbiotic harmony**. *J. Bacteriol.*, 182: 5641-5652.
- Broughton, W. J.; Samrey, U. and Stanley, J. (1987) Ecological genetics of *Rhizobium meliloti*: symbiotic plasmid transfer in the *Medicago sativa* rhizosphere. **FEMS. Microb. Lett.**, 40 (23): 251-255.
- Brown, A. E. (2007). **Bensons Microbiology Application, Laboratory Manual in General Microbiology**. 10th ed., McGraw-Hill's Com. Inc., U.S.A.
- Burdass, D. (2002). **Microbes in the environment**. In: Society for General Microbiology. (ed., H. Janet), SGM, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG. U. K.
- Burgain, A., Pic, É., Markey, L., Tebbji, F., Kumamoto, C. A., and Sellam, A. (2019). A novel genetic circuitry governing hypoxic metabolic flexibility, commensalism and virulence in the fungal pathogen *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, 15(12), 78-87.

- Butt, A. M.; Khan, I. B.; Haq, F. and Tona, Y. (2011). De novo structural modeling and computational sequence analysis of a bacteriocin protein isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain LC-31. **Afr. J. Biotechnol.**, 10(38): 7381-7388.
- Caracciolo, A. B. and Terenzi, V. (2021). **Rhizosphere microbial communities and heavy metals**. *Microorganismes*, 9: 1462-1482.
- Carey, R. B., Bhattacharyya, S., Kehl, S. C., Matukas, L. M., Pentella, M. A., Salfinger, M., & Schuetz, A. N. (2018). Practical guidance for clinical microbiology laboratories: Implementing a quality management system in the medical microbiology laboratory. **Clinical microbiology reviews**, 31(3),62-66.
- Castellane, T. C. L.; Campanharo, J. C.; Colnago, L. A.; Coutinho, I. D.; Lopes, É. M.; Lemos, M. V. F. and de Macedo Lemos, E. G. (2017). Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **Int. J. Biol. Macromole**, 96: 361-369.
- Castellane, T. C. L.; de Sousa, B. F. S.; and Lemos, E. G. (2019). Exopolysaccharide produced from *Rhizobium* spp. an interesting product for industry and environ. **Curr. Appl. Poly. Sci.**, 3: 157-166.
- Chan, Y.; Liu, J.; Pociask, D.; Zheng, M.; Mietzner, T. and Berger, T. (2009). Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against *Klebsiella* infection. **J. Immunol.** 182(8): 47–56.
- Charpentier, M. and Oldroyd, G. E. (2013). **Nuclear calcium signaling in plants**. *Plant Physiol.* 163: 496–503.
- Chatterjee, M. and Raichaudhuri, A. (2017). Bacteriocin in harmony with ABC transporter exhibits antimicrobial activity. **E.C. Microbiol. J.**, 8(1): 3-10.
- Chauhan, M. P.; Singh, N. K.; Chaudhary, A. K. and Shalini, R. (2017). Characterization of *Rhizobium* isolates from *Sesbania* rhizosphere and their role in bioremediation of glyphosate and monocrotophos. **Int. J. Appl. Nat. Sci.**, 6(4): 11-22.
- Chen, W. X.; Yan, G. H. and Li, J. L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**; 38:392-397.

- Chhetri, T. K.; Subedee, B. R. and Pant, B. (2019). Isolation, identification and production of encapsulated *Bradyrhizobium japonicum* and study on their viability. **Nep. J. Biotechnol.**, 7(1): 39-49.
- CLSI. M100-S25 **performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; Twenty-fifth informational supplement; 2015.
- Cole, M. A. and Elkan, G. H. (1979). Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. **J. Appl. Environ. Microbiol.**, 37(5): 867- 870.
- Collee, J. G.; Marmion, B. P.; Fraser, A. G. and Simmons, A. (1996). **Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology**. 14th ed., Churchill Livingstone, New York, USA. p. 263-98.
- Costa, M. M., Melo, M. P., Carmo, F. S., Moreira, G. M., Guimarães, E. A., Rocha, F. S and Pfenning, L. H. (2021). Fusarium species from tropical grasses in Brazil and description of two new taxa. **Mycological Progress**, 20(1), 61-72.
- D’Haeze, W. and Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology** 12: 79–105.
- Dangeard P. A. (1926). **Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses**. Le botaniste, Ser.16. 270 p. Paris, France.
- Daoud, Amal.; Malika, Drira.; Bakari, Sana.; Hfaiedh, Najla.; Mnafgui, Kais; Kadri, Adel. and Gharsallah, Néji. (2019). Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. **Arab. J. Chem.**, 12: 3075-3086.
- Datta, A.; Singh, R. K. and Tabassum, S. (2015). Isolation, characterization and growth of *Rhizobium* strains under optimum conditions for effective biofertilizer production. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, 32(1): 199-208.
- Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **J. Sci. Bacteriol.**, 64: 375-382.
- Dayalan, A. J.; Darwen, P. and Prakash, S. (2011). Comparative study production, purification of penicillin by *penicillium* isolated from soil and citrus sample. **Asian pacific J. Tropical Biomedicine.**, 10: 1016-2221.
- de Lajudie, P.; Laurent-Fulele, E.; Willems, A.; Torck, U.; Collins, M. D.; Kersters, K. and Gillis, M. (1998). *Allorhizobium undicola* gen. Nov. sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **Int. J. Syst. Bacteriol.**; 48:1277- 1290.

- de Lajudie, P.; Willems, A. and Pot, B. (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**; 44:715-733.
- Dénarié, J. and Cullimore, J. (1993). **Lipo-oligosaccharide nodulation factors**: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*, 74: 951-954.
- Deora, G. S. and Singhal, K. (2010). Isolation, biochemical characterization and preparation of biofertilizers using *Rhizobium* strains for commercial use. **Biosci. Biotech. Res. Comm.**, 3(2): 132-136.
- Dhull, S.; Singh, K. and Gera, R. (2018). Intrinsic antibiotic resistance (IAR) of different rhizobial strains isolated from root nodules of *Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub. **Chem. Sci. Rev. Lett.**, 6(21): 88-93.
- Dong, R.; Zhang, J.; Huan, H.; Bai, C.; Chen, Z. and Liu G. (2017). High salt tolerance of a *Bradyrhizobium* strain and its promotion of the growth of *Stylosanthes guianensis*. **Int. J. Mol. Sci.**, 18(8): 1625-1642.
- Duangkh, M.; Chikoti, Y.; Thepsukhon, A.; Thapanapongworakul, P.; Chungopast, S.; Tajima, Sh. and Nomura, M. (2018). Isolation and characterization of rhizobia from nodules of *Clitoria ternatea* in Thailand. **Plant Biotech.**, 35: 123-129.
- Duta F. P.; de France, F. P. and Lopes, L. A. (2006). Optimization of culture conditions for exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. Using the response surface methodes. **Process Biotechn.**, 9: 391-398.
- Edwards, U.; Rogall, T.; Blöcker, H.; Emde, M. and Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic acids res.**, 17(19): 7843-7853.
- Elliot, T.; Worthington, T.; Osman, H. and Gill, M. (2007). **Medical Microbiology and infection**. 4th ed., Blackwell publishing Ltd, Oxford, U.K.
- Ernst, J. F. and Chan, R. K. (1985). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to aminoglycoside antibiotics. **J. Bacteriol.**, 163 (1): 8-14.
- Fagorzi, C.; Checcucci, A.; diCenzo, G. C.; Debiec-Andrzejewska, K.; Dziewit, L.; Pini, F. and Mengoni, A. (2018). Harnessing rhizobia to improve heavy-metal phytoremediation by legumes. **J. Genes**, 9(11):1-16.

- Forbes, B. A.; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). **Diagnostic Microbiology**. St Louis: Mosby. U. S. A.
- Foster, L. J. R.; Moy, Y. P. and Rogers, P. L. (2000). Metal binding capabilities of *Rhizobium etli* and its extracellular polymeric substances. **Biotechnol. Lett.**, 22: 1757-1760.
- Fraysse, N.; Coudere, F. and Poinso, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Eur. J. Biochem.**, 270: 1365-1380.
- Fuskhah, E.; Purbajanti, E. D. and Anwar, S. (2018). Isolation of **Rhizobium** bacteria from forage legumes for the development of ruminant feed. **Earth. Environ. Sci.**, 11 (2) 120-129.
- Galibert, F.; Finan, T. M. and Long, S. R. (2001). The composite genome of the legume symbiotic *Sinorhizobium meliloti*. **Sci.**, 293 (5530): 668-672.
- Gauri, Kumar.; Prasad, S. A.; Bhatt, R.; Pant, S. H.; Kaur, B. M. and Naglot, Ashok. (2011). Characterization of Rhizobium isolated from root nodules of Trifolium alexandrinum. **J. Agri. Tech.**, 7(6): 1705-1723.
- Ghosh, A. C. and Basu, P. S. (2001). Extracellular polysaccharide production by *Azorhizobium caulinodans* from stem nodules of leguminous emergent hydrophyte *Aeschynomene aspera*. **Indian J. Exp. Biol.**, 39: 155-159.
- Ghosh, A. C.; Ghosh, S. and Basu, P. S. (2005). Production of extracellular polysaccharide by a *Rhizobium* species from root nodules of the leguminous tree Dalbergia lanceolaria. **Eng. life sci.**, 5(4): 378-381.
- Giraud, E.; Moulin, L.; Vallenet, D.; Barbe, V.; Cytryn, E.; Avarre, J. C. and Sadowsky, M. (2007). Legumes symbioses: absence of nod genes in **photosynthetic bradyrhizobia**. **Sci.**, 316(5829): 1307-1312.
- Goldmann, A.; Boivin, C.; Fleury, V.; Message, B.; Lecoer, L.; Maille, M. and Tepfer, D. (1991). Betaine use by rhizosphere bacteria: genes essential for trigonelline, stachydrine and carnitine catabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in the symbiotic region. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 4 (6): 571-578.
- Gonzalez, V.; Santamaria, R. I.; Bustos, P.; Hernández-González, I.; Medrano-Soto, A.; Moreno-Hagelsieb, G.; Janga, S. C.; Ramírez, M. A.; Jiménez-Jacinto, V.; Collado-Vides, J. and Dávila, G. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 103 (10): 3834-3839.

- Gonzalez-Guerrero, M.; Matthiadis, A.; Saez, A. and Lung, T. (2014). Fixating on metals: New insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. **J. Front. Plant. Sci.**, 5: 38-45.
- Gopalakrishnan, R. and Winston, F. (2019). Whole-Genome sequencing of yeast cells. **J. Curr. Pro. Mol. Biol.**, 1(4): 28-33.
- Gordon, D. M. and O'Brien, C. L. (2006). Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. **Microbiol.**, 152: 3239-3244.
- Göttfert, M.; Röthlisberger, S.; Kündig, C.; Beck, C.; Marty, R. and Hennecke, H. (2001). Potential symbiosis specific genes uncovered by sequencing a 410- kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. **J. Bacteriol.**, 183 (4): 1405-1412.
- Graham, P. H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil condition. **Can. J. Microbiol.**, 38: 475-484.
- Gray, J. X. and Rolfe, B. G. (1990). Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. **Mol. Microbiol.**, 4: 1425-1431.
- Green, M. R. and Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2019(6), 95-109.
- Gross, D. C. and Vidaver, A. K. (1978). Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing rhizobia. **Appl. Environ. Microbiol.**, 36: 936-943.
- Gundamaraju, R.; Hwi, K. K.; Singla, R. K.; Vemuri, R. C. and Mulapalli, S. B. (2014). Antihyperlipidemic potential of *Albizia amara* (Roxb) Boiv. bark against Triton X-100 induced hyperlipidemic condition in rats. **Pharmacogn. Res.** 6: 267-273.
- Guntli, D.; Heeb, M.; Moenne-Loccoz, Y. and Defago, G. (1999). Contribution of calystegine catabolic plasmid to competitive colonization of the rhizosphere of calystegine-producing plants by *Sinorhizobium meliloti* Rm41. **J. Mol. Ecol.**, 8 (5): 855-863.
- Guo, X.; Flores, M.; Mavingui, P.; Fuentes, S. I.; Hernandez, G.; Davila, G. P. and Alacios, R. (2003). Natural genomics design in: *Sinorhizobium meliloti* nov. gen. **arch. Genome. Res.**, 13 (8): 1810-1817.
- Hamza, T. A. and Alebejo, A. L. (2017). Isolation and Characterization of rhizobia from rhizosphere and root nodule of cowpea, elephant and lab lab plants. **Int. J. Nov. Res. In Interdis Stud**, 4: 1-7.

- Harley, J. P. and Prescott, L. M. (2002). "**Laboratory Exercises in Microbiology**", 5th ed., WCB/McGraw-Hill. U. K.
- Heinrich, K.; Gordan, D. M.; Ryder, M. H. and Murphy, P. J. (1999). A rhizopine strain of *Sinorhizobium meliloti* remains at a competitive nodulation advantage after an extended period in the soil. **Soil. Biol. Biochem.**, 31(7): 1063-1065.
- Hilliam, Y., Kaye, S., & Winstanley, C. (2020). Pseudomonas aeruginosa and microbial keratitis. **J. medical microbial.**, 69(1), 3-13.
- Hillocks R. J. and Maruthi, M. N. (2012). Grass pea (*Lathyrus sativus*): is there a case for further crop improvement. *Euphytica* 186: 647–654.
- Hossain, A.; Gunri, S. K.; Barman, M.; Sabagh, A. E. and da Silva, J. A. T. (2019). Isolation, characterization and purification of *Rhizobium* strain to enrich the productivity of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). varieties. **Frontiers. Microbiol. Open Agri.**, 4(1): 400-409.
- Howieson, J. and Ballard, R. (2004). Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - some contemporary thoughts. **Soil Biol. Biochem.**, 36: 1261-1273.
- Hussein, I. A.; Hussein, N. N. and Al-Darkazaly, M. A. (2005). Isolation and characterization salt tolerant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv, *viciae*. **Ibn AL- Haitham J. Pure Appl. Sci.**, 18 (1): 15-25.
- Hynes, M. F. and McGregor, N. F. (1990). Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. **J. Mol. Microb.**, 4 (4): 567-574.
- Hynes, M. F.; Simon, R.; Muller, P.; Niehaus, K.; Labes, M. and Puhler, A. (1986). The two megaplasmide of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. **Mol. Gen. Genet.**, 202: 356-362.
- Indar, H. L.; Daniales, N.; Prabhakar P.; Brown C.; Baccus, T. G.; Comissiong, E. and Hispedales J. (2001). Emergence of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in the caribbean, case–control study in Trinidad and Tobago, West Indies. **Clinical Inf. Dis.**, 32: 890-896.
- Iyer, B. and Rajkumar, S. (2018). Rhizobia. In Reference Module in Life Sciences, Elsevier, **Nirma University.**, P: 1-20.
- Jackson, S. G., Mariana, S. S., Andr, L. M. O., Marco, A. N., and Mariangela, H. (2018). Development of liquid inoculants for strains of *Rhizobium tropici* group using response surface methodology. **African J. Biotech**, 17(13), 411-421.

- Jan, A. (2010). Impact of salt stress and mineral nutrition on Chickpea and Roselle. Post-Doctoral Research Fellow Report. **University of Kebangsaan**. Malaysia (UKM).
- Janczarek, M.; Rachwał, K.; Cieśla, J.; Ginalska, G. and Bieganowski, A. (2015). Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. **Plant soil**. 388(1): 211-227.
- Jarvis, B. D. W.; van Berkum, P.; Chen, W. X.; Nour, S.; Fernandez, M. P.; Cleyet-Marel, J. C. and Gillis, M. (1997). Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**; 47: 895-898.
- Jawetz, E.; Melnick, J. L. and Adeiberg, E. A. (2004). Review of Medical Microbiology. 16th., Lange Medical publication, USA.
- Jenneman, G. E.; McInerney, M. J.; Crocker, M. E. and Knapp, R. M. (1986). Effect of sterilization by dry heat or autoclaving on bacterial penetration through berea sandstone. **Appl. Environ. Microbiol.**, 51(1): 39-43.
- Jensen, W.; Duarte, C. M.; Kennedy, H.; Marbà, N.; Holmer, M.; Mateo, M. A. and Serrano, O. (2012). Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. **Nature Geoscie**, 5(7): 505-520.
- Jimenez-Zurdo, J. I.; VanDillewijn, P.; Soto, M. J.; Defelipe, M. R.; Olivares, J. and Toro, N. (1995). Characterization of a *Rhizobium meliloti* proline dehydrogenase mutant altered in nodulation efficiency and competitiveness on alfalfa roots. **J. Mol. Plant Microb. Interact.**, 8(4): 492-498.
- Jordan, D. C. and Allen, O. N. (1974). **Family III Rhizobiaceae**. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Edition (Eds., R. E. Buchanan and N. E. Gibbons). The Williams and Wilkins Company Baltimore, U.S.A., pp. 261-264.
- Joseph, M. V.; Desai, J. D. and Desai, A. J. (1983). Production of antimicrobial and bacteriocin-like substances by *Rhizobium trifolii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 45(2): 532-535.
- Jung, M. C. (2008). Heavy metal concentrations in soils and factors affecting metal uptake by plants in the vicinity of a Korean Cu-W Mine. **J. Sensors**, 8(4): 2413-2423.
- Kado, C. L. and Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **J. Bacteriol.**, 145(3): 1365-1373.

- Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sato, S.; Minamisawa, K.; Uchiumi, T. and Sasamoto, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **J. DNA. Res.**, 9: 189-197.
- Kaper, J. B.; Nataro, J. P. and Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microbiol.**, 2: 123-140.
- Khalid, R.; Zhang, X. X.; Hayat, R.; and Ahmed, M. (2020). **Molecular characteristics of rhizobia isolated from Arachis hypogaea grown under stress environ.** Sustainability., 12(15): 6259-6267.
- Khanuja, S. P. S.; Kumer, S. (1988). Isolation of phages for *Rhizobium meliloti* AK631. **Indian J. Exp. Biol.**, 26: 665-667.
- Kohlmeier, M. G., Yudistira, H., Ali, A., and Oresnik, I. J. (2022). *Bradyrhizobium japonicum* FN1 produces an inhibitory substance that affects competition for nodule occupancy. *Canadian Journal of Microbiology*, 68(4), 227-236.
- Kole, J. (2011). Wild Crop Relative Genomic and Breeding Resource Legume Crops and Forages. **Springer, Heidelberg**, Berlin: 321 pp. Germany.
- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C. (1997). **Diagnostic Microbiology**. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 10: 253-320. U. S. A.
- Krol, J.; Wielbo, J.; Mazur, A.; Kopcinska, J.; Lotocka, B.; Golinowski, W. and Skorupska, A. (1998). Molecular characterization of PSSCDE genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1: PSSD mutant is affected in exopolysaccharide synthesis and endocytosis of bacteria. **Mol. Plant. Microb. Intrac.**, 11: 1142-1148.
- Kuchibiro, T.; Hirayama, K.; Houdai, K.; Nakamura, T.; Ohnuma, K.; Tomida, J. and Kawamura, Y. (2018). First case report of sepsis caused by *Rhizobium pusense* in Japan. **JMM Case Reports**, 5(1):1-5.
- Küçük, Ç.; Kivanç, M. and Kinaci, E. (2006). Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from bean. **Turkish J. Biol.**, 30(3): 127-132.
- Kumar, D.; Kumar, S.; Kohli, S.; Arya, R. and Gupta, J. (2011). Antidiabetic activity of methanolic bark extract of *Albizia odoratissima* benth. in alloxan induced diabetic albino mice. **Asian Pac. J. Trop. Med.** 4.11: 900-903.

- Kumari, B. S.; Ram, M. R. and Mallaiah, K. V. (2009). Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from Indigofera. **African J. Microbiol. Res.**, 3(1): 1-14.
- Kunin, V.; Goldovsky, L.; Darzentas, N. and Ouzounis, C. A. (2005). The net of life: reconstructing the microbial phylogenetic network. **J. Genome. Res.**, 15 (7): 954-959.
- Kuznetsova, E. A.; Voitsekhivska, O. V.; Butylyov, A. V. and Shpakov, A. V. (2020). Study of the microstructure and properties of exopolysaccharide (producer of *Rhizobium leguminosarum*). In IOP Conference Series: **Earth Environ. Sci.**, 613 (1): 1-13.
- Laghari, U. A.; Shah, A. N.; Kandhro, M. N.; Jamro, G. M. and Talpur, K. H. (2016). Growth and yield response of five elite grass pea (*Lathyrus sativus* L.) genotypes to varying levels of potassium. **sarhad j. agri.**, 3 (2): 23-34.
- Laranjo, M.; Alexandre, A. and Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. **J. Microb. Res.**, 169 (1): 2-17.
- Laura, A.; Rosa, D. L.; Emilio, A. P. and Gonzalez-Aguilar, G. A. (2010). Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutrition Value, and Stability. **Wile. Blackwell Publication USA.**, 1: 53-88.
- Laus, M. C.; van Brussel, A. A. and Kijne, J. W. (2005). Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. **Mole. plant-microbe intrac.**, 18(11): 1123-1129.
- Lavres, J.; Castro, F. G. and de Sousa, C. G. M. (2016). Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. **J. Front. Environ. Sci.**, 4: 37-46.
- Lebrazi, S. and Fikri-Benbrahim, K. (2018). *Rhizobium*-Legume Symbioses: Heavy Metal Effects and Principal Approaches for Bioremediation of Contaminated Soil. in Legumes for Soil Health and Sustainable Management., pp. 205-233. **Springer, Singapore.**
- Lepek, V. C. and D'Antuono, A. L. (2005). Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. **Lotus News Letter.**, 35: 93-105.
- Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.; Promé, J. C. and Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. **Nature** 344: 781-784.

- Lesins, K. A. and Lesins, I. (1979). Genus *Medicago* (Leguminosae). A **taxogenetic study**. Dr. W. Junk bv Publishers the Hague-Boston-London. 1-228.
- Lin, D. X.; Wang, E. T.; Tang, H.; Han, T. X.; He, Y. R.; Guan, S. H. and Chen, W. X. (2012). *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**; 62: 2579-2588.
- Liu, C. W.; and Murray, J. D. (2016). The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update. **Plants** (Basel) 5: 33-39.
- Liu, Q., Qi, X., Yan, H., Huang, L., Nie, G., & Zhang, X. (2018). Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase PCR in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) subjected to various abiotic stresses. **Molecules**, 23(1), 172-182.
- Long, S. R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. **Cell**, 56: 203-214.
- Lu, Y. L.; Chen, W. F.; Wang, E. T.; Han, L. L.; Zhang, X. X.; Chen, W. X. and Han, S. Z. (2009). *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of Caragana species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 59(12): 3012-3018.
- Ma, Y.; Ling, T.; Su, X.; Jiang, B.; Nian, B.; Chen, L.; Liu, M.; Zhang, Z.; Wang, D. and Mu, Y. (2020). Integrated proteomics and metabolomics analysis of tea leaves fermented by *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii* and *Aspergillus fumigatus*. **Food Chem.**, 1(2): 60-75.
- MacFaddin, J. F. (1980). **Biochemical Tests for the Identification of Medical Bacteria**, Second ed. William and Wilkins, New York, U.S.A.
- Magnet, S. and Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **J. Chem. Rev.**, 105: 477- 497.
- Malik, A., Fatma, T., Shamsi, W., Khan, H. A., Gul, A., Jamal, A., & Bhatti, M. F. (2021). Molecular Characterization of Medically Important Fungi: Current Research and Future Prospects. **Recent Trends in Mycological Research**, 335-369.
- Mallaiyah, K. V. and Prabhavati, E. (2009). Extracellular polysaccharide production by *Rhizobium* sp. nodulating *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. **Asian J. Bio Sci.**, 4(1): 20-23.
- Mandal, S.; Ray, B.; Dey, S. and Pati, B. (2007). "Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* L. Hepper", **Biotechn Letters.**, 29(8): 1271-1275.

- Martin, M.; Lioret, J.; Sanchez-Contreras, J.; Bonilla, I. and Rivilla, R. (2000). MucR is necessary for galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1. *Mol. Plant-Microbe. Interact.*, 13: 129-135.
- Martinez-Romero E, Segovia, L.; Mercante, F. M.; Franco, A. A.; Graham, P. and Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; 41: 417-426.
- Migahed, A. M. (1996). **Flora of Saudi Arabia**, fourth ed. King Saud University Press, Riyadh. Saudi Arabia.
- Mihaylova, S.; Genov, N. and Moore, E. (2014). Susceptibility of environmental strains of *Rhizobium radiobacter* to antimicrobial Agents. *World Appl. Sci. J.*, 31(5): 859-862.
- Miljkovic-Selimovic, B.; Babic, T.; Kocic, B.; Stojanovic, P.; Ristic, L. and Dinic, M. (2007). Bacterial Plasmids. *Acta. Medica. Medianae.*, 46: 61-65.
- Mir, M. I.; nagabhushanam, B.; Quadriya, H.; kumar, B. K. and hameeda, B. (2020). Morphological, biochemical and intrinsic antibiotic resistance of rhizobia isolated from root and stem nodules of various leguminous plants. *Plant Cell Biotech and Molec Biol.*, 21(72): 126-138.
- Mohar, B.; Jezek, S. S.; Molek, K. R.; Stemberger, C. and Kurpis, M. (2016). Detection of an EGFR mutation in cytology specimens of Lung adenocarcinoma. *J. Cytopath.*, 3(2): 1-6.
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the polymerase chain reaction. *J. Sci. Amer.*, 262(4): 56-65.
- Munck, C. and Sommer, M. (2014) Antibiotic Resistance: Adaptive Evolution and Dissemination of Resistance Genes. Ph.D. thesis, **Technical University**, Denmark.
- Munshi, A. (2012) **DNA Sequencing-Methods and Applications**. Publish InTech. Rijeka. Croatia., 2: 3-10.
- Murphy, P. J.; Wexler, M.; Ggzemski, W.; Rao, J. P. and Gordon, D. (1995). Rhizopines: Their role in symbioses and competition. *J. Soil Biol. Biochem.*, 27 (4-5): 525-529.
- Naamala, J.; Jaiswal, S. K. and Dakora, F. D. (2016). Antibiotics resistance in *Rhizobium*: type, process, mechanism and benefit for agriculture. *Curr. Microbiol.*, 72(6): 804-816.
- Nandasena, K. G.; O'Hara, G. W.; Tiwari, R. P.; Sezmis, E. and Howieson, J. G. (2007). In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid

- evolution of diverse competitive strains of Mesorhizobia sub. optimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture Legume biserrula pelecinus L. **J. Environ. Microb.**, 9 (10): 2496-2511.
- Nandi, R. G.; Bara, J. K. and Shrivastava, P. (2019). Antimicrobial activity of *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum* on different plant pathogenic fungal strains. **Biosci. Biotech. Res. Comm.**, 12(2): 435-439.
- Navarini, L.; Stredansky, M.; Matulova, M. and Bertocchi, C. (1997). Production and characterization of an exopolysaccharide from *Rhizobium hedysari* HCNT1. **Biotechnol. Lett.**, 12: 1231-1234.
- Niang, N.; Demaneche, S.; Ndoeye, I.; Navarro, E. and Fall, S. (2018). Genetic diversity of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria of soil under the influence of *Piliostigma reticulatum* (DC.) Hochst and their impact on shrub growth. **Afri. J. Agri. Res.**, 13(46): 2668-2679.
- Nick, G.; de Lajudie, P.; Eardly, B. D.; Suomalainen, S.; Plin, L.; Zhang, X.; Gillis, M. and Lindstrom, K. (1999). *Sinorhizobium arboris* sp. Nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. Nov. isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. **Int. J. Syst. Bacteriol.**; 49: 1359-1368.
- Niehaus, K.; Baier, R.; Becker, A. and Puhler, A. (1996). **Symbiotic Suppression of the *Medicago sativa* Defense System-the Key of *Rhizobium meliloti* to Enter the Host Plant.** In: Biology of Plant-Microbe Interaction Edited by: Stacey, G.; Mullin, B. and Gresshoff, P. M. ISMPI, St. Paul, U.S.A., pp. 349-352.
- Oldroyd, G. E.; Murray, J. D.; Poole, P. S. and Downie, J.A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annu. Rev. Genet.**, 45: 119-144.
- Oresnik, I. J.; Pacarynuk, L. A.; O'Brien, S. A. P.; Yost, C. K. and Hynes, M. F. (1998). Plasmid-Encoded Catabolic Genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: Evidence for a plant-inducible rhamnose locus involved in competition for nodulation. **J. Mol. Plant Microbe Interact.**, 11 (12): 1175-1185.
- Pais, N. J.; Souza, U. P. D.; Shama, K. P. and Shastry, C. S. (2012). Anti-Inflammatory and anti-nociceptive evaluation of roots extracts of *Bauhinia purpurea* linn. **Int. J. Phar. Chem. And Biol.Sci.**, 2(3): 225-235.
- Palacios, R. and Newton, W. E. (2005). **Genomes and Genomics of Nitrogen-Fixing Organisms.** Springer, dordrecht., 3: 1-6. U. S. A.

- Parveen, A.; Liu, W.; Hussain, S.; Asghar, J.; Perveen, S. and Xiong, Y. (2019). Silicon priming regulates morpho-physiological growth and oxidative metabolism in maize under drought stress. **Plants.**, 8(10): 431-438.
- Paudel, d.; Liu, F.; Wang, L.; Crook, M; Maya, S.; Peng, Z.; Kelley, K.; Ane, J. M. and Wang, J. (2020). Isolation and Characterization of Complete genome sequence of a *Bradyrhizobium* strain LB8 from nodules of peanut utilizing crack entry infection. **J. Microbiol.**, 11(93):1-15
- Paul, M. N.; Triveni, S.; Latha, P. C.; Patnaik, M. C. and Rao, A. M. (2018). Resistance of potential plant growth promoting Rhizobacteria to heavy metals (Ni, Cd, Co, Pb) isolated from polluted areas of Hyderabad. **Int. J. Curr. Microb. Appl. Sci.**, 7(8): 3583-3591.
- Pellock, B. J.; Cheng, H. P. and Walker, G. C. (2000). Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. **J. Bacteriol.**, 182: 4310-4318.
- Pellock, B. J.; Teplitski, M.; Boinay, R. P.; Bauer, W. D. and Walker, G. C. (2002). A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, 184(18): 5067-5076.
- Peters, N. K.; Frost, J. W. and Long, S. R. (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Sci.** 233: 977-980.
- Petit, A.; Stougaard, J.; Kuhle, A.; Marcker, K. A. and Tempe, J. (1987). Transformation and regeneration of Legume *Lotus corniculatus*: A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. **Mol. Gen. Genet.**, 207: 245-250.
- Prasad, C. K.; Vineetha, K. E.; Hassani, R. and Randhawa, G. S. (2000). Isolation and symbiotic characterization of aromatic amino acid auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. **Indian J. Exp. Biol.**, 38:1041-1049.
- Prescott, L. M. and Harley, J. P. (1996). **Laboratory Exercises in Microbiology**. 3th ed. WCB McGraw-Hill, Iowa, U.S.A.
- Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A.; Claire-Michèle, B. C. and Dusart, J. (2007). Microbiologie, chapitre 22. Les Bactéries. Les Protéobactéries. Ed. **De Boeck Université**;492. U.S.A.
- Primo, E. D.; Cossovich, S.; Nievas, F.; Bogino, P.; Humm, E. A.; Hirsch, A. M. and Giordano, W. (2019). Exopolysaccharide production in *Ensifer*

- meliloti* laboratory and native strains and their effects on *alfalfa* inoculation. **Arch. Microbiol.**, 202(2): 391-398.
- Priyanka, P.; Arun, A. B.; Ashwini, P. and Rekha. P. D. (2015). **Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18, Carbohydrate Polymers.**, 126: 215-221.
- Purwaningsih, S.; Agustiyani, D. and Antonius, S. (2021). Diversity, activity, and effectiveness of *Rhizobium* bacteria as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from Dieng, central Java. **Iranian J. Microbiol.**, 13(1): 130-138.
- Rana, S. and Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. **Int. J. Biolo. Macromolec.**, 157: 577-583.
- Rasulov, B. A.; Dai, J.; Pattaeva, M. A.; Yong-Hong, L.; Yili, A.; Aisa, H. A. and Li, W. J. (2020). Gene expression abundance dictated exopolysaccharide modification in *Rhizobium radiobacter* SZ4S7S14 as the cell's response to salt stress. **Int. J. Biol. Macromol.**, 164: 4339-4347.
- Rasulov, B.; Rustamova, N.; Yili, A.; Zhao, H. Q. and Aisa, H. A. (2015). Synthesis of silver nanoparticles on the basis of low and high molar mass exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 36 and its antimicrobial activity against some pathogens. **Folia Microbiol.**, 61(4): 283-293.
- Reinhold, B. B.; Chan, S. Y.; Reuber, T. L.; Marra, A.; Walker, G. C. and Reinhold, V. N. (1994). Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* RM 1021. **J. Bacteriol.**, 176: 1997-2002.
- Robert, J. B. (2005). **Genetics**. Macmillan Reference., The Gale Group Inc. U. S. A.
- Roberts, I. S. (1995). **Bacterial polysaccharides in sickness and health**. Microbiology., 141: 2023-2028.
- Rome, S.; Fernandez, M. P.; Brunel, B.; Normand, P. and Cleyet-Marel, J.C. (1996). *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual Medicago spp. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**; 46: 972-980.
- Roy, S.; Liu, W.; Nandety, R. S.; Crook, A.; Mysore, K. S.; Pislariu, C. I; Frugoli, J.; Dickstein, R. and Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 years of genetic discoveries in Legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell.**, 32: 15-41.

- Rozi, P.; Rasulov, B. A.; Waili, A.; Mijiti, Y.; Gao, Y. H.; Yili, A. and Aisa, H. A. (2018). Isolation, characterization, and antimicrobial activity of extracellular polypeptides from diazotrophic strain *Rhizobium radiobacter*. **Chem. Nat. Comp.**, 54(2): 330-333.
- Rozwandowicz, M.; Brouwer, M. S. M.; Fischer, J.; Wagenaar, J. A.; Gonzalez, B.; Guerra, B.; Mevius, D. J. and Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. **J. Antimicrob. Chemother.**, 73 (5): 1121-1137 .
- Rubio-Sanz, L.; Brito, B. and Palacios, J. (2018). Analysis of metal tolerance in *Rhizobium leguminosarum* strains isolated from an ultramafic soil. **FEMS Microbiol. Letters.**, 365(4): 10-17.
- Ruiz-Diez, B.; Quinones, M. A.; Fajardo, S.; Lopez, M. A.; Higuera, P. and Fernandez-Pascual, M. (2012). Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Biotechnol., Hg-contaminated soils. **Appl. Microbiol.**, 96(2): 543-554.
- Ryan, K.; George, R.; Nafees A.; Drew, W. L. and James, P. (2010). **Sherris Medical Microbiol.** 5th Edition, McGraw Hill. U.S.A.
- Sadowsky, M. J.; Keyser, H. H. and Bollool B. B. (1983). Biochemical Charecterization of fast and slow-grawing rhizobia that nodulates soybeans. **Int. J. Syst. Bacterial.**, 33: 716-722.
- Sahl, H. G. and Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram positive bacteria. **Ann. Rev. Microbiol.**, 52(1): 41-79.
- Samson, R. A.; Houbraker, J.; Thrane, U. and Frisvad, J. C. (2010). **Food and Indoor fungi.** Fungal Biodiversity centre. Netherlands., P: 1-398.
- Savran, D., Pérez-Rodríguez, F., & Halkman, A. K. (2018). Modeling the survival of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium during the fermentation of yogurt. **Food Sci. Technol Int.**, 24(2), 110-116.
- Scholla, M. H. and Elkan, G. H. (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 34(4): 484-486.
- Schumann, W. (2006). **Dynamics of the Bacteriol Chromosome:** Structure and Function, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, weinheim Germany.
- Sebuwufu, G. (2013). Physiology of genotype x soil fertility effects on yield and accumulation of iron and zinc in the common bean (*Phaseolus*

- vulgaris* L.) seed. Graduate Thesis and Dissertations. Iowa State University Ames, Iowa. U.S.A.
- Segovia, L.; Young, J. P. W. and Martinez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**; 43:374-377.
- Shahzad, H.; Iqbal, M. and Khan, Q. U. (2018). Rheo-chemical characterization of exopolysaccharides produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Turkish J. Biochem.**, 43(6): 686-692.
- Sharma, K.; Sharma, A.; Sharma, M. and Tanwar, K. (2014). Isolation of orientin and vitexin from stem bark of *Parkinsonia aculeata* (Caesalpinaceae) and their successive blending on sheep wool fiber. **Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.**, 6 (3): 557-561.
- Sharma, R. K. and Agrawal, M. (2005). Biological effects of heavy metals: an overview. **J. Environ. Biol.**, 26(2): 301-313.
- Sheahan, C. M. (2012). **Plant Guide for Cowpea (*Vigna unguiculata*).** USDANatural Resources Conservation Service, Cape May Plant Materials Center, Cape May, NJ. U. S. A.
- Silver, S. (1992) **Plasmid-determined metal resistance mechanisms:** range overview. *Plasmid*, 27(1) :1-3.
- Singh, A.; Ram, J.; Sikka, V. K. and Kumar, S. (1984). Derivation of marked strains in *Rhizobium leguminosarum* R1d1 by nitroguanine and transposon mutagenesis. **Indian J. Exp. Boil.**, 22: 239-247.
- Singh, B.; Kaur, R. and Singh, K. (2008). Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenum graecum* (fenugreek). **Afr. J. Biotech.**, 7 (20): 3671-3676.
- Skorupska, A.; Janczarek, M.; Marczak, M.; Mazur, A. and Krol, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories.**, 5: 11-19.
- Soltani, S.; Emamie, A. D.; Dastranj, M; Farahani, A.; Davoodabadi, A. and Mohajeri, P. (2018). Role of toxins of uropathogenic *Escherichia coli* in development of urinary tract infection. **British J. Phar. Res.**, 21(1): 1-11.
- Somasegaran, P. and Hoben, H. J. (1994). **Handbook of Rhizobia:** Methods in Legume- *Rhizobium* Technology. New York, Springer-Verlag., U. S. A.
- Souza, V.; Nguyen, T. T.; Hudson, R. R.; Pinero, D. and Lenski, R. E. (1992). Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium*

- populations: evidence for sex. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, 89(17): 8389-8393.
- Sowmya, B.; Venkat Kumar, S.; Karpagambigai, S.; Santhoshkumar, J. and Rajeshkumar, S. (2019). Antioxidant and antifungal activity of bacteria mediated silver nanoparticles using *Rhizobium* sp. **Indian J. Public Health Res Develop.**, 10(11): 195-201.
- Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Ann. Rev. Microbiol.**, 54: 257-288.
- Stedel, C.; Efroze, R. C. and Rosu, C. M. (2019). Textile dye bioremediation potential of some rhizobial strains and their heavy-metal and high salinity tolerance. **J. Experi. Molec. Biol.**, 20(2): 15-26.
- Stiens, M.; Schneiker, S.; Keller, M.; Kuhn, S.; Pühler, A. and Schlüter, A. (2006). Sequence analysis of 144-Kilobase accessory plasmid pSmeSM11a, isolated from adominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72 (5): 3662-3672.
- Stoczko, M.; Frere, J. M.; Rossolini, G. M. and Docquier, J. D. (2006). Postgenomic scan of metallo- β -lactamase homologues in rhizobacteria: identification and characterization of BJP-1, a subclass B3 ortholog from *Bradyrhizobium japonicum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 50(6): 1973-1981.
- Stolz, A. (2014). **Degradative plasmids from Sphingomonads**. FEMS. Microb. Lett., 350 (1): 9-19.
- Subudhi, S.; Sethi, D. and Kumar, P. S. (2020). Characterization of *Rhizobium* sp (SAR-5) isolated from root nodule of *Acacia mangium* L. **Indian J. Biochem. Biophysics**, 57(3): 327-333.
- Sullivan, J. T. and Ronson, C. W. (1998). Evolution of rhizobia by acquisition of a 500kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. **J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 95: 5145-5149.
- Sullivan, J. T.; Trzebiatowski, J. R.; Cruickshank, R. W.; Gouzy, J.; Brown, S. D.; Elliot, R. M.; Fleetwood, D. J.; McCallum, N. G.; Rossbach, U.; Stuart, G. S.; Weaver, J. E.; Webby, R. J.; de Bruijn, F. J. and Ronson, C. W. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. **J. Bacteriol.**, 184 (11): 3086-3095.
- Swamynathan, S. K. and Singh, A. (1995). Pleiotropic effects of purine auxotrophy in *Rhizobium meliloti* on cell surface molecules. **J. Biosci.**, 20: 17-28.

- Tadros, M. J.; Samarah, N. H. and Alqudah, A. M. (2011). Effect of different pre-sowing seed treatments on the germination of *Leucaena leucocephala* and *Acacia farnesiana* L. **New forests.**, 42(3): 397-407.
- Tanim, M. T. I.; Chowdhury, M. M. K.; Bari, L.; Rahaman, M. M.; Rahman, S. R. and Rahman, M. M. (2019). Genetic diversity of *Rhizobium* spp. isolated from soil samples of Bangladesh. **Bangladesh J. Microbiol.**, 36(1): 7-10.
- Terefework, Z.; Nick, G.; Suomalainen, S.; Paulin, L. and Lindström, K. (1998). Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 48(2): 349-356.
- Teresa, M. S.; Goma-Tchimbakala, J.; Eckzechel, N. S. A. and Aimé, L. A. (2021). Isolation and characterization of native *Rhizobium* strains nodulating some legumes species in South Brazzaville in Republic of Congo. **Advances in Biosci. Biotech.**, 12(1): 10-30.
- Terlizzi, M. E.; Gribaudo, G. and Maffei, M. E. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. **Front Microbiol.**, 8(1566): 1-23.
- Thanbichler, M.; Viollier, P. H. and Shapiro, L. (2005). The structure and function of the bacterial chromosome. **Curr. Op. Genetics. Devel.**, 15 (2): 153-162.
- Thomas, J. E.; Bandara, M.; Lee, E. L.; Driedger, D. and Acharya, S. (2011). Biochemical monitoring in fenugreek to develop functional food and medicinal plant variants. **New Biotech.**, 28(2): 110-117.
- Tille, P. M. (2017). Baily and Scott's **Diagnostic Microbiology**. 41th ed. Elsevier, Inc. China. 1115pp.
- Tirichine, L.; Sandal, N.; Madsen, L. H.; Radutoiu, S.; Albrektsen, A. S.; Sato, S.; Asamizu, E.; Tabata, S. and Stougaard, J. (2007). A gain of function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. **Sci.**, 315(5808): 104-107.
- Truchet, G.; Roche, P.; Lerouge, P.; Vasse, J.; Camut, S.; de Billy, F.; Promé, J. C. and Dénarié, J. (1991). Sulphated lipooligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. **Nature**, 351: 670-673.
- Tyagi, A.; Kumar, V. and Tomar, A. (2017). Isolation, identification, biochemical and antibiotic sensitivity characterization of *Rhizobium* strains from *Vigna mungo* (L.) Hepper, *Cicer arietinum* (L.) and *Vigna*

- radiata* (L.) Wilczek in Muzaffarnagar, Uttar Pradesh, India. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, 6(12): 1-13.
- Vahedi, A. (2011). The effects of micronutrient application on soybean seed yield and on seed oil and protein content. **J. Am. Sci**, 7(6): 672-677.
- Van Berkum, P.; Beyene, D.; Bao, G.; Campbell, T. A. and Eardly, B. D. (1998). *Rhizobium mongolense* sp. nov. in one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen fixing symbioses with *Medicago ruthenica* L. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**; 48: 13-22.
- Van Hoek, A. H.; Mevius, D.; Guerra, B.; Mullany, P.; Roberts, A. P. and Aarts, H. J. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **J. Front. Microbiol.**, 2(203): 1-27.
- Vanderlinde, E. M.; Harrison, J. J.; Muszynski, A.; Carlson, R. W.; Turner, R. J. and Yost, C. K. (2010). Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **FEMS Microbiol Ecol.**, 7(1): 32-40.
- Vincent, J. M. (1970). **A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria**. I. B. P. Handbook No. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. U.K.
- Vincent, J. M. (1982). **Nitrogen fixation in legumes**. Academic Press Sydney. New York, London.
- Vincent, J. M.; Nutman, P. S. and Skinner, F. A. (1979). **The Identification and Classification of *Rhizobium***. In: **Identification Methods for Microbiologist** (Eds., F. A. Skinner and D. W. Louelock). Academic Press, London, UK. pp. 49-89.
- Wadhwa, Z.; Srivastava, V.; Rani, R.; Tanvi.; Makkar, K. and Jangra, S. (2017). Isolation and characterization of *Rhizobium* from chickpea (*Cicer arietinum*). **Int. J. Curr. Microbial. App. Sci.**, 6(11): 2880-2893.
- Wang, E. T. and Martinez-Romero, E. (2000). *Sesbania herbacea*–*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. **Microbe. Ecol.**, 40(1): 25-32.
- Wang, E. T.; Van Berkum, P.; Beyene, D.; Sui, X. H.; Dorado, O.; Chen, W. X. and Martínez-Romero, E. (1998). *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 48(3): 687-699.

- Wang, E. T.; Van Berkum, P.; Sui, X. H.; Beyene, D. E. S. T. A.; Chen, W. X. and Martínez-Romero, E. (1999). Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 49(1), 51-65.
- Wani, P. A.; Khan, M. S. and Zaidi, A. (2006). An Evaluation of the effects of heavy metals on the growth, seed yield and grain protein of lentil in pots. **Ann. Appl. Biol.**, 27: 23-24.
- Wekesa, C. S.; Furch, A. C. and Oelmüller, R. (2021). Isolation and Characterization of High-Efficiency Rhizobia from Western Kenya Nodulating with Common Bean. **Frontiers Microbial.**, 12: 597-667.
- Xu, H.; Hu, G.; Dong, J.; Wei, Q.; Shao, H. and Lei, M. (2014). Antioxidative Activities and Active Compounds of extracts from Catalpa plant leaves. **Sci. World J.**, 10: 1-7.
- Yost, C. K.; Rath, A. M.; Noel, T. C. and Hynes, M. F. (2006). Characterization of genes involved in erythritol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **Microbiol.**, 152 (7): 2061-2074.
- Young, J. P.; Crossman, L. C.; Johnston, A. W.; Thomson, N. R.; Ghazoui, Z. F.; Hull, K. H.; Wexler, M.; Curson, A. R.; Todd, J. D.; Poole, P. S.; Mauchline, T. H.; East, A. K.; Quail, M. A.; Churcher, C.; Arrowsmith, C.; Cherevach, I.; Chillingworth, T.; Clarke, K.; Cronin, A.; Davis, P.; Fraser, A.; Hance, Z.; Hauser, H.; Jagles, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Norbertczak, H.; Rabbinowitsch, E.; Sanders, M.; Simmonds, M.; Whitehead, S. and Parkhill, J. (2006). The Genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. **Genome Biol.**, 7 (4): 1-20.
- Yuan, K.; Reckling, M.; Ramirez, M. D. A.; Djedidi, S.; Fukuhara, I.; Ohyama, T. and Ohkama-Ohtsu, N. (2020). Characterization of rhizobia for the improvement of soybean cultivation at cold conditions in central Europe. **Microb. Environ.**, 35(1): 1-13.
- Zafar, M.; Maqsood, M.; Anser, M. R. and Ali, Z. (2003). Growth and yield of lentil as affected by phosphorus. **Int. J. Agric. Biol.**, 5(1): 98-100.
- Zarazaga, M., Gómez, P., Ceballos, S., & Torres, C. (2018). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* lineages in the animal–human interface. **Staphylococcus aureus**, 6: 189-214.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. (1997). Succinoglycan and galactoglucan. **Carbohydrate Polym.**, 33(2-3): 139-144.

- Zhang, S.; Yang, S.; Chen, W.; Chen, Y.; Zhang, M.; Zhou, X. and Feng, F. Y. (2017). *Rhizobium arenae* sp. nov., isolated from the sand of Desert Mu Us, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67(7): 2098-2103.
- Zhou, R.; Wu, Z.; Chen, C.; Han, J.; Ai, L. and Guo, B. (2014). Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties, *Food Hydrocolloids* 36: 362-368.
- Zolgharnein, J.; Shariatmanesh, T.; Asanjarani, N. and Zolanvari, A. (2015). Doehlert design as optimization approach for the removal of Pb (II) from aqueous solution by *Catalpa Speciosa* tree leaves: adsorption characterization. *Desalin Water Treat.*, 53(2): 430-445.

of the four selected rhizobial strains revealed that Unknown Query_12861 isolate corresponded 98.55% with *Rhizobium nepotum* 39/7 NR_117203.1, whereas Unknown Query_22767 isolate were corresponded 98.12% with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370 NR_118339.1. Regarding Unknown Query_70219 isolate were 98.42% correspond with *Rhizobium glycinendophyticum* NR_165782.1. The percentage of corresponding of Lel Query_16169 were 97.89% with *Rhizobium leguminosarum* strain LMG 14904.

Abstract

In this study, a 42 different rhizobial isolates were obtained and purified from a nitrogen fixing plants. The isolates were collected from root nodules of different rural areas in Nineveh, Al- Anbar, Baghdad Governorates, and Duhok-Kurdistsn/Iraq. Rhizobial isolates OJ27, OJ29 are first isolated from *Bauhinia purpuria* L., Where are still unkown and were not mentioned in the literatures up to date. For a first time in the world (up to our knowledge), New isolates OJ30 were isolated from *Catalpa speciose* L. Biochemical tests revealed that all isolates are able to grow on Rhizobial Minimal Medium, whereas isolates were variant in their ability to liquefy gelatin. All the isolates were able to utilize citrate as a sole carbon source, except of *R. grahamii* OJ26, OJ35 which were isolated from *Leucaena leucocephala* L. and *Bauhinia purpuria* L., respectively. Most of the isolates showed a positive result to Triple Sugar Iron test. Sugar alcohol mannitol were preferred by all the rhizobial isolates as a sole carbon source. Most of the isolates tolerated to NaCl up to 6.0% concentration, except the isolate *Mesorhizobium loti* OJ33 which was sensitive to this concentration. There were variations in sensitivity and resistance to antibiotics, All the isolates showed sensitivity to Ciprofloxacin 10 µg/ml. There was variation in resistance against heavy metals. Most of the isolates showed a clear resistance to Pb (CH₃COO)₂ (100 µg/ml). All the isolates showed a positive result for production of cell surface molecules and the maximum EPS production average were 280 mg/ml by the isolate *R. leguminosarum* bv. *viciae* OJ4. Antimicrobial activity study revealed that a maximum mean inhibition zone was 16.6 mm when a culture supernatant of OJ31 rhizobial isolated from root nodules of *Parkinsonia aculata* L. against *Candida albicans* AS43. A maximum mean inhibition zone value was 13.3 mm when a culture supernatant of OJ6 applied against a pathogenic fungi *Aspergillus niger* BI1. Sequence aligment of 16 S rRNA sequencing

University of Mosul
College of Education
For Pure Science



**Isolation and Characterization of Rhizobial
Bacterial species from Different Local Plants and
Study Their Antimicrobial Activity Against Some
of Microbes**

Omar Hammad Jumaah

M. Sc. Thesis
Biology

Supervised By

Assist. Prof.

Dr. Raad Hassani Sultan Allawy

Assist. Prof.

Dr. Mahde Saleh Assafi

2022 A.D.

1443 A.H.