

عزل جرثومة *Sinorhizobium meliloti* المعايشة لنبات الجت وتشخيصها مع دراسة تأثير الملوحة والأس الهيدروجيني عليها

ISSN 1817 - 2695

¹باسل عبدالزهرة عباس ، ²جبار دهري ، ²غصون فاضل

¹كلية الطب البيطري

²كلية العلوم/جامعة البصرة

((الاستلام 2009/9/30 ، القبول 2010/4/13))

الخلاصة

جمعت 60 عزلة من جرثومة *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنبات الجت *Medicago sativa* ودرست الصفات المظهرية لمستعمرات الجرثومة بعد زراعتها على وسط مستخلص الخميرة مع التريبتون (TY). لقد اظهرت النتائج أن جميع العزلات سالبة لصيغة كرام و ذات شكل عصوي وكانت جميعها متحركة نتيجة تكوين Cyclic β (1-2) glucans . كما اظهرت العزلات جميعها قدرتها على انتاج Cellulose fibrils و عدم قدرتها على انتاج β - (1→3) glucans . وكونت جميع العزلات عقداً جذرية على جذور النباتات الملقحة بعد فترة حضانة لمدة اسبوعين. و اشارت النتائج أن إضافة المضادات الحيوية gentamycine, amoxicilline الى الاوساط الزرعية بتركيز مختلفة ادى الى تثبيط نمو بعض العزلات وعدم تأثر العزلات الاخرى. وتبين أن العزلات جميعها نمت بصورة جيدة على الوسط الزرعى الصلب بعد اضافة ملح كلوريد الصوديوم له بالتركيز 2% او 3% الا ان التركيز 7% تثبط نمو العزلات جميعها. اما بالنسبة لتأثير ملح كبريتات البوتاسيوم فظهر ان جميع العزلات قد نمت في التراكيز التالية (2% , 3% , 4%) ولم تظهر العزلات قدرة على تحمل الملح في التركيز 7.5%. وكانت جميع العزلات غير قادرة على النمو في الوسط ذا الدالة الحامضية 4 في حين أظهرت العزلات كافة قدرتها على النمو بارتفاع الدالة الحامضية فقد لوحظ نمو العزلات جميعها في الدالة الحامضية (6-10) وبصورة جيدة . كما درس المحتوى النيتروجيني للنباتات الملقحة بالجراثيم وتم تحديد الصفات الكيميائية لعينات التربة التي جمعت في اثناء الدراسة.

المقدمة

بتثبيت النيتروجين حيويًا Biological Nitrogen Fixation ، وأن 90% من النيتروجين المضاف الى التربة يأتي طبيعياً عن طريق التثبيت الحيوي بوساطة أنواع معينة من الجراثيم والطحالب الخضراء المزرقية (Cyanobacteria) والفطريات الشعاعية والأوالي الحيوانية ، اذ تحول النيتروجين الجوي الى أمونيا . هذه الاحياء تصنف الى مجموعة تعيش بصورة حرة في البيئه مثل جرثومة الـ *Azotobacter* واخرى تكون متعايشة مع احياء اخرى ومثال عليها *Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Rhizobium* ، وتعدّ المجموعة الثانية أكثر أهمية كون الجراثيم فيها تثبت

يعدّ النيتروجين الجوي المصدر الأساس للنيتروجين الموجود في البروتينات والاحماض النووية والمكونات النيتروجينية الحيوية الاخرى في جميع الخلايا الحية (31) ، أذ يشكل غاز النيتروجين 80% من حجم الغلاف الجوي وهو المخزن الرئيس له (21; 34) والنيتروجين من أهم العناصر الغذائية التي يحتاجها النبات بكميات كبيرة ويلي عناصر الكربون والهيدروجين (11; 50) .

وتمتلك بعض الكائنات الحية بدائية النواة القدرة على تحويل غاز النيتروجين الى أمونيا ، ويطلق على هذه العملية

التربة والتي تقدر 125-335 كغم N/هكتار سنوياً (7) ، وهو يزرع عالمياً في أكثر من 20 مليون هكتار (1).

ولارتفاع نسبة الملوحة ولاسيما في المناطق الجنوبية من العراق فقد اجريت هذه الدراسة التي هدفت الى عزل جراثيم *Sinorhizobium meliloti* من نبات الجت في مواقع مختلفة من محافظة البصرة ودراسة قدرة العزلات على تحمل مديات مختلفة من الملوحة والذالة الحامضية (pH).

أتبعت نفس الطريقة في الخطوة السابقة بعد اضافة 0.02% من صبغة congo red و ملاحظة تصبغ المستعمرات او عدم تصبغها (48) .

اختبار قدرة العزلات على الحركة بانتاج glucans (2 - 1) - Cyclic β

أجري هذا الاختبار على وسط TY و المضاف له 0.3% من الاكار Agar فقط، و تم ملاحظة أنتشار المستعمرات على سطح الطبق او عدم انتشارها (48) .

أختبار قابلية العزلات على اصابة النبات البقولي
تم في هذه الطريقة تلقیح النبات البقولي الجت (*Medicago sativa L.*) الذي تم تمييزه في انابيب زجاجية على الوسط الزرعي الخالي من النتروجين (Nitrogen free medium) بجرثومة *S.meliloti* النقية والمعزولة مسبقاً وهذا العمل تم تحت ظروف مسيطر عليها من الضوء ودرجة الحرارة بعد ذلك تم تمييز الجرثومة على اساس تكوين العقد الجذرية او عدم تكوينها على نبات الجت (13) ; (18).

اختبار قابلية نمو العزلات الجرثومية على تراكيز مختلفة من المضادات الحيوية

اجريت هذه التجربة لغرض التمييز بين العزلات المختلفة وفقاً لحساسيتها للمضادات الحيوية المختلفة والمستخدم مع الوسط الزرعي (TY) الصلب وقد استخدمت المضادات الحيوية التالية ابتداءً من التركيز 50 مايكروغرام/

النتروجين بالتعايش مع جذور النباتات البقولية (15) ; 21 . (56)

تعَدّ الملوحة و الذالة الحامضية من العوامل البيئية المهمة ذات التأثير الفعال على معدل بقاء الرايزوبيا في التربة ويعدّ نبات الجت (*Medicago sativa L.*) من أهم المحاصيل البقولية العلفية ذات القيمة الغذائية العالية والانتاج العالي المستمر لمواسم عديدة واحتوائه على كمية كبيرة من البروتين فضلاً عن دوره المهم في ادامة خصوبة التربة وتحسينها من خلال كمية النتروجين التي يثبتها في

طرائق العمل

جمع العينات

جمعت 150 عينة من نبات الجت (*Medicago sativa L.*) المحتوية على العقد الجذرية (الوردية اللون) من مناطق مختلفة في محافظة البصرة (الهارثة وابوالخصيب وشط العرب) وأخذت نماذج للتربة من نفس المناطق بعمق 0-30 سم لدراسة بعض الصفات الكيميائية لها ووضعت في اكياس نايلون نظيفة ثم نقلت الى المختبر لغرض عزل جراثيم *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لها وذلك حسب طريقة (51,8) وقد استخدم لهذا الغرض الوسط الزرعي التريبتون و مستخلص الخميرة Trypton Yeast Extract Agar (TY) حضنت الإطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 28 ± 2 م° لمدة 2-4 ايام . لوحظ بعد هذه الفترة نمو مستعمرات بيضاء شفافة لزجة القوام .

الاختبارات التشخيصية للجراثيم

اجريت الاختبارات التالية على العزلات الجرثومية

:-

اختبار قدرة الجراثيم على انتاج Cyclic β - (1- 3) glucans

تم تخطيط العزلات الجرثومية على وسط TY الصلب المحتوي على 0.02% من صبغة الانلين الازرق (*aniline blue*) حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 28 ± 2 م° لمدة 48 ساعة لملاحظة تصبغ العزلات او عدم تصبغها (48) .

اختبار قدرة الجراثيم على انتاج الباف السليلوز Cellulose fibrils

نفذت هذه التجربة لمعرفة تأثير الدالة الحامضية في نمو *S. meliloti* فقد حضرت أطباق من الوسط الزراعي TY وعدلت دالته الحامضية على مديات مختلفة من (10-4 pH) باستخدام حامض الهيدروكلوريك (1N) HCl او هيدروكسيد الصوديوم (1N) NaOH. خطت العزلات عليه ثم حضنت بالحاضنة بدرجة 28 ± 2 م لمدة 24 ساعة لملاحظة النمو من عدمه (14; 24).

صفات النباتات المدروسة

أخذت القياسات المطلوبة للنباتات بعد مرور 45 يوماً من تلقیح النباتات بجرثومة العقد الجذرية *S. meliloti* الأبوية والمطفرة وحسب (30) وشملت ارتفاع النبات وتم قياسه باستخدام المسطرة و عدد الثفرعات ووزن المادة الجافة للأجزاء الخضرية بعد أن جففت في الفرن تحت درجة حرارة 70 م و لمدة 48 ساعة كما سجل عدد العقد الجذرية ووزنها الجاف.

قدر محتوى النتروجين في النبات حسب طريقة (16) حيث تم هضم النباتات المجففة باستخدام حامض الكبريتيك المركز و البيركلوريك وحسب طريقة (20). وبعد الحصول على العينات المهضومة استخدمت في تقدير محتوى النتروجين باستخدام جهاز كدال.

تحليل التربة

قدر التوصيل الكهربائي في رشح التربة بنسبة 1:1 باستخدام جهاز Ec .meter نوع Lf91 شركة الصنع WTW حسب (46). كما استخدم معلق تربة:ماء بنسبة 1:1 لقياس الدالة الحامضية باستخدام جهاز pH-meter نوع Cp-411 شركة الصنع ELMETRON (46).

مللية
ampicilline, chloramphenicol, streptomycine, erythromycine, gentamycine, amoxicilline.

تحضير اللقاح الجرثومي

نقلت مستعمره واحده من الجرثومة النامية على الوسط الزراعي (TY) الصلب لايتعدى عمرها 24 ساعة بواسطة شراج ناقل الى انبوب اختبار يحتوي 5 مل من المحلول الملحي الفسلي ثم لقت الاطباق المحتوية على الوسط الزراعي TY المضاف اليه تراكيز المضادات الحيوية المختلفة بالمعلق الجرثومي باستخدام ماصة دقيقة بحجم 0.1 مل على شكل قطرات على سطح الاكار و تركت الاطباق الملقحة فترة من الوقت الى ان يتم امتصاص الوسط للقاح بصورة كاملة بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 28 ± 2 لمدة 7 ايام (2).

دراسة تأثير الملوحة في نمو *Sinorhizobium meliloti*

استخدم الوسط الزراعي TY الصلب و اضيف اليه ملح كلوريد الصوديوم NaCl او كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4 بتراكيز مختلفة (2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 7.5) % . خطت العزلات على الأوساط الزراعية و حضنت بالحاضنة بدرجة حرارة 28 ± 2 م لمدة 4-6 ايام ، بعد هذه الفترة تم ملاحظة النمو من عدمه (44; 47).

دراسة تأثير الدالة الحامضية في نمو *Sinorhizobium meliloti*

النتائج

الصفات الزراعية و المظهرية لمستعمرات *Sinorhizobium meliloti*

لقد اظهرت نتائج التصبغ بصبغة كرام أن جميع العزلات سالبة لصبغة كرام و ذات شكل عصوي عند فحصها بالمجهر الضوئي على قوة تكبير 100 X كما في الصورة (1-A) وكانت جميع العزلات متحركة من خلال ملاحظة انتشار النمو على سطح وسط TY المحتوي 0.3% اكار بعد فترة حضن 24-48 ساعة، وكما في الصورة (1-B). نتيجة تكوين β cyclic glucans (1-2).

تم الحصول على 60 عزلة من جرثومة *S. meliloti* عزلت من العقد الجذرية لنبات الجت جدول (1) و درست الصفات المظهرية لمستعمرات جرثومة *S. meliloti* المعزولة بعد زراعتها على وسط مستخلص الخميرة مع التريبتون (TY)، اذ لوحظ شكل المستعمرات بعد مرور 24-48 ساعة من الحضن و بدرجة حرارة 28 ± 2 م و تميزت هذه المستعمرات بالصفات المظهرية الموضحة في جدول (2).

كلما زاد تركيز الملح فقدت نموت 6 عزلات فقط وكان نموها ضعيفاً عند التركيز 6% كلوريد الصوديوم وعند التركيز 7% ثبت نمو العزلات جميعها. اما بالنسبة لتأثير ملح كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4 في نمو *S. meliloti* فظهر ان جميع العزلات قد نمت في التراكيز التالسية (2% ، 3% ، 4%) وعند التركيز 5% ظهر نمو 59 عزلة و ثبت نمو عزلة واحدة فقط بينما عند التركيز 6% ثبت نمو 4 عزلات، اما في التركيز 7% ثبت نمو 14 عزلة ولم تظهر العزلات قدرة على تحمل ملح كبريتات البوتاسيوم في التركيز 7.5% ، فقد ثبتت العزلات جميعها عند هذا التركيز.

5.3 تأثير الدالة الحامضية على نمو عزلات

Sinorhizobium meliloti

أشارت النتائج في جدول (5) أن جميع العزلات غير قادرة على النمو في الوسط ذا

الدالة الحامضية 4 و أظهرت 55 عزلة نمواً ضعيفاً عند الدالة الحامضية 5 ، في حين أظهرت العزلات كافة قدرتها على النمو بارتفاع الدالة الحامضية فقد لوحظ نمو العزلات جميعها في الدالة الحامضية من 6-10 وبصورة جيدة .

10.3 تقدير محتوى النتروجين في النباتات

أثارت نتائج تقدير المحتوى النتروجيني للنباتات الملقحة بالجرثيم الى تشابهها في معظم مناطق الدراسة وتراوح بين (0.623-0.644)%.

11.3 بعض الصفات الكيميائية للتربة المدروسة

أظهرت نتائج تحديد الصفات الكيميائية لعينات التربة التي جمعت اثناء الدراسة وجود تغاير في صفات تلك البيئات من ناحية الدالة الحامضية والملوحة ، فقد ظهر أن التربة المدروسة جميعها، تتدرج من ناحية الدالة الحامضية نحو القاعدية، اذ بلغ اعلى درجة للدالة الحامضية في التربة التي جمعت من منطقة نهر حسن / شط العرب (العينة 27) وتساوي $pH=8.2$ وادنى درجة للدالة الحامضية تم الحصول عليها في التربة التي جمعت من منطقة (العينة 52) وكانت $pH=7.0$ ، اما فيما يتعلق بملوحة التربة المدروسة فقد وجد أنها متفاوتة في البيئات المختلفة، إذ تبين أن اعلى نسبة ملوحة تم الحصول عليها في تربة شط العرب (العينة 20)

كما اظهرت العزلات جميعها قدرتها على انتاج Cellulose fibrils من خلال انتاج نمو جرثومي ذا لون احمر ، نتيجة لامتصاصها صبغة congo red كما هو موضح في الصورة (1-C) ، الا انها اظهرت عدم قدرتها على انتاج Cyclic $\beta - (1 \rightarrow 3)$ glucans، نتيجة لعدم تصبغها بصبغة aniline blue ، اذ ظهر النمو الجرثومي بلون ابيض بدلا من اللون الازرق، الصورة (1-D)

اختبار قابلية إصابة النباتات بالجرثيم المعزولة

تبين من خلال تلقح النباتات المزروعة في انابيب زجاجية محتوية على وسط مغذي خال من النتروجين بالجرثيم المعزولة أن جميعها كونت عقداً جذرية على جذور النباتات الملقحة بعد فترة حضان لمدة اسبوعين ، وظهرت العقد بلون وردي وذات حجم متوسط، كما موضح في الصورة (1-E) .

قابلية نمو العزلات الجرثومية في تراكيز مختلفة من

المضادات الحيوية

تم اختبار قابلية نمو عزلات *Sinorhizobium meliloti* تجاه 6 من المضادات الحيوية المختلفة، وتشير النتائج الى أن إضافة المضادات الحيوية المختلفة الى الاوساط الزرعية بتراكيز مختلفة ادى الى تثبيط نمو بعض العزلات وعدم تأثر العزلات الاخرى. وقد لوحظ أن كل العزلات كانت مقاومة للمضاد الحيوي Chloramphenicol بالتركيز 50مايكروغرام/مل ، كما كانت كل العزلات حساسة للمضاد الحيوي Gentamycin بنسبة تثبيط 100% بالتركيز 200مايكروغرام/مل، و اظهرت العزلات حساسية مختلفة تجاه المضادات الأخرى (جدول 3).

تأثير الملوحة في نمو *Sinorhizobium meliloti*

توضح النتائج في جدول (4) تأثير ملح كلوريد الصوديوم على نمو *S. meliloti* ، اذ تبين أن العزلات جميعها نمت بصورة جيدة على الوسط الزراعي الصلب (TY) بعد اضافة الملح له بالتركيز 2% او 3% ثم اخذت بالانخفاض عند زيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم الى 4% فقد نمت 58 عزلة في هذا التركيز اما عند تركيز 5% فظهر نمو 25 عزلة وعند تركيز 5.5% نمت 10 عزلات فقط ثم أخذت اعداد الجرثيم بالانخفاض

وكم اميين في جدول (6).

كان في تركيز ملحي 2% من كلوريد الصوديوم، وأخذت اعدادها بالانخفاض بارتفاع تركيز الملوحة وأشار الى وجود نمو ضعيف في تركيز 7% كلوريد الصوديوم في الوسط الزراعي السائل والسبب كما ذكر آنفاً. فضلاً عن ذلك أن قدرة بعض العزلات للنمو بصورة ضعيفة في التركيز 6% كلوريد الصوديوم قد تعزى الى قابلية العزلات على تجميع منظمات تنافذية في خلاياها نتيجة لزيادة نشاط بعض الانزيمات (53) مثل حوامض امينية (حامض الكلوتاميك وحامض البرولين) والبيبتيد الثنائي-N acetylglutaminylglutamine amide والسكريات الثنائية مثل التريهالوز (trehalose) ومركبات اخرى مثل كلايسين بيتين glycine betaine وأيون البوتاسيوم K^+ مما يساعد في بقاء الخلية منتفخة وبالتالي يقل الضرر الناتج من الأملاح (45;23).

وأجريت في محافظة البصرة دراسة من قبل (6) اشار فيها الى وجود اختلاف بين سلالات وعزلات *S. meliloti* (المعزولة من منطقة الهارثة و سلالات مرجعية أخرى حصل عليها من الولايات المتحدة في فترة تحملها للملوحة، إذ كان افضل نمو لها عند ملوحة الوسط 1.05 ديسيسيمنز / متر 2 و اقل نمو عند المستوى الملحي 12 ديسيسيمنز/ متر 2 في الوسط الغذائي السائل.

ووجد (25) أن بعض سلالات *Rhizobium meliloti* كانت متحملة لتركيز 2% كلوريد الصوديوم واستنتجوا أن التركيز الحرج لهذه السلالات كان عند 3% كلوريد الصوديوم، كما لاحظ (17) نمو سلالات *S. meliloti* في تركيز 300 مليمول/لتر واثبت (9) أن بقاء سلالات الرايزوبيا المعزولة من نبات الجبت في الترب المالحة اقل مما هو عليه في الترب غير المالحة وذلك نتيجة للتأثير الأيوني للملح على النظام الحيوي للجراثيم .

لذا تبين من خلال مقارنة الدراسة الحالية والدراسات التي سبقتها أن هناك مديات مختلفة من التراكيز الملحية للتربة العراقية كما أن عزلات *S. meliloti* لها مديات

وكانت تساوي 8.7 ديسيسيمنز /م و اقل نسبة ملوحة وجدت في تربة منطقة (العينة 44) وتساوي 1.5 ديسيسيمنز /م

المناقشة

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص 60 عزلة جرثومية لـ *S. meliloti* من بين 150 عينة نبات جمعت من مناطق مختلفة في محافظة البصرة وكانت صفات العزلات مطابقة لما ذكر في Bergyes manual (28;19,8) (و اظهرت العزلات المدروسة قدرتها على الحركة و انتاج الياف السليلوز ، وتشير النتائج الى عدم قدرة العزلات على انتاج Cyclic β - (1→3)glucans، إذ ظهر النمو بلون ابيض بدلا من اللون الأزرق للصبغة المستخدمة ، وأنتقت هذه النتائج مع ما توصل اليه (48.12) عند دراستهم على جرثومة *S. meliloti* المعزولة من العقد الجذرية لنبات الجبت في الهند .

هذا فضلاً عن الطرائق السابقة اعتمد في التشخيص على قابلية العزلات على اصابة نبات الجبت وتكوين العقد الجذرية عليه، واتضح من خلال النتائج قدرة جميع العزلات على الأصابة وتكوين العقد الجذرية عليها بعد اسبوعين من الحضان، إذ ظهرت العقد بلون وردي ومتوسطة الحجم، و تمتاز هذه العقد بكفاءتها على تثبيت النتروجين، إذ ظهر ذلك واضحا على نمو الجزء الخضري والمجموع الجذري وهذا يدل أن العزلات تمتاز بصفة التخصص لاصابة نباتات الجبت وهذا ما اشار اليه (18) في دراسته .

وتوضح النتائج في الجدول (4) تأثير ملحي كلوريد الصوديوم و كبريتات البوتاسيوم في نمو *S. meliloti*، إذ تبين خلال الأختبارات أن أفضل نمو لها ظهر عند التركيز 2% ما يعادل 0.3 مول / لتر كلوريد الصوديوم و 0.1 مول / لتر كبريتات البوتاسيوم ، وبعد ذلك اخذت اعدادها بالانخفاض بزيادة تركيز الملح وثبط نمو العزلات جميعها في التركيز 7% كلوريد الصوديوم ما يعادل 1.2 مول / لتر و 7.5 % كبريتات البوتاسيوم ما يعادل 0.43 مول / لتر ، قد يعود ذلك الى طبيعة الملوحة الموجودة في المنطقة والتربة التي عزلت منها وكذلك الى اختلاف التركيب الوراثي للعزلات (54) و ذكر (10) أن أفضل نمو لـ *S. meliloti* المعزولة من منطقة الهارثة في البصرة

ولاحظ (52) نمو جميع السلالات المعزولة من نبات الجت (*M. sativa* L.) في دالة حامضية 10 وثبط نموها في دالة حامضية 3.5 .

وأشار (33) الى أن قيم الدالة الحامضية العليا والسفلى تحدد عادة توزيع الـ *Rhizobium* وعملية تثبيت النترجين تعايشياً. واستخدمت سلالات *S. meliloti* المتحملة للحموضة لإنجاح زراعة نبات *Medicago polymorpha* في أكثر من 350000 هكتار في الترب الحامضية في استراليا(29).

وجد في هذه الدراسة أن إضافة المضادات الحيوية المختلفة الى الأوساط الزراعية بتركيز مختلفة أدت الى تثبيط نمو بعض العزلات وعدم تأثر العزلات الأخرى وبالتالي يمكن التمييز بينها، قد يعزى مثل هذا التغير الى الأختلاف في التركيب الوراثي لهذه العزلات من جهة اوالى آلية عمل المضادات الحيوية من جهة أخرى (4) وتعدّ مقاومة المضادات الحيوية صفة مهمة عرفت في العديد من مجاميع الكائنات الحية المجهرية التي تلعب دوراً مهماً في الفعاليات البيئية فهناك الكثير من الأحياء المجهرية التي تقاوم التأثير المثبط أو القاتل للمضادات الحيوية ، إذ تشير العديد من الدراسات الى استخدام المضادات الحيوية لتشخيص سلالات الرايزوبيا (*Rhizobia*) وتمييزها هذا فضلاً عن الطرائق الكيموحيوية والأختبارات الأيضية والعلامات الوراثية المتبعة في التشخيص (25 ; 32 , 35 ; 37).

ولوحظ في الدراسة الحالية أن العزلات كلها مقاومة للمضاد الحيوي Chloramphenicol بالتركيز 50مايكروغرام / مل وذلك قد يعود الى أن هذه العزلات لديها القدرة على انتاج الانزيمات المسؤولة عن تحطيم أو ابطال تأثير هذا المضاد ، كما كانت كل العزلات حساسة للمضاد الحيوي Gentamycin بنسبة تثبيط 100% في التركيز 200مايكروغرام/ مل قد يكون نتيجة عدم امتلاك العزلات القابلية على انتاج الانزيمات المسؤولة عن ابطال تأثير هذا المضاد (36) وذكر(26) أن الرايزوبيا المعزولة جميعها من نبات الفاصوليا *Phaseolus* كانت مقاومة للمضادين الحيويين (Ampicillin و Streptomycin) و بدرجه اقل للمضاد الحيوي Chloramphenicol. و لاحظ

مختلفة من الملوحة بالامكان أن تتحملها لتتمكن من النمو والتكاثر واصابة النبات

ويوضح الجدول (4) أن نمو عزلات *S. meliloti* كان افضل في الدالة الحامضية المتعادلة والقاعدية فضلاً عن قدرتها على النمو في الدالة الحامضية 6 وبصورة اقل في الدالة الحامضية 5 وانعدام النمو في الدالة الحامضية 4 وهذا يدل على تناقص اعداد *Rhizobium* sp. في الترب ذات الدالة الحامضية الواطئة ولاسيما جرثومة *S. meliloti* قد يعود ذلك الى طبيعة التركيب الوراثي للعزلات والبيئة التي عزلت منها (22, 27, 39) إذ أشار (40) الى وجود جينات في سلالة *S. meliloti* WSM419 مثل الجين *phrR* يستحث في الدالة الحامضية الواطئة وكذلك شخص الجين *lpiA* (الذي يكون محمول على الحامض النووي DNA في سلالة *S. medicae* WSM419 المتحملة للحامضية واكد على وجود هذا الجين في جرثومة *S. meliloti* 1021 (43) ووضح (41) أن مقاومة جنس *Sinorhizobium* للحامضية يعود الى تنشيط جين معين، وأشار الى تشخيص خمسين بروتيناً منظماً للدالة الحامضية .

ووجد (42) أن عدد خلايا *R. meliloti* تساوي 10^5 او اكثر في الغرام الواحد من التربة عندما تكون الدالة الحامضية للتربة تساوي 6، وتعدّ *R. meliloti* حساسة جداً للدالة الحامضية الواطئة ولكن هناك بعض السلالات مثل *R. meliloti* WSM419 تنمو في دالة حامضية تتراوح بين 5-5.5 (55). وأن هذا الاختلاف في قابلية تحمل السلالات للدالة الحامضية قد يكون نتيجة لاختلاف في تركيب متعدد السكريات الدهنية (LPS) في *S. meliloti* أو إلى اختلاف في تراكم الأحماض الامينية داخل الخلية إذ تبين من خلال الدراسة التي اجريت على سلالتين من *S. meliloti* المعزولتين من استراليا (CC169 و U45) واربع سلالات حساسة للحامضية معزولة من الترب القاعدية في العراق (WSM244 و WSM301 و WSM365 و WSM367) انها تحافظ على دالة حامضية قاعدية داخل خلاياها عندما تنمو في وسط ذا دالة حامضية اكبر أو تساوي 6.5 (38)

وأوضحت النتائج أن ملوحة الترب متفاوتة إذ تبين أن أعلى نسبة ملوحة تم الحصول عليها في تربة شط العرب (العينة 20) وتساوي 5.6 % ما يعادل 8.7 ديسيسيمنز / متر قد يرجع ذلك الى مؤثرات طبيعية محلية مثل ارتفاع في مستوى الماء الأرضي وتركيز الملوحة فيه نتيجة لارتفاع درجة الحرارة و التبخر وعدم وجود البازل (5).

(49) تناقص اعداد *S. meliloti* في الوسط الزراعي المزود بالمضاد الحيوي Streptomycin بتركيز 250 مايكروغرام / مل . أظهرت الدراسة الحالية أن ترب جنوب العراق (البصرة) ذات دالة حامضية متعادلة ومتدرجة نحو القاعدية و يعود ذلك الى ارتفاع نسبة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ في التربة والتي تكون أكثر كفاءه في معادلة حموضة التربة من المواد الأخرى أو نتيجة لقلة الأمطار (3).

جدول (1) عزلات *Sinorhizobium meliloti* المعزولة مع مناطق جمع العينات

عدد العينات	اسم المنطقة	رقم العزلة
2	الهارثة	Sm1, Sm2,
16	ابو الخصيب	Sm3,Sm4, Sm5, Sm6, Sm7, Sm8,Sm9,Sm10,Sm11,Sm12,Sm13,Sm14,Sm15, Sm16, Sm 17, Sm18
42	شط العرب	Sm19,Sm20, Sm 21, Sm22,Sm23,Sm24,Sm25, Sm26, Sm27,Sm28,Sm29,Sm30,Sm31,Sm32,Sm33,Sm34,Sm35,Sm36, Sm37,Sm38,Sm39,Sm40, Sm41,Sm42,Sm43,Sm44, Sm45,Sm46,Sm47,Sm48,Sm49,Sm50, Sm51,Sm52,Sm53, Sm54, Sm55 Sm56,Sm57,Sm58,Sm59,Sm60

*Sm = *Sinorhizobium meliloti*

جدول (2) الصفات المظهرية لمستعمرات *Sinorhizobium meliloti* النامية على وسط TY الصلب

قطر المستعمرة	(2-4) ملم
شكل المستعمرة	دائري
لون المستعمرة	ابيض شفاف او ذات لون يشبه لون الاكار
ارتفاع المستعمرة	مرتفعه قليلا عن سطح الطبق
حافة المستعمرة	ملساء
سطح المستعمرة	أملس
قوام المستعمرة	لزجة القوام

جدول (3) مقاومة عزلات *Sinorhizobium meliloti* للمضادات الحيوية

نسبة العزلات المقاومة بالتركيز (%)								المضاد الحيوي مايكروغرام / مل
700	600	500	400	300	200	100	50	
91.7	93.3	95	98.3	98.3	98.3	98.3	100	Chloramphenicol
11.7	21.7	30	40	58.3	65	83.3	86.7	Ampicillin
-	-	-	8.3	8.3	10	13.3	20	Streptomycin
-	-	-	50	51.7	53.3	65	83.3	Erythromycin
-	-	-	0	0	0	3.3	15	Gentamycin
-	-	5	21.7	31.7	43.3	66.7	80	Amoxicillin

جدول (4) قابلية تحمل عزلات *Sinorhizobium meliloti* لتركيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم وكبريتات البوتاسيوم

تركيز NaCl	عدد العزلات المتحملة للملوحة	نسبتها %	تركيز K_2SO_4	عدد العزلات المتحملة للملوحة	نسبتها %
%2	60	100	%2	60	100
%3	60	100	%3	60	100
%4	58	96.7	%4	58	96.7
%5	25	41.7	%5	25	41.7
%5.5	10	16.7	%6	10	16.7
%6	6	10	%7	6	10
%7	0.0	0.0	%7.5	0.0	0.0

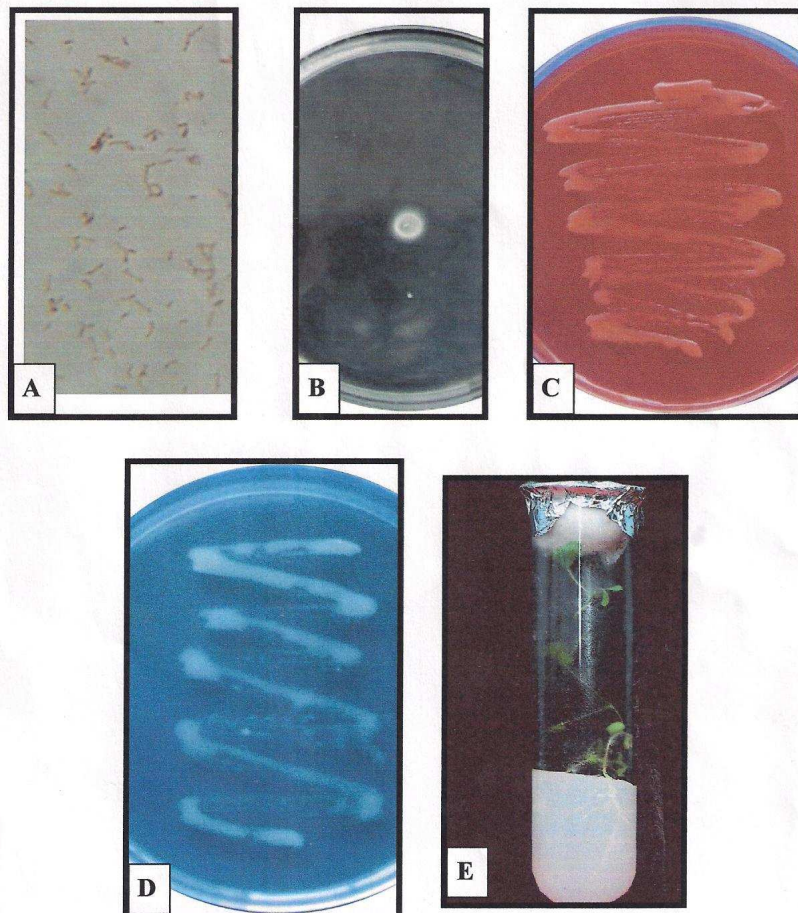
جدول (5) تأثير الدالة الحامضية في نمو عزلات *Sinorhizobium meliloti*

الدالة الحامضية							عدد العزلات المتحملة للدالة الحامضية
10	9	8	7	6	5	4	
60	60	60	60	60	55*	0.0	

*= تشير الى النمو الضعيف

جدول (6) تركيز الملوحة والدالة الحامضية لترب المناطق المدروسة .

المنطقة	معدل EC ديسيمنز / 2م	معدل الدالة الحامضية pH
الهارثة	6.2	7.75
أبو الخصيب	5.5	7.9
شط العرب	4.7	8.6



صورة رقم (1) جرثومة *Sinorhizobium meliloti*. A: مصبغة بصيغة غرام ، B : متحركة على الوسط شبه الصلب ، C : مصبغة بصيغة الكونغو الأحمر ، D : غير مصبغة بصيغة الأتلين الأزرق ، E: مكونة للعقد على نبات الجت.

المصادر العربية

- 1.التكريتي, رمضان احمد و رزق, توكل يونس والرومي, حكمت عسكر(1981). محاصيل العلف والمراعي .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - كلية الزراعة - جامعة بغداد . 248 صفحة .
 - 2.الحدِيثي , هديل توفيق و السيمري , احسان عيدان (1993). علم البكتريا العملي . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي - كلية العلوم - جامعة البصرة . 261 صفحة .
 - 3.الراوي , احمد عبد الهادي و الزبيدي , احمد حيدر وقُدوري , نظيمه (1986). كيمياء التربة . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي - كلية الزراعة - جامعة بغداد . 346 صفحة
 - 4.السعدي, عدويه عبد الله (1978). تأثير التلقيح ببعض الطفرات الوراثية المعزولة من مجموعة رايزوبيا اللوبياء على نمو نبات الماش .رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة بغداد . 119 صفحة .
 - 5.عبد العال , شفيق إبراهيم و الراوي , أمين حمد (1981). استصلاح و تحسين التربة . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي - كلية الزراعة - جامعة السليمانية . 335 صفحة .
 - 6.عزيز, ناجح يوسف (1986). تأثير الملوحة والرطوبة على وجود ونمو وكفاءة سلالات وعزلات بكتريا
- 7.قاسم, غياث محمد وعلي, مضر عبد الستار (1989). علم أحياء التربة المجهرية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - جامعة الموصل . 304 صفحة .
 - 8.المفرجي, طالب كاظم والعزاوي, شذى سلمان (1991). علم الأحياء المجهرية للتربة والمياه .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي -جامعة بغداد . 459 صفحة .
 - 9.نغمش, رزاق غازي (1985). كفاءة السلالات والعزلات المختلفة من بكتريا *Rhizobium meliloti* في تثبيت النترجين الجوي وتأثير بعض العوامل البيئية عليها .رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة البصرة . 148 صفحة .
 - 10.الوحيلى , كاظم حسن هذيلي (2005). تأثير الحديد والمولبيديوم والنترجين في كفاءة الرايزوبيا المتخصصة على الجت *Rhizobium meliloti* ونمو الجت *Medicago sativa* L. وحاصله . رسالة دكتوراه فلسفه في العلوم الزراعية - كلية الزراعة - جامعة البصرة . 177 صفحة .
 - 11.ياسين , بسام طه (2001). اساسيات فسيولوجيا النبات . قسم العلوم البيولوجيه - كلية العلوم - جامعة قطر . 634 صفحة .

المصادر الأجنبية

- 12.B.A.Abbas.Studies on auxotrophic mutants of sulfur-containing amino acids of *Sinorhizobium meliloti* .Ph.D.Thesis, Biosciences and Biotechnology .University of Roorkee,India .101.(2001).
- 13.M.Alexander.Introduction to soil microbiology.2nd ed. Toronto. USA 467 .(1977).
- 14.A.Ayanaba;S.Asanuma andD.N. Munns.An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminum stress .Soil Sci.Soc.Am.J.47;256-258.(1983).
- 15.L.M.Bordeleau and D.Prevost.Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments.Plant Soil.J. 161;115-125.(1994).
- 16.J.M.Bremner.Regular Kjeldahl methods.In: Page, A.L.; Miller, R.H. and Keeney, D.R. (eds.).methods of soil analysis. 2nd ed. ASA. Inc. Madison, Wisconsin, U.S.A.(1970).
- 17.T.Bernard;J.A.Pocard;B. Perroud and D. Le Rudulier.Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. Arch. Microbiol.J. 143;359-364 .(1986).
- 18.W.Chen ; E.Wang ; S.Wang ; Y.Li ;X. Chen andY. Li. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., amoderately and slowly growing root

- nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang people's republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45;153-159.(1995).
19. J.Cheng ;C.D. Sibley ;R. Zaheer and T.M. Finan. A *Sinorhizobium meliloti minE* mutant has an altered morphology and exhibits defects in legume symbiosis. *J. Microbiol.* 153;375-387.(2007).
20. M.S.Cresser and J.W. Parsons. Sulphuric-perchloric acid digestion of plant material for the determination of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium. *Analytic Chem. Acta. J.* 109;431-436.(1979).
21. T.E.Crews. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities : evolutionary vs ecological considerations. *J. Biochem.* 46;233-246.(1999).
22. J.M.Carter ;A.H.Gibson. Competitiveness and persistence of strains of rhizobia for faba bean in acid and alkaline soils. *Soil Biol. Biochem. J.* 27 ; 617- 623.(1995).
23. A.Embalomatis ;D.k. Papacosta and P. Katinakis. Evaluation of *Rhizobium meliloti* strains isolated from indigenous populations northern Greece. *Agric. Crop. Sci. J.* 172;73-80.(1994).
24. T.J.Goss;G.W. ÓHara;M.J. Dilworth and A.R. Glenn. Cloning , characterization and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. *J. Bacteriol.* 172;5173-5179.(1990).
25. P.H.Graham and C.A. Parker. Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. *Plant Soil. J.* 20;383-396.(1969).
26. R.P.Gupta ;M.S. Kaira ; S.C.Bhandari and A.S. Khurana. Intrinsic multiple antibiotic resistance markers for competitive and effectiveness studies with various strains of mung bean rhizobia. *J. Biosci.* 5;253-260.(1983).
27. P.G.Hartel and M. Alexander. Growth and survival of cowpea rhizobia in acid , aluminum – rich soils . *Soil . Sci . Soc . Am . J .* 47;502 – 506.(1983).
28. J.G.Holt; N.R.Krieg;P.H.A.Sneath;J.T. Staley and S.T. Williams. *Bergeys manual of determinative bacteriology.* 9th ed. Williams and Wilkins USA.1246 (1994).
29. J.G.Howieson ; M.A.Ewing and M.F. D'Antuono. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti* . *Plant Soil. J.* 105 ; 179 – 188.(1988).
30. W.Hungria;A.A.Franco and J.I. Sprent. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil. J.* 149;103-109.(1993).
31. D.H.Hubbell and G. Kidder. Biological nitrogen fixation . In [www. edis. ifas. ufl.edu/ss180](http://www.edis.ifas.ufl.edu/ss180).(2003).
32. R.J.Kremer and H.L.Peterson. Nodulation efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance . *Appl . Environ . Microbiol. J.* 43; 636-642.(1982).
33. E.B.Lapinskas. The effect of acidity on the distribution and symbiotic efficiency of rhizobia in Lithuanian soils. *J. Eur . Soil Sci.* 40;419-425 .(2007).
34. W.C.Lindemann and C.R. Glover. Nitrogen fixation by legumes , guide A-129. In www.cahe.nmsu.edu.(2003).
35. J.C.Muller ; H.D.Skipper;E.R. Shipe ;L.W. Grimes and S.C. Wagner . Intrinsic antibiotic resistance in *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem. J.* 20;879-882 .(1988).
36. M.J.Mycek; R.A.Harvey;P.C.Champe and B.D. Fisher. *Lippincott's illustrated reviews : pharmacology . 2nd ed.* Lippincott .Williams and Wilkins. New York. 513 (2000).
37. O.P.Onishchuk; O.N.Kurchak;L.A. Sharypova;N.A. Provorov and B.V.Simarov. Analysis of different types of competitive capacity in the alfalfa rhizobia (*Sinorhizobium meliloti*) Tn5 mutants. *Rus. J. Gen.* 37;1266-1271 .(2004).
38. G.W.ÓHara;T.J.Goss;M.J.Dilworth and A.R.Glenn. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti* . *Appl. Environ. Microbiol. J.* 55;1870-1876.(1989).
39. J.W.M.Pijnenborg ;T.A. Lie and A.J.B. Zehnder. Nodulation of lucerne

- (*Medicago sativa* L.) in an acid soil : effects of inoculum size and lime – pelleting .Plant Soil.J.131;1-10.(1990).
- 40.W.G.Reeve;R.P. Tiwari ; C.M.Wong;M.J. Dilworth and A.R. Glenn.The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses.J.Microbiol.144;3335-3342.(1998).
- 41.W.G.Reeve;R.P.Tiwari;N.Guerreiro;J.Stubbs ;M.J.Dilworth;A.R.Glenn;B.G. Rolfe;M.A.Djordjevic and J.G. Howieson.Probing for pH-regulated proteins in *Sinorhizobium medicae* using proteomic analysis. J. Mol. Microbiol.Biotechnol.7;140-147 .(2004).
- 42.W.A.Rice;D.C.Penney;M.Nyborg. Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. Can. J. Soil Sci. 57;197-203.(1977).
- 43.T.Rui;W.Reeve and R. Tiwari.The *lpiA* gene region;its role in the acid tolerance of *Sinorhizobium medicae*.CRS Annual Report:1-81 .(2006).
- 44.M.J.Sadowsky ;H.H. Keyser and B.B. Bohlool .Biochemical characterization of fast and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans. Int.J.Syst.Bacteriol.33;716-722.(1983).
- 45.D.Sauvage ;J. Hamelia and F. Lacher.Glycine betaine and other structurally related compounds improve the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*.Plant Sci.Lett. J .31;291-302 .(1983).
- 46.Soil Survey Staff. Soil survey manual . USDA Hand book .No .18 .U.S.Gove.Prit office , Washington , D.C.(1999).
- 47.J.Steinborn and R.J. Roughley.Sodium chloride as a cause of low numbers of *Rhizobium* in legume inoculants.J.Appl.Bacteriol.37;93-99.(1974).
- 48.S.K.Swamynathan and A.Singh. Pleiotropic effects of purine auxotrophy in *Rhizobium meliloti* on cell surface molecules. J. Biosci. 20;17-28.(1995).
- 49.P.van Dillewijn ;F.Martinez-Abarca and N.Toro.Multicopy vectors carrying the *Klebsiella pneumoniae nifA* gene do not enhance the nodulation competitiveness of *Sinorhizobium meliloti* on alfalfa.MPMI..J. 11;839-842.(1998).
- 50.C.P.Vance.Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition plant nutrition in a world of declining renewable resources.Plant Physiol. J .127;390-397.(2001).
- 51.J.M.Vincent.Nitrogen fixation in legumes. Academic Press Sydney , New York,London.(1982).
- 52.N.K.Yadav and S.R.Vyas.Response of root-nodule rhizobia to saline,alkaline and acid conditions.Ind.J.Agric.Sci.41;875-881 .(1971).
- 53.S.F.Yap and S.T. Lim . Response of *Rhizobium* sp. UMKL 20 to sodium chloride stress . J. Arch . Microbiol . 135 : 224 - 228 .(1983).
- 54.H.H.Zahran .Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments . Biol . Fertil . Soil . J . 12 ;73-80.(1991) .
- 55.H.H.Zahran.*Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol .Mol. Biol. J .63;968-989 .(1999).
- 56.H.A.Zuill and T.G.Standish .Irreducible inter dependence : an ic-like ecological property potentially illustrated by the nitrogen cycle .Orig. J .60; 6-40.(2007).

Isolation and diagnosis of *Sinorhizobium meliloti* symbiont of alfalfa with the study of effect salinity and pH on it

¹Basil Abd-Alzahraa Abbas ²Jabbar Dehri ²Ghosoan Fadhil¹

¹College of veterinary medicine,

² College of science /Basrah university

Abstract

Sixty local isolates of *Sinorhizobium melilote*.were isolated from *Medicago sativa* root nodules.The colonies characteristics were studied after growing on trypton yeast extract agar (Ty).All isolates were gram negative, rod shape and motile because of formation of cyclic B-(1-2)glucans.All isolates showed ability for production of cellulose fibrils and nonproduction of cyclic B-(1-3)glucans.The bacterial isolates formed nodules on infected plants after two weeks .Adding of differ at antibiotics to the cultural media in different concentration lead to inhibit the growth of some of the bacteria isolates.All isolates showed agood growth on media having 2% and 3% NaCl, but the growth was inhibited at 7% NaCl.regarding K₂SO₄ all isolates shawed growth on media containing 2%,3% and 4%K₂SO₄ but no growth was observed on 7.5%K₂SO₄ .pH 4 inhibit the growth of all isolates in contrast there was agood growth at pH ranging for 6 to 10.The total nitrogen of plant inoculated with bacterial isolates were determined of the soil characteristics were recorded.