مجلة العلوم البحتة والتطبيقية
Journal of Pure & Applied Sciences
www.Suj.sebhau.edu.ly ISSN 2521-9200
Received 13/11/2017 Revised 22/01/2018 Published online 30/06/2018

بكتيريا العقد الجذرية المعزولة من نبات البرسيم الحجازي (*Medicago sativa* L.) و انتاجها للأنزيمات

*مسعودة عمر خليفة و فاطمة علي جرمة و عفاف ابراهيم نصر و مروة محمد ابو صلاح و نجاة علي سعيد
و فادية جمعة اشعيوي و ابتسام محمد احمادي
قسم علم النبات– كلية العلوم–جامعة سبها، ليبيا
*المراسلة:mas.khalefah@sebhau.edu.ly

الملخص يوجد في التربة خاصة الزراعية منها الملايين من الاحياء الدقيقة تشمل: الفطريات، الطحالب، الأوليات والبكتيريا، تلعب هذه الأحياء دوراً أساسياً في المحافظة على خصوبة التربة وامداد النباتات النامية باحتياجاتها الغذائية، بكتيريا الجذر عقدية أو الريزوبيا واحدةً من تلك الاحياء، وهي بكتيريا عصوية سالبة لصبغة جرام تدخل في علاقة تكافلية مع النباتات البقولية، وهي مثلها مثل أي كائن حي آخر يجب أن تكون قادرة على القيام بمجموعة من التحولات الكيميائية؛ لكي تستمر حية وتنمو وتتكاثر، هذه التحولات تتم بواسطة الانزيمات في تفاعلات متتالية تتم بشكل متسلسل تسمى بدورات الايض الغذائي، السلالة المرجعية *Ensifer meliloti* وسبعة عزلات ريزوبية (RBSU4، RBSU6، RBSU7، RBSU10، RBSU11، RBSU13 و RBSU28) حصل عليها من مختبر الاحياء الدقيقة بكلية العلوم جامعة سبها معزولة من منطقة فزان بالجنوب الليبي استخدمت في هذه الدراسة لمعرفة قدرة هذه العزلات على افراز مجموعة من الانزيمات واستغلال نواتج التفاعلات في ايضها الغذائي، شملت مجموعة من الاختبارات الانزيمية هي: Catalase، Oxidase، Tryptophanase، Amylase، Urease، Lactase، Gelatinase، Caseinase و Phosphatase، نتائج هذه الدراسة بينت تباين واختلاف بين العزلات في استغلالها للأنزيمات المستهدفة للدراسة، كانت كل العزلات بما فيها السلالة المرجعية موجبة لإنزيمات Catalase، Oxidase و Urease و سالبة لأنزيم Gelatinase وتباينت النتائج بالنسبة للأنزيمات الاخرى، السلالة المرجعية والعزلتين RBSU11 و RBSU13 كانت أكثر العزلات المختبرة تميزاً و استطاعت انتاج العديد من الانزيمات، في حين العزلتين RBSU6 و RBSU10 الاقل في انتاج الانزيمات، وبالتالي يمكن أن تستخدم المجموعة الاولى كلقاح للنباتات البقولية خاصة في الاراض الجافة و شبه الجافة الفقيرة بالموارد الغذائية.

الكلمات المفتاحية: الاحياء الدقيقة، البرسيم الحجازي، بكتيريا الجذر العقدية، الانزيمات، سلالة مرجعية.

The Isolated root-nodulating bacteria from *Medicago sativa* L. and its production of enzymes.

*Massoudah O. Khalifa ,Fatima A. Jarma , Afaf E. Nseer , Marwa M. Aboslh , Ngat A. Saed , Fadiyah J. Asheiwi , Ibtisam M. Ahmadi
Department of Botany, Faculty of Science , Sebha University, Libya
*Corresponding author: mas.khalefah@sebhau.edu.ly

Abstract The soil, especially the agricultural one, contains millions of microorganisms as: fungi, algae, bacteria and protozoa. These microorganisms have an essential role in maintaining the fertility of the soil and provide the nutritional supplements to the plants, such as The root-nodulating bacteria or rhizobia and it's a Gram-negative bacteria has a symbiotic relationship with leguminous plants, and like any other living organisms they must be able to perform a set of chemical reactions, to continue to survive, grow and multiply. These interactions are carried out by enzymes in sequent reactions known as nutritional metabolism. Reference strain Ensifer meliloti and the rhizobial isolates (RBSU4, RBSU6, RBSU7, RBSU10, RBSU11, RBSU13 and RBSU28). This study aimed to know the ability of these isolates to produce a group of enzymes and using the production of its reactions in its nutritional metabolism. A series of enzymatic tests were included: Catalase, Oxidase, Tryptophanase, Amylase, Urease, Lactase, Gelatinase, Caseinase and Phosphatase. The result of this study showed the difference between isolations in using the target enzymes for this study. All the isolates including the reference strain were positive to catalase, Oxidase and Urease enzymes, and differentiate with the production of other enzymes, while the reference strains and the two RBSU11 and RBSU13 isolates were the most distinguish isolates as it were able to produce many enzymes, while the RBSU6 and RBSU10 isolates were the lowest in the production of enzymes, So reference strains and the two RBSU11 and RBSU13 isolates can be used as a vaccine for leguminous plants, especially in dry and semi-dry areas with poor food resources.

Keywords: Microorganisms, *Medicago sativa*, *Rhizobium*, Enzymes, Reference strain.

المقدمة

يوجد في التربة خاصة الزراعية منها الملايين من الاحياء الدقيقة تشمل: الفطريات، الطحالب، الأوليات و البكتيريا، تلعب هذه الأحياء دوراً أساسياً في المحافظة على خصوبة التربة، و على امداد النباتات النامية باحتياجاتها الغذائية من خلال معدنتها للمواد العضوية، و تيسيرها للعناصر الغذائية، و تثبيت نيتروجين الهواء الجوي، و تكوين الدبال، و افرازاها للكثير من المواد المشجعة للنمو و مقاومتها للمسببات المرضية [1]، البكتيريا مثلها مثل أي كائن حي آخر تتميز بالصفات العامة للحياة كالنمو، التكاثر، التنفس، التغذية، الحركة و الموت، و لكي تستمر في الحياة فإنه يجب أن تكون قادرة على القيام بمجموعة من التحولات الكيميائية بعمليات تعرف بالأيض الغذائي، جميع هذه التحولات تتم بمساعدة الانزيمات، هذه الأخيرة "الانزيمات" توجد داخل الخلية البكتيرية بكميات ضئيلة جداً، كما أن النوع الواحد من البكتيريا ينتج أنواعاً معينة من الانزيمات الخاصة به و المميزة له عن نوع بكتيري آخر، كذلك تختلف كمية الانزيمات التي تحتويها الخلية البكتيرية أيضاً من نوع بكتيري إلى آخر و يحدد ذلك الخواص الوراثية للبكتيريا و الظروف البيئية المحيطة بها، و لكي تتم التفاعلات داخل الخلية؛ فإنها تستغل هذه الانزيمات بالرغم من قلتها بتفاعلات كيميائية تُعرف بدورات الايض الغذائي Metabolism pathways، حيث أن دورة الايض الغذائي تتم داخل الخلية بمجموعة متكاملة من الانزيمات أو بما يُعرف بالنظام الأنزيمي Enzyme system و الذي فيه يقوم كل انزيم بإجراء تفاعل محدد على مادة التفاعل حتى يتم في النهاية استكمال دورة خاصة بعملية حيوية معينة داخل الخلية [1]. الأنزيم عامل مساعد عضوي حيوي ذو وزن جزيئي كبير شديد الحساسية لدرجات الحرارة المرتفعة [2]. بكتيريا العقد الجذرية Rhizobia واحدة من الميكروبات التي تعيش معيشة تكافلية مع النباتات البقولية، تثبت نيتروجين الهواء الجوي داخل العقد الجذرية المتكونة على جذور أو سيقان و نادراً على أوراق هذه النباتات، في غياب النبات البقولي توجد حرة في التربة في صورة كائن محلل [3، 4]. و هي بكتيريا من عائلة Rhizobaceae عصوية الشكل على الاوساط الصلبة، متحركة سالبة لصبغة جرام غير مكونة للأبواغ، تنمو في المختبر على بيئة مستخلص الخميرة و المانيتول، و تستخدم العديد من المواد الكربوهيدراتية كمصدر للكربون و غالباً تنتج حامض و لا تُكوِّن غاز [5، 6]. البرسيم الحجازي *Medicago sativa* L.، يتبع الفصيلة القرنية Fabaceae من ذوات الفلقتين Magnoliophyta، نبات عشبي معمر يمكن أن يمكث في التربة لفتره تصل إلى سنوات، جذره وتدي عميقة تمتد في التربة لمسافة تتجاوز الخمسة امتار، الاوراق مركبة، الازهار صغيرة، البذور صغيرة الحجم كلوية الشكل توجد في قرون حلزونية، يعد واحداً من البقوليات ذات الاهمية الاقتصادية الاولى في ليبيا بصفة عامة و منطقة الجنوب بصفة خاصة، كما ذكر مثله مثل بقية النباتات البقولية الأخرى يدخل هذا النبات في علاقة تكافلية مع بكتيريا العقد الجذرية Rhizobia.

عليه تهدف هذه الدراسة إلى معرفة قدرة بعض العزلات الريزوبية المعزولة من نبات البرسيم الحجازي *M. sativa* على افراز الانزيمات لاستغلالها في ايضها الغذائي.

المواد وطرق العمل

العزلات الريزوبية

سبع عزلات ريزوبية حصل عليها من مختبر الأحياء الدقيقة بقسم علم النبات كلية العلوم جامعة سبها، إضافة إلى السلالة المرجعية *Ensifer meliloti* من مختبر الأحياء الدقيقة و البيولوجيا الجزيئية بكلية العلوم جامعة محمد الخامس بالمغرب، استخدمت في الاختبارات كسلالة مرجعية للمقارنة، رموز العزلات و اماكن عزلها، علاوة على عائلها النباتي مدونة في الجدول رقم 1.

جدول 1. العزلات الريزوبية، عائلها النباتي و أماكن جمعها.

العزلة	العائل النباتي	مكان العزل
RBSU4*	*Medicago sativa* L.	وادي عتبة (تساوه)
RBSU6	*M. sativa*	وادي عتبة (تساوه)
RBSU7	*M. sativa*	وادي عتبة (تساوه)
RBSU10	*M. sativa*	وادي عتبة (تساوه)
RBSU11	*M. sativa*	وادي عتبة (تساوه)
RBSU13	*M. sativa*	وادي عتبة (تساوه)
RBSU28	*M. sativa*	وادي الشاطئ (تاروت)
E. meliloti	*Melilotus* spp.	المغرب (الرباط)

* RBSU (R تعني ريزوبيا، B تعني قسم علم النبات و SU تعني جامعة سبها).

وسط النمو

نميت العزلات الريزوبية و حفظت و نشطت قبل كل اختبار على وسط مستخلص الخميرة و المانيتول Yeast Extract Mannitol Agar "YEMA" [7]، و الذي يتكون من

المركبات التالية (g / L): سكر المانيتول Mannitol (10)، مستخلص الخميرة Yeast extract (1.0)، كلوريد الصوديوم NaCl (0.1)، كبريتات الماغيسوم المائية $MgSO_4. 7H_2O$ (0.2)، فوسفات البوتاسيوم المائية $K_2HPO. 3H_2O$ (0.46)، فوسفات البوتاسيوم اللاّمائية K_2HPO (0.12)، الآجار Agar (15)، ضبط الاس الهيدروجيني عند 7.2.

الاختبارات الانزيمية "البيوكيميائية"

أجريت هذه الاختبارات لمعرفة مدى قدرة العزلات الريزوبية على افراز الأنزيمات و استغلالها في ايضها الغذائي و التي شملت:

اختبار انزيم الكتاليز Catalase enzyme

اجري هدا الاختبار كما وصف من قبل [8]، في اطباق بتري تحتوي وسط مستخلص الخميرة و المانيتول و الملقح بالعزلات الريزوبية، بعد تحضين الاطباق لمدة ثلاثة ايام و عند درجة 28ْم، وضعت قطرات من محلول فوق اكسيد الهيدروجين (6 % H_2O_2) على المزرعة الريزوبية المختبرة. تكون فقاعات من الهواء دلالة على امتلاك العزلة لهذا الانزيم و عدم ظهور مثل هذه الفقاعات العزلة لا تمتلكه و تعد النتيجة سلبية.

اختبار انزيم الاوكسيديز Oxidase enzyme

تنمى البكتيريا أولاً على وسط آجار مستخلص الخميرة و المانيتول و تحضن على الدرجة و المدة المذكورتين في الاختبار السابق، بعد مرور فترة التحضين نقلت كمية قليلة من البكتيريا بإبرة التلقيح و وضعت على أقراص اختبار الاوكسيديز، هذه الاقراص تحتوي على (1% Tetramethyl-1-p-phenylene diamine). إذا تلون القرص بعد وضع العزلة بلون ارجواني دل ذلك على امتلاك العزلة هذا الانزيم و اعتبرت النتيجة موجبة لهذ الاختبار، و إذا لم يتلون فإن العزلة لا تمتلكه و النتيجة سلبية [8].

اختبار انزيم التربتوفاناز Tryptophanase enzyme

يجرى هذا الاختبار بقصد معرفة امتلاك العزلة الريزوبية لأنزيم التربتوفاييناز، حيث لقحت العزلات الريزوبية في انابيب اختبار محتوية على حساء التربتون (1 %)، حضر الوسط بإذابة 1 جرام من التربتون في 100 مل ماء مقطر، عقم الوسط بعد وضعه في انابيب اختبار في الأوتوكلاف عند درجة حرارة 121ْم و لمدة ربع ساعة، تحضن الانابيب الملقحة بالعزلات الريزوبية عند درجة حرارة 28ْم و لمدة ثلاثة ايام، بعد مرور فترة التحضين يضاف للأنابيب كاشف كوفاك؛ تكون حلقة حمراء بعد اضافة الكاشف دلالة على استخدام البكتيريا للحمض الاميني التربتوفان و انتاج الإندول و امتلاكها لأنزيم التربتوفاناز Tryptophanase و عدم تكون مثل هده الحلقة دلاله لعدم امتلاك العزلة لهذا الانزيم وعدم استخدامها للحمض الاميني التربتوفان [9].

اختبار انزيم الاميليز Amylase enzyme

اجرى هذا الاختبار كما وصف من قبل [10]، لمعرفة مدى استخدام البكتيريا للنشأ كمصدر للكربون، حيث استخدم وسط مستخلص الخميرة و المانيتول المحور أو المعدل بعد أن استبدل سكر المانيتول بالنشأ و مستخلص الخميرة بكلوريد الامونيوم، عقم في الأوتوكلاف عند درجة حرارة 121ْم و لمدة ربع ساعة، بعد تبريد الوسط لقحت العزلات في الاطباق بخط طولي، ثم حضنت في درجة 28ْم لمدة ثلاثة أيام، بعد مرور فترة التحضين وضعت قطرات من محلول اليود على المزرعة الريزوبية المختبرة لمدة عشر دقائق، ثم تُخلص من اليود الزائد و لوحظت المستعمرات. اذا اعطى لون شفاف دليل على تحلل النشأ و امتلاك العزلة لأنزيم الاميليز واذا بقى اللون الازرق الغامق عدّ عدم امتلاك العزلة للأنزيم و عدم قدرتها على تتحلل النشأ.

اختبار انزيم اليورياز Urease enzyme

أجري هذا الإختبار كما وصف من قبل [11]، على وسط آجار مستخلص الخميرة و المانيتول المحتوي على 2 % يوريا (W/ V) و 0.012 % من دليل أحمر الفينول، خُططت كل عزلة ريزوبية على كل طبق من أطباق بتري المحتوية على هذا الوسط، ثم حُضنت لمدة ثلاثة أيام و عند درجة حرارة 28ْم. ظهور اللون الوردي أُعتبر دلالة على أن العزلة الريزوبية تحلل اليوريا و امتلاكها لأنزيم اليورياز، أما ظهور اللون الأصفر دل على أن العزلة الريزوبية لا تُحلل اليوريا و لا تمتلك هذا الانزيم.

اختبار انزيم اللاكتاز Lactase enzyme

اجري هدا الاختبار كما وصف من قبل [12]، على أطباق بتري تحتوي على آجار اللاكتوز و الذي يتكون من المركبات التالية (g/ L): سكر اللاكتوز Lactose (10)، ببتون Peptone (5)، مستخلص اللحم Beef extract (3)، و الآجار Agar (15)، تلقح العزلات على الوسط المذكور، ثم تحضن عند نفس درجة و مدة الاختبارات السابقة، بعد مرور فترة التحضين يضاف للأطباق كاشف بندكت؛ عندما يتكون لون

اصفر دليل على تحلل المزرعة و غير ذلك دليل على عدم تحلل المزرعة.

اختبار انزيم الجيلاتيناز Gelatinase enzyme

أجري هذا الاختبار كما وصف من قبل [13]، حيث لقحت العزلات في أنابيب اختبار محتوية على وسط الجيلاتين و الذي يتكون من المركبات التالية (g/ L): ببتون Peptone (5)، مستخلص اللحم Beef extract (3)، الجيلاتين Gelatin(12) و الآجار Agar (15)، حضر الوسط ثم أذيب في حمام مائي، بعدها وزع في انابيب اختبار (20 × 150) و بواقع 5 مل في كل انبوبة، عقمت الانابيب في الأوتوكلاف عند درجة حرارة 121ْم و لمدة ربع ساعة، بعد التعقيم وضعت الانابيب على سطح مائل للحصول على الآجار المائل Slant agar، ثم لقحت العزلات الريزوبية في الانابيب بطريقة الوخز، و حضنت لمد ثلاثة أيام و في درجة 28ْم، بعد مرور فترة التحضين وضعت الأنابيب في وعاء يحتوي على ثلج وتركت لمدة 10 دقائق، بعدها رفعت الانابيب بشكل مائل، فإذا وجدت إن البيئة مازالت متماسكة يعني إن الجيلاتين لم يتحلل بواسطة العزلة المختبرة، أما إذا تمت إسالة الجيلاتين فهذا يدل على إن العزلة أفرزت الإنزيم الخارجي Gelatinase الذي يحلل الجيلاتين.

اختبار انزيم الكازيناز Caseinase enzyme

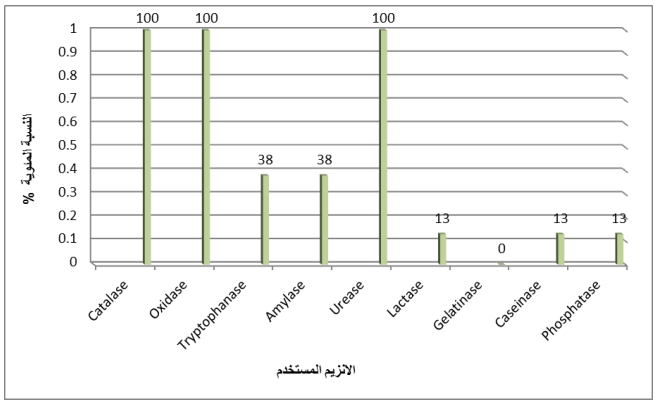
أجري هذا الاختبار باستخدام وسط آجار الكازين و الذي يتكون من المركبات التالية (g/ L): مستخلص اللحم Beef extract (3)، ببتون Peptone (10)، و الكازين Casein (4) و الآجار Agar (15). يعقم كما في الاوساط السابقة عند درجة حرارة 121ْم و لمدة ربع ساعـــــــــــــــــــــــة، تحت ظروف التعقيم يلقح منتصف الطبق بالعزلـــــــــــــــــــة، و يحضن على نفس درجة الاختبارات السابقة و نفس المدة، بعد مرور فترة التحضين فإذا لوحظ وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على إن العزلة حللت الكازين بإفراز إنزيم الكازيناز، وإذا لم يوجد منطقة رائقة حول النمو دليل على عدم قدرة العزلة على تحلل الكازين [9].

اختبار انزيم الفوسفاتاز Phosphatase enzyme

اجري هذا الاختبار كما وصف من قبل [14]، على وسط صلب يتكون من المركبات التالية (g/ L): جلوكوز Glucose (10)، مستخلص الخميرة yeast extract (0.5)، كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ (0.1)، سلفات الماغنيسيوم المائية $MgSO_4.\ 7H_2O_2$ (0.25)، فوسفات الكالسيوم $Ca_3(PO_4)_2$ (2.5) و الآجار Agar (15)، عقم الوسط في الأوتوكلاف عند درجة حرارة 121ْم و لمدة ربع ساعة، لقح كل طبق من أطباق بتري المحتوية على هذا الوسط بـــ 5 ميكروليتر من كل مزرعة ريزوبية نامية إلى الطور النشط، حضنت الاطباق في درجة 28ْم في الظلام، تقرأ النتيجة كل 10، 20 و 30 يوم، و خلال هذه المدة تفحص الاطباق، فإذا ما تكونت هالة حول قطرة المستعمرة دل ذلك على تحلل الفوسفات و امتلاك العزلة للأنزيم المعني و عد ذلك تعد النتيجة سلبية.

النتائج والمناقشة

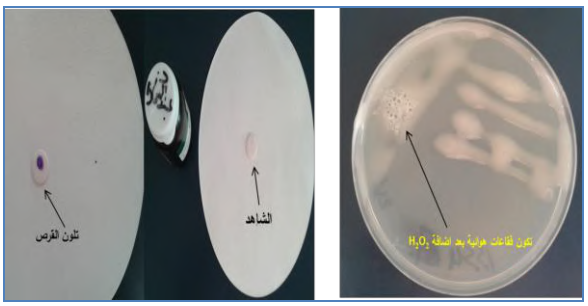
نتائج هذه الدراسة بينت تباين و اختلاف بين العزلات في استغلالها للأنزيمات المستهدفة للدراسة (شكل 1).



شكل 1. التمثيل البياني لاختبار الانزيمات.

الريزوبيا من الميكروبات التي تنتج انزيمات مختلفة و متعددة مثل انتاجها لأنزيم Nitrogenase [15]. الذي تثبت به نيتروجين الهواء الجوي، و انتاج الانزيمات يعد مهم لنمو و حياة الريزوبيا؛ لأنه يوفر لها مواد تستغلها في ايضها الغذائي، خاصةً في المناطق الفقيرة بالمادة العضوية في المناطق الجافة و شبه الجافة، كما هو الحال مع منطقة الدراسة "الجنوب الليبي".

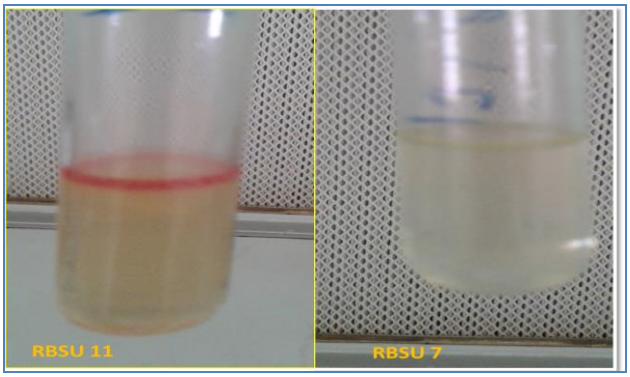
نتيجة اختبار انزيمي التنفس، بينت أن جميع العزلات بما فيها السلالة المرجعية كانت موجبة لهذين الاختبارين و أن العزلات تمتلك انزيمي Catalases و Oxidase و بنسبة 100 % (شكل 2).



شكل 2. العزلة RBSU7 و انتاجها لأنزيمي التنفس.

استخدام العزلات لهذين الانزيمين النتائج اتفقت مع ما جاء به العديد من الباحثين في مجال الريزوبيا و انتاجها لهذه الأنزيمات مع نباتات بقولية مثل أنواع من البرسيم و البسلة و الفول البلدي في مصر و الجزائر [12، 16]. بخصوص الكتاليز الامر متوقع لكونه من الانزيمات التركيبية التنفسية و بالتالي تستخدمه البكتيريا الهوائية في التخلص من المركب السام فوق اكسيد الهيدروجينH_2O_2، و هذا الامر شائع في البكتيريا الهواية العصوية و الريزوبيا لا تستثني من الانواع العصوية، فيما يتعلق بالاوكسيديز فهو الآخر انزيم تفريقي، عدد قليل من البكتيريا العصوية قادرة على انتاجه و العزلات المختبرة كانت من ضمن هذا العدد، هذه الانزيمات تعد هامة في الايض الخلوي الطبيعي و في تشخيص العزلات البكتيرية المجهولة.

اختبار انتاج انزيم التربتوفاييناز، بينت تباين العزلات في انتاجها لهذا الانزيم، حيث استطاعت ثلاثة عزلات فقط و بنسبة 38 % من استخدام الحمض الاميني التربتوفان (شكل 3).

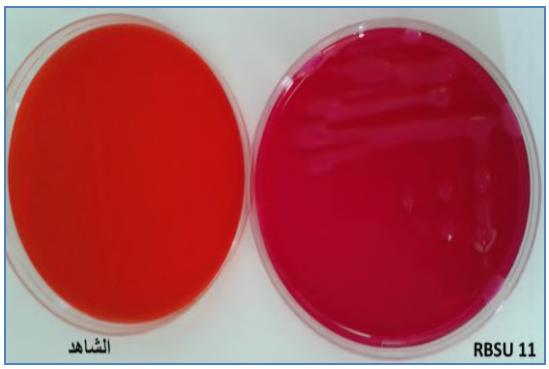


شكل 3. انتاج العزلات لأنزيم التربتوفاييناز (العزلة RBSU7 سالبة و العزلة RBSU11 موجبة للاختبار).

استخدام الريزوبيا للحمض الاميني التربتوفان يجعلها تحلله إلى اندول و نشادر و حمض البيروفيك، تستغل الريزوبيا هذا الاخير في عمليات الايض و الحصول على الطاقة، أما الامونيا "النشادر" فتستخدمه كمصدر للنيتروجين في غياب النبات البقولي.

فيما يتعلق باختبار الاميليز و تحلل السكر المعقد النشأ، تباينت العزلات في استخدام هذا السكر و استطاعت فقط ثلاثة عزلات من تحليليه و هي بهذا اتفقت مع دراسات عن الريزوبيا المعزولة من ليبيا [17]، على انواع من البقوليات البرية و التي منها نوع من البرسيم البري *Medicago polymorpha* و دراسة [18]، على الريزوبيا البطيئة النمو و المعزولة من نبات اللوبيا *Vigna unguiculata*، و بالتالي يتفق الأمر مع ما أفاد به العديد من الباحثين من أن الريزوبيا بقسميها السريعة و البطيئة النمو قليلة في استخدامها للسكريات المعقدة كالنشأ و السليلوز و غيرها [6، 19].

نتائج اختبار انزيم اليورياز (شكل 4)، بينت أن كل العزلات كانت موجبة لهذا الاختبار و اتفقت بالتالي مع دراسات عديدة عن الريزوبيا المعزولة من بقوليات مختلفة من ليبيا شملت اشجار الأكاسيا *Acacia* ssp. و الترمس البري *Lupinus varius* و الرتم *Retama raetam* و كذلك نبات اللوبيا المزروع *V. unguiculata* [18، 20، 21].



شكل 4. تحلل اليوريا بواسطة العزلة RBSU 11 و انتاج انزيم اليورياز.

تحلل اليوريا تعتبر صفة واسعة الانتشار بين مكروبات التربة بما فيها البكتيريا و بين العزلات الريزوبية من نباتات بقولية مختلفة [22]. تحلل اليوريا قد تكون صفة ايجابية تساعد النبات على استخدام هذا المصدر من النيتروجين و قد تكون صفة سلبية من حيث أنها لا تعمل على استقرار مصدر النيتروجين في التربة و هو اليوريا [17].

اختبار اللاكتاز عزلة واحدة استطاعت استخدام سكر اللاكتوز و اتفقت هذه العزلة مع دراسة [18]. استخدام هذا السكر من قبل هذه العزلة يمكنها من الحصول على مصدر الكربون، ألا و هو سكر الجلاكتوز؛ و بالتالي توفير مصدر للكربون. **بخصوص** الجيلاتيناز لم تستطع أية عزلة من تحليل الجلاتين، و اختلفت بذلك مع ما افاد به [23]. **أما** عن الكازين و الفوسفات فعزلة واحدة فقط استطاعت تحليلهما،

organisms. In Biological Nitrogen Fixation (Stacey, G.et al., eds), Pp 43- 86, Chapman and Hall.

[5]- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology 2nd Ed. John Wiley and Sons. Inc., New York.

[6]- Jordan, D. C. (1984). Family III. Rhizobaceae Conn 1938. In Bergy' s manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Edited by N. R. Krieg and J. G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. pp. 234- 244.

[7]- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: International Biological program me, Hand-book no. 15. Oxford, Blackwell Scientific Publication Ltd, Pp 73- 97.

[8]- Koivunen, M. E., Morisseau, C., Horwath, W. R. and Ham-mock, B. D. 2004. Isolation of a strain of *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) utilizing methylene urea (ureaformaldehyde) as nitrogen source. Can J Micro 50: 167- 174.

[9]– سيالة، عبد الرؤوف حمودة 1999. مذكرات في البكتيريولوجيا العملية، منشورات الجا– بيرن / سويسرا.

[10]- de Oliveira, A. N., de Oliveira, L. A., Andrade, J. S. and Júnior, A. F. C. 2007. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. Brazil J Micro 38: 208- 216.

[11]- Lindström, K. and Lehtomäki, S. 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp.(Galegae) compared with other fast- growing rhizobia. FEMS Microbiol lett 50: 277- 287.

[12]- Cheriet, D., Ouartsi, A., Chekireb, D. and Baaarbi, S. 2014. Phenotypic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from *Medicago ciliaris* L. growing in Zerizer from Algeria. *Afri J Microbiol Res* 8 (17): 1763- 1778.

[13]- Aneja, K. 2003. Experiments in Microbiology plant pathology and Biotechnology. 4th Ed, New Age

العزلـــة RBSU11 حللت المركب الاول و السلالـــــــــــة المرجعية *E. meliloti* حللت المركب الثاني، السلالة المرجعية و العزلتين RBSU11 و RBSU13 كانت أكثـــر العـــــــزلات المختبرة تميـــــــــــــــــزاً و استطاعت انتاج العديد من الانزيمات، في حين العزلتين RBSU6 و RBSU 10 الاقل في انتاج الانزيمات؛ تميز السلالة المرجعية ربما يفسر إلى موقع العزل، حيث أن معظم البقوليات في المغرب تزرع بصورة بعلية و معتمدة على مياه الامطار و بالتالي فهي معرضة لعوامل الاجهاد المختلفة، ناهيك عن ذلك أن هذه السلالة تمتاز بقدرتها العالية على انتاج انواع عديدة من الانزيمات، في حين عزلات الاختبار كانت كلها من مزارع و بالتالي لم تتعرض لعوامل الاجهاد البيئي، دائماً يوضع في الاعتبار أن الظروف المخبرية تختلف تمام الاختلاف عن الظروف البيئية؛ لأنه في البيئة الحقيقية للميكروب تتداخل فيها العديد من العوامل الاحيائية و غير الاحيائية و التي تساعدها في استغلال العديد من المواد و افراز العديد من الانزيمات، تميز العزلتين RBSU11 و RBSU13 ربما يعطي فكرة عن استخدام هذه العزلات و استغلالها في المناطق البيئية المتعرضة لعوامل الاجهاد المختلفة والتي منها ليبيا كونها تقع في نطاق الاراض الجافة و شبه الجافة، و بالتالي يمكن استخدام هذه العزلات كلقاح للنباتات البقولية التي تزرع في هذه المنطقة.

شكر و تقدير

نتقدم بخالص الشكر و الثناء الى كل من مد لنا يد العون والمساعدة في سبيل إكمال هـــــذه الدراســـــة، نخص بالذكر الآنسة انتصار محمد احمادي و الاستاذين صالح حسن محمد و حسن عمر خليفة.

المراجع

[1]– مبارك، محمد الصاوي محمد؛ عبد الحافظ، عبد الوهاب محمد؛ جمال، راوية فتحي 2005. عالم البكتيريا، مكتبة أوزوريس– القاهرة/ مصر.

[2]- Dixon, M. and Webb, E. C. 1979. Enzymes. 3rd Ed. Academic Press, New York.

[3]- Trinick, M. J. 1982. Biology. Pages 1- 34 in: Nitrogen Fixation. 2. *Rhizobium*. Oxford University Press, Oxford.

[4]- Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen- fixing

International Publishers, New Delhi, India.

[14]- Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite solubilizing org-anisms in the rhizosphere and soil. Aust J Agri Res 9: 778- 781.

[15]- Baoling, H., ChengQun, L., Bo, W. and LiQin, F. 2007. A rhizobia strain isolated from root nodule of gymnosperm Podocarpus macrophyllus. Sci Chin Ser C-Life Sci 50: 1- 6.

[16]- Zahran, H. H., Abdel-Fattah, M., Yasser, M. M., Mahmoud A. M. and Bedmar, E. J. 2012. Diversity and Environmental Stress Responses of Rhizobial Bacteria from Egyptian Grain Legumes. Austral J Basic Appl Sci 6 (10): 571- 583.

[17]- خليفة، مسعودة عمر أبوالقاسم 2013. التباين المظهري في الريزوبيا المتكافلة مع بعض النباتات البقولية البرية النامية في ليبيا. رسالة ماجستير. كلية العلوم – جامعة سبها.

[18]- Abdelnaby, M., Elnesairy, N. N. B., Mohamed, S. H., and Alkhayali, Y. A. A. 2015. Symbiotic and Phenotypic Characteristics of Rhizobia Nodulaing Cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) Grown in Arid Region of Libya (Fezzan). J Enviro Sci and Engine 227- 239.

[19]- Nour, S. M., Cleyet- Marel, J-C., Beck, D., Effosse, A. and Fernandez, M. P. 1994. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Can J Microbiol 40: 345- 354.

[20]- Mohamed, S. H., Smouni, A., Neyra, M., Kharchaf, D. and Filali- Maltouf, A. 2000. Phenotypic characteristics of root- nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. growing in Libya. Plant and Soil 224: 171- 183.

[21]- Khalifa, M. O. A., Babiker, N. N. and Mohamed, S. H. 2014. Physiological characteristics of rhizobia isolated from *Retama raetam* (Forsk) and *Lupinus various* (L.) indigenous to Libyan desert. J Enviro Sci Engine 246- 255.

[22]- Zerhari, K., Aurag, J., Khbaya, B., Kharchaf, D. and Filali-Maltouf, A. 2000. Phenotypic characteristic of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan region of Morocco. Lett Appl Microbiol 30: 351- 357.

[23]- Singh, B., Kaur, R. and Singh, K. 2008. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). Afri J Biotech 7 (20): 3671- 3676.