The North African Journal of Scientific Publishing (NAJSP)
مجلة شمال إفريقيا للنشر العلمي (NAJSP)
E-ISSN: 2959-4820
Volume 3, Issue 2, April - June 2025
Page No: 52-63
Website: https://najsp.com/index.php/home/index
SJIFactor 2024: 5.49 معامل التأثير العربي (AIF) 2024: 0.71 ISI 2024: 0.696

# العزل والتوصيف الفسيولوجي والبيوكيميائي للريزوبيا باستخدام نظام API 20E

خديجة عبدالله ابو عنيزة[1]، مسعودة عمر خليفة[1]، نجية زيدان برطاطة[1]، وليد طاهر سعد[2]، هاجر صالح خليب[1]، هبة ابراهيم مسعود[1]
[1]قسم الأحياء الدقيقة، كلية العلوم، جامعة سبها، ليبيا
[2]مكتب الزراعة والثروة الحيوانية، شحات، ليبيا

# Isolation and Physiological, Biochemical Characterization of Rhizobia using API 20E System

Khadija A. Abu Anizah[1*], Massoudah O. Khalifa[2], Najia Z. Bertata[3], Waleed T. Saad[4], Hajir S. Kheelib[5], Hibah A. Masoud[6]
[1] Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Sabha, Libya
[2]Office of Agriculture and Animal Resources, Shahat - Libya

*Corresponding author khad.adam@sebhau.edu.ly *المؤلف المراسل*
تاريخ الاستلام: 2025-02-07 تاريخ القبول: 2025-04-11 تاريخ النشر: 2025-04-21

**الملخص**
ثمانية عشر عزلة ريزوبية عزلت من ثلاثة أنواع من البقوليات: البرسيم الحجازي (*Medicago sativa* L.), الحندقوق (*Melilotus officinalis* L.), واللوبيا (*Vigna unguiculata* L. Walp)، نامية في الجنوب الغربي من ليبيا. معظم العزلات أعطت سمات الريزوبيا السريعة النمو، وظهرت مستعمراتها على وسط مستخلص الخميرة والمانيتول خلال 1 – 3 أيام. تبين من خلال نتائج نظام (API20E) أن كل العزلات وبنسبة (100%) كانت موجبة لـ (TDA) وسالبة ($H_2S$)، ومعظمها موجبة لـ (VP) (94.44%). تشابهت العزلات (22.22%) في انتاجها لأنزيمات β-galactopyranosidase (ONPG)، Decarboxylase (ODC)، و Urease (URE)، في حين أنزيم Lysine decarboxylase (LDC) (11.11%) كان الأقل في الانتاج. العزلات RM2، RM8، RM10، RM15، RM16، RV17 و RV18 كانت متميزة في استخدامها للمواد الكربوهيدراتية واستطاعت أكسدة جميع السكريات الموجودة في النظام. أظهرت جميع العزلات مقاومتها للمضاد الحيوي Metronidazole (MTZ), وحساسيتها للمضاد Tetracyclin (TE). عزلات نبات اللوبيا RV17 و RV18 تميزت بمقاومتها لأغلب المضادات. أغلب العزلات كانت مقاومة لملح كلوريد الصوديوم ونمت في تركيز 4%. نتائج التصنيف العددي للاختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية (API20E) بينت أنه باستثناء أربع عزلات (MR1، MR11، MR14 و RV18) التي ظلت منفصلة كونت كل العزلات مع بعضها ثلاث مجاميع عند مستوى تشابه 80%.

**الكلمات المفتاحية**: عزلة ريزوبية، نظام API20E، التصنيف العددي، منفصلة.

**Abstract**
Eighteen rhizobia isolates were isolated from three legume species: alfalfa (*Medicago sativa* L.), Melilot (*Melilotus officinalis* L.), and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), grown in the southwest of Libya. Most of the isolates showed the characteristics of fast-growing rhizobia, and their colonies appeared on yeast extract mannitol medium within 1-3 days. The results of the (API20E) system showed that all isolates (100%) were positive for (TDA) and negative for ($H_2S$), and most of them were positive for (VP) (94.44%). The isolates were similar (22.22%) in their production of β-

galactopyranosidase (ONPG), Decarboxylase (ODC), and Urease (URE) enzymes, while Lysine decarboxylase (LDC) enzyme (11.11%) was the least productive. Isolates RM2, RM8, RM10, RM15, RM16, RV17 and RV18 were distinguished in their utilization of carbohydrates and were able to oxidize all sugars present in the system. All isolates showed resistance to Metronidazole (MTZ) and sensitivity to Tetracyclin (TE). Cowpea isolates RV17 and RV18 were resistant to most antibiotics. Most isolates were resistant to sodium chloride and grew at 4% concentration. The results of numerical taxonomy of biochemical and physiological tests (API20E) showed that except for four isolates (MR1, MR11, MR14 and MV18) that remained separate, all isolates formed three groups at 80% similarity level.

**Keywords**: Rhizobial isolates, API 20E System, Numerical taxonomy, Separate.

**المقدمة:**

البقوليات فصيلة كبيرة ومهمة اقتصاديًا وهي من أكثر النباتات الزهرية انتشارًا بعد الفصيلة المركبة Asteraceae، بأجناس يقدر عددها بـ 750 جنس وأكثر من 20.000 نوع تقريبًا، نباتاتها متباينة ما بين الأعشاب والشجيرات والأشجار، منها ما هو مزروع ومنها ما هو بري، تنمو في ظروف بيئية شديدة التباين وتنتشر في جميع قارات العالم ( Allen & Allen, 1981; Stevens, 2001; Doyle & Luckow, 2003). في ليبيا يبلغ عدد النباتات البقولية 208 نوع تقريبًا، تتوزع وتنتشر في أربعة مناطق رئيسية هي الجبل الأخضر، الجبل الغربي، الحزام الساحلي وفي منطقة فزان ( Qaisar & El Gadi, 1984; Al- Idrissi et al., 1996). تلعب البقوليات دورًا بيئيًا واقتصاديًا وتأتي في المرتبة الثانية من حيث أهميتها للإنسان بعد الفصيلة النجيلية Poaceae، تعد مصدراً للغذاء سواء للحيوان أو الإنسان خاصة لشعوب الدول الفقيرة؛ وذلك لاحتوائها على نسبة عالية من البروتين والكربوهيدرات وغيرها من المركبات الأخرى، تستخدم كمصدات للرياح، وتثبيت الكثبان الرملية وحماية الأراضي الزراعية من الانجراف والتعرية الجوية، لمظهرها الجمالي؛ تستخدم كنباتات للزينة، مصدرًا للأخشاب والفحم والأصباغ، مصدرًا للصمغ العربي، لبعض نباتاتها استخدامات طبية؛ لذلك تدخل في الطب الشعبي أو البديل، تدخل في صناعة العطور، ودباغة الجلود، تستخدم كسماد أخضر تعمل على زيادة خصوبة التربة، علاوة على ذلك تُعد مصدر رخيص للنيتروجين العضوي، حيث يضاف إلى التربة ويثبت بواسطة بكتيريا العقد الجذرية والمعروفة بالريزوبيا ( Allen & Allen, 1981; Baumer, 1990; Boulos, 2007). الريزوبيا بكتيريا هوائية عصوية الشكل، متحركة بأسواط محيطية أو قطبية، سالبة لصبغة جرام غير مكونة للأبواغ تكون عقد على جذور النباتات البقولية. تستوطن التربة وتتواجد بشكل مفرد أو بشكل أزواج ( Chaintreuil et al., 2000; Ngakou et al., 2009; Setu et al.,2019). تنمو في المختبر على بيئة مستخلص الخميرة والمانيتول بشكل مستعمرات بيضاء لزجة، تستخدم العديد من المركبات الكربوهيدراتية كمصدر للكربون وغالبًا تنتج حامض ولا تكون غاز، تنقسم من الناحية الزرعية إلى نوعين، سريعة النمو Fast- growing rhizobia وبطيئة النمو Slow-growing rhizobia(Alexander, 1977; Jordan, 1984).

يتوقف نجاح عملية التكافل بين الريزوبيا والنباتات البقولية وكمية النيتروجين الجوي المثبتة على عوامل فيزيائية وبيوكيميائية كثيرة متعلقة بالتربة علاوة على بعض العوامل الأخرى المتعلقة بالنبات البقولي والريزوبيا المتكافلة معه، حيث تؤثر هذه العوامل على حياة الريزوبيا، وتوزيعها وعلى قُدرتها على تكوين العقد وبالتالي على التكافل وتثبيت النيتروجين. هذه العوامل تُعتبر من ضمن المعايير المستخدمة كخطوة أولى في تصنيفها (Graham et al., 1991). منذ ما يزيد عن نصف قرن من الزمان كان تصنيف الريزوبيا يعتمد على مجاميع التلقيح التبادلية cross-inoculation group (Jordan & Allen, 1974). من العوامل الفيزيائية والكيميائية المستخدمة كمعايير لتصنيف وتعريف الريزوبيا الملوحة Salinity، تأثير الحرارة Temperature، المعادن الثقيلة Heavy matels، الحموضة Acidity، المضادات الحيوية Antibiotics، أكسدة المواد الكربوهيدراتية

Utilization of amino acids، أكسدة الاحماض الامينية Carbohydrate utilization (Nievas et al., 2012; Rasul et al., 2012; Zahran et al., 2012; Datta et al., 2015). يعد نظام (API20E) Analytical Profile Index من أنظمة الاختبار المتعددة Multitest systems، ويعتبر من أكثر الطرق القياسية والدقيقة في تصنيف البكتيريا، وبشريط واحد يمكن اختبار عدد من العوامل البيوكيميائية؛ وبالتالي توفير أنماط دقيقة من النتائج، يعتمد على الكشف عن وجود الأنزيمات. يتألف نظام API20E من 20 قمع Cupules صغير على شريط بلاستيكي، في قعر كل قمع وسط جاف، ويعتبر من الأنظمة السائدة والمستخدمة في تعريف البكتيريا السالبة لصبغة جرام، استخدم من قبل العديد من الباحثين في تعريف الريزوبيا كخطوة أولى في تصنيفها (Niste et al., 2015; Abd EL-ghany et al., 2020). عليه تهدف هذه الدراسة إلى عزل بكتيريا العقد الجذرية من بعض النباتات البقولية وتوصيفها فسيولوجيًا وبيوكيميائيًا باستخدام نظام (API20E).

## المواد وطرق العمل Materials and Methods

### جمع العقد Nodules collection

جمعت إحدى وعشرون عقدة جذرية عائدة إلى ثلاثة أنواع من البقوليات هي: نبات البرسيم الحجازي (*Medicago sativa* L.)، الحندقوق (*Melilotus officinalis* L.) واللوبيا (*Vigna unguiculata* L. Walp) من منطقتي سبها ووادي عتبة في الجنوب الغربي من ليبيا.

### العزل واختبار هوية بكتيريا العقد الجذرية Isolation and Authentication of Root-nodule Bacteria

استخدم لعزل الريزوبيا وحفظها آجار مستخلص الخميرة والمانيتول Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA). يحتوي على المركبات التالية (G/ L): سكر Mannitol (10)، Yeast extract (1)، NaCl (0.1)، $MgSo_4.\ 7H_2O$ (0.2)، $K_2HPO.\ 3H_2O$ (0.46)، $K_2HPO$ (0.12)، pH7.2 و Agar (15) (Vincent, 1970). عُزلت البكتيريا من العقد الجذرية واختبرت العزلات على عائلها الأصلي بتطبيق فرضيات كوخ Koch's postulates؛ للتحقق من كونها ريزوبيا وقدرتها على التكافل (Howieson & Dilworth, 2016). كما أختبرت العزلات بصبغة جرام (Collins et al., 2004).

### الاختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية Biochemical and Physiological tests أشرطة Api20E

لدراسة التباين بين العزلات الريزوبية وتحملها للعوامل الكيميائية استخدم أشرطة Api20E (BioMérieux, France) كما وصف من قبل Niste وآخرون، 2015، وتبناه هذا المختبر. بعد حقن الأشرطة بالمعلق البكتيري Bacterial suspension حضنت على درجة حرارة 28°م ولمدة 24- 72 ساعة. بعد اضافة الكواشف لبعض الاختبارات تلاحظ النتيجة بتغير الألوان، النتائج الإيجابية تعطى إشارة (+) والنتائج السالبة إشارة (-)، تشفر النتائج لتعطي في النهاية مجموعة أرقام لا يقل عددها عن سبعة

### المضادات الحيوية Antibiotics resistance

اختبرت العزلات بطريقة الانتشار والمعروفة بطرقة Kirby-Bauer disc diffusion على وسط آجار مستخلص الخميرة والمانيتول "YEM" (Bauer et al., 1966). استخدم اثنا عشر مضاد (µg/disc): Aztreonam (30 $^{ATM}$)، Clindamycin (2 $^{DA}$)، Penicillin G (10IU $^{P}$)، Fusidic acid (10 $^{FD}$)، Nitrofuration (300IU $^{F}$)، Streptomycin (10 $^{S}$)، Nalidixic acid (30 $^{NA}$)، Chloramphenicol (10 $^{C}$)، Metronidazole (5 $^{MTZ}$)، Rifampicin (5 $^{RD}$)، Polymyxin B (300IU $^{PB}$) و Tetracyclin (10 $^{TE}$). لقحت كل عزلة ريزوبية (200 µl) بفردها على سطح آجار YEM، وبواقع طبقان لكل عزلة. وزعت اقراص المضادات على سطح الآجار، ثم حُضنت الأطباق على درجة حرارة 28°م ولمدة ثلاثة أيام. تكون هالة Inhibition zone حول القرص المشبع بالمضاد الحيوي اعتبر أن العزلة حساسة وعدم تكونها اعتبرت العزلة مقاومة له.

### تحمل الملوحة Salt tolerance

اختبرت العزلات إلى ستة تراكيز (1-6%) من ملح كلوريد الصوديوم NaCl في أطباق بتري محتوية على الوسط المغذي (YEM) والمضاف إليه تركيز الملح المختبر، بحيث قُسِّم كل طبق إلى أربعة أجزاء وضع في كل جزء حوالي 5 ميكروليتر (تحتوي تقريبًا على $10^6$ خلية/مل). حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 28°م لمدة ثلاثة أيام (Khalifa et al., 2014).

### التصنيف العددي Numerical taxonomy

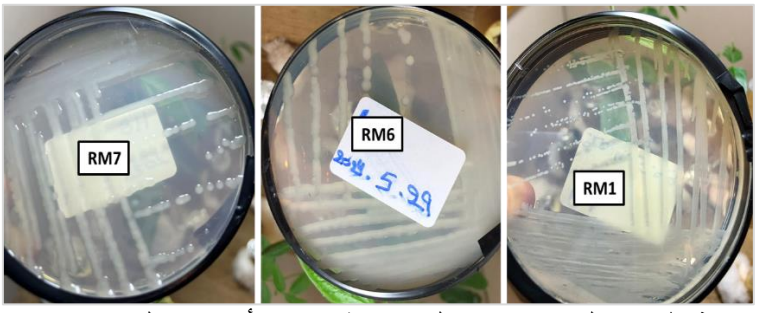
تم إجراء التصنيف العددي (Sneath & Sokal, 1973) للاختبارات المتحصل عليها باستخدام البرنامج STATISTICA (النسخة السادسة).

## النتائج والمناقشة Results and Discussion

### نتائج العزل والتنقية واختبار النبات وصفات العزلات الريزوبية

إحدى وعشرون عزلة ريزوبية عزلت من ثلاثة أنواع من البقوليات واسعة الانتشار في منطقتنا الجنوبية، وتم اختيار مواقع الجمع بناءًا على وفرة النباتات البرية والحقول المزروعة، حيث تتميز هذه المناطق خاصة وادي عتبة بتربة خصبة وظروف بيئية مناسبة لنمو النباتات البقولية. تم اختيار النباتات في مراحل نمو مختلفة لضمان تنوع في الأحجام وكثافة العقد الجذرية، وكان الاختيار وفقًا لبعض المعايير شملت: صحة النبات وخلوه من الأمراض والآفات، ولون العقد.

أعطت ثمانية عشر عزلة الصفات الكلاسيكية للريزوبيا، والمتمثلة في انتاج الصمغ، واللون الأبيض والحافة المستقيمة للمستعمرة (شكل 1، جدول 1). بعض العزلات كانت غزيرة في انتاجها للصمغ الريزوبي، وذات أقطار تتجاوز 1 مم بعد 24 ساعة من التحضين، وظهر معظمها على وسط مستخلص الخميرة والمانيتول خلال 1 – 3 أيام من التحضين؛ مما يشير إلى أن العزلات ربما تكون من قسم الريزوبيا السريعة النمو، وهذا ما ذكره Jordan (1984). كانت جميع العزلات سلبية لصبغة جرام، عزلات نباتي البرسيم والحندقوق كان لها بعض الصفات المشتركة والمتمثلة في حجم المستعمرة ولونها، وانتاج صمغ كثيف. هذه الصفة لوحظت في الريزوبيا المعزولة من منطقتنا الجنوبية لنبات الحندقوق *Melilotus officianalis* (Khalifa *et al*., 2022).




**شكل 1:** المستعمرات الريزوبية بعد 3 أيام من التحضين.

**جدول 1:** نتائج الصفات المظهرية للعزلات الريزوبية، علاوة على عائلها النباتي وأماكن جمعها.

| العزلات Isolates | العائل Host | مكان العزل Site of isolation | نفاعل جرام Gram's reaction | صفات المستعمرة Colonial features | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | فترة النمو بالأيام Growth period (days) | اللون Color | الحجم Size |
| RM1 | *Medicago sativa* | سبها | -ve | 1- 3 | أبيض ( شفاف) | كبير |
| RM2 | *M. sativa* | سبها | -ve | 1- 3 | أبيض (شفاف) | كبير |
| RM3 | *Melilotus officianalis* | سبها | -ve | 1- 3 | أبيض (شفاف) | كبير |
| RM4 | *M. officianalis* | سبها | -ve | 1- 3 | أبيض (شفاف) | كبير |
| RM5 | *M. officianalis* | سبها | -ve | 1- 3 | أبيض (شفاف) | كبير |
| RM6 | *M. officianalis* | سبها | -ve | 1- 3 | أبيض (شفاف) | كبير |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| كبير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | سبها | *M. officianalis* | RM7 |
| متوسط | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | سبها | *M. sativa* | RM8 |
| كبير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | سبها | *M. sativa* | RM9 |
| صغير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | سبها | *M. sativa* | RM10 |
| كبير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | سبها | *M. officianalis* | RM11 |
| كبير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | سبها | *M. officianalis* | RM12 |
| كبير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | سبها | *M. sativa* | RM13 |
| كبير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | سبها | *M. sativa* | RM14 |
| كبير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | وادي عتبة (تساوه) | *M. officianalis* | RM15 |
| كبير | أبيض (شفاف) | 3 -1 | -ve | وادي عتبة (تساوه) | *M. sativa* | RM16 |
| صغير | أبيض (شفاف) | 6 -4 | -ve | وادي عتبة (تساوه) | *Vigna unguiculata* | RV17 |
| صغير | أبيض (شفاف) | 6 -4 | -ve | وادي عتبة (تساوه) | *V. unguiculata* | RV18 |

**نتائج الصفات البيوكيميائية للعزلات الريزوبية**

كل العزلات وبنسبة (100%) كانت موجبة لأنزيم Tryptophan deaminase (TDA)، وسالبة لثيوكبريتات الصوديوم Sodium thiosulfate ($H_2S$)، ومعظمهما موجبة لأنزيمات Voges proskauer (VP) (94.44%)، وأنزيمات Gelatinase (GEL) (77.77%)، ثم تلاها أنزيم Citrate Permease (CIT) (38.88%)، النتائج من أكسدة السترات citrate، ثم Arginine dihydrolase (ADH) (27.77%). تشابهت العزلات وبنسبة (22.22%) في انتاجها لأنزيمات β-galactopyranosidase (ONPG)، وأنزيم Decarboxylase (ODC)، وأنزيم Urease (URE)، في حين أنزيم Lysine decarboxylase (LDC) (11.11%) كان الأقل في الانتاج (شكل 2، جدول 2).

**شكل 2:** نتائج التفاعلات الأنزيمية.

**جدول 2:** نتائج التفاعلات الأنزيمية.

| العزلات | اختبارات API 20E (API 20E tests) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | $H_2S$ | URE | TDA | IND | VP | GLE |
| RM1 | - | + | - | + | + | - | + | + | N.D | + | + |
| RM2 | - | + | - | + | + | - | + | + | N.D | + | - |
| RM3 | - | - | - | - | - | - | - | + | N.D | + | + |
| RM4 | - | + | - | - | + | - | - | + | N.D | + | + |
| RM5 | - | - | - | - | - | - | - | + | N.D | + | + |
| RM6 | - | - | - | - | - | - | - | + | N.D | + | + |
| RM7 | - | - | - | - | - | - | - | + | N.D | + | + |
| RM8 | + | - | - | - | - | - | - | + | N.D | + | + |
| RM9 | - | - | - | - | - | - | - | + | N.D | + | + |
| RM10 | + | - | - | - | - | - | - | + | N.D | + | + |
| RM11 | - | - | - | - | + | - | - | + | N.D | + | + |
| RM12 | - | - | - | - | - | - | - | + | N.D | + | + |
| RM13 | + | + | + | + | + | - | + | + | N.D | - | + |

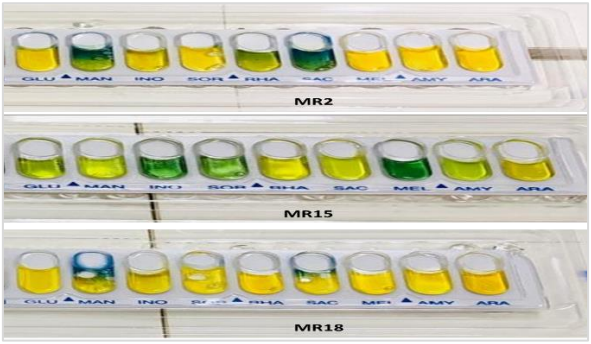
| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + | + | N.D | + | - | - | - | - | - | - | - | RM14 |
| - | + | N.D | + | - | - | - | - | - | - | - | RM15 |
| - | + | N.D | + | - | - | + | - | - | - | - | RM16 |
| + | + | N.D | + | - | - | - | - | - | - | + | RV17 |
| - | + | N.D | + | + | - | + | + | + | + | - | RV18 |

* ONPG =β-galactopyranosidase، ADH =arginine dihydrolase، LDC =Lysine decarboxylase، ODC =Ornithine decarboxylase، CIT =citrate utilization، $H_2S$ =$H_2S$ production، URE =urease، TDA =tryptophan deaminase، IND =Indole production، VP =voges proskauer، GEL =Gelatinase. (+) موجبة للاختبار (مع حدوث تغير في اللون)، (-) سالبة للاختبار (لا يحدث تغير في اللون). N.D= not determined.

نتائج TDA و$H_2S$ كانت متوافقة مع دراسات أخرى لعزلات ريزوبية من نباتي البرسيم الأحمر والحندقوق (Niste *et al*., 2015). ولعزلات من نباتات البازلاء والفول والبرسيم الأحمر والعدس (Abd EL-ghany *et al*., 2020). نتائج VP، GEL، CIT، URE كانت مشابهة إلى درجة كبيرة مع نتائج دراسة (Abd EL-ghany *et al*., 2020)، ومختلفة مع (Niste *et al*., 2015). أفاد Grahamو Parker (1964)، أن انتاج $H_2S$ واستخدام السترات CIT كان مقتصر على عزلات من *Rhizobium meliloti* وهذا كان مخالف لهذه الدراسة.

الريزوبيا من الميكروبات التي تنتج أنزيمات مختلفة ومتعددة؛ لعل أشهرها أنزيم Nitrogenase (Baoling *et al*., 2007). الذي تثبت به نيتروجين الهواء الجـوي، وانتاج الانزيمات يعد مهم لحياة الريزوبيا ونموها؛ لأنه يوفر لها مواد تستغلها في أيضها الغذائي، خاصةً في المناطق الفقيرة بالمادة العضوية؛ كما هو الحال في المناطق الجافة وشبه الجافة.

تباينت العزلات في استخدامها لمصادر الكربون. جميع العزلات (100%) كانت مستخدمة لسكري Mannitol (MAN)، و Arabinose (ARA)، ثم سكر Rhamanose (RHA)، (94.44%)، في المقابل كان سكر Inositol (INO) الأقل في الاستخدام (55.55%). العزلات RM2، RM8، RM10، RM15، RM16، RV17 و RV18 كانت متميزة في استخدامها للمواد الكربوهيدراتية واستطاعت أكسدة جميع السكريات (شكل 3، جدول 3).




**شكل 3:** نتائج أكسدة المواد الكربوهيدراتية.

**جدول 3:** نتائج أكسدة المواد الكربوهيدراتية.

| العزلات | مصدر الكربون (Carbon source) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | GLU * | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA |
| RM1 | + | + | + | + | - | - | + | + | + |
| RM2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RM3 | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| RM4 | - | + | + | - | + | + | - | + | + |
| RM5 | + | + | - | + | - | + | - | - | + |
| RM6 | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| RM7 | + | + | - | - | + | - | - | - | + |
| RM8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RM9 | + | + | - | + | + | + | + | + | + |

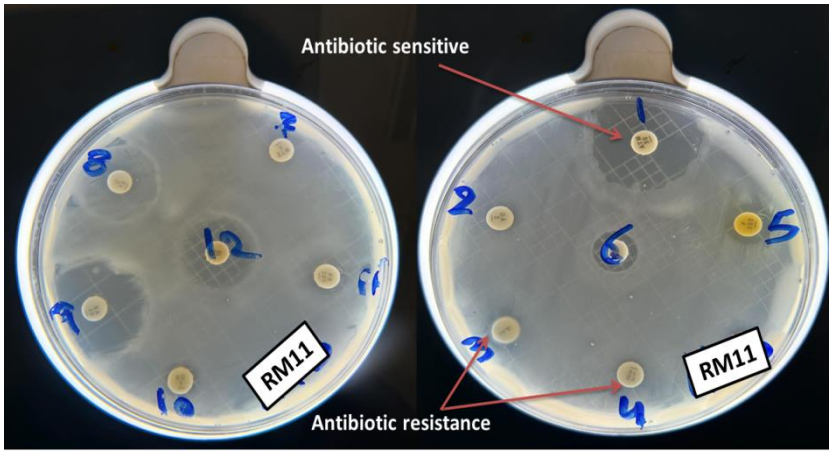
| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + | + | + | + | + | + | + | + | + | RM10 |
| + | - | - | + | + | + | - | + | + | RM11 |
| + | - | - | - | + | - | - | + | + | RM12 |
| + | + | + | + | + | + | - | + | + | RM13 |
| + | + | - | + | + | - | + | + | + | RM14 |
| + | + | + | + | + | + | + | + | + | RM15 |
| + | + | + | + | + | + | + | + | + | RM16 |
| + | + | + | + | + | + | + | + | + | RV17 |
| + | + | + | + | + | + | + | + | + | RV18 |

* GLU =Glucose، MAN =Mannitol، INO =Inositol، SOR =Sorbitol، RHA =Rhamanose، SAC= Saccharose، MEL =Melibinose، AMY =Amygdalin، ARA =Arabinose. (+) مستهلكة للسكر المختبر (يحدث تغير في اللون)، (-) غير مستهلكة للسكر المختبر (لا يحدث تغير في اللون).

نتائج أكسدة السكريات اتفقت إلى درجة كبيرة مع نتائج دراسات أخرى؛ إلا أنها اختلفت عنها في استخدام سكر الأمجدالين (AMY)، حيث في نتائج هذه الدراسة كانت هناك عزلات استطاعت استخدام هذا السكر وهو نفس ما افاد به (Abd EL-ghany *et al*., 2020). واختلفت عن نتائج ( Niste *et al*., 2015) التي كانت سلبية لهذا السكر.

استهلاك الكربوهيدرات من قبل العزلات الريزوبية يُعتبر من المعايير الهامة وذات المصداقية العالية التي تُستخدم في دراسة التباين والتفرقة بين الريزوبيا. بصفة عامة كلا القسمين السريعة والبطيئة النمو قليلة في استخدامها للسكريات المتعددة (Jordan, 1984; Nour *et al*., 1994). تستطيع كثير من البكتيريا خليطة التغذية Heterotrophsاستخدام مصادر عضوية متعددة للحصول على الطاقة، تتضمن هذه المصادر المواد الكربوهيدراتية، والأحماض العضوية، والأحماض الدهنية والأحماض الامينية، غير أن المركبات المفضلة لدى أغلب أنواع البكتيريا خليطة التغذية والتي منها الريزوبيا هي المركبات الكربوهيدراتية.

فيما يتعلق باختبار التضاد (شكل 4، جدول 4) العزلات أظهرت تناسقًا في مقاومتها للمضادات الحيوية المختبرة من حساسة لا تستطيع النمو إلى مقاومة. جميع العزلات (100%) كانت مقاومة للمضاد الحيوي Metronidazole (MTZ)، وحساسة للمضاد Tetracyclin (TE). المضاد Rifampicin (RD) (94.44%)، Nitrofuration (F)، Streptomycin (S)، Chloramphenicol (C) و Nalidixic acid (NA) بنسبة (88.88%) كانت الأكثر تأثيرًا على العزلات بعد مضاد Tetracyclin (TE)، في حين كان المضادين Clindamycin (DA)، Penicillin (P) (77.77%) الأقل في التأثير. عزلات نبات اللوبيا RV17 و RV18 كانت متميزة واستطاعت مقاومة أغلب المضادات.




**شكل 4:** اختبار المضادات الحيوية.

**جدول 4:** نتائج تأثير المضادات الحيوية على العزلات.

| العزلات | المضادات الحيوية (Antibiotics resistance) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ATM | DA | P | FD | F | S | MTZ | C | NA | RD | PB | TE |
| RM1 | + * | + | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM2 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM3 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM4 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM5 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | - | + |
| RM6 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM7 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + |
| RM8 | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| RM9 | + | + | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM10 | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| RM11 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM12 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | - | + |
| RM13 | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM14 | + | - | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM15 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RM16 | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| RV17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| RV18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |

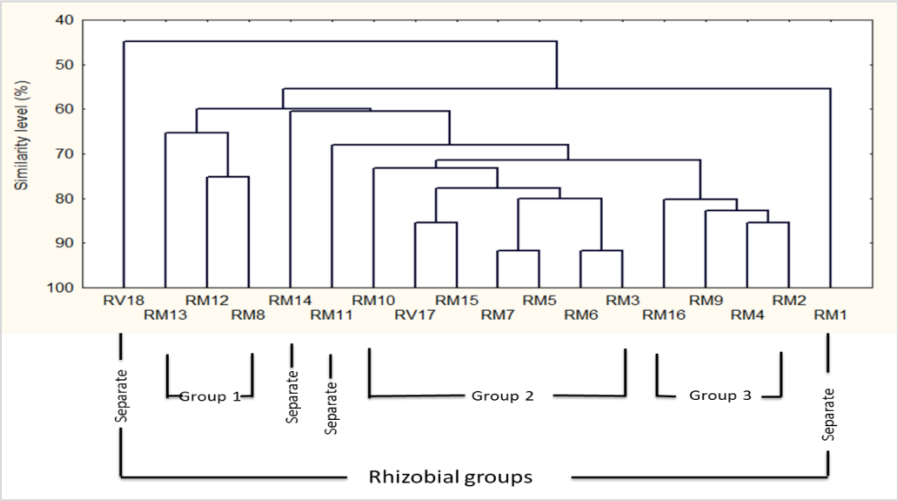
* (+) العزلة حساسة للمضاد الحيوي المختبر، (-) العزلة مقاومة.

اختبار التضاد يعتبر ذو مصداقية في التفرقة بين الريزوبيا مثله مثل اختبار السكريات (Jordan, 1984; Fernandes *et al*., 2012; Rasul *et al*., 2012). مقاومة العزلات لمضاد Metronidazole (MTZ) متوقع كون هذا المضاد يعمل في الظروف اللاهوائية، أما عن Penicillin كانت النتائج متوافقة مع نتائج باحثين آخرين (Stoczko *et al*., 2006). والتي أفادت بأن جنس الـــ Rhizobiumالتابعة لأنواع مختلفة من البقوليات أظهرت مقاومة واضحة له. هذه المقاومة قد تعزى لعدة آليات منها إنتاجها لأنزيمات β- lactamases التي تعمل على تحطيم حلقة البيتا-لاكتام وتحويلها إلى شكل غير مؤثر على الخلية، وأن هذه الأنزيمات غالبًا ما تشفر لها جينات محمولة على الكروموسوم البكتيري وفي بعض الأحيان قد تحمل على البلازميدات أيضًا، وتصبح قابلة للانتقال ما بين السلالات المختلفة مكسبةً إياها صفة المقاومة. أو وجود حواجز تقلل من دخول المضادات أو آليات أخرى تعمل على طرد المضاد للخارج (Stoczko *et al*., 2006). حساسية العزلات للمضاد Streptomycin المؤثر في صناعة البروتين يرجع لكونه مع تثبيط صناعة البروتين له آلية عمل أخرى تتمثل في زيادة نفاذية الغشاء الخلوي البكتيري، حيث تنتقل إلى الخلية البكتيرية عبر الثقوب البورينية Porins. مقاومة عزلات نبات اللوبيا RV17 و RV18 قد يفسر بانتماء هذه العزلات إلى قسم الريزوبيا البطيء النمو والذي يمتاز بمقاومته العالية لعدد كبير من المضادات الحيوية (Graham, 1963; Jordan, 1984). وهذا ما بينته نتيجة هذه الدراسة.

فيما يتعلق بتحمل الملوحة، أغلب العزلات كانت مقاومة وتنمو حتى 4% من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl). هذه العـزلات تشبـه الريزوبيـا المعزولة مـن نبات الترمس الصحراوي (Khalifa *et al*., 2014). ونباتات بقولية مزروعة وأخرى بريـــة ناميـة في الترب الجافـــة من ليبيا (Bertata et al.,2018). الريزوبيا يمكنها تحمل الملوحة أكثر مما يتحمله النبات البقولي المتكافلة معه وتختلف في درجة التحمل، فالسلالات الريزوبيـــة السريعـة النمو كما هـــو الحال مـــع أغلب عزلات هذه الدراســـة أكثر تحملا من البطيئة (Assaffii et al., 2010). الإختلاف بين الريزوبيا في تحمُلها للملوحة يرجع إلى قدرة بعضها على تكوين آليات تُمكنها من العيش في هذه الظروف، منها بناء جزيئات صغيرة تعرف بالمواد التوافقية والتي يقوم مبدأ عملها على إحداث توازن بين الضغط الأسموزي الداخلي والخارجي وهي الطريقة الأكثر شيوعًا. هناك طريقة أخرى أقل شيوعًا عبر التحكم في مستويات البوتاسيوم ($K^+$)، ويتم ذلك عن طريق ضخ كميات كبيرة من أيونات البوتاسيوم في

السيتوبلازم، اضافة الى تكوين بعض الصبغات التي تساعدها على المقاومة، أو تقوم بتجميع أيونـــات جلوتامـــات Glutamate و سكريات و مواد أخرى (Gouffi *et al.*, 2000). العزلات في المختبر كانت متميزة في خواصها، ولكن في الطبيعة قد تكون مختلفة عن ذلك؛ لهذا فإن اختبارها في بيئاتها الطبيعية مطلوب قبل الوصول إلى هذه النتيجة (Khalefah & Mohamed, 2013).

نتائج التصنيف العددي للاختبارات البيوكيميائية والفسيولوجية (API20E) لـ 42 صفة أو اختبار بينت أنه باستثناء أربع عزلات (MR1، MR11، MR14 وMR18) التي ظلت منفصلة (Separate) كونت كل العزلات مع بعضها ثلاث مجاميع (Groups) عند مستوى تشابه 80% (شكل 5). المجموعة الأولى تكونت من ثلاث عزلات (MR13، MR12 و MR8)، عائدة لنباتي البرسيم والحندقوق. المجموعة الثانية تكونت من سبع عزلات (MR10، MR17، MR15، MR7، MR5، MR6 و MR3)، ما يميز هذه المجموعة أنها شملت عزلات من جميع نباتات الدراسة؛ غير أن جلها عائدة إلى نبات الحندقوق. المجموعة الثالثة ضمت أربع عزلات، (MR16، MR9، MR4) و (MR2)، من نباتي الحندقوق والبرسيم على التوالي. صفات كل عزلة ذكرت سابقًا (الجداول 1، 2، 3، 4). ما لوحظ في هذا المخطط أن عزلات المجاميع تكونت بغض النظر عن النبات المعزولة منه.




**شكل 5:** مخطط شجيري Dendrogram يبين علاقة العزلات ببعضها البعض والناتج من الاختبارات البيوكيميائية (API20E) والفسيولوجية.

## الخاتمة Conclusion

بكتيريا العقد الجذرية في ليبيا عامة لم تحظى حتى الآن بالقدر الكافي من الدراسة أسوة بالبكتريا الأخرى؛ ومازالت الدراسات حولها محدودة تكاد لا تتجاوز 0.5% من مجمل النباتات البقولية المنتشرة في القُطر والتي يتجاوز عددها 208 نوع. كان الهدف من انجاز هذه العمل تثمين الدور الذي من الممكن أن تلعبه هذه البكتيريا بيئيا واقتصاديا، من خلال دراسة بعض الصفات الفسيولوجية والبيوكيميائية باستخدام نظام API 20E. هذا النظام شائع الاستخدام في توصيف البكتيريا الممرضة السالبة لصبغة جرام؛ ولكن استخدامه في توصيف الريزوبيا ليس بنفس الدرجة من الشيوع.

**أولاً: النتائج**

1. بينت النتائج أن معظم العزلات أعطت سمات الريزوبيا السريعة النمو، والمتمثلة في حجم المستعمرة الكبير وظهورها على وسط مستخلص الخميرة والمانيتول خلال 1 – 3 أيام.
2. كل العزلات كانت موجبة لأنزيم Tryptophan deaminase، وسالبة لأنزيم Sodium thiosulfate.

3. معظم العزلات كانت منتجة لأنزيمات Voges proskauer، وGelatinase، وقليلة في انتاجها لأنزيمات Citrate Permease، Arginine dihydrolase، β-galactopyranosidase، Decarboxylase، Urease وLysine decarboxylase.
4. كانت جميع العزلات مستخدمة لسكري Mannitol وArabinose، ومعظمها استخدمت سكر Rhamanose، في حين كان Inositol الأقل في الاستخدام. يشار هنا أنه من المعايير ذات المصداقية العالية في توصيف الريزوبيا والتفرقة بين سلالاتها المختلفة قدرتها على استخدام مدى واسع من السكريات.
5. العزلات RM2، RM8، RM10، RM15، RM16، RV17 وRV18 كانت متميزة في استخدامها للمواد الكربوهيدراتية واستطاعت أكسدة جميع السكريات الموجودة في نظام API 20E.
6. جميع العزلات كانت مقاومة للمضاد الحيوي Metronidazole، وحساسة للمضاد Tetracyclin.
7. المضادات Rifampicin، Nitrofuration، Streptomycin، Chloramphenicol و Nalidixic acid كانت الأكثر تأثيرًا على العزلات بعد المضاد Tetracyclin، والمضادين Clindamycin و Penicillin كانا الأقل في التأثير.
8. العزلات الريزوبية كانت متحملة للملوحة نمت حتى 4% من ملح كلوريد الصوديوم.
9. العزلات كانت متباينة ما بين نبات وآخر، ثلاث مجاميع تكونت بالتصنيف العددي بغض النظر عن عائلها أو مكان عزلها.

**ثانيا: التوصيـــات Recommendations**

من خلال هذه الدراسة ونتائجها نستطيع القول إن العزلات في المختبر كانت متميزة في خواصها، ولكن في الطبيعة قد يكون الأمر مختلف عن ذلك؛ لذا اختبارها في بيئاتها الطبيعية مطلوب قبل الوصول إلى هذه النتيجة. من الممكن استخدام هذه العزلات كلقاح للنباتات البقولية الغذائية (كنبات الحلبة) والعلفية (كنبات البرسيم) النامية في الأراضي المتأثرة بالملوحة، والتي باتت مشكلة عالمية تهدد الترب بما فيها الأراضي الليبية.

**شكر وتقدير Acknowledgments**

نتقدم بالشكر إلى الدكتور: نزار نصر الدين بابكر، السيد: أبوبكر عمران. ومركز الاستشارات والبحوث العميلة بجامعة سبها.

## References

[1] Abd EL-ghany, E. M., Eissa, P. A., Fahmi, A. I., Nagaty, H. H. and EL-zanaty, A. M. (2020). Genetic characterization of some rhizobial isolates from various legumes. *J Biotech Comp Biol Bionanotech* 101 (3), 179–191.

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

[3] Al- Idrissi, M., Sbeita, A., Jebriel, A., Shreidi, A. and Ghawawi, H. (1996). Libya: country report to the FAO international technical conference on plant genetic resources. Tripoli.

[4] Allen, O. N. and Allen, E. K. (1981). The Leguminoseae. a source book of Characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin press, Madison, WI/ Macmillan. Publishing, London.

[5] Assaffii, I. A., Hamzia, Y. A. and Hamoodia, D. T. (2010). The effect of salinity on growth and some character of *Bradyrhizobium japonicum*. Coll. Agric.,UNV.Anbar 8(4), 152- 163. (in Arabic).

[6] 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.

[7] Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. AmJ Clin Pathol, 45, 493-496.

[8] Baumer, M (1990). The Potential Role of Agroforestry in Combating Desertifcation and Environmental Degradation. Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation. Wageningen. 250 pp.
[9] Bertata, N. Z., Khalifa, M. O. and Mohamed, S. H. (2018). Selection of salinity tolerant rhizobial isolates from wild and cultivated legumes in arid region of Libya (Fezzan). *Journal* of *Pure & Applied Sciences*. www.Suj.sebhau.edu.lyISSN 2521-9200. (in Arabic).
[10] Boulos, L. (2007). plant diversity In Egypt. Al Hadara Publishing, Cairo. (in Arabic).
[11] Chaintreuil C., Girayd I. E., Prin Y., Lorquin J., Monique G., Lajudie P. and Dreyfus, B. (2000). Photosynthetic Bradyrhizobia are natural Endophytes of the African wild rice Oryza breviligulata. *Appl Environ Microbiol* 66 (12), 5437–5447
[12] Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. and Falkinham III, J. O. (2004). Microbiological Methods. 8th Ed. Arnold a member of the Hodder Headline Group London.
[13] 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.
[14] Doyle, J. J. and Luckow, M. (2003). The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiology 131, 900- 910.
[15] Fernandes Júnior, P. I., Lima, A. A., Passos, S. R., Gava, C. A. T., Oliveira, P. J., Rumjanek, N. G., Xavier, G. R. (2012). Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [*Cajanus cajón* (L.) MILLSP]. *Braz J*
[16] Gouffi, K., Bernard, T. and Blanco, C. (2000). Osmoadaptation by pipecolic acid in *Sinorhizobium meliloti*: specific effects of D and L isomers. Appl Environ Microbiol 66, 2358- 2364.
[17] Graham, P. H. (1963). Antibiotic sensitivity of root nodule bacteria *Australian J Biol Sci* 16, 557- 559.
[18] Graham P. H., Parker C.A. (1964) Diagnostic features in the characterization of root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil* 20(3), 383–396.
[19] Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keiser, H. H., Barnet, Y. M., Bradlely, R. S., Cooper, J. E., De Lay, J., Jarvis, B. D. W., Roslycky, E. B., Strijdom, B. W. and Young, J. P. W. (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodulation bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 41, 582- 587.
[20] Howieson, J. G. and Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.
[21] 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.
[22] Jordan, D. C. and Allen, O. N. (1974). Family III Rhizobaceae Conn In Bergy᾽s manual of Systematic bacteriology. Vol. 1, N. R. Krieg and J. G. Holt (Eds.) Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 234- 244.
[23] Khalefah, M. O. A. and Mohamed, S. H. (2013). Phenotypic diversity ofrhizobia nodulating some wild leguminous plantsgrowing in Libya. Ms.C. Thesis. Faculty of Science- Sebha University. (in Arabic).
[24] Khalifa, M. O., Ahamdi, I. M., Abuzeid, M.I., Abu Anizah, K. A. and Asheiwi, F.J. (2022). A study of biochemical and physiological characteristics of rhizobia isolated from *Melilotus officianalis* L. growing in arid soils of Libya. *Lib J Bas Sci* 19, 37-48 3-4/12/2022 https://ljbs.omu.edu.ly/eISSN 2707-6261

[25] 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.
[26] Nievas, F., Bogino, P., Nocelli, N., Giordano, W. (2012). Genotypic analysis of isolated peanut-nodulating rhizobial strains reveals differences among populations obtained from soils with different cropping histories. *Appl Soil Ecol* 53, 74-82.
[27] Niste, M., Vidican, R., Puia, C., Rotar, I. and Pop, R. (2015). Isolation and Biochemical Characterization of *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii* and *Sinorhizobium Meliloti* using API 20 NE and API 20 E. Bulletin UASVM Agriculture 72 (1)/ 2015. DOI 10.15835/buasvmcn-agr: 11178.
[28] Ngakou A., Megueni C., Ousseni H. and Massai A. (2009). Study on the isolation and characterization of rhizobia strains as biofertilizer tools for growth improvement of four-grain legumes in Ngaoundéré-Cameroon. *Int J Biol Chem Sci* 3(5), 1078–1089.
[29] 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.
[30] Qaisar, M. and El Gadi, A. (1984). A Critical Analysis of the Flora of Libya. *Libyan J Sci* 13, 31- 40.
[31] Rasul, A., Amalraj, E. l. D., Kumar, G. P., Grover, M., Venkateswarlu, B. (2012). Characterization of rhizobial isolates nodulating *Millettia pinnata* in India. FEMS *Microbiol Lett* 336, 148-158.
[32] Setu, L.J., Ahmed, B. and Kibria, K.Q.(2019): Identification and characterization of Rhizobium bacteria. Int. J. Res. Anal. Rev.,6(2), 519-527.
[33] Sneath, P. H. A. and Sokal, R. B. (1973). Numerical Taxonomy: the principles and practices of Numerical classification, Freeman. W. H. and Co., San Francisco, USA.
[34] Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website Version 9, June, 2008.
[35] Stoczko, M., Frere, J., Rossolini, G. and Docquier, J. (2006). Antimicro. Agents Chemother. 1973-1981.
[36] Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria, International Biological Program. *IBP Handbook*.
[37] 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. *Australian Journal Basic Applied Sciences* 6(10), 571- 583.