Diala , Jour , Volume , 32 , 2009

استخدام صبغة الكونغو الحمراء في الوسط الزرعي لتسريع عزل وتنقية وتشخيص الأنواع التابعة لجنس *Azospirillum*

خليل مصطفى خماس، ندى زكي مهدي، ليلى عبد الحميد سعيد
قسم علوم الحياة – كلية العلوم – الجامعة المستنصرية

Abstract

151 isolates of *Azospirillum* were identified out of 289 nitrogen fixing bacteria, these isolates were obtained from soil rhizosphere and sterilized rice roots of different regions in Iraq, by using biochemical and physiological characters, the isolates were differentiated into three species namely: *A. brasilense, A. Lipoferum,* and *A. irakense* and their numbers were 88,16 and 47 respectively. All isolates of *A. irakense* (except two) were obtained from sterilized root. By using modified Red Congo medium for isolation, purification and identification. The isolates were classified into three groups (A, B and C) according to colony colors. The results indicated that there is a relationship between biochemical characters and textures, shapes , colors of the colonies. It seems that there is a similarity between colonies of the same group, which differ from the other groups.

الخلاصة

شخصت ١٥١ عزلة تعود لجنس *Azospirillum* من مجموع ٢٨٩ عزلة مثبتة للنتروجين تم الحصول عليها منطقة الرايزوسفير وجذر نبات الرز لمناطق مختلفة من العراق، وباستخدام الاختبارات الكيموحيوية والخصائص الفسيولوجية الأخرى أمكن توزيع العزلات على الأنواع الآتية: *A. brasilen A. lipoferum, A. irakense,.* وباعداد بلغت ٨٨ و١٦ و٤٧ على التوالي: كانت جميع عزلات النوع *A. irakense* (باستثناء عزلتين) من جذر النبات المعقم، استخدمت اطباق وسط الكونغو الحمراء المحور للعزل والتقنية والتشخيص، اظهرت مستعمرات العزلات اختلافاً واضحاً في شكل وتوزيع الصبغة فيها، لذا فقد قسمت إلى ثلاثة مجاميع (A, B, C). دلت النتائج على وجود ارتباط وصلة وثيقة بين الخصائص الكيموحيوية مع نتائج اختبارات شكل المستعمرة وانتشار الصبغة والمناطق التي كونتها. تبين وجود تشابه لكل عزلات المجموعة الواحدة لطبيعة المستعمرات في الوقت الذي اختلفت فيه عن المجموعات الأخرى.

المقدمة

منذ إعادة عزل بكتريا *Azospirillum* حظيت هذه البكتريا بدراسة مكثفة بسبب تأثيرها المفيد على بعض مجاميع المحاصيل النباتية، وتمتلك هذه البكتريا عدة اليات تشتمل على إنتاج الهرمونات مثل cytokinine, auxin وغيرها (٢،١٠)، وتثبيت النتروجين وتسريع نمو النبات (٢، ٦)، وكونها تستعمر عادة قشرة الجذر ومنطقة الرايزوسفير لمجموعة كبيرة من النباتات المهمة زراعياً (١ ،٤)، وهناك لحد الان عشرة أنواع مكتشفة تقع ضمن جنس *Azospirillum*، ومن ضمنها:
A. irakense, A. zeae, A. lipoferum, A. brasilenseA .oryzae,A .canadense (١٣، ٦، ٥) اعتمد في تشخيص هذه الأنواع على الصفات المظهرية (phenotype characters) (تشمل الشكل الظاهري والصفات الكيمو حيوية) واستخدام التقنية الجزئية (DNA/ DNA hybridization) (٧،١٥) إضافة إلى وسائل أخرى مستندة على التقنية الجزيئية (١١) ومع كل هذا بقيت الصعوبات كثيرة نتيجة للتشابه بين هذه الأنواع عند نموها على الأوساط الزرعية وإطالة فترة العزل والتنقية والتشخيص فضلاً عن العدد الكبير من الاختبارات الكيموحيوية اللازمة لتفريق هذه الأنواع(١٣)، إضافة لوجودها مع مجاميع أخرى من البكتريا المثبتة للنتروجين وارتباط هذه المجاميع بشدة مع التربة وجذور النباتات مما جعل العزل والتنقية أمرا في غاية الصعوبة (١٢،٥)، كما وإن بكتريا *Azospirillum* تعد بطيئة النمو وزمن الجيل طويل نسبيا مقارنة مع الأجناس البكترية الأخرى المتواجدة معها(١٦).

ويتم عزل *Azospirillum* روتينيا من خلال تنميتها على وسط Nfb الأغنائي (٨) الذي يسمح بنمو مجاميع بكترية أخرى مثبتة أخرى للنتروجين(١١)، لذا اقترح الباحثون بضرورة تطوير وسط انتقائي لعزل هذه البكتريا (١٥) أو من خلال تقليل تركيز المصدر الكربوني في الوسط (١٤) أو باستخدام الكونغو الحمراء في الوسط الزرعي (١٢). استخدمت الصباغ الحيوية بصورة روتينية لصبغ البكتريا والأحياء المجهرية الأخرى (١٦،١٧) واعتبر (١٤) أن التصبيغ احد طرق التشخيص الجرثومي كاصطباغ المستعمرة في الوسط الزرعي أو عدم اصطباغها أو قدرة الصبغة على تثبيط بعض الأنواع البكتيرية ليتحول الوسط من عام إلى وسط انتقالي.

كانت صبغة الكونغو الحمراء ذات فائدة كبيرة في تشخيص بكتريا *Pasteurella pestis* (١٩) وتشخيص *Shigella sonnei* (٢٠)، كما وان هذه الصبغة قد استخدمت لتفريق بكتريا *Rhizobium* عن بقية الاجناس (٢١). وكان استخدام هذه الصبغة في الوسط الزرعي لعزل بكتريا *Azospirillum* وتمييزها عن بقية أنواع الأجناس المثبتة للنتروجين مثل *Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter, Bacillus* والمتواجدة معها قد استخدم من قبل Caceres(١٢) واوضح أهمية الصبغة في تمييز جنس *Azospirillum* عن بقية المجاميع الأخرى، حيث أن الأخيرة لا تمتص الصبغة عكس عزلات جنس *Azospirillum*. وعندما استخدمت هذه الصبغة لهذا الغرض لم تتم الإشارة او التطرق إلى قابلية الصبغة على تفريق أو تمييز الأنواع ضمن هذا الجنس (٢٢،١٢،٣)، سوى ما ذكره (Bashan and Levanony) (٢٣) من أن الوسط الحاوي على صبغة الكونغو الحمراء مع بعض المضادات الحيوية استطاع تمييز عزلات النوع *Azospirillum brasilense* عن بقية الأنواع. وفي دراسة لاحقة (٢٤) استطاعت وباستخدام هذه الصبغة من تمييز ثلاثة أنواع ضمن جنس *Azospirillum* وذلك من خلال اشكال المستعمرات وشدة الصبغة وانتشارها.

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم استخدام صبغة الكونغو الحمراء في الوسط الزرعي الصلب لعزل وتنقية وتشخيص العزلات لأنواع جنس *Azospirillum* وبيان مدى الصلة بين الخصائص أو الصفات الظاهرية والكيموحيوية مع خصائص المستعمرات النامية على وسط هذه الصبغة.

المواد وطرائق العمل

الأوساط الزرعية: استخدم نوعين رئيسين من الأوساط:
١. وسط Nfb الاغنائي الشبه الصلب (semi - solid) والخالي من النتروجين والخاص لعزل بكتريا *Azospirillum* (٦) والذي احتوى على المكونات التالية (غم/ لتر):
NaCl(0.1), MgSo4.7H2O(0.2), K2HPO4(0.5), DL.malic acid(5) MnSo4.H2O(0.1), Na2MoO4(0.002), CaCl2(0.02), CaCl2(0.02)، (٤) مل من محلول EDTA (١.٦٤ % وزن/

حجم)، (٢ مل) Bromothymol blue (0.5%) في(0.2) KOH . ٠.٠٠١ بيوتين (Biotin)، (٤.٨) KOH، (١.٨) اكار وضبط الاس الهيدروجيني على ٦.٨ وعند استخدام مصادر كربونية أخرى للاختبارات استبدل المصدر الكربوني أعلاه بينما بقيت المحتويات الأخرى كما هي.

٢. وسط الكونغو الحمراء (RC) (١٢): استخدم هذا الوسط للعزل والتنقية حسب طريقة (١٢) مع اجراء بعض التحويرات على مكونات الوسط وكالاتي (غم/ لتر):

(٠.٠١٥)، NH4Cl(1)، NaCl(0.1), MgSo4.7H2O(0.2), K2HPO4(0.5), DL.malie acid(5) $FeCl_3 6H_2O$، (٠.٢) مستخلص الخميرة، (٠.٠٠١) بيوتين، KOH(4.8)، (٢٠) اكار وتم ضبط الاس الهيدروجيني على ٦.٨ بوساطة KOH (0.1N)

جميع العينات وطرائق العزل

اقتلعت (٣) إلى (٥) من نباتات الرز مع كتلة التربة المحيطة بجذورها وبصورة عشوائية ومن ثلاث مناطق للحقل الواحد تبعد الواحدة عن الأخرى بحدود (٢٠) كيلومتر لحقول تقع ضمن محافظات النجف وديالى والقادسية وحفظت العينات في أكياس بلاستيكية معقمة وبدرجة ٤°م واستخدمت في مدة أقصاها أسبوع بعد الجمع عندها استخدمت عينات من تربة الرايزوسفير المحيطة بالجذور، ومن جذور نفس النبات (٣ نباتات)، وغسلت نماذج الجذور عدة مرات بالماء المعقم، وثم عوملت مع (١%) من Chloramine T وغسلت بعدئذ لمرات عدة حسب طريقة (٢٥) سحقت الجذور بعدها أو قطعت إلى قطع صغيرة (١ إلى ٢ سم) ووضعت في أنابيب احتوت على ٥ مل من وسط Nfb ثم حضنت بحرارة ٣٥oم ولمدة ٧٢ ساعة. وبعد ظهور النمو البكتيري على وسط Nfb و بشكل حلقة (pellicle) بيضاء كثيفة تحت السطح (٣ إلى ٧ ملم) ثم تخطيطها (streaked) على وسط RC وحضنت بحرارة ٣٥م° ولمدة ٧٢ ساعة وبعد ظهور المستعمرات ذات اللون الأحمر تم التقاطها وتخطيطها مرة ثانية على أطباق وسط RC المحور وحسب ما ذكره (١٢) لغرض التأكد من نقاوة المستعمرات عن المجاميع البكتيرية الأخرى التي ظهرت معها عند عملية التخطيط الأولى والتي كانت عديمة اللون.

التشخيص

اخضعت جميع العزلات إلى الاختبارات الكيموحيوية والفسيولوجية باستخدام مجموعة من المصادر الكربونية المختلفة، إضافة إلى ملاحظة الشكل الخارجي للخلايا بواسطة المجهر الضوئي (جدول ١ من النتائج) اعتماداً على ما أشار لـه(٦،٧،٨،١٢)، وكما استخدمت ثلاث سلالات متوفرة بمثابة type strains وهي Sp7(ATCC 29145) للنوع *A. brasilense*، Sp5b(ATCC 29707) للنوع *A. lipoferum* و KBCI للنوع *A. irakense* كمصدر للمقارنة وتقييم النتائج، كما درست أشكال المستعمرات وألوانها وانتشار صبغة الكونغو الحمراء بوساطة مجهر تشريح.

قياس فعالية أنزيم النيتروجينيز:

لقحت الأنابيب الحاوية على (٥) مل من وسط Nfb للعزلات النامية على وسط RC المحور وحضنت بحرارة ٣٠°م ولمدة ٧٢ ساعة. وقدرت فعالية أنزيم النيتروجينيز بطريقة اختزال الاستيلين (٢٦) وتم التعبير عن النتائج من خلال تحرير غاز الاثيلين (نانومول/ مل/ ساعة).

النتائج والمناقشة

من مجموعة ١٦٢ مستعمرة حمراء نامية على وسط RC المحور شبيهة ببكتريا *Azospirillum* أعطت (١٥١) عزلة منها نتائج ايجابية لفحص اختزال الاستيلين، فيما أهملت بقية العزلات التي لم تظهر أية فعالية مقبولة لهذا الفحص وأظهرت (١٥) عزلة فعالية منخفضة لأنزيم النيتروجينيز تراوحت بين (٧) إلى (١٥)

نانومول C2h4/ مل/ ساعة وهي ضمن الحدود المقبولة (٢٧،١٥)، أما بقيت العزلات (١٣٦ عزلة) فتراوحت فعالية النيتروجينيز ما بين (٣٠) إلى (٣٢٠) نانومول C2H4/ مل/ ساعة.

درست العزلات (١٥١ عزلة) تفصيليا وقسمت إلى ثلاثة مجاميع A, B وC استناداً إلى الاختبارات الكيمو حيوية والخصائص الفسيولوجية والمظهر الخارجي، إذ بلغ عدد العزلات ٨٨ و ١٦ و ٤٧ لكل مجموعة على التوالي.

يشير الجدول (١) إلى أن المجموعة A لم تستطع استخدام السترات والمانتيول والسكروز، وكذلك الكلوكوز :- باستثناء (٤) عزلات من أصل (٨٨):- فيما لم تظهر الحاجة إلى البيوتين ولم تنتج حامضا من سكري الفركتوز أو الكلوكوز لكنها كانت قادرة على استخدام D-alanine إضافة إلى أن أشكال خلاياها كانت تشبه ضمة قصيرة ثابتة الشكل واستنادا إلى (٨،٧،٦) فإن تلك الصفات تعود للنوع *A. brasilense*.

أما عزلات المجموعة B (١٦ عزلة) وكما يتضح ذلك من جدول (١) فكانت بحاجة إلى البيوتين، منتجة حامضاً من الكلوكوز والفركتوز، واستخدمت السترات والكلوكوزوالمانتيول والكليسرول بينما لم تستخدم السكروز وبعض السكريات الثنائية، هذا إضافة إلى أن الخلايا كانت متعددة الأشكال (بعضها قصيرة والأخرى طويلة) واستناداً إلى (٨،٧،٦) فإن تلك الصفات تعود للنوع *A. lipoferum*.

والمجموعة C والتي بلغ عدد عزلاتها (٤٧) فالجدول (١) يبين أن عزلاتها ليست بحاجة إلى البيوتين واستخدمت الكلوكوز لكن لم تنتج حامضاً منه، واستخدمت السكروز، المالتوز، السليبيوز و التري هالوز ولم تستخدم المانتول أو الكليسرول إضافة إلى قابليتها على تحلل البكتين (بعد ٧ إلى ٩ أيام) من الحضن كما إنها سريعة الحركة على وسط Nfb وذات خلايا نحيفة وهذه الصفات واستنادا إلى (٢٨،١٠،٧) تنطبق على النوع *A. irakense*.

لقد استبعدت المجموعة C أو بعض عزلاتها من أن تكون ضمن النوع *A. amazonense* (وجود شبه كبير بين النوع *A. irakense*، *A. amazonense* من الناحية الكيمو حيوية) (٧)، فقد استطاعت جميع عزلات المجموعة C من النمو على وسط Nfb الحاوي على NaCl (٣%) وحللت البكتين واستطاعت النمو وتثبيت النتروجين في اس هيدروجيني مقداره ٧.٥ إضافة إلى إنها أظهرت swarming على الوسط الحاوي على ٧.٥ غم/ لتر من الاكار (soft agar)(٢٩،١٠) وبذلك فإن كل هذه الصفات تميز النوعان *A. irakense*، *A. amazonense*، كما استبعدت عزلات المجاميع الثلاثة (C, B, A) من أن تكون هي أو بعضها تعود للنوع A. *halopraefens* لكون هذا النوع لا ينمو على وسط RC ولا عند اس هيدروجيني مقداره ٦.٠ كما لا ينمو بحرارة ٣٥°م (١٢)، علماً أن جميع العزلات قد تم تنميتها بهذه الدرجة الحرارية لم يتم الحصول على أية أنواع أخرى غير التي ذكرت أعلاه.

جدول (١) نتائج الاختبارات التفريقية الكيموحيوية للعزلات بين مجاميع بكتريا *Azospirillum* (١)

الفحص	المجموعة A(a)	المجموعة B(b)	المجموعة C(c)
شكل الخلايا على وسط Nfb	قصيرة تشبه الضمة، ثابتة الشكل	متعددة الأشكال ومتغيرة (طويلة وقصيرة)	ثابتة الشكل تشبه الضمة خلايا نحيفة
صبغة كرام	-	-	-
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	V	+
الحاجة إلى البيوتين	-	+	-
تكوين حامض من الفركتوز والكلوكوز	-	+	-
استخدام المصادر الكربونية:			
D-glucose	+	+	+
D-mannitol	-	+	-
Citrate	-	+	-
Sucrose, Maltose	-	-	+
Trehalose, D-Xellobiose Lactose	+	+	-
Glycerol	+	-	V
D. alanine	+	-	V
L- alanine, malate L- alanine, malate Acetate	+	+	+
تحلل البكتين (٧ إلى ٩ يوم)	-	-	+

(١) جميع العزلات البالغة ١٥١ قد اختبرت

+ = جميع العزلات موجبة الفحص.

- = جميع العزلات سالبة الفحص.

+ = أكثر من ٩٠% من العزلات سالبة الفحص.

V = النتيجة متغيرة (سالبة أو موجبة) بين العزلات.

(a) = مجموعة A = عزلات تعود للنوع *A. brasilense* وعددها (٨٨) عزلة.

(b) = مجموعة B = عزلات تعود للنوع *A. lipoferum* وعددها (١٦) عزلة.

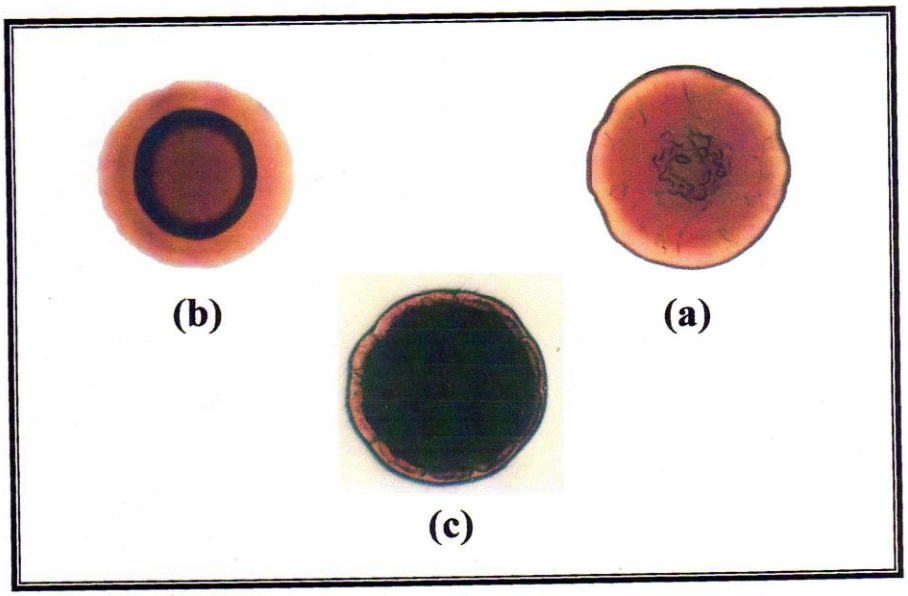
(c) = مجموعة C = عزلات تعود للنوع *A. irakense* وعددها (٤٧) عزلة.

وعند دراسة مستعمرات العزلات لكل مجموعة كُل على حدة على وسط الكونغو الحمراء المحور بعد اكتمال دراستها من الناحية الكيموحيوية والشكل الظاهري ولإيجاد صلة أو علاقة في هذا الجانب فقد أظهرت مستعمرات كل مجموعة اختلافاً واضحاً عن المجموعة الأخرى، وتشابهت عزلات كل مجموعة مع بعضها البعض على هذا الوسط وخاصة عند استمرار حضن المستعمرات لمدة أسبوع.

يوضح الشكل (١) إن مستعمرات المجموعة A والتي شخصت ضمن النوع *A. brasilense* (من هذه الدراسة) قد تميزت بامتصاصها الشديد للصبغة ولونها الأحمر الغامق بعد ثلاثة أيام من الحضن، وكان شكل المستعمرة بعد أسبوع من الحضن ذات تفصص تحت الحافة الخارجية فيما انتشرت الصبغة في معظم المستعمرات ولغاية المنطقة الواقعة تحت حافة المستعمرة تحيطها منطقة فاتحة اللون ضيقة وتحدها من الخارج حافة المستعمرة المائلة إلى التفصيص نوعاً ما.

بدت المستعمرات جافة وملتصقة بالوسط الزرعي وذات لون أحمر غامق منذ اليوم الثالث وحتى اليوم العاشر ولم تظهر اختلافات واضحة بين مستعمرات العزلات لهذه المجوعة (باستثناء عزلتين) كانت حافاتهما ملساء غير مفصصة.

أما المجموعة B والتي وضعت ضمن النوع *A. lipoferum* فقد كانت مستعمراتها (كما في الشكل ١) مؤلفة من ثلاثة مناطق مختلفة اللون بحيث تركزت الصبغة الحمراء في مركز المستعمرة وامتدت بالتساوي لتشغل حيزاً كبيراً من المستعمرة، وأحيطت بحلقة دائرية سوداء والتي كانت محاطة من الخارج بحلقة دائرية فاتحة اللون شاحبة اللون، واستمرت كذلك حتى اليوم العاشر، أما المستعمرة فكانت محدبة إذ كانت جميع العزلات المكونة للمستعمرات متجانسة الشكل ومتشابهة مع بعضها البعض ومع سلالة السيطرة Sp59b.



شكل (١): مستعمرات الأنواع التابعة لجنس *Azospirillum* بعد أسبوع من الحضن (a) *A. irakense*، (b) *A. lipoferum*، (c) *A. brasilense*
قوة التكبير 25X

أما مستعمرات المجموعة C والتي كانت ضمن النوع *A. irakense* فقد تميزت بامتصاصها الصبغة ولكن بصورة أخف وكان لون المستعمرة وردي يميل إلى البرتقالي، وذات شكل دائري ومظهر لماع، فيما انتشرت الصبغة في معظم المستعمرة وأظهرت بداخلها خطوطاً شعاعية غير منتظمة تركزت في الأطراف بعد اليومين الثالث والرابع، وسرعان ما اتجهت هذه الخطوط نحو المركز بعد اسبوع من الحضن (شكل ١) وكان شكل المستعمرة مرتفعاً أشبه بالقبعة، فيما كان شكل المستعمرات لجميع العزلات متطابقا ومتشابها إلى حد بعيد مع سلالة السيطرة KBCl.

ومما يثير الانتباه عدم نمو جميع عزلات المجموعتين A, B عندما استبدلت صبغة الكونغو الحمراء بصبغة المثيل الحمراء وعلى نفس الوسط وذلك عندما تمت زيادة تركيز الصبغة إلى ١٥٠ ملغم/ لتر بدلاً من التركيز ٣٧.٥ ملغم/ لتر (وهذا التركيز هو الذي استخدم في جميع العزلات مع صبغة الكونغو الحمراء) أما المجموعة C فقد نمت جميع عزلاتها على هذا التركيز الأعلى، وهي نفس الملاحظة التي أشير لها في دراسة سابقة (٢٤) ولكن كان التركيز المستعمل هو ٢٠٠ ملغم/ لتر من صبغة المثيل الحمراء وعليه ممكن استخدام هذه الصبغة كوسط انتقالي للنوع *A. irakense* لتمييزها عن النوعين السابقين بالتركيز المشار له أعلاه، وقد أشار (١٧) أن بعض الصبغات مثبطة لأنواع بكتيرية معينة أو ذات تأثير سمي ليتحول الوسط من عام إلى وسط انتقائي، وتتفق هذه الظاهرة مع ما توصلت إليه اللامي (٢٠) حول تأثير تركيز صبغة المثيل الحمراء على نمو بكتريا *Edwardsiella*. ولابد من الإشارة إلى أن صبغة الكونغو الحمراء تمتاز بصغر وزنها الجزيئي وسرعة ذوبانها في الماء إضافة إلى انتشارها داخل المستعمرة (١٨) ويشار إلى نفاذية سطح الخلية لهذه الصبغة والتي تتحد مع السكريات المتعددة والبروتين لتشكل معقد ما يلبث أن يتغير من حالة لأخرى بسبب العملية الأيضية أو النمو أو طرح الصبغة نتيجة العمليات الأيضية نحو مركز المستعمرة (٢٠)، وربما يعود التباين في الألوان

للمستعمرة الواحدة إلى إن خلايا البكتريا الموجودة بالقرب من محيط المستعمرة أكثر نشاط وحيوية لتتخلص من فعل الصبغة فتطرحها خلفها نحو مركز المستعمرة لذا تمركزت الصبغة غالبا في مركز المستعمرة وفقدانها أو قلتها في المنطقة الواقعة بالقرب من حافاتها.

أثبتت النتائج أعلاه إن استخدام صبغة الكونغو الحمراء أعطت نتائج واضحة ورتبت العزلات جميعاً إلى ثلاثة مجاميع كان لها صلة أو ارتباط واضحين تماماً بتقسيم العزلات استناداً إلى خصائصها المورفولوجية والكيموحيوية بحيث إن المجموعة التي تشابهت خصائصها الكيمو حيوية تشابهت كذلك في شكل المستعمرات وانتشار الصبغة والمناطق التي تكونت في المستعمرة.

ومن الملاحظات الأساسية في هذه الدراسة أن النتائج برهنت إن إعداد العزلات التي تم الحصول عليها فاقت كثيراً تلك تم الحصول الحصول عليها في دراسات سابقة في العراق (٣٠،٢٤،٧) بل وأسرعت في العزل والتنقية والتشخيص إذ إن استخدام صبغة الكونغو الحمراء قد أدى إلى التغلب على العديد من الصعوبات التي واجهت دراسة سابقة (٧) عندما استخدمت فيها أوساط صلبة غير الأوساط الحاوية على الصبغة. كذلك يتبين من جدول (٢) أنه من أصل (١٥١) عزلة تابعة لبكتريا *Azospirillum* فإن (٧٢) عزلة تم الحصول عليها من منطقة الجذر وقد شكل النوع *A. irakense* أكثر من نصف العدد من تلك المنطقة ٤٥ عزلة وهذه النتيجة منسجمة نوعاً ما مع دراسة سابقة (٧) كما إن عزلها من المنطقة الجذرية قد يعود إلى تمكن عزلات هذا النوع من احتمالية اختراق خلايا الجذر ربما بسبب قابليته على تحلل البكتين (١٠) ومهاجمة السليلوز (٣١) واللذان يؤلفان جزءاً من الصفيحة الوسطى وجدار الخلية على التوالي هذا إضافة إلى إن استخدام صبغة الكونغو الحمراء ربما انعكس على سهولة عزل هذه المجموعة كما أدى إلى رفع نسبة العزلات لهذا النوع إلى (٣١%) من مجموع العزلات بعد أن كانت هذا النسبة لا تتجاوز (٢٢%) (٢٤) وبرهنت هذه النسبة لعزلات النوع *A. irakense* على تردد وانتشار هذا النوع من الأراضي العراقية الخاصة بزراعة الرز مما يعزز الدراسات السابقة (٢٤،٧).

جدول (٢) توزيع إعداد العزلات المشخصة التابعة لجنس *Azospirillum* من المواقع البيئية المختلفة

اسم المحافظة	عدد العزلات لكل محافظة	عدد العزلات في الموقع البيئي		عدد العزلات المشخصة التابعة لبكتريا *Azospirillum*		
		تربة الرايزوسفير	منطقة الجذر المعقمة	*A. brasilense*	*A. lipoferum*	*A. irakens*
النجف	٤٠	٢١	١٩	٢٤	٤	١٢
ديالى	٥٢	٢٣	٢٩	٣١	٥	١٦
القادسية	٥٩	٣٥	٢٤	٣٣	٧	١٩
المجموع	١٥١	٧٩	٧٢	(a)٨٨	(b)١٦	(C)٤٧

(a) = ٨٨ عزلة تابعة للنوع *A. brasilense* (منها ٦٥ عزلة من تربة الرايزوسفيرو ٢٣ من الجذر)
(b) = ١٦ عزلة تابعة للنوع *A. lipoferum*(منها ١٢ عزلة من تربة الرايزوسفيرو ٤ من الجذر)
(c) = ٤٧ عزلة تابعة للنوع *A. irakens* (منها ٢ عزلة من تربة الرايزوسفيرو ٤٧ من الجذر)

ومن ملاحظة إعداد العزلات ظهر إن النوع *A. brasilense* هو السائد في التربة العراقية مقارنة بالأنواع الأخرى (جدول ٢) وهي نفس الملاحظات التي وردت في دراسات سابقة (٣٠،٢٤،٧) وهي منسجمة مع النتائج التي توصل لها (٣٢) لترب حقول الرز في مصر وفي مالي (٩) وفي اليونان (٢٢) وفي المناطق أخرى في العالم.

نستنتج من هذه الدراسة إن صبغة الكونغو الحمراء ممكن استخدامها بكفاءة عالية للتسريع في تمييز الأنواع التابعة لجنس *Azospirillum* إضافة إلى ضرورة إجراء بعض الاختبارات الكيمو حيوية والظاهرية الأساسية التفريقية بين الأنواع وعدم إضاعة الوقت بإجراء الكثير من تلك الفحوصات فضلاً عن أن هذه الطريقة (استخدام الصبغة) قد استبعدت مجاميع كثيرة من البكتريا المثبتة للنتروجين المصاحبة مما يدلل على فعاليتها ومتماشياً مع التأكيدات السابقة لاستخدام هذه الصبغة (٢، ١٢، ٢٠).

References

1- Eckert, B; Weber, OB, Kirchhof, G, Halbritter, A; Stoffels, M; Hartman, A.. *Azospirillum doebereinera* sp nov. a nitrogen fixing bacterium associated with the C – 4 grass Miscanthus. Int. J. S. Evol. Microbiol. 51, PP. 17 – 26. (2000).

2- Somers; E. D.Ptacek; P. Gysegom; M. Srinivasan, and I. Vanderleyden. *Azospirillum brasilense* produces the Auxin – like phenylacetic acid by using the key enzyme for Indole – 3 – Acetic Acid Biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 71:1803 – 1810. (2005).

3- Bashan, Y; Bustillos, T.T.; Leyva, L.A., Hernandez, T. P, and Bacilio M.. Increase in auxiliary Photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. Biology and Fertility of Soils 42: 279 – 285. (2005).

4- Doberciner, J. Baldani, V. L. D. and Reis, V. M. Endophytic occurance of diazotrophic bacteria in non – Leguminous crop. In: *Azospirillum* Vl and related microorganisms. l. Fendrik, M. de Gallo, J. Vanderleyden and M. de Zamarocy (cds) p: 3 – 14. Springer – verlag. Berlin (1995).

5- Mehnaz, S. B. Weselowski, and G. Lazarovits. *Azospirillum zeae* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from corn rhizosphere soil of zeamays. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., December.1 , 57 (12) 2805 – 2809. (2007).

6- Mehnaz, S. B. Weselowski, and G. Lazarovits. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen – fixing bacterium isolated from corn rhizosphere Int. J. Syst. Evol. Microbiol., March., 1;57 (3): 620 – 624 (2007).

7- Khammas, K.M; Ageron, E.; Grimont, P. A. D and Kaiser, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140: 679 - 693. (1989).

8- Peng, G. H. Womg; G. Zhang; W. Hou; Y, Liu; E. T. Wang, and Z. Tan. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molass grasses. Int. J. Syst Evo. Microbiol., June 1, 56 (6): 1263 – 1271 (2006).

9- Kabir, M. and Faure, D. Identification of *Azospirillum* by Oligonucleotide probes after isolation form a soil and sorghum rhizoplane contaminated or not by parasitic plant: striga. In: *Azospirillum* V I and related microorgamisms. I. Fendrik, M. de Gallo, J. Verlag Berlin. (1995).

10- Khammas, K. M. Interactions nutritionnelles entre bacteries fixatrices d` azote et bacteries pectinolytiques. Thesis of doctorate. University of Paris 7 France. (1991)

11- Boyer, M. J. Haurat, S. Samain, B. Segurens, F; Govry, V. FGonzalez, P. Mavingui. R. Rphr, R. Bally, and F. Wisniewski - Dye. Becteriophage Prevalence in the Genus *Azospirillum* and Analysis of the first Genome Sequence of an *Azospirillum brasilense* integralive Phage. Appl. Envir. Microbiol., Ferbruary 1, 74 (3): 861-874 (2008).

12- Rodrigues- Caceres, E. A. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44: 990- 991 (1982).

13- Xie C. H. and A. Yokota. *Azospirillum oryzoe* sp. nov. , a nitrogen fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa* Int. I. Syst. Evol. Microbiol. July 1.; 55 (4): 1435. (2005)

14- Hegazi, N. A. and Monib, M. Enumeration of nitrogen fixing spirilla. Soil Biol. Biochem. 11: 437- 438. (1979).

15- Tyler, M. E; Milam, I. R.; Smith, R. L.; Sahank, S. C and Zuberer,D. A. Isolation. of *Azospirillum* from divers geographic regions. Can J. Microbiol. 25: 693- 697. (1979).

16- Ogran, A. and Feng, X. Methods of soil community analysis. pp: 422- 430. In: Manual of Environmental Microbiology. C. J. Hurst, G. R. Knudesn, M. J. Mclncrney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter (eds). American Socoicty of Microbiology. Washington. (1997).

17- Swatek, F. E. Textbook of Microbiology. The C. V Mosby Company. (1967).

18- Heden, C. and llleni, T. New approaches to the identification of microorganisms A Wiley Biomedical- Health Publications (1975).

19- Surgall, M. T. and Beesley, E. D Congo Red- Agar plating medium for detection pigmentation in *Pasteurella pestis*. Appl. Microbiol. 18: 834-837.(1969).

٢٠- اللامي سندس هادي. دور الصباغ الحيوية والاشعة فوق البنفسجية في تشخيص افراد العائلة المعوية. رسالة ماجستير- كلية الطب/ جامعة بغداد (١٩٩٣).

21- Fred. E.B. and Waksman. S. A. Laboratory manual of microbiology P. 33 and 96. McGraw- Hill Book Co. New York. (1928).

22- Kefalogianni, I. Flouri, F. and Balis, C. Occurance, Isolation and identification of *Azospirillum* strains in Greece. In: *Azospirillum* V I and related microorganisms. I. Fendrik, M. de Gallo, J. Vanderleydn, and M. de Zamarocy. (eds). P: 461- 465. (1995).

23- Bashan, Y. and Levanony, H. An improved selection technique and medium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol. 31:947- 952. (1985).

٢٤- مهدي، ندى زكي. عزل وتشخيص وكثافة بكتريا *Azospirillum* في المنطقة الجذرية لنبات الرز في محافظة ديالى. رسالة ماجستير. كلية العلوم- الجامعة المستنصرية (١٩٩٥).

25- Patriquin, D. G. and Dobereiner, J. Light microscopy observations of tetrazolium- reducing bacteria in the in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Can. J. Microbiol. 24: 734- 742. (1978).

26- Turner, G. L. and. Gibson, A. H.. Measurment of nitrogen fixation by indirect means: p. 111- 138. In: Methods for evaluating biological nitrogen fixation, F. J. Bergersen (ed). John Wiley and Sons Ltd. Chichester, England. (1980).

27- Thompson, J. A.; Gemell, L.G.; Roughly, R. J. and Evans, J. Nitrogenase activity associated with pasture grasses in northern New South Wales. Soil. Boil. Biochem. 66: 217- 222 (1984).

28- Holt, J. G. Krieg, N. R. Sneath, P. H. A. Staley, J. T. and Williams S. T. Bergeys Manual of determinative Bacteriology. 9th (ed) Williams and Wilkins. (1994).

29- Khammas, K. M. Ageron, E. Grimont, P. A. D. and Kaiser, P. The nitrogen-fixing bacteria from Iraqi rice- field soils. Eur. J. Soil Biol. 30: 101-106. (1994).

30- Al- Maadhidi, J. F. Isolation and characteriztion of *Azospirillum* spp. From Iraqi wheat cultivars. J. University of Kuwait (science). 16: 343- 348. (1989).

٣١- خماس، خليل مصطفى. تحلل السليلوز وتثبيت النتروجين بواسطة بكتريا *Azospirillum* مجلة علوم المستنصرية. المجلد ١٣. العدد (١). ١- ١٠ (٢٠٠٢).

32- Omar, A. M.; Richard, C.; Weinhar, P. and Balandear, J. Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soil. Biol. Fertil. Soil. 7: 156- 163. (1989).