Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 31, No: 02, 2022 (141-149)

Antimicrobial Activity of Local Rhizobial Isolates Against Some fungi

Omar Hammad Jumaah[1*], Raad Hassani Sultan[2], Mahde Saleh Assafi[3]

[1*, 2]Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq.
[3]Department of Biology, College of Sciences, University of Duhok, Kurdistan, Iraq.

E-mail: [1*]omarhammad.92@uomosul.edu.iq, [2]dr.raadsultan@uomosul.edu.iq, [3] mahde.assafi@uod.ac

(Received April 12, 2022; Accepted May 25, 2022; Available online June 01, 2022)

DOI: 10.33899/edusj.2022.133511.1230, © 2022, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Abstract

In this study, three isolates of *Ensifer fredii* bv. *fredii* were isolated from root nodules of *Vigna unguiculata* L. (Cowpea) which collected from different cultural areas in Nineveh Governorate/Iraq. The rhizobial colonies were purified and their agronomic and biochemical characteristics were studied. Microscopic examination results showed rod negative Gram stain bacteria, whereas the three isolates showed ability to grow on rhizobial minimal medium (RMM), motility on TY semi-solid medium, gelatin liquefaction, citrate utilization as a sole carbon source, as well as the isolates showed a positive result for Triple Sugar Iron (TSI). Antimicrobial activity study of local rhizobial isolates against fungi showed a clear effect on studied fungi. The filtrate culture of *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM1 showed inhibition zone effect with average 12.6, 10.3 and 12.0 mm against *Aspergillus niger* MR1, *Fusarium solani* MR2 and *Penicillium* spp. MR3, respectively, whereas the filtrate culture of *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM13 showed inhibition zone effect with average 10.0, 13.3 and 13.0 mm against *Aspergillus niger* MR1, *Fusarium solani* MR2 and *Penicillium* spp. MR3, respectively. A filtrate culture of *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM23 showed less effect against each of *Aspergillus niger* MR1 and *Penicillium* spp. MR3 which inhibition zone average 8.6 mm, whereas there is no inhibition effect were recorded for culture filtrate against *Fusarium solani* MR2.

Keyword: rhizobia, isolation and characterization, antimicrobial activity, fungi.

الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات رايزوبيا محلية تجاه ثلاثة أنواع من الفطريات

عمر حماد جمعة[1*]، رعد حساني سلطان[2]، مهدي صالح عسافي[3]

[1*، 2] قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق

[3] قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة دهوك، دهوك، كردستان/العراق

الخلاصة:

تم في هذه الدراسة عزل ثلاثة عزلات من بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* وهي ORM1 و ORM13 و ORM23 من العقد الجذرية لنبات اللوبيا *Vigna unguiculata* L. (Cowpea) والتي جمعت من مناطق زراعية مختلفة من محافظة نينوى/العراق. أظهرت نتائج الفحص المجهري عصيات سالبة لصبغة كرام Gram negative، في حين أظهرت العزلات الثلاثة قابليتها على النمو على وسط الرايزوبيوم الأدنى RMM والحركة على وسط TY شبه الصلب، كما أظهرت القدرة على تمييع الجلاتين فضلا عن اظهارها القدرة على استهلاك مادة السترات كمصدر وحيد للكاربون. كذلك أظهرت العزلات الثلاثة نتيجة موجبة لاختبار ثلاثي السكر

والحديد TSI. بيّنت دراسة الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المحلية المدروسة تجاه الفطريات Fungi تأثيرا تثبيطيا واضحا على نمو الفطريات الممرضة قيد الدراسة اذ ان راشح مزرعة التخمير للعزلة *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM1 كان له تأثير تثبيطي تجاه كل من عزلات الفطريات *Aspergillus niger* MR1 و *Fusarium solani* MR2 و *Penicillium* spp. MR3 إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 12.6 و 10.3 و 12.0 ملم، على التوالي. في حين أظهر راشح مزرعة التخمير للعزلة *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM13 تأثيراً تثبيطياً تجاه عزلات الفطريات *Aspergillus niger* MR1 و *Fusarium solani* MR2 و *Penicillium* spp. MR3 إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 10.0 و 13.3 و 13.0 ملم، على التوالي. ان راشح مزرعة التخمير للعزلة *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM23 اظهر تأثيراً تثبيطياً اقل تجاه كل من *Aspergillus niger* MR1 و *Penicillium* spp. MR3 اذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 8.6 ملم لكلا الفطرين، في حين لم تسجل أي فعالية مضادة لراشح مزرعة التخمير تجاه *Fusarium solani* MR2.

الكلمات المفتاحية: رايزوبيا، عزل وتشخيص، الفعالية المضادة المايكروبية، فطريات.

1. المقدمة: Introduction

تعود بكتريا التربة الرايزوبيوم *Rhizobium* الى عائلة الـ Rhizobiaceae وتشمل عدة اجناس منها *Rhizobium* و *shinella* و *Ensifer* وبشكل عام قُسمت بكتريا الرايزوبيا الى قسمين بالاعتماد على الوسط المغذي فالقسم الأول يطلق عليه بالرايزوبيا بطيئة النمو Slow growing rhizobia حيث ينتج هذا القسم القلويات ويحتاج الى 3-5 أيام لإنتاج عكورة على الوسط الذي تنمو الذي تنمو فيه ومتوسط تضاعف هذه البكتريا يتراوح ما بين 6-7 ساعات، اما القسم الثاني فيدعى بالرايزوبيا سريعة النمو Fast growing rhizobia ومن مميزاتها انها تنتج الاحماض والتي تؤدي بدوها الي زيادة نسبة العكورة في الوسط الذي تنمو فيه ومتوسط تضاعف هذه المجموعة من الرايزوبيوم ويتراوح ما بين 2-4 ساعات [1].

تتواجد بكتريا الرايزوبيوم حول جذور النباتات البقولية والتي تعرف بمنطقة الـ Rhizosphere، من خلال وجودها في هذه المنطقة فإنها تؤدي الى إصابة جذور النبات في منطقة الشعيرات الجذرية وغالبا ما تحدث الإصابة من خلال التشققات الموجودة في سطوح جذور النبات البقولي، إذ ان دخول بكتريا الرايزوبيوم الى داخل قمة الشعيرة الجذرية يؤدي الى احداث تشوهات في الشعيرات الجذرية Root hair curing ومن ثم تكوين ما يعرف بخيط الإصابة (It) Infection thread والذي يحتوي على بكتريا الرايزوبيوم المنقسمة [2]. تغزو بكتريا الرايزوبيوم الخلايا المجاورة ثم تبدأ خلايا الدائرة المحيطية والقشرة بالانقسام بشكل متعاقب مؤدية الى تكوين العقد الجذرية وتلعب الهورمونات النباتية دورا هاما في السيطرة على العمليات التي تؤدي الى تكوين العقد الجذرية [3]. تقوم بكتريا الرايزوبيوم المتحورة الى بكتيرويدات Bacteriodes وبمساعدة أنزيم النايتروجينيز Nitrogenase بتحويل النايتروجين الجوي الى امونيا. عرفت بعض اجناس البكتريا بانتهاجها للبكتريوسينات Bacteriocins والتي تعد كسموم بروتينية يتم افرازها من قبل البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. ان الكثير من البكتريوسينات تمتلك مدى تثبيطي يمتد الى ما بعد مستوى الجنس كما ان لها قدرة كامنة للدفاع ضد المايكوفلورا غير المرغوب فيها [4].

درس الباحث Butt واخرون [5] التركيب الثلاثي للبروتين التابع للبكتريوسين والمشفر من الجين المعزول من العزلة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* LC31. نجح الباحث Mohammed and Sultan [6] في الحصول على عزلات من بكتريا الرايزوبيوم المحلية ذات فعالية مضادة للمايكروبات حيث بلغ معدل قطر التثبيط 17 ملم تجاه البكتريا المرضية البشرية *Proteus vulgaris* وذلك عند تطبيق راشح مزرعة العزلة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* AS36. لازالت البحوث قليلة في هذا المجال وعليه هدفت هذه الدراسة الى محاولة عزل ودراسة عزلات من بكتريا الرايزوبيا المحلية ذات فعالية مضادة للفطريات الممرضة للنبات.

2. المواد وطرائق العمل:

1.2 الأَوساط الغذائية:

1.1.2 وسط المانيتول ومستخلص الخميرة:

حُضِّر هذا الوسط بإذابة 1 غم من خلاصة الخميرة Yeast Extract، و10 غم من المانيتول Mannitol و0.10 غم من كلوريد الصوديوم NaCl و0.20 غم من كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ و 0.50 غم من مادة KH_2PO_4 و16 غم من الآكار في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني pH عند 6.8 [7].

2.1.2 وسط التربتون ومستخلص الخميرة:

حُضِّر هذا الوسط وذلك بإذابة 3 غم من خلاصة الخميرة Yeast extract و0.12 غم من كلوريد الكالسيوم المائية $CaCl_2.2H_2O$ و5غم من التربتون Tryptone في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني pH عند 7.0 [7].

3.1.2 وسط الرايزوبيا الأَدنى:

حُضِّر هذا الوسط حسب طريقة الباحث Singh واخرون [8]، إذ يتكون هذا الوسط من محلولين:

1.3.1.2 محلول A:

حُضِّر هذا الوسط بإذابة 0.45 غم من مادة ثنائي فوسفات الصوديوم $Na_2HPO_4.12H_2O$ و2.0 غم من مادة كبريتات الامونيوم $(NH_4)2SO_4$ و0.10 غم من مادة كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ و0.04 غم من مادة $CaCl_2.2H_2O$ و2.00 غم من مادة كلوريد الحديد الثلاثي $FeCl_3$ ثم يكمل الحجم إلى 900 مل الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني pH عند 7.2 ثم يتم تعقيمه بالمؤصدة.

2.3.1.2 محلول B:

حُضِّر هذا المحلول وذلك بإضافة 20 غم من سكر الكلوكوز الى 100 مل من الماء المقطر وتم ضبط الـ pH عند 7.0 ثم تم تعقيمه بالمرشح الغشائي Millipor Filter بقطر 0.20 مايكروميتر ثم تم اضافة هذا المحلول إلى المحلول الأَوَّل.

4.1.2 وسط اختبار الحركة:

حُضِّر هذا الوسط بإذابة 1.3 غم من Tryptone Yeast (TY) شبه الصلب في 100 مل من الماء المقطر ثم اضيف له 0.5 غم من الآكار Agar وتم ضبط الأس الهيدروجيني pH عند 7.2 [9].

5.1.2 وسط الجيلاتين:

حُضِّر هذا الوسط وذلك بإذابة 128 غم منه في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني pH عند درجة 7.2 [10].

6.1.2 وسط سيمون ستريت:

حُضِّر هذا الوسط وذلك بإذابة 23 غم منه في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني pHعند درجة 7.2 [11].

7.1.2 وسط مولر–هنتون:

حُضِّر هذا الوسط بإذابة 35 غم منه في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني pH عند درجة 7.2 [12].

8.1.2 وسط الحديد والسكريات الثلاثية:

حُضِر هذا الوسط بإذابة 65 غم منه في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني pH عند درجة 7.2 [13].

9.1.2 وسط سابرويد دكستروز الصلب:

حُضِر هذا الوسط بإذابة 62 غم منه في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأس الهيدروجيني pH عند 5.6 ثم عقم بالمؤصدة وترك الى ان تنخفض درجة حرارة الوسط الى 45-50 °م ثم تم إضافة المضاد البكتيري Streptomycin sulphate بتركيز 100 مايكروغرام/مل من الوسط [14].

2.2 الكواشف والمحاليل:

1.2.2 كاشف الكاتاليز:

حُضِر هذا الكاشف وذلك بإضافة 3 مل من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الى 97 مل من الماء المقطر [15].

2.2.2 كاشف الاوكسديز:

حُضِر هذا الكاشف بإذابة 1 غم من مادة *N, N, N, N*-tetramethyl-*p*-phenylene diamine في 100 مل من الماء المقطر وتم حفظ الكاشف في قنينة زجاجية معتمة عند درجة حرارة 25-30 °م [16].

3.2 عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لنبات اللوبيا:

تم جمع نبات اللوبيا (Cowpea) *Vigna unguiculata* L. من مناطق زراعية مختلفة في محافظة نينوى والتي شملت منطقة وانه وبايبوخت والفاضلية، وتم اتباع الطرائق الخاصة بعزل بكتريا الريزوبيوم من العقد الجذرية لنبات اللوبيا وذلك وفقا لطريقة Vincent [17].

4.2 التلقيح العكسي

أُجري التلقيح العكسي لغرض التأكد من العلاقة التخصصية ما بين بكتريا الرايزوبيوم والنبات المضيف اذ تم اجراء الاختبار حسب طريقة Vincent [17].

5.2 تنقية العزلات الرايزوبية:

نُقيت العزلات الرايزوبية بطريقة التخطيط على الوسط الغذائي التربتون وخلاصة الخميرة Tryptone Yeast Extract حيث تم تخطيط الاطباق بـ 3-4 مراحل ثم تم التحضين عند درجة حرارة 28±2 ° م لمدة 24-48 ساعة.

6.2 إدامة العزلات الرايزوبية:

تم تنمية وحفظ وادامة عزلات الرايزوبيا على شكل موائل (slants) للوسط الغذائي التربتون وخلاصة الخميرة Tryptoe yeast extract.

7.2 الاختبارات الكيموحيوية لعزلات الرايزوبيا:

أُجري اختبار قابلية عزلات بكتريا الرايزوبيا للأصطباغ بصبغة كرام وقابليتها على الحركة حسب طريقة الباحث Aneja [10] وقابلية البكتريا على النمو في وسط الرايزوبيوم الأدنى [18] وتم اختبار قابلية البكتريا على استهلاك مادة السترات حسب طريقة Koneman واخرون [19]. كما أُختبرت قابلية البكتريا على النمو في وسط ثلاثي السكر والحديدTSI [10]. كما تم اختبار قابلية البكتريا على تسييل الجلاتين حسب طريقة Alhayale [20].

8.2 مصدر الفطريات المدروسة:

تم الحصول على الفطريات الاتية: *Asperglus niger* MR1 و *Fusarium oxysporum* MR2 و *Penicillium* spp MR3 والتي استخدمت في هذه الدراسة من قسم وقاية النبات/كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل، وتم التأكد من نقاوتها وذلك بالزرع بطريقة التخطيط Streaking.

9.2 اختبار الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات الرايزوبيا:

تم اجراء هذا الاختبار على مرحلتين في المرحلة الأولى تم تحضير راشح التخمير الخالي من خلايا بكتريا الرايزوبيوم، وفي المرحلة الثانية تم اجراء اختبار التثبيط مختبريا في الأطباق *In vitro* Inhibition zone test وكما يأتي:

10.2 تحضير راشح المزرعة الخالي من خلايا بكتريا الرايزوبيوم:

حُضِّر الوسط الغذائي خلاصة الخميرة والمانيتول Yeast Extract Mannitol السائل ثم تم نقل 25 مل من هذا الوسط إلى دورق زجاجي حجم 100 مل ثم تم تلقيح الوسط بعد التعقيم ببكتريا الرايزوبيوم وبعدها تم وضع الدورق في الحاضنة عند درجة حرارة 2±28 ° م لمدة 24 ساعة. بعد ذلك عُمل طرد مركزي بقوة 6000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة ثم تم امرار العالق من خلال مرشحات دقيقة Millipore filters بقطر 0.2 نانوميتر للحصول على راشح خالي من الخلايا البكتيرية [21].

11.2 اختبار منطقة تثبيط الفطريات في الأطباق:

تم اجراء اختبار الفعاليَّة المضادة المايكروبية لراشح عزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه ثلاثة أنواع من الفطريات اذ تم تنمية الفطريات في الوسط الغذائي Sabouraud Dixtrose Agar (S.D.A.) عند درجة حرارة 2 + 28 ° م لمدة 4 أيام وبعد الحصول على نمو يغطي كامل الطبق تم وضع 10 مل من الماء المقطر المعقم على الطبق وباستخدام ناشر زجاجي معقم Spreader وتم تحريك الماء داخل الطبق للحصول على العالق البوغي ثم تم سحب العالق البوغي بواسطة ماصة معقمة بعد ذلك تم نقل العالق الى قنينة زجاجية معقمة ثم تم قياس كثافة العالق باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer بحيث تكون القراءة مقاربة الى 0.08-0.1 للحصول عالق بوغي بكثافة 10^6 بوغ لكل 1 مل ثم تم سحب 0.1 مل من العالق البوغي وتم فرشه على الوسط الغذائي Muller-Hinton agar الحاوي على 20 مل باستخدام الناشر ثم وضعت الاطباق في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة لكي تجف ثم تم عمل حفر في الاطباق بقطر 6 ملم باستخدام ثاقبة الفلين المعقمة وعلى عدد عزلات بكتريا الرايزوبيا. ثم تم نقل 100 مايكروليتر من راشح بكتريا الرايزوبيا الخالي من خلايا البكتريا بعد ذلك وضعت الاطباق في الحاضنة في درجة حرارة 2+28 ° م لمدة 4 أيام وسُجلت النتائج وذلك بقياس اقطار التثبيط حول الحفر بوحدة مليميتر [22]. اذ تم عمل ثلاث مكررات لكل معاملة بينما تم اضافة 0.1 مل من المحلول الفسلجي المعقم كمجموعة سيطرة سالبة.

3. النتائج والمناقشة:

1.3 عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لنبات اللوبيا:

بعد اتباع طريقة عزل وتنقية بكتريا الرايزوبيوم فقد تم الحصول على ثلاثة عزلات من بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* وقد تم اعطاؤها الأسماء ORM1 و ORM13 و ORM23 والتي عزلت من العقد الجذرية لنبات اللوبيا. تم تنقية العزلات وحفظها في الوسط الغذائي المستخدم للتنقية والحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4 ° م لغرض القيام بالتجارب اللاحقة.

2.3 التلقيح العكسي:

تم اجراء التلقيح الرجعي او العكسي وذلك من اجل التأكد من العلاقة التخصصية ما بين بكتريا الرايزوبيوم والنبات المضيف اللوبيا حيث لوحظ ظهور العقد الجذرية على جذور نبات اللوبيا وذلك بعد مرور أسبوعين وهذا يؤكد ان العزلات هي التي تصيب هذا النبات بشكل تخصصي [23].

3.3 الاختبارات الكيموحيوية لعزلات الرايزوبيا:

بيّنت نتائج الاختبارات الكيموحيوية للعزلات الثلاثة ان البكتريا سالبة لصبغة كرام وكان شكلها عصوي وذات لون وردي عند الفحص تحت المجهر. كما أظهرت العزلات الثلاثة القابلية على النمو على وسط الرايزوبيوم الأدنى (RMM). كما بينت النتائج أن العزلات الثلاثة لها القدرة على استهلاك مادة السترات كمصدر وحيد للكاربون فضلاً عن اظهار جميع العزلات نتيجة موجبة تجاه اختبار ثلاثي السكر والحديد (TSI). كما أعطت العزلات الثلاثة نتيجة موجبة لاختبار تسييل الجلاتين. توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسات سابقة حيث ان بكتريا الرايزوبيوم المدروسة كانت سالبة لصبغة كرام ولها القدرة على استهلاك مادة السترات كمصدر وحيد للكاربون ولها القدرة على النمو على وسط الرايزوبيوم الأدنى فضلا عن قدرتها على تسييل الجلاتين كما أعطت نتيجة موجبة لاختبار ثلاثي السكر والحديد [24].

4.3 الفعالية المضادة الميكروبية لعزلات بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii*:

أُجري اختبار الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا تجاه أنواع الفطريات *Aspergillus niger* MR1 و *Fusarium solani* MR2 و *Penicillium* spp. MR3. واختبرت الفعالية المضادة وذلك بعمل حفر في الوسط الحاوي على الفطريات وكما في الجدول 1.

أَظهرت نتائج اختبار الفعالية المضادة المايكروبية لعزلات بكتريا الرايزوبيا قيد الدراسة أَنَّ الراشح الرايزوبي للعزلة *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM1 كان له تأثير تثبيطي تجاه عزلات الفطريات المرضية *Aspergillus niger* MR1 و *Fusarium solani* MR2 و *Penicillium* spp. MR3 إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 12.6 و 10.3 و 12.0 ملم، على التوالي (الشكل 1).

أما راشح مزرعة التخمير للعزلة *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM13 فقد كان له تأثير تثبيطي تجاه عزلات الفطريات *Aspergillus niger* MR1 و *Fusarium solani* MR2 و *Penicillium* spp. MR3 إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 10.0 و 13.3 و 13.0 ملم، على التوالي (الشكل 1).

ان راشح مزرعة التخمير للعزلة *Ensifer fredii* bv. *fredii* ORM23 اظهر فعالية مضادة مايكروبية تجاه كل من الفطريات *Aspergillus niger* MR1 و *Penicillium* spp. MR3 اذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 8.6 ملم لكلا الفطرين، في حين لم تُظهر أي فعالية مضادة تجاه *Fusarium solani* MR2 (الشكل 1).

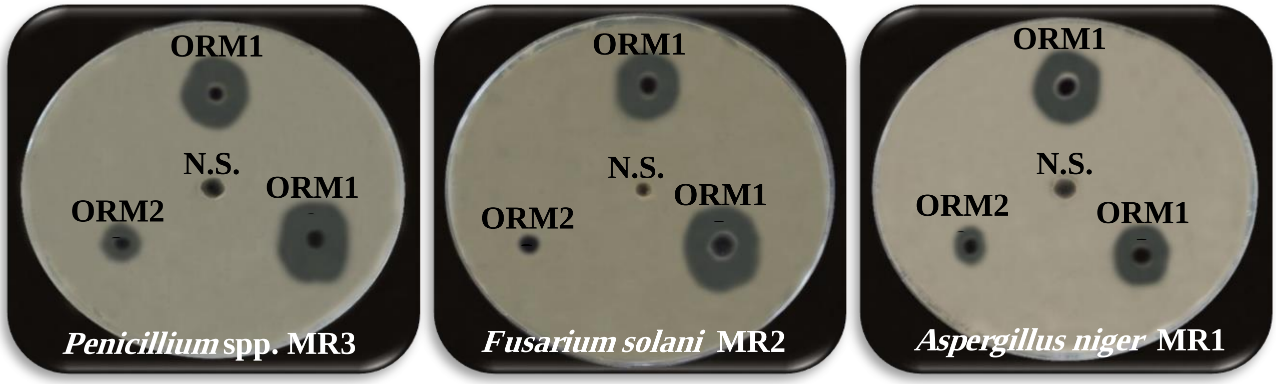
توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه الباحث Sowmya واخرون [25]، حيث قام الباحث بدراسة الفعالية المضادة المايكروبية لبكتريا الـ *Rhizobium* spp. تجاه الفطر *Aspergillus niger* وتوصل الى ان لراشح مزرعة التخمير لبكتريا الـ *Rhizobium* spp. تأثير تثبيطي تجاه هذا الفطر حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 6.5 ملم. درس الباحث Nandi واخرون [26] الفعالية المضادة المايكروبية لبكتريا الـ *Rhizobium japonicum* و *Bradyrhizobium japonicum* تجاه ممرضات نباتية فطرية

حيث أظهرت النتائج ان هنالك تأثيراً تثبيطياً تجاه كل من الفطر *Aspergillus niger* و *Fusarium oxysporum* حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 8.3 ملم و 7.4 ملم على التوالي وذلك عند تطبيق راشح بكتريا *Rhizobium japonicum*. اما عند تطبيق راشح مزرعة التخمير لبكتريا *Bradyrhizobium japonicum* فقد بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 9.2 ملم و 7.6 ملم على التوالي، اعتبر الباحث ان هذه النتائج دلالة على ان بكتريا الـ *Rhizobium japonicum* و *Bradyrhizobium japonicum* تعد بمثابة عوامل سيطرة بايولوجية، كما أوصى الباحث بإجراء دراسات معمقة في مجال الهندسة الوراثية من اجل ادخال الجينات المشفرة لتصنيع مؤيضات الفعالية المضادة للبكتريا والفطريات الى عزلات الرايزوبيا المنتخبة من اجل استخدامها كعوامل سيطرة بايولوجية.

تقاربت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحث Al-Ani واخرون [27] اذ استخدم بكتريا الـ *Rhizobium japonicum* كعامل سيطرة حيوي تجاه مرض تعفن جذور نبات فول الصويا *Glycine max* والذي يسببه الفطر *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* وتوصل الى ان هناك تأثيراً تثبيطياً تجاه هذه الفطريات اذ بلغت نسبة التثبيط 65.58%، 64.04% على التوالي. وقد ذكر الباحث ان الية الفعالية المضادة لبكتريا الرايزوبيا تجاه الفطر *Fusarium solani* و *Macrophomina phaseolina* قد تكون ناتجة من تجمع بكتريا الرايزوبيا في منطقة المجموعة الجذرية للنبات مستغلة افرازات جذور النبات للنمو وتصنيع المؤيضات التي تؤدي بدورها الى حماية جذور النبات المضيف من الممرضات النباتية من خلال التضاد الحيوي فضلا عن تحليل وتحطيم المركبات المفرزة من قبل الفطريات الممرضة كما انها تؤدي الى تثبيط انبات السبورات الفطرية الممرضة وكذلك تحفيز آليات الدفاعات النباتية.

جدول (1): الفعالية المضادة المايكروبية لراشح عزلات بكتريا الرايزوبيوم ومجموعة السيطرة السالبة تجاه ثلاثة انواع من الفطريات، وفق معدل منطقة التثبيط Inhibition zone (ملم).

العزلات	*A. niger* MR1	*F. solani* MR2	*Penicillium* spp. MR3
مجموعة السيطرة السالبة (المحلول الفسلجي)	00.0	00.0	00.0
Ensifer fredii bv. *fredii* ORM1	12.6	10.3	12.0
Ensifer fredii bv. *fredii* ORM13	10.0	13.3	13.0
Ensifer fredii bv. *fredii* ORM23	8.6	0.0	8.6



الشكل (1): الفعالية المضادة المايكروبية لراشح عزلات الرايزوبيا المعزولة في هذه الدراسة تجاه ثلاثة أنواع من الفطريات. (N.S): المحلول الفسلجي المعقم (مجموعة السيطرة السالبة).

4. الإستنتاجات النهائية:

إمكانية الحصول على عزلات رايزوبيا محلية لبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* ذات فعالية مضادة كامنة لفطريات ممرضة للنبات والتي يمكن تطوير هذه الفعالية بطرائق مختلفة.

5. شكر وتقدير:

يشكر باحثو هذه الدراسة كل من جامعة الموصل/كلية التربية للعلوم الصرفة/قسم علوم الحياة وجامعة دهوك/كلية العلوم/قسم علوم الحياة لتوفير الإمكانيات العلمية من الأجهزة والاحتياجات التي ساعدت على أنجاز هذا البحث.

6. المصادر:

[1] T. K. Chhetri, B. R. Subedee, and B. Pant, "Isolation, identification and production of encapsulated *Bradyrhizobium japonicum* and study on their viability," Nepal J. Biotechnol., pp. 7: 39-49, 2019. DOI: https://doi.org/10.3126/njb.v7i1.26950.

[2] G. E. Oldroyd, J. D. Murray, P. S. Poole, and J. A. Downie, "The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis," Annual Rev. Gen., pp. 45: 119-144, 2011. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132549.

[3] S. Roy, W. Liu, R. S. Nandety, A. Crook, K. S. Mysore, C. I. Pislariu., "Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation," The Plant Cell., pp. 32: 15-41, 2020. DOI:10.1105/tpc.19.00279.

[4] M. Chatterjee and A. Raichaudhuri, "Bacteriocin in harmony with ABC transporter exhibits antimicrobial activity," E. C. Microbiol., pp. 8: 3-10, 2017.

[5] A. M. Butt, I. B. Khan, F. Haq, and Y. Tong, "De novo structural modeling and computational sequence analysis of a bacteriocin protein isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain LC-31," African J. Biotechnol., pp. 10: 7381-7388, 2011. DOI: 10.5897/AJB11.609.

[6] A. A. Mohammed and R. H. Sultan, "Isolation and Characterization of Local Isolates of Rhizobia in Nineveh Governorate/Iraq," J. Edu. Sci., pp. 30: 2-22, 2021. DOI: 10.33899/edusj.2000.168657.

[7] S. S. Khanuja and S. Kumar, "Isolation of phages of *Rhizobium meliloti* AK631," Indian j. Exp. Biol., pp. 26: 665-667, 1988.

[8] A. Singh, J. Ram, V. Sikka, and S. Kumar, "Derivation of marked strains in *Rhizobium leguminosarum* Rld1 by nitrosoguanidine and transposon mutagenesis," Indian j. Exp. Biol., pp. 5(22): 239-247, 1984. **DOI:**https://doi.org/10.1128/aem.48.6.1248-1250.1984.

[9] J. G. Collee, T. J. Mackie, and J. E. McCartney, Mackie and McCartney practical medical microbiology: Harcourt Health Sci., pp. 14: 49-131, 1996.

[10] K. Aneja, Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology: New Age Int., U. S. A. 2007. **DOI:** 10.12691/ajidm-2-4-3.

[11] R. M. Atlas, The Handbook Of Microbiological Media For The Examination Of Food: CRC Press., U. S. A. 2006. https://doi.org/10.1201/9781420002980.

[12] K. Makkar and S. Jangra, "Isolation and characterization of *Rhizobium* from Chickpea (*Cicer arietinum*)," Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., pp. 6: 2880-2893, 2017. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.340.

[13] C. Bhattacharya, B. Deshpande, and B. Pandey, "Isolation and characterization of *Rhizobium* sp. form root of legume plant (*Pisum sativum*) and its antibacterial activity against different bacterial strains," Int. J. Agri. and Food Sci., pp. 3: 138-141, 2013.

[14] J. MacFaddin, "Biochemical tests for the identification of medical bacteria, Williams and Wilkins, Baltimore," *Escherichia coli*, pp. 25:922-930, 1980. http://dx.doi.org/10.1136/jcp.29.10.958-c.

[15] L. M. Prescott and J. P. Harley, "Harley Prescott: Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Editio," ed: The McGraw− Hill., U. S. A. 2002.

[16] A. Brown, "Bensons Microbiological application laboratory manual in general microbiology. McGraw â€“Hill Co," INC., U. S. A. 2007.

[17] J. M. Vincent, "A manual for the practical study of the root-nodule bacteria, I.B.P. Handbook No. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. U. K., pp. 12: 152-164, 1970.

[18] C. K. Prasad, K. Vineetha, R. Hassani, R. Gupta, and G. S. Randhawa, "Isolation and symbiotic characterization of aromatic amino acid auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*, Indian J. Exp. Biol., pp. 83: 1041-1049, 2000. http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/24113.

[19] E. W. Koneman, S. D. Allen, W. Janda, P. Schreckenberger, and W. Winn, "Diagnostic microbiology," The nonfermentative Gram-negative bacilli. Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers., pp. 253-320, 1997.

[20] S. Alhayale, "Genetic diagnosis of some root nodule bacteria isolated from leguminous Plants in Nineveh Governorate," J. Edu. and Sci., pp. 30: 163-177, 2021. DOI: 10.33899/edusj.2021.131302.1188.

[21] I. Kalalou, M. Faid, and A. Touhami Ahami, "Extending shelf life of fresh minced camel meat at ambient temperature by *Lactobacillus dlbrueckii* subsp. *delbrueckii*," Electronic J. Biotechnol., pp. 7: 05-06, 2004.

[22] A. Daoud, D. Malika, S. Bakari, N. Hfaiedh, K. Mnafgui, A. Kadri, et al., "Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars," Arab. J. Chem., pp. 12: 3075-3086, 2019. DOI:10.1016/j.arabjc.2015.07.014.

[23] R. Geurts and T. Bisseling, "*Rhizobium* Nod factor perception and signalling," The plant cell., pp. 14: 239-249, 2002. https://doi.org/10.7240/jeps.667509.

[24] M. K. Bedi and A. Naglot, "Characterization of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum*," J. Agri. Technol., pp. 7: 1705-1723, 2011.

[25] B. Sowmya, S. Venkat Kumar, S. Karpagambigai, J. Santhoshkumar, and S. Rajeshkumar, "Antioxidant and Antifungal Activity of Bacteria Mediated Silver Nanoparticles Using *Rhizobium* sp," Indian J. Public Health Res. Develop., pp. 10: 3622-3627. 2019. DOI:10.5958/0976-5506.2019.04150.0.

[26] R. Nandi, J. Bara, and P. Shrivastava, "Antimicrobial activity of *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum* on different plant pathogenic fungal strains," Biosci Biotechnol. Res. Commun., pp. 12: 435-439, 2019. http://dx.doi.org/10.21786/bbrc/12.2/28.

[27] R. A. Al-Ani, M. A. Adhab, M. H. Mahdi, and H. M. Abood, "*Rhizobium japonicum* as a biocontrol agent of soybean root rot disease caused by *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina*," Plant Protec. Sci., p. 48: 149-155, 2012. https://doi.org/10.17221/16/2012-PPS.