# قياس فعالية انزيم السليوليز المنتج من بكتيريا العقد الجذرية

**نجوى ابراهيم خليل[١] ، علي عبد الغفور[٢]**

[١] قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

[٢] مدرسة شريخان سفلى ، مديرية تربية نينوى ، الموصل ، العراق

**( تاريخ الاستلام:** ١٥ / ٦ / ٢٠٠٨ ---- **تاريخ القبول:** ٢٥ / ١٠ / ٢٠٠٩ )

**الملخص**

تناولت الدراسة الحالية التعرف على فعالية أنزيم Cellulase الخام والمعزول من نوعين مختلفين من بكتيرياالعقد الجذرية هما: *Rhizobium leguminousarum* biovar *trifolii* و *Bradyrhizobium parasponia* ، وأظهرت نتائج الأنزيم المنتج مباشرة على سطح الوسط الغذائي من قبل هذه البكتيرياوالمستخلص الانزيمي الخام المعزول من رايزوبيوم النباتات اللابقولية ( *B . parasponia* ) فعالية عالية في تحليله لمادة السليلوز المضافة إلى الوسط الغذائي ، في حين كانت فعالية الأنزيم المنتج من قبل بكتريا( *R. leguminosarum* ***biovar*** *trifolii* ) المتخصصة باصابة النبات البقولي*Trifollium* مقاربة لنصف فعاليته في البكتريا الأولى بدلالة قطر المنطقة الرائقة ( ملم) ،عندمقارنتها مع عينة السيطرة.

**المقدمة**

تنتمي بكتيريا العقد الجذرية الى جنس بكتيريا *Bacillus radicola*(١) التي سميت لاحقا باسم بكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium* من قبل Frank(٢)،تمتاز هذه البكتيريا بكونها هوائية ، عضوية التغذية ، غير مكونة للسبورات تستوطن التربة ، وتعرف أفرادها بقابليتها على تكوين عقد جذرية مثبتة للنتروجين الجوي على جذور نباتات العائلة البقولية (٣) ، وتمتاز بكونها عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام تتواجد بشكل مفرد أو بشكل أزواج وتتحرك بأسواط محيطية أو قطبية وأفضل نمو لها يكون في الأوساط الغذائية المعقدة وخاصة المحتوية على مستخلص الخميرة ، درجة الحرارة المثلى لنموها تتراوح ما بين (٢٥ – ٣٠° م ) وتستطيع الاستفادة من مدى واسع من المركبات الكاربونية (٤) .

صنفت إلى جنس *Bradyrhizobium* من قبل Jordan (٥) ، باعتبارها رايزوبيا بطيئة النمو Slow growing rhizobia،في حين وضع هذا الباحث (٦) ،ثلاثة انواع فقط من جنس *Rhizobium* والتي اعتبرت رايزوبيا سريعة النمو Fast growing rhizobia وهي : *R. meliloti*، *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* , *R. loti*، ونوع واحد تحت جنس *Bradyrhizobium* وهو *B.Bradyrhizobium*.اعتمادا على Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ،فان عائلة Rhizobiaceae ، تضم اربعة اجناس هي : *Rhizobium*، *Bradyrhizobium*، وهما جنسي البكتيريا المثبتة للنيتروجين Nitrogen fixing bacteria و *Arobacterium*،*Phyllobacterium* (٦) .

يكون السليلوز ٥٠%من تركيب جدار الخلية النباتية،ويتألف من سلسلة مستقيمة من وحدات الكلوكوز المتكررة والمرتبطة مع بعضها باواصركلايكوسيدية 4 —1-β (٧)،يتحلل كيمياويا بالاحماض العضوية ، وانزيميا بإنزيم Cellulase (CMCase) Carboxmethyl المنتج من قبل الاحياء المجهرية كالفطريات والبكتيريا ،الذي يتكون على الاقل من ثلاثة انزيمات تعمل مجتمعة على تكسير الاواصر الكلايكوسيدية الى مجموعة من سلاسل الكلوكوز القصيرة (٨ ) ، كما اشار Manka وجماعته(٩) قابلية المسببات المرضية على انتاج الانزيمات المحللة للسليلوز، حيث لوحظ انتاجه من قبل بكتيريا *Pseudomonas salmanacerum* اثناء إصابتها لنبات التبغ وتاثيرها في تحليل انسجة النبات المصاب الى وحدات متكررة من سكرالكلوكوز (١٠)،علما بان هذا الانزيم ينتج بالمرتبة الاولى من قبل الفطر *Trichoderma* (١١) ، ومن قبل بكتيريا *Rhizobium* اثناء علاقتها التعايشية مع النباتات البقولية لإذابة الجدران الخلوية عند قمم الشعيرات الجذرية اثناء تلقيحها ببكتيريا الرايزوبيوم المتخصصة لتسهيل دخول البكتريا الى داخل انسجة الجذر وتحفيزالخلايا المصابة على الانقسام لتكوين العقد الجذرية التي يحصل داخلها تثبيت النيتروجين الجوي وتحويله الى الامونيا مع انزيمات اخرى مشاركة هي Pectinase , Hemicellulase ( ١٢و١٣) .

تهدف الدراسة الحالية الى تحديد الاختلافات في عمل وفعالية أنزيم Cellulase المنتج من قبل بكتريا *R. leguminosarum* biovar *trifolii* و *B . parasponia* وذلك من خلال :

عزل ألانزيم الخام من هذين النوعين من البكتريا ،وتحديد ألاكفأ منهما في تحليله لمادة السليلوز المضافة للوسط.

**المواد وطرق العمل**

**بكتريا الرايزوبيوم**

تم استخدام بكتريا الرايزوبيوم التي لها القابلية على تكوين العقد الجذرية على نباتات البرسيم *Trifolium alexandrinum* وهي *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*(التي تم عزلهامحليا من العقد الجذريةالمتكونة على نبات البرسيم) و بكتريا *Bradyrhizobium parasponia* (التي تم الحصول عليهامن مركز تثبيت النتروجين الجوي في جامعة Nottingham /المملكة المتحدة )،والمتخصصة بتكوين العقد الجذرية على الاشجار الاستوائية اللابقولية من جنس *Parasponia* .

**عزل بكتريا *R. leguminosarum* biovar *trifolii* من العقد الجذرية لنبات البرسيم**

تم الحصول على العقد الجذرية من نباتات البرسيم *Trifolium alexandrinum* بقلع النبات بالكامل مع التربة المحيطة بجذوره لضمان عدم فقدان أجزاء منه في التربة ، وغسل المجموع الجذري بشكل جيد بالماء الجاري لإزالة التربة العالقة به ، ثم فصلت العقد الجذرية مع جزء صغير من الجذر المتصل بها وغمرت بالأيثانول ٧٠% لمدة ثلاثة دقائق ، وغسلت بالماء المقطر المعقم لإزالة أثار الكحول.

تم غمرها في محلول هايبو كلورايد الصوديوم ( NaOCL ) بنسبة ١:٢ (حجم : حجم) لمدة ٤-٦ دقائق ، وغسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية لإزالة أثار المادة المعقمة ، ثم وضعت على أوراق ترشيح معقمة لإزالة الماء العلق بها، وزعت على سطح وسط YEM الصلب(١٤) ، لاختبار مدى كفاءة التعقيم وذلك بوضعها في الحاضنة بدرجة ٢٨مْ لمدة ٢٤ ساعة.أخذت العقد الغير الملوثة وهرست مع قليل من وسط YEM السائل لعمل معلق بكتيري، نقل منه ٠,١ مل وفرش على سطح وسط YEM الصلب بطريقة التخطيط للحصول على مستعمرات مفردة بعد تحضينها بالحاضنة لمدة ٢٤- ٤٨ ساعة بدرجة ٢٨ ± ٢ مْ .

**الكشف عن امتلاك بكتريا الرايزوبيوم لانزيم السليوليز**

**تلقيح وسط YEM السائل بالبكتريا**

وزع وسط YEM السائل في أنابيب اختبار بمعدل (٥مل/ أنبوبة ) ، وغمرت فيه شرائط من ورق الترشيح ١ . Whatman No بقياس (٦×٠,٥ )سم زنة ٢٠ ملغم وذلك بغمر أحدى طرفيها في الوسط الغذائي ويبقى الطرف الاخر خارج فوهة انبوبة الاختبار، عقم بالموصدة ( ١٢١ م، ضغط جوي ١٥ باوند / انج٢ ،لمدة ٢٠ دقيقة) ، ثم لقحت الأنابيب ببكتريا *R. leguminousarium* biovar *trifolii* وبكتريا *B. parasponia* وبمعدل (٥ مكررات) بالإضافة إلى عينة المقارنة (المتمثلة بانابيب الاختبار الحاوية على وسط YEM السائل والملقحة بذات البكتيريا والخالية من شرائط ورق الترشيح) ثم وضعت في الحاضنة بدرجة حرارة ٢٧ مْ لمدة أسبوعين .

**تلقيح وسط YEM الصلب**

لقح وسط YEM الصلب المضاف اليه السليلوز بشكل ملح الصوديوم كاربوكسي مثيل السليلوز CMC-Na(١٠ملغم /لتر) ، بكل من بكتريا *R. leguminousarium* biovar *trifolii* وبكتريا *B.paraspoin* بطريقة التخطيط للحصول على مستعمرات معزولة وبمعدل (خمسة مكررات) ، وضعت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة ٢٧ مْ ولمدة أسبوع وتم الكشف عن افراز الانزيم بدلالة قطر المنطقة الرائقة حول كل مستعمرة بكتيرية لكل نوع ، باستخدام الكاشف يود حامض الهيدروكلوريك HCl-Iodin .

**عزل أنزيم Cellulase**

وزع وسط أكارالسليلوز(١٥) في انابيب اختبار وبمعدل ٢٠ مل / أنبوبة ، لقحت بعد تعقيمها ببكتريا *B.parasponia* ، *R. leguminousarium* biovar *trifolii* بواقع ثلاثة مكررات ، وضعت في الحاضنة بدرجة حرارة ٢٧مْ ولمدة أسبوعين ، رشح العالق البكتيري باستخدام جهاز الطرد المركزي ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة ، أضيف للجزء الطاقي كبريتات الأمونيوم لترسيب البروتينات فيه اعتمادا على درجة تشبع المحلول (١٦)،وبنسبة ٧٠%بوصفها نسبة تشبع،وتمت عملية اضافته بحالته الصلبة تدريجيا وببطءمع التحريك المستمر بواسطة المقلب المغناطيسي لمدة ساعة وتحت ظروف التبريد المستمر(حمام تلجي) تم ترك المحلول في الثلاجة عند درجة حرارة ٠-٤ م الى اليوم التالي للسماح للانزيم بالتجمع بشكل عكورة ، ونبذ مرة اخرى بسرعة ٣٣٠ دورة / دقيقةلمدة ٢٥ دقيقة بدرجة ١ م(١٧) .

**اختبار قدرة انزيم Cellulase على تحليل السيليلوز في الاطباق الزجاجية**

ذوب ٢٠ ملغم من الانزيم الخام في ٢ مل من الماء المقطر وعقم باستخدام المرشحات قطر ثقوبها ٠,٤٥ µm ، نقل منه ١٠٠ µL إلى حفر بقطر ٦ ملم على سطح وسط أكار السليلوز بمعدل ثلاثةمكررات مع استخدام الماء المقطر كعينة مقارنة ، حضنت جميع الأطباق عند درجة حرارة ٢٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة ، ثم غمرت الاطباق بكاشف HCl-Iodin ترك الكاشف لمدة ١٠ دقائق وتم الكشف عن تحلل السليلوز بدلالة ظهور منطقة رائقة حول الحفرة.كما تم قياس كفاءة البكتيريا في انتاجها لانزيم السيليوليز باستخدام المعادلة الاتية (١٨) :

الكفاءة =قطر هالة التحلل / قطر الحفرة المملوءة بالانزيم

**تكوين العقد الجذرية على بادرات البرسيم المعاملة بانزيم Cellulase الخام والملقح بعالق بكتيريا الرايزوبيوم**

غمر المجموع الجذري لبادرات البرسيم المعقمة والنامية بعمر يومين في انزيم السيليوليز الخام والمعزول من بكتيريا الرايزوبيوم بنوعيها *R. leguminousarium* biovar *trifolii* المتخصصة باصابة بادرات البرسيم و*B.parasponia* وغير المتخصصة باصابتها. لمدة ٢٥ – ٣٠ دقيقة . ثم غمرت في ١ مل ولقحت كل بكتريا على حدى لمدة ١٥-٢٠ دقيقة ثم وضعت بشكل صف واحدعلى سطح وسط NFالصلب (١٩) ، بمعدل ٥ بادرات / طبق، غلفت الاطباق بالبارافيلم ثم حضنت بشكل مائل في حاضنة النمو بدرجة ٢٥ ± ٢ م لمدة ٢٤ ساعة في ظروف الظلام التام . ثم نقلت الى نظام الاضائة والظلام التعاقبي ١٦ساعة ضوء / ٨ ساعات ظلام، بشدة اضاءة بلغت ٢٠٠٠ لوكس ، لمدة ٢٥ يوم.

**قياس المحتوى البروتيني**

قدر المحتوى البروتيني لبادرات الجت اعتمادا على طريقة بايوريت (٢٠)، وتم حساب المحتوى البروتيني للعينات (ملغم/غم) باستخدام طريقة المقارنة القياسية ( ٢١).

**النتائج**

**الكشف عن انتاج بكتريا الرايزوبيوم لأنزيم Cellulase في وسط YEM السائل :**

لوحظ بعد اسبوعين من التحضين تآكل حافات شريط ورق الترشيح (المصنوع من السليلوز) المغمور في وسط YEM السائل والملقح ببكتريا الرايزوبيوم ، وضعت جميع الأشرطة في الفرن بدرجة حرارة ٦٠ ْم لحين جفافها تم وزن هذه الأشرطة المعلومة الوزن قبل غمرها في الوسط باستخدام ميزان حساس ، يشير الجدول (١) إلى التاثير الواضح لبكتريا الرايزوبيوم وبنوعيها على وزن شريط ورق الترشيح عند مقارنته مع عينة المقارنة (وسط YEM السائل غير الملقح) . كان لانزيم السليوليز المنتج من قبل بكتريا *B . parasponia* أقوى في تاثيره من ذات الانزيم المنتج من قبل بكتريا *R. leguminousairum* biovar *trifolii* بدليل زيادة النقص في وزن الشريط حيث بلغ الفرق في حالة البكتيريا الأولى ١١ ملغم وفي البكتريا الثانية ٧ ملغم في حين لم يحصل أي نقص بالوزن في عينة المقارنة .

**الجدول (١) وزن شريط ورق الترشيح Whatman No .1 المغمور في وسط YEM السائل قبل وبعد تلقيحه ببكتريا *R. leguminousarium* biovar *trifolii* وبكتريا *B . parasponia*.**

| البكتريا | *متوسط وزن شريط الورق الترشيح Whatman No .1 (ملغم) | |
|---|---|---|
| | قبل التلقيح | بعد التلقيح |
| *R. leguminousarium* biovar *trifolii* | ٢٠ | ١٣ |
| *B . parasponia* | ٢٠ | ٩ |
| * *عينة المقارنة | ٢٠ | ٢٠ |

*النتائج الواردة تمثل متوسط ٥ مكررات . * *عينة المقارنة غير الملقحة بالبكتيريا

**في وسط YEM الصلب :**

غمرت المستعمرات المعزولة بكمية كافية من محلولHCl-Iodine وتركت لمدة ٥-١٠ دقائق بدرجة حرارة المختبر، ثم سكب المحلول وترك الطبق لدقائق عندئذ تكونت منطقة رائقة حول المستعمرة النامية كدلالة على انتاج مستعمرة الرايزوبيوم لأنزيم Cellulase وتحليلها لمادة Cellulose المضافة كمادة اساس للوسط ، يلاحظ من الجدول (٢) ، تباين قطر المنطقة الرئقة حول المستعمرة تبعالكمية وقوة انزيم السليوليز المنتج ،وكان تاثيرانزيم Cellulaseالمنتج من قبل *R. leguminousarium* biovar *trifolii* له نصف قوة تأثير الإنزيم المنتج من قبل *B.parasponia* على تحليل السليلوز المضاف بدلالة قطر المنطقة الرائقة حول المستعمرة البكتيرية والبالغة ١١ ملم و ٢٢ ملم على التعاقب.

**الجدول (٢ ) قطر المنطقة الرائقة حول مستعمرات بكتريا *R. leguminousarium* biovar *trifolii* وبكتريا *B . parasponia* النامية في وسط YEM الصلب والمحور.**

| البكتريا | *متوسط قطر المنطقة الرائقة حول المستعمرة البكتريا (ملم ) |
|---|---|
| *R. leguminousarium* biovar *trifolii* | ١١ |
| *B . parasponia* | ٢٢ |

*محسوبا معها قطر المستعمرة .

**قياس فعالية انزيم Cellulase الخام والمعزول من بكتيريا الرايزوبيوم**

بعد ٤٨ ساعة من التحضين وعند إضافة محلول HCl-Iodine الى وسط اكار السليلوزللكشف عن مدى تأثير الانزيم الخام والمعزول من البكتريا على تحليل السليلوز في وسط اكارالسليلوز، يوضح الجدول (٣) تفوق الانزيم المنتج والمعزول من بكتريا *B . parasponia* النامية في وسط اكارالسليلوز على تحليل السليلوز الموجود في الوسط على الإنزيم المنتج والمعزول من بكتريا *R. leguminousarium* biovar *trifolii* ،بدلالة كفاءة البكتيريا الاولى على البكتيريا الثانية في انتاجها للانزيم والبالغة ٢,٨٣ و١,٣٣ على التوالي ، قياسا بعينة المقارنة (الماء المقطر) الذي لم يكن له تاثير على تحلل السليلوز في الوسط .

**الجدول (٣)قطر المنطقة الرائقة حول انزيم Cellulaseالخام المعزول من بكتيريا *R. leguminousarium* biovar *trifolii* و *B. parasponia* في وسط اكار السيليلوز.**

| البكتيريا | متوسط قطر المنطقة الرائقة حول أنزيم Cellulase الخام( ملم ) | كفاءة البكتيريا في انتاجها للانزيم |
|---|---|---|
| *R. leguminousarium* biovar *trifolii* | ٨ | ١,٣٣ |
| *B . parasponia* | ١٧ | ٢,٨٣ |

| | | |
|---|---|---|
| المقارنة ( الماء المقطر ) | ٠ | ٠ |

**تكوين العقد الجذرية على بادرات البرسيم المعاملة بانزيم السليوليز الخام والملقحة بعالق بكتيريا الرايزوبيوم**

حفزت الشعيرات الجذرية لبادرات البرسيم التي بعمر يومان والمعاملة بانزيم Cellulase الخام والملقحة ببكتيريا *R. leguminousarium* biovar *trifolii*، على زيادة كل من اعداد العقدة الجذرية الى ٧ عقدة / نبات ونسبة الاصابة الى ٩٥ % فضلا عن زيادة المحتوى البروتيني الى ٢١,١ ملغم/غم، قياسا ببادرات البرسيم الملقحة وغير المعاملة بالانزيم ;٥ عقدة / نبات و ٨٥ % و ١٨,٣ ملغم/غم ،على التوالي ، وتكوين العقد الجذرية على هذه البادرات الملقحة بالبكتريا غير المتخصصة(*B. parasponia* ) ٢ و ٤ عقدة / نبات، فياسا ببادرات البرسيم الملقحة بالبكتيريا المتخصصة (*R.leguminousarium* biovar *trifolii*) ، الجدول (٤) .

**الجدول (٤):تكوين العقد الجذرية والمحتوى البروتيني لبادرات البرسيم، المعاملة غير المعاملة بالانزيم،الملقحة بالبكتيريا المتخصصة وغيرالمتخصصة.**

| بكتيريا الرايزوبيوم | عدد العقد/نبات | نسبة الاصابة (%) | المحتوى البروتيني (ملغم/غم) |
|---|---|---|---|
| *R.leguminosarum* biovar *trifolii* | (7) 5 | (95) 85 | (21.1) 18.3 |
| *B. parasponia* | (4) 2 | (82) 60 | (19.2) 18.9 |
| بدون تلقيح(المقارنة) | ٠ | ٠ | ٨,٣ |

القيم الواردة أعلاه تمثل معدل ٢٠ بادرة/معاملة.

القيم بين الاقواس تمثل نتائج البادرات المعاملة بالانزيم.

**المناقشة**

اكدت هذه الدراسة قابلية كل من بكتيريا *R.leguminosarum* biovar *trifolii* على انتاج انزيم Cellulase (٢٢)، وبكتيريا *B. parasponia* بوجود السليلوز كمادة اساس في الوسط الزرعي على الرغم من تباينهما في النوع، يعود ذلك غالبا إلى قربهما تصنيفيا من بعضهما وانتماءهما إلى عائلة واحدة Rhizobiaceae (٢٣)،من ناحية اخرى يعزى تباين النتائج الملاحظة في التجارب المختلفة والمتمثلة بكفاءة بكتيريا *B. parasponia* في تأثيرها على تحليل مادة السليلوز ، إلى امتلاكها لانزيمي Pectinase وCellulase(24) ،فضلا عن تخصص هذه البكتيريا في اصابة الاشجار الاستوائية اللابقولية (٢٥) التي تمتاز بتركيبها النسيجي المعقد مقارنة بالتركيب النسيجي الابسط في الشعيرات الجذرية للنباتات البقولية والمتمثلة هنا ببادرات البرسيم، ليعمل هذا الانزيم مع انزيم Pectinase على ازالة جدران قمم الشعيرات الجذرية التي يدخل في تركيبها مادتي السليلوز والبكتين ،عليه ادى امتلاك هذه الشعيرات لبادرات البرسيم الفتية نسبة قليلة من السليلوز فضلا عن الارتباط غير المحكم بين الالياف السليلوزية واشباه السليلوز والبكتين عند قمم الشعيرات الجذرية (٢٦) إلى توقع الاذابة النسبية للسليلوز بفعل انزيم Cellulase وفسح المجال للبكتيريا المتخصصة *R. leguminosarum* biovar *trifolii*(٢٢) و البكتيريا غير المتخصصة *B. parasponia* على الاختراق المباشر ودخولها الى داخل خلية الشعيرة الجذرية واصابة هذه البادرات وتكوين العقد الجذرية عليها مع زيادة اعدادها، والتي تعزى غالبا إلى كون بكتيريا *B. parasponia* لها قدرة على تكوين عقدا جذرية في مدى واسع من النباتات البقولية و قابلية واسعة لاقامة علاقات تعايشية كفوءة في عائلين نباتيين مختلفين(٢٧)، او الى كونها قريبة تصنيفيا للرايزوبيوم التي تصيب نباتات اللوبيا *R. cowpea* المعروفة بمداها العائلي الواسع(٢٨)،أو إلى وجود مستقبلات تشابه من الناحية الكيمياوية Lectin البقوليات وسريعة الارتباط بالانواع المختلفة من بكتيريا الرايزوبيوم (٢٩)،كما يؤدي سهولة تداخل Lectinالنبات مع مجموعة acyl الواقعة ضمن تركيب العوامل المكونة للعقد Nodulation fctors زيادة فرصة ارتباط اكثر من نوع من بكتيريا الرايزوبيوم بالعائل النباتي (٣٠) وقابلية اللكتين على التغلغل ضمن الطبقة الدهنية المفسفرة داخل الجهاز الخلوي للبكتيريا (٣١) مما يتيح للرايزوبيوم اختراق جذور العائل النباتي وتكوين عقد جذرية بحالة مماثلة للانظمة المعروفة (٣٢).

**التوصيات**

اعتمادا على نتائج هذه الدراسة نوصي أن تكون الدراسات القادمة مكملة لهذه الدراسة وتتعلق بالنواحي التالية .

١-عزل انزيم Pectinase المعروف بانتاجه من قبل بكتريا الرايزوبيوم.

٢-تنقية انزيمي Cellulase و Pectinas .

٣- تحديد مدى كفاءتهما في تحرر البروتوبلاست من الخلايا النباتية.

**المصادر**

1- Beijerinck, M.W. (1888). Die Bakterier der papillionaceen knollchen.Bot.Zfg.46:726-804.

2- Frank,B.(1889).U birdie pflanzen symbiose der Leguminosen. Ber deut. Bot. Gesell.7:332-346.

3- Vincent, J.M. (1974). Root - nodule symbiosis with *Rhizobium.* In : The Biology of Nitrogen

Fixation. (Ed., A. Quispel). North - Holland, Publishing Company, Amsterdam. pp. 265-341.
4- Skinner, F.A., Roughley, L. and Chandler, M.R. (1977). Effects of yeast extract concentration on viabi1ity and cell distortion in *Rhizobium spp* . J. Appl. Bacteriol., 43:287-297.
5- Jordan, D.C.(1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen .Nov. agenus of show growing root nodule bacteria from leguminous plants.Int.J. Syst.Bateriol.32:136-139.
6- Jordan, D.C. (1984). Family III, Rhizobiaceae. Conn., 1938. In: N.R. Krieg and J.G. Holt, (ed.). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,vol I.The Williams Co., Baltimore. pp. 234-256.
٧- آل فليح، خولة احمد. (٢٠٠٠). مدخل إلى الكيمياء الحياتية، الطبعة الثانية، دار الكتب للطباعة والنشر،جامعة الموصل.
8- Wood, T.M. and McCrae, S. I. (1986). The cellulose of *Penicillium pinophilum*.J. Biochem., 234: 93-99.
9- Manka, M. (1981). Cellulytic and pectolytic activity of Fusarum isolates pathogenic to corn seedlings. ACTA Microbiol. Polonica, 30:25-32.
10- kelman, A. and Cowling ,E.B.(1965). Cellulose of Pseudomonas solanacearum in relation to pathogenesis. Phytopathology, 55:148-155.
11- Mandels, M. and Sternberg, D.(1976).Recent advance in cellulase technology. J. Ferment. Technol., 54:267-286.
12. Martinez – Molina, E., Morales, V. M. and Hubbell, D.H. (1979). Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. Apply. Environ. Microbiol., 38: 1186-1188.
13- Gage,D.J.(2004) Infection and in vasion of roots by Symb nitrogen fixing rhizobia during nodulatin of temperate legumes. Microbiol. Mol.Biol.Rev.,68(2): 280-300.
14- Vincent, J.M.(1970).A manual for the practical study of the root-nodule bacteria .I.B.P. Handbook No.15.Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford.
15- Dingle, J, Reid, W.W., and Solomons, G.L. (1953). The enzyme degradation of pectin and other polysaccharides. I. Application of the "Cup-plate" assay to the estimation of enzymes. J Sci. Food Agric. 3-4: 149-155.
16- Robyte,F. and White, B.J. (1987).Biochemical techniques .Theory and practice. Isted .Book/Cole. Montery. California.
17- Hubbell, D.H., Morales, V. M. and Umali-Garcia, M. (1978).Pectolytic enzymes in *Rhizobium*._Appl. Environ. Microbiol.,35: 210-213.
18-Hankin, L. and Anagnostakis, S.L. (1977).Solid media containing carboxymethyl cellulose to detect Cx cellulose activity of microorganism .Jof General Microbiol.98:109-115.
19- Fahraeus, G.(1957).The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen.Microbiol.,16:374-381.
20- Henry, R. J.; Cannon, D.C. and Winkelman, J.W. (1974). Clinical Chemistry Principles and Techniques, 2nd ed., Harper and Row, p.321-323.
٢١- العباجي، مؤيد قاسم والغبشة ، ثابت سعيد.(١٩٨٣). أسس الكيمياء التحليلية ،وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، مطبعة جامعة الموصل ،العراق.
22- Mateos, P.; Jiminez, J.; Chen, J.; Squartin, A.; Martinezmolina, E.; Hubbell, D.H., and Dazzo, F.B. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* bv.*trifolii*. Appl. Environ. Microbiol.,58:1816-1822.
23- Bras, C.P., Spaink, H.P. and staurman N (2000). Structure and function of nod factor In:prokaryotic Nitrogen Fixation .Amodel system-for analysis of Biological precess,Horizon Scientific press Wymordhan, UK., PP.1-18
24- Cocking, E.C., Webster,G., Batchelor, C.A. and Davey, M.R. (I994). Nodulation of non-legume crops: A new look . Agro-Food-Ind . Hi-Technol.,1: 21-24.
25- Trinick, M.J. (1973). Symbiosis between Rhizobium and the non-legume, trema aspera. Nature, 244:459-460.
26- Mort,A.J.and Grover,P.(1988).Characterization of root hair cell walls as potential barrier to the infection of plants by rhizobia .The carbohydrate component. Plant Physiol., 86:638-641.
27- Gresshoff, P. M. and Delves, A.C. (1986). Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: Plant Gene Research, a Genetic Approach to Plant Biochmistry. (Eds., A.D. Blanstein, and P. J. Kings). Springer-Verlag, Wien. New York, pp.159-206.
28-Trinick, M.J. and Galbraith, J.(1980). The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relation ship to the cross-inoculation group concept of legumes New Phytol.,86:17-26.
29- Kijne, J.W.(1992) .The *Rhizobium* infection process .In: Biological Nitrogen Fixation. (Eds., G. Stacey, R.H. Burris and H.J. Evans). New York, Chapman and Hall. pp.349-398.
30- Diaz, C.L. Spaink, H.P. and Kijne, J.W. (1996). Suger signals and legume lectins. In: Biology of Plant-Microbe Interaction.(Eds., G.stacey, B. Mullin and P.M. Gresshoff). International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, M.N. pp. 399-402.
31- Booij, P., Demel, R.A., De Pater, B.S. and Kijne, J.W.(1996).Insertion of pea lectin into a phospholipid monolayer .(C.F. Diaz, C.L. Spaink, H.P. and Kijne, J.W. 1996. Suger signals and legume lectins. In: Biology of Plant-Microbe Interaction.(Eds., G.stacey, B. Mullin and P.M. Gresshoff). International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, M.N. pp.399-402.
32-Caetano- Anolles, G. and Gresshoff, P.M.(1991) Alfalfa controls nodulation during the onset of *Rhizobium*-induced cortical cell division. Plant Physiol., 95 :366-373.

# Measure The Effectiveness of an Enzyme Product from The Bacteria of Root Nodules

**Najwa Ibrahim Khalil[1] , Ali Abdul Ghafoor[2]**
[1] *Department of Biology , College of Education , University of Mosul , Mosul , Iraq*
[2] *School Shrikhan Suphli , Directorate of Education Nineveh , Mosul , Iraq*
(**Received:** 15 / 6 / 2008 ---- **Accepted:** 25 / 10 / 2009)

**Abstract:-**
The present study investigated the activity of the crude cellulose enzyme, which was isolated from two different nodule roots bacteria species *Rhizobium leguminousarum* biovar *trifolii* and *Bradyrhizobium parasponia*.The results of the direct produced enzyme on the nutrient medium , by the bactera , and the crude enzymatic extract isolated from non-legume plants (*B. parasponia* ) , revealed high analytic activity of the cellulose added to the nutrient medium , whereas the activity of the produced enzyme from *R. leguminosarum* ***biovar*** *trifolii*,which was specific to infected the legume plant *Trifollium*. was equal to 50% of the enzyme activity in the first one , by use the indication of the clear zoon diameter , when compared with the control qroup.