التحييد بالحرارة وتأثيره على محتوى DNA البلازميدي في ثلاثة اجناس مختلفة من البكتيريا*

نجاة امين سعيد نجوى ابراهيم خليل

جامعة الموصل / كلية التربية / قسم علوم الحياة

(قدم للنشر في ٢٠١٤/٤/١ ، قبل للنشر في ٢٠١٤/٥/١٥)

ملخص البحث: تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص، البكتيريا التعايشية *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية المتكونة على نباتات الحلبة *Trigonella foenumgraecum* L النامية في الحقل، والبكتيريا الممرضة للإنسان *Pseudomonae aeruginosa* من الترب الحقلية، كما تم إستخدام البكتيريا الممرضة للنبات *Agrobacterium rhizogenes* السلالة R1601 المهندسة وراثياً بمقاومتها للمضادين الحيويين الكانامايسين Kanamycin(Kan $^{Res+}$) والكاربنسلين Carbenicillin(Car $^{Res+}$)، كما تناولت دراسة مدى تأثير التحييد بالحرارة عند درجة ٤٤ مْ على محتوىDNA البلازميدي في الأجناس البكتيرية الثلاثة وعلى بعض الصفات المظهرية الخاصة بكل منها،وتبين ان هذا المحيد الفيزيائي كان لهُ تأ ثير كبير على فقدان كل من بكتيريا *S.meliloti* و*P.aeruginosa* لصفة المقاومة لبعض المضادات الحيوية ،في حين لم تؤثر الحرارة في فقدان صفة مقاومة بكتيريا *A.rhizogenes* للمضادات الحيوية المستخدمة Amoxicillin، Ampicillin، Cefotaxime ، Chloramphenicol، Trimethprim،كما كان لهُ تأثير على فقدان بكتيريا *S.meliloti* فقط لصفة إنتاجها من متعدد السكريات الخارجي دون الجنسين الأخرين.

Abstract: The current study has included isolating and recognizing the symbiotic bacteria "*Sinorhizobium meliloti*" from the rooted nodules forming on *Trigonella foenumgraecum* L. growing in the field and the pathogenic bacteria to man "*Pseudomonae aeruginosa*" in the field of soils, beside the results mentioned in the bar API 20E. It also used the pathogenic bacteria to the plant "*Agrobacterium rhizogenes*", R1601, genetically engineered by its resistance to the two antibiotics Kanamycin (Kan $^{Res+}$) and the Carbenicillin (Car $^{Res+}$), and study the effect of curing by heat at 44^0c on the plasmid content DNA in the three bacterial genders and upon the special apparent specifications of each, and it has appeared that the physical curring had a big effect upon losing *S.meliloti* bacteria and *P.aeruginosa* the feature of resistance of some antibiotics, while the heat didn't affect in losing the resistance feature in A.rhizogenes bacteria for the used antibiotics Amoxicillin, Ampicillin, Cefotaxime, Chloramphenicol, Trimethprim, also it had effect on the losing of *S.meliloti* bacteria for its feature of production from the Exopolysaccharides without the other genders,

* مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول.

المقدمة

ان البلازميدات المتواجدة في البكتيريا عبارة عن جزيئات من الحامض النووي Deoxyribonuclic acid (DNA) مستقلة عن كروموسومات الخلية البكتيرية، يتراوح حجمها بين ١- ٤٠٠ Kpb، تتضاعف ذاتياً وتحمل جيناً واحداً او عدد قليل من الجينات التي تشفر الى بروتينات معينة منها ما تعمل على حماية البكتيريا من التأثير الضار لبعض المضادات الحيوية (Anderson، 1995). وعلى الرغم من كونها مواد وراثية غير ضرورية لنمو وتكاثر الخلايا إلا انها قادرة على تزويد الخلايا بصفات معينة لاحتوائها على مورثات (جينات) خاصة بها مثل مورثات الامراضية Pathogenicity كما في بلازميدات Root inducing plasmid (Ri-plasmid) التي تحفز على إحداث مرض الجذور الشعرية Hairy root عند اصابة النباتات من ذوات الفلقتين ببكتيريا *Agrobacterium rhizogenes* (Tiwarir واخرون،٢٠٠٧) ومورثات مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance (R-plasmid) ، (Rasool واخرون، 2003). ومورثات انتاج الذيفانات Toxins من قبل مجاميع كثيرة من الجراثيم المرضية ولاسيما بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* (Ryder واخرون، 2007) فضلاً عن مورثات متخصصة لمتطلبات العلاقة التعايشية Symbiosis element (Levin وBergstrom، ٢٠٠٠) كالعلاقة التعايشية المعروفة ما بين بكتيريا *Sinorhizobium meliloti* ونبات الجت *Mdicago sativa* او الحلبة *Trigonella foenumgraecum* (Singh وآخرون، ٢٠٠٨) .تشير العديد من الدراسات ان عملية التحييد تفقد الخلايا البكتيرية بلازميداتها إما بشكل تلقائي او عند تعريضها لعوامل كيميائية مثل الاكريدين البرتقالي، الاكري فلافين أوبروميد الاثيديوم (Joshi واخرون،2003) او فيزيائية كدرجات الحرارة العالية 42، 43، 44م (Barrow واخرون، 1987) ، وذلك لانه يثبط تضاعف البلازميدات دون ان يكون له اي تأثير يذكر على التضاعف المستمر للكروموسوم (Kaneker وKulkarni، 1998) ومع استمرار تجديد نمو الخلايا المحيدة وانقسامها نحصل على جراثيم خالية من البلازميدات وبالتالي تصبح هذه الجراثيم فاقدة لبعض الصفات المشفرة من قبل المورثات الواقعة على هذه البلازميدات (Koneman واخرون، 1997).

يهدف البحث الى دراسة مدى نجاح التحييد بالحرارة عند درجة 44 مْ لمحتوى DNA البلازميدي على بعض الصفات

المظهرية لثلاثة اجناس مختلفة من البكتيريا وهي : *S.meliloti* التعايشية مع نباتات الحلبة *A.rhizogenes* الممرضة للنباتات من ذوات الفلقتين و*P.aeruginosa* الممرضة للانسان.

المواد وطرائق العمل :

– البكتيريا المستخدمة ومصادر الحصول عليها وطرق تشخيصها

١– بكتيريا *Sinorhizobium meliloti* :

عزلت بكتيريا *S.meliloti* من العقد الجذرية المتكونة على جذور نباتات الحلبة *Trigonella foenumgraecum* حقليا وذلك طبقا لطريقة (Petit وآخرون، ١٩٨٧)، كما تم تشخيص هذه العزلة باستخدام كل من الفحص المجهري والزرعي لمستعمراتها النامية على وسط YEM الصلب (Vincent، ١٩٧٠) ، فضلاً عن اختبار قابليتها على إصابة عائلها المناسب لها وهو بادرات نبات الحلبة *T.foenumgraecum* في وسط Nitrogen Free (NF) الصلب (Fahraeus، ١٩٥٧). كما تم سحق العقد المتكونة على جذور هذه البادرات للتعرف على أشكال خلايا البكتيريويد Bacteriod داخلها والكشف غير المباشر عن مدى فعالية انزيم النايتروجينيز Nitrogenase في تثبيت النايتروجين الجوي N_2 الى الأمونيا NH_3 بوساطة تقدير المحتوى البروتيني لهذه البادرات بالاعتماد على طريقة فولن Schacterale وPollak (١٩٧٣) المحورة عن طريقة Lowery وآخرون (١٩٥١).

٢– بكتيريا *Agrobacterium rhizogenes* :

استعملت بكتيريا *A.rhizogenes* السلالة R1601 الممرضة للنباتات والمهندسة وراثيا لصفة المقاومة للمضادين الحيويين الكانامايسين Kanamycin (Kana $^{Res+}$) والكاربنسلين Carbenicillin (Carb $^{Res+}$) والتي تم الحصول عليها من Professor. E.W. Nester. Washington. Univ. USA، وتم التعرف عليها من الناحيتين المظهرية والزرعية لمستعمراتها النامية على وسط APM الصلب (Morgan وآخرون، ١٩٨٧) ، فضلاً عن اختبار قابليتها على أحداث مرض الجذور الشعرية على بادرات نباتات الحلبة *T.foenumgraecum* (ياسين، ٢٠٠٠).

٣– بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* :

تم الحصول على بكتيريا *P.aeruginosa* عن طريق عزلها من التربة وذلك بأخذ ما مقداره ٠.١ ملغم من التربة

وأجراء تخافيف عشرية عليها لغاية التخفيف 10^{-7} باستخدام المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline Solution، واخذ ٠.١ سم^3 من التخافيف الثلاثة الأخيرة ونقلت الى سطح وسط الإكار المغذي Nutrient agar، وذلك للحصول على مستعمرات منفردة بعد تحصين الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ مْ ولمدة ٢٤ ساعة، وتم تشخيص المستعمرات النامية من الناحيتين المظهرية والزرعية، بالإضافة الى استخدام شريط API 20E الحاوي على سلسلة من الاختيارات البايوكيميائية.

– اختبار مقاومة وحساسية البكتيريا للمضادات الحيوية :

تم في هذا الاختبار استخدام خمسة مضادات حيوية عند تراكيزها النهائية (مايكروغرام/مل) والموضحة في الجدول (١)، وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل Ahmed (١٩٨٩).

الجدول (١): أنواع المضادات الحيوية وتراكيزها النهائية المستخدمة (مايكروغرام / مل)

المضادات الحيوية	التركيز الخزين (µg/m1)	التركيز النهائي (µg/m1)	المذيب العضوي
(Amo) Amoxicillin	٣٠	٢٥	إيثانول ٧٠ %
(Amp) Ampicillim	٢٥	١٠	إيثانول ٧٠ %
(CTX) Cefotaxime	1	30	ماء مقطر
(C) Chloramphenicol	٥٠	١٠	إيثانول مطلق
(Tri) Trimethprime	٥٠	٣٠	ماء مقطر

تحييد محتوى DNA البلازميدي :

– التحييد التلقائي:

تم اعتماد طريقة Meyer (١٩٧٤) لأجراء هذا النوع من التحييد لغرض التحري عن المستعمرات البكتيرية الفاقدة تلقائيا لصفة المقاومة للمضادات الحيوية المذكورة في الجدول (١) .

– التحييد الحراري:

أُجريت عملية تحييد المحتوي البلازميدي للأجناس الثلاثة من البكتيريا باستخدام درجة الحرارة ٤٤مْ، وحسب طريقة Baldwin وآخرون (١٩٦٩)، وذلك لغرض التحري عن الخلايا البكتيريا المحيدة بلازميداتها بالحرارة بدلالة فقدانها لصفة المقاومة للمضادات الحيوية المشار اليها، علما بانه تم التاكد من قابلية هذه البكتيريا على النمو عند هذه الدرجة الحرارية قبل اجراء هذا التحييد .

–اختبار قابلية البكتيريا المحيدة بالحرارة: على إنتاجها من متعدد السكريات الخارجي، أُجري هذا الاختبار للبكتيريا قيد الدراسة (المحيدة بلازميداتها بالحرارة وغير المحيدة كعينة مقارنة) لمعرفة مدى تاثير هذا التحييد على قابليتها لانتاج متعدد السكريات الخارجي Exopolysaccharides (EPS) في الاوساط الصلبة والسائلة المدعمة بصبغة الـ Congo Red (Basu وGhosh، ٢٠٠١)، فضلا عن استخدام طريقة الكشف اللوني الموصوفة من قبل Robyt وWhite، (١٩٨٧) وPlummer، (١٩٧٨) اضافة إلى اختبار قابلية كلا من *S.meliloti* و*A.rhizogenes* على تكوين العقد الجذرية والجذور الشعرية على بادرات نباتات الحلبة *T.foenumgraecum*، وعلى قابلية *P.aeruginosa* على انتاج صبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة (Spiers وآخرون، ٢٠٠٣)، وتأثيرها أيضاً على نتائج الفحوصات البايوكيميائية في شريط API 20E لهذه البكتريا .

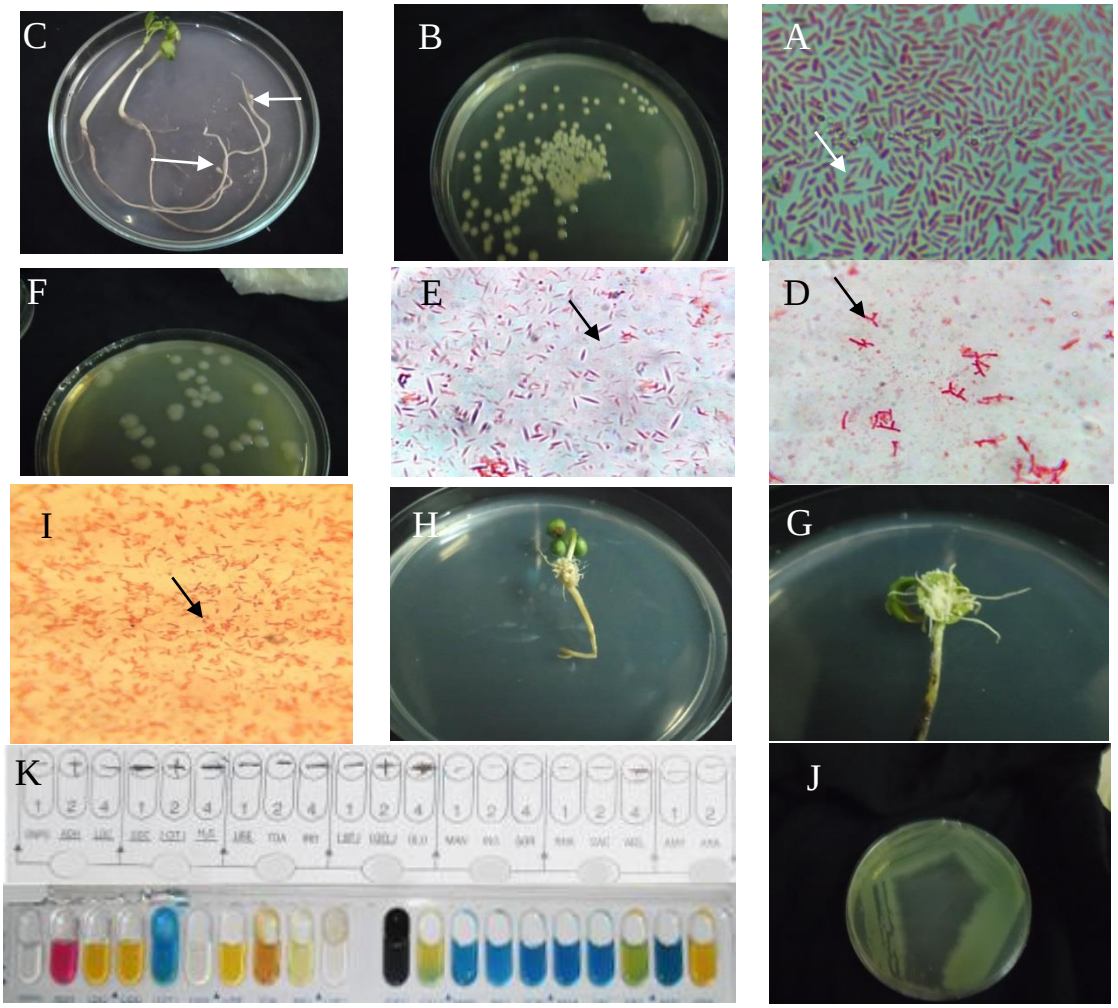
– عزل الـ DNA البلازميدي وترحيله كهربائيا في هلام الأكاروز

تم عزل الـ DNA البلازميدي حسب الطريقة السريعة الموصوفة من قبل Eckhardt (١٩٧٨) والمحورة من قبل الشكرجي، (٢٠١٣) والترحيل الكهربائي له في هلام الأكاروز، وذلك للتحري عن تاثير الحرارة في تحييد بلازميدات الاجناس البكتيرية الثلاثة.

– النتائج :

– تشخيص العزلات البكتيرية :

تم تشخيص بكتيريا *S.meliloti* المعزولة من العقد الجذرية المتكونة على نباتات الحلبة حقلياً، اعتماداً على؛ شكل خلاياها العصوية السالبة لصبغة كرام (الشكل ١، A) وشكل مستعمراتها النامية على وسط YEM الصلب، والتي تبدو بيضاء اللون لزجة القوام دائرية ومحدبة السطح وذات حواف ملساء (الشكل ١، B)، فضلاً عن قدرتها مختبرياً على تشويه الشعيرات الجذرية المستقيمة وتكوين العقد الجذرية على جذور بادرات نباتات الحلبة المتخصصة بإصابتها (الشكل ١، C) ، وكذلك على الاشكال غير المنتظمة لخلايا البكتيريود المتواجدة داخل هذه العقد (الشكل١، D) ،وعلى زيادة المحتوى البروتيني في البادرات الملقحة (٥.٦٠ ملغم /غم) قياساً بمحتواه في البادرات غير الملقحة (0.12ملغم /غم) ، (الجدول ٢،). وتبين ان البكتيريا الثانية المستخدمة في هذه الدراسة *A.rhizogenes* R160 المشخصة مسبقاً من قبل العالم Nester، ذات شكل عصوي وسالبة لصبغة كرام (الشكل ١،E)، ومستعمراتها بيضاء اللون ولزجة القوام عند نموها على سطح وسط APM الصلب (الشكل ١،F)، فضلاً عن قابليتها على النمو في هذا الوسط المدعم بالمضادين الحيويين الكانامايسين والكاربنسلين كعلامتين وراثيين واقعيين على بلازميد هذه البكتيريا المهندسة وراثياً، ونجاح اصابتها لبادرات نباتات الحلبة بدلالة تكوين الجذور الشعرية على اوراقها الفلقية وسيقانها تحت الفلقية (الشكل ١، G، H) وبعد ٣٠ و٤٥ يوم من التلقيح على التعاقب (الجدول ،٣) . وتم تشخيص البكتيريا المعزولة من التربة على انها *P.aeruginosa* وذلك اعتمادا على شكل خلاياها العصوية السالبة لصبغة كرام (الشكل١، G) وعلى شكل مستعمراتها النامية على سطح وسط الأكار المغذي المنتجة لصبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة (الشكل١،H)، فضلاً عن الفحوصات والأختبارات البايوكيميائية الواردة في شريط API 20E (الشكل١، I) .



الشكل (١): نتائج تشخيص الاجناس الثلاثة من البكتريا *S.meliloti*، *A.rhizogenes* و*P.aeruginosa*

A–خلايا بكتيريا *S.meliloti* العصوية السالبة لصبغة كرام(الجزء المؤشر). B – مستعمرات منفردة لبكتيريا *S.meliloti*. C –العقد الجذرية (الجزء المؤشر) المتكونة على بادرات نبات الحلبة الملقحة ببكتيريا *S.meliloti*. D- شكل خلايا البكتيرويد (الجزء المؤشر). E –خلايا بكتيريا *A.rhizogenes* العصوية السالبة لصبغة كرام (الجزء المؤشر). F – مستعمرات بكتيريا *A.rhizogenes* . G – الجذور الشعرية المتكونة على الاوراق الفلقية لبادرات نباتات الحلبة، H– بداية تكوين الجذور الشعرية المتجهة نحو الاعلى على السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الحلبة. I– خلايا بكتيريا *P.aeruginosa* العصوية السالبة لصبغة كرام (الجزء المؤشر). J – مستعمرات بكتيريا *P.aeruginosa* وانتاجها لصبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة. K – نتائج الاختبارات على شريط API 20E .

الجدول (٢): العقد الجذرية والمحتوى البروتيني في بادرات نباتات الحلبة

***T.foenumgraecum* L . الملقحة ببكتيريا *S.meliloti*.**

بادرات الحلبة	العدد الكلي للبادرات	عدد البادرات المكونة للعقد	نسبة الأصابة (%)	معدل عدد العقد/نبات	المحتوى البروتيني (ملغم / غم)
الملقحة ببكتيريا *S.meliloti*	٧٠	٤٥	٦٤	٣	٥.٦٠ (0.523±) *
غير الملقحة	٧٠	٠.٠	0. ٠	0.٠	٠.12 (0.057±)

* القيم الواردة بين الأقواس تمثل الإنحراف المعياري ±SD .

الجدول (٣): الجذور الشعرية ومدة تكوينها(يوم) على بادرات نباتات الحلبة

***T.foenum graecum* L. الملقحة ببكتيريا *A.rhizogenes*.**

موقع الحقن	عدد البادرات الملقحة	عدد البادرات التي تكونت عليها الجذور الشعرية	مدة تكوين الجذور الشعرية (يوم)
السيقان تحت الفلقية	١٠٠	٥٠	٣٠
الأوراق الفلقية	١٠٠	٣٠	٤٥

-إختبار مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية :

تبين أن جميع العزلات البكتيرية كانت مقاومة لجميع المضادات الحيوية الخمسة المستخدمة في هذه الدراسة، كما هو موضح في الجدول (٤).

الجدول (٤): تأثير المضادات الحيوية عند تراكيزها النهائية (مايكروغرام/مل) على نمو الأجناس الثلاثة من البكتيريا .

الأجناس البكتيرية	المضادات الحيوية (مايكروغرام / مل)				
	Amo (25)	Amp (10)	C (30)	Ctx (10)	Tri (30)
S.meliloti	R	R	R	R	R
A.rhizogenes	R	R	R	R	R
P.aeruginosa	R	R	R	R	R

R: (Resistance) تشير لصفة المقاومة للمضاد الحيوي

التحييد التلقائي:

لم يظهر إختلاف في نتائج التحييد التلقائي للبلازميدات الحاملة للمورثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة في الأجناس الثلاثة من البكتيريا، حيث كانت جميع المستعمرات البالغ عددها مئة مستعمرة مقاومة لهذه المضادات بنسبة ١٠٠% وحسب ما هو مبين في الجدول (٥) ، واستخدمت نتائج هذا التحييد كنموذج مقارنة مع نتائج التحييد بالحرارة.

الجدول (٥): التحييد التلقائي لمحتوى DNA البلازميدي في الأجناس الثلاثة من البكتيريا تجاه المضادات الحيوية عند تراكيزها النهائية (مايكروغرام / مل) .

الأجناس البكتيرية	المضادات الحيوية (مايكروغرام / مل)				
	Amo (30)	Amp (25)	C (50)	Ctx (30)	Tri (50)
S.meliloti	-	-	-	-	-
A.rhizogenes	-	-	-	-	-
P.aeruginosa	-	-	-	-	-

– عدم حصول تحييد (جميع العزلات مقاومة للمضادات الحيوية)

– التحييد بالحرارة عند درجة ٤٤ مْ :

يبين الجدول (٦) أن لدرجة الحرارة ٤٤ مْ كان لها تأثير واضح وبنسب مئوية متباينة على تحييد البلازميدات الحاملة للمورثات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية المستخدمة في الأجناس الثلاثة من البكتيريا، حيث فقدت مقاومتها اما لجميع المضادات الحيوية وبنسبة ٨٠% (Amo) و٧٥% (Amp) و٥٠% (C) و٦٥% (Ctx) و٣٠% (Tri) في بكتيريا *S.meliloti*، وبنسبة ٤٦% و٥٢% و٦٠% و٥٥% و٨٣% في بكتيريا *P.aeruginosa*، في حين احتفظت بكتيريا *A.rhizogenes* بمقاومتها لجميع المضادات الحيوية.

الجدول (٦): تاثير تحييد محتوىDNA البلازميدي بالحرارة على مقاومة الاجناس البكتيرية الثلاثة للمضادات الحيوية .

الأنواع البكتيرية	المضادات الحيوية (مايكروغرام / مل)				
	Amo (30um/l)	Amp (25um/l)	C (50um/l)	Ctx (30um/l)	Tri (50um/l)
S.meliloti	80*	75	50	65	30
A.rhizogenes	-	-	-	–	-
P.aeruginosa	46	٥٢	٦٠	٥٥	٨٣

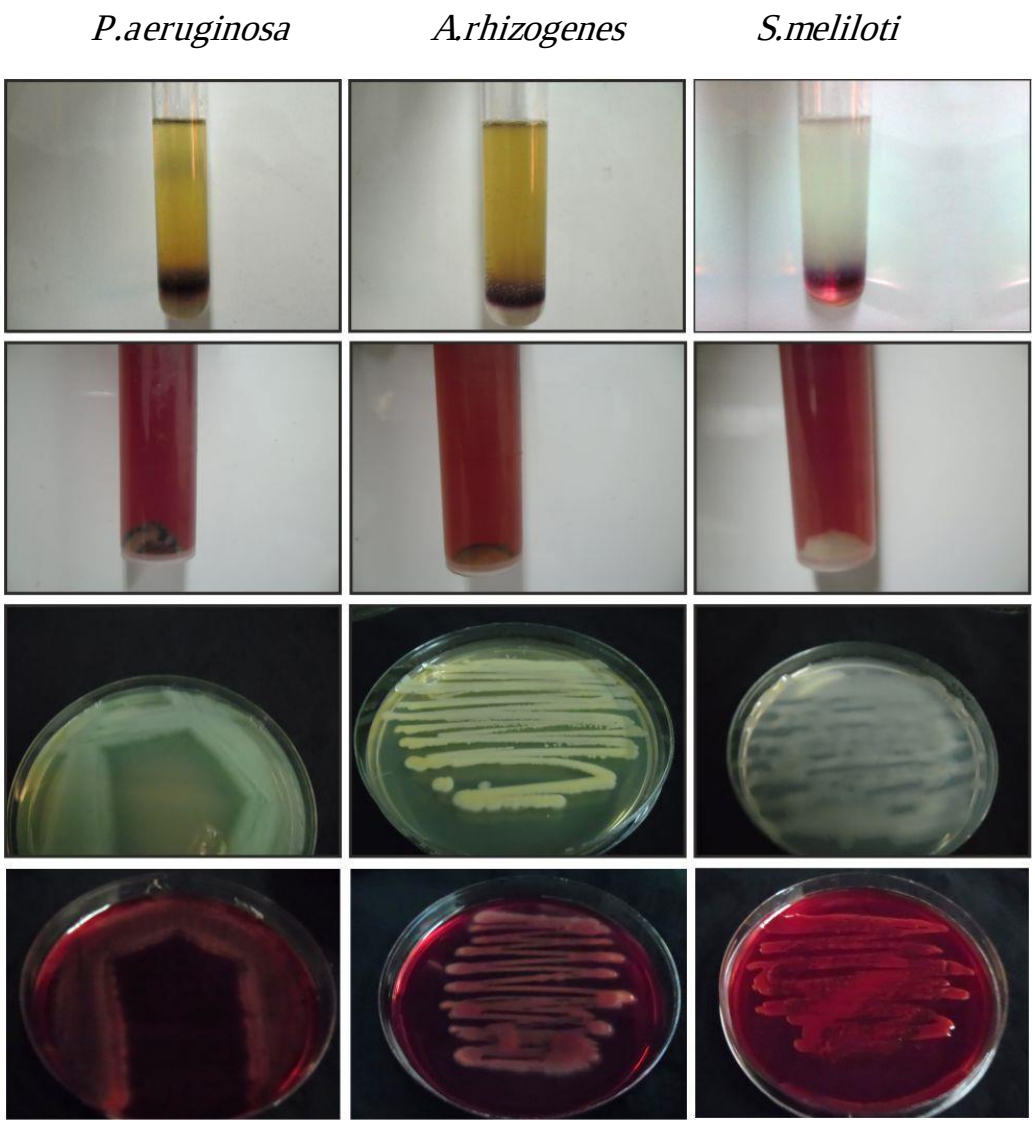
– : مقاومة للمضاد الحيوي (عدم حصول تحييد) ، * : النسبة المئوية للتحييد .

– تأثير التحييد بالحرارة على:

– إنتاج البكتيريا لمتعدد السكريات الخارجي (EPS) Exoplysaccharides

تبين في عينة المقارنة (البكتيريا قبل التحييد) أن جميع الاجناس البكتيرية المستخدمة في هذه الدراسة كان لها القابلية على إنتاج متعدد السكريات الخارجي Exoplysaccharides (EPS)، بدلالة ظهور حلقة حمراء تتحول إلى اللون البنفسجي في الحد الفاصل بين الطبقتين بعد إضافة كاشف مولش α-naphthol إلى الأوساط الغذائية السائلة (الشكل ٢، A) وتلون الراشح بلون أحمر في هذه الأوساط المضافة لها صبغة الكونغو ريد (الشكل ٢، B) فضلاً عن القوام المخاطي

المميز لمستعمراتها النامية في الوسط الصلب (الشكل٢،C) وظهورها بلون أحمر متفاوت في شدته نتيجة لالتقاطها للون صبغة الكونغو ريد المضافة لوسط النمو (الشكل٢، D) . وبعد إجراء تحييدها بالحرارة تبين أن بكتيريا *S.meliloti* فقط فقدت قابليتها على إنتاج متعدد السكريات الخارجي بدلالة عدم تكون الحلقة البنفسجية في الوسط الغذائي YEM السائل عند إضافة صبغة الكاشف اللوني α–naphthol، ولم يتلون الراشح البكتيري باللون الأحمر مع ترسب الصبغة أسفل أنبوبة الإختبار، وعدم تعكر الراشح في الوسط السائل الخالي من الصبغة ،اضافة إلى عدم بقاء القوام المخاطي للمستعمرات على الوسط YEM الصلب، وعدم تلون هذه المستعمرات باللون الأحمر لصبغة الكونغو ريد المضافة للوسط ،في حين بقيت كل من بكتيريا *A.rhizogenes* و*P.aeruginosa*، بعد التحييد محتفظة بقابليتها على إنتاج هذا المركب، (الشكل٣، A وB وC وD وE)، كما هو الحال قبل التحييد .



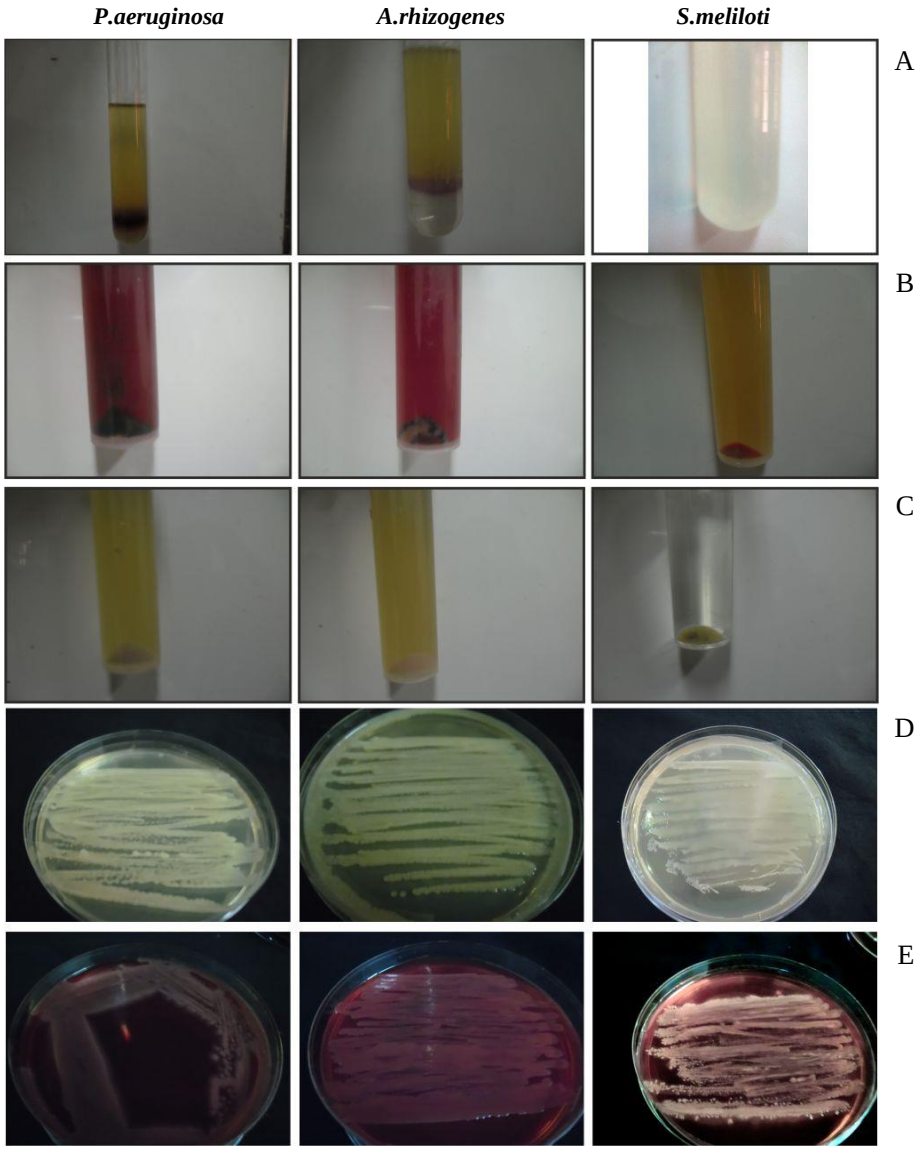
الشكل (٢): اختبار قدرة الاجناس البكتيرية على انتاج متعدد السكريات الخارجي Exopolysaccharides (EPS)

A: تشكل الحلقة البنفسجية في الاوساط السائلة.

B: تلون الراشح البكتيري بلون احمر في الاوساط السائلة.

C: القوام المخاطي للمستعمرات في الوسط الصلب الخالي من صبغة الكونغوريد .

D: ظهور المستعمرات باللون الاحمر في الوسط الصلب الحاوي على صبغة الكونغوريد .



الشكل (٣): دور التحييد بالحرارة لمحتوى DNA البلازميدي على انتاج متعدد السكريات الخارجي من قبل الاجناس البكتيرية الثلاثة

- بكتيريا *S.meliloti*

A: عدم تشكل الحلقة البنفسجية في الوسط السائل.

B: فقدان اللون الاحمر للراشح البكتيري وترسب الصبغة اسفل الانبوبة.

C: عدم تعكر الراشح في الوسط السائل الخالي من الصبغة.

D: عدم ظهور القوام المخاطي للمستعمرات النامية في الوسط الصلب الخالي من الصبغة.

E: عدم ظهور اللون الاحمر للمستعمرات النامية في الوسط الصلب.

بكتيريا *A.rhizogenes* و *P.aeruginosa*

A: بقاء الحلقة البنفسجية.

B: تلون الراشح الحاوي على متعدد السكريات EPS باللون الاحمر.

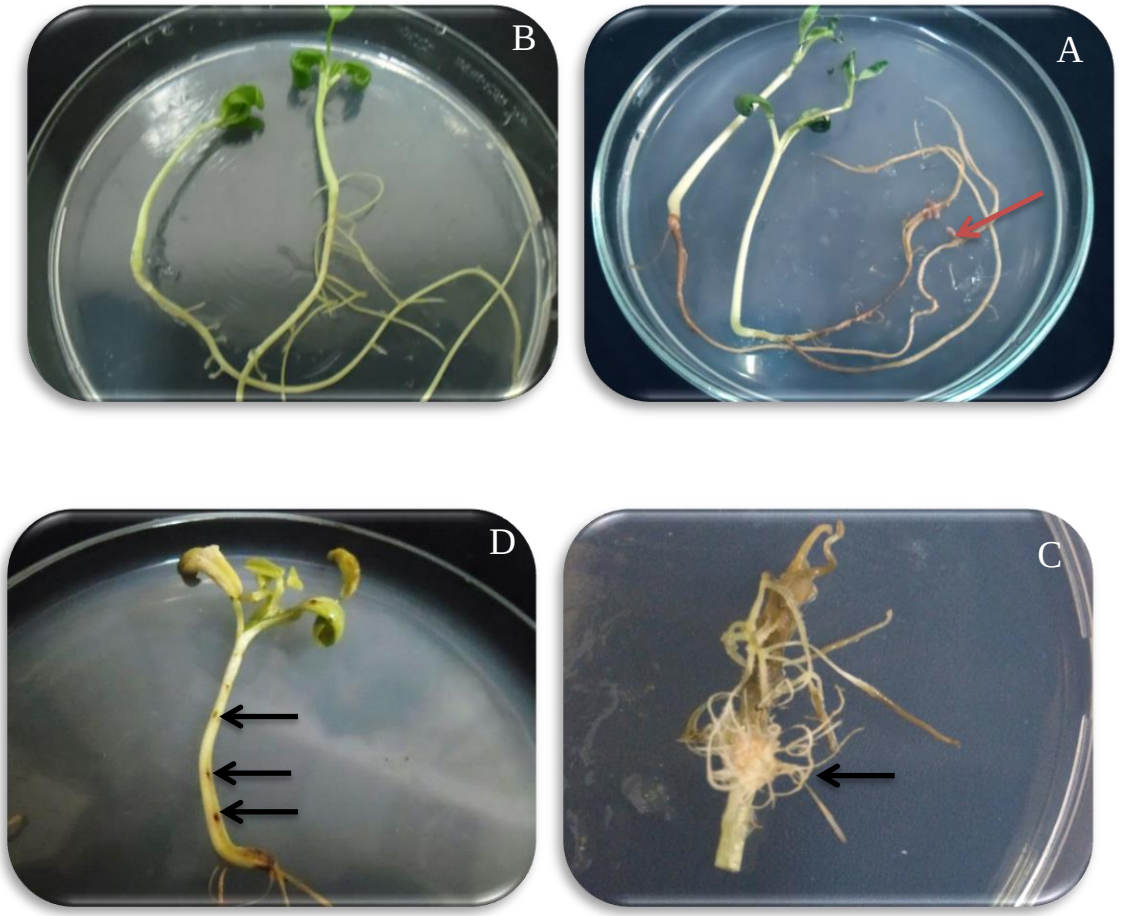
C: تعكر الراشح في الوسط السائل الخالي من الصبغة.

D: بقاء القوام المخاطي للمستعمرات النامية في الوسط الصلب الخالي من الصبغة.

E: القوام المخاطي مع التقاط لون الصبغة للمستعمرات النامية في الوسط الصلب.

- تكوين العقد الجذرية والجذور الشعرية على بادرات نباتات الحلبة :

في الوقت الذي لوحظ فيه تكوين العقد الجذرية على بادرات نباتات الحلبة مختبرياً عند تلقيح مجموعها الجذري بعالق *S.meliloti* غير المحيدة(عينة المقارنة)، لم يلاحظ تكوينها على هذه البادرات عند تلقيحها بالبكتيريا المحيدة بالحرارة عند درجة ٤٤ مْ، كما موضح في الشكل (٤، A، B) . وتبين عدم قدرة عالق بكتيريا *A.rhizogenes* R1601 المحيد بلازميدها بالحرارة على تكوين الجذور الشعرية على طول السيقان تحت الفلقية قياسا بعينة المقارنة، (الشكل ٤ ، C، D) .

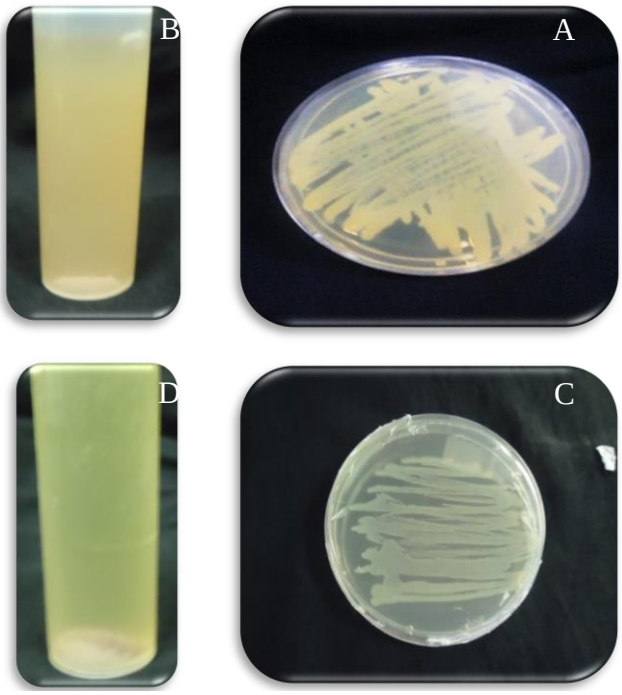


الشكل (٤): تاثير التحييد بالحرارة في بكتيريا *S.meliloti* و*A.rhizogenes* على تكوين العقد الجذرية والجذور الشعرية على بادرات نبات الحلبة.

A – بادرات نبات الحلبة الملقحة ببكتيريا *S.meliloti* غير المحيدة، ويلاحظ تكوين العقد الجذرية عليها (الجزء المؤشر) . B – بادرات نبات الحلبة الملقحة ببكتيريا *S.meliloti* المحيدة . C – تكوين الجذور الشعرية (الجزء المؤشر)على السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الحلبة بعد اصابتها ببكتيريا *A.rhizogenes* R1601 غير المحيدة. D –عدم تكوين الجذور الشعرية على السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الحلبة بعد اصابتها ببكتيريا *A.rhizogenes* R1601 المحيدة.

– إنتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin من قبل بكتيريا *P.aeruginosa*

لوحظ فقدان قابلية بكتيريا *P.aeruginosa* المحيدة بالحرارة على إنتاج صبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة في وسط الإكار المغذي، في حين امتاز نمو هذه البكتيريافي وسط المرق المغذي بقوامه المتعكر المائل الى اللون الاصفر والذي يمثل متعدد السكريات الخارجي EPS فقط قياسا بعينة المقارنة (البكتيريا قبل التحييد) التي ظهر ت بلون اخضر ناتج من مزج لوني صبغة البايوسيانين مع متعدد السكريات الخارجي EPS كما هو واضح في الشكل (٥، A، B ، C، D) .

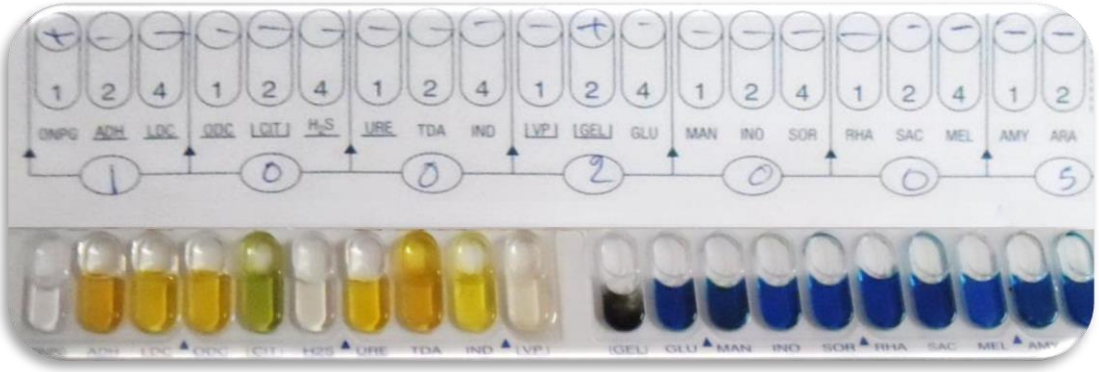


الشكل (٥): تاثير التحييد بالحرارة لمحتوى DNA البلازميدي في *P.aeruginosa* على انتاجها من صبغة البايوسيانين .

A – عدم تكون الصبغة على الوسط الصلب بعد التحييد . B – عدم إنتاج الصبغة بعد التحييد في الوسط السائل الذي امتاز باللون الاصفر. C – تكون الصبغة على الوسط الصلب قبل التحييد . D – إنتاج الصبغة قبل التحييد في الوسط السائل الذي امتاز باللون الاخضر.

نتائج الفحوصات الواردة في شريط API 20 E لبكتيريا *P.aeruginosa*

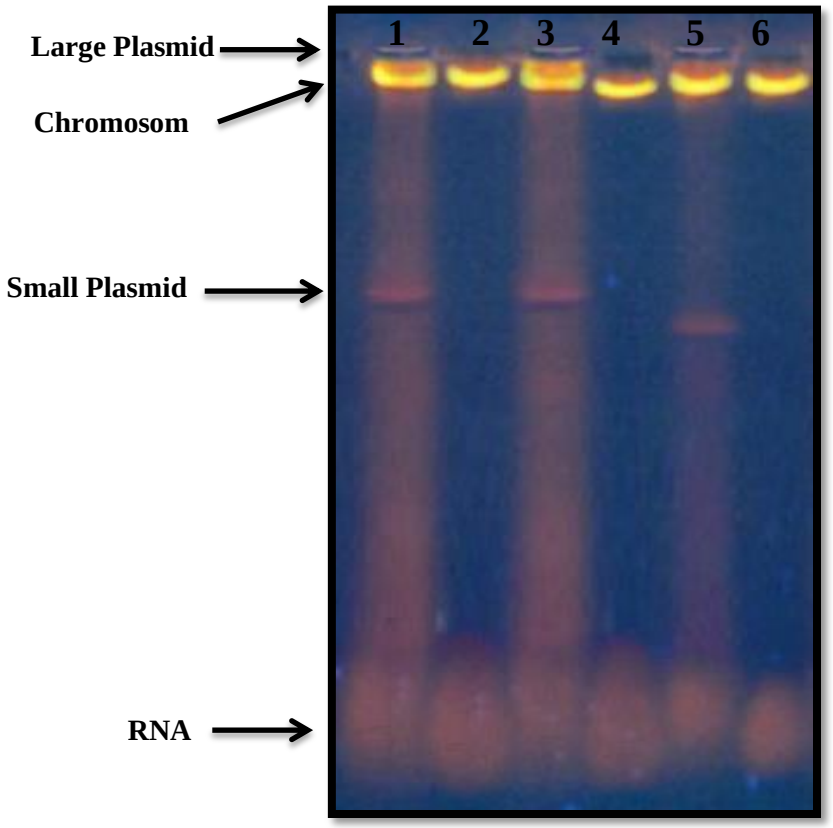
لوحظ فقدان قابلية بكتيريا *P.aeruginosa* المحيد بلازميدها بالحرارة (الشكل ، ٦)،على اعطاء نفس نتائج الفحوصات البايوكيميائية الواردة في شريطAPI ٢٠E قبل التحييد .



الشكل (٦): تاثير التحييد بالحرارة لمحتوى DNA البلازميدي في بكتيريا *P.aeruginosa* على الفحوصات البايوكيميائية الواردة في شريط API 20E.

عزل الـ DNA البلازميدي:

واكدت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (الشكل، ٧) امتلاك الاجناس البكتيرية الثلاثة لحزمتين بلازميديتين، وبعد التحييد لوحظ عدم ظهور هذه الحزم، ويدل ذلك على نجاح التحييد بالحرارة العالية في فقدان البكتيريا لبلازميداتها .



الشكل (٧): الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز للبكتيريا المحيدة وغير المحيدة.

الاعمدة، ١، ٣، ٥ تشير لمحتوى الـ DNA البلازميدي في بكتريا *S.meliloti*، *A.rhizogenes* و *P.aeruginosa* غير المحيدة على التعاقب، الاعمدة، ٢، ٤، ٦ تشير لمحتوى الـ DNA البلازميدي في بكتريا *S.meliloti*، *A.rhizogenes* و *P.aeruginosa* المحيدة على التعاقب

المناقشة :

في هذه الدراسة اظهرت نتائج عزل وتشخيص البكتيريا بانها مطابقة لما ذكره العديد من الباحثين، فبالنسبة للبكتيريا المعزولة من العقد الجذرية المتكونة على نباتات الحلبة *Trigonella foenumgraecum* L. حقلياً ، تبين أنها *Sinorhizobium meliloti* وذلك بدلالة اشكال خلاياها العصوية السالبة لصبغة كرام (Cowie وآخرون،٢٠٠٦) ، ومستعمراتها النامية على وسط YEMالصلب (Dang وآخرون،٢٠١٠) ، وقابليتها على تكوين العقد الجذرية (Miller وآخرون،٢٠٠٧) ، ذات الأشكال المتطاولة (Chengوآخرون،٢٠١٣)، على بادرات الحلبة مختبرياً، إنعكس ذلك على زيادة المحتوى البروتيني لهذه البادرات قياساً بالبادرات غير الملقحة بهذه البكتيريا كعينات مقارنة ،وذلك نتيجة لنشاط إنزيم النايتروجينيز Nitrogenase في هذه البكتيريا المعروف بمسؤوليته عن تحويل النايتروجين الجوي N_2 إلى الأمونيا NH_4 (Singh وآخرون،٢٠٠٨) . من ناحية أخرى ، تمكنت بكتيريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 من إصابة السيقان تحت الفلقية والأوراق الفلقية لبادرات نباتات الحلبة وتكوين مرض الجذور الشعرية عليها ،وذلك بفعل إنتقال قطعة Transfer DNA (T-DNA)، الواقعة على البلازميد Root-inducing plasmid (Ri-Plasmid) وتداخلها مع المادة الوراثية الموجودة في نواة الخلايا المصابة (Jainوآخرون،٢٠٠٩) ، الا ان نسبة تكوينها على السيقان تحت الفلقية تجاوز نسبة تكوينها على الأوراق الفلقية بحوالي مرتين ، وهذا مطابق لما أشار إليه الباحث Shahabzadeh وآخرون (٢٠١٣) ، فعلى الرغم من أختلاف النسب المئوية لتكوين الجذور الشعرية والتي بلغت 81.3و 71.8%على التعاقب ، ومن تاثير كثافة النموالبكتيري على نجاح إصابة النباتات بهذه البكتيريا (Akbarian وآخرون ،٢٠١١) ، الا ان De Buckوآخرون ، (١٩٩٨) فسروا هذه الحالة بأن إستجابة النبات للإصابة ببكتيريا *A.rhizogenes* تقع ضمن الحالة الفسيولوجية للخلايا المكونة له، وليس كل خلايا النبات لها القابلية على الإصابة بهذه البكتيريا وبمستوى واحد حتى ضمن النبات الواحد . كما تم تشخيص البكتيريا المعزولة من التربة على أنها *Pseudomonas aeruginosa* وذلك إعتماداً على شكل خلاياها العصوية السالبة لصبغة كرام، بالإضافة إلى نموها المنتشر على سطح وسط الأكار المغذي، وإنتاجها لصبغة

البايوسيانين Pyocyanin الخضراء المزرقة (Gaouar-Borsali وآخرون، ٢٠١٢)، وعلى مطابقة نتائج الفحوصات البايوكيميائية الواردة في شريط API 20E مع نتائج تشخيص هذه البكتيريا الواردة في Bergey's Manual Determinative Bacteriology (Holt وآخرون، ١٩٩٤). كما تطرقت هذه الدراسة لبيان مدى تأثير التحييد بالحرارة ٤٤مْ على بعض الصفات المظهرية للبكتيريا ولتحقيق ذلك ، تم اولاً دراسة حساسية هذه البكتيريا لخمسة مضادات حيوية Amoxicillin (Amo)، Ampicillin (Amp)، Cefotaxime (CTX)، Chloramphenicol (C) وTrimethprim (Tri)، وتبين أن البكتيريا بأجناسها الثلاثة كانت مقاومة لجميع المضادات الحيوية ، وأعطت مقاومة بنسبة ١٠٠% في حالة التحييد التلقائي ، ان هذه النتائج متوقعة بالنسبة لبكتيريا *Pseudomonas* التي تمتاز بثباتها الوراثي العالي لذلك لايحصل فيها تحييد تلقائي يغير من صفة مقاومتها للمضادات الحيوية (Pootjes ،1977)، وقد تكون هذه المقاومة طبيعية ناتجة عن تغيير الغشاء البلازمي او نتيجة لأفراز الكائنات المجهرية خلال مساراتها الأيضية لأنزيمات معينة تعمل على إتلاف او تعطل عمل هذه المضادات (Alsaimaryوآخرون،٢٠١٠) . وقد تعلل هذه المقاومة بهذه النسبة الكبيرة لكون هذه البكتيريا من الكائنات الدقيقة المستوطنة للتربة وقد طورت مقاومتها لمختلف المضادات الحيوية الطبيعية، بفعل إمتلاكها لبلازميد المقاومة R-factor plasmid، (Scott ،٢٠٠٨) . فضلاً عن ذلك فإن وجود أعداد هائلة من الأحياء الدقيقة ضمن نفس البيئة قد منحها القابلية لإكتساب وامكانية تبادل المقاومة فيما بينها (Dainiوآخرون،٢٠٠٨)،لذلك تمتلك الأجناس البكتيرية التي يتم عزلها من التربة مقاومة أكثر تجاه المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة ودرجات الحرارة المرتفعة مقارنة مع تلك التي يتم عزلها من أماكن أخرى او من حالات مرضية معينة (Smithوآخرون، ٢٠١٢؛ Shahid وMalik،٢٠٠٥) وهذا من شأنه أن يُفسر سبب مقاومة البكتيريا للنمو عند تحييدها عند هذه الدرجة الحرارية (٤٤مْ) .

بما ان التحييد يُفقد البكتيريا بلازميدها وبالتالي يفقدها لبعض الصفات التي تُشفر من قبل الجينات الواقعة على هذه البلازميدات (كوادينوف ،١٩٨٥) ، لذلك ادى التحييد بالحرارة في كل من *S.meliloti* و*P.aeruginosa*، إلى فقدانها لصفة المقاومة لجميع المضادات الحيوية وبنسب مئوية مختلفة، وقد يرجع هذا التباين في نسب التحييد إلى حدوث خلل في آلية توزيع نسخ

DNA اثناء الإنقسام الخلوي الامر الذي يؤدي إلى ظهور خلايا جديدة تحتوي على نسخ متعددة من البلازميدات وأخرى خالية منها (Toyوآخرون،٢٠٠٨). وقد اشاركل من Brooks وآخرون(٢٠٠٧) وTofteland وآخرون (٢٠٠٧)، في هذا السياق ان الجينات المسؤولة عن التشفير لإنتاج أنزيمات β-Lactamase التي تعمل على كسر حلقة β-Lactam الموجودة ضمن مكونات المضاد الحيوي (Amp) وتعطل بذلك تأثير المضاد تجاه نمو البكتيريا، واقعة على DNA البلازميدي، وتم الكشف عن وقوع الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادين الحيويين (Amo) و(Amp) على DNA البلازميدي لأنواع مختلفة من بكتيريا *Rhizobium* عند إستخدام الأكريدين البرتقالي كعامل محيد كيمياوي،كما أن جينات المقاومة للمضادين الحيويين (Amp)و(C) في بكتيريا *P.aeruginosa* واقعين على DNA البلازميدي الذي فُقد عند معاملة هذه البكتيريا بدرجة حرارة 44مْ وبنسب تحييد ضعيفة (Radi وRahman ،٢٠١٠) مقارنة بنسبة التحييد التي حصلنا عليها(٥٢ و٦٠%) على التعاقب، ان حصولنا على نسبة تحييد جيدة باستخدام الحرارة يدل على امتلاك هذه البكتيريا بلازميدات حساسة للحرارة تحمل صفة المقاومة للمضادات الحيوية ، ومن الممكن أن يرجع السبب في ذلك إلى اختلاف السلالة البكتيرية المستخدمة واختلاف الحالات والمواقع التي يتم فيها العزل (Gaourar-Borsali وآخرون،٢٠١٢)، لذلك ادى تعريض الاجناس البكتيرية الثلاثة في هذه الدراسة لدرجة حرارة ٤٤مْ إلى فقدان صفة المقاومة لهذه المضادات الحيوية كونها واقعة على البلازميد وليس على الكروموسوم البكتيري.أما عدم حصول التحييد لمحتوى DNA البلازميدي لبكتيريا *A.rhizogenes* فذلك يرجع حتماً لكون بلازميدها مهندس وراثياً لصفة المقاومة للمضادين الحيويين الكاربنسلين Carbenicillin (Car^{Res+}) والكاناماسين Kanamycin (Kan^{Res+}) فقط ، في حين تفسر المقاومة التي أبدتها تجاه المضادات الحيوية قبل التحييد وبعدها، إلى وقوع الجينات المسؤولة عنها على الكروموسوم(Spratt،١٩٩٤).

وعند دراسة تأثير التحييد على صفات مظهرية أخرى ،تبين أنهُ في بكتيريا *S.meliloti* نجح التحييد بالحرارة ٤٤مْ بفقدان البكتيريا لصفة إنتاجها لمتعدد السكريات الخارجي ولصفة تكوين العقد الجذرية على بادرات نباتات الحلبة *Trigonella foenumgraecum* L. وهذا مطابق لما أشار إليه العديد من الباحثين عند دراستهم لتاثير التحييد بالحرارة

على فقدان مستعمراتها النامية على الوسط الغذائي لصفة اللزوجة التي تشير إلى إنتاجها من متعدد السكريات الخارجي (Barbour وElkan،١٩٨٩) وعلى فقدان بكتيريا *Rhizobium* قابليتها على تشويه الشعيرات الجذرية وتكوين خيط الإصابة (Cen وآخرون،١٩٨٢)، وعلى تكوين العقد الجذرية وإنتاجها لإنزيم النايتروجينيز (Nigel وآخرون،١٩٨٣)، وذلك لأن *S.meliloti* تعود لمجموعة الرايزوبيوم سريعة النمو (Diaz وآخرون،١٩٨٩)، والتي تمتاز بوقوع جيناتها الداخلة في تثبيت النايتروجين الجوي بنوعيها*nif* and *fix* genes والمشفرة لعوامل تكوين العقد nodulation genes (*nod*) على البلازميدات التعايشية العملاقة Symbiosis) Megaplasmid A pSymA) ،(Oh وآخرون، ٢٠١٢)، في حين تقع المورثات المسؤولة عن التشفير لمتعدد السكريات الخارجي (EPS) لهذه البكتيريا على البلازميدات العملاقة الأخرى وهي Symbiosis Megaplasmid B (pSymB)، (Finan وآخرون،٢٠٠١)، كما بين Zurkowski وLorkiewicz (١٩٧٨)، وهذا يعني أن الجينات المسؤولة عن صفة التعايش تقع على البلازميدات في بكتيريا *Rhizobium* وبإمكانها أن تفقد هذه الصفة عند تعريضها للحرارة. من ناحية أخرى، لم يكن لهذا التحييد تاثير يذكر على انتاج كل من بكتيريا *A.rhizogenes* و*P.aeruginosa* من متعدد السكريات الخارجي، وهذا بسبب أن المورثات المسؤولة عنهما تقع على الكروموسوم وليس على البلازميد في البكتيريا الأولى (Kamoun وآخرون، ١٩٨٩)، وفي البكتيريا الثانية (Wiehlmann وآخرون، ٢٠٠٧)، كما نجح التحييد في فقدان صفة تكوين الجذور الشعرية لبكتيريا *A.rhizogenes* بعد إصابتها لبادرات نباتات الحلبة ،وذلك لوقوع جيناتها المشفرة لها على البلازميد Root-induced plasmid (Ri-plasmid)، (Melcher، ٢٠٠٠)، كما كان هذا التحييد ناجحاً أيضاً في فقدان بكتيريا *P.aeruginosa* لإنتاجها من صبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة، وذلك لوقوع الجينgene *rhIR* المشفر لها على DNA البلازميدي لهذه البكتيريا (Mathee وآخرون،٢٠٠٨). وبعد اجراء الترحيل الكهربائي للحامض النووي البلازميدي في هلام الأكاروز، تبين بان الاجناس الثلاثة قيد الدراسة تشترك باحتوائها على حزمتين بلازميديتين (الشكرجي، ٢٠١٣) وبعد التحييد فقدت البكتيريا جميع هذه الحزم قياسا بعينة المقارنة قبل التحييد (Radi وRahaman،

٢٠١٠) مما يؤكد وقوع الجينات المشفرة للصفات المدروسة على هذه البلازميدات (الياس وآخرون، ٢٠١١).

المصادر:

الياس، ميساء جاسب وحامد، دانية منعم وحمزة، صبحي جواد. (٢٠١٢). دراسة وراثية للطوافر البكتيرية المحللة للمركبات الفينولية. مجلة جامعة النهرين، المجلد ١٤، العدد٣، ايلول، ص ٦٤–٧٣.

الشكرجي، محمد عبد الاله. (٢٠١٣). عزل وتشخيص بكتيريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لبعض النباتات البقولية وتوصيف محتواها البلازميدي. اطروحة دكتوراه. كلية التربية، جامعة الموصل.

كودانيوف، أورسولا. (١٩٨٥). علم الوراثة، الجزء الثاني، الطبعة الثانية، جامعة هارفارد، ترجمة د. عدنان حسن محمد، جامعة الموصل، العراق.

ياسين، جاسم محمد. (٢٠٠٠). التحول الوراثي في نباتات الحلبة *Trigonella foenumgraecum*، بوساطة بلازميدات Ti و Ri لبكتريا *Agrobacterium*، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

Ahmed, K. D. (1989). The positive control of ilvc expression in *E. coli* K. 12. Ph. D. Thesis, Univ Durham, England.

Akbarian, R.; Hasanloo, T. and Khosroshahi, M. (2011). Evaluation of trigonelline production in *Trigonella foenum-gracum* hairy root cultures of two Iranian masses. Plant Omics. J., 4: 408- 412.

Alsaimary, I. E.; Alabbasi, A. M. and Najim, J. M. (2010). Antibiotics susceptibility of bacterial patheogens associated with otitis media. Journal of Bacteriology Research, 2(4). P: 41- 50.

Anderson, J. N. (1995). Producing a strain of *E.coli* that Glows in the Dark. Modern Biology, Inc.

Baldwin, J. N.; Strickland, R. H. and Cox, M. F. (1969). Some properties of the Beta lactamase genes in *Staphylococcus epidermidis*. J. Appl. Microbiol., 18: 628- 630.

Barbour, W. M. and Elkan, G. H. (1989). Relationship of the presence and copy number of plasmids to exopolysaccharides production and symbiotic effectinvness in *Rhizobium fredii* USDA 206. Appl. Environ. Microbiol., 55 (4):813-818.

Barrow, P. A.; Simpson, J. M.; Lovell, M. A. and Binns, M. M. (1987). Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. J. Infection and Immunity, 55: 388- 392.

Brooks, E.; Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. (2007). Medical Microbiology. 24th. McGraw-Hill Companies. N.Y., USA., P:189- 201.

Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Company Baftimore.

Cen, Y.; Bender, G. L.; Trinick, M. J.; Morrison, N. A.; Soctt, K. F.; Gresshoff, P. M.; Shine, J. and Rolfe, B. G. (1982). Transposon mutagenesis in rhizobia which can nodulate both legumes and the non lequme *Parasponia*. Appl. Environ. Microbiol., 43: 233- 236.

Cowie, A'; Cheng, J.; Sibley, C. D.; Fong, Y.; Zaheer, R.; patten, C. L.; Morton, R. M.; Golding, G. B. and Finan, T. M. (2006). An integrated approach to functional genomics: construction of a novel reporter gene fusion library for

B. J. J. and Kijne, J. W. (1989). Root lectin as a determinat of host plant specificity in *the Rhizobium*- legume symbiosis. Nature, 338: 579- 581.

Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid, 1: 584- 588.

Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide techinique. J. Gen. Microbiol., 16: 374- 381.

Finan, T. M.; Weidner, S.; Wong, K.; Buhrmester, J.; Chain, P.; Vorholter, F. J.; Hernandez-Lucas, I.; Becker, A.; Cowie, A.; Gouzy, J.; Golding, B.; and Puhler, A. (2001). The complete sequence of the 1.683- kb pSym B Megaplasmid from the N_2-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acud. Sci. USA., 98: 9889- 9894.

Sinorhizobium meliloti. Appl. Environ. Microbiol., 72: 7156-65.

Daini, O. A.; Effiong, M. J. and Ogbolu, O. D. (2008). Quinolones Resistance and R-Plasmid of clinical isolates of *Pseudomonas* Species. Sudan J. M. Sci., 3: 139- 146.

Dang, S.; Sun, L.; Huang, Y.; Lu, F.; Leu, Y.; Gong, H.; Wang, J. and Yan, N. (2010). Structure of a fucose transporter in an outward open conformation. Nature, 467: 734- 8.

De Buck, S.; Jacobs, A.; Van montageu, M. and Depicker, A. (1998). *Agrobucterium tumefaciens* transformation and co- transformation frequencies of *Arabidoposis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. Mol. Plant Microbe Interact., 11: 449- 457.

Diaz, C. L.; Melchers, L. S.; Hooykaas, P. J. J.; Lugtenberg,

transformation of super root derived *lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics. BMC. Plant Biol., 9: 1- 14.

Joshi, S. G.; Litake, G. M.; Ghole, V. S. and Niphadkar, K. B. (2003) . Plasmid borne extended spectrum β-Lactamase in clinical isolates of *Acientobacter baumannii*. J. Med. Microbiol., 52: 1125- 1127.

Kamoun, S.; Cooley, M. B.; Rogowsky, U. M. and Kado, C. I. (1989). Two chromosomal loci, involved in production of exopolysacch-aride in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., 171: 1755- 1759.

Kanekar, P. P. and Kulkarni, R. S. (1998). Effects of some curing agents on phenotypic stability in *Pseudomonas utida* degrading epsilon- caproloctam. J. Microbiology and Biotechnology, 14(2): 255- 257.

Gaouar-Borsali, N.; Gaouar. Yadi, M.; Bab aahmed, Z. and Dirssi, M. (2012) . Antibiotic resistonce study of some clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* characterization by conjugation and cleaning out of plasmid. Der. Pharmachemical, 4: 1160- 1163.

Ghosh, A. C. and Basu, P. S. (2001). Extracellular Polysaccharde production by *Azorhizobium caulinodans* from stem nodules of leguminous emergent hydrophyted *Asechynomene aspera*. Indian J. Exp. Biol., 39: 155- 159.

Holt, J. G.; Kriey, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and William, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition, The Williams and Wilkins Company, USA.

Jain, B.; Hau, W.; Wu, C.; Liu, B.; Liu, W.; Song, S.; Bi, Y. and Hand, T. (2009). *Agrobacterium rhizogenes*, mediated

Academy of Sciences, 105 (8): 3100- 3105.

Melcher, V. (2000) T-DNA Transformation. In: Molecular Genetics,
P. 4373.

Meyer, R. (1974). Alternate forms of the factor in *Proteus mirablils*. J. Bacteriol., 118 (3): 1010- 1019.

Miller, S. H.; Elliot, R. M.; Sullivan, J. T. and Ronson, C. W. (2007). Host- Specific regulation of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobum leguminosarum* biovar *trifolii*. Microbiology, 153: 3183- 3195.

Morgan, A. J.; Cox, P. N.; Turner, D. A.; E.; Davey, M. R.; Gart land, K. M. A. and Mulligan, B. J. (1987). Transformation of tomato using an Ri- Plasmid vector. Plant Sci., 49: 37- 49.

Nigel, A. M.; Cen, Y. H.; Michael, J.T.; John,, S. and Barry, G.R. (1983). Heat curing of a Sym plasmid in a fast- growing

Koneman, E. W., Allen, S. D.; Janada, W. M.; Schreckenberg, P. C. and Winn, W. C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., Lippinctt com, Philadelphia, New York.

Levin, B. R. and Bergslrom, C. T. (2000). Bacteria are different: Observations, interpretions, speculations, and opinions about mechanism of a daptive evolution in prokaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97: 6981- 6985.

Lowery, O. H.; Resebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol regent. J. Biol. Chem., 193: 265- 275.

Mathee, K.; Narasimhan, G.; Valdes, C.; Qiu X.; Matewish, J. N.; Koehrsen, M.; Rokas, A. and Yandava, C.N. (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. Proceedings of the National

Pseudomonas facilis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 76: 1002- 1006.

Radi, R. and Rahman, F. H. (2010). Study the effects of Ethidium Bromide, SDS and elevated temperature on stability of multiple antibiotic resistance plasmid of *Pseudomonas aeruginosa*, Iraq. J. Biotech., 9(4): 797- 811.

Rasool, S. A.; Ahmad, A.; Khan, S. and Wahab, A. (2003). Plasmid borne antibiotic resistance factors among indigenous *Klebsiella penumoniae*. J. Bot., 35 (2): 243- 248.

Robyt, J. and White, B. H. (1987). Biochemical techniques theory and Practice. Books cole publishing company. Monterey, California, P: 115- 118.

Ryder, C.; Byrd, M. and Wazniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas Rhizobium* sp. that is able to nodulate legumes and non-legumes, *Parasponia* sp. J. Bacteriol., 153(1): 527- 531.

Oh, C. J.; Kim, H. B.; Kim, J.; Kim, W. J. and Lee, H. (2012). Organization of *nif* gen cluster in *Frankia* sp. Eulk 1 Strain, asymbiont of *Elaeagenus umbellate*. Arch. Microbiol., 1294: 29- 34.

Petit, A.; Stougaard, J.; Kuhle, A.; Marcker, K. A. and Tempe, J. (1987). Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*. A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet., 207: 245- 250.

Plummer, D. ER. (1978). An Introduction of Practical Biochemistry, 2nd ed. Mc Graw. Hill Book company. UK., P. 61.

Pootjes, C. F. (1977). Evidence for plasmid coding of the ability to utilize hydrogen gas by

Singh, B.; Kaur, R. and Sing H, K., (2008). Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek). Afr. J. Biotech., 70: 3671- 3676.

Smith, S.; Ganiyu, O.; John, R.; Fowora, M. and Akinsinde, K. (2012). Antimicrobial resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wounds in lagos, Nigeria. Acta. Med. Iran, 50: 433- 438.

Spiers, A. J.; Bohannon, J.; Gehrig, S. M. and Rainey, P. B. (2003). Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW 25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. Mol. Microbiol., 50: 15- 27.

Spratt, B. G. (1994). Resistance of antibiotics mediated by target alterations. Sci., 264: 388- 393.

aeruginosa biofilm development. Curr. Opin. Microbial., 10: 644- 648.

Schacterale, G. R. and Pollak, R. L. (1973). A simplified methods for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. Anal. Bio. Chem., 51: 651- 655.

Scott, W. C. (2008). New Antibiotic Targets, Hamana Press. Inc.

Shahabzadeh, Z.; Heldari, B. and Hafez, R. F. (2013). Introduction of transgenic hairy roots in *Trigonella foenum-graecum* co-cultivated with *Agrobacterinum rhizogenes* Harboring. GFPGene. J. Crop Sci. Biotech., 16 (4): 263- 268.

Shahid, M. and Malik, A. (2005). Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns patients. Indian J. Med. Res., 122: 324- 329.

Briscoe, D. (2008). Microbiology. 2th ed. McGraw-Hill comp. New York.

Vincent, J. M. (1970). A Monul for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Oxford, 113- 131-.

Wiehlmann, L.; Wagner, G.; Cramer, N.; Siebert, B.; Gudowius, P.; Morales, G.; Ko., T.; Delden, C.; Weinel, C.; Slickers, P. and Tu, B. (2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. Preceedings of the National Academy of Sciences of the USA., 104; 8101- 8106.

Zurkowski, W. and Lorkiewicz, Z. (1978). Effective method for the symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. Plant Sci. Lett., 19: 277- 284.

Tiwarir, K.; Mala, T.; Guang, Z. C.; Giamg- Qin, G. and Guo-Chang, Z. (2007). Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoirdoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. Plant Cell Rep., 26: 199- 210.

Tofteland, S.; Simonsen, G. and Walsh, T. (2007). Effect of phenotype and genotype on methods for detection of extended spectrum-β-Lactamase production clinical isolates of *Escherichia coil* and *Klebsiella pneumonia* in Norway. Journal of Clinical Microbiology, 9(45): 199- 205.

Toy, E.; Debord, C.; Wanger, A.; Castro, G., Kettering, J.D. and