



الدرس العملى السابع

بكتيريا العقد الجذرية

تتواجد علي جذور الكثير من النباتات
البقولية عقدا تكونها أنواع من البكتريا التابعة
لجنس الرايزوبيم **Rhizobium** أو البرادي
رايزوبيم **Bradyrhizobium** ويطلق عليها
العقد الجذرية أو العقد البكتيرية .
تستطيع البكتريا التي تعيش بداخل هذه
العقد تثبيت نيتروجين الهواء الجوي وتحويله
من صورته خاملة إلي صورته يستفيد منها النبات

وتستعين هذه البكتريا في نشاطها للقيام بهذه العملية بما تستمده من النباتات المتعايشة معها من مصادر الطاقة اللازمة حيث ينشأ بينها وبين النباتات **علاقة تكافلية أو علاقة تبادل المنفعة** ولذلك يطلق علي هذه الأنواع من البكتريا **البكتريا التكافلية**

هذه الأنواع من البكتريا تستطيع القيام بعملية **تثبيت النيتروجين الجوي** بالاستعانة بما تملكه من إنزيم خاص يطلق عليه **إنزيم النيتروجينيز**. هذا الإنزيم **يساعد علي** ارتباط النيتروجين بالهيدروجين لتكوين الامونيا وهي الناتج الأولي لعملية التثبيت .

عملية تثبيت النيتروجين الجوي عملية هامة جدا فيما يتعلق بخصوبة التربة وإمداد النباتات المزروعة بما تحتاجه من نيتروجين سواء كان النبات البقولي الذي تتم فيه عملية التثبيت أو النباتات غير البقولية التي تزرع عقبه . وقد أثبتت الاختبارات الخاصة بخصوبة التربة أن النباتات البقولية تضيف للتربة كمية لا بأس بها من النيتروجين المثبت والتي تختلف باختلاف نوع النبات البقولي ومدة مكثه في الأرض ومدى انتشار مجموعته الجذري وتوزيعه في التربة

ونظرا للأهمية الكبيرة لهذه الأنواع من البكتريا فقد نجحت المحاولات منذ زمن بعيد في الحصول عليها في صورة مزارع نقية محملة علي حوامل مناسبة واستخدامها كلقاح للنباتات البقولية لزيادة قدرتها علي تثبيت النيتروجين الجوي خصوصا في الأراضي المستصلحة حديثا .

ويهدف هذا الدرس العلمى إلى :

- عزل هذه الأنواع من البكتريا في صورته مزارع نقية
- إختبار درجة نقاوتها
- إختبار قدرتها علي تثبيت النيتروجين الجوي في عقد علي جذور النباتات البقولية المتخصصة.

عزل البكتيريا العقدية (*Rhizobium spp.*) من جذور البقوليات

- الأدوات والمواد المطلوبة

- ١- جذر نبات بقولي عليا عقد جذريه صادقة
- ٢- ابرة تلقيح
- ٣- ملقط
- ٤- ساق زجاجية
- ٥- مشرط
- ٦- مقص معقمة
- ٧- طبق بتري به محلول سليمانى
- ٨- وآخر يحتوى علي كحول ٩٥%
- ٩- وثالث يحتوى علي ١٥ مل ماء معقم

١٠- ورابع به اسم ٣ ماء معقم

١١- أطباق بتري فارغة معقمة

١٢- وأنايب اختبار تحتوي علي بيئة أجار المينتول
ومستخلص الخميرة معقمة

وهي تتركب من الآتي :

مينتول ١٠ جرام ، فوسفات بوتاسيوم ثنائي القاعدية ٠.٥
جرام ، كبريتات ماغنسيوم مائية ٠.٢ جرام ، كلوريد
صوديوم ٠.١ جرام ، كربونات كالسيوم ٣ جرام ،
مستخلص خميرة (١٠%) ١٠٠ سم ٣ ، أجار أجار ١٥ –
٢٠ جرام ، ماء مقطر ٩٠٠ سم ٣ .



جذر نبات بقولي يبين العقد الجذرية

خطوات العمل :

- ١- إ فصل عقدة كبيرة الحجم بواسطة مشرط أو مقص وإقطعها مع جزء صغير من الجذر (بدون إحداث أى جرح لها منعاً من دخول المطهرات التي تقضي على البكتيريا) ثم اغسلها جيداً بالماء لإزالة ما يعلق بها من حبيبات الطين.
- ٢- ضع العقدة فى محلول السليمانى من ٣-٦ دقائق مع التحريك ثم إنقلها بواسطة ملقط معقم إلى الكحول ٩٥٪ لمدة ٣-٥ دقائق ثم إنقلها إلى الطبق المحتوى على ١٥ سم^٣ من الماء المعقم مع تقليبها للتخلص من بقايا السليمانى والكحول.
- ٣- إنقل العقدة بعد ذلك إلى الطبق المحتوى على ١ سم^٣ ماء معقم ثم إهرسها جيداً وفتتها فى الماء لتكون معلق بكتيري وذلك بالإستعانة بالملقط المعقم أو بطرف الساق الزجاجية المعقمة.
- ٤- سيح أنابيب أجار المانيتول ومستخلص الخميرة ثم إتركها لتبرد عند ٤٥°م ثم صبها فى الأطباق المعقمة تحت شروط التعقيم واترك البيئة حتى تتصلب فى الأطباق.



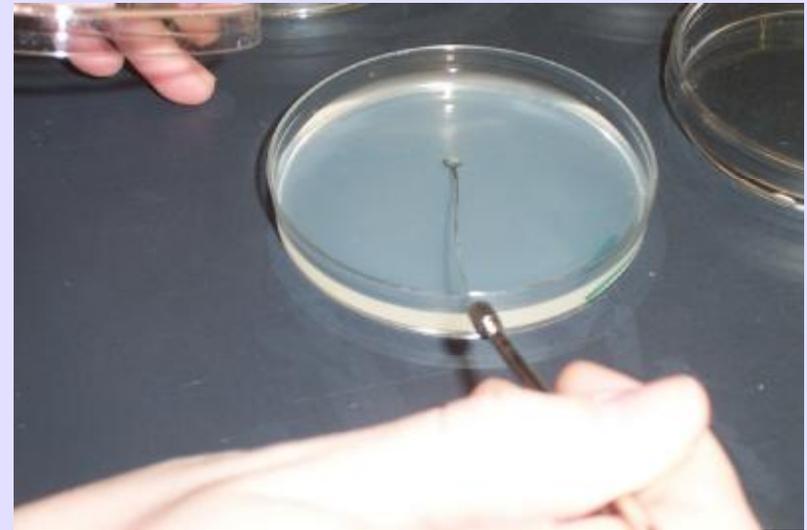
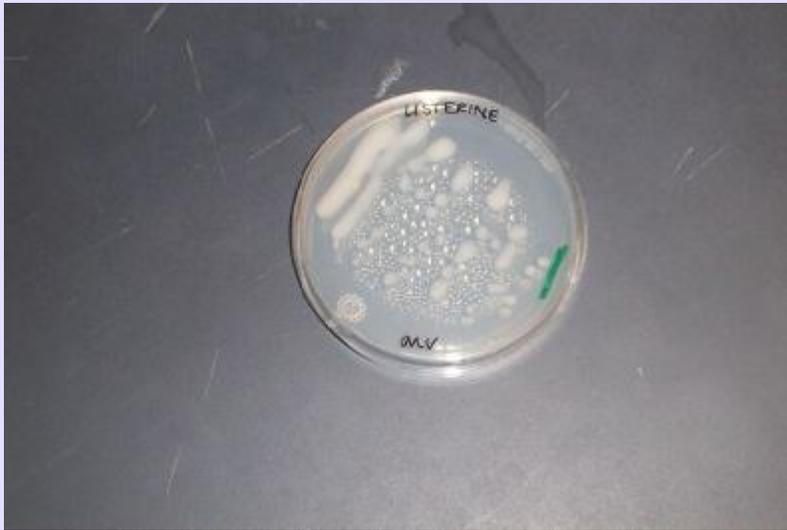
- غسيل النباتات جيدا لإزالة التربة - تجفيف النباتات على ورق نشاف



- تجهيز ٣ أطباق بتري تحتوى على (سليمانى - كحول إيثيل - ماء مقطر معقم)
- مرر العقد فى الثلاث أطباق لإجراء عملية التعقيم السطحي



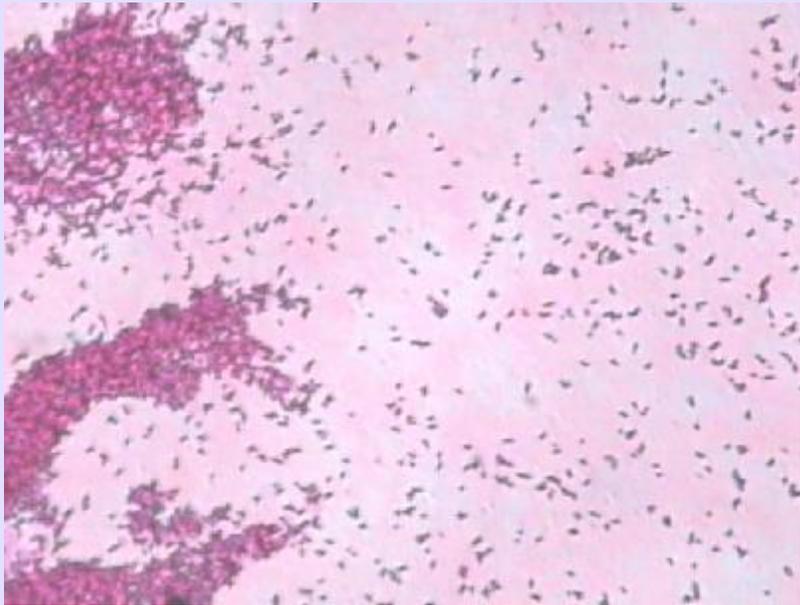
- ضع في أحد الأطباق كمية من الماء المقطر المعقم ثم أهرس العقدة فيها



- لقع أحد الأطباق من معلق مهروس العقدة ثم ضع الطبق في الحضان



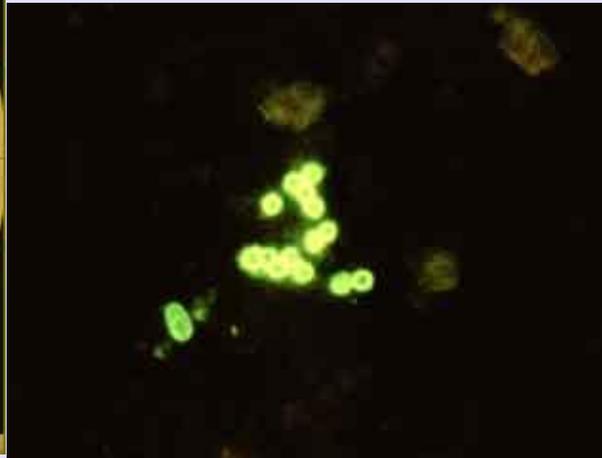
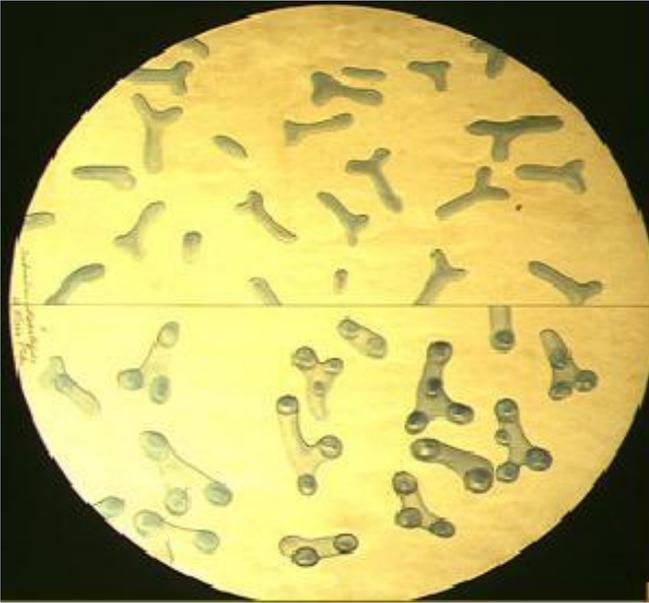
تفحص المستعمرات الناتجة
بعد التحضين ويتم التعرف
علي خصائصها حيث تظهر
مرتفعة رطبة المظهر ذات
حافة دائرية كما أنها في
بادئ الأمر تكون لامعه
شفافة ثم تتحول إلي لون
أبيض معتم



شكل *Rhizobium* تحت
الميكروسكوب عصوي قصير
سالب لجرام غير متجراثم

الإسم العلمي : Rhizopus sp.

- شكل الميكروب : يشبه حروف اللغة اللاتينية (X,Y,L,T,V)
- نظام التجمع : مفرد
- نوع الصبغ : بسيط
- اسم الصبغة المستخدمة : الفوكسين
- لون خلايا الميكروب : أحمر



إختبار درجة نقاوة بكتيريا العقد الجذرية وعزلها في صورة مزارع نقية

تفحص المستعمرات الناتجة بعد التحضين ويتم التعرف علي خصائصها حيث تظهر مرتفعة رطبة المظهر ذات حافة دائرية كما أنها في بادئ الأمر تكون لامعه شفافة ثم تتحول إلي لون ابيض معتم وهذه المستعمرات تمثل مستعمرات الرايزوبيم .

غير أنه قد تظهر مستعمرات مشابهة لها ولكن لميكروب آخر قد يكون ملوث للعقدة البكتيرية نتيجة لعدم دقة عملية التعقيم لسطح العقد وهذا الميكروب هو

Agrobacterium radiobacter

ولهذا لابد من إجراء اختبارات التأكد من نقاوة مستعمرات الرايزوبيم لعزلها في صورة مزارع نقية ويتم ذلك بالاتي

١ - إختبار أحمر الكنجو

يعتبر هذا إختبار تفرريقي بين كل من الرايزوبيوم والاجر وبكتيريم من جهة وبين البكتريا الملوثة الأخرى حيث لا تستطيع مستعمرات الرايزوبيوم والاجر وبكتيريم امتصاص اللون الأحمر لأحمر الكونجو بينما تمتصه المستعمرات البكتيرية الأخرى

ويجري هذا الإختبار بأخذ جزء من النمو الميكروبي من المستعمرات الناتجة من تجربته العزل السابقة علي طرف ابره التلقيح المعقمة ويخطط به علي سطح بيئة آجار المانيتول ومستخلص الخميره المضاف إليها أحمر الكونجو ثم تحضن الأطباق مقلوبة علي درجة حرارة ٢٦ - ٢٨° م لمدة ١-٢ أسبوع ثم تفحص المستعمرات المتكونة بعد التحضين وإذا ظهرت مستعمرات غير ملونة فهي تمثل إما مستعمرات الرايزوبيوم أو مستعمرات الاجر وبكتيريم

٢- إختبار بيئة لبن عباد الشمس

للتفرقة بين بيئة مستعمرات الرايزوبيوم والاجروبيكتيريم تستخدم بيئة **لبن عباد الشمس** ذات اللون البنفسجي حيث تستطيع بعض أنواع بكتريا الرايزوبيوم **إختزال لون الدليل** مع حدوث تأثير قلوي وبعضها يكون قادر علي إختزال اللون مع حدوث تأثير حمضي بينما بكتريا الاجروبيكتيريم تختزل اللون مع **نموات مخاطية سميكة في مدي أسبوع** ثم **تنقلب إلي لون شيكولاتي مسود في مدة أسبوعين** .

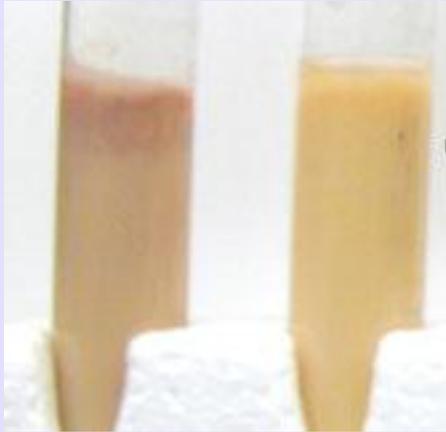
ويمكن إجراء هذا الاختبار باستخدام أنابيب تحتوي علي **بيئة لبن عباد الشمس** المعقمة وتلقيحها بجزء من النمو من المستعمرات الناتجة من اختبارات العزل والذي تحدد أنها قد تكون تابعة لبكتريا الرايزوبيوم أو الأجروبكتيريم (اختبار أحمر الكونجو)

ثم تحضن علي درجة حرارة ٢٦ - ٢٨° م لمدة ١-٢ أسبوع وبعد فتره التحضين تلاحظ التغيرات الحادثة في البيئة

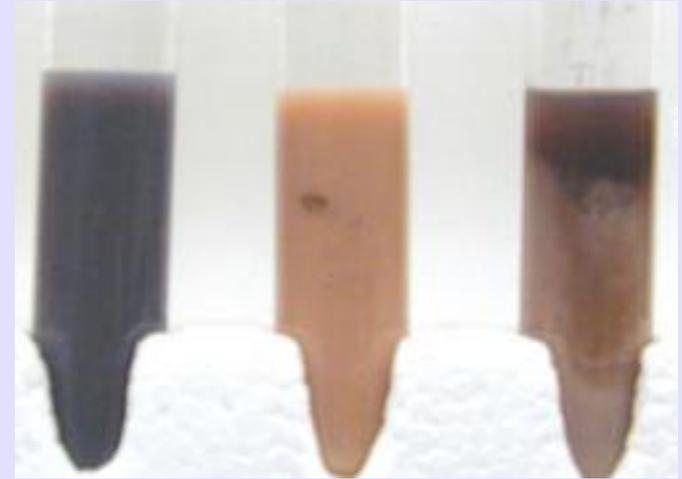
وفي حالة ظهور **حلقة شفافة** علي مدي فترة التحضين تعتبر المستعمرات نقيه للرايزوبيوم

أما إذا تكونت حلقة شفافة مع نموات مخاطية سميكة ثم **أنقلب إلي اللون الشيكولاتي المسود** فيدل علي أن هذه المستعمرات للاجر وبكتيريم فتستبعد.

إختبار بيئة لبن عباد الشمس



حلقات شفافة طوال مدة التحضين
Rhizobium



حلقات شفافة مع نموات مخاطية
سميكة في مدى أسبوع ثم تنقلب
إلى بني شيكولاتي مسود على مدى
أسبوعين *Agrobacterium*



Agrobacterium

Rhizobium

٣- إختبار بيئة البطاطس

يمكن التمييز أيضا بين الرايزوبيوم والاجروبيكتيريم بتلقيح أطباق تحتوي علي **بيئة البطاطس الصلبة** بطريقة التخطيط وذلك بجزء من النمو الميكروبي لمستعمرات الميكروبات السابقة والتحصين علي درجة حرارة ٢٥م لمدة ١٠ أيام

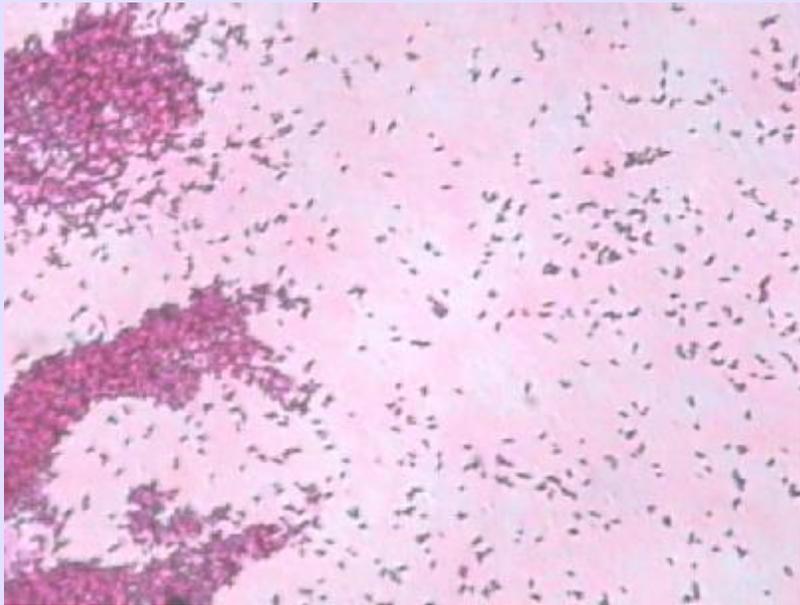
ثم اختبار النمو حيث يظهر في حاله **الرايزوبيم شفافا ولزجا وغير سميك** بينما في حالة **الاجروبيكتيريم** يكون مخاطيا ويظهر رمادي اللون في البداية ثم يتحول فيما بعد إلي اللون البني حيث تكتسب البطاطس هذا اللون أيضا بدلا من لونها الأبيض.

بعد التعرف علي خصائص مستعمرات الرايزوبيم والتأكد من نقاوتها بالاختبارات السابقة ينقل الميكروب إلي بيئة آجار المانيتول ومستخلص الخميرة المائلة بعد عمل غشاء وصبغة بطريقة جرام ثم فحصة ميكروسكوبيا للتعرف علي خصائص الميكروب وبذلك نحصل علي مزارع نقية علي بيئة صلبة مائلة والتي يتم حفظها علي درجة الحرارة المناسبة لحين الاستخدام .



مستعمرات نقية من

Rhizobium



شكل *Rhizobioum*

تحت الميكروسكوب

عصوى قصير سائب

لجرام غير متجراثم

إختبار قدرة بكتيريا العقد الجذرية على تكوين العقد على جذور النباتات البقولية

الدليل الأكد على نقاوه المزارع المائية التي تم الحصول عليها من الاختبار السابق هو قدرتها على تكوين العقد على النبات البقولي المعزولة منه وذلك عند تلقيح جذوره بهذه البكتريا وزراعتها تحت ظروف معقمة وتعتبر هذه هي الطريقة المثلى للتعرف على سلالات الرايزوبيم والتأكد من نقاوتها ويجري ذلك طبقا للخطوات التالية

الأدوات والمواد اللازمة :

- ١- المزارع المائية الناتجة من الاختبار السابق .
- ٢- بذور النبات البقولي والذي سبق عزل هذه البكتريا منه .
- ٣- أطباق بتري معقمة .
- ٤- دوارق أو زجاجات تحتوي علي بيئة آجار المانيتول ومستخلص الخميره المعقمة .
- ٥- كحول ايثانول
- ٦- محلول السليماني .
- ٧- أصص زرع بها رمل معقم .
- ٨- ماء معقم
- ٩- محلول مغذي (محلول كرون) معقم .

خطوات العمل

١- التعقيم السطحي للبذور :

- ١- تغمر كمية من البذور في الكحول لمدة ٣ - ٥ دقائق مع الرج جيدا .
- ٢- تنقل البذور إلي محلول السليمانى حيث تغمر لمدة ٣ - ٥ دقائق مع الرج للبذور الصغيرة أو ٣ - ٥ دقائق في حالة البذور الكبيرة الحجم ثم تغسل جيدا بماء معقم عدة مرات في حالة البذور ذات القصرة السميقة يمكن استخدام ماء معقم ساخن درجة حرارته من ٦٠ - ٦٤ °م ليسهل الإنبات بعد ذلك .
- ٣- تنقل البذور بعد ذلك إلي أطباق بتري معقمة وتوضع الأطباق في الحضان علي درجة ٣٧ °م لمدة ١٢ - ٢٤ ساعة لتجف .
- ٤- بعد التجفيف تزرع البذور علي سطح بيئة آجار المانيتول ومستخلص الخميرة الصلبة الموضوعة في أطباق بتري معقمة ، وتحضن علي درجة حرارة الغرفة لمدة ٤٨ - ٧٢ ساعة ، ثم تختبر البذور المستنبطة بعد فترة التحضين لمدي تلوثها بالميكروبات من عدمه وذلك باستخدام عدسه يدوية .

٢- زراعة البذور وتلقيحها بالبكتريا المختبرة :

- ١- توضع البذور المستنبطة الخالية من التلوث الميكروبي علي سطح الرمل المعقم الموضوع بالأصص .
- ٢- تلقح بعض الأصص بالميكروب المختبر الموجود في صوره مزرعة نقية سائلة وذلك بنقل ١ - ٢ سم ٣ من هذه المزرعة بواسطة ماصه معقمة ثم تغطي البذور بطبقة رقيقة من الرمل المعقم ثم يرطب السطح بالمحلول المغذي أو بالماء المعقم .
- ٣- تترك بعض الأصص الاخري المزروعة بدون تلقيح للمقارنة.
- ٤- توضع الأصص المزروعة سواء الملقحة أو غير الملقحة في صوبة تحت شروط التعقيم مع الري باستمرار وذلك باستخدام المحلول المغذي مرتين ثم يعقبة مرة باستخدام الماء المعقم وهكذا.

٣- إختبار النباتات :

تختبر النباتات النامية سواء الملقحة أو غير الملقحة أسبوعا لطول البادرة واللون مع فحص تكوين العقد بعد ٣ - ٥ أسابيع أو قبل ذلك مع ملاحظة أعداد العقد المتكونة وموضعها علي المجموع الجذري وخصائصها الأخرى مثل حجمها وشكلها ولونها من الداخل للتأكد من وجود الليجهيموجلوبيين .



نباتات ملقحة
بيكتيريا العقد
الجزرية

نباتات غير ملقحة
بيكتيريا العقد
الجزرية

ملاحظات :

- ١- ظهور عقد علي جذور النباتات غير الملقحة يدل علي حدوث تلوث وعدم الدقة في إجراء عمليات التعقيم .
- ٢- يمكن بالإختبار السابق معرفة مدي كفاءة السلالة المعزولة في تثبيت الازوت الجوي .
- ٣- يمكن استخدام أواني زجاجية تحتوي علي بيئة آجار المانيتول ومستخلص الخميرة المعقمة والمضاف إليها المحلول المغذي المعقم بدلا من الرمل المعقم وعند زراعتها بالبذور المستتبتة توضع البذور علي السطح بعد عمل شقوق في الآجار لأسفل عن طريق ابره التلقيح المعقمة لتسهيل انتشار الجزيرات ثم تلقح بواسطة ١ - ٢ سم من المزرعه السائلة بواسطة ماصة معقمة وتحاط الأنابيب من أسفل سطح الآجار بورق أسود لحجب الضوء عن حيز نمو وانتشار الجذور وتغطي هذه الأنابيب بأي وسيلة تسمح بالتهوية مع عدم إعطاء الفرصة لحدوث التلوث.



عقد جذرية صادقة
(لونها من الداخل أحمر)

عقد جذرية
كاذبة (لونها من
الداخل أبيض)



جذر نبات
بقولى غير
ملقح
بيكتيريا العقد
الجزرية

جذر نبات
بقولى ملقح
بيكتيريا العقد
الجزرية

المراجع :

http://www.wou.edu/las/natsci_math/biology/boomer/Bio331/microlab/projects/websitesspring2002/nitroweb02/Rhizobium.html

www.cat.cc.md.us/.../labmanua/lab7/endobmmg.html

<http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/bugs/closter.html>

<http://visualsunlimited.com/results.jsp>

<http://medic.med.uth.tmc.edu/path/methods.htm>

<http://www.statlab.iastate.edu/survey/SQI/SoilBiology/bacteria.htm>

http://www.cbs.knaw.nl/cbs_home/cbs_home.html?http://www.cbs.knaw.nl/publications/Aspergillus.htm~main

http://www.wou.edu/las/natsci_math/biology/boomer/Bio331/microlab/projects/websitesspring2002/nitroweb02/AzotobacterPage.html