جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فاژتایپینگ ۳۰ سویه ریزوبیوم جدا شده از ۵ لگوم همزیست از خاک استان‌های گیلان و اصفهان

مجید بوذری*، گیتی امتیازی* و محمد جواد مهدی‌پور مقدم**

*** گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان**

**** کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان**

چکیده

در این تحقیق ۳۰ سویه *ریزوبیوم* همزیست ۵ لگوم از ٦ خاک مختلف از استان های گیلان و اصفهان جداسازی و شناسایی گردید. ۲ فاژ مربوط به *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار فازئولی* (*Phaseolus vulgaris* L.) و *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ* (*Cicer arietinum* L.) و ۲ فاژ مختلف از *سینوریزوبیوم ملیلوتی* (*Trigonella foenum-graecum* L.) که روی میزبان اختصاصی خود به مدت ۱ سال خالص‌سازی شده بودند، به منظور شناسایی اختصاصی میزبان در بین ۳۰ سویه ریزوبیوم مورد استفاده قرار گرفتند. فاژ *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار فازئولی(لوبیا)* جداشده از خاک منطقه جیرگوابر رودسر و فاژ *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ*(نخود) جداشده از منطقه دانشگاه اصفهان هریک دارای یک واکنش متقاطع(Cross reaction) و فاژهای *سینوریزوبیوم ملیلوتی* (*شنبلیله*) جداشده از منطقه ناژوان اصفهان وخاک منطقه دانشگاه اصفهان هریک دارای ۹ واکنش متقاطع بودند. برای تشخیص افتراقی بین دوسویه *ریزوبیوم لوبیا* و *ریزوبیوم نخود* از فاژ ریزوبیوم *شنبلیله* استفاده شد. درنتیجه می‌توان از فاژهای *ریزوبیوم لوبیا* و *ریزوبیوم نخود* برای تشخیص سویه‌های میزبان در بین سویه‌های مختلف *ریزوبیوم* در دواستان مذکور استفاده کرد. غیراختصاصی عمل کردن باکتریوفاژهای *ریزوبیوم شنبلیله*، نشان داد که این باکتریوفاژها اثرات تخریب‌کنندگی وسیع دارند و لذا احتمال می‌رود با شناخت عوامل بازدارنده‌ی باکتریوفاژهای *ریزوبیوم شنبلیله*، بتوان از تهاجم این باکتریوفاژها به‌طور بیولوژیک روی میزبان‌های *ریزوبیوم* متفاوت، ممانعت به عمل آورد. حساسیت یا مقاومت باکتری‌های *ریزوبیوم* به باکتریوفاژها، متفاوت بود، که می‌تواند ناشی از عدم وجود گیرنده اختصاصی، حالت لیزوژنی یا وجود پلاسمید sym درسویه‌های مقاوم به فاژ باشد.

واژه های کلیدی: فاژتایپینگ، باکتریوفاژ، *ریزوبیوم*، لگوم، واکنش متقاطع.

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

باکتری های *ریزوبیوم* مهمترین میکروارگانیسم های موجود در خاک هستند که نسبت به سایر میکروارگانیسم های خاک نقش بیشتری در تثبیت ازت (Nitrogen fixation) دارند و این فرآیند را طی همزیستی با ریشه گیاهان خانواده بقولات (Leguminaceae) انجام می دهند(۲۵). باکتریوفاژها، ویروس های پروکاریوت هایی مثل یوباکتری ها و آرکی باکترها هستند(۱). یکی از زیستگاه های باکتریوفاژها، خاک می باشد(۲۲). باکتری های *ریزوبیوم* یکی از میزبان های باکتریوفاژها در خاک محسوب می شوند. در سال ۱۹۳۵، Dunenz و Demolon نشان دادند که فاژها باکتری های *ریزوبیوم* را در خاک از بین می برند. در سال ۱۹۳٦ مشخص شد که فاژها و باکتری ها به طور همزمان در گرهک های(nodules) ریشه *یونجه* نیز وجود دارند. وجود باکتریوفاژهای *ریزوبیوم* یا ریزوبیوفاژها (rhizobiophages) در خاک، در تعدیل جمعیت باکتری های *ریزوبیوم* اثر می گذارند(۱). از باکتریوفاژها برای شناسایی و تمایز بین سویه های مختلف باکتری ها به منظور بررسی اپیدمیولوژیکی سویه های مختلف استفاده می شود(۹،۵،۲،۱). همچنین باکتریوفاژها از مدت ها قبل برای طبقه بندی (classification) گونه‌های *ریزوبیوم* و برای تمایز سویه(۱۳،۱۲) و *ریزوبیوم* های تیپ وحشی (wild-type) از جهش یافته هایی (mutants) که قادر به تشکیل گرهک نیستند(۱٤) مورد استفاده قرار گرفته اند. به طور کلی تعداد فاژهای مربوط به یک سویه در خاک بیشتر از تعداد میزبان است. لذا تعداد بیشتر فاژ نسبت به تعداد باکتری میزبان در خاک نشان‌دهنده غیراختصاصی عمل کردن برخی از باکتریوفاژها است(۲،۳، ۱۱،۲۲). در سال ۱۹۸۰ در تحقیقات انجام گرفته توسط Staniewski، ۲۲۳ سویه *ریزوبیوم* با استفاده از ۲۸ فاژ شناسایی شد(۱۷). در سال ۱۹۸٦ در تحقیقات انجام گرفته توسط Bromfield و همکاران، ۱۹۲۰ سویه *ریزوبیوم* با استفاده از ۸۹ فاژ شناسایی شد(٤). Ali و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز نشان دادند که باکتریوفاژهای *ریزوبیوم ژاپونیکوم* به طور غیر اختصاصی عمل می کنند(۲). اهمیت باکتریوفاژهای *ریزوبیوم* نیز به خاطر اختصاصی عمل کردن بسیار محدود آن ها است و به همین دلیل از باکتریوفاژها در فاژتایپینگ سویه های *ریزوبیوم* استفاده می شود(۵، ۱۵،۱٦،۲۰،۲۱). Evans و همکاران در سال ۱۹۷۵ نشان دادند که وجود باکتریوفاژ در منطقه ریشه شبدر (Clover) باعث تغییراتی در همزیستی سویه های حساس *ریزوبیوم تریفولی* می‌شود (۶،۷،۱۹). حساسیت یا مقاومت باکتری های *ریزوبیوم* نیز به باکتریوفاژها متفاوت است(۱،۲،۱۰). در این تحقیق از ٤ باکتریوفاژ جدا و خالص سازی شده از دو استان گیلان و اصفهان، برای شناسایی سویه های میزبان در بین ۳۰ سویه جدا شده از ۵ لگوم همزیست از استان های گیلان و اصفهان استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۳۰ سویه *ریزوبیوم* همزیست با ۵ لگوم شامل *یونجه*(*Medicago sativa.* L)، *لوبیا* (*Phaseolus vulgaris* L.)، *شنبلیله*(*Trigonella foenum-graecum* L.)، *نخود*(*Cicer arietinum* L.) و *عدس*(*Ervum lens* L.)(۱۸) جداسازی و شناسایی شد.

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱ – اجزای محیط کشت YMA (۸).

نوع ماده شیمیایی	مقدار ماده شیمیایی(گرم)
مانیتول	۱۰/۰
فسفات دی پتاسیم	۰/۵
سولفات منیزیم	۰/۲
کلرور سدیم	۰/۱
کربنات کلسیم	۰/٤
عصاره مخمر	۱/۰
آگار	۱۵/۰
آب مقطر	۱/۰ لیتر

۱- جداسازی سویه های *ریزوبیوم* از گرهک لگوم همزیست

گرهک سالم و بخشی از ریشه که گرهک در آن وجود دارد، چند بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس سطوح گرهک با محلول کلرور جیوه ۰/۱٪ استریل، و با استفاده از پنس استریل در سطح محیط YMA(Yeast Extract Mannitol Aagr) انتقال داده و فشرده شد. بعد از فشرده شدن گرهک در سطح محیط، باکتروئید های موجود در داخل گرهک طی ۳ الی ۷ روز در درجه حرارت ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد در سطح محیط کشت ظاهر شدند. بعد از ظاهر شدن کلنی اطراف گرهک، به منظور خالص سازی، مقداری از کلنی اطراف گرهک تحت شرایط استریل به محیط کشت YMAدیگری انتقال داده شد که بعد از ۳ الی٦ روز انکوباسیون در درجه حرارت ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد، باکتری ها به خوبی در سطح محیط رشد نمودند(۸). اجزای تشکیل دهنده محیط YMA در جدول ۱ آمده است. اسامی سویه هایی که در این تحقیق جداسازی وشناسایی شده اند، در جدول ۲ آورده شده است.

۲- شناسایی باکتری های *ریزوبیوم*

مورفولوژی باکتری های *ریزوبیوم* با استفاده از رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی گونه های *ریزوبیوم* از آزمون های افتراقی بیوشیمیایی استفاده گردید(۸).

۳- جداسازی و خالص سازی باکتریوفاژهای *ریزوبیوم*

برای جداسازی باکتریوفاژها، ۱۰ گرم خاک از منطقه مورد نظر با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط و بعد از ۲ دقیقه تکان دادن، به مدت ۲٤ الی ٤۸ ساعت به حالت ساکن قرار گرفت. سپس محلول رویی جدا و از فیلتر۰/٤۵ میکرون عبور و محلول عبوری یا فیلترات روی میزبان مورد نظر منتقل گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی باکتریوفاژ به وسط محیط YMA حاوی کشت چمنی تازه (lawn culture) میزبانی که جداسازی فاژ آن مورد نظر بود، اضافه گردید. بعد از ۲ هفته پلاک های کوچکی در وسط پلیت ها مشاهده گردید، که به مرور زمان قطر آن ها زیاد شد، به طوری که بعد از گذشت ٤ هفته تمام سطح پلیت ها را فرا گرفتند. سپس با محلول گلیسین۱٪ (۲۳)، پلاک های بزرگ تشکیل شده شستشو و از فیلتر۰/٤۵ میکرون عبور داده شدند(۲). سپس همانند مرحله قبل، ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول های عبوری بلافاصله بعد از کشت چمنی میزبان مورد نظر به وسط پلیت حاوی میزبان منتقل گردیدند. برای جداسازی و در نهایت خالص سازی فاژ مربوط به یک میزبان، ٤ الی۵ بار انتقال محلول حاوی فاژ به وسط پلیت

جدول۲ – فاژتایپینگ سویه های جدا شده از لگوم های همزیست از خاک های مناطق مختلف مورد مطالعه.

خاک مناطق مختلف	سویه ها	فاژ			
		P1	P2	P3	P4
باغچه ای رودسر	*Srm(M)*	–	–	-	-
	Rlbp(P)	-	-	+	+
	Srm(T)	–	–	-	-
	Rlbv(C)	–	–	–	–
	Rlbv(E)	–	–	+	-
جیرگوابر رودسر	*Srm(M)*	–	–	+	+
	Rlbp(P)	+	+	+	+
	Srm(T)	–	–	+	+
	Rlbv(C)	–	–	–	–
	Rlbv(E)	–	–	+	+
حسن سرا رودسر	*Srm(M)*	–	–	–	–
	Rlbp(P)	–	–	–	+
	Srm(T)	–	–	–	+
	Rlbv(C)	–	–	–	–
	Rlbv(E)	–	–	–	–
ناژوان اصفهان	*Srm(M)*	–	–	–	–
	Rlbp(P)	–	–	–	–
	Srm(T)	–	–	+	–
	Rlbv(C)	–	–	–	–
	Rlbv(E)	–	–	+	–
دانشگاه اصفهان	*Srm(M)*	–	–	–	+
	Rlbp(P)	–	–	+	–
	Srm(T)	–	–	+	+
	Rlbv(C)	+	+	–	+
	Rlbv(E)	–	–	–	–

ادامه جدول۲

خاک مناطق مختلف	سویه ها	فاژ			
		P1	P2	P3	P4
دشتی اصفهان	*Srm(M)*	_	_	_	_
	Rlbp(P)	_	_	_	_
	Srm(T)	_	_	_	_
	Rlbv(C)	_	_	_	_
	Rlbv(E)	_	_	_	_

تشکیل پلاک : + ، عدم تشکیل پلاک :-

P1: فاژ *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار فازئولی(لوبیا)* منطقه جیرگوابر.

P2: فاژ *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(نخود)* منطقه دانشگاه.

P3: فاژ *سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله)* منطقه ناژوان.

P4: فاژ *سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله)* منطقه دانشگاه.

Srm(M) : سینوریزوبیوم ملیلوتی(یونجه).

Rlbp(P) : ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار فازئولی(لوبیا).

Srm(T) : سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله).

Rlbv(C) : ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(نخود).

Rlbv(E) : ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(عدس).

حاوی میزبان انجام گرفت. این روش جداسازی و خالص سازی باکتریوفاژهای *ریزوبیوم* برای اولین بار توسط نویسندگان این مقاله مورد استفاده قرار گرفت.

٤- فاژتایپینگ

برای فاژتایپینگ ۳۰ سویه باکتری توسط هر فاژ، سوسپانسیونی از کشت تازه هر ۳۰ سویه باکتری با جذب نوری ۱/۹ (در طول موج ٦۰۰ نانومتر) تهیه و میزان ۵۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به وسط پلیت حاوی محیط کشت YMA انتقال و به طور چمنی کشت داده شد. میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی فاژ (بعد از ٤ الی ۵ بار جداسازی) به وسط پلیت حاوی محیط کشت چمنی باکتری منتقل گردید. شرایط برای تمام ۳۰ پلیت یکسان بود. این آزمایش برای هر فاژ و هر سویه در ۲ تکرار بررسی شد. پلیت ها در دمای اتاق و به دور از نور مستقیم خورشید(٢٤) قرار داده شدند و بعد از گذشت ٤۸ الی ۷۲ ساعت وجود پلاک و گسترش آن مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل پلاک و گسترش آن در هر ۲ تکرار ملاک مثبت بودن فاژتایپینگ برای هر تیمار قرار گرفت. این روش فاژتایپینگ *ریزوبیوم* ها نیز برای اولین بار توسط نویسندگان این مقاله مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از فاژتایپینگ ۳۰ سویه *ریزوبیوم* با استفاده از ٤ فاژ در جدول ۲ نشان داده شده است. در فاژهای مختلف دامنه میزبانی متفاوتی مشاهده گردید.

تشکیل پلاک و گسترش آن در هر ۲ تکرار ملاک مثبت بودن فاژتایپینگ برای هر تیمار قرار گرفت. تشکیل پلاک در یک تکرار و عدم تشکیل پلاک در تکرار دیگر مشاهده نگردید. میانگین قطر پلاک تشکیل شده توسط باکتریوفاژها روی میزبان هایی که آن ها را لیز نمودند، در جدول ۳ نشان داده شده است. بعد از گذشت ۷۲ ساعت افزایش قطر پلاک نمونه های مثبت مشاهده و ثبت گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال ۱۹۷٦ در تحقیق انجام گرفته توسط Patel، *ریزوبیوم های* کند رشد و *ریزوبیوم های* تند رشد با استفاده از باکتریوفاژهای اختصاصی شناسایی شدند(۱). در سال ۱۹۸۰ در تحقیقات انجام گرفته توسط Staniewski، ۲۲۳ سویه *ریزوبیوم* با استفاده از۲۸ فاژ شناسایی شد، که میزان لیزکنندگی این باکتریوفاژها (حساسیت یا مقاومت باکتری‌های *ریزوبیوم* به باکتریوفاژها) روی۲۲۳ میزبان متفاوت بود(۱۷). در سال۱۹۸٦ در تحقیقات انجام گرفته توسط Bromfield و همکاران، ۱۹۲۰ سویه *ریزوبیوم* با استفاده از ۸۹ فاژ شناسایی شد. همچنین نتایج حاصله نشان داد که میزان لیزکنندگی این باکتریوفاژها متفاوت است(٤). Ali و همکاران درسال۱۹۹۸ نیز نشان دادند که باکتریوفاژهای *ریزوبیوم ژاپونیکوم* به طور غیراختصاصی عمل می‌کنند و میزان لیزکنندگی باکتریوفاژها روی میزبان‌های مختلف، متفاوت است(۲). لذا نتایج محققین نشان داد که باکتریوفاژهای *ریزوبیوم* در اکثر موارد به طور غیراختصاصی عمل می‌کند. در این مطالعه هریک از فاژهای مربوط به *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووارفازئولی(لوبیا)* منطقه جیرگوابر و *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(نخود)* منطقه دانشگاه اصفهان دارای۲ میزبان، وهریک از فاژهای مربوط به *سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله)* دارای ۱۰ میزبان بودند. در نتیجه می توان از فاژهای *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار فازئولی(لوبیا)* وفاژهای *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ (نخود)* برای تشخیص سویه های میزبان در بین سویه‌های مورد مطالعه استفاده کرد.

باکتریوفاژهای *سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله)* غیراختصاصی عمل کردند که نشان‌دهنده اثر تخریب‌کنندگی وسیع این باکتریوفاژها است. لذا احتمال می‌رود باشناخت عوامل بازدارنده‌ی باکتریوفاژهای *ریزوبیوم شنبلیله*، بتوان ازتهاجم این باکتریوفاژها به طور بیولوژیک روی‌میزبان‌های *ریزوبیوم* متفاوت، ممانعت به عمل آورد. میزان لیز کنندگی باکتریوفاژها روی میزبان هایی که آن ها را لیز نمودند، متفاوت بود، به طوری که باکتریوفاژهای *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار فازئولی(لوبیا)* و *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(نخود)* روی میزبانی که روی آن جداشده بودند، میزان لیز بیشتری نسبت به میزبان های دیگرنشان دادند. این حساسیت با مشاهده پلاک بزرگ‌تر روی یک میزبان نسبت به میزبان دیگر وبه دنبال آن افزایش قطرپلاک، دریک زمان مشخص حاصل شد. باکتریوفاژهای *سینوریزوبیوم ملیلوتی (شنبلیله)* منطقه ناژوان، بیشترین قدرت لیزکنندگی را روی میزبانی‌هایی داشتند که از آن‌ها جداشده بودند، وقادربه شناسایی *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(نخود)* نبودند. باکتریوفاژهای *سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله)* منطقه دانشگاه، بیشترین قدرت لیزکنندگی روی میزبانی

جدول ۳- میزان لیز کنندگی (میانگین قطر پلاک ها) باکتریوفاژهای مناطق مختلف بر روی میزبان‌های مناطق مختلف پس از گذشت ۷۲ ساعت.

باکتریوفاژ	میزبان – منطقه	میانگین قطر پلاک (سانتی متر)
P1	*Rlbp(P)* – جیرگوابر	٤/٠
P1	*Rlbv(C)* – دانشگاه اصفهان	۲/۸
P2	*Rlbv(C)* – دانشگاه اصفهان	۲/۲
P2	*Rlbp(P)* – جیرگوابر	۱/۷
P3	*Srm(T)*– ناژوان اصفهان	۳/۷
P3	*Rlbp(P)* – جیرگوابر	۳/٤
P3	*Rlbp(P)* – دانشگاه اصفهان	۳/۱
P3	*Srm(M)* – جیرگوابر	۲/۷
P3	*Rlbv(E)*– ناژوان اصفهان	۲/٥
P3	*Rlbp(P)* – باغچه ای رودسر	۲/۱
P3	*Srm(T)* – دانشگاه اصفهان	۱/۹
P3	*Rlbv(E)* – باغچه ای رودسر	۱/۷
P3	*Srm(T)* – جیرگوابر	۱/٤
P3	*Rlbv(E)* – جیرگوابر	۱/۲
P4	*Srm(T)* – دانشگاه اصفهان	۲/۸
P4	*Rlbp(P)* – جیرگوابر	۲/۳
P4	*Srm(M)* – جیرگوابر	۲/۱
P4	*Srm(M)* – دانشگاه اصفهان	۱/۸
P4	*Rlbp(P)* – حسن سرا	۱/٦
P4	*Srm(T)* – حسن سرا	۱/۳
P4	*Rlbv(E)* – جیرگوابر	۱/۲

ادامه جدول ۳

باکتریوفاژ	میزبان – منطقه	میانگین قطر پلاک (سانتی متر)
P4	*Rlbv(C)* – دانشگاه اصفهان	۱/۰
P4	*Srm(T)* – جیرگوابر	۰/۸
P4	*Rlbp(P)* – باغچه ای رودسر	۰/۷

P1: فاژ *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار فازئولی(لوبیا)* منطقه جیرگوابر.

P2: فاژ *ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(نخود)* منطقه دانشگاه.

P3: فاژ *سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله)* منطقه ناژوان.

P4: فاژ *سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله)* منطقه دانشگاه.

Srm(M) : سینوریزوبیوم ملیلوتی(یونجه).

Rlbp(P) : ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار فازئولی(لوبیا).

Srm(T) : سینوریزوبیوم ملیلوتی(شنبلیله).

Rlbv(C) : ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(نخود).

Rlbv(E) : ریزوبیوم لگومینوساروم بیووار ویسه آ(عدس).

داشتند که ازآن جدا شده بودند و توانستند انواع *ریزوبیوم* ۵ لگوم همزیست را شناسایی کنند. این حساسیت یا مقاومت باکتری‌های *ریزوبیوم* می تواند ناشی از عدم وجود گیرنده اختصاصی(۱)، حالت لیزوژنی(۲) یا وجود پلاسمید sym(۱۰) در سویه‌های مقاوم به فاژ باشد.

منابع

1. H. S. Ackermann, Bacteriophages. In: Encyclopedia of Microbiology. (eds. Lederberg, J.), Academic Press, New York. 398-410. (1999).
2. F., Ali, T. Loynachan, A. Hammad, and Y. Aharchi. Polyvirulent rhizobiophage from a soybean rhizosphere. Soil Biol. Chem. 30(14), 2171-2175. (1998).
3. Y. Barent, Properties of *Rhizobium trifolii* isolates surviving exposure to specific bacteriophage. Can. J. Microbiol. 25(9), 979-986. (1979).
4. E., Bromfield, I. Sinah, and M. Wolynetz. Influence of location, host cultivar and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. Appl. Environ. Microbiol. 51(5), 1077-1084. (1986).

5. A., Chakrabarti, A. Ghosh, G. Balakrish Nair, and S. M. Lesley. A bacteriophage typing system for *Rhizobium meliloti*. Soil Sci. 28, 180-189. (1982).

6. J., Evans, Y. Barnet, and J. Vincet. Effect of a bacteriophage on the colonization and nodulation of clover roots by a strain of *Rhizobium trifolii*. Acta Microbiol. Pola A. 7(4), 181-188. (1975).

7. A., Gibson, R. Date, and J. Brockwell. A comparsion of competitiveness and persistence amongest five strains of *Rhizobium trifolii*. Soil Biol. Biochem. 8, 395-409. (1976).

8. D.C. Jordan Family III. Rhizobiaceae In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1(eds. Krieg NR, Holt JC), The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 234-242. (1984).

9. S., Kariuki, J. Gilks, J. Muyodi, P. Waiyaki, and C. Hart. Analysis of *Samonella enterica* serotype *typhimurium* by phage typing, antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophorsis. J. Med. Microbiol. 48, 1037-1042. (1999).

10. D., Mendum, I. Clark, and D. Hirsch. Characterization from a field release site of genetically modified *Rhizobia*. Anton. Van Leeuwn. 76, 189-197. (2001).

11. J. Patel, Morphology and host range of virulent phages of lotus rhizobia. Can. J. Microbil. 22(2), 204-212. (1976).

12. M., Sadowsky, B. Bohlool, and H. Keyser. Serological relatedness of *Rhizobium fredii* to other *Rhizobia* and to the *Bradyrhizobia*. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1785-1789. (1987).

13. A., Sessitsch, G. Hardarson, A. Akkermans, and W. De vos. Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodules *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. Mol. Eco. 6, 601-608. (1997).

14. G., Stacey, L. Pocratsky, and V. Puvanesarajah. Bacteriophage that can distinguish between wild-type *Rhizobium japonicum* and non-nodulating mutant. Appl. Environ. Microbiol. 48(1), 68-72. (1984).

15. R. Staniewski, Relationship among different *Rhizobia* determined by phage lysis. Acta Microbiol. Pol. 2, 3-11. (1970).

16. R. Staniewski, Typing of *Rhizobium* by phages. Can. J. Microbiol. 16, 1003-1009. (1970).

17. R. Staniewski, Typing of *Rhizobium* with two different phage dilutions. Acta Microbiol Pol. 29(4), 331-41. (1980).

18. Unknown, http://cmgm.stanford.edu/~mbarnett/rhiz.htm.

19. A. S. Uterkamp, Nitrogen cycling and human intervention. In: Nitrogen Fixation Achivements and Objectives. (eds. Gresshoff, P., Roth, L., Stacey, G. and Newton, W.), Chapmann and Hall. 180-224. (1990).

20. A. Turska-Szewczuk, and R. Russa. A new *Mesorhizobium loti* HAMBI 1129 phages isolated from polish soil. Curren. Microbiol. 40, 341-343. (2000).

21. S., Wdowiak, W. Malek, and M. Grazadka. Morphology and general characteristics of phages specific for *Astragalus cicer Rhizobia*. Curren. Microbiol. 40, 110-113. (2000).

22. M., Werquin, H. Ackermann, and R. Levesque. A study of 33 bacteriophages of *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 188-196. (1998).

23. K., Williamson, K. Wommack, and M. Radosevich. Sampling natural vital communities from soil for culture-independent analysis. Appl. Environ. Microbiol. 69(11), 6628-6633. (2003).

24. K., Wommack, R. Hill, T. Muller, and R. Colwell. Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. Appl. Environ. Microbiol. 62(4), 1336-1341. (1996).

25. H. Zahran, *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol. Mol. Rev. 63(4), 968-989. (1999).