جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

عزلُ وتشخيصُ أنواع مِن بكتريا الرايزوبيوم من نباتات محليَّةٍ مختلفة ودراسةُ فعاليَّتها المُضَادَةِ لعدد من المايكروباتِ

عمر حماد جمعة

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإشراف

الأُستاذ المساعد
الدكتور رعد حساني سلطان علاوي

الأُستاذ المساعد
الدكتور مهدي صالح عبد الرحمن

1443 هـ

2022 م

الخلاصة:

أُجري في هذه الدراسة عزل وتنقية 42 عزلة من بكتريا الرايزوبيوم من العقد الجذرية لنباتات مثبتة للنايتروجين مختلفة والَّتي جُمعت من مناطق زراعيَّة وبيئية مختلفة من محافظات نينوى والأَنبار وبغداد ودهوك/العراق، وكانت عزلات الرايزوبيوم OJ27 وOJ29 الَّتي عُزلت في هذه الدراسة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. لم يتم تثبيت جنسها ونوعها في المصادر لحد الآن. ولأَوَّل مرة في العالم تم تسجيل عزل بكتريا الرايزوبيوم OJ30 من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا *Catalpa speciose* L. وإذ لم يتم تسجيل مثل هذه العلاقة التعايشية في العالم (على حد علمنا) كما ولم يؤشر هذا مسبقًا في المراجع العلميَّة، وأَظهرت الاختبارات البايوكيميائية قابلية جميع عزلات الرايزوبيا قيد الدراسة على النمو على وسط الرايزوبيا الأدنى Rhizobial Minimal Medium. كما أَظهرت النتائج قدرة جميع عزلات الرايزوبيوم على استغلال السترات كمصدر وحيد للكاربون، ماعدا العزلات *R. grahamii* OJ26, OJ35 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الليوسينيا *Leucaena leucocephala* L. والعزلة OJ29 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل *Bauhinia purpurea* L. وتباينت قابلية العزلات على تمييع الجلاتين، كما أَظهرت أَغلب عزلات الرايزوبيا قيد الدراسة نتيجة موجبة لاختبار ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron ، أَظهرت جميع عزلات الرايزوبيوم المدروسة نتيجة موجبة لاختبار الكاتاليز والأوكسيديز، أظهرت نتائج أختبار استغلال سكريات مختلفة أَنَّ عزلات الرايزوبيا لها القابلية على استغلال الكلوكوز والكالاكتوز والارابينوز والفركتوز والمالتوز والزايلوز واللاكتوز وبدرجات متباينة، في حين أَفضل مصدر كاربوني للنمو كان سكر الكحول المانيتول، وإنَّ جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة أَظهرت قابليتها على تحمل تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl ولحد تركيز 6.0% ما عدا العزلة *Mesorhizobium loti* OJ33 إذ كانت حساسة لملح كلوريد الصوديوم عند هذا التركيز، فيما تباينت الحساسية والمقاومة للمضادات الحياتية المدروسة، إذ أَظهرت جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة الحساسية تجاه المضاد الحيوي Ciprofloxacin بتركيز 10 مايكروغرام/مل. كذلك تباينت مقاومة عزلات الرايزوبيا المدروسة للمعادن الثقيلة المختلفة؛ إذ أَظهرت معظم العزلات تحملاً واضحًا لملح المعدن الثقيل خلات الرصاص الثنائي $Pb(CH_3COO)_2$ وبتركيز 100 مايكروغرام/مل، وأَظهرت جميع عزلات الرايزوبيا نتيجة موجبة لإنتاج جزيئات سطح الخلية وأَفضل إنتاج للسكر المتعدد الخارجي كان بمعدل 280 ملغم/مل من العزلة *R. leguminosarum* bv. *viciae* OJ4. وأَظهرت نتيجة دراسة الفعاليَّة المضادة المايكروبية للراشح الزرعي الخام لعزلات الرايزوبيا فعاليَّة لأَغلب العزلات المرضية المدروسة؛ إذ بلغ أَعلى

معدل قطر تثبيط 15.3 ملم عند تطبيق راشح مزرعة التخمير لبكتريا *R. grahamii* العزلة OJ31 تجاه العزلة المرضية *Klebsiella pneumoniae* AS63 في حين أَعلى معدل قطر تثبيط بلغ 16.6 ملم عند تطبيق راشح مزرعة التخمير للعزلة OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا *Parkinsonia aculeata* L. تجاه العزلة المرضية لداء المبيضات *Candida albicans* AS43 وأعلى معدل قطر تثبيط بلغ 13.3 ملم عند تطبيق راشح مزرعة التخمير للعزلة *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* OJ6 تجاه العزلة الممرضة للنبات *Aspergillus niger* BI1، وأَظهرت نتائج تطابق تسلسل القواعد النايتروجينية للجين 16S rRNA لأربع عزلات رايزوبية منتخبة، وهي العزلة الأولى OJ27 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات خف الجمل والعزلة الثانية OJ30 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الكاتالبا والعزلة الثالثة OJ31 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الباركنسونيا والعزلة الرابعة OJ32 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الالبيزيا، ان نسبة التطابق للعزلات كانت للعزلة الأولى OJ27 98.55% مع العزلة القياسية *Rhizobium nepotum* 39/7 NR 117203.1، أَمَّا العزلة الثانية OJ30 فقد تطابقت بنسبة 98.12% مع العزلة القياسية *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370 NR_118339.1، وفيما يخص العزلة الثالثة فقد تطابقت وبنسبة 98.42% مع العزلة القياسية *Rhizobium glycinendophyticum* NR_165782.1. أَمَّا العزلة الرابعة فقد تطابقت وبنسبة 97.89% مع العزلة القياسيَّة *Rhizobium leguminosarum* strain LMG 14904.

Abstract

In this study, a 42 different rhizobial isolates were obtained and purified from a nitrogen fixing plants. The isolates were collected from root nodules of different rural areas in Nineveh, Al- Anbar, Baghdad Governorates, and Duhok-Kurdistsn/Iraq. Rhizobial isolates OJ27, OJ29 are first isolated from *Bauhinia purpuria* L., Where are still unkown and were not mentioned in the literatures up to date. For a first time in the world (up to our knowledge), New isolates OJ30 were isolated from *Catalpa speciose* L. Biochemical tests revealed that all isolates are able to grow on Rhizobial Minimal Medium, whereas isolates were variant in their ability to liquefy gelatin. All the isolates were able to utilize citrate as a sole carbon source, except of *R. grahamii* OJ26, OJ35 which were isolated from *Leucaena leucocephala* L. and *Bauhinia purpuria* L., respectively. Most of the isolates showed a positive result to Triple Sugar Iron test. Sugar alcohol mannitol were preferred by all the rhizobial isolates as a sole carbon source. Most of the isolates tolerated to NaCl up to 6.0% concentration, except the isolate *Mesorhizobium loti* OJ33 which was sensitive to this concentration. There were variations in sensitivity and resistance to antibiotics, All the isolates showed sensitivity to Ciprofloxacin 10 µg/ml. There was variation in resistance against heavy metals. Most of the isolates showed a clear resistance to Pb $(CH_3COO)_2$ (100 µg/ml). All the isolates showed a positive result for production of cell surface molecules and the maximum EPS production average were 280 mg/ml by the isolate *R. leguminosarum* bv. *viciae* OJ4. Antimicrobial activity study revealed that a maximum mean inhibition zone was 16.6 mm when a culture supernatant of OJ31 rhizobial isolated from root nodules of *Parkinsonia aculata* L. against *Candida albicans* AS43. A maximum mean inhibition zone value was 13.3 mm when a culture supernatant of OJ6 applied against a pathogenic fungi *Aspergillus niger* BI1. Sequence aligment of 16 S rRNA sequencing

University of Mosul
College of Education
For Pure Science

Isolation and Characterization of Rhizobial Bacterial species from Different Local Plants and Study Their Antimicrobial Activity Against Some of Microbes

Omar Hammad Jumaah

M. Sc. Thesis
Biology

Supervised By

Assist. Prof.
Dr. Raad Hassani Sultan Allawy

Assist. Prof.
Dr. Mahde Saleh Assafi

2022 A.D. 1443 A.H.