



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

**دراسة تأثير منقوع التمر وتحييد محتوى DNA البلازميدي
بالحرارة على انتاج متعدد السكريات الخارجي
Exopolysaccharides في بكتيريا *Sinorhizobium meliloti*،
Pseudomonas aeruginosa و *Agrobacterium rhizogenes***

رسالة تقدمت بها

نجة أمين سعيد الجرجري

إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في

علوم الحياة/ علم النبات

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتورة نجوى ابراهيم خليل البرهاوي

2014 م

1435 هـ

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية ثلاثة محاور أساسية، المحور الأول اختص بعزل وتشخيص، البكتيريا التعايشية *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية المتكونة على نباتات الحلبة *Trigonella foenumgraecum* L. والبكتيريا الممرضة للإنسان *Pseudomonas aeruginosa* من الترب الحقلية، وتم تشخيصهما اعتماداً على الصفات المظهرية لشكل خلاياها العصوية السالبة لصبغة كرام باستخدام المجهر الضوئي عند القوة X100، والصفات الزرعية لمستعمراتها النامية على سطح الأوساط الغذائية الصلبة، بالإضافة إلى تمكّن البكتيريا الأولى من إصابة بادرات نباتات الحلبة مختبرياً بدلالة تكوينها للعقد الجذرية عليها وزيادة محتواها البروتيني قياساً بالبادرات غير المصابة، واعتماداً على إنتاج البكتيريا الثانية لصبغة البايوسيانين Pyocyanin الخضراء المزرقّة، إلى جانب نتائج الإختبارات الواردة في شريط API 20E. كما تم استخدام البكتيريا الممرضة للنبات *Agrobacterium rhizogenes* السلالة R1601 المهندسة وراثياً بمقاومتها للمضاديين الحيويين الكاناميسين Kanamycin (Kan^{Res+}) والكاربنسلين Carbenicillin (Car^{Res+})، في إصابة بادرات نباتات الحلبة بمرض الجذور الشعرية Hairy Roots Disease في منطقة السيقان تحت الفلقية والأوراق الفلقية وبنسبة 50 و30% على التعاقب.

المحور الثاني، تمّ فيه دراسة قابلية الأجناس البكتيرية الثلاثة المذكورة في أعلاه، على إنتاجها من متعدد السكريات الخارجي (EPS) Exopolysaccharides، وذلك من خلال ملاحظة، القوام المخاطي لمستعمراتها والتقاطها للون صبغة الكونغو ريد Congo Red الأحمر المضافة لأوساط النمو الغذائية الصلبة، وتلون الراشح البكتيري في الأوساط الغذائية السائلة بلون هذه الصبغة أيضاً. كما تمّ الكشف عن تأثير نوع المصدر الكربوني في إنتاج هذه المركبات من قبل البكتيريا قيد الدراسة، وكان سكر الكلوكوز الموجود كأحد مكونات وسط المرق المغذي والمستخدم لتنمية بكتيريا *P.aeruginosa* أكثر كفاءة من سكر المانيتول الموجود ضمن مكونات وسطي الـ YEM السائل المستخدم في تنمية *S.meliloti* والـ APM المستخدم لتنمية *A.rhizogenes* في تحفيزه على إنتاج هذه المركبات بعد 24 ساعة من التحضين، حيث بدأ بالتجمع بعد 72 ساعة وبقيت كمياتها ثابتة لغاية 96 ساعة من التحضين والتي تمثل نهاية الطور الثابت. وأدى استبدال هذه السكريات بمنقوع التمر الذي بلغ محتواه الكلي من الكربوهيدرات 28غم/لتر، والمتمثلة بسكري الكلوكوز والسكرورز بدلالة نتائج الكشوفات اللونية باستخدامه كمصدر طبيعي ووحيد للكربون في هذه الأوساط الغذائية، إلى زيادة واضحة في كل من الكتلة الحيوية وإنتاجها من متعدد السكريات الخارجي وارتفاع محتواها الكلي من الكربوهيدرات. ولم يكن لهذا المركب أو لنوع الوسط الغذائي أي تأثير يذكر على فعالية المضادات الحيوية الخمسة

(Amikacin, Carbenicillin, Cefotaxime, Chloramphenicol, Kanamycin)، تجاه نمو هذه البكتيريا ، وذلك لتساوي تأثير المقاومة والحساسية في حالتها العالقة والراسب البكتيري .وعند تحليل هذه المركبات وترحيلها على ورق كروماتوغرافيا الورق النازل مع استخدام السكريات القياسية كعينات مقارنة ، تبين أنها مكونة وبشكل عام من سكر الكلوكوز فضلا عن سكر الكالاكتوز والأرابينوز والفركتوز في مركبات متعدد السكريات الخارجي المنتج من قبل *S.meliloti* و *A.rhizogenes* و *P.aeruginosa* على التعاقب. كما تم التأكد من كون المركبات المستخلصة ذات طبيعة كاربوهيدراتية، وذلك بدلالة امتصاصية المادة الفعالة فيها والمتمثلة بمجموعة

الهيدروكسيل (OH-) Hydroxyl والكاربونيل Carbonyl (C=O) ، عند الأطوال الموجية التي تراوحت بين 1631-1640 و 3258-3305 سم⁻¹ على التعاقب.

أما المحور الثالث، فقد تناول دراسة مدى تأثير التحييد بالحرارة عند درجة 44 م على محتوى DNA البلازميدي في الأجناس البكتيرية الثلاثة وعلى بعض الصفات المظهرية الخاصة بكل منها، وتبين أن هذا المحيد الفيزيائي كان له تأثيراً كبيراً 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)،


وذلك لأن هذه البكتيريا مهندسة وراثياً لصفتي المقاومة للمضادين الحيويين الكاناميسين (Kan^{Res+}) والكاربنسلين (Car^{Res+}) فقط، ولوقوع جيناتها المشفرة لهذه الصفة على الـ DNA الخارج كروموسومي والمتمثل بالبلازميد (Root induced Plasmid) (Ri-Plasmid)، كما كان له تأثيراً على فقدان بكتيريا *S.meliloti* فقط لصفة إنتاجها من متعدد السكريات الخارجي دون الجنسين الآخرين، فضلاً عن تأثيرها على فقدان كل من بكتيريا *S.meliloti* و *A.rhizogenes* لقابليتهما على تكوين العقد الجذرية والجذور الشعرية على نباتات الحلبة *L. foenumgraecum* قياساً بعينات المقارنة قبل التحييد. بالإضافة إلى فقدان بكتيريا *P.aeruginosa* قابليتها على إنتاج صبغة البايوسيانين الخضراء المزرقمة واختلاف نتائج الفحوصات الواردة في شريط الـ API 20E قياساً بنتائجه قبل التحييد. ودعمت هذه النتائج بالترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز للحامض النووي البلازميدي، والذي أكد أن الحرارة العالية لها القابلية على تحييد بلازميدات الأجناس البكتيرية قيد الدراسة، بدلالة عدم ظهور حزم الحامض النووي البلازميدي مقارنة بظهورها في العينات قبل التحييد.

ABSTRACT

The current study has included three basic axes, the first is specialized in 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. Its recognition depends on the apparent specifications for their negative rod cells of gram stain, using light microscope at 100X power and the culture of its growing colonies on the surface of the solid mediums, as well as to the ability of the first bacteria to infect the seedling of *Trigonella foenumgraecum* L. in the laboratory denoted by its forming the rooted nodules and the increasing of its protein content comparing with seedlings which is not infected and depending on the production of the second bacteria "Pyocanin", the blue- green pigment, 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+}), in infecting the seedlings of *Trigonella foenumgraecum* L. by Hairy roots disease at the stems area sub cotyledon and the cotyledon leaves at average 50%, 30% successively.

The second axis, studies the ability of the three bacterial mentioned above, for its production to the Exopolysaccharides (EPS), by noticing the textures mucous of its colonies and its picking up the red color to Congo Red pigment which is added to the solid mediums and colored the bacterial filtered in the liquid mediums with the color of this pigment also. It also disclosed the effect of the carbonic source in producing these compounds by the bacteria under the study and glucose which exists as one of originated element of the Nutrient broth which is used to growth

P.aeruginosa was more qualified from Mannitol sugar existed among originated elements of YEM medium, the liquid which is used to growth *S.meliloti*, and the APM used to growth *A.rhizogenes* in stimulating the production of these compounds after 24 hours from incubating, whereas it started assembly after 72 hours and its quantities still stable until 96 hours from nurturing which represents the end of the stable phase. The replacement of these sugars with date's extract which its total content from carbohydrates reached 28gm/L is represented by glucose and sugars by the denotation of the colored statements through using it as natural and sole source for the carbon in these mediums, led to an obvious increase in the biomass and its production of the exopolysaccharides and the rise of its total content of carbohydrates. There isn't any mentioned effect on the activity of the five antibiotics (Amikacin, Carbenicillin, Cefotaxime, Chloramphenicol, Kanamycin), toward the growing of this bacteria, due to the equality of resistance and sensitivity in leach and the bacterial precipitate cases. When these compounds are analyzed and put on, Descending paper chromatography by using the standard sugars as a compared samples, show that it consists generally of Glucose besides Galactos, Arabinose and Fructose, in the external polysaccharides produced by *S.meliloti*, *A.rhizogenes*, *P.aeruginosa*, successively. It is makes sure that the extracted compounds have carbohydrate nature by the indication of the absorption of the active material in it, represented by the

Hydroxyl (OH-) and the Carbonyl , at the wavy longitudes range from 1640-1631 and 3305-3258 Cm^{-1} , respectively.

The third axis deals with the effect extent of curring by heat at 44⁰c 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), due to that those bacteria are genetically engineered for the resistance features of the two antibiotics (Kan^{es+}) and (Car^{res+}) only, as well as, to their coding genes which have this feature on the extra chromosomal DNA represented by root induced plasmid (Ri-Plasmid), also it had effect on the losing of *S.meliloti* bacteria for its feature of production from the Exopolysaccharides without the other genders, beside its effect on the losing of *A.rhizogenes* and *S.meliloti* for their capability to form the rooted nodules and the hairy root on *Trigonella foenumgraecum* L. comparing with the comparison samples before curing. Besides the losing of *P.aeruginosa* for its ability to produce the blue- green pigment and the difference of the appeared tests results on bar API 20E comparing with its results before curing, and supported these finding, with agarose gel electrophoresis to the DNA plasmid which confirmed that the high temperature have the ability to cure bacterial plasmid under study, in terms of that DNA plasmid bands dos not appear compered to it is appearance in the sample before curing.

University of Mosul
College of Education
For Pure Science



**Study the Effect of Date's Extract and Heat
Curring of Plasmid DNA on Production of
Exopolysaccharides in *Sinorhizobium meliloti*,
Agrobacterium rhizogenes and
*Pseudomonas aeruginosa***

A Thesis Submitted

By

Najat Ameen Saeed Al-Jarjary

To

**The Council of College of Education for Pure
Science University of Mosul In Partial
Fulfillment of Requirement
For the Degree of M.Sc.**

In

Biology / Botany

Supervised By

Assistant Professor

Dr.Najwa Ibraheem Khaleel Al-Barhawi

2014 A.D.

1435 A.H.