جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

العزل والتشخيص الجزيئي لعدد من أجناس جرثومة الرايزوبيا ودراسة فعاليتها المايكروبية المضادة تجاه عدد من أنواع الجراثيم المرضية

أحمد علي محمد سليمان

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإشراف

الأُستاذ المساعد

الدكتور رعد حساني سلطان علاوي

1443 هـ

2021 م

الخلاصة:

أظهرت نتيجة تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص (PCR) لمورثات 16S rRNA لعزلات الرايزوبيا المحلية AS32, AS26, AS11, AS10, AS35 تشابهاً كبيراً مع كل التسلسلات القياسية والمسجلة في بنك الجينات Bacterium clone Andaman6، *Rhizobium sophora* strain IST6، *Rhizobium* sp. Clone KH2334، *Rhizobium leguminosarum* Ls و *Rhizobium laguerraea* strain MLS17.

في هذه الدراسة عُزلت 36 عزلة من جرثومة الرايزوبيوم من العقد الجذرية لنباتات بقولية مختلفة جُمعت من مناطق مختلفة من محافظة نينوى/العراق. والعزلات التي عُزلت من العقد الجذرية لنباتات الجت *Ensifer meliloti* هي: AS1 , AS2 , AS3 , AS5 , AS6 , AS24 , AS33 وAS34، في حين عزلت من الجرثومة الرايزوبيا *Ensifer fredii* biovar *fredii* العزلات AS4, AS7 , AS8 , AS9 والتي عزلت من العقد الجذرية لنبات اللوبيا. وتم الحصول على عزلة واحدة وهي AS10 *Mesorhizobium loti* من العقد الجذرية لنبات الحمص. كذلك حصلنا على عزلة واحدة وهي *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* AS11 من العقد الجذرية لنبات العدس. حصلنا على 10 عزلات رايزوبية من العقد الجذرية لنبات الفاصوليا *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* والعزلات هي AS12, AS13, AS14, AS15, AS16, AS17, AS18, AS19, AS20, AS21. كما عُزلت 12 عزلة من جرثومة الرايزوبيا *R. leguminosarum* bv. *viciae* من العقد الجذرية لنبات الباقلاء والعزلات هي AS22, AS23, AS25, AS26, AS27, AS28, AS29, AS30, AS31, AS32, AS35, AS36.

جُمعت 41 عينة مرضية من الإدرار والخروج والتهابات الجروح والتجويف الفمي لغرض العزل الجرثومي حيث تم عزل منها 29 عزلة مرضية، طبقاً للصفات الزرعية والكيموحيوية التشخيصية وتبيّن أَنَّ الأنواع البكتيرية كانت كما يأتي: *Escherichia coli* 11 عزلة، *Proteus mirabilis* 4 عزلات، *Proteus vulgaris* 3 عزلات، *Staphylococcus aureus* 5 عزلات، *Pseudomonas aeruginosa* 3 عزلات، *Klebsiella pneumonia* عزلتين كما تم الحصول على عزلة واحدة من خميرة *Candida albicans*. ولقد تم انتخاب سبعة عزلات مرضية وكما يأتي لأجراء التجارب اللاحقة: AS37, AS38, AS39, AS51, AS60, AS63, AS65 على التوالي. وأَظهرت نتيجة دراسة النمو على الوسط الرايزوبي الأَدنى أَنَّ جميع عزلات الرايزوبيا المحلية المعزولة لها القدرة على النمو على هذا

الوسط. وأبدت عزلات الرايزوبيا تبايناً في المقاومة والحساسية تجاه المضاد الحيوي Erythromycin بتركيز 10 مايكروغرام/مل والمضاد الحيوي Vancomycin بتركيز 30 مايكروغرام/مل. وكانت جميعها حساسة تجاه Azithromycin بتركيز 15 مايكروغرام/مل و Gentamycin بتركيز 10 مايكروغرام/مل عدا جرثومة *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* العزلتين AS12 و AS14، حيث كانتا مقاومتين لهذين المضادين. وكانت أغلبها حساسة تجاه المضادين Amikacin بتركيز 10 مايكروغرام/مل و Streptomycin بتركيز 25 مايكروغرام/مل.

أظهرت نتيجة دراسة استغلال سكريات مختلفة أنَّ عزلات الرايزوبيا المحلية لها القابلية على استغلال الكلوكوز والكالاكتوز والارابينوز والفركتوز والمالتوز والزايلوز واللاكتوز بدرجات متباينة، في حين أفضل مصدر كاربوني للنمو كان المانيتول. لوحظ ان جميع العزلات عدا العزلة AS11 *R. leguminosarum* bv. *viciae* كانت مقاومة لملح كلوريد الصوديوم، إذ كانت غير مقاومة لأي تركيز مدروس. التراكيز التي كانت أكثر من 5.0% أدى إلى تثبيط نمو الجراثيم بشكل عام. جميع الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات الرايزوبيا كانت موجبة عدا الجرثومة *Ensifer meliloti* العزلات AS2 و AS3 والجرثومة *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة AS4 والجرثومة *Mesorhizobium loti* العزلة AS10 والجرثومة *R. leguminosarum* bv. *viciae* العزلة AS11 كانت سالبة لاختبار تميع الجلاتين. أظهرت نتيجة الفعالية المضادة للمايكروبات لراشح الزرعي الخام لعزلات الرايزوبيا فعالية لأغلب العزلات المرضية المدروسة، إذ بلغ أقصى معدل قطر تثبيط 17 ملم لجرثومة *R. leguminosarum* bv. *viciae* AS36 تجاه العزلة المرضية *Proteus vulgaris* AS39 و 22 ملم تجاه عزلة داء المبيضات *Candida albilcans* AS43. وأظهرت نتيجة دراسة تحمل أملاح المعادن الثقيلة تحمّل أغلب عزلات الرايزوبيا لأملاح المعادن الثقيلة المدروسة عدا *Ensifer meliloti* العزلة AS1 و *Ensifer fredii bv. fredii* العزلة AS4 و *Mesorhizobium loti* AS10 و *R. leguminosarum* bv. *viciae* AS11، إذ كانت حساسة تجاه ملح كلوريد الزئبق بتركيز 100 مايكروغرام/مل. كذلك أظهرت العزلتان *Ensifer meliloti* AS34 و AS36 *R. leguminosarum* bv. *viciae* الحساسية تجاه كبريتات الخارصين بالتركيز 100 مايكروغرام/مل. عشرة عزلات من الرايزوبيا المعزولة كانت ذات إنتاج غزير من السكر المتعدد الخارجي (EPS)، إذ بلغ أقصى إنتاج 494 ملغم/لتر للعزلة *R. leguminosarum* bv. *viciae* AS35. اظهر الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي لأفضل عزلات الرايزوبيا أنتاجاً للسكر المتعدد اظهر وجود حزم على مسافات متقاربة كبيرة الحجم.

Abstract

Results of specific PCR experiment of local rhizobial isolates AS10, AS11, AS26, AS32 and AS35 revealed high combability with standard strains which recorded in gene bank as follow: Bacterium clone Andaman6, *Rhizobium sophora* strain IST6, *Rhizobium* sp. clone KH2334, *Rhizobium leguminosarum* Ls and *Rhizobium laguerraea* strain MLS17.

In this study, 36 rhizobial isolates were isolated from root nodules of different leguminous plants collected from different areas of Nineveh Governorate/Iraq. Strains isolated from alfalfa plants were as follows: *Ensifer meliloti* AS1, AS2, AS3, AS5, AS6, AS24, AS33 and AS34, whereas, *Ensifer fredii* biovar *fredii* AS4, AS7, AS8 and AS9 were isolated from root nodules of cowpea. One isolate *Mesorhizobium loti* AS10 were isolated from the root nodule of chickpea. Also, one isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* AS11 were isolated from the root nodules of lentils. Ten isolates were obtained from root nodules of the green bean as follows: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* AS12, AS13, AS14, AS15, AS16, AS17, AS18, AS19, AS20 and AS21. Twelve rhizobial isolates were isolated from root nodules of broad as follows: *R. leguminosarum* bv. *viciae* AS22, AS23, AS25, AS26, AS27, AS28, AS29, AS30, AS31, AS32, AS35 and AS36. 41 pathogenic specimens were collected from urine, stool, infection wounds and oral cavity which isolated from them 29 pathogenic isolates. According to cultural and biochemical characterization, pathogenic bacterial species were detected as: *Escherichia coli* (11) isolates, *Proteus mirabilis* (4) isolates, *Proteus vulgaris* (3) isolates, *Staphylococcus aureus* (5) isolates, *Pseudomonas aeruginosa* (3) isolates, *Klebsiella pneumonia* (2) isolates and *Candida albicans* (1) isolate, seven pathogenic isolates were selected for farther experiments, as follows: AS37, AS39, AS51, AS38, AS60, AS63 and

AS65 respectively. Results the growth study of rhizobial isolates on RMM revealed that all the isolates could grow on the mentioned medium. A local rhizobial isolated revealed variation in resistance and sensitivity against Erythromycin 10 µg/ml and Vancomycin 30 µg/ml. All the isolates were sensitive to Azithromycin 15 µg/ml and Gentamycin 10 µg/ml with the exception of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* AS12 and AS14, were resistant to this antibiotic. Most of the isolates were sensitive against Amikacin 10 µg/ml and Streptomycin 25 µg/ml. Utilization of different sugars study revealed the ability of locally isolated strains to utilize glucose, galactose, arabinose, fructose, maltose, xylose and lactose with different degrees. Whereas, the best carbon source was mannitol. Tolerance to sodium chloride was noticed with 5.0% concentration for all rhizobial strains with the exception to *R. leguminosarum* bv. *viciae* AS11, which were sensitive to any studied concentration. Concentrations of more than 5.0% led to inhibition growth of rhizobia generally. All biochemical characterization tests for rhizobial strains were positive with exception to *Ensifer meloloti* strains AS1, AS2, *Ensifer fredii* bv. *fredii* strain AS4, *Mizorhizobium loti* strain AS10 and *R. leguminoasrum* bv. *viciae* AS11 which were negative for gelatin liquefaction test. Antimicrobial activity test revealed that a crud filtrate of rhizobial cultures has activity against most of studied pathogenic isolates which a maximum average of inhibition zone reached to 17 mm of *R. leguminosarum* bv. *viciae* AS36 against pathogenic bacteria *P. vulgaris*, and 22 mm against *Candida albicans* AS43. A result of study of heavy metal salts tolerance revealed that most of rhizobial isolates were tolerant to heavy metal salts with the exception to *Ensifer meliloti* strain AS1, *Ensifer fredii* bv. *fredii* strain AS4, *Mesorhizobium loti* AS10 and *R. leguminosarum* bv. *viciae* AS11 which were sensitive against mercury chloride 100 µg/ml. Also, *Ensifer meliloti* AS34 and *R. leguminosarum*

bv. *viciae* AS36 showed sensitivity against zinc sulfate 100 µg/ml. Ten isolates of local rhizobial isolates were produced excessive exopolysaccharide which production reached maximum of 494 mg/li by the isolate *R. leguminosarum* bv. *viciae* AS35. Gel electrophoresis of plasmid DNA content of the best rhizobial EPS produces revealed the presence of large equal plasmids.

University of Mosul
College of Education
For Pure Science

Isolation and Molecular Identification of Number of Rhizobial Genera and Study their Antimicrobial Activity Against A number of Pathogenic Microbes

Ahmed Ali Mohammed Suliman

M. Sc. Thesis
Biology

Supervised By
Assist Prof.
Dr. Raad Hassani Sultan Allawy

2021 A.D. 1443 A.H.