جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

عزل وتشخيص بايوكيميائي وجزيئي لعزلات من الرايزوبيا المحلية وتقييم فعالية المستخلص الخام المضادة للاحياء المجهرية

محمد حامد جاسم الجبوري

رسالة ماجستير

علوم حياة

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور رعد حساني سلطان علاوي

1445 هـ

2023 م

الخلاصة:

شمُلت هذه الدراسة عزل 25 عزلة من بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لنباتات بقولية مختلفة مثبتة للنايتروجين والتي جُمعت من مناطق زراعيَّة وبيئية مختلفة من محافظة نينوى–العراق. أظهرت نتائج الإختبارات البايوكيميائية ان جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة لها قابلية على النمو على وسط الرايزوبيا الأدنى. كما وأظهرت النتائج قدرة جميع عزلات الرايزوبيا على استغلال السترات كمصدر وحيد للكاربون ماعدا بكتريا *R. leguminosarum* bv. *trifolii* العزلة MH3 المعزولة من العقد الجذرية لنبات البرسيم *Trifolium alexandrinum* L. وبكتريا *Ensifer meliloti* العزلتين MH5 و MH6والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. كما وتباينت العزلات في قدرتها على تمييع الجيلاتين. وأظهرت جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة نتيجة موجبة لإختبار ثلاثي السكر والحديد TSI، في حين تباينت العزلات في انتاجها لغاز كبريتد الهيدروجين H_2S. أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات الرايزوبيا المدروسة موجبة لإختبار اليوريز والبروموثيمول الازرق والاندول و الكاتاليز و الاوكسيديز وسالبة لإختبار المثيل الاحمر وفوكس– بروسكاور، في حين أظهرت النتائج ان عزلات بكتريا الرايزوبيا تبايناً في قابليتها على استغلال السكريات المختلفة المدروسة منها المانوز والسكروز والارابينوز والفركتوز والمالتوز والكلوكوز والسوربيتول والزايلوز واللاكتوز والمانيتول بدرجات متباينة. وان أفضل مصدر كاربوني للنمو كان سكر الكحولي المانيتول. ان أغلب عزلات الرايزوبيا المدروسة أظهرت قابليتها على تحمل تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl ولحد تركيز 8.0%، ماعدا بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلتين MH1 و MH13 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات اللوبيا *Vigna unguiculata* L. وبكتريا *Ensifer meliloti* العزلات MH8 و MH10 و MH20 المعزولة من العقد الجذرية لنبات الجت *Medicago sativa* L. وبكتريا *Rhizobium* sp. العزلة MH23 المعزولة من نبات القطب الشائك *Tribulus terrestris* L. كانت مقاومة لحد التركيز 9.0%. فيما يخص الحساسية والمقاومة للمضادات الحياتية المدروسة، فقد أظهرت النتائج أن جميع عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة حساسة تجاه المضاد الحيوي Chloroamphenicol وبتركيز 10 مايكروغرام/ مل، إذ بلغ معدل قطر التثبيط 28 ملم في العزلة MH22 *Ensifer meliloti* و Ciprofloxacin وبتركيز 10 مايكروغرام/ مل إذ بلغ أعلى معدل قطر تثبيط 42 ملم في العزلة MH16 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. كذلك تباينت مقاومة عزلات بكتريا الرايزوبيا المدروسة لأملاح المعادن الثقيلة المختلفة. إذ أظهرت جميع عزلات الرايزوبيا حساسية تجاه ملح كلوريد الكوبلت $CoCl_2$ بتركيز 5000 مايكروغرام/ مل إذ بلغ أعلى معدل قطر تثبيط 36 ملم في بكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة MH2 المعزولة من نبات اللوبيا *Vigna unguiculata* L.، في حين أظهرت النتائج ان بكتريا *Ensifer meliloti* العزلة MH15

مقاومة تجاه هذا الملح وبتركيز 1000 مايكروغرام/ مل، أظهرت النتائج ان جميع العزلات مقاومة لملح كلوريد النيكل $NiCl_2$ ولجميع التراكيز 100 و 500 و 1000 و 5000 مايكروغرام/ مل. وأظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات الرايزوبيا كانت موجبة لإختبار انتاج جزيئات سطح الخلية، إذ بلغ أعلى معدل انتاج للسكر المتعدد الخارجي EPS 3.76 غم/ لتر من العزلة *R. leguminosarum* bv. *viciae* MH25 المعزولة من العقد الجذرية لنبات الباقلاء *Viciae faba* L.. أظهرت نتيجة دراسة الفعَّاليَة المضادة المايكروبية لراشح التخمير الخام للمزارع السائلة لعزلات بكتريا الرايزوبيا فعَّالية تجاه أغلب العزلات المرضية المدروسة، إذ بلغ أعلى معدل قطر تثبيط 25 ملم عند تطبيق راشح التخمير الخام للعزلة *Ensifer meliloti* MH15 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الجت *Medicago sativa* L. تجاه البكتريا المرضية *E. coli* MJ20 وأعلى معدل قطر تثبيط بلغ 27 ملم عند تطبيق راشح مزرعة التخمير للعزلة *Ensifer meliloti* MH10 تجاه البكتريا المرضية *Bacillus cereus* MJ24، في حين بلغ أعلى معدل قطر تثبيط 25 عند تطبيق الراشح الخام لبكتريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* MH1 والمعزولة من نبات اللوبيا *Vigna unguiculata* L. تجاه البكتريا المرضية MJ22 *Salmonella typhi*. إذ بلغ أعلى معدل قطر تثبيط 29 ملم عند تطبيق الراشح الخام لمزرعة التخمير للعزلة *Ensifer meliloti* MH17 تجاه الفطر الممرض للنبات*Aspergillus niger* MJ30، في حين بلغ أعلى معدل قطر تثبيط 28 ملم عند تطبيق راشح المزرعة السائلة للعزلة *R. leguminosarum* bv. *viciae* MH21 المعزولة من العقد الجذرية لنبات الباقلاء *Viciae faba* L تجاه الفطر الممرض للنبات *Fusarium verticillioides* MJ32. في حين بلغ أعلى معدل قطر تثبيط 26 ملم عند تطبيق راشح التخمير الخام للمزرعة السائلة للعزلة *Ensifer meliloti* MH6 المعزولة من العقد الجذرية لنبات الحلبة *Trigonella foenum–gracum* L. تجاه العزلة المرضية داء المبيضات *Candida albicans* MJ34. أظهرت نتائج تحديد تطابق تسلسل القواعد النايتروجينية لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل للتسلسل الجزيئي للمورث 16S rRNA منتخبة معزولة في هذه الدراسة مع تسلسلات العزلات القياسية المسجلة في بنك الجينات من أَجل الحصول على تتابعات القواعد النايتروجينية ان العزلة الاولى IcI|Query-44061 التي عُزلت من العقد الجذرية لنبات القطب الشائك *Tribulus terrestris* L. كانت قريبة بنسبة 97.27% من السلالة القياسية *Rhizobium* sp. BAB-3360 (KF984469.1) فيما يخص العزلة الثانية IcI|Query −22739 التي عزلت من العقد الجذرية لنبات الباقلاء *faba Vicia* L. فقد تطابقت بنسبة 97% من السلالة القياسية والمسجلة في بنك الجينات(KY940047.1) *Rhizobium leguminosarum* strain RP1.

Abstract:

This study included isolation of twenty five rhizobial bacteria from root nodules of different leguminous nitrogen fixer plants which the collected from different agricultural and ecological areas from Nineveh governorate-Iraq. Biochemical test results revealed that all the isolates have the ability to grow on Rhizobial minimal medium. Also results revealed that ability of all isolates to utilize citrate as sole carbon course with exception to *R. leguminosaran* bv. *trifolii* bacteria isolate MH3 which isolated from root. nodules of *Trifolium alexandrimum* L. and bacteria *Ensifer meliloti* MH5 and MH6 isolates. which isolated from root nodules of *Trigonella foenum-graecum* L. Also there were variations in ability of isolates for gelatin liquefaction. All the studied isolates revealed positive result for triple sugar iron (TSI), whereas there were variation of among the isolates for production of hydrogen sulfide gas (H_2S). Results of this study revealed that all the rhizobial isolates are positive for urease, bromothymol blue, indole, catalase, oxidase and negative for methyl red and Voges-Proskauer test, whereas per the results revealed that all the isolated rhizobial bacteria were variant in their ability to utilize different studied sugars like mannose, sucrose, arabinose fructose, maltose, glucose, sorbitol, xylose, lactose and mannitol with varying degrees. The best carbon, source for support growth was sugar alcohole mannitol. Most of the studied rhizobial bacteria were showed the ability of tolerance of different concentrations of sodium chloride NaCl up to 8.0% with exception with *Ensifer fredii* bv.*fredii* MH1 and MH13 isolates which isolated from bot nodules of *Vigna unguiculata* L. and bacteria *Ensifer meliloti* MH8, MH10 and MH20 isolated from root nodules of *Medicago sativa* L. and the bacteria *Rhizobium* sp. isolate MH23 isolated from *Tribulus terrestris* L. were tolerated. up to 9.0%. Regarding to sensitivity and resistance to studied antibiotics, results revealed that all the studied rhizobial isolates sensitivity against chloramphenicol with 10 µg/ml concentration, which inhibition zone mean value reached 28mm by the isolate *Ensifer meliloti* MH22 and sensitivity against Ciprofloxacin with 10 µg/ml concentration which inhibition zone mean value was a maximum with 42 mm by the isolate *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* MH16. Also there were variation in resistance against of rhizobial isolates different heavy metal salts, which. results showed

that all rhizobial isolates sensitive against Cobalt chloride with 5000 µg/ml concentration, which a maximum inhibition zone mean value was 36 mm by the bacteria *Ensifer fredii bv.fredii* MH2 isolated from *Vigna unguiculata* L. Whereas results showed that the bacteria *Ensifer meliloti* isotale MH15 resistant to this salt with 1000 µg/ml concentration. Results showed that all isolates were resistance to nickel chloride salt with all concentrations. 100, 500, 1000 and 5000 µg/ml . Results of this study revealed that all rhizobial isolates were positive for production of all surface molecules, a maximum mean production of exopolysaccharide (EPS) was reached to 3.76 gm/L by the strain *R. leguminosarum* bv. *viciae* MH25 isolated from *Viciae faba* L. Results of antimicrobial activity revealed that the filtrate crude of fermented culture of rhizobial bacteria activity-against of most studied pathogenic strains, A maximum mean value of inhibition zone reached 25 mm. when filtrate crude of fermented culture of *E. meliloti* MH15 applied against pathogenic bacteria *E. coli* MJ20. A maximum mean inhibition zone mere 27mm when a code filtrate crude of fermented culture of *Ensifer meliloti* MH10 applied against *Bacillus cereus* MJ24. A maximum mean value of inhibition Zone was 25mm when filtrate crude of fermented culture of *Ensifer fredii bv.fredii* MH1 applied against *Salmonella typhi* MJ22, which a maximum inhibition is reached to 29 mm when filtrate crude of segmented culture of *Ensifer meliloti* MH17 against of pathogenic plant fungi *Aspergillus niger* MJ30. A maximum mean value inhibition was 28 mm when filtrate crude of fermented Culture *R. leguminosarum* bv. *viciae* MH21 applied against *Fusarium verticillioides* MJ32. Whereas inhibition zone here. reached 26 mm. when filtrate crude of fermented culture of *Ensifer meliloti* MH16 applied against *Candida albicans* MJ34. Results of aligment of DNA sequencing of polymerase chain reaction (PCR) products of the partial sequence of the gene 16S rRNA of the tow selected rhizobial strains under study with standard strains recorded in the Gene Bank reaveled that IcI|Query-44061 isolate corresponded 97.27% with *Rhizobium* sp. BAB-3360 (KF984469.1) wherea (IcI|Query-22739) isolate were corresponded 97% with *Rhizobium leguminosarum* strain RP1(KY940047.1).

University of Mosul

College of Education

For Pure Science

Isolation, Biochemical and Molecular Characterization of Local Rhizobial Isolates and Evaluation of Antimicrobial Activity of Crude Extract

Mohammed Hamid Jasim Al-Jobouri

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised by

Assist Prof.

Dr. Raad Hassani Sultan Allawy

2023 A.D. 1445 A.H