



جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

عزل وتوصيف بايوكيميائي وجزئي لعزلات من الرايزوبيا المحلية

ساره مصباح محمد يحيى

رسالة ماجستير

علوم حياة

بأشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور رعد حساني سلطان علاوي

٢٠٢٥ م

١٤٤٦ هـ

الخلاصة:

تم عزل 41 عزلة رايزوبيا عزلت من العقد الجذرية للنباتات البقولية وعزلتين من الرايزوبكتيريا عزلت من انتفاخات أو تورم في جذور نبات الأوركيد. *Orchid phalaenopsis* L. ونبات العنكبوت *Chlorophytum comosum* L. وأن جميع العزلات قد تم جمعها من مناطق زراعية وبيئية مختلفة لمحافظة نينوى/العراق من شهر أيلول 2023 إلى شهر كانون الثاني 2024. أظهر اختبار الحركة بأن جميع العزلات كانت متحركة، كما أظهرت الاختبارات الكيموحيوية أنها موجبة لاختبار اليوريز والكتاليز والأمايليز تحلل النشأ والبروموثيمول الأزرق واحمر الكونغو واستغلال السترات بوصفه مصدراً وحيداً للكربون وإيجابية نتيجة الأندول في حين أن جميع العزلات كانت سالبة لاختباري المثلث الاحمر وفوكس-بروسكر. تحمّلت عزلات الرايزوبيا وعزلتي الرايزوبكتيريا تراكيز مختلفة من ملح نترات البوتاسيوم KNO_3 وصلت الى 10% (وزن/حجم) عدا العزلتين *Ensifer fredii* bv. *fredii* SM12 و SM16 والبكتيريا *Ensifer meliloti* العزلات SM23 و SM34 و SM39 والبكتيريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* العزلة SM41. تباينت العزلات في مقاومتها وحساسيتها للمضادات الحيوية المدروسة وأظهرت البكتيريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلة SM3 والرايزوبكتيريا العزلة SM5 وبكتيريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* العزلتين SM31 و SM43 وبكتيريا *Ensifer meliloti* العزلتين SM32 و SM34 وبكتيريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* العزلة SM41 مقاومة ثلاثة مضادات حيوية مختلفة. أظهرت تجربة تحمّل المبيد العشبي الغليفوسيت قدرة العزلات *Rhizobium leguminosarum* bv. *leguminosarum* bv. *phaseoli* SM14 و *trifolii* SM27 و *Ensifer meliloti* على النمو بشكل جيد عند التركيز 100 ملغم /مل. من بين سبعة عزلات منتجة للاندول 3-حامض الخليك (IAA) وهي كالأتي: البكتيريا *Ensifer fredii* bv. *fredii* العزلتين SM1 و SM33 والبكتيريا *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* العزلات SM21 و SM27 و SM30 و SM43 والبكتيريا *Ensifer meliloti* العزلة SM32. أظهرت العزلة SM32 *Ensifer meliloti* أفضل معدل انتاج 21.43 مايكروغرام/ مل بعد ثلاثة أيام من التحضين. إضافة 3 ملغم/ مل من التربتوفان للوسط Luria-Bertani دعم أفضل انتاج من العزلة SM32 *Ensifer meliloti* حيث بلغ الانتاج 72.96 مايكروغرام /مل، وبعد ثلاثة أيام من التحضين. أظهرت نتيجة تحديد تطابق

تسلسل القواعد النايتروجينية لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل الجزئي للموروث 16S rRNA للعزلة SM1 المعزولة من العقد الجذرية لنبات اللوبيا *Vigna unguiculata* L. كانت متطابقة بنسبة 90% مع السلالة القياسية المسجلة في بنك الجينات *Enterobacter* sp. EC5.2 وقد تم تسجيلها في بنك الجينات للمركز الوطني لمعلومات التقنيات الأحيائية برقم الانضمام PP713097.1. أما فيما يخص العزلة SM21 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات البرسيم *Trifolium alexandrinum* L. فقد تطابقت بنسبة 98% مع السلالة القياسية والمسجلة في بنك الجينات *Rhizobiaceae* bacterium strain EW38 وقد تم تسجيلها في بنك الجينات للمركز الوطني لمعلومات التقنيات الأحيائية برقم الانضمام PP708943.1. أظهر تحديد تسلسل الجينوم الكامل للعزلة SM32 والمعزولة من العقد الجذرية لنبات الجت *Medicago sativa* L. أنها تتشابه بنسبة 99.84% مع نوع البكتيريا *Enterobacter cloacae* السلالة القياسية ATCC13047. وقد تم تسجيل العزلة SM32 *Enterobacter cloacae* في بنك الجينات للمركز الوطني للتقنيات الأحيائية برقم الانضمام JBEFMZ000000000.1 ورقم المستودع PRJNA1121377 وبرقم SAMN41748806.

Abstract

In this study isolation of 41 rhizobial isolates were done from root nodules of different leguminous plants collected from different agricultural and eco-areas in Nineveh Governorate-Iraq and two rhizobacterial isolates isolated from swellings in root of *Orchid phalaenopsis* L. and *Chlorophytum comosum* L. All isolates were collected from different agricultural and environmental areas of Nineveh Governorate/Iraq from September 2023 to January 2024. Motility test result showed that all isolates were motile. Biochemical tests results revealed that all isolates were positive for urease, catalase, amylase, Bromothymol blue, Congo red, utilization of citrate as sole carbon source and indole. Whereas, all the isolates were negative for methyl red and Vogues-Proskauer tests. Rhizobial and rhizobacterial isolates tolerated different concentrations of potassium nitrate reached to 10 % (w/v), with exception to *Ensifer fredii* bv. *fredii* isolates SM12 and SM16 and *Ensifer meliloti* isolates SM23, SM34 and SM39 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolate SM41. Isolates showed variations regarding to its resistance and sensitivity for studied antibiotics. *Ensifer meliloti* isolate SM3, rhizobacteria isolate SM5, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolate SM31, SM43 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolate SM41 showed multidrug resistance for three different antibiotics. Glyphosate tolerance experiment result showed ability of isolates *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* SM14, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SM27 and *Ensifer meliloti* SM34 good growth with 100 mg/ ml concentration. Among seven indole 3-acetic acid producer isolates as follows: *Ensifer fredii* bv. *fredii* isolates SM1 and SM33, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates: SM21, SM27, SM30 and SM43 and *Ensifer meliloti* isolate SM32, the isolate *Ensifer meliloti* SM32 revealed the best mean production 21.43 µg/ ml, after 3 days of incubation. Addition of tryptophan to Luria-Bertani medium supported the best production, after 3 days of incubation by the isolate *Ensifer meliloti* SM32. The mean production reached to the 72.96 µg/ ml, after 3 days of incubation. Results of detection of nitrogenous bases matching of polymerase chain reaction of partial sequence of the gene 16S rRNA of the SM1 strain which isolated from root nodules of *Vigna unguiculata* revealed that this strain was matched with 90% ratio to stranded strain *Enterobacter* sp. EC5.2. SM1 isolate was recorded in Gene Bank of National center for Biotechnology Information with accession number PP713097.1.

Regarding the SM21 isolate which isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum* L. was matched with 98% with standard strain Rhizobiaceae bacterium strain EW38. The SM21 was recorded in Gene Bank of National center for Biotechnology Information with accession number PP708943.1. Results of detection of whole genome sequence of nitrogenous bases of SM32 isolate which isolated from root nodules of *Medicago sativa* L. revealed that was similar with 99.83% with species *Enterobacter cloacae* strain ATCC13047. *Enterobacter cloaca* SM32 was recorded in Gene Bank of National center for Biotechnology Information with accession number JBEFMZ000000000.1 and with BioProject number PRJNA1121377 and with BioSample number SAMN41748806.

University of Mosul
Collage of Education
For Pure Sciences



Isolation, Biochemical and Molecular Characterization of Local Rhizobial Isolates

Sara Musbah Mohammed Yahya

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised by

Assist Prof.

Dr. Raad Hassani Sultan Allawy

2025 A. D.

1446 A. H.