جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

التشخيص البايوكيميائي والجزيئي لبعض أنواع بكتريا الرايزوبيوم وتأثير الجسيمات النانوية على نموها

هنية خالد محمدعلي الحياني

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإشراف

المدرس الدكتور

عمر عبدالعزيز أحمد

١٤٤٤هـ

٢٠٢٣ م

الملخص:

في هذه الدراسة الحالية عُزِلت 24 عزلة لبكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لأربعة أنواع من النباتات البقولية وهي اللوبيا و الفاصولياءوالجت والباقلاء التي زرعت في مناطق مختلفة من مدينة الموصل وشُخّصت هذه العزلات عن طريق الصفات المظهرية والزرعية وعدد من الاختبارات البايوكيميائية و كانت النتائج موجبة لكل من الاختبارات منها تحلل الجيلاتين واستهلاك السترات واختبار المثيل الاحمر الاندول ،اذ أظهرت الصفات المظهرية والزرعية انها تنمو بشكل مستعمرات شفافة لزجة القوام لانتاج السكريات الخارجية بوفرة على الأوساط الصلبة Yest extract وMannitol ودرست حساسية العزلات ومقاومتها لستة أنواع من المضادات الحيوية وهي:(TE) Tetracycline و (RA) Rifampin و(CRO) Ceftriaxone و (TOB) Tobramycin و (AM) Ampicillin و(CIP) Ciprofloxacin و بالتراكيز 10,5,1010,25,10 مايكروغرام/مل على التوالي.اختُلفت العزلات في مقاومتها للمضادّات الحيوية، وكانت أعلى نسبة لمقاومة للعزلات الرايزوبية وهي 100% للمضاد الحيوي AM وCIP ،واعلى نسبة للحساسية للعزلات الرايزوبية وهي النسب 100% للمضاد الحيوي TOB مع تباين النسب لبقية المضادات الحيوية. كما تضمنت الدراسة اختبار إنتاج العزلات الرايزوبية المدروسة للسكر المتعدد الخارجي حيث تباينت العزلات فيما بينها بمعدل الإنتاج حيث اقصى انتاج كان في العزلة HA21 *leguminosarum* bv. *viciae* واقل انتاج في العزلة HA10 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* و أظهرت نتائج الفعالية المضادة المايكروبية لجسيمات الفضة النانوية المحضَّرة بثلاثة تراكيز وهي 250 ،500 ،750 مايكرو غم/مل أعلى معدل قطر تثبيط نمو تجاه العزلات الرايزوبية مقارنة بثاني أوكسيد التيتانيوم النانوي وأوكسيد النيكل النانوي و بشكل عام أظهر التركيز 750 مايكرو غم/مل أعلى نسبة تثبيط من التركيزين 250 و500 مايكرو غم/مل،اذ ظهر أعلى معدل قطر تثبيط لجسيمات الفضة النانوية عند التركيز 750 مايكرو غم/مل عند العزلة HA4 *Ensifer fredii* bv. *fredii* اذ بلغ 34.67 ملم وأقل قطر تثبيط في التركيز ذاته بلغ 22.00 ملم عند العزلة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA22، أما بالنسبة لثاني أوكسيد التيتانيوم النانوي أظهرت أيضا معدلات اقطار تثبيط متباينة بحسب التراكيز وأيضا كان التركيز 750 مايكرو غم/مل هو أعلى قطر تثبيط، اذ بلغ بحدود 33.33 ملم عند العزلة HA23 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* واقل معدل قطر تثبيط بلغ 17.67 ملم تجاه العزلة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA19، بالإضافة الى الفعالية البايولوجية لاوكسيد النيكل النانوي اذ ان اعلى معدل قطر تثبيط في التركيز مايكرو غم\مل هو 750 30.67 ملم تجاه العزلتين *Rhizobium*

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* و *leguminosarum* bv. *viciae* HA21 HA24 واقل معدل قطر تثبيطي بالتركيز نفسه هو 14.33 ملم تجاه العزلة *Ensifer meliloti* HA17 كما درست الفعالية المضادة المايكروبية بطريقة قياس الكثافة الضوئية(العكورة) لجسيمات الفضة النانوية حيث كانت اعلى قيمة في التركيز 750 مايكرو غم/مل 0.66 O.D تجاه العزلة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA19 و ادنى قيمة كانت بحدود O.D 0.33 تجاه العزلة *Ensifer meliloti* HA7 و اعلى قيمة في التركيز 750 مايكرو غم/مل بالنسبة لتأثير ثاني أوكسيد التيتانيوم كانت بحدود 0.58 O.D تجاه العزلة *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA13 و ادنى قيمة كانت بحدود 0.34 O.D تجاه العزلة *Ensifer meliloti* HA17 وفي التركيز ذاته و بالنسبة لتأثير أوكسيد النيكل النانوي بلغت أقصاها تجاه العزلة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA23 بحدود O.D0.56 و ادناها بلغت 0.40 O.D تجاه العزلة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA19 كما تضمّنت هذه الدراسة اختبار مدى تأثير الجسيمات النانوية في انتاج السكريات المتعددة الخارجية لعزلات الرايزوبيا، وأظهرت النتائج ان للمواد النانوية تاثيراً تثبيطيا كبيراً في معدل إنتاج السكر المتعدد الخارجي في حين كلّما زاد تركيز الجسيمات النانوية قَلّ معدل الإنتاج بشكل كبير واظهرت النتائج ان لـ AgNPs بتركيز 750 مايكرو غم/مل كان ذا فعالية عالية مقارنة بالتركيزين 250 و500 مايكرو غم/مل،حيث انتجت العزلة*Ensifer meliloti* HA15 فقط الـ EPS واما بتركيز 250 مايكرو غم/مل انتجت العزلات *R.leguminosarum bv. Phaseoli* HA10، *Ensifer meliloti* HA15، *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* HA22 اما بتركيز 500 مايكرو غم/مل تم الحصول على السكريات المتعددة الخارجة من العزلة *Ensifer meliloti* HA15 وعند ثاني أوكسيد التيتانيوم وبتركيز 250 مايكرو غم\مل أُنتِجَت العزلات *Ensifer fredii* bv. *fredii* HA1,HA5، *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA19 و بتركيز 500 مايكرو غم/مل أُنتِجَت العزلات *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA10، *Ensifer meliloti* HA18 و *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA24، بينما في تركيز 750 مايكرو غم\مل كان الـ EPS فقط من إنتاج العزلة *Ensifer meliloti* HA8 و بالنسبة لاوكسيد النيكل النانوي أُنتِجَت العزلات *Ensifer fredii* bv. *fredii* HA3,HA5، *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA13،HA18،HA15 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA22,HA23 بتركيز 250 مايكرو غم/مل،اما بتركيز 500 مايكرو غم/مل انتجت العزلات، *Ensifer meliloti* HA15 ,*Ensifer fredii* bv. *fredii* HA5 *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* HA22،أمّا بينما في تركيز 750 مايكرو

غم/مل فكان معدل إنتاج العزلات أقّل فقد انتجت العزلة *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA23 والعزلة *Ensifer meliloti* HA15 و *Ensifer meliloti* HA18 و بالنسبة لاختبار فحص طيف الاشعة أظهرت ثلاث قمم امتصاص مختلفة 420,970,960 لكل من الفضة و ثاني أوكسيد التيتانيوم و النيكل على التوالي اما جهاز الماسح الالكتروني أظهرت الاشكال الكروية لثاني أوكسيد التيتانيوم و كروية غير منتظمة لاوكسيد النيكل و بالحجم 36–72 و 31–54 nm عللى التوالي. وأظهرت نتائج التشخيص باستخدام تقنية الـ PCR لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل الجزيئي Partial sequence للمورث 16S rRNA للعزلات قيد الدراسة تطابقاً مع تسلسلات العزلات المسجلة في بنك الجينات الدولي حيث أظهرت النتائج أن هناك تشابهاً بنسبة 98% بين تسلسلات العزلة HA5 *Ensifer fredii* bv. *fredii* اما العزلة HA10 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* فقد أظهرت تشابها يصل الى 80% مع تسلسلات العزلة المسجلة بالرقم NR-115801.1 و أظهرت العزلة *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA13 تشابها كبيرا بنسبة 100% مع تسلسلات العزلة المسجلة المسجلة بالرقم CP050108.1.

Abstract

In current study, 24 isolates of rhizobial bacteria were isolated from the root nodules of four of leguminous plants, namely cowpea, broad bean, leguminous, and broad bean, which were grown in different regions of the city of Mosul. Gelatin decomposition, citrate consumption, and indole red methylation test, as the morphological and cultural characteristics showed that they grow in the form of transparent, viscous colonies to produce external sugars in abundance on solid media, Yest extract and Mannitol, the sensitivity of the isolates and their resistance to six types of antibiotics were studied: Tetracycline (TE), Rifampin (RA), Ceftriaxone (CRO), Tobramycin (TOB), Ampicillin (AM) and Ciprofloxacin (CIP) at concentrations 10, 5, 10, 10, 25, 10. µg/mL, respectively.

The isolates differed in their resistance to antibiotics, and the highest percentage of resistance to rhizobia is 100% to antibiotics AM and CIP, and the highest percentage of sensitivity to rhizobia isolates, which is 100% to antibiotic TOB, with varying percentages for the rest of the antibiotics.

The study also included testing the production of the studied rhizobial isolates of the external polysaccharide, where the isolates varied among themselves in the rate of production, as the maximum production was in the isolate *R. leguminosarum* bv. *viciae* HA21 and the lowest production in the isolate *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA10 the results showed the anti-microbial activity of silver nanoparticles prepared at three concentrations of 250, 500, and 750 µg/mL, the highest rate of growth inhibition diameter towards rhizobial isolates.The highest inhibition percentage was from the two concentrations 250 and 500 µg/ml, as the highest inhibition rate of silver nanoparticles appeared at the concentration 750 µg/ml when isolate *Ensifer fredii* bv. *fredii* HA4 reached 34.67 mm.The lowest diameter of inhibition at the same concentration was 0.0022 mm when the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA22, as for the nanoscale titanium dioxide, it also showed

different inhibition diameters according to the concentrations, and the concentration of 750 µg / ml was the highest inhibition diameter, as it reached 33.33 mm for the isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA23 and the lowest inhibition diameter was 17.67 mm against the isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA19.I n addition to the biological activity of nickel oxide nanoparticles, as the highest inhibition diameter in the microgm/ml concentration was 750 30.67 mm against the two isolates *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA21 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA24, the lowest inhibition diameter at the same concentration was 14.33 mm against the isolate *Ensifer meliloti* HA17. The antimicrobial activity was also studied by measuring the optical density (turbidity) of silver nanoparticles, where the highest value was in the concentration of 750 µg/ml 0.66 0.D against the isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA19 and the lowest value was about 0.33 O.D towards the isolate *Ensifer meliloti* HA7 and the highest value at the concentration of 750 µg/ml for the effect of titanium dioxide was about 0.58 O.D towards the isolate *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA13 and the lowest value was around 0.34 O.D towards the isolate *Ensifer meliloti* HA17at the same concentration and with respect to the effect of nanoparticles of nickel oxide, it reached a maximum towards the isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA23 with a range of 0.56 O.D and below it reached 0.40 O.D towards the isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA19. This study also included testing the effect of nanoparticles on the production of expolysaccharides of *Rhizobium* isolates, whereas, as the concentration of nanoparticles increased, the production rate decreased significantly, and the results showed that AgNPs at a concentration of 750 µg/ml was highly effective.

Compared to concentrations of 250 and 500 µg/ml, the isolate *Ensifer meliloti* HA15 produced only EPS at a concentration of titanium dioxide at a concentration of 250 µg/ml, the isolates *Ensifer fredii* bv. fredii HA1, HA5 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA19 were produced at a concentration of 500 µg/ml, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA10, *Ensifer meliloti* HA18 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

HA24, while at a concentration of 750 µg/ml only EPS was produced by the isolate *Ensifer meliloti* HA8 and for nickel oxide nanoparticles only the isolates *Ensifer fredii* bv. *fredii* HA3, HA5, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA13, *Ensifer meliloti* HA15, HA18, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA22, HA23 were produced. at a concentration of 250 µg/ml, while at a concentration of 500 µg/ml the isolates, *Ensifer fredii* bv. *fredii* HA5, *Ensifer meliloti* HA15, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* HA22, whereas, at a concentration of 750 µg/ml, the rate of production of isolates was lower. The isolate Rhizobium leguminosarum bv. viciae HA23 and isolates *Ensifer meliloti* HA15 and *Ensifer meliloti* HA18. As for the spectroscopy test, three different absorption peaks showed 420,970,960 for each of silver, titanium dioxide and nickel, respectively. The electronic scanner showed spherical shapes of titanium dioxide and irregular sphericality of nickel oxide and with a size of 36-72 and 31-54 nm, respectively.

The results of the diagnosis using the PCR technique of the partial sequence polymerase chain reaction products of the 16S rRNA gene of the isolates under study matched the sequences of the isolates registered in the International Genbank, where the results showed that there was a similarity of 98% between the sequences of the isolate *Ensifer fredii* bv. *fredii* HA5 isolate *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* HA10 showed 80% similarity with the sequences of the isolate recorded under NR-115801.1, and the isolate HA13 *R. leguminosarum* bv. phaseoli high similarity of 100% with the sequences of the recorded isolate registered No. CP050108.1.

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

Biochemical and Molecular Identification of Some Types of Rhizobial Bacteria and the Effects of Nanoparticles on its Growth

Hanya Khaled Mohammed Ali Alhayani

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised by

Lecturer

Dr. Omar Abdulaziz Ahmed

2023 A. D **1444 A.H**