



دولة ليبيا

وزارة التعليم

جامعة سبها

كلية العلوم

قسم الأحياء الدقيقة

قُدم هذا البحث استكمالاً لمتطلبات الاجازة الجامعية البكالوريوس بعنوان:

عزل بكتيريا العقد الجذرية من نوعين من نبات البرسيم (*Medicago spp.*) واستعمالها في
انتاج متعدد هيدروكسي البيوترات (PHB) β -Hydroxybutyrate Poly-

**Isolation of rhizobi from two species of Alfalfa plant (*Medicago spp.*)
and their Use in the Production of Polyhydroxybutyrate**

اعداد:

فاطمة الكيلاني ابراهيم عبدالقادر اسليم

عبير سالم محمد سالم الفقي

فاطمة محمد ابراهيم علي الترهوني

إشراف

أ. مسعودة عمر أبو القاسم خليفة

الربيع 2021م



كلية: العلوم

قسم: الأحياء الدقيقة

إقرار من مشرف مشروع تخرج للمرحلة الجامعية بتسليمه للمناقشة
عنوان مشروع التخرج لنيل درجة: البكالوريوس

عزل بكتيريا العقد الجذرية من نوعين من نبات البرسيم (*Medicago spp.*) واستعمالها في
انتاج متعدد هيدروكسي البيوترات (PHB) Poly- β -Hydroxybutyrate

اسم الطالب: عبير سالم محمد سالم الفقي رقمه الدراسي: 2180881
اسم الطالب: فاطمة الكيلاني ابراهيم عبدالقادر اسليم رقمه الدراسي: 2170798
اسم الطالب: فاطمة محمد ابراهيم علي الترهوني رقمه الدراسي: 2180815

أ. مسعودة عمر أبو القاسم خليفة

اقرانا مشرف البحث المذكور أعلاه بأن البحث مطابق لمواصفات البحوث الجامعية بجامعة سبها علمياً و لغوياً وشروط
الكتابة المعتمدة

توقيع المشرف:----- التاريخ:

يعتمد

توقيعه:-----

رئيس القسم: أ. مسعودة عمر أبو القاسم خليفة

الربيع 2021م



كلية: العلوم

قسم: الأحياء الدقيقة

تفويض

أنا..... أفوض جامعة سيها بتزويد نسخ من بحثي للمكتبات أو المؤسسات أو الهيئات أو الأشخاص عند طلبهم حسب الأنظمة و اللوائح التنظيمية في الجامعة للبحث المقدم لمتطلبات الإجازة الجامعية بقسم علم الأحياء الدقيقة كلية العلوم جامعة سيها بعنوان:

عزل بكتيريا العقد الجذرية من نوعين من نبات البرسيم (*Medicago spp.*) واستعمالها في إنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات (PHB) Poly- β -Hydroxybutyrate

اعداد

اسم الطالب: عبير سالم محمد سالم الفقي	رقمه الدراسي: 2180881
اسم الطالب: فاطمة الكيلاني ابراهيم عبدالقادر اسليم	رقمه الدراسي: 2170798
اسم الطالب: فاطمة محمد ابراهيم علي الترهوني	رقمه الدراسي: 2180815

تحت إشراف

مسعودة عمر خليفة توقيع: -----

الدرجة العلمية للمشرف: محاضر

الربيع 2021م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ﴾

بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

من الآية 11 من سورة المجادلة

الإهداء

الحمد لله وحده لا شريك له، له الملك و له الحمد و هو على كل شيء قدير، الحمد لله رب العالمين ما كنا اليوم و لا نكون بدون فضل الله عز وجل، اهدي هذا البحث إلى من علمني كيف اقف بكل ثبات فوق الارض أبي المحترم و إلى نبع المحبة و الإيثار و الكرم أمي الموقرة و إلى سندي خوالي و إلى صديقاتي العزيزات.

كلمة الشكر

الحمد لله الذي خلق الأنسان و علمه البيان، و الصلاة و السلام على نبينا الحبيب و صحبه أجمعين. أما بعد نتوجه بالشكر إلى التي بفضلها تمكنا من تكملة البحث العلمي و إنجازه و ساعدتنا في وضع المسارات الاساسية في خطة البحث و ساعدت على الإشراف على جميع الخطوات مما ساهم في أنجاز هذا البحث.

الاستاذة / مسعودة عمر خليفة

لا يمكننا أن نغفل عن مساهمة هيئة أعضاء التدريس بقسم الأحياء الدقيقة، والذي من شأنه رفع مستوى الجودة بهذا المجال وحرصهم على تقديم كل دافع والاهتمام بجميع التفاصيل،،،،

الى الأستاذات / مبروكة حسين ابو زيد، خديجة عبد الله أبو عنيزة، نجية زيدان برطاطة و ابتسام محمد احمادي

كما نتقدم بالشكر و التقدير إلى قسم علم النبات ممثلاً برئيسة القسم د. هدى سالم الرويق و جميع اعضاء هيئة التدريس و دونما استثناء لتعاونهم معنا في استكمال الجزء العملي من البحث، فلکم منا جميعاً خالص الشكر و الثناء، شكرنا موصول إلى استاذ شمسي عبدالله لما قدمه لنا من ساعده لإتمام هذا العمل.

أخيراً شكرنا يمتد إلى اسرنا الذين بذلوا الغالي و النفيس في سبيل وصولنا الى هذه المرحلة.

نقول لكم جميعاً ألف شكر و في ميزان حسناتكم

بمجرد الانتهاء من
العملية البحثية
في ٢٠٢٢م / ١٤٤٤هـ

فهرس المحتويات

الصفحة

الموضوع

.....	الافرار .
.....	التقويض .
أ الآية القرآنية .
ب الإهداء .
ج كلمة الشكر .
د فهرس المحتويات .
هـ فهرس الاشكال .
و فهرس الجداول .
ز الملخص .
..... I. الفصل الاول .
1 1.1 المقدمة .
2 2.1 الكائنات المجهرية المنتجة لمتعدد هيدروكسي البيوترات .
3 3.1 التخليق الحيوي لمتعدد هيدروكسي البيوترات داخل الخلية .
4 4.1 الكشف عن متعدد هيدروكسي البيوترات في الخلايا البكتيرية .
5 5.1 الهدف من البحث .
..... II. الفصل الثاني .
..... 2. المواد وطرق العمل .
6 2.1 جمع العينات (جمع العقد) .
6 2.2 وسط النمو .
7 2.3 عزل الريزوبيا من العقد الجذرية .
7 2.4 السمات التكافلية للعزلات .
8 2.5 الوسط المستعمل في إنتاج متعدد PHB .
8 2.5.1 الوسط الثاني .
8 2.5.2 الوسط الثالث .
8 2.5.3 الوسط الرابع .
9 2.5.4 الوسط الخامس .
9 2.6 فحص تكوين PHB داخل الخلايا البكتيرية .
9 2.6.1 طريقة صبغ الطبقة البترية .
9 2.6.2 طريقة الصبغ باستخدام الشريحة الزجاجية .
10 2.7 دراسة الظروف المثلى لإنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات .

10 1.7.2. درجة الحرارة المثلى.
10 2.7.2. الاس الهيدروجيني الامثل.
10 8.2. استخلاص PHB بطريقة Sodium hypochlorite- Chloroform.
 III. الفصل الثالث.
11 3. النتائج و المناقشة.
 IV. الفصل الرابع.
17 4. الاستنتاج.
18 5. التوصيات.
19 6. المراجع العربية.
19 7. المراجع الأجنبية.
 8. الملاحق.
23 8. 1. تصنيف نبات البرسيم.
23 8. 2. وسط جنسن Jensen.
24 8. 3. صبغة السودان السوداء Sudan Black B dye.
24 8. 4. مجاميع التلقيح التبادلية.

فهرس الأشكال

الصفحة	الشكل
4	1. مخطط يبين مسار او دورة PHB في بكتيريا <i>Ensifer meliloti</i>
11	2. نمو العزلة R13 على وسط مستخلص الخميرة و المانيتول.
12	3. اختبار الانبات و تكوين العقد.
13	4. النسبة المئوية لنمو العزلات و استخدامها للسكر المختبر.
13	5. العزلات الريزوبية و انتاجها لمتعدد PHB بطريقتي الاطباق و تحت المجهر.
16	6. تكون غشاء رقيق من متعدد PHB بعد 24 ساعة من تبخر المذيب.

فهرس الجداول

الصفحة	الجدول
6	1. العزلات الريزوبية، عائلها النباتي و أماكن جمعها.
14	2. انتاج متعدد هيدروكسي البيوترات عند ظروف مختلفة.

المستخلص

تم الحصول على 14 عزلة ريزوبية من نوعين من نبات البرسيم هما البرسيم الحجازي المزروع *Medicago sativa* L. و البري *M. littoralis* جمعت من مناطق مختلفة من ليبيا ذات مناخ جاف و شبه جاف. جميع العزلات استطاعت ان تكون تكافل فعال مع نبات البرسيم الحجازي المزروع. غربلت العزلات النامية الوسط الزراعي مستخلص الخميرة و المانيتول غربلة اولية على اساس الاصطباغ بصبغة Sudan black B و قدرتها على انتاج متعدد هيدروكسي البيوترات. استخدمت مصادر كربونية و نيتروجنية مختلفة لإنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات، فأظهرت العزلات تباين في استخدام هذه الاوساط. درجتي الحرارة و الاس الهيدروجيني المختبرة لم يكن لها تأثير يذكر حول قدرة العزلات على انتاج هذا المتعدد. العزلات R5، R8، R9 و R10 كانت مميزة مقارنة بالعزلات الاخرى واستطاعت انتاج هذه المتعدد تحت جميع الظروف المختبرة.

الكلمات المفتاحية: عزلة ريزوبية، البرسيم، تكافل، صبغة Sudan black B، متعدد هيدروكسي البيوترات.

Abstract

Fourteen rhizobial isolates were obtained from two species of Alfalfa plant, cultivated (*Medicago sativa* L.) and wild (*M. littoralis*) collected from different regines of Libya arid and semi-arid. All isolates were able to form an effective symbiosis with the cultivated alfalfa plant. All isolates growing in culture media were screened from yeast extract mannitol preliminary screening based on dyeing with Sudan black B day to determine the ability of these isolates to produce Polyhydroxybutyrate from different carbon and nitrogen sources, the isolates showed a variation in their ability to form Polyhydroxybutyrate. The tested temperature and pH did not have any effect on produce Polyhydroxybutyrate. The isolates R5, R8, R9 and R10 it was distinguished compared to other isolates, as was able to produce the Polyhydroxybutyrate under all conditions.

Key words: Rhizobial isolate, Alfalfa, Symbiosis, Sudan black B day, Polyhydroxybutyrate.

المراجع References

أولاً: المراجع العربية

- السحار، قاسم فؤاد (1987). مقدمة في علم تقسيم النبات، دار البحر الابيض المتوسط للنشر - القاهرة / مصر.
- خليفة، مسعودة عمر أبوالقاسم و صالح حسن محمد "التباين المظهري في الريزوبيا المتكافئة مع بعض النباتات البقولية البرية النامية في ليبيا". جامعة سبها - كلية العلوم - سبها / ليبيا. (2013).

ثانياً: المراجع الاجنبية

- Alexander, M. (1977). Introduction to Soil Microbiology, 2nd Ed. John Wiley and Sons. Inc., New York.
- Aswini, P.; Kavitha, P.; Revathy, A. R. and Babujanarthanam, R. (2014). Poly β hydroxy butyrate (PHB) biosynthesis in *Bacillus*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 28(1): 8-11.
- Bonartseva, G. A., Myshkina, V. L. and Zagreba, E. D. (1994). Poly-bhydroxybutyrate content in cells of various Rhizobium species during growth with different carbon and nitrogen sources. Microbiology. 63:1. 45-48.
- Burdon, L.K.; Stokes, J.C. and Kimbrough, C. E. (1942). Studies of the Common Aerobic Spore-forming Bacilli, I. Staining for Fat with Sudan Black B safranin. Journal of Bacteriology, 43(6): 717-724.
- Chandrashekharaiyah, P. S. (2005). Isolation, screening and selection of efficient Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) synthesizing bacteria .MSc. Thesis, Karnataka, Indian.
- Charen, T.; Vaishali, P.; Kaushalya, M.; Amutha, K.; Ponnusami, V. and Gowdha-man, D. (2014). Isolation and identification of Polyhydroxybutyrate producing bacterial strain (*Bacillus thuringiensis* GVP) from chlorine contaminated soil . International Journal of ChemTech Research, 6(5): 3197-3202.
- Charles TC (2001) Sinorhizobium meliloti PHB cycle genetics. International congress on nitrogen fixation. CABI, Hamilton, ON.
- Dangeard, P. A. (1926). Recherches sur les tubercles radicaux des legumineuses. Le Botaniste 13, 1- 275.
- El-Selim, A. A., El-Sawah, M. M. A., Kassem, M. M., Ashour, E. H. and ElKadi, S. M. L. (2009). The influence of nutritional conditions on the accumulation of Poly-

hydroxybutyrate (PHB) in *Azotobacter chroococum*. 10th International conference on chemistry and its role in development Mansoura–Sharm El Sheikh, Egypt. p:1–14.

– Fred, E. B., Baldwin, I. L. and McCoy, E. (1932). Root nodule Bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Studies. Science, number 5. University of Wisconsin Press, Madison.

– Fukui, T., Ito, M., Saito, T. and Tomita, K. (1987). Purification and characterization of NADP-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *Biochimica et Biophysica Acta* 23;917(3):365–371.

– Jie, W. Y. (2007). Production of polyhydroxyalkanoates for pharmaceutical and medical applications. Ph.D. thesis, The Hong Kong polytechnic university, Hong Kong. 239.

– Jordan, D. C. and Allen, O. N. (1974). Family III Rhizobaceae Conn In Bergy's manual of Systematic bacteriology. Vol. 1, N. R. Krieg and J. G. Holt (Eds.) Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 234– 244.

– Juan, M. L., Gonzalez, L. W. and Walker, G. C. (1998). A Novel Screening Method for Isolating exopolysaccharide deficient mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4600– 4602.

– Hartman, T. L. (1940). The use of Sudan Black B as a bacterial fat stain. *Staining Technology*, 15 : 23–28.

– Howieson, J. G. and Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.

– Kocharin, K. (2013) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for polyhydroxybutyrate production. Ph.D. thesis, Chalmers university, Sweden.

– Kumar, B.S. and Prabakaran, G. (2006). Production of PHB (bioplastics) using bio-effluent as substrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Indian Journal of Biotechnology*, 5:76–79.

– Kumari, P. and Dhingra, H. K. (2013) Isolation and characterization of PHB Producing Microorganisms isolated from root nodules of leguminous Plants. *International Quarterly Journal of Life Sciences*, 8(1): 109–113.

– Lee, S.Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 1–14.

- Lillo, J.G. and Rodriguez-Valera, F. (1990). Effects of culture conditions on Poly(3-Hydroxybutyric Acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8): 2517–2521.
- Macário, V. F. C. (2009). Scale-Up and design of chemometric models for the production of MCL-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442, Msc. thesis, University of Lisbon, Portugal.
- Mahishi, L. H., Tripathi, G. and Rawal, S. K. (2003). Poly- β - hydroxybutyrate (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring, *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: Effects of various carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 158: 19–27.
- Masamune, S., Walsh, C.T., Sinskey, A. J. and Peoples, O. P. (1989). Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis: mechanistic studies on the biological Claisen condensation catalyzed by β - ketoacyl thiolase. *Pure and Applied Chemistry*, 61: 303–312.
- Mercan, N., Aslim, B., Yüksekdağ, Z. N and Beyatlı, Y. (2002). Production of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) by Some *Rhizobium* Bacteria. *Turk J Biol* 26, 215– 219.
- Mikkili, I., Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Babu, J. D., Nath S. B. and Kodali, V. P. (2014). Isolation, screening and extraction of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria from sewage sample. *International Journal of Pharm Tech Research*, 6(2):850–857.
- Nair, S., Jha, P. K. and Babu, C. R. (1993). Variation in poly- β hydroxybutyrate synthesis in rhizobia reflects strain differentiation and temperature regulation. *Journal of Basic Microbiology*. 35–39.
- Ostle, A. G. and Holt, J. G. (1982). Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate. *Applied Environmental Microbiology* 44(1): 238–241.
- Quan, Z. X., Bae, H. S., Baek, J. H., Chen, W. F., Im, W. T. and Lee, E. E. (2005). *Rhizobium daejeonense* sp. nov., isolated from a cyanide treatment bioreactor. In *J Syst Evol Microbiol* 55, 2543– 2549.
- Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P. and CleyetMarel, J. C. (1996). *Sinorhizobium medicae*, sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Bacteriol* 46, 927– 980.

- Trainer, M. A. and Charles, T. C. (2006). The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 377–386.
- Trinick, M. J. (1982). Biology. Pages 1–34 in: Nitrogen Fixation. 2. *Rhizobium*. Oxford University Press, Oxford.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of root– nodule bacteria. In: International Biological program me, Handbook no. 15. Oxford, Blackwell Scientific Publication Ltd, pp. 73– 97.
- Young, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen– fixing organisms. In *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey, G. et al., ed– s), 43– 86, Chapman and Hall.