MENOUFIA JOURNAL OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

https://mjab.journals.ekb.eg

Title of Thesis	**:**	Genetic characterization of heavy metals tolerant mutants of rhizobia nodulating Pisum sativum
Name of Applicant	**:**	Weam Naeem Shahat Hegazy
Scientific Degree	**:**	M.Sc.
Department	**:**	Agriculture Biochemistry
Field of study	**:**	Agriculture Biochemistry
Date of Conferment	**:**	Mar. 12, 2025

Supervision Committee:

- Dr. A I. Fahmi : Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. Kh. S. Abdellatif : Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. H. H. Nagaty : Assistant prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. O. M. Zayed : Doctor prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.

SUMMARY

This work was conducted in the genetics laboratory -Faculty of Agriculture, Menoufia University. It was carried out to investigate the interaction between *Rhizobium* strains isolated from contaminated agricultural soils with heavy metals and *Pisum sativum* (Pea) plants. **The study's goals were:**

1- Isolation and identification of *Rhizobium* isolates from different polluted sites cultivated with *Pisum sativum*.
2- In vitro evaluation of isolates' tolerance to three heavy metals (Cobalt, Nickel, and Lead)
3- Assessment of the impact of the most tolerant isolates on pea plants under greenhouse conditions.
4- Induction of *Rhizobium* mutants more tolerant to lead (Pb) by EMS and assessment of their effect on pea plant parameters.

To achieve our goals, **t**wenty-three agricultural sites representing different Governorates (Menoufia, Gharbia, Kafr El Sheikh, Qalubia, Giza, Ismailia, Daqahlia, Sharqia, and Behira) irrigated with wastewater were selected for sampling. A total of 25 *Rhizobium* isolates were collected from pea root nodules and characterized morphologically, biochemically, and molecularly through 16S rDNA sequencing, confirming their identity as *Rhizobium leguminosarum.* The data obtained were summarized as follows:

All morphological tests proved that all tested isolates were *Rhizobium*. The bacteria were Gram-negative, motile, and rod-shaped. Moreover, biochemical tests including catalase, antibiotic sensitivity, pH, and sodium chloride resistance) showed some differences in their response:

1) The isolates were tested for pH tolerance on YEMA plates at pH degrees 4, 5, 8, 9, and 11, with a control pH of 6.8. None of the isolates grew at pH 4, while isolates RL24 and RL25 showed the greatest growth at pH 5. The greatest number of colonies was observed at pH 8, especially for isolates RL4 and RL17, while isolated RL15 showed the least growth. Growth was significantly reduced at pH levels 9 and 11.
2) The isolates were also tested for tolerance to varying concentrations of NaCl (1, 2, 3, and 4%). Isolate RL25 showed the best growth across all NaCl concentrations, while isolate RL16 showed the poorest growth, especially at 1% NaCl.
3) All isolates were generally tolerant of antibiotics, especially isolated RL1, which was tolerant of both tobramycin and vancomycin, and isolated RL2, which was tolerant of vancomycin.

For molecular identification, the 16SrRNA gene was amplified and sequenced from all Rhizobium isolates using PCR. All isolates produced a PCR product of 1500 bp. Nucleotide sequences of every

isolate were compared to known nucleotide sequences in the gene bank using Blast N, and we obtained accession numbers for all isolates under study in the gene bank. Our results revealed that all isolates are related to *Rhizobium leguominosarum.*

The strains were evaluated for their tolerance to different nickel, lead, and cobalt concentrations in the laboratory.

- In the case of nickel treatments, RL15 showed the highest growth at the maximum concentration of 5 mM. RL9 and RL20 could not grow at the maximum concentration of 5 mM.
- Regarding Lead treatments, RL21 and RL16 showed the greatest growth at 5 mM Pb, but RL9 and RL20 failed to grow at the highest Pb concentrations.
- In the case of Cobalt treatments, the isolates exhibited higher sensitivity compared to their tolerance to Ni and Pb at the highest concentrations.

Greenhouse experiments demonstrated that inoculation with the best LC_{90} metal-tolerant strains improved the pea plants' tolerance to heavy metal contamination.

To improve the tolerance of Rhizobium strains against the highest concentrations of Lead, nine *Rhizobium* mutants were developed by EMS mutagenesis of the RL16 strain and were tolerant to the LC95 concentration of 6.3 mM Pb $(NO_3)_2$. This study showed that RLM6 was the best mutant at producing a large amount of extracellular proline compared to wild-type RL16. As for IAA, the data indicated that all isolates, including wild-type and mutants, had excess amounts under Pb stress conditions compared to non-stress conditions.

Finally, *Rhizobium* application improves the pea characters (chlorophyll content, root fresh weight, root dry weight, shoot fresh weight, shoot dry weight, nodule fresh weight, nodule dry weight, nodule number, and nitrogen percent) in the plants inoculated with *Rhizobium* mutants as compared to those inoculated with the wild-type strain. Furthermore, *Rhizobium* mutants exhibited better recovery because the mutants were more tolerant to Pb than the wild-type RL16 strain. Also, the result demonstrated that *Rhizobium* mutants' inoculation showed more proline production by pea plants, which agrees with their ability to recover the negative effect of Pb contamination. PCR amplification of the *pbr*A gene showed that the wild-type strain and mutants contained the Pb-resistant gene. All these results state that we obtained Rhizobium strains tolerant to heavy metals from contaminated soils and super *Rhizobium* mutants that improved *Pisum sativum* growth parameters. These mutants can be employed efficiently in the bioremediation of contaminated soils.

عنوان الرسالة: الدراسات البيوكيميائية والميكروبيولوجية على بعض مواد حفظ الأغذية الطبيعية
اسم الباحث : وئام نعيم شحات حجازى
الدرجة العلمية: الماجستر الفلسفة فى العلوم الزراعية
القسم العلمى : الكيمياء الحيوية
تاريخ موافقة مجلس الكلية : ٢٠٢٥/٣/١٢
لجنة الإشراف: أ.د/ عبدالمجيد ابراهيم فهمـــــى أستاذ الوراثة ، كلية الزراعة، جامعة المنوفية
أ.د/ خالد صلاح الدين عبداللطيف أستاذ الوراثة ، كلية الزراعة، جامعة المنوفية
د/ هشام حسن نجاتـــــــــــى أستاذ مساعد الوراثة، كلية الزراعة – جامعة المنوفية
د/ عمر محمد زايـــــــــــد مدرس الوراثة، كلية الزراعة – جامعة المنوفية

الملخص العربى

أجري هذا العمل في معمل قسم الوراثة بكلية الزراعة جامعة المنوفية وذلك لدراسة التفاعل بين سلالات الريزوبيوم المعزولة من التربة الزراعية الملوثة بالمعادن الثقيلة ونباتات البازلاء و كانت أهداف الدراسة:

1- عزل وتعريف سلالات ريزوبيوم معزولة من مواقع مختلفة ملوثة مزروعة بالبازلاء.
2- تقييم تحمل العزلات لثلاثة معادن ثقيلة (الكوبالت والنيكل والرصاص) في المختبر.
3- تقييم تأثير العزلات الأكثر تحملاً على نباتات البازلاء تحت ظروف الصوبة.
4- استحداث طفرات ريزوبيوم أكثر تحملاً للرصاص (Pb) بواسطة EMS وتقييم تأثيرها على خواص نباتات البازلاء.

ولتحقيق الأهداف تم اختيار ثلاثة وعشرين موقعًا زراعيًا تمثل محافظات مختلفة (المنوفية والغربية وكفر والشيخ والقليوبية والجيزة والدقهلية والشرقية والبحيرة) مروية بمياه الصرف الصحي لأخذ العينات ثم تم جمع إجمالي ٢٥ عزلة من بكتيريا الريزوبيوم من عقد جذور البازلاء وتوصيفها مورفولوجياً وكيميائيًا وجزيئيًا من خلال توالياتDNA لجين 16S rRNA مما أكد هويتها على أنها .Rhizobium leguominosarum

ويمكن تلخيص النتائج التي تم الحصول عليها على النحو التالي:

أثبتت جميع الاختبارات المورفولوجية أن جميع العزلات المختبرة كانت من بكتيريا الريزوبيوم. كانت البكتيريا سالبة الجرام ومتحركة وقضيبية الشكل و علاوة على ذلك أظهرت الاختبارات الكيميائية الحيوية (الكاتالاز، حساسية المضادات الحيوية، درجة الحموضة، و تحمل كلوريد الصوديوم) بعض الاختلافات في استجابتها:

1) تم اختبار العزلات لتحمل درجة الحموضة على أطباق YEMA عند درجات الحموضة ٤ و٥ و٨ و٩ و١١، مع درجة حموضة تحكم ٦,٨. لم تنمو أي من العزلات عند درجة حموضة ٤ بينما أظهرت العزلتان RL24 و RL25 أكبر نمو عند درجة حموضة ٥. لوحظ أكبر عدد من المستعمرات عند درجة حموضة ٨، وخاصة للعزلتين RL4 وRL17 بينما أظهرت العزلة RL15 أقل نمو و انخفض النمو بشكل ملحوظ عند مستويات pH 9 و ١١.
2) تم اختبار العزلات أيضًا لتحمل تركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم (١ و ٢ و ٣ و ٤٪). أظهرت العزلة RL25 أفضل نمو عبر جميع تركيزات كلوريد الصوديوم بينما أظهرت العزلة RL16 أضعف نمو وخاصة عند ١٪ كلوريد الصوديوم.
3) كانت معظم العزلات متحملة بشكل عام للمضادات الحيوية خاصة العزلة RL1 التي أظهرت تحملا لكل من توبراميسين وفانكومايسين والعزلة RL2 التي أظهرت تحملا للفانكومايسين.

للتعريف الجزيئي تم تضخيم توالياتجين 16S rRNA من جميع عزلات الريزوبيا باستخدام تفاعل الPCR و أنتجت جميع العزلات شظايا DNA من تفاعل الPCR يبلغ طولها ١٥٠٠ زوج قواعد كما تمت مقارنة توالياتالنوكليوتيدات لكل

عزلة بتواليات النوكليوتيدات المعروفة في بنك الجينات باستخدام Blast N و حصلنا على أرقام تعريفية للعزلات قيد الدراسة في بنك الجينات كشفت نتائجنا أن العزلات هي .Rhizobium leguominosarum

ثم تم تقييم السلالات من حيث تحملها لتركيزات مختلفة من النيكل والرصاص والكوبالت في المختبر.

1) في حالة معالجات النيكل أظهرت RL15 أعلى تكوين للمستعمرات عند أقصى تركيز ٥ مليمول. لم تتمكن RL9 و RL20من النمو عند أقصى تركيز ٥ مليمول.
2) في حالة معالجات الرصاص أظهرت RL21 و RL16 أكبر نمو عند ٥ مليمول من الرصاص ولكن فشلت RL9 و RL20في النمو عند أعلى تركيزات الرصاص.
3) في حالة معالجات الكوبالت أظهرت العزلات حساسية أعلى مقارنة بتحملها للنيكل والرصاص عند أعلى التركيزات.

كما أثبتت تجارب الصوبة أن التطعيم بأفضل سلالات متحملة مع المعادن LC90 أدى إلى تحسين تحمل نباتات البازلاء للتلوث بالمعادن الثقيلة و من أجل تحسين تحمل سلالات الريزوبيوم ضد أعلى تركيزات الرصاص.تم استحداث تسعة طفرات من الريزوبيوم عن طريق المطفر EMS لسلالة RL16 وكانت متحملة مع تركيز [6.3mM Pb(NO3)2)] من الرصاص و هو ما يمثل LC95

كما أظهرت هذه الدراسة أن RLM6 كانت أفضل طفرة في إنتاج كمية كبيرة من البرولين خارج الخلية مقارنة بسلالة RL16البرية. أما بالنسبة لـIAA ، فقد أشارت البيانات إلى أن جميع العزلات لديها كميات زائدة في ظل ظروف إجهاد الرصاص

وأخيرًا، يحسن تطبيق الريزوبيوم من خصائص البازلاء (محتوى الكلوروفيل، الوزن الطازج للجذور، الوزن الجاف للجذور، الوزن الطازج للساق، الوزن الجاف للساق، الوزن الطازج للعقد، الوزن الجاف للعقدة، عدد العقد ونسبة النيتروجين) في النباتات الملقحة بطفرات الريزوبيوم مقارنة بتلك الملقحة بالسلالة البرية. وعلاوة على ذلك، أظهرت طفرات الريزوبيوم تعافيًا أفضل لأن الطفرات كانت أكثر تحملاً للرصاص من سلالة RL16 البرية. كما أظهرت النتيجة أن تلقيح الطفرات الريزوبيومية أظهر إنتاجًا أكبر للبرولين بواسطة نباتات البازلاء مما يتفق مع قدرتها على التعافى من التأثير السلبي لتلوث الرصاص. أظهر تضخيم تفاعل الPCR لجين pbrA أن كلا من السلالة البرية والطفرات تحتوي على الجين المقاوم للرصاص.

تؤكد كل هذه النتائج أننا نجحنا في الحصول على سلالات الريزوبيوم المتحملة للمعادن الثقيلة من التربة الملوثة والحصول على طفرات فائقة من الريزوبيوم التي حسنت من إنتاج البازلاء و يمكن استخدام هذه الطفرات بكفاءة في المعالجة البيولوجية للتربة الملوثة.