MENOUFIA JOURNAL OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

https://mjab.journals.ekb.eg

Title of Thesis	**:**	BIOTECHNOLOGICAL STUDIES ON SALINITY-TOLERANT MICROORGANISMS.
Name of Applicant	**:**	Ahmed Ahmed Abd El-Monaem Mousa
Scientific Degree	**:**	M.Sc
Department	**:**	Agric. Botany
Field of study	**:**	Plant Pathology
Date of Conferment	**:**	Feb. 19 , 2023

Supervision Committee:

- Dr. Wafaa H. Mahmoud: Prof. of Pesticides, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. A. E. Elbeltagy : Prof. of Agricultural Zoology, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. H. E. El-Saed : Prof. of Blue Metagenome and Gene Biotechnology, Chair of Aquacultur Division, National Institute of Oceanography and Fisheries, NIOF, Egypt.

ABSTRACT: Halophilic and halo-tolerant bacteria are micro-organisms that living in hyper saline environments. They have many potential in several fields in life such as Industry and agriculture. In this study a total of 17 isolates were obtained from the four saline ponds of Qarun Lake on Nutrient Agar (NA) medium prepared using ponds' water. The 16S rRNA analysis showed that our isolates affiliated with four groups, Firmicutes (47.06% of the isolates) that include family Bacillaceae with six different genera including Bacillus, Halobacillus, Lentibacillus, Oceanobacillus, Thalassobacillus and Virgibacillus, Gammaproteobacteria (35.29% of the isolates) including two genera Halomonas and Salinivibrio, two within Bacteriodetes group (11.76% of the isolates) and one of Alphaproteobacteria (5.88%). Firmicutes seems to be the more dominant group, including microorganisms of various genera, especially Bacillus (37.5%) followed by Halobacillus, Oceanobacillus, Lentibacillus and Virgibacillus (12.5% for each genera). 52.94% of isolates were gram negative, 35.29% were gram positive and 11.76% were gram variable. All isolates were catalase producers and motile. Halotolerance assay observed that only two isolates (11.76 %) were able to grow on the absence of salt and considered as halotolerant, while fifteen isolates (88.24%) were able to grow on NA media with different salt concentrations and considered as halophilic bacteria. Among them, thirteen isolates (76.47%) were able to grow on NA media with 7% NaCL. All isolates grew on NA with 12.5% NaCl; nine iso-lates (52.94%) were able to grow on NA media with 20% salinity, while three isolates (17.65%) appeared on NA media with salt concentration of 22% and considered extremely halophilic bacteria. All isolates were tested for plant growth promoting factors. The results showed that all isolates can produce IAA, while 47.06% of isolates can fix Nitrogen and 47.06 % have ability for phosphate solubilization. Concerning hydrolytic enzymes activi-ties of the isolates, it was found that 58.82% and 76.47% of isolates pro-duced lipase using olive oil and tween80 as a substrate respectively. It was also found that 47.06% of isolates showed ability for esterase production and same percentage for casease production. Gelatinase was excereted by 58.82%, while chitinase was produced by 70.59% of isolates. Five isolates were screened for biosurfactants and other bioactive compounds production. These isolates namly as QSLA1, QSLA7, QSLA14, QSLA16 and QSLA17 which were similar to, Halomonas sp.RS-17, Salinivibrio sp. pr6, Lentibacillus sp.strain BCHS25, Uncultured bacterium clone QAMU23 and Bacillus sp.strain6 in the GenBank database, respectively. Among them two isolates QSLA16 and QSLA17 had NRPs genes encoding for lipopeptide biosurfactants synthetase enzymes and HPLC analysis confirmed presence of different biosurfactants such as, surfactin, fengycin and mycosubtilin. The culture of the two isolates, QSLA1and QSLA7 were analysed by Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) and showed ability for production of antifungal, antimicrobial and antitumer metabolites such as Desulphosinigrin, Undeca-2,4,6,8,10-pentaenal, 11-(2-furyl)-, oxime and Strychane, 1-acetyl-20à-hydroxy-16-methylene. Accordingly, QSLA1 had in vitro antibacterial activity against Salmonella typhi and Acinetobacter baumannii. Whereas, QSLA16 was able to inhibit the growth of bacterial pathogens Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia and Salmonella typhi in contaminated salty whey. In this regard, QSLA1 showed in vitro antifungal activity against Alternaria solani and Fusarium oxysporium f.sp. lycopersici, and had in vivo a siginificant effect on the growth of Fusarium oxysporium f.sp. lycopersici infecting tomato seedlings compared to control and therefore can be used among biological control systems under saline conditions.

Key words: Halophilic bacteria; non-ribosomal lipopeptides; anti-pathogens; solar salterns; salty whey.

عنوان الرسالة: دراسات بيوتكنولوجية على الميكروبات التى تتحمل الملوحة .
اسم الباحث : أحمد أحمد عبد المنعم موسى
الدرجة العلمية: الماجستير فى العلوم الزراعية(ميكروبيولوجيا زراعية)
القسم العلمى : النبات الزراعى
تاريخ موافقة مجلس الكلية : ٢٠٢٣/٢/١٩
لجنة الإشراف: أ.د/ وفاء حنفى محمـــود أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية – كلية الزراعة – جامعة المنوفية
أ.د/ عادل السيد البلتاجى أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية - كلية الزراعة - جامعة المنوفية
أ.د/ حسام عيسى السعيد أستاذ وراثة الأحياء المائية والتقنية الحيوية – المعهد القومى لعلوم البحار والمصايد

الملخص العربى

البكتريا المحبة والمتحملة للملوحة هى كائنات دقيقة تعيش فى بيئات ذات تركيزات ملحية عالية. لذلك يمكن استخدامها فى عديد من المجالات مثل الصناعة والزراعة. فى هذه الدراسة تم عزل ١٧ عزلة من تلك البكتريا على بيئة الأجار المغذى وذلك من المياه الملحية الموجودة فى أحواض تستخدم فى انتاج الملح ومصدر مياه الأحواض هو بحيرة قارون الموجودة بالفيوم. وتم تعريف العزلات من خلال جين 16S rRNA ووجد ان العزلات تنتمى الى ٤ مجموعات بكتيرية وهم مجموعة Firmicutes (٤٧,٠٥٪) متمثلة فى عائلة Bacillaceae من خلال ٦ أجناس Bacillus و *Halobacillus* و *Lentibacillus* و *Oceanobacillus* و *Thalassobacillus* و *Virgibacillus* ومجموعة جاما بروتيوبكتيريا (٣٥,٢٩٪) من خلال جنسى *Halomonas* و*Salinivibrio* (٣عزلات لكل جنس) ثم مجموعة ألفابروتيوبكتيريا (٥,٨٨٪) متمثلة فى جنس *Sphingomomas* وعزلتان(١١,٧٦٪) من مجموعة Bacteriodetes. وتعتبر Firmicutes هى المجموعة السائدة وخصوصاً جنس Bacillus. وبفحص العزلات وجد ان ٥٢,٩٤٪ منها سالبة لصبغة جرام ٣٥,٢٩٪ موجبة لجرام و ١١,٧٦٪ منها متغيرة لصبغة جرام. تبين ان العزلات كلها متحركة وموجبة لاختبار الكتاليز. من خلال اختبارمدى تحمل العزلات للتركيزات الملحية المختلفة تبين أن عزلتان نجحت فى النمو فى غياب الملح بينما نمت ال ١٥ عزلة الاخرى على تركيزات ملحية مختلفة , حيث نمت ١٣ عزلة على بيئة الاجار المغذى بتركيز ٧٪ و نمت كل العزلات على تركيز ١٢,٥٪ بينما ظهرت ٩ عزلات عند تركيز ٢٠٪ و٣ عزلات قد ظهرت عند تركيز ٢٢٪ . تم اختبار قدرة العزلات على تنشيط نمو النبات وقد أظهرت النتائج قدرة كل العزلات على انتاج اندول حمض الخليك بينما ٤٧,٠٦٪ من العزلات كان لها القدرة على تثبيت النيتروجين وبنفس النسبة أظهرت عزلات قدرتها على اذابة الفوسفات الغير ذائبة. وفيما يتعلق بقدرة العزلات على انتاج الانزيمات نجحت ٥٨,٨٢٪ و٤٧,٠٦ من العزلات فى انتاج انزيم الليبيز من زيت الزيتون وtween80 على التوالى بينما أظهرت ٤٧,٠٦٪ من العزلات قدرتها على انتاج انزيم الاستيريز وبنفس النسبة أظهرت عزلات قدرتها على انتاج الكيتينيز. وفيما يخص انتاج المواد المستحلبة تم اختبار قدرة ٥ عزلات على انتاجها وهم QSLA1 و QSLA7وQSLA14و QSLA16 وQSLA17. وتبين قدرة عزلتى QSLA16 وQSLA17 على انتاج تلك المواد من خلال عمل تحليل البلمرة المتسلسل للكشف عن وجود الجينات المسئولة عن انتاج الليبوبتيدات الغير ريبوسومية مثل السرفكتين والفينجيسين والميكوسبتلين وتم تأكيد قدرتهما على الانتاج من خلال جهازHPLC. بينما تم اجراء التحليل الكروماتوجرافى- قياس الكتلة الطيفى جهازGC-MS) Gas chromatography–mass spectrometry) لعزلتى QSLA1 و QSLA7 ومن خلال ذلك تبين قدرة هذه العزلات على انتاج المواد المستحلبة والمواد المضادة للبكتريا والفطريات, لذلك أظهرت العزلة QSLA1 قدرتها على مقاومة البكتريا المرضية *Salmonella typhi* و *Acinetobacter baumannii* . كما أنها أظهرت مقاومة للفطرالمسبب لمرض الندوة المبكرة فى الطماطم والفطر المسبب لمرض الذبول الفيوزاريومى فى الطماطم فى المعمل وأظهرت تجارب زراعة شتلات الطماطم فى الأصص تحسن فى نمو النباتات المصابة بالفطر و ظهور فروق معنوية فى نسبة الاصابة وطول الجذر والساق وطول منطقة الاصابة على الساق مقارنة بالكنترول. لذلك يمكن استخامها ضمن أنظمة المكافحة البيولوجية تحت الظروف الملحية.