التشخيص الكيموحيوي والجزيئي لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* المعزولة من الترب العراقية وتقييم كفاءتها في انتاج المركبات المحفزة لنمو النبات والمثبطة للفطر الممرض *Macrophomina phaseolina*

عبدالكريم عريبي سبع وعبدالله عبدالكريم حسن وهبة محمد يوسف[1]

كلية الزراعة – جامعة تكريت – العراق

الخلاصـة

تم جمع 72 عينة تربة من المنطقة المحيطة بجذور نباتات (الحنطة، الشعير، باقلاء، بصل، سلق، فجل، بطاطا، رقي، البابونك، نعناع، فلفل) ، لغرض عزل بكتريا *Pseudomonas* منها ، اظهرت النتائج وجود 60 عزلة بكتيرية تحمل صفات *Pseudomonas spp*. و بالإعتماد على الاختبارات التفريقية والكيموحيوية تبين ان 48 عزلة تتبع النوع *P.fluorescens* تم تأكيد التشخيص المختبري بأستعمال العدة التشخيصية API 20 E فضلا عن التشخيص الجزيئي اذ استخدم البادئيين 16SPSEfluF، 16SPSEfluR لغرض تضخيم الجين 16S rRNA باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وكانت الحزم الناتجة بحجم جزيئي قدره 848 زوج قاعدي للـ 16S rRNA والذي يضخم فقط لنوع البكتريا *P. fluorescens* ، سجلت البكتريا *P.fluorescens* في نبات البصل أعلى نسبة تواجد بلغت 83.3% يليه الشعير والباقلاء بنسبة 80%، ويليه الحنطة والبطاطا والرقي والنعناع بنسبة 75% ومن ثم البابونك والسلق والفلفل بنسبة 50% واقل تواجد لها كان في نبات الفجل إذ بلغت النسبة 42.8%. اظهرت النتائج ان 34 عزلة استطاعت النمو في وسط خلب الحديد، اما قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* في أنتاج صبغة البايوفردين فقد كانت العزلة P.f16 الأعلى في انتاجها للبايوفردين اذ أعطت أعلى امتصاصية والبالغة 2.62 تليها العزلة P.f14 التي بلغت 2.44 ومن ثم العزلة P.f12 إذ أعطت 2.30 . بينت النتائج ان 9 عزلات كانت غير قادرة على إذابة الفسفور المعدني بينما تمكنت 39 عزلة من إذابته كما أظهرت العزلة البكتيرية P.f16 مقدرة عالية على أنتاج الاندول حامض الخليك IAA التي أعطت 16.28 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

الكلمات المفتاحية:
بكتريا الـ *fluorescens Pseudomonas* ، المركبات المثبطة للفطر الممرض *M. phaseolina* ، التشخيص الجزيئي ، المركبات المحفزة للنمو.

للمراسلة:
عبدالكريم عريبي سبع الكرطاني
البريد الالكتروني:
alkurtany@yahoo.com

الاستلام: 13/ 12 / 2016
القبول: 11 / 4 / 2017

Biochemical and Molecular Identification of *P.fluorescens* Isolated from Iraqi Soils and Evaluation of Their Efficacy in Production of Plant Growth Promoting Compounds and Inhibitor Compounds for *Macrophomina phaseolina*

Abdul-Kareem E. Alkurtany, Abdullah A. Hassan and Hiba Mohammed Yousef
College of Agriculture - University of Tikrit - Iraq

ABSTRACT

72 soil samples Were collected from the rhizosphere of (*Triticum aestivum* L *Hordeum Sp, Vicia faba, Allium cepa, Beta vulgaris L., raphanus sativus, Solanum tuberosum, Citrullas lantus , Matricaria chmomilla, Mentha sp* and *Capsicum annuum*) in order to isolate *Pseudomonas* Results showed that out of 72 soil samples, 60 isolates were belong in its charactercitic to *Pseudomonas* spp. Depending on the differential and biochemical tests, 48 isolates were related to P.fluorescens, Laboratory diagnosis was confirmed using a diagnostic kit APi 20E, as well as molecular identification by using the primers 16SPSEfluF and 16SPSEfluR for the amplification of the gene 16D rRNA using polymerase chain reaction PCR technique the resulting bands have molecular size of 848 base pairs of the 16S rRNA, which only amplitied the species *P. fluorescens*. At level of host plants highest of *P. fluorescens* was in the onions (83.3%) followed by barley and peas (80%) followed by wheat, potatoes, watermelon and mint (75%) then chamomile and chard and peppers (50%) and less presence was in the plant radish as the ratio reached at 42.8%.

Keywords: *fluorescens Pseudomonas*, *M.Phaseolina*, Growth promoting compounds, molecular identification.
Corresponding Author:
Abdul-Kareem E. Alkurtany
E-mail:
alkurtany@yahoo.com
Received: 13/12/2016
Accepted: 11/4/2017

[1] البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثالث

The results showed that 34 isolates of *P. fluorescens* were able to be grown in the media of the iron chelation, ,the ability of isolates isolates in the production of boiverdine dye the isolate P.f16 was the higher in the production of boiverdine as it gave the highest absorbence (2.62) then the isolate P.f14 reached 2.44 and the isolate P.f12 reached 2.30 While absorbance for the other isolates range between 0.33 to 2.62 The results showed that 9 isolates were unable to phosphate sulobilizing the mineral phosphorus, while 39 isolates able to phosphate sulobilizing the mineral phosphorus. isolate P.f16 showed a high capacity to produce indole acetic acid (IAA) amounting to 16.28 Mg.ml $^{-1}$.

المقدمة:

تعرف بكتريا الـ *Pseudomonas* بالبكتريا العملاقة بين جميع اجناس البكتريا (Adhikari وآخرون، 2014)، اذ تؤدي أدوارا هامة في تعزيز نمو النبات (Anitha و Kumudini ، 2013) والمعالجة الحيوية (Wasi وآخرون ، 2013) والترسيب الحيوي ومكافحة مسببات الامراض (Amkraz وآخرون، 2010). وتعد الـ *P.fluorescens* من اهم انواع الجنس *Pseudomonas* والتي تتواجد بكثرة في منطقة الرايزوسفير للنبات (Lucas وآخرون، 2001) والتي تحفز نمو النبات بعدة آليات، إذ لها المقدرة على إنتاج مركبات حيوية محفزة لنمو النبات كما لها المقدرة على إذابة الفسفور وزيادة جاهزيته في التربة، فضلا عن إنتاجها مركبات شبيهه بالهرمونات النباتية مثل Indol-3-acetic acid وحوامض عضوية مثل Succinic acid و Lactic acid والتي تزيد من نمو النبات (Khan وآخرون، 2009) ، لقد نالت *P.fluorescens* أهتماماً خاصاً بين أنواع الأحياء المجهرية المشاركة في السيطرة الحيوية بوصفها أكبر واقوى مجاميع البكتريا المحفزة لنمو النبات PGPR الموجودة في المناطق المحيطة بالجذر Rhizosphere والتي تشارك في المكافحة الإحيائية (Lucy وآخرون ،2004) والتي أستعملت في السيطرة على العديد من الأمراض الفطرية من ضمنها الفطر *Macrophomina phaseolina* (اللشي ومحمود،2014). وبالنظر لأهمية بكتريا *Pseudomonas fluorescens* وتنوع آليات تأثيرها في تحفيز نمو النبات وتثبيط الممرضات التي يتعرض إليها، فقد أجريت هذه الدراسة التي هدفت إلى :

1. عزل بكتريا *P. fluorescens* من تربة الرايزوسفير لنباتات مختلفة وتشخيصها بأستعمال التشخيص الكيموحيوي (التشخيص التقليدي،Api) والتشخيص الجزيئي PCR .
2. تقييم كفاءة هذه العزلات من حيث انتاج صبغة البايوفردين وإنتاج الاندول حامض الخليك وخلب الحديد وجاهزية الفسفور وإنتاج المواد المثبطة لنمو الفطر *M. phaseolina*.

المواد وطرائق البحث:

جمعت 72 عينة تربة من تربة الرايزوسفير لنباتات الحنطة والشعير والباقلاء والبصل والسلق والفجل والبطاطا والرقي والبابنك والنعناع والفلفل لمناطق (ناحية ليلان/كركوك،قضاء رانية/ السليمانية، قضاءكركوك/كركوك)، وكذلك أخذت نماذج تربة ممثلة للمواقع المدروسة من الأفق السطحي (0-30) سم وقدرت فيها صفات التربة الكيمياوية والفيزياوية جدول(1) حسب الطرق الواردة في Black وآخرون ، (1965). تم عزل بكتريا *P.fluorescens* من منطقة الرايزوسفير بطريقة التخافيف والعد بالاطباق بأستخدام وسط King B وحضنت الأطباق في درجة حرارة 28^0 م لمدة 36 ساعة (Saravanan وآخرون، 2004)، انتخبت المستعمرات النامية المنتجة للصبغة المتألقة وأعيد تنميتها على وسط King B للحصول على مستعمرات نقية لإجراء الفحوص التشخيصية التأكيدية عليها.

شخصت عزلات *P.fluorescens* اعتمادا على الصفات المجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية حسب ما ورد من قبل (Palleroni ، 1984) وذلك بدراسة صفاتها المجهرية (ملون كرام، شكل الخلايا، الحركة(Atlas وآخرون، 1995) ،ودراسة صفاتها الزرعية (اختبار النمو في وسط Cetremide Agar، اختبار النمو بدرجات الحرارة 4 ، 42 ^{0}م وإنتاج صبغة البايوفردين، اختبار إنتاج صبغة البايوسيانين، اختبار الحركة (Motility test) واستهلاك المانيتول، النمو على وسط

الماكونكي) حسب Collee وآخرون، 1996 ؛Cruickshank وآخرون، 1975. ودراسة صفاتها الكيموحيوية (اختبار انتاج إنزيم الكاتليز، اختبار الاوكسديز، اختبار اسالة الجيلاتين، اختبار تحلل الأرجنين، اختبار أحمر المثيل، اختبار القابلية على إنتاج الاندول) حسب Baron و Finegold،1990 ؛ Cruickshank وآخرون، 1975؛ Collee وآخرون، 1996 . لغرض تأكيد تشخيص البكتيريا تم استعمال عدة خاصة بالتشخيص API System وهي API20E اتبعت الطريقة المبينة من الشركة المجهزة للعدة التشخيصية BioMerieux,France وكما وضحها (Atlas وآخرون، 1995) ولقراءة نتائج الاختبارات الكيموحيوية في نظام API 20 E تم أستخدام ورقة نتائج الأختبارات المجهزة مع عدة التشخيص.

جدول (1) بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية لتربة مناطق المسح المدروسة

الصفة / المنطقة		السليمانية	كركوك	ليلان
التوصيل الكهربائي	$ds.m^{-1}$	0.86	1.65	1.82
PH		6.48	7.28	7.14
C.E.C	$Cmol.1kg^{-1}$ soil	22	18.4	16
الجبس	$gm.kg^{-1}$	13	15	30
الكلس		255	280	260
المادة العضوية		25	14	12
نتروجين جاهز	$mg.kg^{-1}$	130	80	72
فسفور جاهز		20	16	14
بوتاسيوم جاهز		86	82	80
الطين	التوزيع الحجمي لدقائق التربة $g.kg^{-1}$	20	24	22
الغرين		30	28	28
الرمل		50	48	50
النسجة		Loam	Sand clay loam	Sand clay loam

تم تأكيد تشخيص بكتريا الـ *P.fluorescens* باستعمال تقنية الـ PCR إذ استخلصت عينات الدنا الجينومي للعزلات البكتيرية والبالغ عددها 50 عزلة بكتيرية بأستعمال عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام المنتج من قبل شركة بروميكا ذي الرقم التسلسلي A1120 باسم منتج Wizard® Genomic DNA Purification Kit وذلك حسب تعليمات الشركة المصنعة.واستعملت بادئات جهزت بشكل مسحوق مجفد (Lyophilized) من قبل شركة Alpha DNA، وقد تم إعادة اذابتها بحجم 1000 مايكرولتر من الماء المقطر والمعقم وكانت مواصفات البادئات التي تم استخدامها كما يلي :-

Primer name	Primer sequence 5′ ⟶ 3′	Referenses
16SPSEfluF	TGCATTCAAAACTGACTG	Scarpelliniوآخرون،2004
16SPSEfluR	AATCACACCGTGGTAACCG	Scarpelliniوآخرون،2004

وتضمن مزيج التفاعل لتضخيم قطعة الدنا بتقنية الـ PCR كل من المواد(ماء مقطر 7 مايكروليتر، محلول الدنا 1 مايكروليتر، بادئ امامي1 مايكروليتر، بادئ خلفي 1 مايكروليتر، Master mix 10 مايكروليتر، الحجم النهائي 20مايكروليتر. سحبت هذه المواد باستعمال ماصة دقيقة ونقلت الى أنابيب ابندورف سعة 1.5مل. واجري تفاعل التضخيم وفق البرنامج الحراري الموضح في الجدول (2) .

جدول (2) البرنامج المستخدم تضخيم قطعة الدنا

الخطوة	درجة الحرارة(ْم)	الوقت (دقيقة)	عدد الدورات
المسخ الاولي لشريط الدنا Initial denaturation	94	5	1
المسخ Denaturation	94	1	35
الارتباط Annealing	55	1	
الاستطالة Extension	72	2	
الاستطالة النهائية Final extension	72	5	1

بعد انتهاء عملية تفاعل سلسلة البوليميريز تم التحري عن نواتج التضخيم بالترحيل على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفولتية 70 فولت لمدة 30 دقيقة ثم الكشف عن حزم الDNA على الهلام باستعمال الاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز UV-Transiluminator .

تقييم كفاءة عزلات بكتريا *P.fluorescens* في انتاج المركبات المحفزة لنمو النبات والمركبات المثبطة للفطر *M.Phaseolina*

أجريت بعض الاختبارات لتقييم كفاءة عزلات بكتريا *P.fluorescens* وهذه الاختبارات هي اختبار قابلية عزلات *P.fluorescens* على انتاج المركبات المخلبية للحديد (Siderophores) حسب Payne (1980)، واختبار قابلية عزلات *P.fluorescens* على اذابة الفسفور المعدني من مركب ثلاثي فوسفات الكالسيوم (TCP) حسب Pikovskaya (1948)، وتقدير الاندول حامض الخليك (IAA) حسب Glickmann و Dessaux ،(1995)، وأختبارالتفاعل اللوني للكشف عن صبغة البايوفردين Antoine وآخرون، (1964).

تأثير رواشح *P. fluorescens* في نمو الفطر الممرض *M.Phaseolina*

جهزت أنابيب حاوية على 10ml من وسط المرق المغذي (N.B) ثم لقحت بعزلات بكتريا *P. fluorescens* وحضنت على 28^{0}م لمدة 24 ساعة، أجري النبذ المركزي للأنابيب ومحتوياتها بسرعة 10.000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة بعد ذلك أخذ الراشح وعقم بواسطة مرشحات معقمة حيث أستخدم الراشح في دراسة تأثير رواشح البكتريا *P. fluorescens* على نمو الفطر الممرض وذلك بنقل 1ml من الراشح الى طبق بتري ويصب فوقه وسط PDA المعقم والمبرد ثم يلقح الطبق بقرص قطره 0.5 سم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر وتركت أطباق بدون إضافة الراشح البكتيري لمعاملة مقارنة ،حضنت جميع الأطباق على درجة حرارة 27±1 ^{0}م لحين وصول مستعمرة الفطر في معاملة المقارنة الى حافة الطبق بعدها تم قياس أقطار المستعمرات الفطرية حسب معادلة Abbot الواردة في شعبان والملاح (1993).

النتائج والمناقشة :

عزل وتشخيص بكتريا *P. fluorescens*

التشخيص الكيموحيوي :

تم عزل 60 عزلة من بكتريا *Pseudomonas spp.* من التربة المحيطة بجذور نباتات (الحنطة، الشعير، باقلاء، بصل، سلق، فجل، بطاطا، رقي، بابنك، نعناع، فلفل) لمناطق (ناحية ليلان/كركوك، قضاء رانية/السليمانية، قضاء كركوك/ كركوك)، وبين الفحص المظهري للمستعمرات النامية على وسط King B الملقح بتخافيف التربة الى انها مستعمرات ملساء وصغيرة في الغالب مع وجود بعض المستعمرات الكبيرة وبلونين ابيض واصفر، ومتألقة تحت الأشعة فوق البنفسجية لمقدرتها على انتاج البايوفردين وتمكنت هذه العزلات من النمو في وسط Cetrimide Agar الذي يعد وسطاً انتقائياً لهذه البكتريا، كما اعطت نتائج موجبة لفحصي الاوكسيديز والكاتليز وكانت سالبة لصبغة كرام، ومن هذه الصفات المذكورة سابقا فان هذه المستعمرات تعود للجنس *Pseudomonas spp.* عند إجراء الاختبارات التفريقية والكيموحيوية جدول (3) التي تميز بكتريا *P.fluorescens* عن بقية أنواع الجنس *Pseudomonas* كانت 48 عزلة تتبع النوع *P.fluorescens* اذ امتازت العزلات التابعة لهذا النوع بأنها استطاعت النمو

في درجة 4 ^{0}م ، ولم تتمكن من النمو في درجة 42 ^{0}م وكانت غير متألقة في وسط King A لعدم مقدرتها على إنتاج البايوسيانين، وسالبة لاختبار احمر المثيل وإنتاج الأندول، ولها القابلية على الحركة وإنتاج انزيم الجيلاتينيز وهذه الفحوص تميز بكتريا *P.fluorescens* عن بقية انواع *Pseudomonas* (Lukkaniو Surendranatha Reedy،2014).

الجدول (3) الاختبارات الزرعية والكيموحيوية لبكتريا *P. fluorescens* المعزولة في بعض نباتات محافظتي كركوك والسليمانية

الاختبارات الزرعية والكيموحيوية	النتيجة
النمو في وسط Cetrimide Agar	+
التفاعل مع صبغة كرام	–
انتاج البايوفردين	+
انتاج انزيم الاوكسيديز	+
انتاج انزيم الكاتليز	+
شكل الخلايا	عصوية الشكل
النمو بدرجة 4 ^{0}م	+
النمو بدرجة 42 ^{0}م	–
الحركة	+
انتاج البايوسيانين	–
أنتاج انزيم الجيلاتينيز	+
انتاج الاندول	–
احمر المثيل	–
تحلل الارجنين	+
استهلاك المانيتول	+

التشخيص باستعمال العدة التشخيصية API 20 E

تم تأكيد التشخيص المختبري باستعمال العدة التشخيصية APi20E اذ سجلت النتائج على ورقة النتائج (Result sheet) الخاصة بالعدة التشخيصية، وحولت النتائج الى ارقام واستعمل الدليل APi20E لتحديد النوع البكتيري وحسب توصيات الشركة المنتجة لهذة العدة، ويوضح الجدول (4) نتائج الفحوصات التشخيصية لهذه العدة الى بكتريا *P. fluorescens* .

الجدول (4) الاختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *P.fluorescens* بأستعمال العدة التشخيصية APi20 E

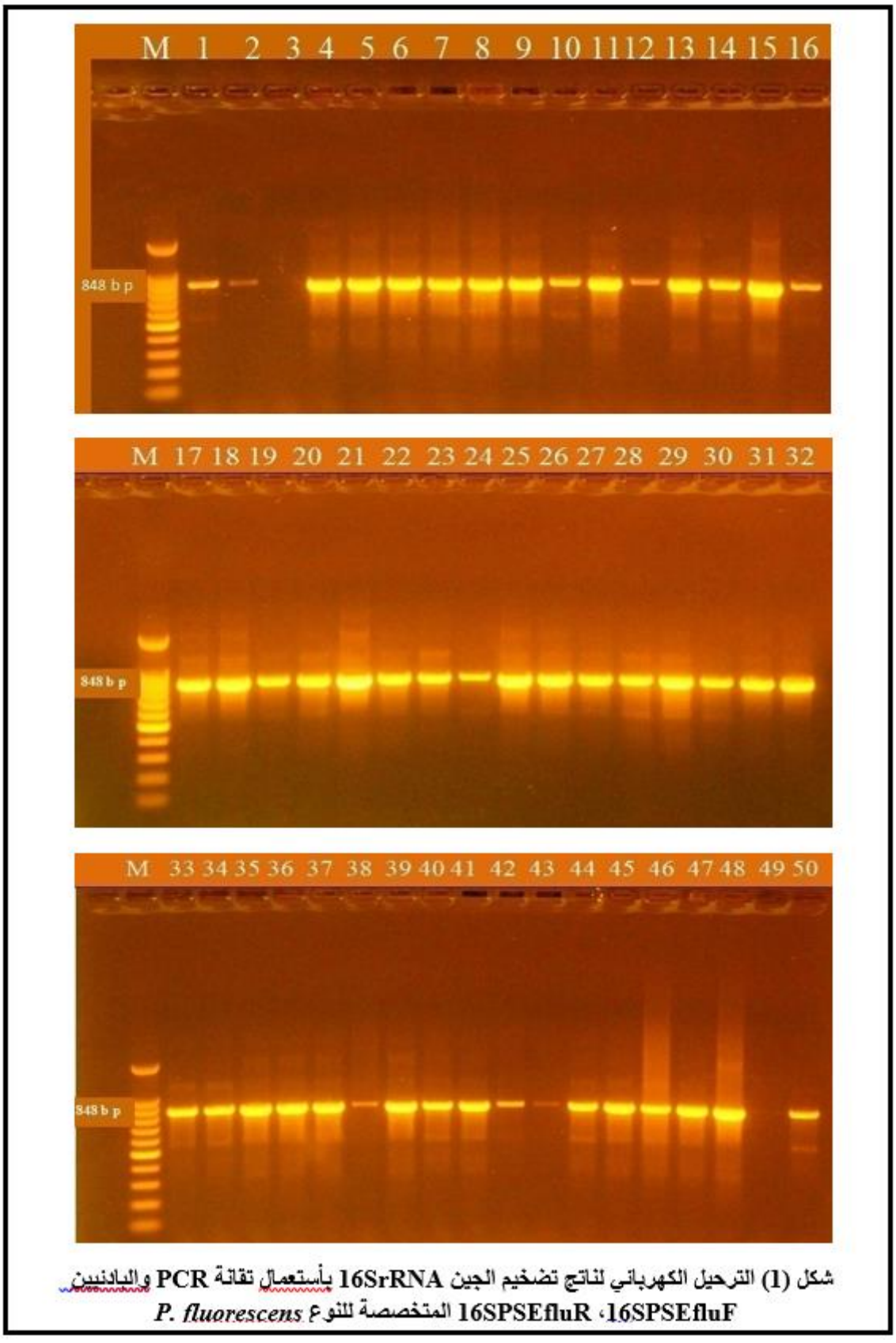
ت	الفحص	النتيجة
1.	انتاج انزيم β-galactosidase	−
2.	تحلل الارجنين	+
3.	تحلل اللايسين	+
4.	الاورنثين	+
5.	استهلاك السترات	+
6.	انتاج غاز H_2S	−
7.	انتاج انزيم اليوريز	−
8.	انتاج انزيم Tryptophandeaminase	−
9.	انتاج الاندول	−
10.	انتاج الاسيتون	−
11.	انتاج انزيم الجيلاتينيز	+
12.	استهلاك سكر الكلوكوز	+
13.	استهلاك سكر المانيتول	+
14.	استهلاك سكر الانوسيتول	+
15.	استهلاك سكر السوربيتول	−
16.	استهلاك سكر الراميوز	−
17.	استهلاك سكر السكروز	+
18.	استهلاك سكر الميليبايوز	−
19.	استهلاك سكر الاوكدالين	−
20.	استهلاك سكر الارابينوز	+

التشخيص الجزيئي لبكتريا الـ *P. fluorescens*

اســتعمل البادئيين 16SPSEfluF ، 16SPSEfluR لغرض تضــخيم الجين 16S rRNA باســتعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ويوضح الشكل (1) نتائج التضخيم لهذا الجين، وكانت الحزم الناتجة بحجم جزيئي قدره 848 زوج قاعدي للــ 16S rRNA والذي يضـــخم فقط لنوع البكتريا *P. fluorescens* وعليه فأن وجود الحزم بحجم جزيئي 848 زوج قاعدي يؤكد عائديتها الى النوع *P. fluorescens* . وهذا يتفق مع ما وجده (Scarpellini وآخرون، 2004) عند اســـتعمال البادئيين أعلاه لتشخيص البكتريا *P. fluorescens* .

يعد التشخيص بأستعمال المؤشرات الجزيئية من الوسائل المهمة والحساسة التي تؤكد التشخيص المجهري و الكيموحيوي لهذه البكتريا، كما ويعد من الطرائق التصنيفية الكفوءة في تحديد الأصل النشؤي لأنواع البكتريا(Drancourt وآخرون ،2000)، نظرا لكفاءة التشخيص الجزيئي وحساسيته للكشف عن أنواع البكتريا بأستعمال بوادئ متخصصة قد أصبح كمرجع لتصنيف البكتريا (Clarridge ،2004). إن منطقة 16S rRNA هي المسؤولة عن تشفير الوحدة 16S لتكوين الرايبوسوم واعتمدت كمعيار (عند حجم 848 زوج قاعدي) لتأكيد نوع البكتريا *P. fluorescens* كونها أكثر ثباتاً وأقل عرضة للتغاير (Gobbin وآخرون، 2007).

أكد تشـخيص البكتريا *P. fluorescens* بأسـتعمال الطريقة الجزيئية التشـخيص بأسـتعمال الاختبارات الكيموحيوية والتشـخيص بأسـتعمال العدة التشـخيصـية APi20E وأن هذا التطابق يؤكد دقة تصـنيف بكتريا *P. fluorescens* . هذه النتائج تتفق مع عدد من الدراسات السابقة.(Mohammad ،2012 ؛ Moustafa وآخرون، 2015).



شكل (1) الترحيل الكهربائي لناتج تضخيم الجين 16SrRNA بأستعمال تقانة PCR والبادئين 16SPSEfluF، 16SPSEfluR المتخصصة للنوع *P. fluorescens*

النسب المئوية لتواجد وانتشار بكتريا *P.fluorescens*

يبين الجدول (5) ان أعلى تواجد لبكتريا *P.fluorescens* على مستوى النباتات سجل في نبات البصل 83.3% يليه الشعير والباقلاء بنسبة80%، ويليه الحنطة والبطاطا والرقي والنعناع بنسبة 75% ومن ثم البابنك والسلق والفلفل بنسبة 50% واقل تواجد كان في نبات الفجل إذ بلغت النسبة 42.8%.

جدول (5) العينات النباتية التي عزلت من تربتها بكتريا *P.fluorescens* والنسب المئوية للعزل

النبات	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزل%
الحنطة *Triticum aestivum* L.	8	6	75
الشعير *Hordeum Sp*	10	8	80
الباقلاء *Vicia faba*	10	8	80
البصل *Allium cepa*	6	5	83.3
السلق *Beta vulgaris L.*	4	2	50
الفجل *raphanus sativus*	14	6	42.8
البطاطا *Solanum tuberosum*	4	3	75
الرقي *Citrullas lantus*	4	3	75
البابنك Matricaria chmomilla	4	2	50
النعناع *Mentha Sp.*	4	3	75
الفلفل *Capsicum annuum*	4	2	50
المجموع	72	48	66.6

ان إختلاف نسب العزل بين النباتات قد يعزى الى اختلاف طبيعة إفرازات الجذور كالأحماض العضوية والكاربوهيدرات والأحماض الامينية والهرمونات والتي تشجع نمو وتكاثر البكتريا ومن ثم تأثيرها في توزيع الأحياء المجهرية في منطقة الرايزوسفير (Bergوآخرون، 2002). وقد يعزى السبب في وجود بكتريا *P.fluorescens* بكثرة في المناطق المحيطة بالجذر لقدرتها على استيطان الجذور النباتية ، كما ان لها متطلبات غذائية قليلة وهذه تعكس قابليتها على التكيف والنمو في أغلب البيئات ولها قابلية استغلال أكثر من مصدر كاربوني بوصفه مصدراً للطاقة ولها قابلية النمو السريع لاستغلالها عدد من المواد المفرزة من الجذور (Humphris وآخرون، 2005).

الكشف عن قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* على إنتاج المركبات الخالبة للحديد

يبين الجدول (6) كفاءة عزلات *P.fluorescens* على إنتاج المركبات الخالبة للحديد، اذ يلاحظ من الجدول ان 14 عزلة كانت غير قادرة على النمو في وسط خلب الحديد وذلك لعدم مقدرتها على إنتاج المركبات الخالبة للحديد، في حين ان 34 عزلة استطاعت النمو في وسط خلب الحديد، وسجلت العزلات *P.f3*، *P.f6*، *P.f12*، *P.f14*، *P.f16* ، *P.f21*، *P.f25*، *P.f33* أعلى قابلية للخلب مقارنة بالعزلات الأخرى وهذا يدل على مقدرة هذه العزلات على انتاج المركبات الخالبة للحديد،ان للمركب 2,2dipyrdil خاصية سحب الحديديك والارتباط به،وهذا يجعله غير متوافر للبكتريا المزروعة في هذا الوسط ، ان البكتريا غير المنتجة للمركبات الخالبة للحديد ولعدم مقدرتها على الحصول على الحديد لا تستطيع النمو في هذا الوسط الذي يدخل في فعاليات ايضية عديدة.اما البكتريا المنتجة التي لها المقدرة على سحب الحديديك من مركب 2,2dipyrdil فهي البكتريا المنتجة للمركبات المخلبية للحديد والتي تستفيد من الحديد في الفعاليات الايضية (Leoni وآخرون،1996). أما بالنسبة لأختلاف القابلية المخلبية للحديد باختلاف العزلات ربما يعزى إلى التباين الوراثي للعزلات المدروسة وهذا التباين ينعكس على الأداء التركيبي والوظيفي

والفسلجي للبكتريا ومن ثم تتباين مقدرتها على القابلية المخلبية وحسب التعبير الجيني لهذه الصفة (O'Sullivan وO'Gara، 1992) لقد درست عملية نقل الحديد الى داخل الخلية المايكروبية بمساعدة المواد الخالبة حتى في ظروف وجود كميات قليلة منه (Rachid وAhmed،2005).

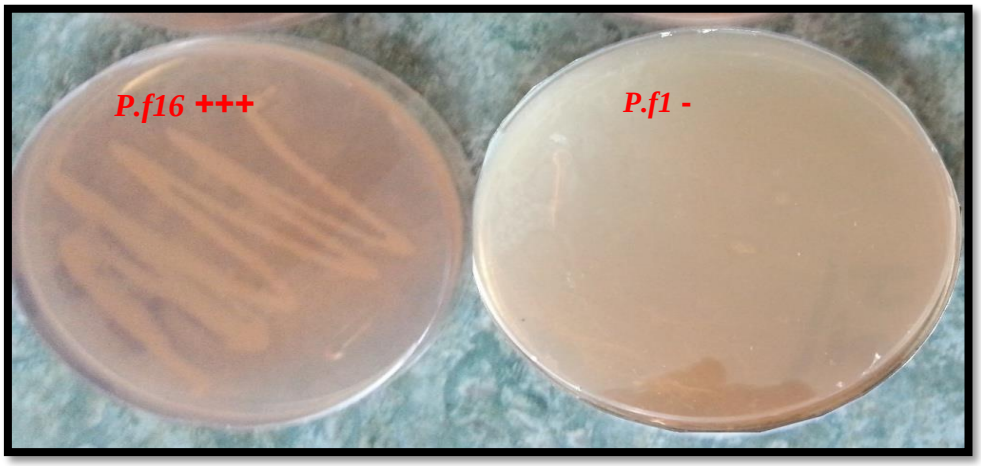
جدول (6) قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* على إنتاج المركبات الخالبة للحديد

الصفة / رقم العزلة	خلب الحديد	الصفة / رقم العزلة	خلب الحديد
P.f1	-	***P.f25***	+++
P.f2	–	***P.f26***	-
P.f3	+++	***P.f27***	++
P.f4	+	***P.f28***	+
P.f5	++	***P.f29***	-
P.f6	+++	***P.f30***	++
P.f7	-	***P.f31***	++
P.f8	-	***P.f32***	-
P.f9	++	***P.f33***	+++
P.f10	+	***P.f34***	++
P.f11	-	***P.f35***	++
P.f12	+++	***P.f36***	+
P.f13	++	***P.f37***	+
P.f14	+++	***P.f38***	++
P.f15	-	***P.f39***	+
P.f16	+++	***P.f40***	-
P.f17	+	***P.f41***	+
P.f18	+	***P.f42***	-
P.f19	-	***P.f43***	++
P.f20	-	***P.f44***	-
P.f21	+++	***P.f45***	++
P.f22	+	***P.f46***	+
P.f23	+	***P.f47***	++
P.f24	++	***P.f48***	+

– عدم وجود القابلية المخلبية للحديد + قابلية خلب الحديد واطئة ++ قابلية خلب الحديد متوسطة +++ قابلية خلب الحديد عالية

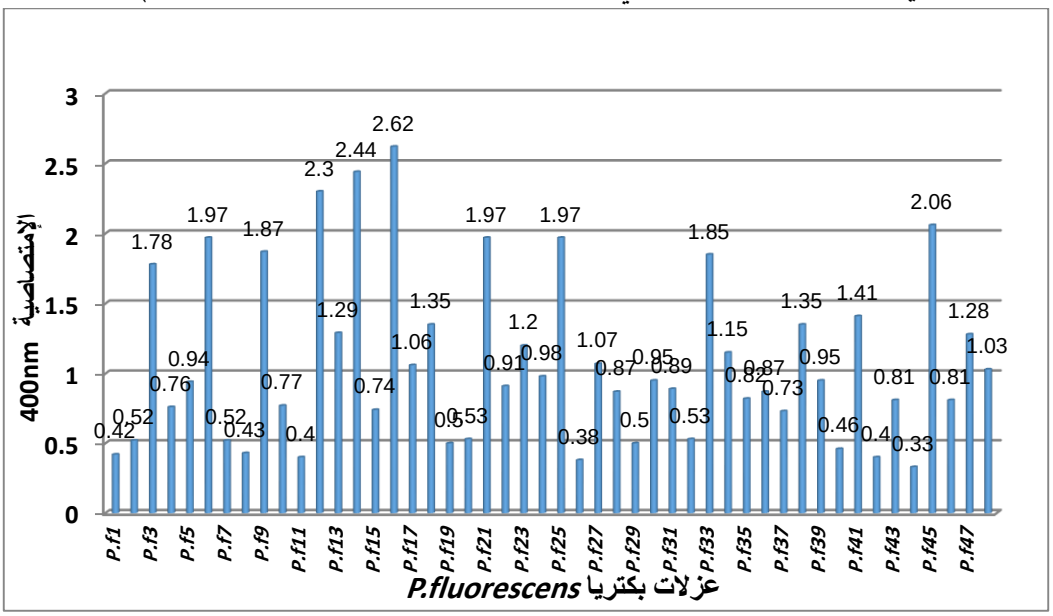
ان هذه الطريقة هي من الطرائق العامة للكشف على قابلية انتاج المركبات الخلابية للحديد دون تحديد نوع المركب واستعملت في الكشف عن المركبات الخلابية للحديد من نوع الـ hydroxymate و الـ Catechol .

منظور(1) مقارنة نمو العزلة *P.f16* لبكتريا *P.fluorescens* على وسط خلب الحديد



الكشف عن قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* على انتاج صبغة البايوفردين:

يبين الشكل (2) قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* في أنتاج صبغة البايوفردين، وقد أظهرت النتائج ان العزلة *P.f16* كانت الأفضل في انتاجها للبايوفردين اذ أعطت أعلى امتصاصية والبالغة 2.62 تليها العزلة*P.f14* إذ بلغت 2.44 ومن ثم العزلة *P.f12* والتي سجلت 2.30 في حين تراوحت الامتصاصية لبقية العزلات بين 0.33 الى 2.62. ان إنتاج البايوفردين يتأثر بصورة رئيسة بوجود الحديد اذ ان زيادة ايونات الحديديك يقلل من الانتاجية ويثبط الانتاج بالكامل عند وجود الحديديك بتركيز 248 مايكروغرام/مليلتر في الوسط (Villegasواخرون، 2002) كما يتأثر انتاج البايوفردين بالعديد من العوامل البيئية مثل: الرقم الهايدروجيني الحامضي الذي يزيد من ذوبان الحديد ومن ثم يقلل الانتاج وكذلك فان توفير التهوية ومستوى عالي من الاوكسجين له اهمية في زيادة الانتاجية(Lenhoff، 1963)، كما وجد Rachid وAhmed (2005) ان اكبر انتاجية للبايوفردين تكون في وسط Succinate عند استعمال Succinc acid مصدراً للكاربون. يرتبط انتاج البايوفردين بجاهزية الحديد فعندما يكون تركيز الحديد عالياً داخل الخلية البكتيرية فان الجينات المسؤولة عن انتاج البايوفردين سوف تتوقف عن التشفير بسبب ارتباط معقد Fur – Fe^{+2} مع مشغلات الجينات الموجودة في تلك المنطقة ومن ثم تكبح عملية الانتاج، ومن ناحية اخرى فأن انتاج البايوفردين يعتمد على وجود البايوفردين الذي يعمل محفزاً ايجابياً يؤثر في تعبير الجينات (Mossialos وآخرون، 2002).



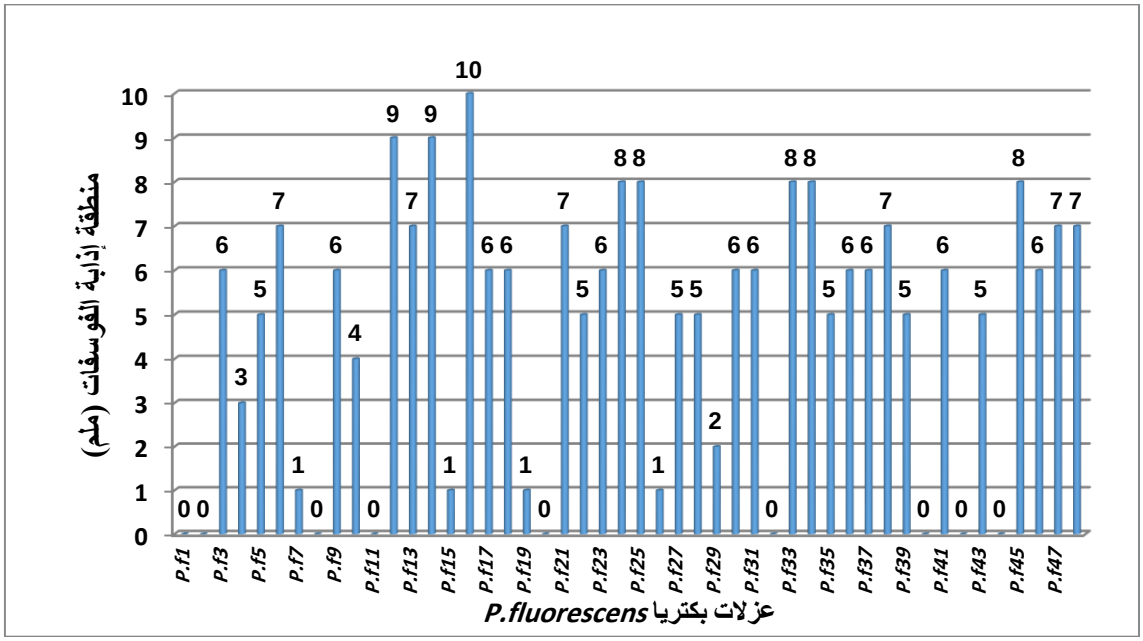
شكل (2) قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* في إنتاج صبغة البايوفردين بدلالة الامتصاصية

الكشف عن قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* على إذابة الفسفور المعدني من مركب ثلاثي فوسفات الكالسيوم (TCP) :

أوضحت نتائج فحص مزارع عزلات بكتريا *P.fluorescens* على إذابة الفسفور المعدني بعد 7 أيام من زراعتهما على الوسط الزرعي (PVK) والموضحة في الشكل (3) ان 9 عزلات كانت غير قادرة على إذابة الفسفور المعدني بينما تمكنت 39 عزلة من إذابة الفسفور المعدني وأظهرت العزلات *P.f12* ، *P.f14* ، *P.f16* أعلى إذابة للفسفور إذ بلغت منطقة الإذابة حول المستعمرات ذات قطر 9 ،9، 10ملم على التوالي.

إن فعالية إذابة الفوسفات تقدر بمقدرة الأحياء الكيموحيوية لتكوين الحوامض العضوية واللاعضوية ويمكن اعتبار هذه العملية من أهم الاليات المتفق عليها من قبل معظم الباحثين ويتم عن طريقها إذابة المركبات الفوسفاتية اللاعضوية، وقد ذكر Bear، (1969) أن معظم الأحياء الدقيقة في التربة تقوم بعملية الإذابة عن طريق إنتاجها الحوامض اللاعضوية (الكبريتيك والنتريك والفوسفوريك) وكذلك حوامض عضوية (الفوليك Fulvic الهيوميك Humic السيتريك Citric الأوكزاليك Oxalic وحامض الليسينيك Licinic Acid) التي تزيد من ذوبان معادن التربة، وبين Marra وآخرون، (2012) ان نوع وتركيز الاحماض يختلف حسب جنس البكتريا او الفطر المنتج لهذه الاحماض وإن الحوامض التي وجدت في معظم البحوث على الأوساط الغذائية السائلة هي الستريك، السكسونيك، اللاكتيك، الأوكزاليك، الايزوستريك، الفيومارك، وحامض الترتاريك وأعزى فعل هذه الأحماض إلى صفاتها المخلبية التي تمكنها من عمل مركبات معقدة مع إيونات الـ Ca^{+2} و Mg^{+2} و AL^{+3} و Fe^{+3}، أو قد تعود مقدرة الاحياء على إذابة الفوسفات الى افراز الإنزيمات وخاصة انزيم Phosphatases (Aseri وآخرون، 2009) وإنزيمPhytase (Maougalوآخرون، 2014).

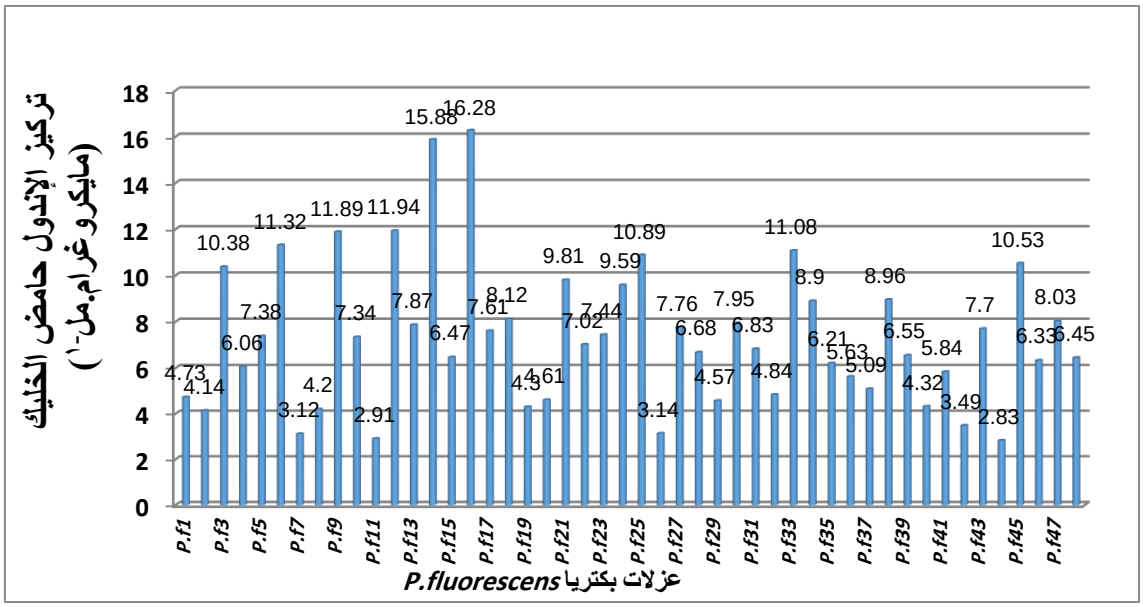
إذ أن إذابة الفوسفات من قبل البكتريا ناتج عن إنتاجها مجموعة من الأحماض العضوية المختلفة (Rashid وآخرون، 2004) وهذا يفسر مقدرة بعض السلالات على إذابة الفوسفات وعدم مقدرة سلالات أخرى على ذلك، ويعود تباين العزلات الواضح في قطر منطقة الإذابة إلى مقدرتها على إنتاج الأحماض العضوية وطبيعة ونوع الحامض العضوي المنتج.هذا الأختبار يؤكد كفاءة بكتريا *P. fluorescens* في اذابة الفسفور المعدني.



شكل (3) قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* على إذابة الفسفور المعدني من مركب ثلاثي فوسفات الكالسيوم (TCP)

الكشف عن قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* على أنتاج الأندول حامض الخليك Indole-3-acetic acid:

يبين الشكل (4) كفاءة عزلات بكتريا *P.fluorescens* على أنتاج الاندول حامض الخليك، اذ يلاحظ من الشكل ان هناك تباينا في أنتاج IAA باختلاف العزلة البكتيرية، وأظهرت العزلة البكتيرية *P.f16* مقدرة عالية على أنتاج الاندول بلغت 16.28 مايكروغرام .مل$^{-1}$ ، تليها العزلتان *P.f14* ، *P.f12* بأنتاج قدره 15.88 و 11.94 مايكروغرام .مل$^{-1}$ على التوالي ، وأقل إنتاج للأندول كان في العزلة *P.f44* اذ بلغ 2.83 مايكروغرام .مل$^{-1}$.تتفق هذه النتائج مع نتائج (Sivasakthi وآخرون ،2014 ؛ Lukkani و SurendranathaReedy،2014)، الذين أكدوا ان لعزلات بكتريا *P.fluorescens* مقدرة متفاوتة في إفراز الاوكسين IAA في المزارع السائلة، وقد يعود ذلك الى اختلاف التراكيب الوراثية للنوع الواحد وهذا ما ينعكس على تباين خصائصها البايولوجية ومنها إفرازاتها في وسط النمو، وأشارت دراسات عديدة بان للأحياء المجهرية دور مهم في إنتاج مديات واسعة من الهرمونات النباتية ولاسيما الاندول حامض الخليك IAA (Noel وآخرون، 1996).



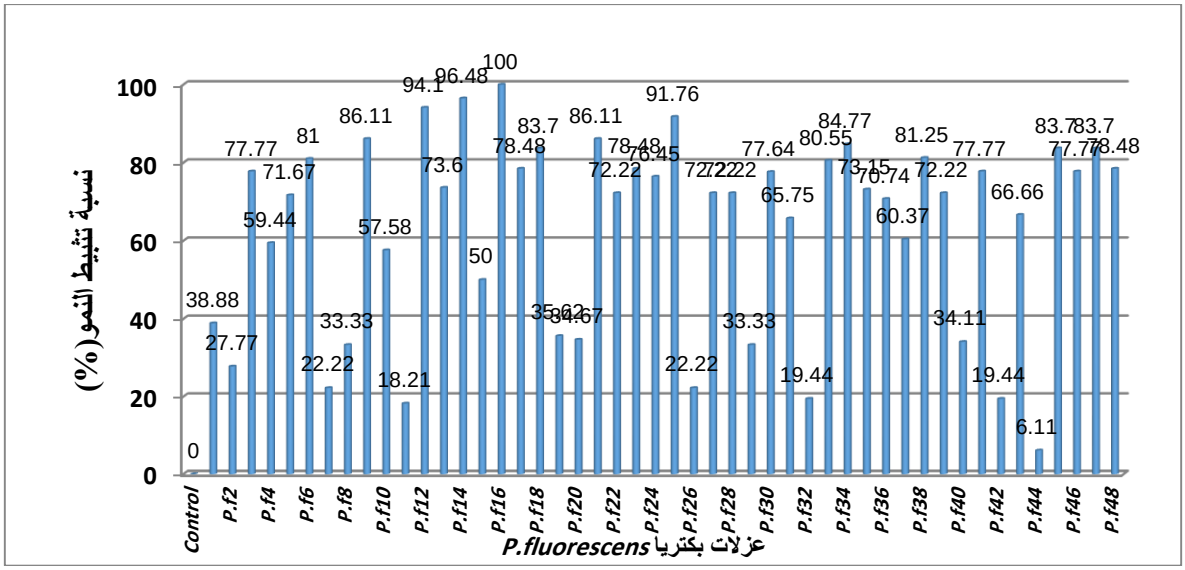
شكل (4) قابلية عزلات بكتريا *P.fluorescens* على أنتاج الأندول حامض الخليك Indole-3-acetic acid

تأثير إفرازات خلايا عزلات *P.fluorescence* على نمو الفطر الممرض *M.Phaseolina*

أظهرت نتائج الاختبار شكل (5) أن لإفرازات خلايا عزلات بكتريا *P.fluorescens* كفاءة تضادية ضد الفطر *M.Phaseolina*في الوسط PDA وبنسب مختلفة إذ سببت الإفرازات البكترية تثبيطاً تاماً للفطر بلغ 100% للعزلة *P.f16* (منظور 2) تليها العزلتين *P.f14*، *P.f12* بنسبة 96.48 و 94.10% على التوالي وتراوحت نسبة التثبيط للعزلات الأخرى بين 100 . %- 6.11

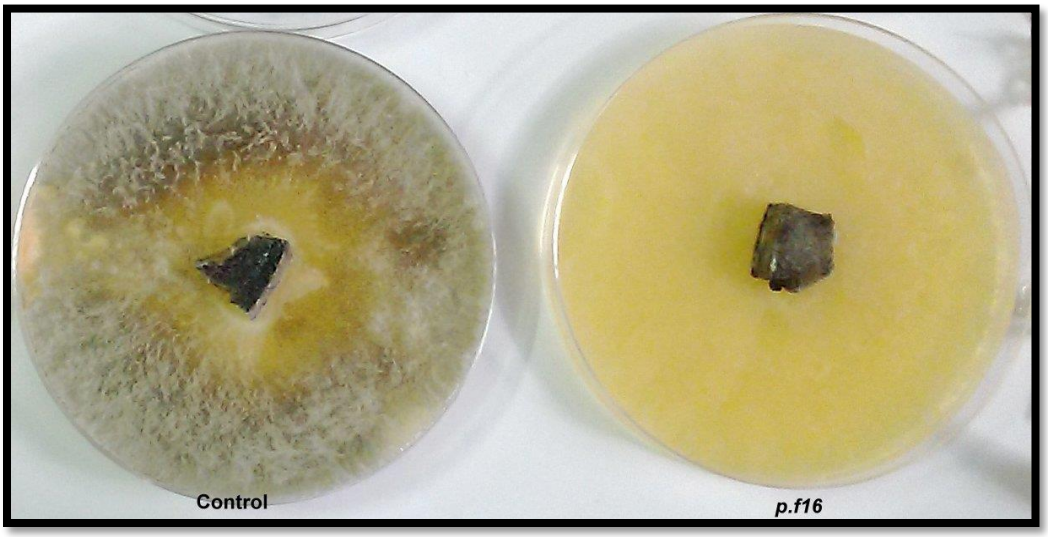
توصل Srivastava و Shalini (2009) الى أمكانية استخدام رواشح عزلات بكتريا *P.fluorescence* بوصفها عامل كفوء في المكافحة الحيوية للفطريات الممرضة للنبات، وبين خزعل (2007) ان لرائق العزلة البكتيرية PFAS14 فعالية تثبيطية ضد الفطرين الممرضين للنبات *R.solani* و*F.oxysporum* ، ويمكن تفسير الفعالية التثبيطية للرائق لاحتوائه على عدد من المضادات الحيوية المختلفة مثل المركبات الخالبة للحديد وسيانيد الهيدروجين، فضلا عن بعض الإنزيمات الهاضمة الخارج خلوية مثل Chitinase المثبطة للفطر الممرض (Dev و Dawande، 2010) إذ أن الجدار الخلوي للفطريات الممرضة للنبات تتكون أساسا من glucan، Chitin و إن كل من Chitinase، B1-3glucanase من الإنزيمات الرئيسية التي تعمل على هدم وتحليل

الجدار الخلوي لهذه الفطريات تشكل بذلك ثغور مما يسهل عملية إختراقها وإستخلاص المركبات الغذائية اللازمة لنموها (Cao وآخرون ، 2009).



شكل (5) تأثير إفرازات عزلات بكتريا *P.fluorescence* على نمو الفطر الممرض *M.Phaseolina*

منظور(2) تأثير رائق العزلة البكتيرية P.f16 على نمو الفطر الممرض



المصادر:

خزعل، علي قاسم (2007). استخلاص وتنقية صبغة البايوفردين من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* المعزولة محلياً وامكانية استخدامها كعامل سيطرة بايولوجية. أطروحة ماجستير–كلية العلوم – جامعة بغداد.

شعبان، عواد والملاح، نزار مصطفى (1993). المبيدات. دار الكتب للطباعة والنشر– جامعة الموصل.

اللشي، نجوى بشير وعبير احمد محمود (2014). المقاومة الحيوية لموت بادرات نبات الباميا بأستخدام المبيدين الاحيائين *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis*. مجلة علوم الرافدين ، المجلد 25، العدد 1 ، ص 23–39.

Adhikari,A., Rana,G. and Mandal T.2014.An in silico assessment of molecular evolution at 16s rRNA of *Pseudomonas sp*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3 (8) , 518 - 527.

Amkraz,N., Boudyach,E.H., Boubaker,H., Bouizgarne,Ait Ben,B. and Aoumar, A. 2010.Screening for *fluorescent pseudomonades*,isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. World J. Microbiol. Biotechnol. 26 (6):1059-1065.

Anitha, G., and Kumudini, B.S.2013. Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads and their effect on plant growth promotion. Journal of Environmental Biology, Vol. 35, 627-634.

Antoine, A.D., Morrison, N.E., and Hanks, J.H. 1964. Specificity of improved methods for Mycobactin Bioassay by *Arthrobacter terregens*. J.Bacteriol. 88:1672-1677.

Aseri, G. K., Jain, N., and Tarafdar. J.C. 2009. Hydrolysis of Organic phosphate forms by phosphatases and phytase producing fungi of arid and semi arid soil of India.American-Eurasian J.Agric.and Environ.Sci.5(4):564-570.

Atlas, R.M., Parks, L.C. and Brown, A.E. 1995. Laboratory manual of experimental microbiology. Mosby-Year Book, U.S.A.

Baron,E.J., and Finegold, S.M. 1990. Diagnostic microbiolgy.8th .Ed. The C.V.Mosby Company.

Bear,F.1969.Chemistry of the Soil.Second Edition.Van Nostrand Reinhold Company,New York,Cincinnati, Toronto, London, Melbourne. PP. 279-282.

Berg,G., Roskot,N., Steidle, A.,Ebler, L.,Zocck, A.,and Smalla,K.2002.Plant- Dependent genotyping and phenotyping diversity of antagonistic rhizobacteria Isolation from different Verticillium host plant. Appl.Environ.Microbiol.68:3328-3338.

Black, C.A. 1965.Methods of soil analysis.part 1. Physical properties Amer Soc . Agron. Inc. publisher, Madison Wisconsin, USA.

Cao,R., Liu,X., Gao,K., Mendgen,K., Kang, Z., Gao, J., Dai, Y., and Wang, X.2009. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soil borne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Curr Microbiol*, 59: 584-592.

Clarridge, J.E.2004.Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Clinical Microbiology Reviews.17:840 - 862.

Collee,J.G., Miles, R.S., and Watt, B.1996. Tests for the identification of Bacteria In Mackie and McCartney practical medical Microbiology by Colle, J.G.; Fraser,A.G.; Marmion,B.P. and Simmons,A. 14th ed, Churchill Livingstone,Singapore. p:131-149.

Cruickshank,R., Duguid, J.P., Marmion, B.P.,and Swain, R.H.A. 1975. Medical Microbiology. 12th ed. (Vol.2) Churchill Livingstone, Great Britain.

Dev, N., and Dawande, A.Y.2010. Biocontrol of soil borne plant pathogen *Rhizoctonia solani*using *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas fluoresceus* Asiatic. *J. Biotech.Res.*,1, 39-44.

Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, P., and Raould, D.2000. 16S ribosomal DNA sequences analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. Clin. Microbiol. 38: 3623 - 3630.

Glickmann, E., and Dessaux, Y.1995. Acritical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria .Appl . Environ . Microbiol . 61 : 793 – 796 .

Gobbin,D., Rezzonico,F., and Gessler,C. 2007. Quantification of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf153 in soil using a quantitative competitive PCR assay unaffected by variability in cell lysis- and DNA-extraction efficiency. Soil Biology and Biochemistry, 39:1609–1619.

Humphris,S.N., Bengough, A.G., Griffiths, B.S., Kilham, K., Rodger, S., Stubbs,V., Valentine, T. and Young, I.M.2005. Root Cap influence root colonization *Pseudomonas fluorescens* SBW 25 on Maize. FEMS. Microbiol. Lett. 54:123-130.

Khan, M.S., Zaidi, A., Wani., P.A., Ahemad, M., and Oves, M. 2009. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) Microbial strategies for crop improvement. Springer, Berlin, pp 105–132.

Lenhoff, H.1963. An Inverse relationship of the effect of oxygen and Iron on the production of fluorescin and cytochrome C by *Pseudomonas fluorescens*. Nature. 199:601-602.

Lucas,Y. 2001. The role of plant in controlling rates and products of weathering:Importance of Biological Pumping. Annu. Rev. Earth Plant. Sci. 29:135-63.

Lucy,M., Reed,E., and Glick,B.R. 2004 . Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek Inter.J.Gen. Mol. Microbiol. 86:1-25.

Lukkania,N.J., and Surendranatha Reddya E.C. 2014 . Evaluation of plant growth promoting attributes and biocontrol potential of native *fluorescent Pseudomonas* spp.against *Aspergillus niger* causing collar rot of groundnut. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 4(4), 256-262 .

Maougal,R.T., Brauman,A., Plassard,C., Abadie,J., Djekoun,A., and Drevon, J.J.2014. Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency.Eur J Soil Biol 62:8–14.

Marra, L.M., Soares, C.R., Oliveira, S.M., Ferreira, P.A.A., Soares, B.L., Carvalho, R.F., Lima, J.M., and Moreira, F.M.2012. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. Plant Soil 357:289–307.

Mohammad , Anwar Othman.2012. Effect of *Pseudomonas* isolates on the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) yield and nutritional value.Ph.D dissertation in Agricultural Science – soil and water submitted to the council of the faculty of Agricultural Sciences university of sulaimani.

Mossialos,D.,Ochsner,U., Baysse,C., Chabl, P., Prinary, J.P., Koedom, N., Budzikiewicz, H., Fernandez, D.U., Schfer, M., Ravel, J., and Cornelis, P.2002. Identification of new conserved, non-ribosomal peptide synthetases from *fluorescent Pseudomonas* involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. Mol. Microbiol. 45:1673-1685.

Moustafa,M., Eissa,A.E., Laila,A.M., Gaafar,A.Y., Abumourad, I.M., and Elgendy, M.Y.2015.Investigations into the Potential Causes of Mass Kills in Mari-Cultured Gilthead Sea Bream, Sparus aurata, at Northern Egypt. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 6 : 466 - 477.

Noel, T., Sheng, C., Yost, C., Pharis, R., and Hynes, M.1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth promoting rhizobacterium : direct growth promoting of canola and lettuce. Can. J. Microbiol. 42: 279-283.

O'Sullivan, D.J., and O'Gara, F.1992. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol.Rev. 56:662-672.

Palleroni, N.J.1984.Gram negative aerobic rods and cooci family:Pseudomonasdaceae *In* Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology by Krieg.N.R. and Holt,J.G. .(Vol.1) Williams and Wilkins.Baltimore,p:141-199 .

Payne, S. M. 1980 . Synthesis and utilization of siderophores by *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. 143 : 1420 - 1424.

Pikovskaya, R.E.1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species, Mikrobiologiya 17:362–370.

Rachid, D., and Ahmed, B.2005. Effect of Iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. Afr. J.Biotech. *4*:697-702.

Rashid, A., Yasin, M., Ashraf, M., and Mann, R.A.2004. Boron deficiency in calcareous soils reduces rice yield and impairs grain quality. *International Rice Research Notes 29:58-60.*

Saravanan,T., Bhaskaran, R., and Muthusam, M.2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in Banana roots (*cv. Rasthali*) against Fusarium with disease. Plant Pathol. J. 3:72-80.

Scarpellini, M., Franzetti,L., and Galli, A.2004.Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. FEMS Microbiology Letters 236: 257–260.

Sivasakthi,S., Usharani,G., and Saranraj, P.2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria(PGPR)-Pseudomonas fluorescens and Bacillus *subtilis*:Areview. African Journal of Agricultural Research.Vol.9(16), PP.1265-1277.

Srivastava, R., Shalini, K.2009. Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. Intern. *J. Microbiol*, 7(2), 1937.

Villegas, M.E., Villa, P., and Frias, A.2002. Evaluation of siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* spp. Rev. Lat.Amer.Microbil. 44:112-117.

Wasi,S., Tabrez,S., and Ahmad,M .2013. use of *pseudomonas spp*. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. Environment Monitoring and Assessment 185: 8147-8155.