عزل وتشخيص بكتريا الزوائف *Pseudomonas* المشجعة لنمو النبات من المنطقة المحيطة بجذور بعض النباتات النامية في ترب جبسية في محافظة صلاح الدين

خليل خالد خليل[1] وعبد الكريم عريبي سبع الكرطاني*

* أستاذ دكتور – قسم علوم التربة والموارد المائية– كلية الزراعة– جامعة تكريت

الخلاصــة

جمعت عشرون عينة تربة جبسية من المنطقة المحيطة بجذور نباتات – الحنطة ، الشعير ، الذرة الصفراء ، الجت ، النعناع - بهدف عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas* من هذه العينات ، اجريت عملية التشخيص بالاعتماد على الصفات المزرعية والمظهرية والكيموحيوية ، وتم تأكيد التشخيص بجهاز Vitek 2 compact system ، اظهرت النتائج بأن النوع *Pseudomonas putida* سجل اعلى نسبة مئوية للتردد بلغت (55%) تلاه النوع *Pseudomonas fluorescens* بنسبة بلغت (30%) بينما اعطت الانواع *Pseudomonas aeurginosa* و *Pseudomonas cepacia* و *Pseudomonas pseudomallei* نسبة بلغت (5%) لكل عزلة ، وتبين من نتائج اختبار كفاءة العزلات في انتاج الأوكسين (أندول حامض الخليك IAA) وإذابة الفوسفات وانتاج المركبات المخلبية (Siderophore) ، تفوق العزلة KH-K13 العائدة الى بكتريا *P. fluorescens* في إنتاج الأندول حامض الخليك IAA إذ بلغ تركيزه 9.12 مايكروغرام.مل$^{-1}$ وإذابة الفوسفات الذي بلغ قطر الهالة 2 وكانت متوسطة في انتاج Siderophore ، تلتها العزلة KH-K12 العائدة الى بكتريا *P. putida* بتركيز 7.62 مايكروغرام.مل$^{-1}$ لأندول حامض الخليك وإذابة الفوسفات بلغ قطر الهالة 1.86 وإنتاج متوسط Siderophore ، اما العزلة KH-K20 *P. cepacia* التي بلغ إنتاجها IAA بتركيز 5.00 مايكروغرام.مل$^{-1}$ وإذابة فوسفات بلغ 1.68 وإنتاج متوسط من Siderophore ، أما عزلة *Pseudomonas pseudomallei* فقد أبدت مقدرة على إذابة الفوسفات بلغ قطر الهالة 1.40 وإنتاج الأندول حامض الخليك IAA بتركيز 3.12 مايكروغرام.مل $^{-1}$ وانتاج متوسط من Siderophore ، أما عزلة *Pseudomonas aeruginosa* كانت غير قادرة على إذابة الفوسفات وبلغ انتاجها للأندول حامض الخليك IAA بتركيز 3.65 مايكروغرام.مل$^{-1}$ وإنتاج عالي من Siderophore.

الكلمات المفتاحية:
Pseudomonas spp ، الاندول حامض الخليك ، اذابة الفوسفات ، المركبات المخلبية.

للمراسلة:
خليل خالد خليل
البريد الالكتروني:
Khalil.khalid70@yahoo.com

الاستلام: 2016/10/30
القبول: 2017/3/12

Isolation and Identification of *Pseudomonas* Bacteria Promoting Plant Growth from Rhizosphere of Some Plants Growth in Gypsiferous Soils in Salah-Aldin Governorate

Khalil Khalid Khalil and Abdul Kareem Eraibi Sabaa Alkurtany*

*Prof. Dr.- Department of Soil Sciences & Water Resources-College of Agriculture- Tikrit University

ABSTRACT

Twenty samples of gypsiferous soil were collected from the rhizosphere soil of different plants (*wheat Triticum aestivum , barley Hordeum vulgare , Zea mays L, alfalfa Medicago sativa , Mentha pulegium L*) to isolate and diagnoses the *Pseudomonas* bacteria from these samples, the diagnostic process was conducted based on the culture, microscopic and biochemical characteristics, as well as the diagnosis was confirmed by using device Vitek 2 compact system, the results showed that the *Pseudomonas putida* species scored the highest percentage ratio of the frequency reached (55%), followed by the *Pseudomonas fluorescens* species as a percentage reached (30%), while the species *Pseudomonas aeurginosa* and *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas pseudomallei* gave a percentage of the frequency reached (5%) for each one of these isolates. The results of the ability of these bacteria isolates on indole acetic acid (IAA)

Key words:
Pseudomonas spp, Indole acetic acid, phosphate solubilizing , Siderophores
Corresponding Author:
Khalil K. Khalil
E-mail:
Khalil.khalid70@yahoo.com
Received: 30/10/2016
Accepted: 12/3/2017

[1] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

production and phosphate solubilizing and Siderophore production, showed that the isolate KH-K13 which belong to *P. fluorescens* gave the highest values in production of IAA reached 9.12 5 µg/ml and phosphate solubilizing reached 2mm and production of Siderophore average, followed by *P. putida* (KH-K12) which gave 7.62 µg/ml , 1.86 and average respectively, then 5 µg/ml, 1.68 and average respectively for *P. cepacia* (KH-K20) isolate , then 3.12 µg/ml , 1.40 and average respectively for *P.pseudomallei* (KH-K4) isolate, while the *P. aeruginosa* (KH-K10) isolate was not capable of phosphate solubilizing , but is capable of IAA production reached 3.65 µg/ml and it showed a high capable for the production of Siderophore .

المقدمة:

تقع بكتريا *Pseudomonas* ضمن عائلة Pseudomonadacae العصوية السالبة لصبغة كرام غير المخمرة لسكر اللاكتوز **(1992 Palleroni)** ، ذكر **Zumft (1997)** إن العالم الألماني Walter Migula من أوائل الذين أشاروا إلى هذا الجنس عام 1894 ، وذكر **Stanier وآخرون (1966)** في وصفه لبكتريا *Pseudomonas* أن هناك اقتراحات (Flugge) في عام 1886 تضمنت دراسة الأنواع المنتجة لصبغة الفلوريسنت (الصفراء– الخضراء) الذائبة بالماء ، وهذه الأنواع عزلت من بيئات التربة والمياه واعتمد على صفة إذابة الجلاتين للتفريق بين الأنواع ، وكذلك الاعتماد على اختلاف الأنواع في أستعمالها لمركبات عضوية مختلفة مصدراً للطاقة ، استناداً إلى مقدرتها على التمثيل Synthesis وانتاج الصبغات ، وهي بكتيريا سالبة لصبغة كرام، كيميائية التغذية ، غير مكونة للأبواغ ، عصوية مستقيمة أو منحنية ، متحركة لإمتلاكها سوط واحد أو اكثر، موجبة لاختبار الأوكسديز والكاتاليز ، تترتب بصورة مفردة أو بشكل سلاسل قصيرة ، أبعادها (0.5 – 0.8 µ m x 1 – 3 µ m) ، وهي هوائية تستعمل الأوكسجين كمستقبل نهائي للألكترونات ، وفي بعض الحالات تستعمل النترات (Nitrate) كمستقبل نهائي للألكترونات ، ما يسمح بعض أنواعها من النمو لاهوائياً ، وهي غير محاطة بأغلفة ، منتشرة بشكل واسع في الطبيعة ، وتعيش بهيئة مستعمرات هجومية أو عدوانية aggressive colonizers في المنطقة المحيطة بالجذور للعديد من نباتات الخضر والمحاصيل ، وقد وجدت في داخل أنسجة الجذر بين البشرة والقشرة **(Duijff وآخرون ، 1997)** ، فضلاً عن كونها موجودة مع النبات والحيوان كمسببات مرضية **(1981 Palleroni)** ، إنَّ بكتيريا *Pseudomonas* احد اهم الاجناس البكتيرية المتواجدة في المنطقة المحيطة بالجذور Rhizosphere والتي وضعت على رأس الاحياء المشجعة لنمو النبات –Plant growth promoting rhizobacteria – إذ تشكل جزءاً كبيراً من مجموعة البكتيريا المحيطة بجذر غالبية النباتات ، يمكن لهذه البكتريا أن تقوم بزيادة جاهزية الفسفور وتحلل المركبات العضوية المعقدة مثل اللكنين والسليلوز والبايتين والبروتينات واليوريا وذلك بعملية النشدرة ، وكذلك يمكن لبعض انواع هذه البكتريا المقدرة على تثبيت النيتروجين **(Alexander ، 1988)** ، وتسهم بكتيريا *Pseudomonas spp* في تدوير المواد الغذائية ، وفي معالجة ملوثات التربة الكيميائية **(Segura وآخرون 2009 ؛ Segura و Ramos 2012)** ، وفي تشجيع نمو النبات فضلاً عن المكافحة الأحيائية لمسببات أمراض الجذر **(Rezzonico وآخرون 2007 ؛ Abbas– Zadeh وآخرون 2010)**.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات التربة:

جمعت 20 عينة عشوائياً من مناطق مختلفة من حقول كلية الزراعة / جامعة تكريت وناحية العلم للعام الدراسي 2015 – 2016 ، وجمعت العينات في خمسة اشهر تشرين الثاني وكانون الاول وكانون الثاني وشباط واذار إذ شملت عينات تربة ملتصقة بالجذر من منطقة الرايزوسفير لنباتات (الحنطة والشعير والذرة والنعناع والجت)، اخذت العينات من عمق 0–30سم بعد إزالة الطبقة السطحية سمك 3سم عبئت في أكياس معقمة من البولي إثلين وثبتت المعلومات على الأكياس (نوع النبات المزروع، المكان، تاريخ أخذ العينات).

عزل بكتريا *Pseudomonas spp* من التربة المحيطة بالجذور (Soil Rhizosphere)

قلعت النباتات مع الجذور والتربة المحيطة بها ، بعد عمل دائرة حول النبات تستوعب جذر النبات والتربة المحيطة به ، اخذت الجذور والتربة الملتصقة تماماً بالجذور(تربة الرايزوسفير) ، ثم وضعت في كيس معقم من البولي إثلين ازيلت التربة الملاصقة للجذور بعناية وخلطت التربة جيدا ثم أخذ 1 غم من التربة في أنابيب اختبار معقمة ، وأضيف إلى 9 مل من محلول الفسلجي (0.85 NaCl) غم ، وبذلك نحصل على التخفيف10^{-1} ، ومنه عملت سلسلة تخافيف لغاية 10^{-4} ، أضيف 0.5 مل من التخفيف الأخير على طبق بتري يحتوي على وسط King B (King واخرون 1954) وحضنت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 28 مْ ولمدة 48 ساعة ، وبعد ظهور نمو المستعمرات النقية للبكتريا Pure colony ، أخذت مسحة من المستعمرات النامية من كل طبق ، ووزعت بطريقة التخطيط Streaking على الوسط نفسه مرة أخرى ثم حضنت للتأكد من نقاوتها، ثم حفظت العزلات بعد نموها على وسط الأكار المغذي المائل (slant) في الثلاجة درجة حرارة 4^{0}م ، لحين إجراء الفحوصات التشخيصية عليها.

تشخيص بكتريا *Pseudomonas*

شخصت البكتريا إلى مستوى النوع والطراز الأحيائي، وذلك من خلال تحديد الصفات المظهرية و المزرعية وإجراء الفحوص الكيميوحيوية اللازمة حسب ما ذكر في Bergey's manual of determinative bacteriology ، وجرى تأكيد النتائج بوساطة جهاز Vitek 2 compact system .

الكشف عن قابليات العزلات على انتاج المواد المشجعة لنمو النبات

تقدير الأندول حامض الخليك (IAA)

أ/ تحضير المنحني القياسي

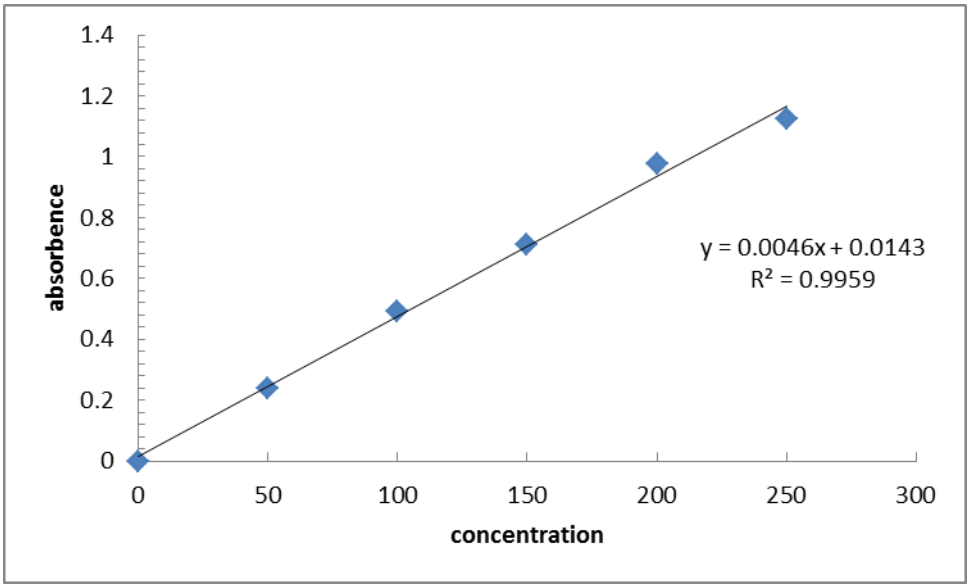
أستعمل المنحني القياسي لتحويل الكثافة الضوئية (Optical density OD) إلى تركيز وذلك طبقاً للخطوات المبينة :

1- حضرت سلسلة تخافيف من الأندول حامض الخليك (0، 50، 100، 150،200، 250، 300، 350، 400، 450) مايكروغرام في 10مل من الماء المقطر المعقم .

2- وضع 1 مل من كل تخفيف في أنابيب اختبار، وأضيف إليه 2مل من محلول Salkowsky (كاشفA) الذي حضر عن طريق خلط 2 مل من 0.5 مولاري من FeCl3 مع 98 مل من حامض البيروكلوريك بتركيز 35% (Gordon و Weber ،1951) ، وتركت الأنابيب لمدة (25-20) دقيقة ، وخلال هذه المدة يتحول لون المحلول إلى الأحمر .

3- جرى قياس الامتصاصية باستعمال جهاز ألطيف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي 535 nm.

4- رسم المنحنى القياسي من خلال العلاقة بين التركيز والامتصاصية (OD) ، كما موضح في الشكل (1)



شكل 1 المنحنى القياسي للإندول حامض الخليك

ب / طريقة القياس :

1- وضع 100 مل من وسط الاكار المغذي N.B في قناني سعة (250) مل ، وأضيف 0.2% تربتوفان لكل قنينه ، وعقم بوساطة المؤصدة بدرجة حرارة 121 م^0 ، وضغط 1.5بار لمدة 15 دقيقة، ثم لقحت القناني بعد التبريد بمسحة من العزلات البكتيرية المختلفة.

2- حضنت العزلات في حاضنة هزازة بواقع 250 بالدقيقة لمدة 24 ساعة بدرجة 27± 2 م^0 .

3- بعد مدة الحضن وضع 1.5 مل من المستنبت البكتيري في أنابيب ابندروف ، وأجري النبذ بجهاز الطرد المركزي (centrifuge) لمدة 7 دقائق ، بواقع 7000 دورة بالدقيقة .

4- نقل 1مل من الراشح إلى أنابيب اختبار وأضيف 2 مل من كاشف A وتركت الأنابيب لمدة (20-25) دقيقة لحدوث التفاعل والتغير اللوني .

5- جرى قياس الامتصاصية بجها Spectrophotometer على طول موجي535 nm .

6- جرى حساب تركيز IAA باستعمال المنحنى القياسي شكل (1) (Glickmann و Dessaux، 1995) .

اختبار كفاءة العزلات في إذابة الفوسفات:

حضر الوسط بإذابة 10 غم كلكوز و 0.5 غم كبريتات الامونيوم NH4 (SO4)2 و 0.1 غم كبريتات المغنيسيوم المائية MgSO4.7H2O و 0.5 غم خلاصة الخميرة Yeast extracts و 0.2 غم كلوريد البوتاسيوم KCl و 0.2 غم كلوريد الصوديوم NaCl و 0.002 غم كبريتات الحديدوز المائية FeSO4.7H2O و 0.002 غم كبريتات المنغنيز المائية MnSO4.7H2O و 5.09 غم فوسفات الكالسيوم $Ca_3(PO_4)$ و 15 غم اكار Agar في 850 مل ماء مقطر وضبط الرقم الهيدروجيني عند 7.7 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم ، وأكمل الحجم إلى لتر وعقم بالمؤصدة ، ثم لقحت الاطباق بالعزلات البكتيرية وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 30 مْ ، ولمدة 5 إلى 7 أيام ، إذ يجري التعرف على المستعمرات البكتيرية المذيبة للفوسفات من خلال تكوينها لهاله شفافة رائقه حول مستعمراتها ، دلاله على إذابة الفوسفات غير الذائب ، واستعملت المعادلة للتعبير عن قدرة البكتريا على إذابة الفوسفات **(Permono وآخرون 1996)**.

Solubilization Index (SI) = (colony diameter + zone of halo) / colony diameter

اختبار كفاءة العزلات في خلب الحديد Siderophore

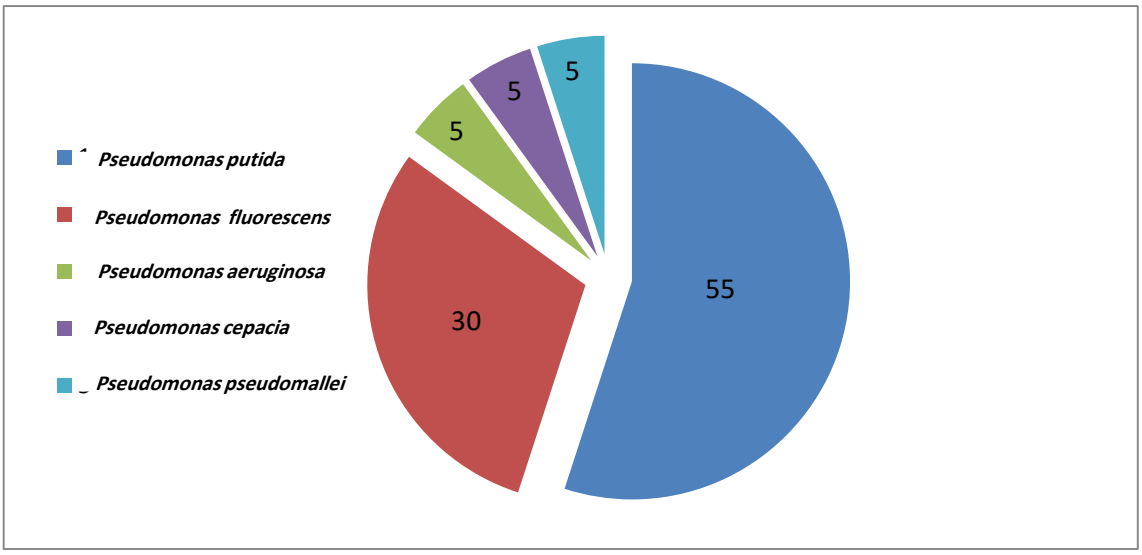
حضر لتر من وسط الأكار المغذي استناداً إلى الطريقة الموصوفة من **Payne (1980)** ، وذلك بإضافة 800 ملليتر من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ، وأكمل الحجم الى 990 ملليتر، من ثم عقم بالمؤصدة ، وترك الوسط ليبرد إلى درجة حرارة 48–46^{0}م ، ثم أضيف إليه 2 ملغرام 2.2'-dipyridyl المذاب في 10 ملليترات من الماء المقطر والمعقمة بوساطة مرشحات دقيقة وأوراق ترشيح ذات ثقوب بقطر 0.2 مايكروميتر للحصول على تركيز نهائي 200 مايكروغرام/ ملليتر، وبعدها جرى صبه في أطباق بتري معقمة وترك ليتصلب ثم لقحت الاطباق بالعزلات البكتيرية وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 28 مْ ولمدة 24 ساعة ، إذ يجري التعرف على المستعمرات البكتيرية المنتجة للمركبات المخلبية من خلال ظهور نمو (ضعيف ، متوسط ، كثيف) في الأطباق ، دلالة على قدرة البكتريا على إنتاج المركبات الخالبة للحديد.

النتائج والمناقشة:

4–1–1– تشخيص عزلات بكتريا *Pseudomonas spp* والانواع التابعة لها

يبين الجدول (1) العزلات العشرين العائدة لبكتريا *Pseudomonas spp* والتي عزلت من ترب الدراسة وشخصت بالاعتماد على الصفات المجهرية والمظهرية والمزرعية والكيموحيوية ، ويتبين من الجدول بأنَّ جميع العزلات أظهرت مقدرة على النمو في وسط ماكونكي أكار، وتميزت عند فحصها تحت المجهر بكونها خلايا عصوية مفردة أو مزدوجة ، سالبة لصبغة كرام ، متحركة ،موجبة لاختبار الأوكسديز والكاتليز، وأظهر الفحص المظهري أيضاً بأنَّها مستعمرات دائرية مرتفعة بشكل محدب ملساء صغيرة مع وجود بعض المستعمرات الكبيرة ومتألقة تحت الأشعة فوق البنفسجية لمقدرتها على إنتاج البايوفردين فضلاً عن وجود رائحة غير مرغوبة ، وعند إجراء الاختبارات التفريقية اللازمة ، تميزت عزلات بكتريا Fluorescent *Pseudomonas* بإنتاجها لصبغات متألقة (خضراء مصفرة + برتقالي بني) منتشرة في الوسط عند تنميتها على الوسط King B ، في حين لم تظهر العزلتان KH-K4 العائدة للنوع*Pseudomonas pseudomallei* والعزلة KH-K20 العائدة للنوع *Pseudomonas cepacia* أي صفة من صفات التألق ، وأظهرت العزلة KH-K10 العائدة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* مقدرتها على النمو في وسط King A وانتاج صبغة برتقالية phenazine وهذا ما وجده **(Mavrodi وآخرون 2001)** ولم تتمكن العزلات الأخرى من النمو أو إنتاج اي صبغة على هذا الوسط ، أما اختبار النمو بدرجة حرارة 4^{0}م و 42^{0}م فيبين الجدول أنَّ العزلة KH-K4 العائدة للنوع *Pseudomonas pseudomallei* والعزلة KH-K10 العائدة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* والعزلة KH-K20 العائدة للنوع *Pseudomonas cepacia* لم تتمكن من النمو بدرجة حرارة 4^{0}م والتي تتميزها عن العزلات الأخرى التي تمكنت من النمو في هذه الدرجة ، في حين تمكنت كل من العزلتينKH-K10 *Pseudomonas aeruginosa* و KH-K4 *Pseudomonas pseudomallei* من النمو بدرجة 42^{0}م وتميزت عن العزلات الأخرى التي لم تتمكن من النمو في هذه الدرجة ، أما اختبار إنتاج كبريتيد الهيدروجين فقد أظهرت جميع العزلات أنَّها سالبة لاختبار إنتاج كبريتيد الهيدروجين (H2S)، في حين أظهرت العزلات (KH-K3 و KH-K8 وKH-K9 و KH-K14 وKH-K13 و KH-K19) العائدة للنوع *Pseudomonas fluorescens* والعزلة KH-K10 العائدة للنوع *Pseudomons aeruginosa* والعزلة KH-K20 العائدة للنوع *Pseudomonas cepacia* و العزلة KH-K4 العائدة للنوع *Pseudomonas pseudomallei* القدرة على اذابة الجيلاتين والتي تميزها عن العزلات الأخرى التي لم تستطع أن إذابة الجيلاتين، وتعد هذه الاختبارات التأكيدية من أهم الاختبارات التي تميز أجناس Pseudomonas ، وبناءً على ما بينته الدراسات التي تناولت بكتريا *Pseudomonas* ، فأنَّ الصفات تتطابق مع الصفات المجهرية والمظهرية لأنواع بكتريا *Pseudomonas* spp (Palleroni 1984 ؛ Holt واخرون 1994) ، ومن خلال دراسة الانواع الواقعة تحت جنس *Pseudomonas* spp والمثبتة في الجدول (1) .

يبين الشكل (1) بأنَّ أعلى تواجد سجل 55% للنوع *Pseudomonas putida* ، يليها النوع *Pseudomonas fluorescens* بنسبة 30% ، وأقل قيمة سجلت للعزلات *Pseudomonas cepacia* و*Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas pseudomallei* إذ بلغ 5% لكل عزلة .



شكل 2 النسبة المئوية للأنواع التابعة لجنس *Pseudomonas* في عينات تربة الدراسة

– التشخيص باستعمال جهاز Vitek 2 compact system

استعمل جهاز Vitek 2 compact system في تأكيد تشخيص العزلات قيد الدراسة ، ويتضح من خلال جداول التشخيص (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5) أنَّ البكتريا المشخصة تعود للأنواع *Pseudomonas fluorescens* و*Pseudomonas putida* و*Pseudomonas aeruginosa* و*Pseudomonas cepacia* و *Pseudomonas pseudomallei* بنسبة احتمالية بين 93% إلى 99% ، ويستعمل جهاز Vitek 2 compact system –وهو تطوير لنظام API 20– في تشخيص أغلب أنواع البكتريا من خلال عدد تشخيصية تجرى فيها الاختبارات الكيموحيوية ، ويسجل الجهاز التغيرات اللونية الحاصلة نتيجة لنمو البكتريا.

الجدول (1) بعض الاختبارات العامة والتفريقية التي أجريت لعزلات المجاميع البكتيرية *Pseudomonas sp*

الصفات المظهرية				الاختبارات الكيموحيوية									تأكيد التشخيص
العزلة	صبغة كرام	شكل الخلايا	الحركة	الاوكسديز	الكاتليز	إنتاج الصبغة		النمو في MacConkey agar	النمو في درجة حرارة		تحلل الجيلاتين	إنتاج H_2S	اسم البكتريا	Vitek 2 compact system
						King's B	King's A		4م^0	42م^0				
KH-K1	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K2	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K3	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	+	–	*P. fluorescens*	*P. fluorescens*
KH-K4	–	عصوية	+	+	+	–	–	+	–	+	+	–	*Pseudomonas spp*	*Burkholderia pseudomallei*
KH-K5	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K6	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K7	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K8	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	+	–	*P. fluorescens*	*P. fluorescens*
KH-K9	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	+	–	*P. fluorescens*	*P. fluorescens*
KH-K10	–	عصوية	+	+	+	برتقالي بني	برتقالي	+	+	–	+	–	*P. aeruginosa*	*P.aeruginosa*
KH-K11	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K12	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K13		عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	+	–	*P. fluorescens*	*P. fluorescens*
KH-K14	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	+	–	*P. fluorescens*	*P. fluorescens*
KH-K15	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K16	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K17	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K18	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	–	–	*P.putida*	*P.putida*
KH-K19	–	عصوية	+	+	+	أصفر مخضر	–	+	+	–	+	–	*P. fluorescens*	*P. fluorescens*
KH-K20	–	عصوية	+	+	+	–	–	+	–	–	+	–	*Pseudomonas spp*	*Burkholderia cepacia*

+ : جميع العزلات موجبة _ : جميع العزلات سالبة

الجدول (2) تشخيص العزلة KH-K10 لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستعمال جهاز Vitek 2 compact system.

Patient Name: Patient ID:
Location: Physician:
Lab ID: 10 Isolate Number: 1

Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	7.00 hours	Status:	Final
Selected Organism	93% Probability	Pseudomonas aeruginosa		
	Bionumber:	0103051041500230		
Organism Quantity:				
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	+	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	+
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	(-)	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	(+)	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

الجدول (3) تشخيص العزلة KH-K4 لبكتريا *Pseudomonas pseudomallei* باستعمال جهاز Vitek 2 compact system.

Patient Name:
Location:
Lab ID: 4 Patient ID:
Physician:
Isolate Number: 1

Selected Organism : Burkholderia pseudomallei

Source: Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	6.00 hours	Status:	Final
Selected Organism	93% Probability	Burkholderia pseudomallei		
	Bionumber:	0023011311500352		
Organism Quantity:				
ID Analysis Messages	Highly pathogenic organism See product information for additional information.			

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	+	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	+	62	ELLM	-	64	ILATa	+			

الجدول (4) تشخيص العزلة KH-K20 لبكتريا *Pseudomonas cepacia* باستعمال جهاز Vitek 2 compact system

Patient Name: Patient ID:
Location: Physician:
Lab ID: 20 Isolate Number: 1

Selected Organism : Burkholderia cepacia group

Source: Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	4.00 hours	Status:	Final
Selected Organism	99% Probability Bionumber:	Burkholderia cepacia group 2003011103500252		
Organism Quantity:				
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	+	62	ELLM	-	64	ILATa	+			

الجدول (5) تشخيص العزلة KH-K12 لبكتريا *Pseudomonas putida* باستعمال جهاز Vitek 2 compact system

Patient Name: Patient ID:
Location: Physician:
Lab ID: 12 Isolate Number: 1

Selected Organism : Pseudomonas putida

Source: Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	8.00 hours	Status:	Final
Selected Organism	96% Probability Bionumber:	Pseudomonas putida 0003011101501352		
Organism Quantity:				
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	+	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	+	62	ELLM	-	64	ILATa	+			

الجدول (6) تشخيص العزلة لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* KH-K13 باستعمال جهاز Vitek 2 compact system

Patient Name: Patient ID:
Location: Physician:
Lab ID: 13 Isolate Number: 1

Selected Organism : Pseudomonas fluorescens

Source: Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	8.50 hours	Status:	Final
Selected Organism	95% Probability Bionumber:	Pseudomonas fluorescens 0001051101400212		
Organism Quantity:				
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	+
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	(-)	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	+			

كفاءة عزلات بكتريا *Pseudomonas spp* في إذابة الفوسفات وإنتاج Indole-3-acetic acid وإنتاج المركبات المخلبية Siderophore.

أظهرت النتائج في الجدول 7 مقدرة جميع العزلات العشرين التابعة لجنس *Pseudomonas* على إذابة الفوسفات وإنتاج الأندول حامض الخليك (IAA) وإنتاج المركبات المخلبية بنسب مختلفة ، إذ اعطت العزلة KH-K13 العائدة للنوع *P.fluorescens* أعلى قيمة لإذابة الفوسفات بلغ 2.00 ، تلتها العزلة KH-K12 العائدة للنوع *P. putida* بقيمة بلغت 1.86، اما بكتريا *P. cepacia* KH-K20 فقد اعطت قيمة في إذابة الفوسفات بلغ 1.68 ، ثم عزلة *P.pseudomallei* KH-K4 إذ اعطت قيمة في إذابة الفوسفات بلغت 3.12 ، اما عزلة *P.aeruginosa* KH-K10 فلم تتمكن من إذابة الفوسفات ، وعلى الرغم من كون هذا الاختبار نوعياً وليس كمياً إلا إنَّه يؤكد كفاءة هذه الأحياء على إذابة الفوسفات المعدني ، وهو يفسر وإنَّ كان جزئياً كفاءة هذه الأحياء في زيادة جاهزية الفسفور في التربة الملقحة ، وتتفق هذه النتائج مع نتائج **Fouzia وآخرين (2015)** لبكتريا *P. fluorescens* و *P. putida* و **SINGH وآخرين (2013)** لبكتريا *P.cepacia* الذين سجلوا مقدرة هذه العزلات على إذابة الفوسفات في تجارب مختبرية.

اما اختبار كفاءة العزلات على إنتاج الأندول حامض الخليك (IAA) فسجلت العزلة KH-K13 العائدة للنوع *P. fluorescens* اعلى قيمة في انتاج الأندول حامض الخليك بلغ تركيزه 9.12 مايكروغرام مل$^{-1}$ ، تلتها العزلة KH-K12 العائدة للنوع *P. putida* بتركيز 7.62 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ، اما العزلات KH-K20 *P.cepacia* و-KH *P.pseudomallei* K4 و KH-K10 *P. aeruginosa* فبلغ تركيز الأندول حامض الخليك (5 ، 2.12 ، 3.65) مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التتابع ، وقد يعود اختلاف العزلات العشرين على إنتاج الأوكسين (IAA) إلى التباين الوراثي لهذه العزلات كونها تعود لأنواع مختلفة وهو ما ينعكس على خصائصها البايولوجية ومنها افرازاتها في وسط النمو، تتفق هذه النتائج مع **Hernández واخرون (2004)** لعزلات مختلفة من بكتريا *P.fluorescens* و *P. cepacia* و **Mohamed وآخرون (2012)** لعزلات مختلفة من بكتريا *P. fluorescens* و *P. putida*.

اما اختبار كفاءة العزلات على انتاج المركبات المخلبية Siderophores فأعطت العزلة *P.aeruginosa* KH-K10 والعزلة KH-K8 العائدة للنوع *P.fluorescens* والعزلة KH-K1 العائدة *P.putida* أنتاج عالي من المركبات المخلبية ، اما العزلة *P.cepacia* KH-K20 والعزلة *P.pseudomallei* KH-K4 فأعطيتا انتاج متوسط من المركبات المخلبية ، أنَّ النتائج تبين مقدرة العزلات العشرين على النمو في وسط انتاج المركبات المخلبية ، وأنَّ البكتريا غير المنتجة للمركبات الخالبة للحديد لا تستطيع النمو في هذا الوسط لعدم قدرتها على الحصول على الحديد الذي يدخل في العديد من الفعاليات الأيضية ، في حين أنَّ البكتريا المنتجة للمركبات الخالبة للحديد القدرة على سحب الحديديك من مركب 2.2dipyrdil والارتباط به ونقله إلى داخل الخلية البكتيرية للاستفادة منه في الفعاليات الايضية ، تتفق هذه النتائج مع **Leoni وآخرون (1996)** في الكشف عن قابلية بكتريا *P. aeruginosa* في إنتاج المركبات الخالبة للحديد.

جدول (7) كفاءة عزلات بكتريا *P. putida* ، *P. fluorescens* ، *P. cepacia* ، *P. pseudomallei* ، *P. aeruginosa* في إذابة الفوسفات وإنتاج الأندول حامض الخليك (IAA) وإنتاج المركبات المخلبية (Siderophore)

رمز العزلة	كمية إذابة الفوسفات			IAA مايكروغرام.مل $^{-1}$	انتاج Siderophore
	Colony diameter mm	Zone of halo mm	SI		
Pseudomonas putida					
KH-K1	7.0	5.0	1.71	3.14	+++
KH-K2	9.0	6.5	1.72	6.44	++
KH-K5	8.5	5.0	1.58	6.65	+
KH-K6	6.5	5.0	1.76	6.32	+
KH-K7	9.5	3.5	1.47	5.23	++
KH-K11	8.0	6.0	1.75	5.29	+
KH-K12	7.5	6.5	1.86	7.62	++
KH-K15	8.5	5.0	1.58	4.86	++
KH-K16	9.0	8	1.80	3.21	+
KH-K17	7.5	6.5	1.73	4.31	+
KH-K18	9.0	5.0	1.50	5.22	++
Pseudomonas fluorescens					
KH-K3	9.0	6.5	1.70	4.52	+
KH-K8	9.0	4.5	1.50	4.21	+++
KH-K9	6.0	1.5	1.25	5.71	++
KH-K13	9.0	9.0	2.00	9.12	++
KH-K14	9.0	8.0	1.80	3.32	++
KH-K19	10.0	3.0	1.30	6.41	+
Pseudomonas cepacia					
KH-K20	8.0	5.5	1.68	5	++
Pseudomonas pseudomallei					
KH-K4	10.0	4	1.40	3.12	++
Pseudomonas aeruginosa					
KH-K10	.	.	.	3.65	+++

Solubilization Index (SI) = (colony diameter + zone of halo) / colony diameter

+ : نمو ضعيف ++ : نمو متوسط +++ : نمو كثيف

المصادر :

Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary-Nejati, A.R., Miransari, M.2010. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. Acta Physiologiae Plantarum. 32: 281- 288.

Alexander , M .1988. Introduction to soil microbiology . John Wiley and Sons , In c . New York.

Duijff, B. J., V. Gianinazzi-Pearsonand, and P. Lemanceau. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by *biocontrol Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. New Phytol. 135:325-334.

Fouzia, A., Allaoua, S., Hafsa, C.S., & Mostefa, G. 2015. Plant growth promoting and antagonistic traits of indigenous fluorescent *Pseudomonas spp*. isolated from wheat rhizosphere and A. halimus endosphere. European Scientific Journal. 11(24): 129–148.

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

Gordon and R.P. Weber .1951. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. Plant Physiology. 26: 192-195.

Hernández, A., Rives, N., Caballero, A., Hernández, A.N. y Heydrich, M.2004. Caracterización de rizobacterias asociados al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideroforos y ácido salicilico. Revista Colombiana de Biotecnología 6:6-13.

Holt , J.G. ; Kreig , M.R.; Sneath , P.H. ; Staley , J.T. and Williams , S.T.1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th (ed.). Williams and Wilkins , U.S.A., P. 93 , 94 .

King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D .E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301.

Leoni,L.; Ciervo,A.; Orsi,N.; Visca,P. 1996. Iron-Regulated Transcription of the *pvdA* Gene in *Pseudomonas aeruginosa* : Effect of Fur and *pvdS* on Promoter Activity.J.Bacteriol.**178**: 2299-2313.

Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS.2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol. 183: 6454–6465.

Mohamed E.A. Dawoud Zienat K. Mahmoud Hanaa E. Ahmed Mohamed G. Farahat.2012.Growth promotion and biocontrol of leaf spot and leaf speck diseases in tomato by *Pseudomonas spp* Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.): 8(1): 67-76.

Palleroni NJ.1984. Gram-negative aerobic rods and cocci, family I: Pseudomonasdaceae .In: Krieg nr. Holt JG (eds). Bergeys manual of systematic bacteriology .vol 1.Williams and Wilkins. Baltimore, pp.141-199.

Palleroni, N. J. 1992. Human- and animal-pathogenic pseudomonads, p. 3086-3103. In A. Balows, H. G. Triiper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, vol. 3. Springer-Verlag, New York.

Palleroni, N.J.1981. Introduction to the family Pseudomonadaceae *In* The Prokaryotes by Starr,M.P.; Stolp,H.; Truper,H.G.; Balows,A. and Schlegel,H.g.Vol.1. Sprague Verlag, U.S.A., p:655-665.

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

Premono, M.A. Moawad and P.L.G. Vleck.1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indonesian Journal of Crop Sciences. 11: 13-23.

Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moënne-Loccoz, Y., Défago, G. 2007. Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? New Phytol. 173: 861–872.

Segura A, Rodríguez-Conde S, Ramos C, Ramos JL. 2009. Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. Microb Biotech2: 452-464.

Segura A, Ramos JL. 2012. Plant-bacteria interactions in the removal of pollutants. Curr Opin Biotechnol. 24: 1-7.

Singh RK, Malik N, Singh S. 2013. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (Zea mays L.). Nusantara Bioscience. 5: 8-14.

Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. & Doudoroff, M. .1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J Gen Microbiol 43: 159–271.

Zumft, W. G.1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 61:533–616.