مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد ٤٠ العدد ٤ (٢٠٢٥): ٢٩٥-٣٣١

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 40 No.4 (2025): 295-331

التحري عن بكتيريا محلية معززة لنمو النبات PGPR من المحيط الجذري للقمح، وتعريف سلالة واعدة تنتمي للنوع Enterobacter hormaechei

وسيم البلخي*[١] محمود أبو غرة[٢] فواز العظمة[٣]

[*١] طالب دراسات عليا، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق.
[٢] أستاذ في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة جامعة دمشق.
[٣] أستاذ في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة – جامعة دمشق.

تاريخ الايداع: ٢٠٢٣/٥/٣١
تاريخ القبول: ٢٠٢٣/٧/١٠

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص **CC BY-NC-SA 04**

الملخص:

هدف هذا البحث الى عزل بكتيريا معززة لنمو النبات من المحيط الجذري للقمح من عدد من المناطق المحلية في الجمهورية العربية السورية حيث تمت دراسة /٤٤/ عزلة من حيث أهم معايير تعزيز نمو النبات و بينت النتائج ان ١٦ عزلة منها كانت قادرة على تثبيت الازوت الجوي و١٩ عزلة منها كانت إيجابية لتحليل الفوسفات في حين ان ٢١ عزلة كانت محللة للبوتاس اما انتاج حمض الاندول الخلي فكانت فقط ١٥ من العزلات قادرة على انتاجه , وبينت نتائج الاختبارات ان أفضل عزلة هي ذات الرمز SY-Ba ١٦.٢ وبنتيجة التحليل البيوكيميائي والجزيئي ورسم شجرة القرابة تبين انها تنتمي الى النوع البكتيري Enterobacter hormaechei

الكلمات المفتاحية: المحيط الجذري، بكتيريا معززة لنمو النبات (PGPR)

ISSN: 2789-7214 (online)
http://journal.damascusuniversity.edu.sy

Detection of local Plant Growth Promoting Bacteria from wheat rhizosphere and identification of a promising isolate belonging to Enterobacter hormaechei

Waseem Al-Balkhi[*1] Mahmoud Abu-Ghorrah[2] Fawaz Al-Adma[3]

[1*] Postgraduate student, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University

[2] Professor at the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University

[3] Professor at the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture - Damascus University

Received: 31/5/2023
Accepted: 10/7/2023

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

This research aimed to isolate Plant Growth Promoting Bacteria from wheat rhizosphere from several regions in Syria. A total of 44 bacterial isolates isolated from the rhizosphere region of wheat plants were studied for their ability to enhance plant growth. The results showed that ١٦ of the isolates were able to fix atmospheric nitrogen, 19 of them were positive for phosphate solubilization, while 21 were potassium solubilizers. As for indole acetic acid production, only 15 of the isolates were able to produce it. The test results showed that the best isolate has been coded SY-Ba 16.2 and as a result of biochemical and molecular analysis and phylogenetic tree, it was found to be long to the bacterial species Enterobacter hormaechei.

Keywords: Rhizosphere, Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR)

Keywords: Rhizosphere, Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR).

المقدمة والدراسة المرجعية:

تعد البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات (PGPR) مجموعة مهمة من البكتيريا المفيدة التي تستعمر الجذور التي تزدهر في جذور النبات والتربة المحيطة، ويمكن أن تتفاعل البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات (PGPR) مع النباتات مباشرة عن طريق زيادة توافر العناصر الغذائية الأساسية مثل (النيتروجين والفوسفور والحديد)، وإنتاج وتنظيم المركبات المشاركة في نمو النبات (مثل الهرمونات النباتية)، ويمكن أن تؤثر أيضا على نحو غير مباشر على النباتات من خلال حمايتها من الأمراض عن طريق التنافس والتضاد مع مسببات الأمراض أو تحريض الاستجابات الجهازية في النباتات المضيفة. إن قدرة PGPR على تسهيل نمو النبات ذات أهمية أساسية، خاصة في حالت الإجهاد اللاحيوي، حيث يمكن للبكتيريا أن تدعم لياقة النبات، وتحمل الإجهاد، و/ أو حتى المساعدة في معالجة الملوثات (Oleńska *et al.,* ٢٠٢٠) .يعتبر تثبيت النتروجين إحدى أهم الآليات المباشرة التي تتميز بها PGPRحيث يعتبر النيتروجين عنصراً غذائياً حيوياً لنمو النبات. وهو مكون أساسي من مكونات الأحماض النووية والبروتينات والإنزيمات. ومع ذلك، فإن النيتروجين يسيطر على الغلاف الجوي في شكل غاز، ولا يمكن الوصول إليه من قبل النباتات والحيوانات ولامتصاص النيتروجين بوساطة النباتات، يجب تحويل النيتروجين الجوي إلى أمونيا. يتم مساعدة هذا التحويل بوساطة الكائنات الحية الدقيقة المثبتة للنيتروجين التي تحتوي على مركب إنزيمي يسمى النيتروجيناز، وتسمى العملية التثبيت البيولوجي للنيتروجين (Smith *et al.,*2013). الكائنات الدقيقة المثبتة للنيتروجين وفيرة في منطقة الجذور بالتربة. يمكن أن يكون التثبيت الحيوي للنيتروجين إما تكافليا مع جذور النبات أو غير تكافلي (Ahemad & Khan، ٢٠١٢).

وتشكل الاجناس البكتيرية Mesorhizobium Sinorhizobium Rhizobium, Bradyrhizobium, ارتباطًا تكافليًا مع النباتات البقولية، بينماAnabaena، Azotobacter Azospirillum، Burkholderia، Gluconacetobacter Enterobacter Pseudomonas

على سبيل المثال تشكل رابطة غير تكافلية وبالتالي، فإن تلقيح البذور أو الجذور أو التربة بالكائنات الحية الدقيقة المثبتة للنيتروجين يحفز نمو النبات، ويعزز جودة التربة، ويحافظ على مستوى النيتروجين في التربة (Meena *et al.*. ٢٠٢١، (Bhavya & Geetha)٢٠٢١

ومن جهة أخرى يعتبر الفوسفور من المغذيات الكبيرة الحيوية الأخرى التي تتطلبها النباتات لتحقيق النمو الأمثل. فهو عنصر غذائي لا مفر منه لأنه يلعب دورًا رئيسيًا في عمليات التمثيل الغذائي، ونقل الإشارات، والتركيب الحيوي للجزيئات الكبيرة، والتمثيل الضوئي (Anand *et al.,* 2016)

أكثر من ٩٠٪ من الفسفور المتوفر غير قابل للذوبان أو غير متحرك أو مترسب، وبالتالي يكون من الصعب على النباتات امتصاصه. النباتات قادرة على استخدام الفوسفات كأيونات أحادية القاعدة أو ثنائية القاعدة. تظهر البكتيريا التي تذوب الفوسفات بكثرة في تربة الجذور هذه البكتيريا التي تذوب في الفوسفات قادرة على إذابة وتمعدن الفوسفات و، تخليق بعض الأحماض العضوية منخفضة الوزن الجزيئي، مثل حمض الجلوكونيك وحمض الستريك، وتمتلك البكتيريا المحللة للفوسفات إنزيم الفوسفاتاز الذي يمكنه إذابة الفوسفور غير العضوي إلى أيونات أحادية القاعدة أو ثنائية القاعدة وتنتمي هذه البكتريا التابعة PGPR إلى أجناس مختلفة,Pseudomonas Bacillus ,Beijerinckia , Burkholderia ,Enterobacter Microbacterium Arthrobacter, Serratia , Rhodococcus , Flavobacterium, Mesorhizobium , Rhizobium , Erwinia , هي مواد مذابة للفوسفات . (Oteino *et al.,* 2015) ، ومع ذلك، فإن الأنواع القادرة على اذابة الفوسفات تنتمي إلى أجناس العصيات، المعوية، Erwinia،

وPseudomonas بصرف النظر عن تزويد النباتات بالفوسفور القابل للذوبان، فإنه يعزز أيضًا نمو النبات عن طريق تنشيط القدرة على إصلاح النيتروجين عن طريق الكائنات الدقيقة المثبتة للنيتروجين(Mohammadi & Sohrabi, 2012)

-إنتاج الهرمونات النباتية:

الهرمونات النباتية هي أكثر منظمات النمو أهمية، لأنها تحفز استقلاب النبات، وتحفز آليات دفاع النبات. يمكن افراز الهرمونات النباتية مثل الأكسينات والسيتوكينين والجبرلينات والإيثيلين عن طريق بعض PGPR التي تلعب دورًا مهمًا في تنشيط الجذور تنتج البكتيريا التي تنتمي إلى أجناسRhizobium، وBradyrhizobium، وMesorhizobium، وBacillus، وPantoea، وPseudomonas Arthrobacter، وEnterobacter، وBurkholderia أنواعًا مختلفة من الهرمونات النباتية. تمتلك غالبية الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من منطقة الجذور القدرة على تخليق وإطلاق الأكسينات (Khan *et al.,* 2020).

ولعل حمض الأندول الخليIAA واحد من أهم الهرمونات النباتية التي تنتجها كل من البكتيريا والنبات، كإحدى آليات إدارة نمو النبات. حيث يعدل الأندول الميكروبي بنية الجذور لزيادة توافر العناصر الغذائية لهذه الميكروبات التي يمكن أن تنتج هرمونات نباتية(AlAli *et al.,* 2022) .

تثبيت النيتروجين على الأمونيا وإتاحتها للنبات. يتم تقديم البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات على نطاق واسع على أنها متكافلة هيRhizobium ، وBradyrhizobium، وSinorhizobium، و Mesorhizobium مع النباتات البقولية، و Frankia مع الأشجار والشجيرات غير البقولية (Bhavya & Geetha, 2021) .

مواد وطرق البحث:

١ جمع العينات:

تم تنفيذ جولات حقلية في عدة مناطق من سوريا وعلى عدد من الحقول، وذلك خلال عامي (٢٠١٨-٢٠١٩) حيث شملت حقول قمح مروية وبعلية وجمعت بكتيريا المحيط الجذري من نباتات قمح أو شعير سليمة ظاهريا والمجاورة للنباتات المصابة، وتم جمع ١٠ عينات من نباتات لا تبدو عليها أعراض (سليمة ظاهرياً) موجودة إلى جانب نباتات أخرى مصابة بالأمراض أو مجهدة ظاهرياً.

٢ عزل البكتيريا:

تم عزل البكتيريا من المحيط الجذري بفصل الجذور وغسلها بماء الصنبور ثم بالماء المقطر جيداً ثم قطعت الجذور إلى قطع صغيرة(٢-٣ سم)، ووضعت في أنابيب تحوي ١٠مل ماء مقطر معقم ثم رجت الأنابيب لمدة ٥ دقائق , وذلك لفصل البكتريا الموجودة في منطقة المحيط الجذري أو الملتصقة على سطح الجذور, ثم أخذ ١مل من المعلق، وتم مَدّه ٣ مرات (١٠/١ - ١٠/٠١- ١٠/٠٠١) وبعدها تم أخذ قطرة بحجم ٣٠ ميكروليتروتركيز CFU/١٠٧ (وحدة مشكلة للمستعمرة) نشرت على سطح طبق بتري يحتوي على وسط (YPGA) (غلوكوز ٧غ-بيبتون٧غ- مستخلص خميرة ٧غ- أغار ١٤غ أضيف لها لتر ماء معقم) أو على وسط (KING-B) (ببتون ٢٠غ- غليسرول ١٠غ- سلفات المغنيزيوم ١،٥غ- أغار ١٨غ أضيف إليها لتر من الماء المقطر المعقم عقم على الدرجة ١٢٠س لمدة ٣٠ دقيقة بالأوتوغلاف)، وتم تحضين الأطباق على درجة حرارة ٢٥س° ولمدة ٣ أيام.

تمت تنقية مستعمرات مختلفة من الأطباق بحسب لونها وقطرها وشكلها (محدبة – مسطحة – منتظمة – غير منتظمة) وزرعت على أطباق جديدة للحصول على مستعمرات نقية.

وتم حفظ العزلات المختارة في وسط الحفظ PYDAC

عليه تعليق [L1]:

(peptone 3 g L, yeast extract 3 g L−1, glucose 5 g L, calcium carbonate 40 g L, agar 15 g L) (أبوغرة والدوجي،١٩٩٦).

٣ تعريف البكتيريا بالطرق الكيميائية:

أ- اختبار صبغة غرام حسب طريقة RYV (Suslow*et al.*, 1982)

توضع قطرة من المعلق البكتيري على شريحة ويثبت المعلق بالتسخين يُصبغ المحضر بالكريستال البنفسجي لمدة ١ دقيقة، ثم يُغسل المحضر باليود ثم بالماء ثم بالكحول ٩٥٪ حتى يصبح الكحول عديم اللون، يُغسل المحضر بالماء المقطر، ثم يصبغ المحضر بالصفرانين لمدة ٢ إلى ٣ دقائق ويغسل بالماء ويفحص بالعدسة الزيتية.

قراءة الاختبار: البكتيريا موجبة غرام تظهر بلون بنفسجي داكن، البكتيريا سالبة غرام تظهر بلون وردي أو أحمر

ب-اختبار الأوكسيداز:

تستخدم أقراص الكاشف من شركة Bio Merieux. حيث تنقل المستعمرة بحلقة التلقيح إلى القرص. يدل ظهور اللون البنفسجي على أن الاختبار موجب.(Harrigan.1998)

ت- اختبار مقدرة البكتيريا على تشكيل الأبواغ الداخلية Endospores(Philipp *et al.*, 1981)

يتم وضع ماء مقطر ومعقم في عدة أنابيب اختبار صغيرة بمقدار ٥ مل في كل أنبوب، ثم يضاف إليها بواسطة إبرة معقمة قليلاً من الخلايا البكتيرية، ومن ثم توضع الأنابيب في حمام مائي على الدرجة ٨٠ ْس لمدة عشرين دقيقة، بعدها تؤخذ قطرات من كل أنبوب وتزرع على أطباق بتري تحوي وسط آغار مغذي BHI (Brain Heart Infusion) وتُحضن على الدرجة ٢٨ ْس لمدة ٤٨ ساعة، حدوث نمو بكتيري يدل على قدرة البكتيريا على تشكيل الأبواغ.

ث- اختبار السكريات الثلاثية والحديد Triple sugar iron agar (TSI)

حيث يشير تغير اللون من الأحمر الى الأصفر الى ان البكتيريا قامت بتخمير السكريات سواء في قعر الانبوب او على السطح المائل(Bailey and Scott's.,2014)

ج- اختبار الكاتالاز:(أبو غرة والدوجي،١٩٩٦)

وهو يوضح قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكاتالاز الذي يقوم بتحرير الاوكسجين وفق المعادلة التالية:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2\uparrow$$

استخلاص الـ DNA وتطبيق الـ PCR وتحديد التتابع النكليوتيدي

تم عزل الـDNA البكتيري من مستعمرات بكتيرية بعمر ٢٤ ساعة باستخدام DNA wizard isolation and purification kit من شركة (Promega) وفق تعليمات الشركة الصانعة (Wizard ® Genomic DNA Purification Kit- TechnicalManual،) ثم تم تحديد سلامة ونوعية الـ الدنا ونقاوته باستخدام جهاز المطياف الضوئي على اطوال أمواج A260/A230 نانومتر.

حضر تمديدات الدنا بتركيز 10نانوغرام/ميكرولتركما وتطبيق اختبار الـ PCR وتحديد التتابع النكليوتيدي في مركز البحوث الإيطالية في مدينة ميلانو –إيطاليا (Macrogen-Europe (Milan Genome Center DNA sequencing laboratory.

حيث أُجري تفاعل الـ PCR باستخدام ٥ ميكروليتر من الدنا باستخدام زوج بادئات عام (f 27-8 و r ١٤٩٢-١٥١٠) متخصص يمورثاتS rRNA ١٦ (Lane .1991) ٢ ميكروليتر لكل بادئ وبتركيز (10 poml/ µl) وبحجم نهائي ٥٠ ميكروليتر.

وكان البادئ المباشر (f٨ 27-) بتسلسل نكليوتيدي

3'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -'5 والبادئ غير المباشر
5'- GGCTACCTTGTTACGACTT - '3 (1212-1862 r)

واستخدم ٢٥ ميكروليتر من (BiocompareGoTap G2-Hot Start Green Master Mix) (وفق تعليمات الشركة Promega),وأكمل الحجم بإضافة ٢١ ميكرولتر من الماء المقطر المعقم.

اجري تفاعل الدنا باستخدام جهاز المدور الحراري بطريقة PCR المصنع من قبل شركة BIORAD، وفق البرنامج التالي: حيث قمنا بالمرحلة الأولى بالتفكيك الأولي لسلسلتي الدنا بدرجة حرارة ٩٥ س لمدة خمسة دقائق، وبعدها التفكيك الثانوي بعدة دورات متكررة (٣٥دورة) على درجة حرارة ٩٥ س لمدة دقيقة واحدة. ومن ثم مرحلة ارتباط البادئات على درجة حرارة ٦٥ س لمدة ٤٥ ثانية فقط، بعدها مرحلة استطالة البادئات على درجة حرارة ٧٢س لمدة دقيقة ونصف، وبالنهاية القيام بالاستطالة النهائية على درجة حرارة ٧٢ س لمدة خمسة عشر دقيقة.

ثم تم ترحليها على هلامة Agarose (تركيزها ١٪)، وباستخدام محلول منظم للرحلان (TBE 1X)، واستخدام بكتيريا Agrobacterium,vitis كشاهد موجب والماء المقطر المعقم كشاهد سالب، بالمقارنة مع Ladder الدنا Plus 1Kb المؤشر الجزيئي وفق الإرشادات المتبعة للوصول الى حزمة الوزن الجزيئي.

تمت تنقية نواتج تفاعل PCR باستخدام,(QIAquick ,Germany,Hilden) تبعا لإرشادات الشركة المصنعة لتحديد الدنا في كال الاتجاهين باستخدام زوج من البادئات العامة (f 27-8 و r ١٤٩٢-١٥١٠) (Macrogen Korea) تم فحص الدنا البكتيريا على أطوال أمواج A260/A230، وتحديد التتابع النكليوتيدي بصيغة ملف (ab1)، ثم تم تحديد نوع البكتيريا باستخدام قاعدة بيانات BLAST على موقع البنك الوراثيNCBI.

٥- اختبارات محددة لصفات البكتريا الجذرية(PGPR) :

أ-اختبار قدرة البكتريا على إنتاج حمض الأندول الخلي .

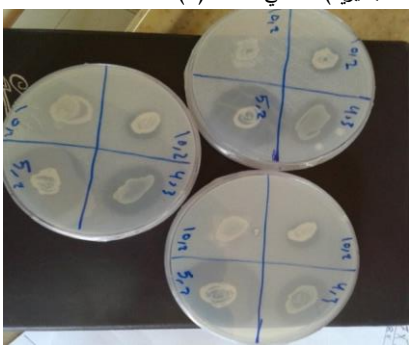
تم اختبار البكتيريا حسب Khamna ورفاقه (2010) حيث تم زرع البكتيريا على وسط YMA بعدها أخذ قرص بقطر ٨مم من البكتيريا النامية وزرعت في أنبوب يحوي ٥ مم من وسط Yeast Malt Extract Broth (YMB) مضاف اليه L-tryptophan بتركيز ٢غ/ل وحضنت على درجة حرارة ٣٠ م° لمدة 48ساعة ثم فصلت الرشاحة بعملية الطرد المركزي 10000دورة/دقيقة. وللكشف عن وجود حمض الأندول الخلي تم مزج ١ مل من الرشاحة مع ٢ مل من كاشف Salkowski's المكون من ١٥مل (FECL3(O,5 M و٣٠ مل من H2so4 وكان ظهور اللون الوردي بعد ٢٥ – ٣٠ دقيقة دليل على وجود الأندول الخليIAA كما في الشكل (١)

الشكل (١) اختبار الاندول

ب – اختبار الفوسفات:

حسب طريقة:Pikovskaya s (PVK) : وسط PKA

١٠ غ غلكوز – ٥ غ ثلاثي فوسفات الكالسيوم – ٠.٥ غ مستخلص خميرة –٠.٥ غ سلفات الأمونيوم – ٠.٢ كلوريد البوتاسيوم – ٠.٢ كلوريد الصوديوم– ٠.١ سلفات المغنيزيوم– ١٥ غ أغار والتحضين على درجة حرارة ٢٨م ولمدة أسبوع . (النتيجة الإيجابية : تشكيل هالات حول العزلات البكتيرية) كما في الشكل (٢).



الشكل (٢) تشكل هالات حول المستعمرات المحللة للفوسفات

ج – اختبار قدرة البكتريا على تحليل البوتاسيوم(K):

حيث يتم الزرع البكتيري في أطباق كما في اختبار الفوسفات، تحتوي وسط آلكساندورف 15غ غلوكوزو٠.٥ غ كبريتات المغنيزيوم Mg SO4 و٠.١غ كربونات الكالسيوم CaCO3 و٠.٠٠٦ غ كلوريد الحديد FeCl3 و٢غ فوسفات الكالسيوم Ca3PO4 و٢٠ غ أغار +٢ غ فلدسبار البوتاس أو ميكا البوتاسيوم (Manib.1986).

تتجلى إيجابية التحليل عن طريق ظهور هالة شفافة تدل على تحليل البوتاس من الوسط، وتم استخدام نفس الية العمل المتبعة في الاختبار السابقة بتحديد شدة تحليل البوتاس كما في الشكل رم (٣).

الشكل (٣) ظهور هالة شفافة تدل على تحليل البوتاس

د- اختبار قدرة البكتريا على تثبيت الأزوت الحر:

لمعرفة قدرة البكتيريا على تثبيت الأزوت الجوي بشكل حر، تم زرع البكتريا في اطباق بترية علىوسط مغذي يحتوي على (٥ غ سكروز – ٠.٢ غ K2HPO4 – ٠.٦ غ KH2PO4 – ٠.٢ غ MgSO4.7H2O – ٠.٠٢غ Cacl2.2H2O– ٢ مـــل Bromthymol محلـــول أزرق (0.2N KoH) – ٤ مل محلول الحديدي (1.64%) Fe (III) EDTA – ١مل محلول فيتامينD– ١٥ غ أغار).

حيث أن ظهور اللون البرتقالي في الوسط المغذي الأزرق هو دليل على قدرة البكتريا على تثبيت الأزوت الجوي وفقا ما هو موضح في الشكل (٤).

الشكل (٤) تحول اللون حول المستعمرات البكتيرية المثبتة للآزوت الى اللون البرتقالي

النتائج:

العزلات البكتيرية:

تم اختبار العزلات البكتيرية من أربعة عشر عينة من مناطق مختلفة (دمشق –ريف دمشق – درعا) وتم الحصول على ٤٤ عزلة بكتيرية ورمزت العزلات كما في الجدول (١) كما تم اختبار قدرتها على تعزيز نمو النبات وانتمائها للـ PGPR من خلال تحليل الفوسفات والبوتاس وقدرتها على إنتاج الأندول وتثبيت الآزوت.

جدول (١) اختبار قدرتها العزلات البكتيرية على تحليل الفوسفات والبوتاس وقدرتها على إنتاج الأندول وتثبيت الآزوت.

الرقم	رقم العزلة	P	K	N	IAA
	16.1	-	-	-	-

	٣16.	-	-	-	++
	16.1.1	-	-	-	-
	٢16.	++++	+++	+++	++
	16.4	-	-	-	-
	18.1.1	-	-	-	-
	18.1.2	-	-	+	-
	18.2	-	-	+	-
	18.3	+	+	-	+
	19.3	-	-	-	-
	19.4	+	-	-	++++
	20.1	+++	-	-	-
	20.2	-	++	-	+
	20.2.1	-	+++	-	+
	25.1				++
	28.2	++++	++++	-	-
	30.1	+	++	-	-
	32.1.1	-	-	-	++
	32.1.2	++	-	-	-
	32.2	-	-	++	-
	32.3	+	++	++	-
	32.3.2	-	-	+++	-
	33.1	-	-	+++	-
	33.3.1	+	+	+	+++
	33.4	-	-	+++	+++
	33.5	+	+	-	
	34.1	-	-	+++	-
	34.2	-	-	++	-
	34.3.1	-	+	-	+++
	35.1	+	++	+	-
	35.2	-	+	-	++
	35.3	-	+++	+++	-
	39.3	+	+	-	-
	39.8	+	-	-	+
	40.1	+++	+++	-	+
	40.2	+	+	-	-
	42.1	++	++	++	-
	42.3.1	-	-	-	-
	42.3	-	+++	-	-
	42.4	-	+++	-	-
	46.1	-	-	-	-
	46.2.1	+	+	++	-
	46.2.2	++	++	++	+
	30.2	+			

١. انتاج الازوت:

بينت نتائج اختبار العزلات ٤٤ قيام ١٦ عزلة من العزلات بتثبيت الازوت الجوي حيث تم تقدير قدرة العزلة على التثبيت لونيا من خلال تغير لون الوسط من اللون الأزرق الى البرتقالي.

جدول رقم (٢) يبن نتائج اختبار العزلات لقدرتها على تثبيت الآزوت.

حيث تدل + ان العزلة مثبة للازوت بشكل بسيط، ++العزلة مثبتة للازوت بشكل جيد، +++ العزلة مثبتة للآزوت بشكل ممتاز

٢. انتاج الفوسفات:

بينت نتائج تحليل الفوسفات للعزلات ٤٤ قيام ١٩عزلة من العزلات بتحليل الفوسفات من الشكل غير الميسر الى الشكل الميسر والذي يسهل امتصاصه من قبل النبات وكانت النتائج كما في الجدول رقم (٣).

جدول رقم (٣) يبين العزلات المحللة للفوسفات ومعامل الذوبان لكل عزلة:

العزلة	١٦.٢	١٨.٣	١٩.٤	٢٠.١	٢٨.٢	٣٠.١	٣٠.٢
معامل الذوبان	٤.٧	١.٨	٢.١	٤	٤.٦	٢.٢	٢.٧
العزلة	٣٢.١٢	٣٢.٢	٣٣.٣١	٣٣.٥	٣٥.١	٣٩.٣	٣٩.٨
معامل الذوبان	٢.٧	٢.١	٢.٣	١.٩	٢.١	٢	٢
العزلة	٤٠.١	٤٠.٢	٤٢.١	٤٦.٢١	٤٦.٢٢		
معامل الذوبان	٤	١.٨	٢.٦	٢.٢	٢.٦		

وتم حساب معامل الذوبان وفق المعادلة التالية :

$$\frac{\text{المستعمرةقطر + الهالةقطر}}{\text{المستعمرةقطر}} = \textbf{معامل الذوبان} \text{ :(Jadoon } \textit{et al.}\text{, 2019).}$$

ونلاحظ إن العزلات/16.2/, /٢٨.٢/ أعطت اعلى معامل ذوبان مقارنة مع باقي العزلات المختبرة. حيث بلغت معاملات الذوبان للعزلات أعلاه /٤.٧/,/٤.٦ / على التوالي في حين أعطت العزلات/١٨.٣/, /٤٠.٢/ اقل معامل ذوبان حيث بلغت معاملات الذوبان لهذه العزلات /١.٨/.

٣. تحليل البوتاس:

أظهرت نتائج اختبار العزلات /٤٤/ على وسط آلكساندورفان/٢١/ عزلة من من العزلات أعطت نتائج إيجابية لجهة تحليل البوتاسيوم وتشكيل هالة تحلل حول المستعمرة البكتيرية وفق الجدول رقم (٤).

الجدول رقم /٤/ يبين العزلات المحلل للبوتاس ومعامل الذوبان لكل عزلة.

العزلة	١٦.٢	١٨.٣	٢٠.٢	٢٠.٢١	٢٨.٢	٣.١	٣٢.٣
معامل الذوبان	٢.٨	١.٢	١.٤	١.٧	٣.٤	١.٤	١.٣
العزلة	٣٣.٣١	٣٣.٥	٣٤.٣١	٣٥.١	٣٥.٢	٣٥.٣	٣٩.٣
معامل الذوبان	١.١٢	١.١٤	١.١٣	١.٦	١.١	٢.١	١.٢١
العزلة	٤٠.١	٤٠.٢	٤٢.١	٤٢.٣	٤٢.٤	٤٦.٢١	٤٦.٢٢
معامل الذوبان	٢.٧	١.١٦	٢.١	٢.٤	٢.٤	١.١	١.٧

القدرة على إذابة البوتاسيوم (مؤشر الذوبان، SI)

$$\frac{\text{المستعمرةقطر + قطر الهالة}}{\text{المستعمرةقطر}} = \textbf{معامل الذوبان} \text{ :(Jadoon } \textit{et al.}\text{, 2019)}$$

٤. إنتاج حمض الأندول الخلي:

أظهرت نتائج اختبار العزلات أن ١٥ عزلة من العزلات أعطت نتائج إيجابية لجهة إنتاج حمض الأندول الخلي وكانت النتائج وفق الجدول رقم (١).

جدول رقم (١) يبين العزلات المنتجة لحمض الأندول الخلي.

حيث تدل إشارة + على شدة اللون وبالتالي شدة الإنتاج لحمض الأندول الخلي من خلال تدرج تغير اللون من الأصفر الى الأحمر.

نتائج تعريف العزلات.

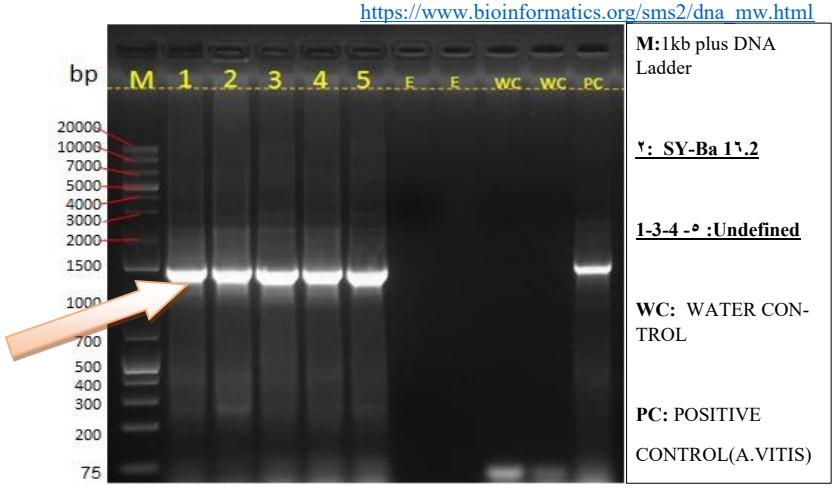
من خلال الاطلاع على النتائج تم العمل على تعريف أفضل العزلات من خلال الاختبارات المدروسة وكانت العزلة ١٦.٢ أفضل العزلات المدروسة من حيث اجتماع الصفات المطلوبة وتميزت نتائج الاختبارات البيوكيميائية ان العزلة ١٦.٢ هي من البكتيريا عصوية سالبة غرام لاهوائية اختيارية غير متبوغة سالبة لاختبار الاوكسيداز وموجبة لاختبار الكاتالاز.

نتائج التعريف الجزيئي للعزلة ١٦.٢:

بينت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة (Agarrose ١٪) وجود الحزمة المرغوبة بوزن جزيئي DNA Molecular Weight results

"GGGTGGAGGG" "Untitled" starting "Results for 1378 residue sequence"

422856.97Da وفق سلم 1kb plus DNA Ladder، وأن الدنا البكتيري المدروس سليم حسب https://www.bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html



الشكل (١٢) صورة للرحلان الكهربائي لدنا العزلة(SY_Ba16.2)

تم الحصول على نتائج تسلسل النيكليوتيدات باستخدام تقنية PCR والذي بلغ ١٣٧٨نيكليوتيد لكامل الجينوم البكتيري.

تم تحدد التتابع النكليوتيدي للقطعة المضخمة باستخدام بادئات 16S rDNA

ولدى مقارنة تسلسل النيكليوتيدات بالبنك الوراثي لموقع الوراثي (NCBI)

GGGTGGAGGGGAGGGAAGGGGGGTTAGTGGTAGCGGGAGGTTAAGCTACC
TACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGG
CCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTC
CGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGTACTT
TATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCC
TAACCGCTGGCAACAAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATTTCACAACACGAACTGACGACCGCCATGCAGCACCTGGCTCAAA
ATTCCCGAAGGGACCAAAGCATCTCTGCTAAATTCTCTGGATGTCAAGAA
TAAGTAAGGGTCTTCCCGTTGCATCCAAATAAACCACATGCTCCACCGCT
TGGGCGGGCCCCCCTCAATTCATTTGAATTTTAACCTTGCGGCCGTACTC
CCCAAGCGGTCCACTTAACGCGTTAACTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGC
ACAACCTCCAAGTCCACATCCTTTACCGCGTGGAATACCAAGGTATCTAA
TCCTGGTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGG
GGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTCAACGC
TACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACCAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCC
GATGCAGTTCCCAAGTTGAGCCCCGGGGATTTCACATCCGACTTGACAGA
CCGCCCGCCTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCAATTAACGCTTGCACCCT
CCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAACCGGTGCTTCTTCTGCGA
GTAACGTCAATTGACAGGGGTTATTAAACCCTGAAACCCTTCCTCCCCCG
CTGAAAGTACTTTACAAACCCGAAAGGCCTTCTTCCAAAACCCCCGCCAA
GGCTTCTTCAGGCTTTGCCCCCTTTGGGCAAAATTTCCCCCACGGTTGCC
CCCCCCAAAAAAATTGGAAACGGTTTTTAATTTCCTGTTTGGTTTGGTTC
TCCCCCCTAAAAAAAACCTAGGGGAATCCCCCCCAAGGGTAACCCCTAAC
CCCCCCCACAAAAAACCAATACCCCCTTTGGGGCCCCCCCAGAGGGAAAA
AAGGCCGCAGAGAGCCCCCCCCCTTTTTTTTTCCCCCCCCATTTTTTTGG
GGGATAAAAAAAAAAACGATTTTTTCAT

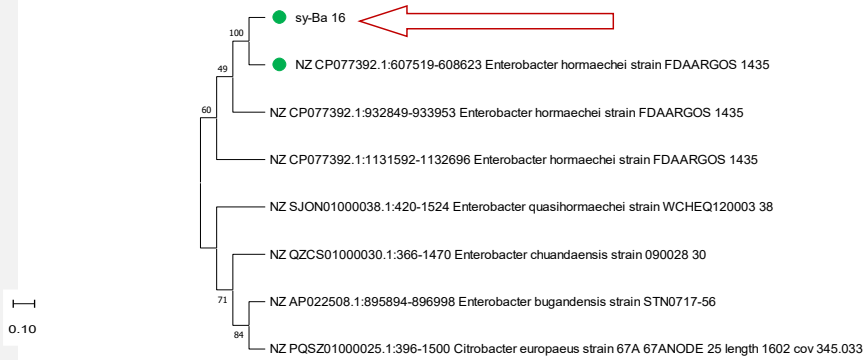
.BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov)

تبين ان العزلة البكتيرية ١٦,٢ تنتمي الى عائلة Enterobacteria جنس Enterobacter وتتشابه مع النوع Enterobacter hormaechei بنسبة تشابه بلغت ٩٤.٣٨٪

بناءاً على نتائج البنك الوراثي تم رسم شجرة القرابة للعزلة ١٦.٢SY-Ba مع السلالات الأكثر تشابها لها، حيث تم استخدام طريقة Neighbor-Joining method التي قدمها Saitou عام ١٩٨٧. للوصول الى التقارب الوراثي بين العزلة (١٦.٢) وثمان سلالات بكتيرية تتبع الى الجنس البكتيري Enterobacter وتم حساب مسافات التقارب الوراثي باستخدام الطريقة الإحصائية"الاحتمالية المركبة القصوى" (Maximum Composite Likelihood) بين الأصناف البكتيرية الداخلة بالتحليل. وتم إزالة جميع المواضع الغامضة لكل زوج تسلسلي. أُجريت هذه التحليلات الوراثية باستخدام برنامج(MEGA11 Tamura, 2021).

بينت شجرة القرابة الشكل رقم (١٢) وجود فرعين أساسيين حيث ضم العنقود الأول أربع سلالات بكتيرية تابعة لثلاثة أنواع وهي Enterobacter hormaechei

أما العنقود الثاني فيضم أربع سلالات تتبع الأنواع التالية: E. bugandensis، E. quasihormaechei, E.chuandaensis,Citrobacter europaeus



الشكل رقم (١٢) شجرة القرابة الوراثية للعزلة SY_ Ba 16.2

كما بينت مصفوفة التشابه الناتجة للعزلة المدروسة وأكثر العزلات تشابهاً معها حسب موقع SIAS (Sequence Identity And Similarity) (http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html) بأن أقرب سلالة هي- Enterobacter hormaechei 1435 607519-608623 بنسبة تشابه ٩٤,٣٨٪ مع العزلة المدروسة SY-Ba١٦,٢.

المناقشة:

بينت النتائج أن العزلات البكتيرية المختبرة /٤٤عزلة/ أعطت نتائج متباينة وفق الاختبارات المدروسة حيث أن١٦ من العزلات كانت قادرة على تثبيت الأزوت الجوي و١٩ منها كانت إيجابية لتحليل الفوسفات في حين أن ٢١ عزلة كانت محللة للبوتاس أما إنتاج حمض الأندول الخلي فكانت فقط ١٥ من العزلات قادرة على إنتاجه. حيث تبين تفوق /٦/ عزلات /١٦.٢-٣٣.٢-٣٣.١-٣٣.٤-٣٤.٢-٣٥.٣/ في إنتاج الآزوت حيث كانت مثبته بشكل كبير للآزوت الجوي.

وفي المقابل تميزت ٣ عزلات بمعامل تحليل للفوسفات ≤٤. وهي العزلات /١٦.٢-٢٨.٢-٤٠.١/

في حين تميزت ثلاثة عزلات فقط بتحليل البوتاس بمعامل تحليل ≤ ٢.٧ وهي /١٦.٢-٢٨.٢-٤٠.١/ وحيث نلاحظ من النتائج أن أفضل العزلات البكتيرية المحللة للفوسفات هي محللة للبوتاس بكفاءة عالية أيضا.

أما بالنسبة لإنتاج لحمض الأندول الخلي فقد تميزت /٤/ عزلات وهي /١٩.٤-٣٣.٣١-٣٣.٤-٣٤.٣١/ في حين أعطت العزلة ١٦.٢ نتائج إيجابية متوسطة لجهة إنتاج حمض الاندول الخلي. ومن خلال الاطلاع على النتائج السابقة كانت العزلة ١٦.٢ أكثر العزلات تميزا من ناحية تثبيت الازوت وتحليل الفوسفات والبوتاس وحتى أنها أعطت نتائج إيجابية متوسطة بإنتاج حمض الأندول الخلي.

ومن خلال نتائج التعريف البيوكيميائي والجزيئي تم تأكيد ان العزلة المدروسة تتبع لجنس Enterobacter والنوع hormaechei بنسبة تشابه وصلت الى ٩٤.٣٨٪ وأطلق على العزلة رمز SY-Ba 16.2.

وهو ما يؤكد انتمائها الى مجموعة البكتيريا المعززة لنمو النبات PGPR وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه Jha عام ٢٠١١ الـذي اكـد أن الأجنـاس الموجـودة فـي عائلـة Enterobacteriaceae التـي تتميـز بأنهـا مـن مجموعـة PGPB هي Citrobacter, Klebsiella ,Erwinia, Enterobacter و , Kluyvera , Pantoea , Serratia، (Jha *et al.,* 2011) .

وهذا ما يتفق أيضا مع ما أكده Ranawat بدراسته عام ٢٠٢١ على بكتيريا Enterobacter hormaechei والتي تستطيع بشكل طبيعي تثبيت N وإذابة المغذيات الكبيرة المرغوبة P و .K وتحويل K-feldsparإلى بوتاسيوم واذابة ثلاثي فوسفات الكالسيوم الى فوسفات وإنتاج حمض الاندول الخلي IAA كما أكد أن البذور التي تمت معالجتها بكتيريا Enterobacter hormaechei أبدت زيادة واضحة بالكتلة الحيوية المعززة وزيادة في طول الساق عند مقارنتها بمجموعة التحكم(الشاهد) وأدت الى تعزيز ليس فقط نمو النبات بل عدلت بنية الجذر مما أدى إلى تحسين إنتاجية المحاصيل(Ranawat *et al.,* 2021).

وقام Ranawat بفحص أربع سلالات مختارة لإنتاج السيدروفورات وذوبان الفوسفات وانتاج حمض الإندول الخليك (IAA) لدراسة إمكانية تعزيز نمو النبات. تمت مقارنة المجموعات التجريبية مع مجموعة تحكم لم تتلق أي علاج، وكانت العزلة EB8D هي أفضل عزلة من حيث تعزيز النمو مع تحسن ٧٣.٨٥٪ في طول الساق و١١٠.٨٦٪ في طول الجذر و١١٨.٨٥٪ في الوزن الجاف مقارنة بالشاهد غير المعالج. أظهرت نشاط التحكم الحيوي أن سلالة EB8D قد حسَّنت طول الساق بنسبة ١١١.٨٥٪ وطول الجذر بنسبة ١١٨.٨٥٪ والوزن الجاف بنسبة ٤٥٢.٣٨٪.

أكد تحليل S rRNA١٦ أن هذه السلالة تنتمي إلى جنس Enterobacter ولديها تشابه عالٍ مع Enterobacter hormaechei subsp. steigerwaltii (٩٩.٧١٪) (Ranawat *et al.,* 2021).

وأكد Jha أن Enterobacter spp لديها مجموعة واسعة من خصائصPGPالتي تشمل تثبيت النيتروجين، وإذابة فوسفور التربة، وإنتاج المضادات الحيوية، والقدرة على إفراز منتجات حامض الحديد، والكيتيناز، ونزعة الأمينACC ، والإنزيمات المائيّة إلى جانب السكريات الخارجية وفي تعزيز مسامية التربة .كما أكد أن قدرات PGP هذه البكتيريا من Enterobacterيمكن أن تجعلها مرشحًا محتملًا مناسبًا لنمو النبات وتطوره .نظرًا لدورها المتنوع في نمو المحاصيل ، فقد تم تطوير عدد من هذه السلالات تجاريًا كمحفزات لنمو النبات وعوامل المكافحة الحيوية(Jha *et al.,* 2011).

الاستنتاجات:

خلال دراسة ٤٤ عزلة بكتيرية من المحيط الجذري للقمح في عدة مناطق سورية أظهرت (٣٨) عزلة منها خصائص ايجابية ضمن معايير البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات PGPR. من بين هذه العزلات تفوقت العزلة ١٦,٢ من ناحية إنتاج الآزوت وتحليل الفوسفات والبوتاس وبنتيجة التحليل البيوكيميائي والجزيئي ورسم شجرة القرابة تبين انها تنتمي الى النوع البكتيري Enterobacter hormaechei

مما يرشحها للاستخدام في نظام زراعة القمح بعد إجراء مزيد من الاختبارات والتجارب الحالية.

التمويل: هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (٥٠١١٠٠٠٢٠٥٩٥).

References:

١. أبو غرة، محمود والدوجي، زياد الصواف. (١٩٩٦-١٩٩٧). أمراض النبات البكتيرية (النظري والعملي)، منشورات جامعة دمشق. ص (٤٣٢-٤٤٠).

2. Ahemad, M., & Khan, M. S. (2012). Evaluation of plant-growth-promoting activities of rhizobacterium Pseudomonas putida under herbicide stress. Annals of microbiology, 62(4), 1531-1540 .
3. Anand, K., Kumari, B., & Mallick, M. (2016). Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers. Int. J. Pharm. Pharm. Sci, 8(2), 37-40 .
4. Arancon, N. Q., Owens, J. D., & Converse, C. (2019). The effects of vermicompost tea on the growth and yield of lettuce and tomato in a non-circulating hydroponics system. Journal of plant nutrition, 42(19), 2447-2458 .
5. Atieno, M., Herrmann, L., Nguyen, H. T., Phan, H. T., Nguyen, N. K., Srean, P., . . . Shutsrirung, A. (2020). Assessment of biofertilizer use for sustainable agriculture in the Great Mekong Region. Journal of environmental management, 275, 111300 .
6. Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R., Reddy, M., & El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. Sustainability, 13(3), 1140 .
7. Bhavya, K., & Geetha, A. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria. Advances in Agriculture Sciences, 61, 87 .
8. Bishnoi, U. (2018). Agriculture and the dark side of chemical fertilizers. Environ. Anal. Ecol. Stud, 3(1), 552 .
9. Chandran, H., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria as a green alternative for sustainable agriculture. Sustainability, 13(19), 10986 .
10. Das, B., Sarma, H. K., Konwar, G., Saikia, J., & Rabha, J. (2016). Screening and Identification of traits in plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soils of Persea bombycina. Biotechnology and Biochemistry 2(2), 11-18 .
11. Fascella, G., Montoneri, E., & Francavilla, M. (2018). Biowaste versus fossil sourced auxiliaries for plant cultivation: The Lantana case study. Journal of Cleaner Production, 185, 322-330 .
12. Ilangumaran, G., & Smith, D. L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: a systems biology perspective. Frontiers in Plant Science, 8, 1768 .
13. Jabborova, D., Wirth, S., Kannepalli, A., Narimanov, A., Desouky, S., Davranov, K., . . . Syed, A. (2020). Co-inoculation of rhizobacteria and biochar application improves growth and nutrientsin soybean and enriches soil nutrients and enzymes. Agronomy, 10(8), 1142 .
14. Jadoon, S., Afzal, A., Asad, S., Sultan, T., Tabassam, T., Umer, M., & Asif, M. (2019). Plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from potato (Solanum tuberosum L.) and their antifungal activity against Fusarium oxysporum. JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences, 29 .(٤)

15. Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., & Saraf, M. (2011). Enterobacter: role in plant growth promotion. Bacteria in agrobiology: Plant growth responses, 159-182 .
16. Kesavan, P., & Swaminathan, M. (2018). Modern technologies for sustainable food and nutrition security. Current Science, 115(10), 1876-1883 .
17. Khan, N., Bano, A., Ali, S., & Babar, M. A. (2020). Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. Plant Growth Regulation, 90, 189-203 .
18. Meena, M., Zehra, A., Swapnil, P., Marwal, A., Yadav, G., & Sonigra, P. (2021). Endophytic nanotechnology: an approach to study scope and potential applications. Frontiers in Chemistry, 9, 613343 .
19. Mohammadi, K., & Sohrabi, Y. (2012). Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review. ARPN J Agric Biol Sci, 7(5), 307-316 .
20. Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. Science of the Total Environment, 743, 140682 .
21. Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. Frontiers in microbiology, 6, 745 .
22. Ranawat, B., Bachani, P., Singh, A., & Mishra, S. (2021). Enterobacter hormaechei as plant growth-promoting bacteria for improvement in Lycopersicum esculentum. Current microbiology, 78, 1208-1217 .
23. Smith, B. E., Richards, R. L., & Newton, W. E. (2013). Catalysts for Nitrogen Fixation: Nitrogenases, Relevant Chemical Models and Commercial Processes (Vol. 1): Springer Science & Business Media.
24. Walpola, B., & Hettiarachchi, R. (2020). Plant Growth Promoting Traits of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Agricultural Lands in Sothern Sri Lanka. J. Food Agric, 13, 2-18.
25. Jadoon, S., Afzal, A., Asad, S., Sultan, T., Tabassam, T., Umer, M., & Asif, M. (2019). Plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from potato (Solanum tuberosum L.) and their antifungal activity against Fusarium oxysporum. JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences, 29(4).
26. Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., & Saraf, M. (2011). Enterobacter: role in plant growth promotion. Bacteria in agrobiology: Plant growth responses, 159-182.
27. Ranawat, B., Mishra, S., & Singh, A. (2021). Enterobacter hormaechei (MF957335) enhanced yield, disease and salinity tolerance in tomato. Archives of microbiology, 203, 2659-2667.