جـــامعـــة كـــربـــــلاء
كليــة العلــوم
قســم علـوم الحيـاة

دراسة تأثيرمتعدد السكر الخارجي المنتج من البكتريا المحفزة لنمو النبات في تخفيف الإجهاد المائي لنباتات الذرة الصفراء *Zea mays* L.

رسالة ماجستير

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

كرار كاظم هاشم الجيليحاوي

بكالوريوس علوم حياة- جامعة كربلاء 2007

باشـــــراف

أ.م. د. خالد علي حسين **أ.د. ناجح هاشم كاظم**

صفر- 1446 هـ آب - 2024 م

﴿وَمَا تَوْفِيقِي إِلاَّ بِاللَّهِ عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ أُنِيب﴾

صدق الله العلي العظيم

(سورة هود، الآية 88)

اقرار المشرف

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافنا في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع:

الاســـم: د. خالد علي حسين

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريـــخ : ٣ / ٧ / ٢٠٢٤

التوقيع:

الاســـم: د. ناجح هاشم كاظم

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريـــخ : ٣ / ٧ / ٢٠٢٤

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات أعلاه, أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاســـم: د . مؤيد نعيم كريم

المرتبة العلمية : مدرس

العنـــوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريـــخ : ٣ / ٧ / ٢٠٢٤

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة ، نشهد باننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (**دراسة تأثير متعدد السكر الخارجي المنتج من البكتريا المحفزة لنمو النبات في تخفيف الإجهاد المائي لنباتات الذرة الصفراء .Zea mays L**) وقد ناقشنا الطالب (**كرار كاظم هاشم عبود الجيليحاوي**) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ ٢٩ / ٨ / ٢٠٢٤ ونرى انها جديرة لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة بتقدير (**امتياز**) .

رئيس اللجنة المناقشة

التوقيع :

الاسم : د. علي عطية عبد

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التأريخ : ١٨/ ٩/ ٢٠٢٤

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.خنساء عبد العالي شهيد

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التأريخ : ١٨/ ٩/ ٢٠٢٤

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.ايفان ابراهيم مرهج

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة بابل

التأريخ : ١٨/ ٩/ ٢٠٢٤

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.خالد علي حسين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التأريخ : ١٨/ ٩/ ٢٠٢٤

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.ناجح هاشم كاظم

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية الزهراوي الجامعة

التأريخ : ١٨/ ٩/ ٢٠٢٤

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع :

الاسم : د. حسن جميل جواد الفتلاوي

المرتبة العلمية : استاذ

التأريخ : ١٩/ ٩/ ٢٠٢٤

الإهداء

من ذاتي القاصر والمقصّر الى ذاته الشاملة الفياضة، ومن آني ومحدوديتي الى أزليته وسرمديته ارفع اهدائي بأرفع أعمالي، راجياً قبول جهد المقل وتعب السنين.

الى من اسمه خير الأسماء وهو سيد الأنبياء ومعلم البشرية الأول النبي محمد (صلى الله عليه وآله وسلم)

الى من برهما ودعائهم سبيل نجاتي، امام عطائهم الكثير وفيض حنانكم الكبير أشعل اصابعي قناديلاً في دروبكما كمن يهدي نجمة للسماء. ورؤيتهما، سر سعادتي، أمي وأبي، أقدم اهدائي.

الى من أشعلت طاقتها قنديلاً في طريقي المتعثر، زوجتي وام روحي، أقدم اهدائي.

الى وجوه أولادي الفياضة بالأمل والسعادة، أقدم اهدائي.

الى من شاركوني بدم والديَّ، توائمي الكثيرة، أختي واخوتي، أقدم اهدائاتي.

أهدي جهدي هذا

الباحث

كرار كاظم هاشم

شكر وعرفان

في زمان المصاعب هذا، ومطبات فضاءه وعنفوانها، كنت على سفر العلم الناجع مســـافراً، وكانت هناك ايدٍ كريمة، تعارك مجتذبات أفقه، وتذلل عقباته، وتصد رياحه الشمسية عني.

ايادٍ وأفواه لا ترتقيها كلمات شـكري ومضـامين طيات لسـاني، غير إني على يقين من سماحة قلوبهم ووسعتها بقبول قليل شكري وامتناني.

الى رئاسة جامعة كربلاء فضاءً رحباً وقلوباً طيبة.

الى عمادة كلية العلوم متمثلة بالســـيد العميد ا.د حســـن جميل الفتلاوي شكري الوافر.

الى رئاســة قســم علوم الحياة والكادر التدريسيـ والمنتســبين شـكراً يليق بمقامهم السامي.

الى رفيعي المقام أ. م. د. خالد علي حســين اليســاري و أ.د. ناجح هاشـــم كاظم الظويهري، الشكر اللائق بمقامهما لأشرافهما على هذه الرسالة، وما قدماه لي من نصح وتوجيه سـاعد في اخراج هذا النتاج العلمي وسـاهم في تجاوز الكثير من الصعاب.

الى مركز الامين للابحـاث / العتبـة العلويـة، ووزارة العلوم والتكنولجيـا / الهيئة العامة للبحوث، أجزل الشكر والامتنان.

الى مختبرات الصـــحة العامة في كربلاء / الاحياء المجهرية ومختبر زراعة كربلاء والكادر واخص بـالـذكر الاخ مصـــطفى حمود عبود ابلغ الشـــكر والامتنان واحسنه.

الباحث

كرار كاظم هاشم

الخــلاصـــة

اجريت الدراسة في مختبر الدراسات العليا في كلية العلوم جامعة كربلاء و في وزارة العلوم والتكنلوجيا – الهيئة العامة للبحوث ,بهدف تحضير لقاح بكتيري من بعض الانواع البكتيرية المحفزة لنمو النبات promoting growth plant bacteria (PGPB) .

وتضمنت الدراسة محورين اساسيين :

المحور الاول : عزل 60 عزلة بكتيرية محلية من ترب تعاني من الجفاف و قلة المياه و تضمنت سلسلة من التجارب لتشخيص العزلات مظهرياً و مجهرياً و شخصت الى 20 عزلة بكتيرية من الاجناس التالية Bacillus , Pseudomonas , Azotobacter و دراسة قابلية هذه الاجناس على انتاج السكر المتعدد الخارج خلوي Extra cellular polysaccharide و كانت جميع العزلات منتجة للسكر و بنسب متفاوتة و انتخبت 10 عزلات من كل جنس و الاكثر انتاجا" للسكر المتعدد الخارج خلوي .

دراسة تحمل العزلات البكتيرية الاكثر انتاجا" للسكر لتحمل مستويات من الجفاف المستحدث باستخدام التراكيز (25,20,15,10,0) % من مادة Polyethylene glycol 600 (peg-600) وانتخاب عزلتين من كل جنس كانت الاكثر الاكثر انتاجا" للسكر المتعدد الخارج خلوي و تحملا" للجفاف .

تم اجراء الفحوصات البايـــوكيميائية للعزلات الستة المختـــــارة في الـــدراسة وشخصت مايلي :

,Pseudomonas Putida , BreviBacillus Choshinenensi, Bacillus subtilli) Azotobacter , Azotobacter chroococcum1,Pseudomonas Fluresense chroococcum2) وتم تاكيد التشخيص باستخدام جهاز الفايتك Vitek-2و API20 بالنسبة للعزلات الاولى

المحور الثاني : استخدام العزلات الستة المشخصة في تخفيف الاجهاد الجفافي من خلال سلسلة من التجارب التالية حيث تم نقع بذور الذرة الصفراء *Zea mays* L. بالراشح البكتيري للعزلات الســتة قيد الـدراســـة لمـدة 24 ســـاعــة ونفـذت تجربـة عـاملي و وفق تصــميم RandomizedcompleteDesign(RC) لدراســة تاثير العزلات البكتيرية في تحســين تحمل بادرات الذرة الصـفراء في ظروف الاجهاد الجفافي المسـتحدث من خلال فترات ري مختلفة كل (24, 48, 72) ســـاعة و تمت تنمية في غرف النمو Growth chamber تحت ظروف النمو القياسية من درجة الحرارة و شدة الاضاءة لمدة 15 يوم و اظهرت النتائج :

أنَ استعمال العزلات البكتيرية قد سببت حصول زيادة معنوية في دليل تحمل الجفاف لبادرات الذرة الصفراء الغيرمجهدة (الري كل 24 ساعة) من 2.100 الى (3.0 ،2.3، 3.4، 2.3، 4.4) و المجهدة (الري كل 48 ساعة) ارتفع الى (3.6 ، 3.1 ، 4.1 ، 2.4 ، 4.6) لكل

من العزلات *Bacillus subtilis*، *BreviBacillus* ، *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas fluresense*، *Azotobacter chroococcum*1، على التوالي .

أثرت العزلات معنوياً في زيادة محتوى الاوراق من الكلوروفيل حيث زاد من 66.03 في أوراق البادرات غير المجهدة الى (86.11,82.20,83.64,80.69,84.02،80.69) للعزلات *Bacillus subtilis*، *BreviBacillus* ، *Pseudomonas putida* ، *Pseudomonas fluresense* ، *Azotobacter1 chroococcum* ، *Azotobacter chroococcum 2* على التوالي .

أثرت العزلات معنوياً في خفض شدة الإجهاد والنسبة لضرر الغشاء البلازمي و نسبة انخفاض سجلت 32% و 31,5% عن المعاملة بالبكتيريا عند العزلتين *Azotobacter1 chroococcum*، *Azotobacter chroococcum 2* على التوالي .

كانت للعزلات أثرمعنوياً في زيادة المحتوى الرطوبي للتربة وأعلى محتوى رطوبي 33.070 تحقق عن المعاملة ببكتيريا *Bacillus subtilis*.

أثر الجفاف بشكل معنوي في أغلب المؤشرات المدروسة و سبب زيادة معنوية في شدة الإجهاد و نسبة الضرر للغشاء البلازمي من (0.594) (41.991) على التوالي من البادرات غير المجهدة الى (61.05) (0.937) في البادرات المعرضة للاجهاد (الري كل 72 ساعة) وانخفاضاً من محتوى أوراق البادرات و استقرارية الكلوروفيل من (80.438) الى (67.447) وانخفاض دليل التحمل من(2.7) الى (2.41) وبنسبة (% 9.7 و % 8.93) على التوالي .

إنّ التداخل بين كل من العزلات البكتيرية ومستويات الجفاف أثر وبشكل معنوي في أغلب الصفات المدروسة.

قائمة المحتويات

التسلسل	المحتويات	رقم الصفحة
1	**المقدمة**	**1**
2	**استعراض المراجع**	**5**
1-2	احياء التربة المجهرية	**5**
1-1-2	تطبيقات الأحياء المجهرية على التربة	**6**
2-1-2	أهمية الأحياء المجهرية على تحسين ونمو النبات	**7**
3-1-2	الأحياء المجهرية كمخصبات حيوية	**7**
1-3-1-2	البكتيريا المحفزة لنمو النبات	**8**
1-1-3-1-2	بكتريا PGPB المتحلمة للجفاف	**11**
2-1-3-1-2	تأثير PGPB في إجهاد الجفاف	**11**
3-1-3-1-2	آليات الحماية من الإجهاد بواسطة PGPB	**12**
2-2	متعدد السكريات الخارجي البكتيري	**15**
1-2-2	آلية انتاج EPS وتحمل الجفاف	**17**
2-2-2	البكتريا المنتجة لل EPS ودورها في نمو وتحمل الجفاف	**17**
3-2-2	التفاعل بين البكتيريا المنتجة لل EPS والنباتات	**18**
4-2-2	تحمل الجفاف بواسطة البكتريا المنتجة للـ EPS	**20**
5-2-2	أهم الأنواع البكتيرية المنتجة للـ EPS	**21**
1-5-2-2	جنس*Bacillus spp.*	**21**
1-1-5-2-2	اكتشاف وتصنيف بكتريا *Bacillus spp*	**21**
2-1-5-2-2	الصفات الفسلجية لبكتريا *Bacillus spp*	**21**
3-1-5-2-2	أهمية بكتريا *Bacillus spp*	**22**
2-5-2-2	جنس *Pseudomonas spp.*	**22**
1-2-5-2-2	اكتشاف وتصنيف بكتريا *Pseudomonas spp.*	**22**
2-2-5-2-2	الصفات الفسلجية لبكتريا *Pseudomonas spp.*	**23**

3-2-5-2-2	أهمية بكتريا *Pseudomonas spp*	**24**
3-5-2-2	جنس*Azotobacter spp.*	**24**
1-3-5-2-2	إكتشاف وتصنيف بكتريا *Azotobacter spp.*	**24**
2-3-5-2-2	الصفات الفسلجية لبكتريا *Azotobacter spp.*	**25**
3-3-5-2-2	أهمية بكتريا *Azotobacter spp.*	**26**
6-2-2	تأثيرات البكتريا المنتجة لل EPS	**26**
1-6-2-2	تأثير البكتريا المنتجة لل EPS على المحتوى المائي للتربة	**26**
2-6-2-2	تأثير البكتريا المنتجة لل EPS على عملية النتح	**28**
3-6-2-2	تأثير البكتريا المنتجة لل EPS على قوة البادرة	**28**
4-6-2-2	تأثير البكتريا المنتجة لل EPS على شدة الإجهاد ومعامل التحمل	**29**
5-6-2-2	تأثير البكتريا المنتجة لل EPS على استقرارية الغشاء البلازمي	**30**
6-6-2-2	تأثير البكتريا المنتجة لل EPS على استقرارية الكلوروفيل	**30**
7-6-2-2	تأثير البكتريا المنتجة لل EPS على المحتوى المائي للأوراق	**31**
3	**المواد وطرائق العمل**	**33**
1-3	المواد والأجهزة المستخدمة	**33**
1-1-3	الأدوات والمعدات	**33**
2-1-3	المواد الكيمياوية	**34**
3-1-3	الأوساط الزرعية المستعملة	**35**
	مخطط التجربة	**36**
2-3	**طرق العمل**	**37**
1-2-3	جمع العينات	**37**
2-2-3	عزل وتشخيص البكتريا	**37**
1-2-2-3	عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus spp.*	**37**
1-1-2-2-3	عزل بكتريا *Bacillus spp.*	**37**

39	التشخيص الأولي لبكتريا *Bacillus spp.*	2-1-2-2-3
39	الفحوصات المجهرية للتشخيص الأولي لعزلات *Bacillus spp.*	1-2-1-2-2-3
40	حفظ العزلات وأدامتها	3-1-2-2-3
40	عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas spp*	2-2-2-3
40	عزل البكتريا *Pseudomonas spp*	1-2-2-2-3
41	التشخيص الأولي لبكتريا *Pseudomonas spp*	2-2-2-2-3
41	الفحوصات المختبرية للتشخيص الأولي لعزلات *Pseudomonas spp.*	1-2-2-2-2-3
42	عزل وتشخيص بكتريا.*Azotobacter spp*	3-2-2-3
42	عزل البكتريا.*Azotobacter spp*	1-3-2-2-3
43	التشخيص الأولي لبكتريا ال.*Azotobacter spp*	2-3-2-2-3
44	حفظ عزلات بكتريا .*Azotobacter spp*	3-3-2-2-3
44	الغربلة الكمية لا نتاج متعدد السكريات الخارجي من بكتريا .*Bacillus spp*	3-2-3
44	تحضير اللقاح	1-3-2-3
44	تحضير وسط الأنتاج	2-3-2-3
44	تلقيح وسط الأنتاج	3-3-2-3
44	استخلاص متعدد السكريات الخارجي من بكتريا *Bacillus spp.*	4-3-2-3
45	الغربلة الكمية لإنتاج متعدد السكريات الخارجي من عزلا ت *Pseudomonas spp*	4-2-3
45	تحضير اللقاح	1-4-2-3
45	تحضير وسط الأنتاج	2-4-2-3
45	تلقيح وسط الأنتاج	3-4-2-3
46	استخلاص متعدد السكريات الخارجي من بكتريا *Pseudomonas spp.*	4-4-2-3
46	الغربلة الكمية للإنتاج متعدد السكريات الخارجي من عزلات*Azotobacter spp*	5-2-3
46	تحضير اللقاح	1-5-2-3
46	تحضير وسط الأنتاج	2-5-2-3

3-5-2-3	تلقيح وسط الأنتاج	**46**
4-5-2-3	استخلاص متعدد السكريات الخارجي من بكتريا *Azotobacter spp*	**46**
6-2-3	اختبار قابلية العزلات قيد الدراسة في تحمل ظروف الجفاف	**46**
7-2-3	التشخيص الكيموحيوي للعزلات المنتخبة قيد الدراسة	**47**
8-2-3	عمل اختبارات وفحوص الفايتك للعزلات البكتيرية المنتخبة	**52**
9-2-3	اختبارات ال API20	**52**
10-2-3	تحضير معاملات الجفاف	**52**
1-10-2-3	معاملات التربة	**52**
2-10-2-3	معاملات البذور	**53**
3-10-2-3	معاملات اللقاح البكتيري	**54**
4-10-2-3	تهيئة التجربة	**54**
11-2-3	تقدير وحساب المؤشرات	**55**
12-2-3	التحليل الأحصائي	**57**
4	**النتائج والمناقشة**	**58**
1-4	عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus spp.*	**58**
1-1-4	عزل بكتريا *Bacillus spp*	**58**
1-1-1-4	الصفات الزرعية والمجهرية	**58**
2-1-4	عزل وتشخيص بكتريا . *Pseudomonas spp*	**58**
1-2-1-4	عزل بكتريا . *Pseudomonas spp*	**58**
2-2-1-4	الصفات الزرعية و المجهرية	**59**
3-1-4	عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter spp.*	**59**
1-3-1-4	عزل بكتريا *Azotobacter spp.*	**59**
2-3-1-4	الصفات الزرعية و المجهرية	**59**
2-4	غربلة عزلات بكتريا . *Bacillus spp* للإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي EPS	**59**
3-4	غربلة عزلات بكتريا *Pseudomonas spp* لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي	**61**

4-4	غربلة عزلات بكتريا *Azotobacter spp* . لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلو ي	**62**
5-4	تقدير قابلية البكتريا في تحمل ظروف الجفاف	**66**
1-5-4	تقدير قابلية عزلات بكتيريا *Bacillus spp* في تحمل ظروف الجفاف	**66**
2-5-4	تقدير قابلية عزلات بكتيريا *Pseudomonas spp* في تحمل ظروف الجفاف	**66**
3-5-4	تقدير قابلية عزلات بكتيريا *Azotobacter spp* في تحمل ظروف الجفاف	**67**
4-5-4	التشخيص الكيموحيوي للعزلات الأكثر انتاجا لـ EPS والمتحملة للجفاف	**68**
1-4-5-4	التشخيص الكيموحيوي للعزلات الأكثر انتاجا لل EPS والمتحملة للجفاف بكتريا *Bacillus spp.*	**68**
2-4-5-4	التشخيص الكيموحيوي للعزلات الأكثر انتاجا لل EPS والمتحملة للجفاف بكتريا*Pseudomonas spp*	**69**
3-4-5-4	التشخيص الكيموحيوي للعزلات الأكثر انتاجا لل EPS والمتحملة للجفاف بكتريا *Azotobacter spp*	**69**
6-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل معدلات النتح لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	**71**
7-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل قوة و حيوية البادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	**72**
8-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل شدة الإجهاد لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	**74**
9-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل تحمل الإجهاد لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	**76**
10-4	تأثير العزلات البكتيرية في استقرارية الغشاء البلازمي لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	**77**
11-4	تأثير العزلات البكتيرية في الكلوروفيل لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	**78**
12-4	تأثير العزلات البكتيرية في المحتوى الرطوبي للتربة لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	**80**
13-4	تأثير العزلات البكتيرية في المحتوى المائي للورقة لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	**81**
5	**الأستنتاجات والتوصيات**	**84**
1-5	الأستنتاجات	**84**

2-5	التوصيات	**85**
	المصادر	**86**

قائمة الاشكال

التسلسل	الشكل	رقم الصفحة
1-2	أنواع مختلفة من المخصبات الحيوية	8
2-2	العلاقة بين البكتريا وجذور النباتات	10
3-2	العلاقة بين الإجهاد و PGPB وعلاقتهما بنمو النبات	12
4-2	الآليات المباشرة لـ PGPB المؤثرة في نمو النبات	14
5-2	الآليات غير المباشرة ل PGPB المؤثرة في نمو النبات	15
1-3	عزلات 10 *Bacillus spp* التي تم انتخابها والتي كانت الأكفأ في انتاج EPS	60
2-3	عزلات 10 *Pseudomonas spp* التي تم انتخابها والتي كانت الأكفأ في انتاج EPS	62
3-3	عزلات 10 *Azotobacter spp* التي تم انتخابها والتي كانت الأكفأ في انتاج EPS	63

قائمة الجداول

التسلسل	الجدول	رقم الصفحة
1-3	الأدوات والمعدات والشركات المصنعة لها	33
2-3	المواد الكيميائية أو المحاليل والشركات المصنعة لها	34
3-3	الأوساط الزرعية المستعملة	35
4-3	مكونات وسط تخمر السكريات	48
5-3	التحاليل الفيزيائية والكيميائية لتربة التجربة	52
6-3	العزلات البكتيرية ومستويات الجفاف	54
1-4	غربلة عزلات بكتيريا *Bacillus spp* .لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي	60
2-4	غربلة عزلات بكتيريا *Pseudomonas spp* . لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي	61
3-4	غربلة عزلات بكتيريا *Azotobacter spp* لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي	63
4-4	نتائج كفاءة عزلات بكتريا *Bacillus spp* المقاومة للجفاف	66
5-4	نتائج كفاءة عزلات بكتريا *Pseudomonas spp* المقاومة للجفاف	67
6-4	نتائج كفاءة عزلات بكتريا *Azotobacter spp* المقاومة للجفاف	67
7-4	الأختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا*Bacillus spp* ، *Pseudomonas spp* و*Azotobacter spp*	70
8-4	تشخيص العزلات البكتيرية	71
9-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل معدلات النتح لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	72
10-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل قوة و حيوية البادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	73
11-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل شدة الإجهاد لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	75
12-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل تحمل الإجهاد لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	76
13-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل استقرارية الغشاء البلازمي لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	78
14-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل الكلوروفيل لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	79

15-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل المحتوى المائي للتربة لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	80
16-4	تأثير العزلات البكتيرية في دليل المحتوى المائي للورقة لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف	82

الأختصار	المعنى
PGPR	Promoting growth plant Rihzospher
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
EPS	Exopolysaccharide
PEG	Polyethylene glycol
RWC	Relative Water Content
SMS	Sucrose Mineral Salt
API20	Analytical Profile Index 20
L.B	lurian bacteria broth
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DDST	Double distilled water

قائمة المختصرات

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

1- المقدمة Introduction

تعد زراعة النباتات من أهم الأنشطة الأقتصادية في العالم، حيث توفر الغذاء والدواء والمواد الخام للعديد من الصناعات. ومع ذلك فإن إنتاجية النبات تواجه العديد من التحديات، بما في ذلك ندرة المياه وتلوث التربة وتغير المناخ . يمكن أن تؤدي هذه الظروف البيئية المختلفة إلى انخفاض إنتاجية النباتات، مما يؤثر على الأمن الغذائي العالمي ونقص الغذاء. (Silva *et al.,* 2020)

تكتسب الممارسات الزراعية المستدامة، مثل استخدام البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النباتات Promoting growth plant bacteria (PGPR) أو اللقاحات الميكروبية، أهمية كبيرة في الزراعة المكثفة في جميع أنحاء العالم بسبب انخفاض استخدام الاسمدة الكيمياوية في إنتاج المحاصيل بسبب المشاكل البيئية والأقتصادية التي تصاحبها (Ramakrishna *et al.,* 2019) .

تؤثر الظروف البيئية المختلفة، سواء الاحيائية أو اللا أحيائية، على نمو النباتات. يمكن أن يؤدي انخفاض إنتاجية النباتات إلى مشاكل الأمن الغذائي العالمي، لذلك من المهم فهم هذه العوامل وتطوير استراتيجيات للتخفيف من آثارها مع الحفاظ على البيئة النظيفة من حيث الوقت والطرق الجديدة وعلى المدى القصير حيث يمكن استخدام الأسمدة والمبيدات واستعمال أصناف عالية الأنتاجية وذات جودة . مع أنها لا تعد صديقة للبيئة ويمكن أن تؤدي الى زيادة تركيز المواد الملوثة للبيئة والتي تؤثر على نمو النباتات ودخولها في السلسلة الغذائية (Rani *et al.,* 2023).

من العوامل الأحيائية البكتريا المحفزة لنمو النبات هي Promoting Growth Plant Bacteria (PGPB)، توفر البكتيريا المعززة لنمو النبات **(**PGPB**)** فوائد متعددة من خلال تعزيز إنتاجية المحاصيل ومحتوى العناصر الغذائية وكبح نمو مسببات الأمراض. سيؤدي تطوير التفاعلات المفيدة بين الميكروبات والنبات بناءً على علم الجينوم والنسخ والبروتينات والبيانات الأيضية لكل من PGPB والمضيف إلى التلقيح الميكروبي الأمثل لتعزيز إنتاجية المحاصيل ومحتوى المغذيات. يتم الترويج لـ PGPB كتقنية خضراء من شأنها تقليل استخدام الأسمدة الكيماوية وبالتالي تحسين بيئة التربة (Ramakrishna *et al.,* 2019)**.**

إنّ البكتريا المنتجة للسكريات المتعددة واحدة من مجاميع PGPB والتي تعد عديدات السكر الخارجية (EPS) Exopolysaccharide ذات الأصل الميكروبي ذات الوظائف الجديدة والخصائص الفيزيائية والكيميائية القابلة للتكرار فئة مهمة من المواد البوليميرية. يُعتقد أن EPS يحمي الخلايا البكتيرية من الجفاف، وينتج الأغشية الحيوية، ومن الآليات التي تعمل بها PGPB على تحفيز نمو النبات و تحمله اجهاد الجفاف Draught stress، هي تكوين الغشاء الخلوي البكتيري Bacterial biofilm و تتكون هذه الأغشية الحيوية عن طريق انتاج مواد بوليميرية ذات علاقة كبيرة من خلال التفاعل ما بين البكتريا والنبات تحت ظروف الإجهاد و EPS له قابلية على الأحتفاظ بالمياه (Vardharajula, 2014) . والبكتريا المنتجة لل EPS يمكنها البقاء والعيش في ظروف قلة المياه و EPS هو عبارة عن بوليمرات ذات وزن جزيئي عالي والتي تلتصق بسطح التربة مما يساعد على تجمع التربة . والبكتريا المنتجة لل EPS يمكنها المحافظة على محتوى مائي أعلى مما يساعدها على البقاء والعيش في ظروف تراجع أو قلة المحتوى المائي للتربة (Raghuwanshı, 2024) .

دراسة سابقة اشارت الى أن التعرض لظروف الإجهاد المائي يؤثر على تركيب ونسب السكريات في EPS المنتج بواسطة *Bacillus spp.* حيث أدت السلالات الموجودة في التربة إلى تراكم جيد للتربة في ظل ظروف إجهاد الجفاف في فترات حضانة مختلفة على تحمل الإجهاد اللا أحيائي للكائنات الحية الدقيقة. تشير هذه الدراسة إلى حقيقة أن جزيئات EPS تشارك في الأدوار البيئية عن طريق توجيه الطاقة والمواد المغذية للنمو وحماية الخلايا ضد البيئات المحدودة المياه والمساهمة في تحسين بنية التربة كما يتضح بزيادة إنتاج EPS بواسطة *Bacillus spp.* تحت ضغط الجفاف. وبالتالي فإن التلقيح باستخدام *Bacillus spp.* قد تكون مفيدة في استعادة بنية التربة (Vardharajula, 2014).

كذلك يمكن لسلالة *Pseudomonas putida* المنتجة لـ EPS أن تشكل غشاء حيوي على سطح جذر شتلات عباد الشمس وأظهرت تحسنًا في تجميع التربة واستقرار التربة الملتصقة بالجذور (Sandhya *et al*., 2009).

كذلك يلعب EPS المنتج من قبل بكتيريا *Azotobacter* الموجود في موطن التربة أدواراً رئيسة في عمل النظام البيئي من خلال التحكم في تفاعلات تدوير المغذيات الضرورية للحفاظ على خصوبة التربة وكذلك المساهمة في تكوين وصيانة بنية التربة في ظل ظروف الجفاف اللاحيائية حيث تعتمد *Azotobacter* المنتجة لـ

EPS آليات مختلفة لتعزيز نمو النبات والبكتيريا الجذرية الأخرى، تعد هذه مفيدة وصديقة للبيئة. (Gauri *et al.,* 2012)

كذلك في دراسات سابقة اشارت الى سلالات معينة من PGPR المتحملة للجفاف يمكن أن تساعد النباتات على تحمل إجهاد الجفاف من خلال بعض الآليات الفسيولوجية التي تم اقتراحها تشمل تغييرات في بنية الجذر مما يؤدي إلى تحسين امتصاص الماء والمغذيات، مع آثار إيجابية على نمو النبات بشكل عام، وزيادة في المحتوى المائي النسبي، وزيادة في العديد من المواد المذابة العضوية وغير العضوية، فضلا عن زيادة في تخليق المعدلات الأسموليتات بما في ذلك البرولين، وزيادة فعالية الأنزيمات المضادة للأكسدة التي تبحث عن أنواع الأوكسجين الفعالة، وانتاج الهرمونات النباتية (Ngumbi & Kloepper, 2016) .

وفي ظل هذه الظروف (اجهاد مائي) فإن استخدام بكتريا PGPB هي الأستراتيجية البديلة البسيطة والرخيصة للتعامل مع ظروف الإجهاد المائي. أي استخدام طرق صديقة للبيئة والوقت المناسب والأفضل وذلك عن طريق البكتريا المحفزة للنمو (PGPB) المنتجة للـ Exopolysaccharides والمتحملة للجفاف (Chieb & Gachomo, 2023).

هدف الدراسة :

بالنظر للمشاكل التي يسببها الجفاف وخطورته على الأمن الغذائي والأقتصاد العالمي، ولزيادة استخدام الأسمدة الكيمياوية والتي لها تأثيرات سلبية، وكلفتها الأقتصادية العالية، ولأهمية معالجة هذه الظاهرة المتنامية التجأت الأبحاث الحديثة الى استخدام اللقاحات المايكروبية. فقد هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن بعض أنواع البكتريا المنتجة للـ Exopolysaccharides والأكثر تحملاً للجفاف وتأثيرها على النبات .

ولذلك تم استخدام انواع بكتيرية كمخصبات حيوية في تحسين نمو و تحمل نبات الذرة للاجهاد الجفافي واستخدامها كمخصبات حيوية في تحسين و نمو النبات و البيئة اللا احيائية غير الملائمة و حماية النبات منها لتحسين تحمل بادرات الذرة الصفراء في تحمل الجفاف و نجاح هذه الأستراتيجية قد يكون نهجاً واعداً لتشخيص تحمل النباتات النامية في الترب التي تعاني من ندرة أو قلة المياه تحت ظروف الجفاف .

وتم عمل ذلك من خلال تحقيق المحاور التآلية:

1. عزل وتشخيص بعض أنواع البكتيريا (PGPB) والمتحملة للجفاف والمنتجة لـ Exopolysaccharides (ESP).

2. استخدام البكتريا المعزولة كمخصبات حيوية في تحسين نمو النبات وزيادة تحمل للاجهاد الجفافي .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

2- استعراض المراجع

2-1 احياء التربة المجهرية Microorganisms of Soil

تلعب الكائنات الحية الدقيقة في التربة دورًا مهماً في النظام البيئي للتربة، وهو أمر مهم لجودة التربة والأنتاجية النباتية. ولها تأثير على العديد من عمليات النظام البيئي الحاسمة والأساسية، مثل تحلل المواد العضوية، وتمعدن المغذيات، ووظائف التربة، وامتصاص المغذيات النباتية. (Bending *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2021)

علاوة على ذلك، تعد البكتيريا المجموعة الأكثر تنوعاً ووفرة من الكائنات الحية الدقيقة في التربة، والتي تلعب دوراً مهماً في تحلل وتمعدن المواد العضوية والمواد المغذية وتطوير مجاميع التربة (Lian *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2020; Bu *et al.*, 2020)، وبالتالي التأثير على خصوبة التربة ونمو النبات. (Tardy *et al.*, 2015) تلعب الكائنات الحية الدقيقة دوراً متميزاً في تحلل المواد العضوية من خلال افراز الأنزيمات خارج خلوية وتحلل الجزيء الكبير إلى مونومرات يستخدمها النبات (Bending *et al.*, 2004 ; Harris, 2009). علاوة على ذلك، يؤدي تحلل بقايا النباتات بواسطة الكائنات الحية الدقيقة إلى دوران مغذيات التربة وتداولها، مثل دورة الكربون (C) والفسفور(P) والنيتروجين (N) (Brennan & Acosta-Martinez, 2018).

تم استكشاف العديد من الكائنات الحية الدقيقة المعززة للنمو، مثل البكتيريا أو الفطريات، والتي يمكن أن تكون مفيدة بشكل خاص في الظروف التي قد تتعرض فيها النباتات للإجهاد، كما هو الحال في التربة ذات المحتوى المنخفض من المواد العضوية أو التربة التي تعاني من الجفاف، نظرًا لأن الإجهادات، مثل الملح والجفاف، تؤدي دوراً مهماً آخر في تقليل النشاط البيولوجي، هناك العديد من الكائنات الحية الدقيقة المفيدة، مثل البكتيريا والفطريات، تعيش في التربة وتوفر الظروف المناسبة لنمو النباتات (Ortiz & Sansinenea, 2022).

تشمل التفاعلات المفيدة لهذه الميكروبات مع النباتات توفير العناصر الغذائية للمحاصيل، وتحفيز نمو النبات، وإنتاج الهرمونات النباتية، والمكافحة الحيوية لمسببات الأمراض النباتية، وتحسين تركيب التربة، والتراكم الحيوي للمركبات غير العضوية، والمعالجة الحيوية للتربة الملوثة بالمعادن. (Sansinenea, 2019) ، هناك العديد من الدراسات التي سلطت الضوء على دور الكائنات الدقيقة المفيدة في تعزيز نمو النبات (Jacoby *et al.*, 2017 ; Khan *et al.*, 2020;Prakash, & Mishra, 2022).

لقد تم استخدام الأسمدة الحيوية كطريقة جديدة لتحسين إنتاجية النبات. (Sarkar *et al.*, 2021) وتعد الأسمدة الحيوية بدائل تكنولوجية حيوية مجدية ومستدامة وجذابة لزيادة إنتاجية المحاصيل وتحسين واستعادة خصوبة التربة وتحفيز نمو النباتات و بسبب الأثر البيئي المرتبط بالتسميد الكيميائي. تم تقييم الأسمدة الحيوية في مجموعة واسعة من النبات، بما في ذلك الأرز والخيار والقمح وقصب السكر والشوفان وعباد الشمس والذرة والكتان والبنجر والتبغ والشاي والقهوة وجوز الهند والبطاطس ومروحة السرو وعشب السودان والباذنجان والفلفل، الفول السوداني، والبرسيم، والطماطم، وجار الماء، والذرة الرفيعة، والصنوبر، والفلفل الأسود، والفراولة، وفول الصويا الأخضر، والقطن، والفاصوليا، والخس، والجزر، والنيم، وغيرها (Zambrano-Mendoza *et al.*,2021).

2-1-1 تطبيقات الأحياء المجهرية على التربة

Applications of microbes in soil

الكائنات الحية الدقيقة، عند تطبيقها على التربة أو النبات، والتي تساعد على زيادة توافر العناصر الغذائية لنباتات المحاصيل تُعرف باسم المخصبات الحيوية، وهي بدائل صديقة للبيئة ورخيصة. (Husson *et al.*, 2021)

هناك كائنات دقيقة مختلفة تستخدم العديد من الأستراتيجيات مثل تثبيت، إذابة، تعبئة، إعادة تدوير العناصر الغذائية في النظام البيئي الزراعي لتكون مفيدة للنبات، وتحسين نمو النبات وإنتاجيته (**Nath Bhowmik** & Das, 2018).

يتم استعمار منطقة جذور النبات، وهي المحيطة بالنظام الجذري للنباتات النامية، بواسطة مجموعة واسعة من الكائنات الدقيقة، والتي تشكل البكتيريا والفطريات المجموعات الأكثر وفرة منها (de La Fuente Cantó *et al.*, 2020).

يتم تصنيف بكتيريا التربة الحرة التي تزدهر في منطقة الجذور، وتستعمر جذور النباتات، وتسهل نمو النبات على أنها بكتيريا جذرية معززة لنمو النبات والتي تنتج وتفرز مواد كيميائية تنظيمية مختلفة في محيط جذور النباتات مما يساعد في تعزيز نمو النبات (Basu *et al.*, 2021; Khoshru, *et al.*, 2020).

يمكن للبكتيريا والفطريات التي تعيش في منطقة الجذور أن تعمل كأسمدة حيوية تعزز نمو النباتات وتطورها من خلال تحسين تحمل الإجهاد الحيوي وغير الحيوي ودعم تغذية النباتات المضيفة. ويمكن أن تعمل كمبيدات حيوية أيضًا لأن العديد من الكائنات الحية الدقيقة تقتل الحشرات والأفات الأخرى التي تهدد

النباتات. علاوة على ذلك، فإن الكائنات الحية الدقيقة لديها القدرة على تحليل وإزالة السموم من المركبات العضوية وغير العضوية الضارة التي تتراكم في التربة كمواد ملوثة، والتي تكون نتيجة للعديد من الأنشطة، التي تفيد التربة والنبات (Medfu Tarekegn *et al.*, 2020).

2-1-2 أهمية الأحياء المجهرية في تحسين ونمو النبات

The importance of microorganisms in improving plant growth

أحد التحديات الرئيسة في القرن الحادي والعشرين هو إنتاج المحاصيل بطريقة سليمة بيئياً ومستدامة، ويعد انتاج الغذاء الكافي للأعداد المتزايدة من السكان وبالأضافة إلى المركبات الأساسية في العمليات الصناعية، وتؤدي أساليب الأنتاج الحآلية في الزراعة، على سبيل المثال، الأستخدام غير السليم للمبيدات الحشرية والأسمدة الكيميائية، إلى إنشاء قائمة طويلة من المشكلات البيئية والصحية (Gunnell *et al.*, 2007 ; Leach & Mumford 2008).

هناك طلب متزايد على الأستراتيجيات السليمة والمتوافقة بيئياً. ساهمت التكنولوجيا الحيوية النباتية في تطوير العديد من أصناف المحاصيل الجديدة المتحملة الجفاف والأملاح، وتحسين القيمة الغذائية. غالبًا ما يتم تجاهل التفاعل المفيد بين النبات و الكائنات الحية الدقيقة في استراتيجيات التربة على الرغم من أن الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة بالنبات تؤدي وظائف النظام البيئي المهمة للنباتات والتربة. ويشمل ذلك تأثيرات الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة بالنبات على صحة النبات ونموه، فهي تعزز القدرة على تحمل الإجهاد، وتوفر مقاومة للأمراض، وتساعد على توافر العناصر الغذائية وتدويرها وتعزز التنوع البيولوجي (Lugtenberg *et al.*, 2002 ; Morrissey *et al.*, 2004).

3-1-2 الأحياء المجهرية كمخصبات حيوية Microorganisms as Biofertilizers

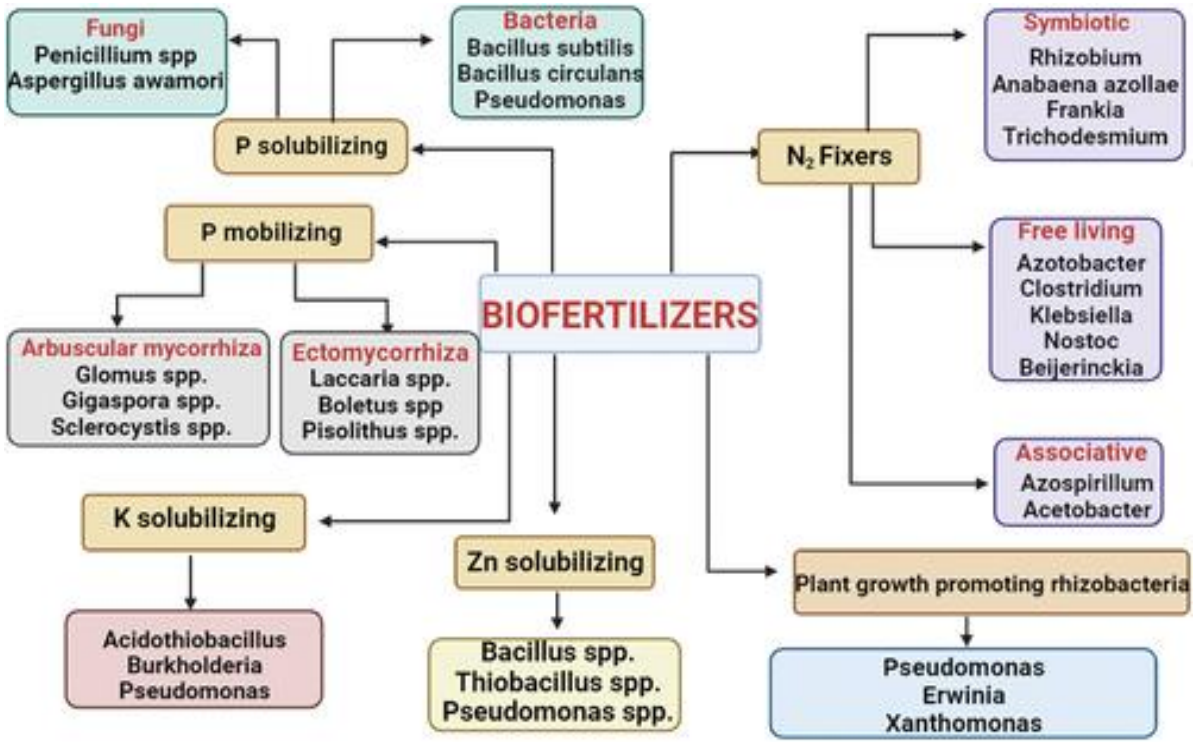
بسبب المشاكل المتعلقة باستعمال الأسمدة الكيماوية والمبيدات الحشرية، كان هناك تطور مهم نحو الزراعة المستدامة باستخدام أساليب أكثر ونظيفة، مثل استخدام المبيدات الحيوية والأسمدة الحيوية. يمكن تلقيح الأسمدة الحيوية على البذور وكذلك في جذور نباتات المحاصيل المختلفة في ظل ظروف مثآلية، ويمكن أيضاً تطبيقها مباشرة على التربة (Abbasniayzare *et al.*, 2012). الأسمدة الحيوية هي مادة تحتوي على كائنات حية دقيقة، والتي عند تطبيقها على البذور أو التربة، والتي لها دور في توافر العناصر الغذائية من خلال نشاطها البيولوجي، وتعزز نمو النبات. (Ortiz & Sansinenea, 2022)

تضـيف الأسـمدة الحيويـة العناصـر الغذائيـة مـن خـلال العمليـات الطبيعيـة مثـل تثبيـت النيتـروجين مـن الغـلاف الجـوي، وإذابـة الفوسـفور، وتحفيـز نمـو النبـات مـــن خـلال تخليـق المـواد المحفـزة لنمـــو النبات (Pathak *et al.*, 2017 ; Wong, 2021).

1-3-1-2 البكتيريا المحفزة لنمو النبات

Plant growth promoting bacteria (PGPB)

تعتبـر بعـض أنـواع البكتريـا ذات أهميـة كبيـرة كمخصـبات للتربـة، وتسـاهم بشـكل كبيـر فـي تحسـين نمـو النبـات (Fasusi *et al.*,2021). حيـث يمكنهـا تثبيـت النيتـروجين، وإذابـة الفوسـفور والبوتاسـيوم أو المغـذيات الدقيقـة الأخـرى، وإفـراز المركبـات العضـوية لكـبح مسـببات الأمـراض النباتيـة أو المـواد المعـززة لنمـو النبـات. مـن أمثلـة الأسـمدة الحيويـة البكتيريـة الأكثـر شـيوعاً التـي تـم تطبيقهـــا هـــي اســـتخدام بكتيريـــا *Azotobacter*، *Azospirillum*، *Rhizobium* و*Bacillus*، كمـا هـو موضـح فـي الشـكل (2-1). إن اسـتخدام هـذه البكتيريـا كأسـمدة حيويـة لتعزيـز نمـو وإنتاجيـة النبـات، والـتحكم الحيـوي فـي مسـببات الأمـراض النباتيـة يعـزز الزراعـة المسـتدامة مـن خـلال تقـديم بـدائل صـديقة للبيئـة للمـواد الكيميائيـة الزراعيـة الأصـطناعية، مثـل الأسـمدة الكيمأويـة والمبيـدات الحشرية (Bhardwaj *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015).

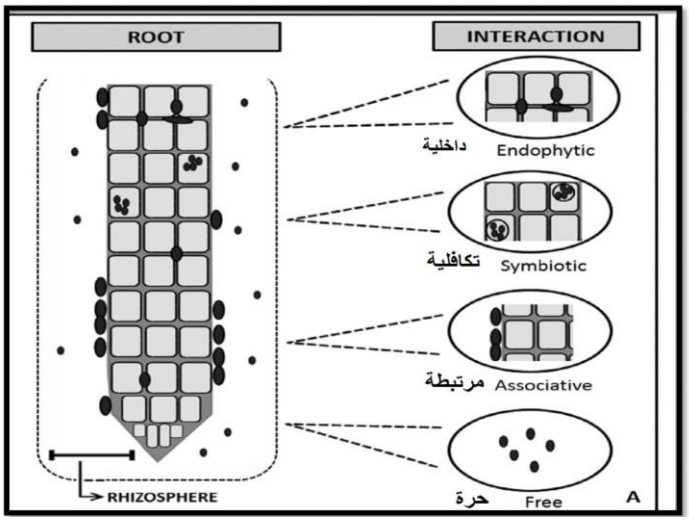


شكل (2-1) أنواع مختلفة من المخصبات الحيوية (Sreethu *et al* .,2024).

ويمكن ان تتواجد البكتريا المحفزة للنمو بشكل طبيعي في التربة أو بشكل متعايش مع النبات وتكون محيطة بالجذر، وتدعى البكتيريا المحفزة لنمو النبات Plant growth promoting bacteria (PGPB)، ويتأثر نمو النبات في التربة بالعديد من العوامل الأحيائية واللا أحيائية و تكون المنطقة حول الجذر غنية نسبياً بالمغذيات وذلك لأن أكثر من 40% من المواد المصنعة بعملية البناء الضوئي في النبات تفرز من الجذر وهذه المغذيات تجذب الكثير من أنواع البكتريا منها *Azotobacter chroococcum*، و *Pseudomonas fluorescens*، و*Bacillus subtillis*، والفطريات والتي تتضاعف في المنطقة المحيطة بالجذر (Rhizosphere) وتتكاثف لتصل أو تتجاوز 100 مرة أكثر من المناطق البعيدة عن الجذر و قد تكون الأحياء المجهرية نافعة أو مثبطة لنمو النبات، وأول من عرفها (1978) Kloepper حيث أشارا الى استيطان البكتريا لجذور النباتات ومن ثم تلقح بها البذور لتعزز نمو النبات وتدعى البكتريا المصاحبة لجذور النباتات المعززة لنموها.

وهذه البكتريا إما تكون علاقة تكافلية (Symbiotic) مع النبات وتساهم في تكوين تراكيب متخصصة أو عقد مع جذور النبات (Entophytic) أو تتفاعل مع الجذور في التربة (Associative) أو تعيش بصورة حرة Free كما في الشكل (2-2) (Souza *et al.*, 2015).

إنّ البكتريا المعززة لنمو النبات هي البكتريا التي تسكن حول أو على سطح الجذور وتشارك بشكل مباشر أو غير مباشر في تعزيز نمو النبات وتطوره عن طريق انتاج وافراز العديد من المواد الكيميائية التنظيمية في محيط منطقة الجذور. وإنّ هذه البكتيريا تيسر نمو النبات مباشرة إما عن طريق المساعدة في اكتساب المغذيات (النتروجين والفسفور والمعادن الأساسية) أو تعديل مستوى الهرمونات النباتية، أو بشكل غير مباشر عن طريق خفض التأثيرات المثبطة لمسببات الأمراض الفطرية على نمو النبات وتطويره على شكل عامل مكافحة بيولوجية، وقد وثقت العديد من الدراسات زيادة نمو وانتاجية الأنواع النباتية المختلفة من خلال تطبيق البكتريا المعززة لنمو النبات تحت كل من الظروف الطبيعية والإجهاد، وقد تقلل البكتريا المعززة لنمو النبات من الأعتماد على المواد الكيميائية الخطرة التي تؤثر على استقرارية النظم البيئية . (Souza *et al.*, 2015)



الشكل (2-2) العلاقة بين البكتريا وجذور النباتات (Souza *et al.*, 2015) .

اما البكتريا الموجودة في التربة، تدعى البكتيريا المحفزة لنمو النبات Plant growth Promoting bacteria (PGPR)، حيث أطلق على مجموعة أنواع وأجناس البكتريا التي تتباين في استعمالاتها وتعدد الآليات التي تعمل بها لتشجيع نمو النبات اسم PGPR تعمل هذه الأحياء على تشجيع نمو النبات من طرائق عديدة أهمها، تثبيت النتروجين الجوي، وتحليل المادة العضوية، وانتاج هرمونات النمو النباتية والمركبات المخلبية وإذابة الفسفور، تشمل الأنواع الآتية: *Azotobacter*، *Azospirllum*، *Bacillus*، *Eentrobacte*، *Pseudomonas*، و *Acetobacter*. (Duca *et al.*, 2014 ; Ahemad & Kibret, 2014).

ويمكن أن تعرف PGPR بأنها مجموعة من الأحياء التي تستعمر جذور النباتات بنشاط وتشجع النمو وزيادة الأنتاجية عند إضافتها إلى البذور أو الجذور أو الدرنات. (Vejan *et al.*, 2016) إنّ الآليات التي تعمل بها PGPR يمكن أن تتم بطريقتين مباشرتين عن طريق:

1. تثبيت N2 الجوي، ومعدنة أو تجهيز الفوسفور و البوتاسيوم وتجهيز الحديد Siderophores في التربة.
2. انتاج السكريات الثانوية، وهرمونات النمو النباتية، مثل الأندول حامض الخليك (IAA)والجبريلين (GA) والسيتوكاينين (CK) والأثيلين. (Bhardwaj *et al.*, 2014 ; Singh *et al.*, 2016)

وطريقة غير مباشرة: عن طريق انتاج المضادات الحيوية (Antibiosis)، انتاج انزيمات الحماية مثل Chitinase و Glucanase وكذلك ACC-deaminase وآلية التحلل المائي للإنزيمات، وسيانيد

الهيدروجين، وانتاج المركبات الطيارة. (Choudhary *et al.*, 2011 ; Kaur *et al.*, 2016 ; Etesami & Alikhani, 2016)

أشارت دراسات الكثير من الباحثين الى أنّ آليات PGRP هو انتاج بعض الأنزيمات التي لها دور مهم في تحلل المادة العضوية، مثل انزيمات Nitrogenase، Celluslase، وCatalase، Amaylase، وPhosphatas، وانعكس ذلك إيجاباً على زيادة نسبة انبات البذور وزيادة محتوى الكلوروفيل لنباتات مختلفة وتحسين نوعية الأنتاج وزيادة مقاومة الأمراض والحشرات. (Hereter *et al*., 2011 ; Njira, 2013)

1-1-3-1-2 بكتريا PGPB المتحلمة للجفاف Drought-tolerant PGPR bacteria

يعد الإجهاد الناتج عن قلة المياه أحد المشكلات الرئيسة التي تحد من إنتاجية النبات في معظم المناطق الجافة وشبه جافة في العالم. يؤثر هذا النوع من الإجهاد اللا أحيائي على العلاقات بين النبات والماء على المستوى الخلوي ومستوى النبات بأكمله، مما يسبب تفاعلات وأضرارًا محددة وغير محددة. يمكن للبكتيريا البقاء على قيد الحياة في ظل ظروف الإجهاد بسبب إنتاج متعدد السكريات الخارج الخلوي (EPS) الذي يحمي الكائنات الحية الدقيقة من الإجهاد المائي عن طريق تعزيز احتباس الماء وتنظيم انتشار مصادر الكربون العضوي, يساعد EPS أيضًا الكائنات الحية الدقيقة على ربط الجذور واستعمارها بشكل لارجعة فيه بسبب مشاركة شبكة من المواد الليفية التي تربط البكتيريا بشكل دائم بسطح الجذر (Chenu & Roberson 1996; Bashan *et al*., 2004). و قد يؤدي تلقيح النباتات بالكائنات الحية الدقيقة المفيدة المقاومة للجفاف إلى زيادة تحمل النباتات للجفاف التي تنمو في المناطق الجافة وشبه جافة (Ali *et al.*, 2014).

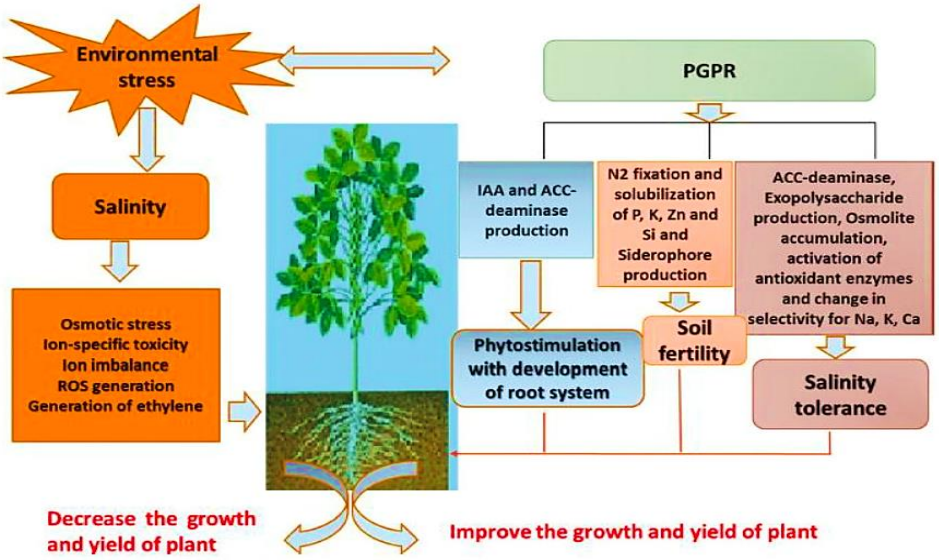
يخفض الجفاف نمو النبات وإنتاجيته وتعمل البكتيريا المرتبطة بالنباتات الموجودة في التربة على تخفيف الأثار الضارة لإجهاد الجفاف وإن استخدام البكتيريا المنتجة لـ EPS لمكافحة تحمل الجفاف يعد تطبيقاً لمقاومة الإجهاد الناتج عن الجفاف وبالتالي زيادة الأمن الغذائي العالمي (Naseem *et al.*, 2018).

2-1-3-1-2 تأثير PGPB في إجهاد الجفاف Effect of PGPB on drought stress

تساهم PGPB في تحسين نمو النبات وتحمّل اجهاد الجفاف من خلال دورها في توازن الأيونات وتحسين امتصاص المغذيات و تثبيت النتروجين N fixation وإذابة الفسفور P والبوتاسيوم K والزنك Znوالسليكون Si وإنتاج انزيم ACC deaminase وهرمون اندول حامض الخليك وعديد

السكريات الخارجي Exopolysaccharides وحاملات الحديد Siderophere وتنشيط الأنزيمات المضادة للأكسدة. (Saghafi *et al.*,2019) إنّ استخدام المواد الكيميائية لها عيوب من ناحية الكلفة وتعد ملوثة للبيئة (Cheng, 2015). البكتريا المنتجة لإنزيم ACC deaminase المعزولة من تربة مالحة تُعزز نمو المجموع الخضري والجذري وزيادة محتوى الكلوروفيل وتقلل انتاج الأثيلين تحت تأثير الإجهاد الملحي (Bal *et al.*, 2013).

ان جميع المشاكل المرتبطة بالجفاف تؤدي الى قلة أو فقدان التنوع الأحيائي الميكروبي للتربة و خصوبة التربة وزيادة التنافس غلى العناصر الغذائية ومن التدابير المعالجة استخدام احياء التربة المجهرية المحفزة لنمو النبات PGPB و المتحملة للجفاف والمنتجة لـ EPS الأسلوب صديق للبيئة و رخيص الثمن فإنّ البكتريا PGPB المقاومة للجفاف تعمل على تحفيز قدرة النبات على تحمل الجفاف و تقليل التأثيرات السلبية للجفاف على النبات (Saberi Riseh *et al.*, 2021).



الشكل (2-3) العلاقة بين الإجهاد وPGPB وعلاقتهما بنمو النبات (saghafi *et al.*, 2019) .

2-1-3-1-3 آليات الحماية من الإجهاد بواسطة PGPB

Mechanisms of stress protection by PGPB

تتعرض النباتات بصورة متكررة الى اجهادات بيئية متنوعة وهي تمتلك آليات مختلفة لمواجهة تلك الإجهادات. (Ramegowda & Senthil-Kumar, 2015) و هناك العديد من الأستراتيجيات التي تؤدي الى تخفيف درجة الأضرار الناجمة عن الإجهادات اللا أحيائية والتي تقوم بها PGPB ، فقد تمت دراسة استخدام PGPB في مقاومة الإجهادات اللا أحيائيةعلى النبات بشكل جيد.

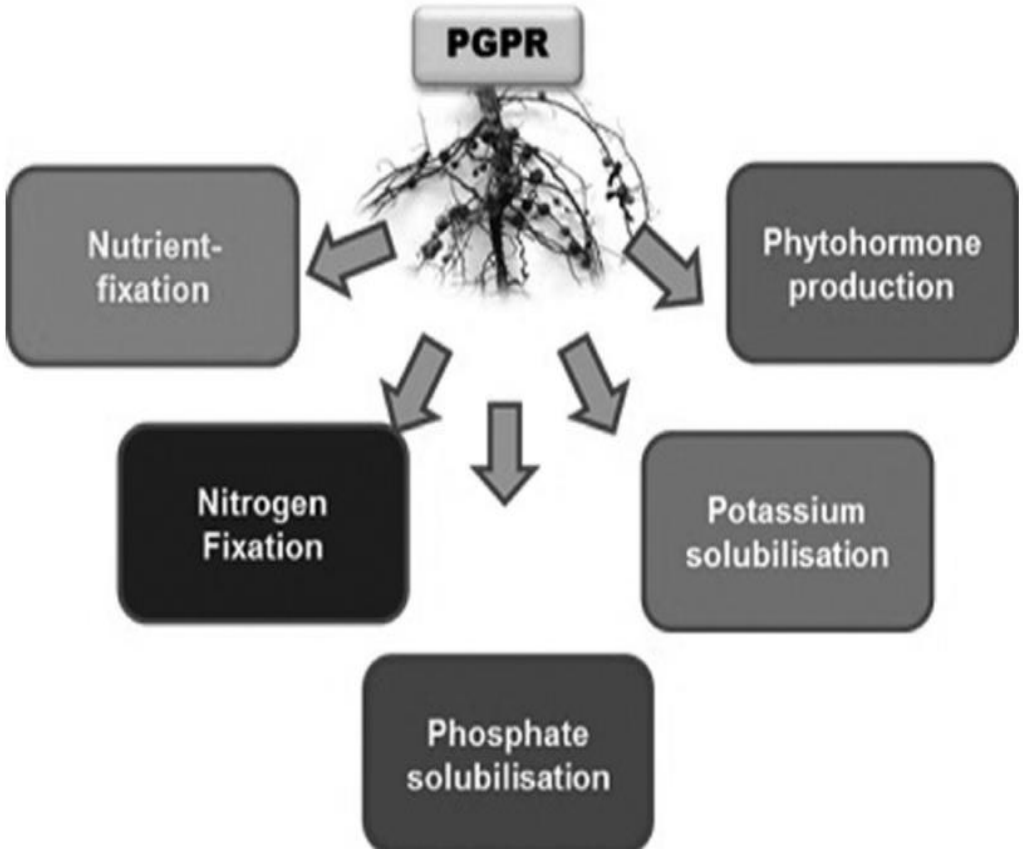
تؤدي الإجهادات الأحيائية الى انخفاض الأنتاج النباتي بسبب التأثير الممرض على المحاصيل بواسطة مسببات الأمراض مثل البكتيريا (Haggag *et al.*, 2015). ويمكن حل هذه المشكلة عن طريق استخدام PGPB، مثل *Bacillus spp* (Ngumbi & Kloepper, 2016) .

تلعب PGPB دوراً مهماً في حث تحمل الإجهادات في النباتات وهي حالة فسيولوجية تُحسن المقاومة الدفاعية استجابة لظروف بيئية معينة، إذ أثبتت PGPB دورها في حث نظام التحمل في العديد من النباتات ضد العديد من الإجهادات (Prathap & Bd, 2015) .

يمكن أن تحفز PGPRs نمو النبات من خلال الآليات المباشرة وغير المباشرة التي تحدث داخل النبات وخارجه، على التوالي (de La Fuente Cantó *et al.*, 2020) .

وتوجد نوعين من الآليات:

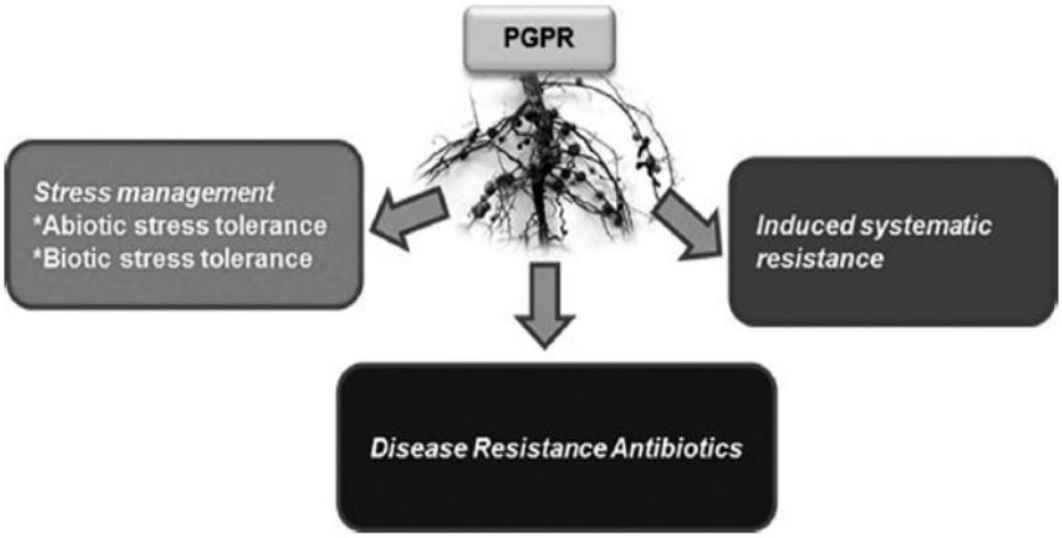
1. **الآليات المباشرة**: وتشمل الآليات المباشرة توفير المغذيات النباتية للنباتات مثل النيتروجين الثابت أو معادن التربة الذائبة (مثل الفوسفور، البوتاسيوم والحديد) وتحفيز نمو النبات وتطوره من خلال تنظيم مستويات الهرمونات النباتية. (Gouda *et al.*, 2018 ; Kalam *et al.* 2020)، حيث تمتلك PGPB القابلية على الأستيطان اما داخل خلايا النبات أو في منطقة Rhizosphere و تحدث علاقة تبادل منفعة بين البكتريا والنبات، تجهز البكتريا المعززة لنمو النبات المواد الأساسية والمناسبة للنمو، تعزز الكثير من البكتريا نمو النبات في مراحل مختلفة من دورة حياة النبات وخلال آليات مختلفة، كما في الشكل (2-4) (Bhattacharyya & Jha, 2012) .



الشكل (2-4) الآليات المباشرة لـ PGPB المؤثرة في نمو النبات (Gouda *et al.*, 2018) .

تعمل PGPB كحافز مباشر لنمو النباتات لأنها تميل إلى زيادة إمكانية الوصول الى تركيز العناصر الغذائية من خلال جذور النباتات عن طريق تأمين امدادات الجذور بالمواد الغذائية لزيادة النمو والأنتاجية في النباتات (Kumar, 2016)، من الآليات المباشرة لـ PGPB هي انتاج الهرمونات النباتية أو منظمات نمو النبات (Damam *et al*., 2016).

2. <u>الآليات غير المباشرة</u>: من الآليات غير المباشرة التي تقوم بها PGPB الكثير من العمليات التي تمنع أو تعدل التأثيرات الضارة للأمراض النباتية التي تصيب النبات من خلال انتاج مواد كابحة تؤدي الى زيادة المقاومة الطبيعية للنبات (Jha, 2015) ، كما في الشكل (2-5).



الشكل (2-5) الآليات غير المباشرة لـ PGPB المؤثرة في نمو النبات (Gouda *et al.*, 2018) .

وتشمل الآليات غير المباشرة التأثير على تحفيز نمو النبات عن طريق قمع مسببات الأمراض النباتية وغيرها من الكائنات الحية الدقيقة الضارة، والتنافس على العناصر الغذائية وإنتاج مواد معادية مثل سيانيد الهيدروجين وحاملات الحديد، وتحفيز المقاومة الجهازية في النباتات ضد مجموعة واسعة من مسببات أمراض الجذور والأوراق. (Berg *et al.*, 2017) . يعزز PGPR أيضاً تحمل الإجهادات اللا أحيائية المختلفة في النباتات، وتشمل بعض الآليات الفعالة في ظل الإجهاد اللا أحيائي إنتاج الهرمونات المرتبطة بالإجهاد، و Osmolite، والأنزيمات المضادة للأكسدة، والسكريات الخارجية (Ilyas *et al.*, 2020).

2-2 متعدد السكريات الخارجي البكتيري Bacterial Exopolysaccharides (EPS)

السكريات الخارجية البكتيرية EPS: هي المادة المهمة لتكوين الأغشية الحيوية بواسطة البكتيريا. تم اقتراح اسم عديد السكاريد الخارجية هذا بواسطة (Sutherland *et al.*, 1972) . حيث قدم المصطلح العام لأنواع مختلفة من EPS الموجودة خارج جدار الخلية البكتيرية. إذ إنّ معظم أنواع البكتريا تمتلك القابلية الطبيعية لبناء وإفراز EPS كذلك يشار لها بمتعدد السكريات خارج خلوية Extracellular polysaccharides ومواد متعددة السكريات الخارجية (Material EPS) إذ تتراوح أوزانها الجزئية بين (4×411 الى 4×611) دالتون، وتعد EPS الجزء الأكثر أهمية في المصفوفة خارج الخلية والتي غالبًا ما تمثل 40-95٪ من وزن البكتيريا. تلعب هذه EPS دوراً حاسماً في تعزيز قدرة النبات على تحمل الجفاف من خلال الحفاظ على بيئة دقيقة رطبة حول البكتيريا، وتقليل فقدان الماء، وتعزيز بقاء البكتيريا

تحت ضغط الجفاف (Naseem *et al.*, 2018 ; Morcillo & Manzanera, 2021; Latif *et al.*, 2022) .

ان إنتـاج EPS البكتيـري يتـم بشكليــن أساسييــن همـــا:

1. متعــدد السكريـــات الخارجـــي المحفظي (Capsular EPS).
2. متعدد السكريات الخارجي الهلامي (Slime EPS) .

ويتم التمييز بين الإثنين من درجة ارتباطهما بسطح الخلية، خارج الخلية الميكروبية يرتبط EPS تساهمي مع سطح الخلية مكون المحفظة، أو يبقى غير مرتبط ويتواجد بشكل طبقة هلامية، وإنّ أغلب أنواع البكتريا تظهر ميلاً لتكوين وإنتاج أحد الأنواع أكثر من الأخر (Broadbent *et al.*, 2003).

وتعد EPS خليط غير متجانس يتكون من: السكريات والبروتينات والأحماض النووية والدهون (Sutherland *et al.*, 1972 ; Wingender *et al.*, 1999). وهي جزيئات طويلة السلسلة، لها وزن جزيئي يتراوح بين 10-30 كيلو دالتون (Kumar *et al.*, 2011). ويُفضل إنتاج EPS بواسطة البكتيريا بنسبة عالية من الكربون وانخفاض نسبة النيتروجين (Kimmel & Roberts, 1998).

السكريات الخارجية عبارة عن بوليمرات قابلة للذوبان في الماء وتتكون من مجموعة واسعة من المونومرات (Sultherland *et al.*, 1997).

بعض EPS تكون محايدة، لكن معظمها متعددة الأيونات إما بسبب وجود حمض اليورونيك (d-galacturonic acid, d-glucuronic acid, and d-mannuronic acid) (uronic acid)، أو بسبب وجود مجموعة البيروفات المرتبطة بالكيتال، والأجزاء غير العضوية مثل الكبريتات والفوسفات. قد يسبب ايضاً تغيير في طبيعة متعددة الأيونات لـEPS (Sutherland *et al.*,1972 ; Sultherland *et al.*, 1977).

عدد قليل جدًا من EPS تكون متعددة الأيونات، على سبيل المثال، البوليمرات الخارجية التي تم الحصول عليها من سلالات المكورات العقدية (Prajapati *et al.*, 2013).

غالباً ما تكون EPS البكتيرية بوليمرات حمضية بسبب وجود بعض المجموعات الوظيفية مثل (مجموعة الهيدروكسيل ومجموعة الكربوكسيل وحامض الفوسفوريك) التي تعطي EPS درجة عالية من الألفة لأيونات المعادن (Mittelman & Geesey, 1985) . السكريات الخارجية هي جزيئات عضوية كبيرة والأجزاء العضوية الرئيسة هي الكربوهيدرات والبروتينات. (Kimmel & Roberts, 1998 ; Nielsen & Jahn, 1999 ; Flemming & Wingender, 2001)

1-2-2 آلية انتاج EPS وتحمل الجفاف

EPS production mechanism and drought tolerance

يمكن أن يؤدي إنتاج EPS بواسطة البكتيريا إلى تكوين غشاء حيوي على سطح الجذر، مما يساعد في حماية النباتات من إجهاد الجفاف عن طريق تحسين احتباس رطوبة التربة وتعزيز امتصاص الماء والمغذيات (Bhagat *et al.*, 2021 ; Morcillo & Manzanera, 2021).

بالأضافة إلى ذلك، يمكن أن يتغير EPS في مستويات التركيب والأنتاج استجابة لمستويات الإجهاد المتزايدة، حيث تنتج بعض البكتيريا مجمعات كربوهيدرات عالية الوزن الجزيئي في ظل ظروف قاسية مثل الجفاف، مما يضمن مقاومة أفضل ضد الجفاف وزيادة توافر المياه في منطقة الجذور. حيث يمتلك EPS القدرة على ربط الكاتيونات مثل Na^+، مما يحد من امتصاصها بواسطة جذور النباتات ويساعد في الحفاظ على التوازن بين العناصر الغذائية الأساسية مثل Na^+ . من خلال ربط Na^+ في التربة، يمكن أن يجعلها EPS غير متاحة لجذور النباتات، وبالتالي تخفيف الإجهاد الملحي وتعزيز نمو النبات في ظل الظروف المالحة (Morcillo & Manzanera, 2021) .

2-2-2 البكتريا المنتجة لـ EPS ودورها في نمو وتحمل الجفاف

EPS-producing bacteria and their role in growth and drought tolerance

تتمتع بعض أنواع البكتيريا وبالأخص الجذرية منها بالقدرة على إنتاج كمية أكبر من عديدات السكاريد الخارجية تحت اجهاد الجفاف مقارنةً بالظروف غير المجهدة. وزاد إنتاج عديدات السكاريد الخارجية مع زيادة شدة الجفاف. ويشير إلى أن إنتاج عديدات السكاريد الخارجية في البكتيريا كان استجابة لإجهاد الجفاف (Roberson & firestone, 1992).

وفي ظل الجفاف تغير تركيز وتكوين السكريات الخارجية، تحتوي عديدات السكاريد المحفظة في *Azospirillum brasilense* Sp245 على مركب كربوهيدرات عالي الوزن الجزيئي ومركب عديد السكاريد الدهني والبروتينات ومركب عديد السكاريد الدهني المسؤول عن الحماية ضد الجفاف الشديد. لقد ثبت أن إضافة *Azospirillum brasilense* Sp245 يعزز البقاء على قيد الحياة تحت ظروف الجفاف (Konnova *et al.*, 2001). وتظهر النباتات حساسية عالية تجاه إجهاد الجفاف خلال موسم النمو بينما خلال فترة الأزهار وامتلاء الحبوب تكون معرضة بشكل خاص للجفاف. تظهر الأبحاث أنه أثناء الإجهاد يتأثر النمو والأنتاجية بشدة بسبب الأضرار الجسيمة التي تلحق بالنباتات (Larson, 1995).

تظهر النباتات الملقحة بالميكروبات المنتجة للسكريات الخارجية مقاومة عالية لإجهاد الجفاف مقارنة بالنباتات غير الملقحة (Yang *et al.*, 2009).

تظهر النباتات التي تنمو في المناطق الجافة وشبه الجافة الملقحة بالبكتيريا المفيدة زيادة في تحمل إجهاد الجفاف (Dai, *et al*,.1997 ; Konnova *et al.*, 2001).

وتعد سلالة *Pseudomonas putida* GAP-P45، بكتيريا منتجة لـ EPS يمكنها تكوين غشاء حيوي على سطح جذور شتلات عباد الشمس وتزيد تحمل عباد الشمس تحت ضغط الجفاف. أظهرت النباتات الملقحة بسلالة *Pseudomonas putida* المنتجة لـ EPS زيادة في التربة الملتصقة بالجذور، ومحتوى مائي نسبي مرتفع للأوراق (Sandhya *et al*., 2009) وقد لوحظ أن هناك علاقة بين كمية EPS التي تنتجها سلالة *Azosporillum* ويتحمل نبات اللوبيا الجفاف (Skvortsov & Ignatov,1998 ; Khan & Bano, 2016).

يؤدي تكيف النبات مع الإجهاد إلى تعديل المستقلبات في جسم النبات التي تسبب العديد من المواد المذابة المتوافقة مثل السكر، والكحولات متعددة الهيدرات ومركبات الأمونيوم الرباعية والأحماض الأمينية الأخرى، ويرتبط أيضاً بإنتاج بروتينات الإجهاد (Roessner *et al.*, 2001).

التباين في إنتاج البروتينات هو مؤشر على استجابة النبات للاجهادات المختلفة. ونبات الخس (*Lactuca sativa L.*) الملقّح بـ *Pseudomonas* المنتجة لانزيم مضاد الأكسدة مثل Catalase الذي يعزز من تحمل الجفاف (Kohler *et al.*, 2008).

3-2-2 التفاعل بين البكتيريا المنتجة لـ EPS و النباتات

Interaction between EPS-producing bacteria and plants

السكريات الخارجية (EPS) عبارة عن بوليمرات عالية الوزن الجزيئي تنتجها البكتيريا التي يمكنها التفاعل مع الخلايا النباتية لتحسين تحمل الجفاف. يمكن أن يشكل EPS غلافاً حيوياً على سطح الجذر، والذي يمكنه حماية النبات من إجهاد الجفاف عن طريق الحفاظ على رطوبة التربة وتحسين امتصاص الماء والمغذيات. بالأضافة إلى ذلك، يمكن أن يتغير EPS في مستويات التركيب والأنتاج استجابة لمستويات الإجهاد المتزايدة، حيث تنتج بعض البكتيريا مجمعات كربوهيدرات عالية الوزن الجزيئي في ظل ظروف قاسية مثل الجفاف، مما يضمن مقاومة أفضل ضد الجفاف وزيادة توافر المياه في منطقة الجذور (Yang *et al*,. 2021 ; Chieb & Gachomo, 2023) . الخطوة المبكرة المطلوبة للتداخل بين النبات والميكروبات هي ربط بكتيريا التربة بخلايا جذر النبات. تشير العديد من الدراسات إلى

أن بكتيريا الجذور، وهي *Pseudomonas*، و *Azospirillum*، و *Rhizobium* spp التي تشكل ارتباطاً بجذور النباتات، وتوجد على اسطح الجذر أو يمكن العثور عليها داخل الخلايا الجذرية الأضافية (Fujishige *et al.*, 2006).

يعد ارتباط البكتيريا بجذر النبات أيضاً خطوة أولى في تكوين الأغشية الحيوية بواسطة البكتيريا الموجودة على جذور النباتات. يعتمد تكوين الأغشية الحيوية البكتيرية حول جذور النباتات على التجمعات البكتيرية أو المجتمعات البكتيرية خارج الخلية. تعد استراتيجية تكوين الأغشية الحيوية للبكتيريا شائعة في الحياة البكتيرية (Kim & Han,. 2011) .

في عملية التعلق، تكون المرحلة الأولى: عبارة عن مرحلة ربط عكسية وضعيفة وغير محددة. تتضمن هذه المرحلة 3 مكونات: بروتينات اللاكتين، بروتين مرتبط بـ Ca12 يسمى ريكادهيسين، والسكريات البكتيرية. توجد بروتينات اللاكتين في البقوليات عند طرف الشعيرات الجذرية وتتعرف على الكربوهيدرات المحددة الموجودة على سطح البكتيريا وترتبط بها (Matthysse, 1983 ; Isken & de Bont, 1998) .

الخطوة الثانية: تصنيع الأرتباطات من ألياف السليلوز البكتيرية، حيث يتم تصنيعها بعد 8-16 ساعة من التلقيح البكتيري ويتم التوسط في هذه الخطوة بواسطة السكريات السطحية للبكتيريا. تظهر خلايا *Azospirillum arakense* ارتباطاً بالشعيرات الجذرية لنبات الأرز، بينما ترتبط خلايا *Azospirillum brasilense* بأسطح الجذر (Zhu *et al.*, 2002).

يرتبط إنتاج عديدات السكر الخارجية بواسطة البكتيريا أيضاً بعملية التلبد لخلايا *Azospirillum spp* (Burdman *et al.*, 1998; Skvortsov & Ignatov., 1998) .

في بعض الحالات، يكون الجلوكان الحلقي، وألياف السليلوز، والسكريات الخارجية معقدة في ارتباط البكتيريا الزراعية بالنباتات. إنّ الأرتباط المتبادل المتكون بين جذور النباتات والمعقدات الميكروبية يُطلق عليه اسم (Rhizosphere)، وهي بيئة حيوية للجذور التي تحقق متطلبات البكتيريا لإنشاء الأغشية الحيوية (أي رطوبة التربة الكافية وإمدادات العناصر الغذائية) التي توفرها النباتات و أن العوامل النباتية المتنوعة التي تكون معقدة في عملية الأرتباط، وأهمها هي اللايكتينات النباتية التي تعمل كمستقبلات لربط متعدد السكريات الخارجية البكتيرية. (Hirsch, 1999 ; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007) .

هناك العديد من السكريات المختلفة (ما لا يقل عن 4 أنواع) تلعب دوراً في تكوين الأرتباط التعايشي بين البكتيريا والنباتات. هذه الأنواع الأربعة هي: جلوكان حلقي، موجود في الفضاء المحيط بالبكتيريا ويوجد أيضاً في الوسط الزرعي. وتشكل EPS ارتباطاً ضعيفاً بالأغشية الخارجية وتوجد في الوسط خارج الخلية (السكريات المحفظية) والتي ترتبط بالأغشية الخارجية والسكريات الدهنية، (وهي المكونات الهيكلية للأغشية الخارجية). ويعتقد أيضاً أن EPS البكتيرية السطحية تلعب أيضاً دوراً رئيسياً في ارتباط البكتيريا الزراعية بالخلية النباتية. ان EPS السطحي الجديد الذي يتكون بشكل أساسي من الجلوكوز والمانوز والجلاكتوز والرامنوز موجود أيضاً بكمية صغيرة ويظهر ارتباطاً عالياً ببكتينات البازلاء (*Vicia sativa*) وتشتمل السكريات السطحية الأخرى التي تنتجها هذه السلالة البكتيرية على: عديدات السكر الدهنية، وعديدات السكر الخارجية، والجلوكان الحلقي، والسكريات المحفظية، ولكنها لا ترتبط بكتينات البيقية واللاكتين. أظهرت التجربة التي أجريت على ليكتينات البازلاء أنه تم العثور على عديدات السكاريد الجلوكومانية فقط التي لها دور في الأرتباط بأسطح الجذر بين السكريات الأخرى Skvortsov (&Ignatov, 1998;Laus *et al.*, 2006) .

4-2-2 تحمل الجفاف بواسطة البكتريا المنتجة لـ EPS

Drought tolerance by EPS-producing bacteria

يمكن تعزيز تحمل النباتات للجفاف عن طريق EPS التي تنتجها البكتيريا. يمكن أن تعمل EPS على تحسين بنية التربة وتجمعها، مما يؤدي إلى زيادة إمكانات المياه المحيطة بالنبات، وتعزيز امتصاص العناصر الغذائية، وتطوير النبات، ومقاومة الجفاف (Yang *et al.*,2021 ; Chieb, & Gachomo, 2023 ; Raghuwanshı, 2024) .

يمكن للبكتيريا المنتجة لـ EPS أن تشكل غشاء حيوياً على سطح الجذر، والذي يمكنه حماية النبات من إجهاد الجفاف عن طريق الحفاظ على رطوبة التربة وتحسين امتصاص الماء والمغذيات، على سبيل المثال، أظهر تلقيح نباتات الدخن الثعلبي بسلالة *Azospirillum* المنتجة لـ EPS مقاومة للإجهاد المائي من خلال تحسين بنية التربة وتجميعها. وبالمثل، كانت بذور الذرة المعالجة بسلالات بكتيرية منتجة لـ EPS تحتوي على نسبة أعلى من رطوبة التربة ومحتوى مائي نسبي، وزيادة في طول الجذور والبراعم، ومساحة الأوراق، والكتلة الحيوية النباتية في ظروف إجهاد الجفاف (Yang *et al.*, 2021).

تستطيع البكتيريا المنتجة لـ EPS أيضاً تنظيم المسارات الأيضية ، والتي تعد ضرورية لتخفيف إجهاد الجفاف في النباتات. في ظل إجهاد الجفاف، يساعد تراكم المستقلبات الثانوية العضوية وغير العضوية، المعروفة باسم التعديلات الأسموزي، في الحفاظ على النشاط الأيضي للنبات والتكيف مع

الإجهاد. ومع ذلك، فإن فك رموز الآليات المعقدة لتحمل الجفاف في النباتات يمثل تحدياً كبيراً للطرق الوراثية لتحمل الجفاف (Ilyas *et al.*, 2020).

2-2-5 أهم الأنواع البكتيرية المنتجة لـ EPS

The most important bacterial species that produce EPS

2-2-5-1 جنس *Bacillus spp.*

2-2-5-1-1 اكتشاف وتصنيف بكتريا *Bacillus spp*

Discovery and classification of *Bacillus spp*

تم تسمية جنس *Bacillus* في عام 1835 من قبل Christian Gottfried Ehrenberg، لاحتوائه على بكتيريا على شكل (عصية). تم تعديل *Bacillus* لاحقاً بواسطة Ferdinand Cohn لوصفها على أنها بكتيريا مكونة للأبواغ، إيجابية الگرام، هوائية أو لاهوائية اختيارياً. فإن 266 نوعاً من *Bacillus* موجودة في كل مكان (Parte *et al*,.2020). يحتوي الجنس على تنوع كبير جداً في Ribosomal16S (Pei *et al.*,2020).

2-2-5-1-2 الصفات الفسلجية لبكتريا *Bacillus spp.*

Physiological characteristics of *Bacillus spp.* bacteria

هي جنس من البكتيريا موجبة الگرام، عصوية الشكل، ولها 266 نوعاً محدداً. يستخدم المصطلح أيضاً لوصف شكل (عصوي) أو محدبة. يمكن أن تكون أنواع العصيات إما كائنات هوائية إجبارية تعتمد على الأوكسجين، أو كائنات لاهوائية اختيارية يمكنها البقاء على قيد الحياة في غياب الأوكسجين. تكون نتيجة اختبار أنواع العصيات المزروعة إيجابية بالنسبة لإنزيم الكاتلاز في حالة استخدام الأوكسجين أو وجوده وكذلك بالنسبة للحركة ويمكن ان تنمو بمستويات من NaCl بمقدار 6.5%. يمكن للعصيات أن تتحول إلى أبواغ داخلية بيضاوية ويمكن أن تظل في هذه الحالة الخاملة لسنوات (Turnbull, 1996 ;Paul*et al*,. 2021).

في بعض مزارع الأنواع قد تتحول إلى سلبية الغرام مع التقدم في السن. تُظهر الأنواع العديدة من الجنس نطاقاً واسعاً من القدرات الفسيولوجية التي تسمح لها بالعيش في كل بيئة طبيعية. يتم تشكيل بوغ داخلي واحد فقط لكل خلية. الجراثيم مقاومة للحرارة والبرودة والأشعاع والجفاف والمطهرات (Turnbull, 1996).

يمكن للعديد من أنواع العصيات أن تنتج كميات وفيرة من الأنزيمات، والتي تستخدم في صناعات مختلفة، مثل إنتاج ألفا أميليز المستخدم في التحلل المائي للنشا والبروتياز سبتيليسين المستخدم في المنظفات. *B. subtilis* هو نموذج قيم للأبحاث البكتيرية. يمكن لبعض أنواع العصيات تصنيع وإفراز الببتيدات الدهنية، وخاصة السورفكتينات والميكوسوبتيلين وتكون نتيجة اختبار أنواع العصيات المزروعة إيجابية بالنسبة للحركة وتنمو بمستويات 6.5% من NaCl، وموجبة لصبغة گرام وCatalase (Paul*et al.*, 2021).

3-1-5-2-2 أهمية بكتريا *Bacillus spp.*

The importance of *Bacillus spp.* bacteria

توجد أنواع جنس *Bacillus* في كل مكان من الطبيعة، على سبيل المثال: في التربة، يمكن أن تحدث في البيئات القاسية مثل ارتفاع درجة الحموضة (*B. alcalophilus*)، وارتفاع درجة الحرارة (*B.thermophilus*)، وتركيزات الملح العالية (*B.halodurans*) (Ding *et al*., 2005 ; Xie *et al*,.1998).

كما أنها توجد أيضاً بشكل شائع جداً على أنها Endophytes في النباتات حيث يمكن أن تلعب دوراً حاسماً في جهازها المناعي وامتصاص العناصر الغذائية وقدرات تثبيت النيتروجين (Ramesh *et al.*, 2014 ; War Nongkhlaw *et al.*, 2014 ; Jooste *et al.*, 2019).

تنتج بكتيريا *B. thuringiensis* سماً يمكنه قتل الحشرات وبالتالي تم استخدامه كمبيد حشري (Gutiérrez *et al*,.2020). كذلك يحتوي *B. siamensis* على مركبات مضادة للميكروبات تمنع مسببات الأمراض النباتية، مثل الفطريات *Rhizoctonia solani* و*Botrytis cinerea*، وهي تعزز نمو النبات عن طريق الأنبعاثات المتطايرة. إضافة لذلك بعض أنواع *Bacillus* قادرة بشكل طبيعي على امتصاص الحمض النووي عن طريق التحول (Keen *et al.*, 2017).

2-5-2-2 جنس *Pseudomonas spp.*

1-2-5-2-2 اكتشاف وتصنيف بكتريا *Pseudomonas spp*.

Discovery and classification *Pseudomonas spp*.

تنتمي إلى عائلة Pseudomonadaceae من رتبة Gammaproteobacteria. يعتقد ان أفراد الجنس البالغ عددهم 313 عضوا (Parte *et al*., 2020).

إن سهولة استزراعها في المختبر وتوافر عدد متزايد من تسلسلات الجينوم لسلالة *Pseudomonas* جعلت هذا الجنس محورًا ممتازًا للبحث العلمي. حيث تشمل أفضل الأنواع التي تمت دراستها: *P. aeruginosa* في دورها كممرض انتهازي للإنسان، وممرض النبات *P. syringae*، وبكتيريا التربة *P. putida*، والمحفزة لنمو النبات (Plant growth-promoting *P.fluorescens*، و *P. lini*، و *P. migulae*، و *P.graminis* (Padda *et al.*, 2019; Padda . *et al*,.2018)

وبسبب انتشارها على نطاق واسع في الماء وبذور النباتات مثل ثنائيات الفلقة، فقد لوحظت *Pseudomonads* في وقت مبكر من تاريخ علم الأحياء الدقيقة. حيث تم تعريف الأسم العام *Pseudomonas* الذي تم إنشاؤه لهذه الكائنات و بمصطلحات غامضة إلى حد ما تم تصنيفها في البداية عند نهاية القرن التاسع عشر من قبل Walter Migula في عامي 1894 و1900 كجنس من البكتيريا سالبة الگرام، على شكل قضيب، وذات سوط قطبي مع بعض الأنواع البوغية. وقد ثبت فيما بعد أن الوصف السابق غير دقيق وذلك بسبب وجود حبيبات انكسارية (وجود حبيبات تحتوي على مواد تخزين للطاقة، قد تكون السبب في عدم دقة الوصف السابق). وعلى الرغم من الغموض في الوصف، الأ أن النوع النمطي، *Pseudomonas pyocyanea* (الأسم الأساسي لـ *Pseudomonas aeruginosa*)، أثبت كونه أفضل واصف. (Migula, 1900; Palleroni *et al*,. 2010).

2-2-5-2-2 الصفات الفسلجية لبكتريا *Pseudomonas spp.*

Physiological characteristics of *Pseudomonas spp.*

عادةً ما تعطي أنواع *Pseudomonas* نتيجة إيجابية لاختبار Oxidase، وغياب تكوين الغاز من الجلوكوز، ويتأكسد الجلوكوز في اختبار الأكسدة / التخمير باستخدام اختبار Hugh Levinson O/F، بيتا الأنحلالي (على أجار الدم)، الأندول السلبي، الميثيل أحمر سلبي، اختبار Voges-Proskauer سلبي، وسيترات إيجابية. البكتيريا سالبة لصبغة الگرام، وتكون على شكل Rod-shaped، وذات سوط قطبي واحد أو أكثر يوفر القدرة على الحركة مع بعض الأنواع البوغية كذلك تمتاز أفراد هذا الجنس بكونها هوائية حرة المعيشة ومتغير Oxidase. وتكون ايجابية لفحص Catalase وغير مكونة للأبواغ (Migula, 1900).

بكتريا *P. syringae* هو ممرض نباتي . وموجود في أكثر من 50 مساراً مختلفاً، يُظهر الكثير منها درجة عالية من خصوصية النبات المضيف. يمكن للعديد من أنواع *Pseudomonas* الأخرى أن تعمل كمسببات للأمراض النباتية، ولا سيما جميع الأعضاء

الأخـــرين فـــي مجموعـــة *P.syringae* الفرعيـــة، ولكـــن *P. syringae* هـــي الأكثـــر انتشـــاراً والأفضل دراسة (Padda *et al.*, 2019; Padda *et al.*, 2018).

2-2-5-2-3 أهمية بكتريا *Pseudomonas spp.*

The importance of *Pseudomonas spp.* bacteria

منذ منتصف الثمانينات، تم تطبيق بعض أعضاء جنس *Pseudomonas* على بذور الحبوب أو تم تطبيقها مباشرة على التربة كوسيلة لمنع نمو أو إنشاء مسببات أمراض المحاصيل. ويشار إلى هذه الممارسة بشكل عام باسم المكافحة الحيوية. إن خصائص المكافحة الحيوية لسلالات *P. fluorescens* و *P. Protegens* (CHA0 or Pf-5 for example) هي حالياً أفضل فهم، على الرغم من أنه ليس من الواضح بالضبط كيف يتم تحقيق خصائص تعزيز نمو النبات لـ *P. fluorescens*. تشمل فرضيات ما يلي:

1. قد تحفز البكتيريا الجهاز المناعي في النبات المضيف، حتى تتمكن من مقاومة هجوم مسبب المرض الحقيقي بشكل أفضل.
2. وقد تتفوق البكتيريا على ميكروبات التربة الأخرى (المسببة للأمراض)، على سبيل المثال. بواسطة حاملات الحديد مما يعطي ميزة تنافسية في البحث عن الحديد.
3. قد تنتج البكتيريا مركبات معادية لميكروبات التربة الأخرى، مثل المضادات الحيوية من نوع Phenazine أو Hydrogen cyanide. تدعـــم الأدلة التجريبية كل هـــذه النظريات Haas (& Défago 2005).

وتشمـــل أنـــواع *Pseudomonas* البارزة الأخـــرى ذات خصائـــص المكافحـــة الحيويـــة *P. lorantiaca*، التي تنتج عامل مضاد حيوي من نوع Phenazine ضد بعض مسببات الأمراض النباتية الفطرية (Chin-A-Woeng *et al*,.2000)، والأنواع ذات الصلة الوثيقة *P. aurantiaca*، التي تنتـج di-2,4-diacetylfluoroglucylmethane، مركب مضاد حيوي فعال ضد الكائنات إيجابية الگرام *et al*,.1975).

2-2-5-3 جنس *Azotobacter sp.*

2-2-5-3-1 إكتشاف وتصنيف بكتريا *Azotobacter*

Discovery and classification *Azotobacter*

يعد العالم الهولندي Beijerinck (1901) أول من عزل بكتريا *Azotobacter chroococcum* و *Azotobacter agilis* (Mrkovacki & Milic, 2001).

أما الأنواع المتواجدة في التربة وسطوح جذور النباتات فقد عزل العالم (Lipman, 1930) بكتريا *Azotobater vinelandii*، وتمكـــن العالم Beijerinck (1901) مـــن عزل بكتريا *Azotobacter* (beijernckii, 1940).

وعزلت بكتريا *Azotobacter nigricans* من قبل Krassilnikov (1994) بينما تمكن Döbereiner (1966) من عزل بكتريا *Azotobacter paspali*،

كما عزل Skerman & Thompson، في عام 1980 بكتريا *Azotobacter armenicus*، وفي عام 1981 وبكتريا *Azotobacter salinestris*. (Mrkovacki & Milic, 2001) . وتعود هذه البكتريا لعائلة *Azotobacter*aceae (Mali & Bodhankar,2009). وإنّ أكثر الأجناس شيوعاً هو جنس *Azotobacter chroococcum* (Kizilkaya, 2009) .

2-2-5-3-2 الصفات الفسلجية لبكتريا *Azotobacter*

Physiological characteristics of *Azotobacter* bacteria

تمتاز أفراد هذا الجنس بكونها هوائية حرة المعيشة ومثبتة للنيتروجين ومنتجة لمادة Poly-β-hydroxybutyrate ومكونة للأكياس ومتغايرة في انتاج المحفظة فضلاً عن الخلايا متعددة الأشكال والأحجام (Page & Shivprasad, 1991).

كما أنّ لبعضها القابلية على الحركة بسوط محيطي بينما البعض الآخر غير متحرك وتمتلك ظاهرة تعدد الأشكال (Polymorphism) وتتراوح اشكالها من عصوي الى كروي، أما أن تكون مفردة أو مزدوجة أو بشكل تجمعات غير منتظمة وأحياناً سلاسل مختلفة في الطول، هوائية ولكن لها القابلية على النمو في ظروف هوائية قليلة، كما أنها تستهلك الكربوهيدرات وخصوصاً الكلوكوز، وتحتاج الى المولبيديوم لتثبيت النيتروجين ومنتجة للصبغات الذائبة وغير الذائبة في الماء .ويتراوح الرقم الهيدروجيني الملائم لنموها من 4.8 – 8.5 أما الملائم لتثبيت النيتروجين فهو 7.0– 7.5 . وتتواجد في التربة والماء وسطوح جذور النباتات. (Krieg & Holt, 1984)

وذكر Martyniuk & Martyniu (2003) أنّ بكتريا *Azotobacter chroococcum* تعد أكثر أنواع بكتريا *Azotobacter* إنتشاراً في مختلف ترب العالم بينما يكون انتشار الأنواع الأخرى محدداً فعلى سبيل المثال يتواجد النوع *A. paspali*. فقط في سطح جذور نبات*Paspalum notantum* . وذكر عدد من الباحثين أنّ بكتريا *Azotobacter* تتواجد في الترب ذات الرقم الهيدروجيني المتعادل سواء في المناطق الحارة او الباردة، كما أنها مثبتة للنيتروجين بمقدار 10 ملغم غرام نيتروجين لكل غرام

كربوهيدرات وبالتالي المحافظة على دورة النيتروجين في الطبيعة (Revillas *et al.*, 2000 ; Tejera *et al.*, 2005).

2-2-5-3-3 أهمية بكتريا *Azotobacter*

The importance of *Azotobacter* bacteria

أكدت العديد من الدراسات دور بكتريا *Azotobacter* الأيجابي للنبات بصورة مباشرة وغير مباشرة، فالتأثيرات المباشرة للبكتريا تتم من خلال قابليتها على تثبيت النيتروجين كما أن لها القابلية على انتاج الأمونيا و الفيتامينات مثل Thiamine و Riboflavin و Nicotine فضلاً عن انتاج الهرمونات النباتية مثل حامض الجبرليك (GA) و إندول - حامض خليك (IAA) التي تحفز نمو النبات وزيادة كفاءته على امتصاص العناصر الغذائية . اما التأثيرات غير المباشرة فتتمثل بعمل البكتريا بوصفها عوامل سيطرة حيوية ضد المسببات المرضية للنبات من خلال إنتاج المواد المضادة لهذه الممرضات كإنتاجها للمضادات الحيوية والسيانيد فضلاً عن Sidrophore الذي يكبح نمو تلك الممرضات من خلال سحب الحديد (Iron deprivation) (Joseph *et al.*, 2007 ; Zaied *et al.*,2007 ; Islam *et al* ., 2008 ; Mali & Bodhankar , 2009 .

وتستخدم هذه البكتريا في المجالأت البيئية والزراعية (Page & Shivprasad,1991) خاصة في مجال المستحلبات الحيوية (Biosurfactants) لتحطيم الملوثات البيئية (Helmy *et al.*, 2010). فضلاً عن إنتاج المخصبات الحيوية (Bio-fertilizers) (Jayathilake *et al.*, 2006) .

2-2-6 تأثيرات البكتريا المنتجة لـ EPS

2-2-6-1 تأثير البكتريا المنتجة لـ EPS على المحتوى المائي للتربة

يمكن لـ EPS التي تنتجها البكتيريا أيضًا أن تولد غشاءً حيويًا على سطح الجذر، مما يمكن أن يعزز بنية التربة، وبالتالي ضمان نمو النبات، وتقليل تأثير إجهاد الجفاف على النباتات. على سبيل المثال، أظهرت النباتات المعالجة بسلالة Azospirillum المنتجة لـ EPS مقاومة للإجهاد المائي من خلال تحسين بنية التربة وتجمعها. إن تلقيح نباتات الدخن الثعلبي المزروعة في المناطق شبه القاحلة في شمال شرق الصين في ظل ظروف الجفاف بهذه البكتيريا المفيدة استعمرت التربة الملتصقة بالجذور بكفاءة، وعززت رطوبة التربة. يمكن أن يعزز EPS البكتيري النفاذية عن طريق تحسين تجميع التربة والحفاظ على إمكانات مائية أكبر تحيط بالنبات، مما يؤدي إلى زيادة امتصاص العناصر الغذائية، وتطور النبات، ومقاومة الجفاف (Yang *et al.*, 2021 ; Chieb & Gachomo, 2023).

تـأثير المخصـبات الحيويـة والبكتيريـا علـى المحتـوى المـائي والرطوبـة فـي التربـة يعتمـد علـى عـدة عوامـل، بمـا فـي ذلـك نـوع المخصـبات الحيويـة المسـتخدمة وطريقـة تطبيقهـا، وشـروط التربـة والبيئـة المحيطـة بالنباتـات. ومـع ذلـك، هنـاك بعـض الأثـار الشـائعة التـي يمكـن أن تـؤثر علـى المحتوى المائي الرطوبي في التربة (Bashan & de-Bashan, 2010).

وبالتالي تؤثر على النباتات:

1. زيادة استفادة النبات من الماء :بعض المخصبات الحيوية والبكتيريا قد تساعد في تحسين هيكل التربة وتعزيز امتصاص الجذور للماء، مما يزيد من كفاءة استخدام الماء من قبل النباتات.
2. تحسين توزيع الماء في التربة :يمكن للبعض من المخصبات الحيوية أن تساهم في تحسين توزيع الماء في التربة وتقليل تجمعات الماء أو تسربها، مما يؤدي إلى تحسين التوازن بين الجفاف والرطوبة في التربة.
3. تحسين تركيبة التربة :تساعد بعض المخصبات الحيوية والبكتيريا في تحسين تركيبة التربة، مما يجعلها أكثر قدرة على الأحتفاظ بالرطوبة وتوفير بيئة مواتية لنمو النباتات.
4. تقليل تبخر الماء :بعض البكتيريا والمخصبات الحيوية قد تساعد في تقليل تبخر الماء من سطح التربة و تحسين التهوية في التربة (Vessey, 2003).
5. تحسين قدرة النبات على التكيف مع الجفاف :بعض المخصبات الحيوية قد تعزز قدرة النباتات على التكيف مع ظروف الجفاف، سواء من خلال تحفيز نمو الجذور أو زيادة محتوى المواد الفعالة في النباتات التي تساعدها في تحمل الجفاف.

مصادر المخصبات الحيوية والبكتيريا التي يمكن أن تؤثر على المحتوى المائي والرطوبة في التربة تشمل:

a. البكتيريا النيتروجينية الثنائية :مثل *Rhizobium* و*Azotobacter*.
b. الفطريات الميكوريزية الفعالة :مثل.Glomus spp
c. البكتيريا المحفزة لنمو النباتات :مثل *Pseudomonas* و*Bacillus spp*.

. (Vessey, 2003 ; Bashan & de-Bashan, 2010)

2-6-2-2 تأثير البكتريا المنتجة لـ EPS على عملية النتح

Effect of EPS-producing bacteria on transpiration

يمكن أن تساعد البكتيريا المنتجة لـ EPS في التخفيف من آثار الاجهاد غير الحيوية مثل الجفاف والملوحة على معدلات نتح النباتات، يمكن لـ EPS التي تنتجها البكتيريا أن تعزز امتصاص الماء وقدرتـه على الأحتفاظ بالتربة مما يحسن وصـــول النبات إلـــى الماء ويقلل مـــن خسائر النتـــح (Bhagat *et al.*, 2021). يمكن EPS التي أنشأتها البكتيريا حول جذور النباتات أن تحمي الجذور فعلياً من الجفاف، وتحافظ على مستويات رطوبة التربة العالية وتقلل من النتح. يمكن للبكتيريا المنتجة لـ EPS أن تساعد في تنظيم توازن Na^+ وK^+ في النباتات في ظل الظروف المالحة، ومنع امتصاص الصوديوم المفرط الذي يمكن أن يعطل نقل المياه ويزيد من النتح (Dar *et al*,.2021).

أظهرت الدراسات أن التطعيم ببكتيريا تعزيز نمو النباتات المنتجة لـ EPS يمكن أن يزيد بشكل كبير من معدل نتح نباتات المحاصيل مقارنة مع الغير ملقحة في ظل الجفاف وإجهاد الملوحة. باختصار، تساعد قدرة البكتيريا المنتجة لـ EPS على تحسين احتباس الماء في التربة، وتنظيم توازن الأيونات، وحماية جذور النباتات في التخفيف من التأثيرات السلبية للضغوط غير الحيوية على معدلات نتح النباتات (Dar *et al*., 2021; Morcillo & Manzanera, 2021).

2-2-6-3 تأثير البكتيريا (PGPB) المنتجة لـ EPS على قوة البادرة

Effect of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) and EPS Producers on Seedling Vigor

تعد البكتيريا المعززة لنمو النبات (PGPB) مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن تؤثر بشكل إيجابي على نمو النبات وتطوره، بما في ذلك قوة الشتلات، تعد قوة الشتلات عاملاً حاسماً في إنبات النبات وبقائه، حيث تحدد قدرة النبات على الأنبات والخروج من التربة وتحمل الضغوط المبكرة. يمكن لـPGPB، وخاصة تلك التي تنتج عديد السكر خارج الخلوي، تعزيز قوة الشتلات من خلال آليات مختلفة. تم فحص آثار PGPB المنتجة لـ EPS على قوة الشتلات في ظل ظروف الإجهاد اللا أحيائي مجتمعة (الجفاف والملوحة) حيث تم ملاحظة أن هذه البكتيريا يمكن أن تخفف بشكل فعال من الأثار السلبية للضغوط المتعددة على نمو الشتلات (Bhagat *et al.*, 2021) .

2-2-6-4 تأثير البكتريا المنتجة لـ EPS على شدة الإجهاد ومعامل التحمل

تعد المخصبات الحيوية والبكتيريا جزءاً مهماً من التكنولوجيا الزراعية المستدامة والتي تهدف إلى تحسين إنتاج النباتات بطرق طبيعية وبيئية وصديقة للبيئة. لديها تأثيرات إيجابية عديدة على شدة الإجهاد للنباتات، (Sayyed *et al.*, 2019) .

ومن بين هذه التأثيرات:

1. تحسين مقاومة النبات للإجهاد: تعزز المخصبات الحيوية والبكتيريا نمو الجذور والأنسجة النباتية الصحية، مما يجعل النباتات أكثر قدرة على التعامل مع ظروف الإجهاد مثل الجفاف أو الجفاف الجزئي، وارتفاع درجات الحرارة، والتربة القلوية أو الحمضية.
2. تعزيز امتصاص المواد الغذائية : تساعد المخصبات الحيوية والبكتيريا في زيادة امتصاص النبات للمغذيات الضرورية مثل النيتروجين والفوسفور والبوتاسيوم، وهذا يعزز نمو النبات ويجعله أقوى في مواجهة الإجهاد.
3. تحسين التوازن البيولوجي في التربة : تعمل المخصبات الحيوية والبكتيريا على تحسين التوازن البيولوجي في التربة عن طريق تحسين تركيبتها الكيميائية والفيزيائية، مما يعزز قدرتها على دعم نمو النباتات وتحملها للإجهاد.
4. تحفيز نمو الجذور: تساعد بعض المخصبات الحيوية والبكتيريا على تحفيز نمو الجذور وتطويرها بشكل جيد، وهذا يساعد النبات على الوصول إلى مزيد من الماء والعناصر الغذائية في التربة، مما يزيد من قدرته على التحمل والبقاء في ظل ظروف الإجهاد.
5. تحسين تنفس الجذور : يمكن لبعض أنواع المخصبات الحيوية والبكتيريا أن تعزز التهوية في التربة وبالتالي تحسين تنفس الجذور، مما يساعد في تقليل الإجهاد الناتج عن نقص الأوكسجين في التربة.

بشكل عام، تعمل هذه المصادر على تحسين صحة النباتات وتعزيز قدرتها على التكيف مع الظروف البيئية القاسية، مما يقلل من تأثير الإجهاد عليه (Lugtenberg & Kamilova 2009;Singh *et al.*, 2016).

اما تأثير البكتريا في معامل التحمل، فتلعب البكتيرية دوراً مهماً في تحسين خصائص التربة ونمو النبات. يُعتقد أن البكتيريا لها تأثيراً واضحاً على معامل التحمل للنبات، وهو مقياس لقدرة النبات على تحمل الظروف البيئية القاسية حيث تساعد بعض أنواع البكتيريا، مثل البكتيريا المثبتة للنيتروجين، في تحسين امتصاص النبات للنيتروجين، وهو عنصر ضروري لنمو النبات ومقاومة الإجهاد (Demidchik & Maathuis, 2007) .

تـوثر بعـض العوامـل علـى المخصـبات الحيويـة البكتيريـة علـى معامـل التحمـل للنبـات اعتمـادًا علـى نـوع الكائنـات الحيـة الدقيقـة المسـتخدمة وخصـائص التربـة، مثـل نـوع التربـة ومحتوى المواد العضوية (Marschner, 2011).

2-2-6-5 تأثير البكتريا المنتجة لـ EPS على استقرارية الغشاء البلازمي للنبات

Effect of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) and EPS Producers on Plasma Membrane Stability (PMS)

تلعب البكتيريا المعززة لنمو النبات دورًا حاسمًا في تعزيز نمو النبات وتحمل الإجهاد من خلال آليات مختلفة في تحسين استقرار غشاء البلازما وسلامة الخلايا النباتية ووظيفتها في ظل الظروف البيئية المعاكسة وهو الحاجز الخارجي للخلايا النباتية ويكون له دورُ محوري في العمليات الخلوية المختلفة، بما في ذلك امتصاص العناصر الغذائية ونقل الأيونات والأشارات في ظل ظروف الجفاف أو الملوحة أو درجات الحرارة القصوى، يصبح الغشاء البلازمي عرضة للتلف. يمكـن أن يـؤدي هـذا الأضطراب إلـى فقدان المستقلبات الخلوية، وتعطيـل الأنزيم، وفـي النهاية مـوت الخلايا. (Gupta *et al.,* 2022) يمكن أن يكون استخدام PGPB المنتج لـ EPS استراتيجية فعالة لتحسين تحمل إجهاد النبات من خلال تعزيز استقرار غشاء البلازما. ومن خلال حماية غشاء البلازما من التلف، يمكن لهذه البكتيريا أن تساعد النباتات في الحفاظ على سلامتها ووظيفتها وإنتاجيتها حتى في ظل ظروف الإجهاد في دراسة سابقة (Vurukonda *et al.*, 2016). وجد أن تطبيق سلالات *Pseudomonas Fluorescens* المنتجة لـ EPS أدى إلى تحسين استقرار غشاء البلازما في نباتات الذرة المعرضة للإجهاد الملحي. كذلك أفاد (Zhang *et al.* 2014) أن التلقيح بسلالات *Bacillus subtilis* المنتجة لـ EPS عزز بشكل كبير استقرار غشاء البلازما في نباتات القمح تحت ضروف الجفاف.

2-2-6-6 تأثير البكتريا المنتجة لـ EPS على استقرارية الكلوروفيل

Effect of EPS-producing bacteria on chlorophyll stability

تتحلل الصبغات النباتية عند تعرضها للجهد المائي مسببة تلفاً في أجهزة عملية التمثيل الكاربوني وتعد صبغة الكلوروفيل من بين أكثر الصبغات الطبيعية أهمية في النبات. ممكن أن تساعد البكتيريا المنتجة لـ EPS في الحفاظ على استقرار الكلوروفيل في النباتات في ظل ظروف الإجهاد غير الحيوي مثل الجفاف والملوحة حيث تساعد EPS التي تنتجها بكتيريا مثل *Bacillus spp*. و*Pseudomonas spp*. في الأحتفاظ برطوبة التربة حول جذور النباتات، مما يقلل من الوقت الذي تعاني فيه النباتات من نقص المياه. يساعد هذا في الحفاظ على محتوى مائي نسبي أعلى (RWC) في أوراق النبات، وهو أمر بالغ الأهمية

لاستقرار الكلوروفيل. تظهر النباتات الملقحة بالبكتيريا المنتجة لـ EPS زيادة في محتوى الماء النسبي بنسبة 60-85٪ مقارنة بالنباتات غير الملقحة في ظروف غير مجهدة ومجهدة بسبب الجفاف (Naseem *et al*,. 2024).

تعمل EPS أيضًا على تحسين تجميع التربة وتشكل غلافًا جذريًا واقيًا حول الجذور، مما يعزز احتباس الماء في منطقة الجذور. تكون البكتيريا المنتجة لـ EPS (عمرها 10 أيام) أكثر فعالية في زيادة رطوبة التربة مقارنة عمرها يومان، في ظل ظروف الجفاف، تظهر النباتات التي تم تطعيمها ببكتيريا تنتج EPS مستويات متزايدة من المواد الواقية من الضغط الأسموزي مثل الجلوكوز والبرولين والأحماض الأمينية الحرة. تساعد هذه المركبات في الحفاظ على بنية البلاستيدات الخضراء ووظيفتها في ظل ظروف نقص المياه، مما يحافظ على الكلوروفيل (Morcillo & Manzanera, 2021; Naseem *et al.*, 2024) .

2-2-6-7 تأثير البكتريا المحفزة لنمو النبات و المنتجة لـ EPS على المحتوى المائي للأوراق

Effect of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) and EPS Producers on Leaf Relative Water Content (RWC)

يعد دور EPS مهمًا في تحسين محتوى الماء النسبي للأوراق (RWC)، وهو مقياس لمحتوى الماء في أوراق النبات بالنسبة لقدرتها القصوى على الأحتفاظ بالمياه (Sharma *et al.*, 2011) .

يمكن أن يعمل EPS كخزان للمياه، حيث يمتص ويحتفظ بجزيئات الماء بالقرب من جذور وأوراق النباتات. ويمكن بعد ذلك استخدام هذه المياه من قبل النبات خلال فترات الإجهاد المائي. أظهرت العديد من الدراسات السابقة قدرة PGPB وEPS على تعزيز المحتوى المائي للأوراق (RWC) في أنواع النباتات المختلفة حيث أظهرت النباتات الملقحة زيادة في محتوى الماء النسبي ومحتوى البروتين والسكر والبرولين وانخفضت أنشطة إنزيمات مضادات الأكسدة (Naseem & Bano, 2014) واكـدKarimi (2022) أن التلقيح باستخدام *Bacillus subtilis* المنتجة لـ EPS أدت إلى زيادة كبيرة في RWC في نباتات القمح تحت اجهاد الجفاف، كذلك وجد في دراسات سابقة، أن تطبيق سلالات *Pseudomonas Fluorescens* المنتجة لـ EPS أدى إلى تحسين RWC في نباتات الذرة المعرضة لظروف نقص المياه (Upadhyaya *et al*,.2016).

أظهرت النباتات الملقحة بالبكتيريا المنتجة لـ EPS تراكماً أعلى للبرولين والسكريات والأحماض الأمينية الحرة في ظل نقص الماء، ومع ذلك، انخفض محتوى تسرب النشا

والبـروتين فـي نفـس الحالـة. قـدمت نفـس النباتـات المعالجـة بالبكتيريـا المنتجـة لـ EPS نشـاطاً منخفضـاً لأنزيمـات بيروكسـيداز الأسـكوربات والكـاتليز والجلوتـاثيون بيروكسـيديز تحـت اجهـاد الجفـاف ممـا يشـير إلـى دور البكتيريـا المنتجـة لـ EPS فـي تحمـل النباتـات للجفـاف . (Roessner *et al.*, 2001 ; Sandhya *et al.*, 2009 ; Wezel *et al.*, 2014)

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials &Methods

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1 المواد والأجهزة المستخدمة

3-1-1 الأدوات والمعدات Equipments and instruments

الأدوات والمعدات المستعملة في الدراسة الحالية كما مبين في جدول (3-1) :

جدول (3-1) الأدوات والمعدات والشركات المصنعة لها

ت	الأجهزة		المنشا	الشركة المصنعة
1	أطباق بتري	Petri dishes	Iraq	تصنيع محلي
2	أطراف الماصة الدقيقة كل الأحجام	Micropipette tips (all size)	Germany	Hettich
3	أنابيب ابندروف	Eppendrof tubes	Belgium	BioBasic Inc.
4	أنابيب اختبار بلاستيكية معقمة	plastic disposable test tubes	Jordan	AFMA
5	ثلاجة	Refrigerator	Japan	Marubeni
6	جهاز الطرد المركزي العادي	Microcentrifuge	Germany	Witeg
7	جهاز الطرد المركزي المبرد	Centrifuge	England	Gallen Kamp
8	جهاز تقطير ماء	Water distillatory	Japan	Ogawa
9	جهاز قياس التوصيلية الكهربائية	Electric conductivity	China	JENWAY
10	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني	pH-meter	Denmark	Radio meter
11	حاضنة	Incubator	England	Gallen kamp
12	حاضنة هزازة	Shaking incubator	England	Gallen kamp
13	حجرة التعقيم	Hood chamber	Iraq	Native Industrialization
14	حمام مائي	Water bath	Germany	Memmert
15	شرائح زجاجية واغطية شرائح الزجاجية	Slides and cover slips	China	Meheco
16	عروة ناقلة	Loop	England	Shandon
17	فرن كهربائي	Electrical oven	England	Gallen kamp
18	فلاسكات حجمية (دوارق)	Volumetric flasks	India	Jlassco
19	قطينة	Cotton swabs	England	Shandon
20	كابينة الزرع الجرثومي	Hood	Japan	Marubeni
21	المازج الدوار	Vortex mixer	England	Gallen kamp
22	ماصات دقيقة	Micropipettes	USA	Oxford
23	مجمدة	Freezer	Lebanon	Concord
24	مجهر ضوئي	Light microscope	Japan	Olympus
25	محرك مغناطيسي	Vortex mixer	USA	Tomy
26	مسخنة حرارية	Hot plate	England	Gallen kamp
27	مصباح بنزن	Bunsen Burne	Iraq	تصنيع محلي
28	مطياف ضوئي	Spectrophotometer	Jordan	Shmadzu-1- Japan
29	المؤصدة	Autoclave	Japan	Sony
32	ميزان حساس	Sensitive balance	Swizerland	Meter
33	وحدة ترشيح (مليبور)Unit	Millipore filter	Japan	Millipore Corp

2-1-3 المواد الكيمياوية Chemicals and Solutions

المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة في هذه الدراسة كما مبين في جدول (3-2)

جدول (3-2) المواد الكيميائية أو المحاليل والشركات المصنعة لها:

ت	المواد الكيميائية	المنشأ	الشركة المصنعة
1	أسيتون Acetone		G C C / U . K
2	آكاروز Agarose	Canada	BHD
3	بولي اثيلين كلايكول Polyethylene Glycol 600		China
4	بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2	England	BDH
5	ثلاثي أوكسيدالموليبديوم Trimolybdumoxide, MoO_3		BDH
6	ثلاثي كلور حامض الخليك Trichloro acetic acid (tca)	Mumbai	Sdfine-Chem limited
7	حامض الهيدروكلوريك HCl Hydrochloric acid		BDH
8	سكروز Sucrose		BDH
9	صبغة السفرانين Safranin		BDH
10	صبغة الملكايت الخضراء	England	BDH
11	عدة صبغة كرام Gram stain kit	England	BDH
12	فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين potassium hydrogen Phosphate, K_2HPO_4		Fluka
13	كاربونات الكالسيوم Calcium Carbonate $CaCO_3$		Merck
14	كاشف Urease	England	BDH
15	كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent	England	BDH
16	كاشف الكاتليز Catalase reagent	England	BDH
17	كاشف كوفاكس (Kovac's reagent)	Germany	BioMer'ieux-W
18	كبريتات الأمونيوم (Ammonium Sulfate)		Himedia
19	كبريتات الحديدوز Sulfate Ferrous ($FeSO_4.7H_2O$)		Fluka-Garantie
20	كبريتات الحديدوز Sulfate Ferrous ($FeSO_4.7H_2O$)		Fluka-Garantie
21	كبريتات الكالسيوم Calcium Sulfate $CaSO_4$		Fluka
22	كبريتات المغنسيوم $MgSO_4$	England	BDH
23	كبريتات المغنسيوم المائية Magnesium Sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)		Merck
24	كحول الأيثانول Ethanol	UK	GCC
25	كلوريد الكالسيوم Calcium Chloride $CaCl_2$		Carloerba
26	كلوكوز Glucose	India	Afco
27	كليسيرول (Glycerol)		BDH
28	لاكتوز (lactose)	Germany	Behr.ing Institute
29	ماء مقطر منزوع الأيونات Deionized Distilled Water	USA	Sigma
30	مانوز mannos		HIMEDIA
31	مانيتول Mannitol	England	BDH
32	المحلول الملحي الفسلجي Normal saline Solution	France	Biomerieux
33	مستخلص الخميرة (Yeast Extract)		Himedia
34	مولبيدات الصوديوم Sodium- Molybdate		Chem-supply
35	هيدروكسيد الصوديوم Sodium Hydroxide, NaOH		Himedia
36	يوديد البوتاسيوم Potassium Iodide KI	England	Griffin
37	Schaeffer and fultons spor stain		

38	Tetramethyl-P-phenylene diamine dihydrochloride		BDH

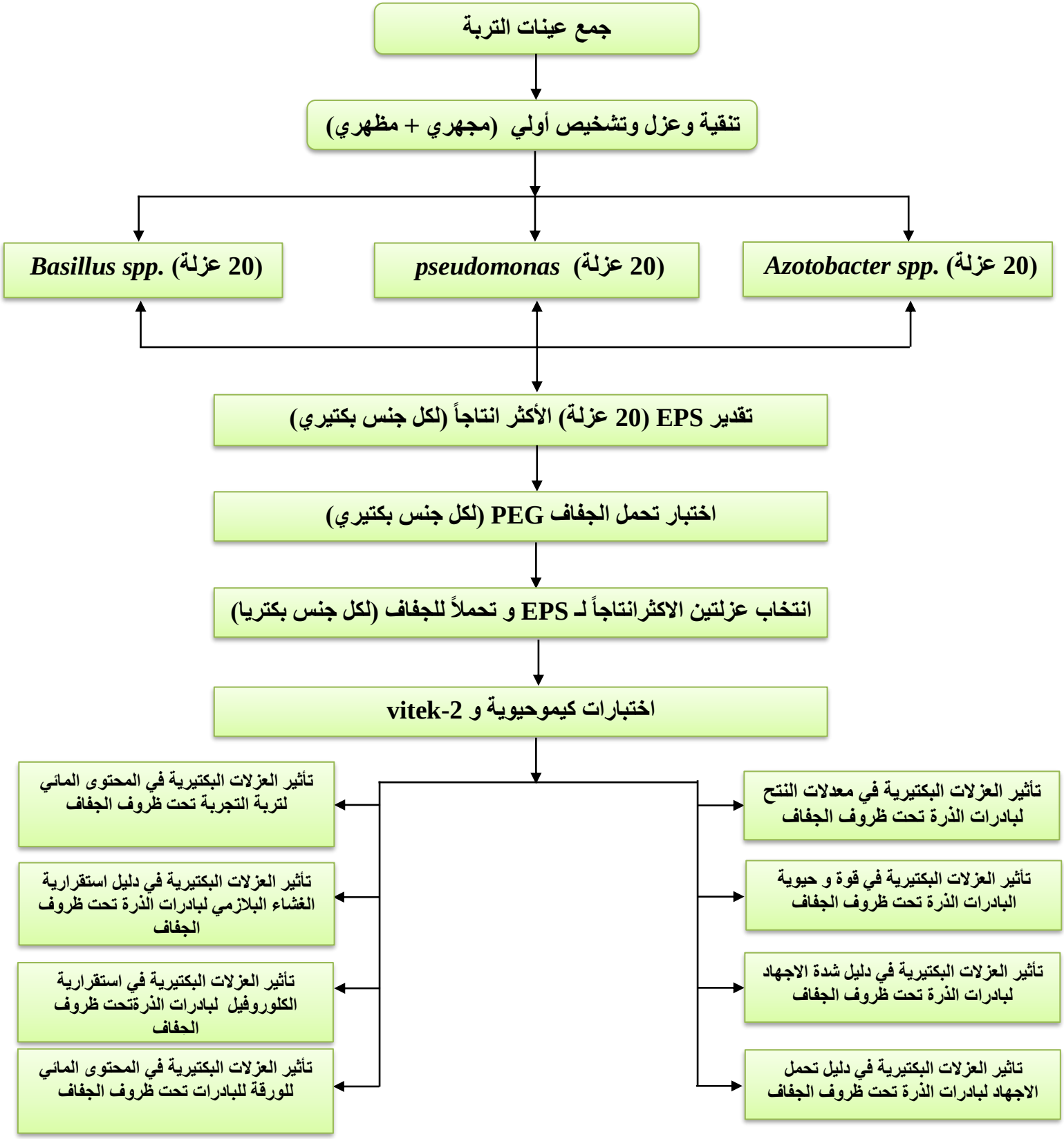
3-1-3 الأوساط الزرعية المستعملة Culture media

الأوساط الزرعية المستعملة في هذه الدراسة كما مبين في جدول (3-3)

جدول (3-3) الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة

ت	أسم الوسط	الشركة المصنعة
1	(SMSA) Sucrose Mineral Saslt Agar	
2	Gelatin medium	
3	Luria broth media	HIMEDIA
4	Mineral growth medium	
5	Nitrogen – free Ashby broth medium	
6	Urea agar medium	
7	اكار– اكارAgar- Agar	HIMEDIA
8	وسط King B	
9	وسط غراء المغذي المائل Slant agar	Himedia
10	وسط اختبار الحركة Mannitol media	
11	وسط اختبار السكريات الثلاثية والحديد Triple Sugar Iron	LAB (Germany)
12	وسط الأكار المغذي Nutrient agar	LAB Germany)
13	وسط الماكونكي أكارMacConkey agar	Himedia (India)
14	وسط المرق المغذي Nutrient broth	Himedia
15	وسط تخمر السكريات Sugar fermentation medium	
16	وسط سايمون ستريت Simmon citrate agar	Himedia (India)

مخطط التجربة



2-3 طرق العمل Methods

1-2-3 جمع العينات Sample collection

تم جمع 20 عينة من التربة من مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة، واشتملت هذه العينات على تربة رملية صحراوية وجمعت العينات حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Aslim *et al.*, 2002) إذ استعملت مجرفة صغيرة لتنظيف التربة وحفر التربة بعمق 15 سم من سطح الأرض وقد وضعت العينات في أنابيب نظيفة ومعقمة ونقلت الى المختبر .

2-2-3 عزل وتشخيص البكتريا Isolation and identification of bacteria

1-2-2-3 عزل وتشخيص بكتريا.*Bacillus spp*

1-1-2-2-3 عزل بكتريا.*Bacillus spp*

A. الأوساط المستعملة

عقمت الأوساط المحضرة بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م ولمدة 15 دقيقة .

1. الوسط المغذي الصلب (Nutrient agar):-

أستعمل هذا الوسط لعزل وتنقية بكتريا *Bacillus* وحفظها. تم تحضير الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة المكتوبة على العلبة، وذلك بإذابة 28 غرام في 1 لتر من الماء المقطر وتم غليه لكي يذوب تماما ثم عقم بواسطة المؤصدة Autoclave وترك ليبرد بدرجة 45-50مْ بعدها تم صبه بأنابيب اختبار بصورة مائلة (MacFaddin, 2000)، حيث تم استخدامه لإدامة حيوية البكتريا المخزونة والحفاظ على صفاتها الفسيولوجية لفترات. ولعمل وسط اختبار الحركة تم تحضيره بإذابة 13غم من الأكار (0.5 %) في 1 لتر من الماء المقطر.

2. المرق المغذي (Nutrient broth)

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 13 غم من الوسط Nutrient broth في لتر من الماء المقطر ووزع في أنابيب وعقم بالمؤصدة. وقد أستعمل هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا.

3. وسط الحفظ والأدامة

حفظت العزلات البكتيرية بطريقتين:

a. للحفظ طويل الأمد، نميت البكتريا في الوسط المغذي السائل تحت الظروف المثلى لها، ثم أضيف الكليسيرول المعقم بنسبة 15 % إلى الأنابيب وحفظت بالتجميد (-20 مْ).

b. للحفظ قصير الأمد، لقح الوسط المغذي الصلب (بشكل مائلات) بالعزلات البكتيرية، وحضنت تحت الظروف المثلى (37 مº ولمدة 18 ساعة) وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 مْ (2020 Zhgun *et al.*,).

B. المحاليل المستعملة:

1. محلول الملح الفسلجي (Normal Saline)

حضر هذا المحلول بإذابة (8.5) غم من كلوريد الصوديوم (NaCl) في كمية كافية من الماء المقطر لحين إتمام الإذابة ثم أكمل الحجم الى لتر في قنينة حجمية (Colle *et al.*, 1996).

2. صبغة كرام (Gram stain)

المجهزة من معهد المصول واللقاحات العراقي (VSI)، استعملت هذه الصبغة المتكونة من (صبغة البنفسج البلوري Crystal Violet، محلول الأيودين Iodine Solution، الكحول المطلق وصبغة السفرانين Sufranine) لدراسة الخصائص المظهرية والبكتريا المعزولة ولغرض تفريق البكتريا الى سالبة أو موجبة لصبغة كرام.

3. صبغة (Malachite green)

تم تحضير الصبغة بإضافة 5 غم من مسحوق الصبغة الى دورق مخروطي وبعدها يتم صب الماء المقطر بالتدريج الى المسحوق مع التحريك المستمر واكمال الحجم الى 100 مل مـــن الماء المقطر (Cooksey, 2016).

4. صبغة السفرانين

يتم مزج 2.5 غرام من السفرانين مع 100 مل مع الإيثانول 95% (V / V)، للحصول Stock solution. يتم تخفيف المحلول المركز بنسبة 1 / 10 بالماء للحصول على المحلول الجاهز للعمل وهذا المحلول يمكن تخزينه لمدة تصل الى سنة بدرجة حرارة الغرفة. (Moyes *et al.*, 2009)

C. طريقة العمل:

1.عزل البكتريا:

أتبعت طريقة (Aslim *et al.*, 2002) في عزل البكتريا، إذ نظفت عينات التربة من بقايا النباتات ثم وزن 1 غم منها وأضيف لها 99 مل من محلول الملح الفسلجي وبذلك أصبح التخفيف 1: 100 وعملت منه تخافيف متسلسلة (1×10^{-6}) ووضعت التخافيف في حمام مائي بدرجة 80 م° لمدة 30 دقيقة وبعد إخراجها بردت لدرجة حرارة الغرفة ثم سحب 0.1 مل من كل تخفيف وتم نشرها بأستعمال ناشر زجاجي (L- shap) في طبق بتري الحاوي على وسط الأكار المغذي (عمل مكررين لكل تخفيف) وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة.

2.تنقية العزلات :

تمت عملية تنقية العزلات بنقل جزء من المستعمرة النامية بصورة مفردة بوساطة ناقل Loop معقم الى أطباق بتري جديدة حاوية على وسط الأكار المغذي وتم نشرها بطريقة التخطيط وكررت العملية عدة مرات لغرض الحصول على مستعمرات نقية

2-1-2-2-3 التشخيص الأولي لبكتريا *Bacillus spp*.

1-2-1-2-2-3 الفحوصات المجهرية للتشخيص الأولي لعزلات *Bacillus spp*

يتم الأعتماد بصورة رئيسة على الفحوصات المجهرية لتحديد وتشخيص بكتيريا*Bacillus spp* ، حيث اعتمدت هذه الفحوصات على مشاهدة وملاحظة خصائص بكتيريا*Bacillus spp* المختلفة تحت المجهر، ومنها خصائص مثل: الشكل، الحجم، ترتيب الخلايا، وخصائص التلوين.

3. تصبيغ البكتريا بصبغة گرام Gram stain

تم وضع قطرة من الماء المقطر على شريحة زجاجية نظيفة، ثم نقل جزء من المستعمرة النقية، التي تم تنميتها على وسط الأكار المغذي بعمر 16 – 24 ساعة، الى الشريحة الزجاجية ونشرت على جزء من سطح الشريحة وتركت لتجف ثم ثبتت بوساطة اللهب وصبغت بصبغة گرام، وتم ملاحظة شكل ولون وتجمع الخلايا بفحصها تحت المجهر الضوئي باستعمال العدسة الزيتية (Brown, 2007) .

4. فحص الأبواغ:

تم فحص الأبواغ بطريقة schaeffer fulton method، حيث تم إدخال صبغة الملكيت الخضراء Malachite green إلى الأبواغ عن طريق تبخير المستحلب البكتيري. وتعد صبغة Malachite green قابلة للذوبان في الماء، ولها قابلية منخفضة لتصبيغ المواد الخلوية، لذلك يمكن إزالة لون الخلايا النباتية بالماء. ثم يتم بعد ذلك تلوين الخلايا النباتية بالسافرانين.

طريقة العمل:

a. أخذت مسحة من المستعمرة (التي تم تنميتها بعمر 7 – 10 أيام) وتم وضعها على شريحة زجاجية نظيفة. ثم تم تجفيفها بالهواء وثبتت بحرارة متوسطة.
b. غمرت الشريحة بأكملها بمحلول Schaeffer & Fulton`s Spore Stain A (الملكيت الأخضر).
c. تم استخدام البخار لمدة 3-6 دقائق (التجفيف الرطب)، ثم تم شطفه تحت بالماء.
d. صبغت الأبواغ باستخدام محلول Schaeffer & Fulton's Spore Stain B (السفرانين) لمدة 30 ثانية.
e. بالنهاية غسلت بالماء، وجففت الشريحة (Hussey & Zayaitz, 2007) .

3-2-2-1-3 حفظ العزلات وأدامتها

لقح الوسط المغذي الصلب والذي تم صبه في أنابيب بشكل (slant) بالعزلات المراد حفظها وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة، ثم حفظت بدرجة حرارة 4 م° حفظاً مؤقتاً Colle (*et al* .,1996) .

3-2-2-2 عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas spp*

3-2-2-2-1 عزل البكتريا *Pseudomonas spp*

A. الأوساط المستعملة :

عقمت الأوساط المحضرة بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م ولمدة 15دقيقة.

1. وسط - King B Medium

استعمل هذا الوسط لعزل ونمو بكتريا *Pseudomonas*، وقد حضر بإذابة 20 غم ببتون و1.5 كبريتات المغنسيوم $MgSO_4$ و1.5 غم فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين K_2HPO_4 و 15مل جليسيرول و15غم أكار في 850 مل من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني إلى 7.2 وأكمل الحجم إلى لتر وعقم بالمؤصدة (Cruickshank *et al*., 1975).

2. وسط الحفظ والأدامة:

حفظت العزلات البكتيرية بطريقتين:

a. للحفظ طويل الأمد، نميت البكتريا في الوسط المغذي السائل تحت الظروف المثلى لها، ثم أضيف الكليسيرول المعقم بنسبة 15 % إلى الأنابيب وحفظت بالتجميد (-20 مْ).

b. للحفظ قصير الأمد، لقح الوسط المغذي الصلب (بشكل مائلات) بالعزلات البكتيرية، وحضنت تحت الظروف المثلى (37 م° ولمدة 18 ساعة) وحفظت في الثلاجة عند درجة حـــــرارة 4 مْ (Zhgun *et al*., 2020) **.**

B. المحاليل والكواشف المستعملة :

1.محلول الملح الفسيولوجي Normal saline Solution

تم تحضيره كما جاء في الفقرة **2-2-2-1-1** أولا (ب).

2. صبغة گرام (Gram stain)

تم تحضيره كما جاء في الفقرة **2-2-2-1-1** ثانيا (ب).

C. طريقة العمل

1.عزل البكتريا

تم وضع عينات التربة في داخل أكياس معقمة من البولي إثلين بعناية وخلطت التربة جيداً. ثم أخذ 1 غم من التربة ووضع في أنابيب اختبار معقمة تحتوي 9 مل من المحلول الفسلجي (Normal saline Solution)، وبذلك نحصل على التخفيف 10^{-1}ومنه عملت سلسلة من التخافيف العشرية، ثم أخذ0.1 مل من التخفيف 10^{-3} – 10^{-4} ونشرت على وسط King B وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 28 مْ، ولمدة 48 ساعة.

2. تنقية العزلات

وبعد ظهور المستعمرات النقية للبكتريا Pure colonies على الوسط أخذت مسحة منها ووزعت بطريقة التخطيط (Streaking) على الوسط نفسه مرة أخرى للتأكد من نقاوتها، ثم حفظت العزلات بعد نموها على وسط الأكار المغذي المائل (Slant) بدرجة حرارة 4 مْ، لحين اجراء الفحوصات التشخيصية.

3-2-2-2-2 التشخيص الأولي لبكتريا *Pseudomonas spp*

3-2-2-2-2-1 الفحوصات المختبرية للتشخيص الأولي لعزلات *Pseudomonas*

شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على مصنف بيرجي (HOLT,1994).

a. الفحص المظهري (الصفات المزرعية Cultural properties)

1.إنتاج صبغة الفلورسين (Fluorescin) المتألقة .

لقح وسط King B الصلب وحضنت الأطباق في درجة حرارة 28 مْ مدة 48 ساعة، أنّ ظهور لون أصفر مخضر حول المستعمرات في الطبق تحت الضوء الأعتيادي دل على إن الأختبار موجب، ولتأكيد النتيجة وضعت الأطباق تحت الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 365 nm (King *et al.*, 1954).

2. فحص نمو البكتريا عند درجة حرارة 4 مْ و42 مْ

أجري هذا الفحص لمتابعة نمو البكتريا في درجتي الحرارة 4 مْ و 42 مْ، إذ زرعت البكتريا على الوسط King B وعمل مكررين للعزلة البكتيرية، حضن الأول بدرجة 4 مْ، والأخر بدرجة 42 مْ (Holt *et al* ., 1994).

b. التشخيص المجهري Microscopical Identification

1.التصبيغ بصبغة گرام Gram stain :

تم ذكره كما في الفقرة السابقة 2-2-2-2-1-2-1 أولاً.

3-2-2-3 عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter spp*.

1-3-2-2-3 عزل البكتريا *Azotobacter spp*.

A. الأوساط الزرعية المستعملة : عقمت الأوساط المحضرة بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة .

1.وسط Sucrose Mineral Salts السائل

حُضِّر هذا الوسط حسب الطريقة المُتَبِعة من قبل الراشدي وتاج الدين (1988) وذلك بإذابة 10 غم من السكروز و3 غم من كاربونات الكالسيوم في100مل لمحلول يتكون من 0.5 غم من فوسفات البوتاسيوم أُحادية الهيدروجين K_2HPO_4 و 0.2 غم من كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ و0.1 غم من كبريتات الكالسيوم $CaSO_4$ و 0.02غم من كبريتات الحديدوز $FeSO_4.7H_2O$ و0.02 غم من كبريتات المنغنيز المائية $MnSO_4.4H_2O$ و 0.01 غم من ثلاثي أوكسيد المولبدينوم MoO_3 و 0.01 غم من يوديد البوتاسيوم KI مع إضافة 2 % أكار– اكار إلى الوسط ,وبعد إتمام اذابة الوسط تم تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 و إكْمال الحجم إلى لتر واحد من الماء المقطر وبعد ذلك عقم بالمؤصدة وصُب في أطباق بتري معقمة وقد أستعمل هذا الوسط لتقدير العدد الكلي لبكتريا *Azotobacter*.

2. وسط Sucrose Mineral Salts الصلب

أستخدم هذا الوسط لتنمية بكتريا *Azotobacter* , وحضر هذا الوسط بالطريقة الواردة في الفقرة (1) نفسها مع إضافة 1.5% أكار– اكار الى الوسط وبعد إتمام عملية الإذابة عقم بالمؤصدة وتم صبه في أطباق بتري معقمة .

3. وسط المرق المغذي (Nutrient Broth)

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 13 غم من الوسط Nutrient Broth في لتر من الماء المقطر ووزع في أنابيب وعقم بالمؤصدة . وقد أستعمل هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا .

4. وسط اختبار الحركة (Motility Test Medium)

حضر هذا الوسط بإضافة 4 – 5 غم من مسحوق أكار–اكار الى 13 غم من مسحوق Nutrient broth وأذيبت المحتويات في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الإذابة أكمل الحجم الى 1 لتر ثم وزع الوسط في أنابيب وعقمت بجهاز المؤصدة . وقد استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة (Collee *et al*., 1996).

B. المحاليل والكواشف المستعملة :

1.عدة صبغة گرام (Gram Stain kit)

المجهزة من معهد المصول واللقاح العراقية (VSI).

C. طرق العمل:

1.عزل البكتريا:

وضعت عينات التربة في داخل أكياس معقمة من البولي إثلين بعناية وخلطت التربة جيداً. ثم أخذ 1 غم من التربة ووضع في أنابيب اختبار معقمة تحتوي 9 مل من المحلول الفسلجي (Normal Saline Solution) وبذلك نحصل على التخفيف 10^{-1}ومنه عملت سلسلة من التخافيف العشرية، ثم أخذ0.1 مل من كل تخفيف ونشرها في طبق يحوي وسط Sucrose Mineral Salt (SMS) الصلب حيث يعمل مكررين لكل تخفيف وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ، ولمدة 96 ساعة، في ظروف هوائية.

2. تنقية العزلات:

نعمل بعد ذلك في ظروف هوائية على انتقاء المستعمرات ثم نشرها بطريقة التخطيط Streaking ويتم (تكرار العملية ثلاث مرات) من اجل تنقية المستعمرات ثم حفظت العزلات بعد نموها على وسط الأكار المغذي Slant بدرجة حرارة 4 مْ، لحين اجراء الفحوصات التشخيصية المجهرية والكيموحيوية.

3-2-2-3-2 التشخيص الأولي لبكتريا *Azotobacter spp.*

شخصت عزلات بكتريا *Azotobacter*على وفق ماجاء في (Krieg & Holt, 1984)، اذ تم الأعتماد على الصفات المظهرية والفحوصات المجهرية في التشخيص.

A. الصفات المظهرية (Morphological Characteristics)

سجلت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية في وسط SMS الصلب من حيث شكل المستعمرة ولونها وحجمها.

B. الفحوصات المجهرية (Microscopical tests)

1.تصبيغ بكتريا *Azotobacter*

تم انتقاء المستعمرات النامية على الوسط المذكور أعلاه وأجري لها الفحص المجهري لمعرفة قابليتها على الأصطباغ بصبغة كرام وملاحظة لونها وشكلها.

2. اختبار الحركة (Motility test)

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الحركة بطريقة الطعنة وحضنت بدرجة 37 م لمدة تتراوح بين 24-48 ساعة. إن انتشار النمو في الوسط خارج حدود الطعنة دلالة على قابلية البكتريا على الحركة.

3-2-2-3-3 حفظ عزلات بكتريا *Azotobacter*

لقحت أنابيب حاوية على وسط الحفظ الصلب بشكل مائل (Slant) بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، ثم حفظت في الثلاجة، إذ يتم تجديد المزارع شهرياً.

3-2-3 الغربلة الكمية لا نتاج متعدد السكريات الخارجي من بكتريا *Bacillus spp.*

تمت الغربلة لجميع العزلات التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة التي شخصت بشكل أولي على أنها*Bacillus spp* .

3-2-3-1 تحضير اللقاح

أستعمل وسط Luria broth حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة ووزع في أنابيب بواقع 5 مل لكل أنبوبة وعقم بالمؤصدة، وقد تم تحضير اللقاح بنقل مستعمرة بكتيرية بوساطةLoop معقم من العزلات التي تم تنميتها على وسط الأكار المغذي) كلا على انفراد) الى الأنبوبة المخصصة لها والحاوية على وسط Luria broth وحضنت الأنابيب بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة للحصول على اللقاح.

3 -2-3-2 تحضير وسط الأنتاج

أستعمل وسط **Mineral Growth Medium** الذي يتكون من المواد التآلية مذابة في لتر من الماء المقطر مستخلص الخميرة 5غم كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ (5غم) كبريتات الأمونيوم 3 غم كلوكوز 50غم تم تحضير هذا الوسط من المواد المذكورة في أعلاه إذ وزنت المواد وأذيبت في كمية من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى (5) ثم أكمل الحجم الى لتر ووزع الوسط في دوارق زجاجية Flaskes سعة 75 مل وبواقع 19.6 مل في كل دورق وبثلاث مكررات لكل عزلة وعقم بالمؤصدة (Szumigaj *et al*.,2008).

3-2-3-3 تلقيح وسط الأنتاج

لقح وسط الأنتاج بحجم لقاح مقداره 2 % من حجم الوسط وOptical dencity مقداره 0.5 عند الطول الموجي 600 نانومتر وحضنت flasks بالحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 37 مº بسرعة رج 100 دورة / دقيقة ولمدة 48 ساعة (Szumigaj *et al*., 2008) .

3-2-3-4 اسـتخلاص متعدد السكريات الخارجـي من بكتريـا *Bacillus spp.*

أتبعت طريقة Kanmani (2011) في استخلاص متعدد السكريات الخارجي إذ بعد انتهاء مدة الحضن (48 ساعة) وضع وسط الأنتاج في حمام مائي بدرجة 90 مº مئوية ولمدة 10 دقائق وتم فصل الخلايا عن وسط التخمر باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق. جففت الخلايا لغرض حساب الوزن الجاف للكتلة الحيوية في حين أستعمل الراشح إذ أضيف اليه (TCA) Trichloroacetic acid بتركيز 8% حجم / حجم وترك لمدة 3 ساعات بدرجة 4 مº. ثم أجريت له عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وذلك لترسيب البروتين الموجود في الوسط

بعد ذلك أهمل الراسب وأخذ الراشح وأضيف اليه حجمين من الأيثانول المبرد بتركيز 95% وترك بدرجة 4 م°. لمدة 24 ساعة ثم فصـــل EPS بوساطة الطـــــرد المركـزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 12 دقيقة إذ أهمل الراشح وجفف الراسب بدرجة 40 م . لمدة 24 ساعة لغرض حساب الوزن الجاف، ويتم اختيار 10 عزلات الأكثر انتاجاً.

4-2-3 الغربلــة الكميــة لإنتاج متعدد السكريات الخارجي مــن عـزلات *Pseudomonas spp*

1-4-2-3 تحضير اللقــاح

نشطت السلالات البكتيرية المنتخبة وذلك بنقل جزء متساو من المستعمرات النقية النامية باستخدام الناقل المعقم إلى دوارق مخروطية سعة 10 مل تحتوي على 5 مل من وسط King B Medium Broth المعقم بالمؤصدة وحضنت المزارع السائلة في حاضنة هزازة ضبطت درجة حرارتها عند 28 م° وبسرعة 100 دورة/ دقيقة لمدة 48 ساعة. (Bakker *et al*,.1986)

2-4-2-2 تحضير وسط الأنتاج

أستعمل وسط Nitrogen free medium (NFM) الذي يتكون من المواد التآلية مذابة في لتر من الماء المقطر فوسفات البوتاسيوم الأحادي (K_2HPO_4) 1غم , كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$ 0.2 غم، كاربونات الكالسيوم ($CaCo_3$) 1غم، كلوريد الصوديوم (NaCl) 0.2 غم، كبريتات الحديد ($FeSO_4$) 0.1 غم، مولبيدات الصوديوم 0.005 غم، كلوكوز 10 غم، وزنت المواد المذكورة وأذيبت في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم الى 1 لتر بعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى 7 (Ranganayaki *et al*,.1981) ثم وزع الوسط في دوارق زجاجية (Flask) سعة 100 مل وبواقع 24 - 25 مل في كل دورق وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة.

3-4-2-3 تلقيح وسط الأنتاج

لقح وسط الأنتاج بحجم لقاح مقداره 3% من حجم الوسط (Pal *et al* ,.1999) وبكثافة نوعيه مقدارها 1عنـد الطـول الموجي 660 نانومتر ووضعـت فـي الحاضنة بدرجة 37 م° لمدة 72 ساعـة وبسرعـة رج مقدارهـا 100 دورة / دقيقة (Evans & Linker, 1973).

4-4-2-3 استخلاص متعدد السكريات الخارجي من بكتريا.*Pseudomonas* spp

أتبعـت الطريقة كما في الفقرة السابقة 2-2-4-4. ويتم اختيار العزلات الأكثر انتاجاً في التجارب اللاحقة.

5-2-3 الغربلــة الكميــة للإنتاج متعدد السكريات الخارجي مــن عـزلات.*Azotobacter spp*

1-5-2-3 تحضير اللقــاح

استخدم وسط (SMS) السائل لغرض تحضير اللقاح، إذ وزع الوسط المذكور في أنابيب بواقع 5 مل لكل أنبوبة ثم عقم بالمؤصدة. وحضر اللقاح بنقل عزلة من عزلات بكتريا *Azotobacter* بواسطة ((Loop full من العزلة المنماة على وسط (SMS) الصلب الى الأنبوبة المخصصة لها الحاوية على وسط (SMS) السائل المحضر أعلاه وحضنت الأنابيب في الحاضنة على درجة حرارة 37م° لمدة 18 ساعة للحصول على اللقاح.

2-5-2-3 تحضير وسط الأنتاج

استعمل وسط Nitrogen-free Ashby Broth والذي يتكون من المواد التآلية ($g \cdot l^{-1}$): (mannose 20) و (KH_2PO_4, 0.2) و ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2) و (NaCl,0.2) و(K_2SO_4, 0.1) و ($CaCO_3$,5) . وزنت المواد المذكورة وأذيبت في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم الى اللتر، بعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى 7. (Rasulov *et al*., 2013)، ثم وزع الوسط في دوارق زجاجية Flask سعة 2 لتر وبواقع 49.5 مل في كل دورق وبثلاث مكررات لكل عزلة وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121مº ولمدة 15 دقيقة (Vargas-Garcia *et al*., 2003).

3-5-2-3 تلقيح وسط الأنتاج

لقح وسط الأنتاج بحجم لقاح مقداره 1% من حجم الوسط وبكثافة نوعية مقدارها 0.5 عنـد الطـول الموجي 540 نانومتر ووضعـت فـي الحاضنة بدرجة 30 مº لمدة 72 ساعـة وبسرعـة رج مقدارهـا 150 دورة / دقيقة (Vargas-Garcia *et al*., 2003).

4-5-2-3 استخلاص متعدد السكريات الخارجي من بكتريا *Azotobacter*

أتبعـت الطريقة كما في الفقرة السابقة 2-2-4-4. ويتم اختيار العزلات الأكثر انتاجاً للـESP في التجارب اللاحقة.

6-2-3 اختبار قابلية العزلات قيد الدراسة في تحمل ظروف الجفاف:

Evaluation of Drought Tolerance Potential

اختبار قابلية تحمل ظروف الجفاف كما يلي:

1. استُخدمت مادة البولي إيثيلين جلايكول (PEG600) بتركيزات مختلفة في وسط مرق مغذي (NB) بمستويات جفاف محتملة على التوالي لتقييم قابلية العزلات البكتيرية على النمو تحت ظروف الإجهاد الجفاف.

2. أُضيفت تركيزات مختلفة من (PEG600) 0%، 10٪، 15٪، 20٪، و 25٪ (بالوزن / الحجم) إلى وسط NB لضبط إمكانات المياه على التوالي، ثم لقحت هذه المحاليل بـ 1٪ من عزلات البكتيريا المزروعة لمدة 24 ساعة (Joshi *et al*., 2020).

3. بعد 24 ساعة من الحضانة في حاضنة هزازة (200 دورة في الدقيقة) عند درجة حرارة 30مº، تم قياس كثافة OD عند طول موجة 600 نانومتر باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي.

4. تم اختبار نمو المزرعة البكتيرية عند تركيزات مختلفة من PEG وتم حساب معدلات النمو المقارنة (بالمقارنة مع السيطرة الخالية من PEG) (Patel *et al*., 2019) .

5. تم تحديد علاقة مباشرة بين إمكانات المياه ونشاطها المثبط للنمو (Sati *et al*., 2023).

6. تم اختيار العزلات البكتيرية المنتجة الأكثر لـ Exopolysacharide لكل نوع بكتيري من *Bacillus spp. Pseudomonas spp* و *Azotobacter spp* وتقدير قابلية تحملها لظروف الجفاف. ويتم انتخاب 6 عزلات في التجارب اللاحقة.

7-2-3 التشخيص الكيموحيوي للعزلات المنتخبة قيد الدراسة: Biochemical Identification

A. الأوساط الزرعية المستعملة : عقمت الأوساط المحضرة بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة .

1.وسط أكار الجيلاتين Gelatin Medium

حضر بإضافة 12 غم جيلاتين إلى 100 مل من الوسط المغذي السائل N.B، عدل الأس الهيدروجيني PH إلى 7 باستخدام حمض الهيدروكلوريك بتركيز 0.1 N أو هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 N المخفف، ومن ثم وزع في أنابيب وعقم بالمؤصدة على درجة حرارة 115مْ لمدة 20 دقيقة، استعمل لاختبار قابلية البكتريا على تحلل الجيلاتين (Feltham & Barrow, 2003).

2. وسط أكار اليوريا Urea Agar Medium

حضر بإذابة 4 غم من مسحوق وسط أكار اليوريا الأساس (Urea Agar B ase) في 95 مل من الماء المقطر المعقم، وبعدها عقم الوسط بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة ثم أضيف 5 مل من محلول اليوريا 40% (المعقم بالترشيح) بعد تبريده بدرجة حرارة 50 مْ، ووزع الوسط إلى أنابيب اختبار معقمة، وضعت بشكل مائل لتتصلب، واستعمل لاختبار قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم اليوريز (MacFaddin, 2000) .

3. وسط اكار الماكونكي MacConkey Agar

تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة المكتوب على العلبة وذلك بإذابة 52 غرام في1 لتر من الماء المقطر وتم غليه لكي يذوب تماما ثم عقم بواسطة المؤصدة Autoclave وترك ليبرد بدرجة 45 – 50 مْ بعدها تم صبه في اطباق Petri dishes وهو يعتبر وسط انتقائي للبكتريا السالبة لصبغة گرام ووسط تفريقي (يفرق هذا الوسط بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز حيث تظهر المستعمرات المخمرة بلون وردي) واستخدم لدراسة الصفات المظهرية .

4. وسط أكار سايمون ستريت Simmon Citrate Agar

استخدم هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على استهلاك السترات وحضر حسب تعليمات الشركة المصنعة . وزع في أنابيب زجاجية نظيفة بواقع 5 مليلتر للأنبوبة الواحدة وعقم بالمؤصدة، ثم تركت الأنابيب بعدها لتبرد بصورة مائلة Slant .

5. وسط غراء ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron

استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وغاز ثاني أوكسيد الكاربون CO_2 والتحري عن قابلية لتخمر سكر الكلوكوز واللاكتوز . تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة. وزع في أنابيب زجاجية نظيفة بواقع 5 مل للأنبوبة الواحدة وعقم بالمؤصدة .

6. وسط تخمر السكريات Sugar Fermentation Medium

حضر الوسط وفقاً لما ذكره Macfaddin (1979) وذلك بإذابة المكونات المدرجة في الجدول (4-2)، في لتر من الماء المقطر ووزع على أنابيب اختبار زجاجية بواقع 4.5 مل لكل أنبوبة اختبار، وعقم الوسط بالمؤصدة، ثم أُضيف 0.5 مل لكل من السكريات الآتية: الكلوكوز (Glucose) واللاكتوز (Lactose) والمانيتول (Mannitol)، على حدة للحصول على تركيز نهائي للسكر مقداره 1 % . ثم تم الترشيح باستعمال مرشحات دقيقة ونقلت إلى الأنابيب المحضرة مسبقاً، واستعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على استهلاك السكريات.

الجدول (3-4) مكونات وسط تخمر السكريات

المادة	الوزن (غم)
Peptone	10
Beef extract	1
NaCl	5
Phenol red	0.018

6. وسط اختبار الأندول (Indole Test Medium)

أستخدم هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على إنتاج الأندول إذ حضر بإذابة 10 غم ببتون و 5 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى PH=7.2 أكمل

الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر، ثم وزع الوسط في أنابيب وعقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مئوية لمدة 15 دقيقة (MacWilliam,2012).

B.المحاليل والكواشف المستعملة :

1.محلول اليوريا Urea

حضر بإضافة 40 غم من اليوريا إلى كمية كافية من الماء المقطر وبعد اكمال الإذابة يكمل الحجم الى 10 مل بقنينة حجمية ليصبح التركيز النهائي 20 %، ويحفظ لحين الأستعمال في تحضير وسط أكار اليوريا (Collee *et al* ., 1996) .

2.كاشف الكوفاكس Kovacs reagent

أستخدم هذا الكاشف حسب توصيات الشركة المجهزة (Bio –merieux) الألمانية للكشف عن قابلية العزلات لانتاج الأندول .

3.كاشف الكاتليز Catalase reagent

حضر بإضافة 3 مل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 من المحلول الأصلي بتركيز 30% ، إلى 42 مل من الماء المقطر المعقم للحصول على محلول تركيزه 30 %، ويحفظ في قنينة معتمة . استعمل للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الكاتليز . (Tadesse & Alem, 2006)

4.كاشف الأوكسيديز Oxidase Test

حضر هذا المحلول آنياً وذلك بإذابة 1 غم من مادة Tetramethyl-P-phenylene diamine dihydrochloride في 90 ملليتر ماء مقطر، ثم أكمل الحجم إلى 100 ملليتر. استعمل للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز (Baron *et al* ., 1994).

C.الفحوصات الكيموحيوية Biochemical test

1.اختبار إنزيم الكاتليز Catalase Test

أجري هذا الأختبار بنقل مسحة من البكتريا النامية (بعمر 18-24 ساعة) على الوسط الزرعي الخاص بتنمية العزلات إلى شريحة زجاجية نظيفة بواسطة الناقل Loop ثم أضيفت له قطرة من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 تركيز (3%)، إن التحرر المباشر لفقاعات الأوكسجين يدل على النتيجة الموجبة للاختبار (Collee *et al*., 1996).

2.اختبار إنزيم الأوكسيديز Oxidase Test

غمرت ورقة الترشيح بمحلول Tetramethyl- P-phenylene diamine hydrochloride ونقلت إليها المستعمرة البكتيرية بعمر 48 ساعة بواسطة عيدان خشبية

معقمة، ويدل ظهور اللون البنفسجي بعد 10-60 ثانية من ملامسة الخلايا للكاشف على نتيجة موجبة للتفاعل (Cruickshank *et al* ., 1975) .

3.اختبار الأندول Indole test

أجري هذا الأختبار للتحري عن قابلية البكتريا على تحويل الحامض الأميني Tryptophan الى Indole، إذ لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الأندول بمزروع بكتيري بعمر 18- 24 ساعة وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24- 48 ساعة وبعد اكتمال مدة الحضن، أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس الى الأنابيب مع الرج الجيد. وإن ظهور حلقة حمراء أعلى الوسط دلالة على ايجابية الأختبار (MacFaddin,1979).

4.اختبار إنزيم اليوريز Urease Test

خطط مائلاً وسط اليوريا أكار بالبكتريا المراد اختبارها وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 28مْ لمدة 48 ساعة، تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي يدل على قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم اليوريز. (Holt *et al.*, 1994)

5.اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

أجري هذا الأختبار للتحري على قابلية البكتريا لاستهلاك السترات بوصفها مصدراً وحيداً للكاربون، إذ لقح وسط Simmon citrate agar المائل بالعزلات البكتيرية وحضن بدرجة حرارة 28 مْ لمدة 48 ساعة، إن تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق يدل على إيجابية الأختبار (Atlas *et al.*, 1995).

6.اختبار الحركة Motility Test

لقح أنبوب الأختبار الحاوي على وسط المانيتول شبه الصلب بالبكتريا بطريقة الطعن مع المراعاة لعدم الوصول إلى قعر الأنبوب، ومن ثم بعد الحضن بدرجة 28مْ لمدة 48 ساعة. إن انتشار النمو خارج خط الطعن دلالة على إيجابية الأختبار، وكما إن تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأصفر دليل على استهلاك المانيتول (Collee *et al.*, 1996).

7.اختبار إسالة الجيلاتين Gelatin liquefaction Test

يكشف هذا الأختبار عن قابلية البكتريا في إنتاج إنزيم الجيلاتينيز (Gelatinase) الذي يعمل على إسالة الجيلاتين، إذ لقحت البكتريا المراد اختبارها في أنابيب الوسط أكار الجيلاتين بطريقة الطعن وحضنت بحرارة 28مْ لمدة 48 ساعة. إن عدم تصلب الوسط بدرجة حرارة 4 مْ في الثلاجة لمدة نصف ساعة يدل على إيجابية الأختبار وقابلية البكتريا على تحليل الجيلاتين (Collee *et al.*, 1996).

8.النمو على وسط الماكونكي Growth on MacConkey agar medium

خططت الأطباق الحاوية على وسط الماكونكي أكار وحضنت بحرارة 28 مْ لمدة 48 ساعة، ظهور النمو وتغير لون الوسط يدل على إيجابية الأختبار (Collee *et al*., 1996).

9.اختبار تخمر السكريات Sugar fermentation Test

تم تلقيح أوساط تخمر السكريات الحاوية على السكريات المراد اختبارها بمزروع بكتيري بعمر 18- 24 ساعة وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 7 أيام، مع متابعة تغيرات اللون يومياً، وإن تغير لون الوسط من الأزرق الى الأصفر دلالة على ايجابية الأختبار (MacFaddin , 2000).

10.إنتاج كبريتيد الهيدروجين (H_2S)

لقح الوسط Triple Sugar Iron الصلب بطريقة الطعن (Stabbing)، وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 22 مْ، ولوحظت النتائج يومياً لمدة 7 أيام للكشف عن وجود اسوداد حول خط الطعن والذي يدل على قدرة البكتريا على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين (Collee *et al*., 1996).

11. الكشف عن قابلية البكتريا على النمو في 0.1% فينول .

نميت البكتريا في وسط SMS السائل و الصلب الذي يحتوي على 0.1 % فينول , ثم حضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 4 ايام . إن ظهور العكورة في الوسط السائل ونمو المستعمرات على الوسط الصلب دلالة على قابلية البكتريا على النمو بوجود 0.1 % فينول .

12. الكشف عن قابلية البكتريا على النمو في 1% كلوريد الصوديوم (NaCl).

نميت البكتريا في وسط SMS السائل و الصلب الذي يحتوي على 1 % كلوريد الصوديوم, ثم حضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 4 أيام، إن ظهور العكورة في الوسط السائل ونمو المستعمرات على الوسط الصلب دلالة على إيجابية الأختبار .

13. الكشف عن قابلية البكتريا على النمو في 2% كليسرول كمصدر وحيد للكاربون

نميت البكتريا في وسط SMS السائل و الصلب الذي يحتوي على 2% كليسرول بدلاً من السكروز، ثم حضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 4 أيام. إن ظهور العكورة في الوسط السائل ونمو المستعمرات على الوسط الصلب دلالة على قابلية البكتريا على النمو بوجود الكليسرول كمصدر وحيد للكاربون .

3-2-8 عمل اختبارات و فحوص الفايتك للعزلات البكتيرية المنتخبة

تم اجراء الفحوصات اللازمة لتشخيص النوع البكتيري لكل من بكتريا *Bacillus spp* و *Pseudomonas spp* لتحديد النوع و الجنس للعزلات البكتيرية .

3-2-9 اختبارات API20 (Analytical Profile Index 20)

تم اجراء فحص **API** لعزلة *Azotobacter* لتشخيص نوع العزلات البكتيرية المنتخبة حسب طريقة استعمال الشركة المصنعة.

يعد فحص API نظام لتحديد البكتيريا. حيث يحتوي كل نظام على 20 اختباراً كيميائياً مصغراً. وقاعدة بيانات يتضمن نظام API test من 20 اخدودا صغيراً (Wells) يحتوي على مواد مجففة. تم حقن هذه الأخاديد بمعلق بكتيري بواسطة ماصة بلاستيكية (Plastic transfer pipettes) أثناء الحضانة، ينتج الأيض الغذائي تغيرات في اللون تكون إما تلقائية (مباشرة بعد الحضن) أو يتم الكشف عنها عن طريق إضافة الكواشف بعد الحضن. وتتم قراءة التفاعلات بعد 18-24 ساعة من الحضن بدرجة 37 مْ وحسب جدول القراءة والتي يتم التعرف عليها من خلال الرجوع إلى فهرست نظام API 20.

3-2-10 تحضير معاملات الجفاف

3-2-10-1 معاملات التربة: -

1. جمع عينات التربة: -

تم جمعت عينات التربة كما يلي:

a. جمعت عينات التربة وأخذت من على السطح بعمق 20 سم.
b. جمعت العينات من مناطق غرب كربلاء من اراضي رملية جافة .
c. جففت عينات التربة بالفرن عند 20 درجة مئوية لمدة 48 ساعة، وتمريرها من خلال منخل 2 مم.

2. تحليل تربة التجربة:-

تم اجراء الفحوصات الفيزيائية و الكيميائية لعينات التربة المستخدمة في المعاملات لتحديد صفاتها للدراسة المطلوبة في مختبر مديرية زراعة كربلاء وحسب الجدول التالي :-

جدول (3-5) التحاليل الفيزيائية والكيميائية لتربة التجربة

الفحص	EC ds/m	T.D.S ppm	PH	Ca^{++} ppm	Mg^{++} ppm	Na^{++} ppm	K^{+} ppm	CL^{-} ppm	$N\text{-}NH4^{+}$ ppm	$N\text{-}NO3^{-}$ ppm	O.M %
العينة	3.1	1985	8.1	360	70.5	414.2	176	2130	40	20.1	1.8

3.تقدير المحتوى الرطوبي للتربة :-

سجل وزن التربة الرطب لكل اصيص وسجل وزن التربة الجاف بعد انتهاء التجربة لحساب المحتوى المائي النسبي و يتم اجراء التجربة بقياس وزن عينة من التربة قبل و بعد التجفيف. حيث تم تجفيف التربة في الفرن وقياس وزنها قبل التجفيف (الرطب) وبعد التجفيف ومن ثم سجلت القراءات بالميزان الحساس مع استخراج وزن العبوة الخاصة بجمع عينات التربة واستخدام الطريقة التالية وحسب المعادلة أدناه .(O'Kelly, 2005) :-

$$\mathbf{W\ ,\ \%} = \frac{\mathbf{weight\ of\ water}}{\mathbf{weighe\ of\ dry\ soild}} \times \mathbf{100}$$

$$\mathbf{W,\%} = \frac{\boldsymbol{weight\ of\ water}}{\boldsymbol{weighe\ of\ dry\ soild\ mass}} = \frac{\boldsymbol{w2-w3}}{\boldsymbol{w2-w1}} \times \mathbf{100}$$

W1 = وزن التربة الرطب.

W2 = وزن التربة الجاف .

W3 = وزن العبوة .

4. تعقيم التربة: -

وضعت عينات التربة في أكياس بلاستيكية خاصة معقمة ثم عقمت عند 121 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة. بعد ذلك تركت التربة المعقمة لتبرد لمدة معينة، وتوزيعها بأحجام معلومة إلى أواني بلاستيكية (Chukwuneme *et al*, 2020).

3-2-10-2 معاملات البذور:

1. مصدر البذور:

اخذت بذور الذرة الصفراء المستخدمة في التجربة من وزارة الزراعة / دائرة البحوث الزراعية حيث تم أخذ النموذج من الصنف التركيبي فجر.

2. تحضير بذور الذرة للدراسة :

بعد جلب البذور مباشرة تم اجراء الآتي :-

a. تعقيم البذور سطحيا باستخدام كحول بتركيز 70% لمدة 5 دقيقة ومن ثم عقمت باستخدام محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% لمدة 10 دقائق
b. غسلت البذور كليا بعناية باستخدام الماء المقطر
c. جففت البذور بدرجة حرارة المختبر ولمدة 24 ساعة (khan *et al.*, 2003)
d. حفضت البذور في عبوات بلاستيكية محكمة الغلق بدرجة حرارة 4 م˚ لحين الأستخدام.

3-10-2-3 معاملات اللقاح البكتيري

A. تحضير اللقاح البكتيري:

تم تنشيط العزلات البكتيرية المختارة المحفوظة على Slant وذلك بتنميتها على الوسط المغذي وحضر معلق اللقاح البكتيري للعزلات لمعالجة البذور حيث تم تنشيطها عن طريق خلط مستعمرة واحدة من كل سلالة بكتيرية في وسط N.B المغذي وحضن المزرعة لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 م° (Azeem, *et al.*, 2022).

B. تلقيح البذور بالعزلات البكتيرية Seed inoculation with bacterial isolates

تم تنشيط العزلات البكتيرية المختارة الموجودة على سلانت والمحفوظة والمعزولة والمشخصة مسبقاً. حيث تم تنشيطها على N.B وبعد 24 ساعة تم أخذ العزلات و تلقيحها على lurian – (bacteria) (L.B) ثم وضعها في الحاضنة الأهتزازية عند درجة حرارة 30 و لمدة 72 ساعة ثم يتم عمل طرد مركزي للعزلات عن (300 دورة \دقيقة ولمدة 10 دقائق) بعد ذلك يتم التخلص من الراشح واخذ الراسب (pellet) ثم نضيف كميات قليلة من الماء للراسب من اجل الحصول على قراءة (OD =1) عند 660 نانومتر والتي تعادل (10^{-10}) CFU ml^{-1} (الوحدة المكونة للمستعمرات) (Asadullah & Bano, 2018).

ثم تم نقع البذور المعقمة في هذا اللقاح البكتيري لمدة 24 ساعة وزراعتها في التربة. (Nasim&Bano,2014 ; Mubeen *et al.*, 2021) .

3-10-2-4 تهيئة التجربة: -

اشتملت الدراسة على تجربة عاملية لثلاثة مستويات من الجفاف (ري كل 24 ساعة، ري كل 48 ساعة، ري كل 72 ساعة) وستة عزلات بكتيرية (*Bacillus subtilis*، *BreviBacillus choshinenensis*، *p.putida* ، *p.fluresens*، *Azotobacter chroococcum* 1 ، *Azotobacter chroococcum* 2) ومعاملة بدون لقاح بكتيري . وبثلاثة مكررات لكل معاملة وحسب الجدول التالي:-

جدول (3-6) العزلات البكتيرية ومستويات الجفاف

نوع السلالة البكتيرية	مستويات الجفاف
Control (بدون معاملة)	ري كل 24 ساعة، ري كل 48 ساعة، ري كل 72 ساعة
Bacillus subtilis	ري كل 24 ساعة، ري كل 48 ساعة، ري كل 72 ساعة
BreviBacillus	ري كل 24 ساعة، ري كل 48 ساعة، ري كل 72 ساعة
Pseudomonas putida	ري كل 24 ساعة، ري كل 48 ساعة، ري كل 72 ساعة
Pseudomonas fluresense	ري كل 24 ساعة، ري كل 48 ساعة، ري كل 72 ساعة
Azotobacter chroococcum 1	ري كل 24 ساعة، ري كل 48 ساعة، ري كل 72 ساعة
Azotobacter chroococcum 2	ري كل 24 ساعة، ري كل 48 ساعة، ري كل 72 ساعة

11-2-3 تقدير و حساب المؤشرات التالية :-

A. تقدير معدل النتح Measurement of transpiration

تم قياس معدل النتح عن طريق قياس فقدان الماء. تم إجراء التجربة بطريقة الوزن، تم وضع البادرات في بيكرات زجاجية تحتوي على 20 مل من الماء المقطر. تمت إضافة قطرات من الزيت إلى سطح الماء لمنع فقدان الماء بسبب التبخر، وبعد ذلك تم حساب الوزن الأولي. ثم تم تقدير معدلات النتح لمدة 6 أيام. وفي اليوم السادس، سجل الوزن لكل من (نباتات + بيكر + ماء + قطرات الزيت) لتحديد كمية الماء المفقودة من كل معاملة.

قلة الوزن تشير إلى فقدان النبات للماء (بسبب النتح). يتم قياس معدل النتح على أنه كمية الماء المفقودة معبراً عنها بوحدات غرام/ يوم/نبات (Maylani *et al*., 2020).

B. تقدير قوة البادرة Strength of seedling

بعد انهاء التجربة تم جمع البادرات وغسلت بالماء المقطر وتم قياس ارتفاع البادرات (بالسانتيمتر). بعد غسل الشتلات تم فصل المجموع الجذري عن المجموع الخضري، ثم وضع الجزء الخضري في أكياس، ثم جففت في الفرن بدرجة (40 م°) وعند ثبوت الوزن سجل الوزن الجاف للجزء الخضري لكل معاملة، وحسبت قوة البادرات من خلال المعادلات: (Talukder *et al*., 2022)

$$\text{Seedling strength (mg cm}^{-1}) = \frac{\text{Shoot weight (mg)}}{\text{Shoot length (cm)}}$$

C. قياس شدة الإجهاد Stress Intensity

قيست شدة الإجهاد حسب طريقة (Fischer & Murrer 1978) واعتماداً على الوزن الجاف للبادرات وحسبت من المعادلة الآتية :

$$\text{Stress intensity} = 1 - (Ysi / Ypi)$$

Ysi = الوزن الجاف لمعاملة البادرات

Ypi = الوزن الجاف لمعاملة البادرات بدون جفاف (سيطرة)

D. قياس دليل تحمل الإجهاد Stress tolerance index

تم قياس دليل تحمل الإجهاد الجفافي ((Stress tolerance index index STI حسب طريقة (Shetty *et al*,.1995) وذلك بالأعتماد على الوزن الجاف للبادرات وحسب المعادلة الآتية:

$$STI = (Ypi \times Ysi) / Ypi^2$$

حيث ان:

STI = دليل تحمل الإجهاد Stress tolerance index index

Ysi = الوزن الجاف لمعاملة البادرات

Ypi = الوزن الجاف لمعاملة البادرات بدون جفاف (سيطرة)

E. تقدير استقرارية الغشاء البلازمي *Cell membrane stability index:*

تم تحديد مؤشر استقرار غشاء الخلية بناءً على عدد الأيونات الموجودة في double- ddH_2O distilled water وفقًا Guo واخرون، (2009) و Singh واخرون، (2017) تم تنظيف 200 ملغ من الأوراق وتقطيعها بطول 5 مم ووضعها في أنبوب يحتوي على 20 مل ddH_2O. تم تحضين الأنابيب لمدة 12 ساعة عند درجة حرارة الغرفة مع إضاءة ثابتة. يتم قياس قيمة توصلية المحلول باستخـــدام مقياس التوصليـــة الكهربائية (E.C-meter CM-21P, TOA Corp, Japan) باعتباره الموصلية الأولية (E.C 1)، ثم يتم غلي المحلول إلى 100 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة ثم يتم تبريده إلى 25 درجة مئوية ثم يتم قياس التوصيلية الكهربائية كـ E.C 2 .

حيث ISM يتم تحديدها بالصيغة التالية: (Salsinha *et al* ., 2020) .

$$ISM\ (\%) = \left[1 - \frac{EC1}{EC2}\right] \times 100\%$$

F. تقدير استقرارية الكلوروفيل Chlorophyll stability index

تم غسل 100 ملغم من الأوراق باستخدام الماء المقطر وتقطيعها ووضعت هذه الأوراق المقطعة في أنابيب اختبار في ثلاث تكرارات وأضيف 10 مل من DMSO إلى كل أنبوب اختبار. تم تحضين أنابيب الأختبار في حمام مائي عند درجة حرارة 60 مئوية لمدة 15 دقيقة. تم تسجيل امتصاص المحاليل عند 663 - 645 نانومتر على مقياس الطيف الضوئي مزدوج الشعاع المرئي للأشعة فوق البنفسجية. (النموذج: ELIT، BioEra Ltd.)

تم حسابه أيضًا بشكل دوري باستخدام الصيغة التآلية:

(CSI %) = (إجمالي الكلوروفيل تحت الإجهاد / إجمالي الكلوروفيل للسيطرة) × 100

. (Pawar & Kamble , 2015)

G. تقدير المحتوى المائي للأوراق Moisture content (%) measurement

لقياس محتوى الرطوبة في النباتات، تم خذ أوراقا طازجة، ووزنها وتركها لتجف في الفرن، وأخذت قراءات الأوراق المجففة حتى تحصل على القيمة المماثلة في الوزن. ثم نطرحها من وزن الأوراق الطازجة، وستعطينا نتيجة الرطوبة الموجودة في الأوراق. إذا قسمنا النتيجة على الوزن الجاف، فسنحصل على محتوى الرطوبة (Jabeen *et al* ., 2023) .

يتم وزن وعاء صغير. ثم وزن 10 گرام من العينة في الوعاء. بعد ذلك يتم تجفيف العينة لمدة 24 ساعة في فرن درجة حرارته 105-110 درجة مئوية. نعمل على إعادة وزن العينة وطرح وزن الحاوية وتحديد محتوى الرطوبة باستخدام المعادلة التالية:

$$Mn = ((Ww-Wd)/Ww) \times 100$$

بحيث: Mn = محتوى الرطوبة (٪) من المادة n

WW = الوزن الرطب للعينة،

Wd = وزن العينة بعد التجفيف.

12-2-3 التحليل الأحصائي Statistical Analysis

استعمل التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design وحللت البيانات احصائياً باستخدام الحاسوب واعتمدت قيم (L.S.D) للمقارنة بين متوسطات المعاملات على مستوى احتمالية (0.05) في جميع التجارب (Steel & Torrie 1997).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus*

4-1-1 عزل بكتريا *Bacillus spp*

في هذه الدراسة، تم جمع 60 عينة تربة من مناطق مختلفة تعاني من الجفاف من ترب محافظة كربلاء المقدسة، وتم الحصول على عزلات نقية من بكتريا . *Bacillus spp* من جميع العينات التي تم جمعها . والتي تملك صفات مظهرية مطابقة لصفات البكتريا المراد عزلها عند استخدام وسط Nutrient agar بكونه وسطاً ملائماً لنمو هذه البكتريا .

4-1-1-1الصفات الزرعية و المجهرية Cultural & Microscopic Characteristics

أظهرت بكتريا . *Bacillus spp* التي تم تنميتها على وسط العزل الصلب Nutrient agar، مستعمرات جافة ذات لون أبيض و حواف غير منتظمة ، موجبة لصبغة گرام، ، البكتريا عصوية الشكل، مكونة للسبورات، وبعضها كانت لاهوائية. وتوافقت هذه النتائج مع (Elkholy *et al* ., 2023)

يمكن اختيار المستعمرات التي تظهر خصائص نموذجية للبكتيريا العصوية من مزرعة لعينة بيئية تم تخفيفها بشكل كبير بعد الصدمة الحرارية أو التجفيف بالهواء الساخن لاختيار البكتيريا العصوية المحتملة للاختبار. عادة ما تكون المستعمرات المستزرعة كبيرة ومنتشرة وغير منتظمة الشكل. تظهر الخلايا العصوية تحت المجهر على شكل عصوي، وعادة ما يحتوي جزء كبير من الخلايا على أبواغ داخلية بيضاوية في أحد طرفيها، مما يجعلها منتفخة (Foysal & Lisa, 2018).

يتم عادةً التعرف على عزلات بكتريا *Bacillus spp* من خلال الصفات الزرعية و المجهرية . حيث إنّ العزلات الأكثر نشاطاً عبارة عن كائن حي عصوي مستقيم، موجب لصبغة گرام، وكائن مكون للأبواغ الداخلية. كانت إيجابية للنشاط الهوائي، المتحرك، الأميليز والكاتلاز. وعلى أساس نتائج الأختبارات المورفولوجية والفسيولوجية والكيميائية الحيوية يتم تشخيص بكتريا .*Bacillus spp* (Sánchez-León *et al* ., 2023) .

4-1-2 عزل وتشخيص بكتريا . *Pseudomonas spp*

4-1-2-1 عزل بكتريا . *Pseudomonas spp*

بعد جمع 60 عينة من ترب مختلفة من مناطق محافظة كربلاء المقدسة تم الحصول على عزلات من بكتريا . *Pseudomonas spp* بعد تنميتها على وسط King B medium الذي يعد وسطاً انتقائياً لنمو هذه البكتريا .

4-1-2-2 الصفات الزرعية و المجهرية Cultural & Microscopic Characteristics

أظهرت بكتريا *Pseudomonas* على وسط العزل الصلب KingB medium بكتريا مستعمرات ذات هالة صفراء مخضرة حول المستعمرة، سالبة لصبغة گرام، قابلة للنمو عند درجة الحرارة 4- 42، والبكتريا عصوية الشكل، ويعد ظهور هالة صفراء مخضره اللون حول المستعمرات في الطبق تحت الضوء الأعتيادي دليل على إن الأختبار موجب لصبغة الفلورسين .

اتفقت نتائج الدراسة مع Hua واخرون، (2020) الذي أشار الى أنّه بعد حضن البكتريا لمدة 48 ساعة عند 28 درجة مئوية، تم تنقية مستعمرات صغيرة ذات حواف ناعمة وسطح محدب وأظهرت تألقاً واضحاً تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية على وسط King's B medium .

4-1-3 عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter spp*

4-1-3-1 عزل بكتريا *Azotobacter*

تم جمع 60 عزلة من عينات التربة التي تم جمعها من مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة وتم زرعها على وسط sucrose mineral salt (SMS) وهو الوسط الملائم لنمو هذا النوع من البكتريا .

4-1-3-2 الصفات الزرعية و المجهرية Cultural & Microscopic Characteristics

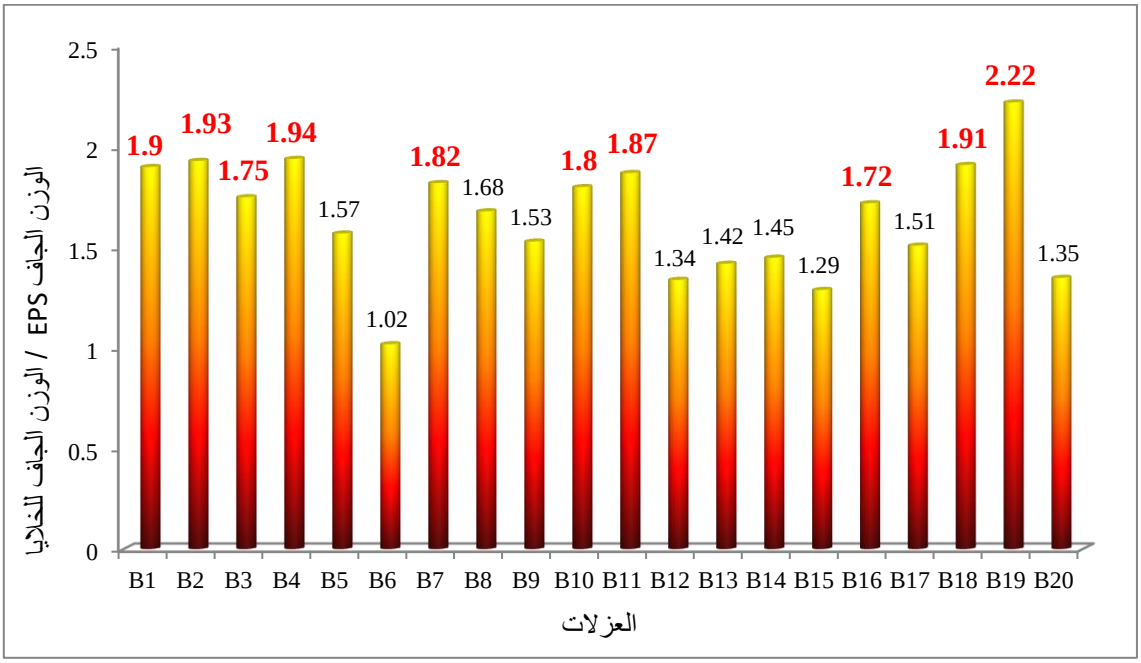
أظهرت بكتريا *Azotobacter* على وسط العزل الصلب (SMS) مستعمرات ملساء ناعمة ولماعة و بعضها منتجة لطبقة مخاطية وتراوح لونها ما بين الأبيض الى البرتقالي، متباينة في الحجم، والبكتريا كروية الشكل . ونظراً لامتلاكها ظاهرة تعدد الأشكال فقد تراوحت ما بين عصوية الى كروية الشكل ولها القابلية على التكيس وذلك طبقاً لما ورد في (Saribay, 2003) وهي سالبة لصبغة غرام وتتواجد أما مفردة أو مزدوجة أو مجموعة غير منتظمة وأحياناً بشكل سلسلة مختلفة في الطول وذلك طبقاً لما ورد في (Krieg & Holt,1984) .

4-2 غربلة عزلات بكتريا *Bacillus spp.* للإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي (EPS)

أخضعت جميع عزلات بكتريا *Bacillus spp* التي تم الحصول عليها لاختبار قابليتها وتحديد الأكفأ منها لإنتاج EPS من خلال حساب الوزن الجاف للـ EPS . الجدول (3-1) يوضح العزلات المنتجة لـ EPS والوزن الجاف للEPS والوزن الجاف للخلايا وتحديد الأكفأ منها لإنتاج EPS من خلال حساب المعدل (الوزن الجاف للـ EPS / الوزن الجاف للخلايا). وتم انتخاب (10) عزلات من بكتريا *Bacillus spp* ذات المعدل الأعلى .

الجدول (4-1) غربلة عزلات بكتيريا *Bacillus spp* لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي

رمز العزلة	الوزن الجاف لـ EPS ملغم / لتر	الوزن الجاف للخلايا ملغم / لتر	الوزن الجاف لـ EPS/ الوزن الجاف للخلايا
B1	950	500	1.9
B2	678	350	1.93
B3	720	410	1.75
B4	816	420	1,94
B5	633	402	1.57
B6	700	680	1.02
B7	912	500	1.82
B8	830	493	1.68
B9	650	424	1.53
B10	733	406	1.8
B11	600	320	1.87
B12	618	461	1.34
B13	690	483	1.42
B14	708	486	1.45
B15	906	700	1.29
B16	588	340	1.72
B17	650	330	1.51
B18	733	415	1.91
B19	600	350	2.22
B20	618	590	1.35



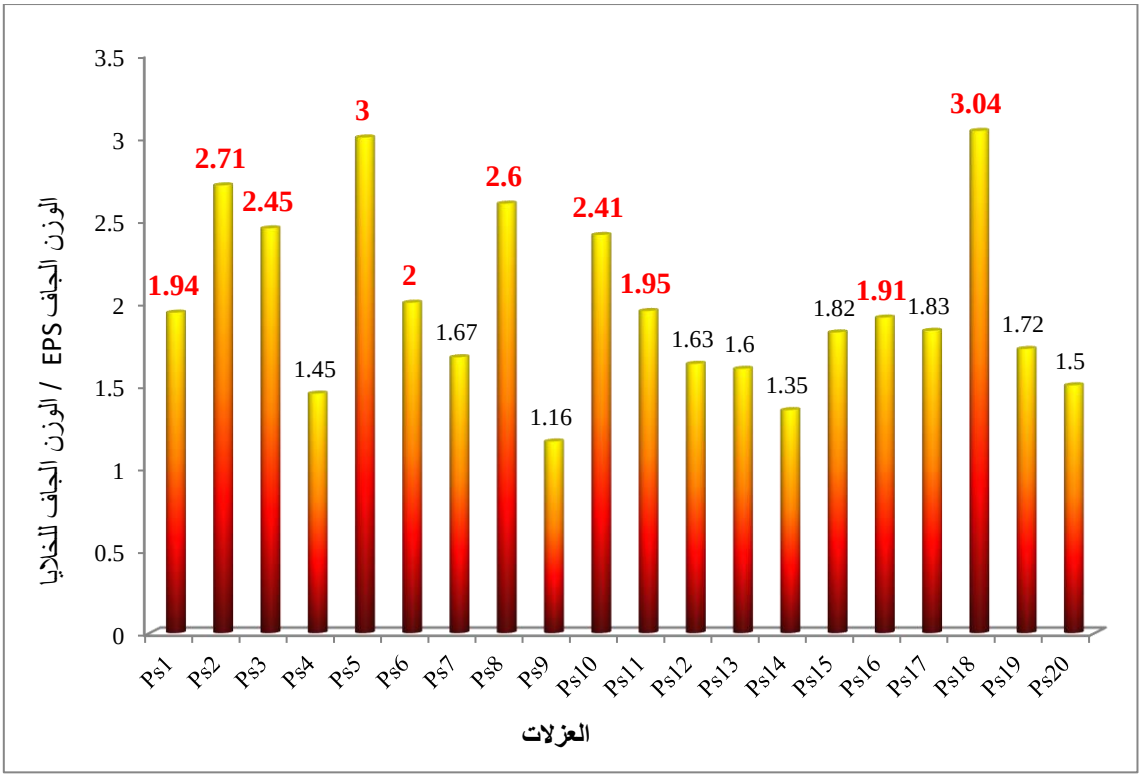
الشكل (3-1) عزلات . *Bacillus spp* الـ(10) التي تم انتخابها والتي كانت الأكفأ في انتاج EPS .

3-4 غربلة عزلات بكتريا *Pseudomonas spp.* لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي

أخضعت جميع عزلات بكتريا *Pseudomonas spp.* التي تم الحصول عليها عملية عزل وتنقية هذه البكتريا من (60) عينة تربة لاختبار قابليتها وتحديد الأكفأ منها لإنتاج EPS من خلال حساب الوزن الجاف لـ EPS . ويبين الجدول (3-2) معدل انتاج EPS (الوزن الجاف لـ EPS / الوزن الجاف للخلايا)

الجدول (4-2) غربلة عزلات بكتيريا *Pseudomonas spp.* لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي

رمز العزلة	الوزن الجاف لـ EPS ملغم / لتر	الوزن الجاف للخلايا ملغم / لتر	الوزن الجاف لـ EPS/ الوزن الجاف للخلايا
Ps1	700	360	1.94
Ps2	380	140	2.71
Ps3	590	240	2.45
Ps4	160	110	1.45
Ps5	660	220	3
Ps6	490	245	2
Ps7	520	310	1.67
Ps8	560	210	2.6
Ps9	620	530	1.16
Ps10	580	240	2.41
Ps11	492	252	1.95
Ps12	556	341	1.63
Ps13	540	330	1.6
Ps14	530	390	1.35
Ps15	751	412	1.82
Ps16	460	240	1.91
Ps17	570	311	1.83
Ps18	670	220	3.04
Ps19	573	233	1.72
Ps20	516	342	1.5



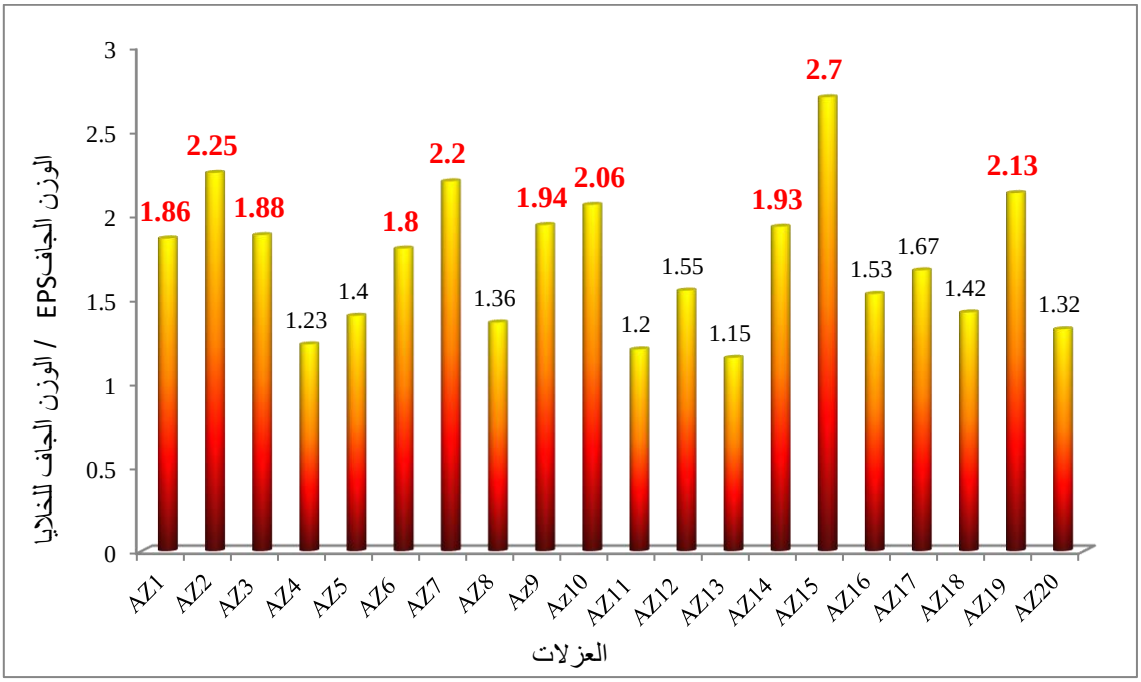
الشكل (2-3) عزلات الـ*Pseudomonas spp.* الـ (10) التي تم انتخابها والتي كانت الأكفأ في انتاج EPS

4-4 غربلة عزلات بكتريا *Azotobacter spp.* لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي

أخضعت جميع عزلات بكتريا *Azotobacter spp* . التي تم الحصول عليها عملية عزل وتنقية هذه البكتريا من (20) عينة من أنواع ترب إذ جمعت من مناطق مختلفة في محافظة كربلاء لاختبار قابليتها وتحديد الأكفأ منها لإنتاج EPS من خلال حساب الوزن الجاف لـ EPS . ويبين الجدول (3-3) معدل انتاج EPS (الوزن الجاف لـ EPS / الوزن الجاف للخلايا)

الجدول (3-4) غربلة عزلات بكتيريا *Azotobacter spp.* لإنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي

رمز العزلة	الوزن الجاف لـ EPS ملغم / لتر	الوزن الجاف للخلايا ملغم / لتر	الوزن الجاف لـ EPS/ الوزن الجاف للخلايا
AZ1	420	225	1.86
AZ2	720	320	2.25
AZ3	320	170	1.88
AZ4	880	710	1.23
AZ5	700	500	1.4
AZ6	380	210	1.8
AZ7	442	195	2.2
AZ8	131	96	1.36
Az9	350	180	1.94
Az10	660	320	2.06
AZ11	120	100	1.2
AZ12	335	215	1.55
AZ13	370	320	1.15
AZ14	252	130	1.93
AZ15	270	100	2.7
AZ16	230	150	1.53
AZ17	211	126	1.67
AZ18	270	190	1.42
AZ19	239	112	2.13
AZ20	330	250	1.32



الشكل (3-3) عزلات الـ *Azotobacter spp* . الـ (10) التي تم انتخابها والتي كانت الأكفأ في انتاج EPS

من الجداول السابقة يتضح أنّ معدل انتاج EPS تراوحت بين (1.02 الى 2.22) ملغم / لتر بالنسبة لبكتريا *Bacillus spp* ، أما بالنسبة لبكتريا *Pseudomonas spp* فقد تراوحت حصيلة الأنتاج بين (1.16 الى 3.04) ملغم / لتر، وتراوحت حصلية انتاج EPS لبكتريا *Azotobacter spp* بين (1.15 الى 2.7) ملغم / لتر .

ومن النتائج التي تم الحصول عليها تم اختيار (10) عزلات لكل من بكتريا *Bacillus spp* وبكتريا *Pseudomonas spp* و لبكتريا *Azotobacter*، والتي كانت الأكفأ في انتاج EPS وتم انتخابها لاحقاً لإجراءات التجارب اللاحقة.

يلاحظ من الجداول (3-1) و (3-2) و (3-3) أنّ جميع العزلات كانت منتجة لـ EPS وتوافقت هذه النتائج مع (Ranjbar *et al* ., 2021; Bhandary & Alagesan , 2024)، وتوافقت أيضاً مع (Balíková *et al* ., 2022) و (Hindersah *et al* ., 2017) . يعتمد انتاج EPS على: الوسط الزرعي المستخدم ونوعية المكونات لهذا الوسط، وكذلك يعتمد على فترات الحضن و يعتمد أيضاً على بعض المعايير منها درجة الحرارة ودرجة الحموضة pH، وعادةً ما يكون زيادة انتاج EPS عندما يكون الوسط غني بالكاربوهايدرات والنيتروجين. (Al-Abbasi, 2018) ويزداد انتاج EPS باقصى معدل بعد (72) ساعة من فترة الحضن، بينما الأنتاج يزداد تدريجياً كلما ابتعدت درجة الحموضة عن (PH=7) حيــث تبلغ ذروة الأنتاج عنــد pH (7- 8) . (Abou-Dobara *et al* ., 2014)

يظهر الجدول (3-1) تفاوت العزلات في انتاج EPS عند الظروف نفسها التي تمت مراعاتها من درجة حرارة ودرجة حموضة ونوع المغذيات وفترات الحضن . ويعتمد الأختلاف في انتاج EPS للعزلات على نوع السلالة ضمن نفس البكتريا. (Sathishkumar *et al* ., 2021) بينما يعتمد الأختلاف في انتاج EPS ضمن السلالة الواحدة على العوامل الوراثية والجينات التي تشفر لإنتاج EPS، كما أشارت دراسة أجراها Argianas (2015) الى تفاوت في انتاج EPS لنفس السلالة بعد حذف الجينات المشفرة لإنتاج EPS . (Argianas, 2015)

يمكن أن يتأثر إنتاج EPS بعوامل بيئية مثل الحد من النيتروجين والكربوهيدرات الزائدة ودرجة الحرارة. على سبيل المثال، تنتج *Pseudomonas* ncibii264 EPS إلى أقصى حد تحت الحد من النيتروجين مع الكربوهيدرات الزائدة. (Williams & Wimpenny, 1978) بينما تعد الأختلافات الجينية في بكتريا *Pseudomonas spp* من العوامل المهمة التي تؤثر على انتاج EPS، حيث يمكن أن تنتج سلالات مختلفة من *Pseudomonas spp* أنواعاً وكميات مختلفة من EPS. على سبيل المثال، قد تنتج بعض السلالات نوعاً واحداً أو نوعين فقط من EPS، مثل Pel و Psl و alginate، بينما قد تنتج

سلالات أخرى الأنواع الثلاثة. (Sandhya & Ali, 2015) و يمكن لبعض سلالات بكتريا *Pseudomonas spp* المخاطية أن تنتج كميات زائدة من alginate، وهو أمر مفيد في البيئات القاسية. ومع ذلك، لا تحتاج السلالات غير المخاطية إلى التعبير عن جينات التخليق الحيوي alginate لتكوين الأغشية الحيوية، وذلك باستخدام إما Pel أو Psl كبولي سكاريد هيكلي أساسي للمصفوفة. (Balíková *et al* ., 2022)

بعض سلالات بكتريا *Pseudomonas spp* يمكنها تحمل وإنتاج EPS استجابةً لضغوط غير حيوية مختلفة مثل الجفاف ودرجة الحرارة والملح، حيث تزداد تركيبة EPS ونسب السكريات في ظل ظروف الإجهاد، مما قد يؤدي إلى تحمل التناضح والحرارة في البكتيريا. وكذلك يمكن أن يؤثر اختيار مصدر الكربون أيضاً على إنتاج EPS. على سبيل المثال، وجد أن الجلسرين هو أفضل مصدر للكربون لإنتاج EPS في *Pseudomonas putid* في ظل ظروف الإجهاد وغير الإجهاد. (Sandhya & Ali , 2015) يمكن أن يتأثر إنتاج EPS بعوامل بيئية مثل وجود المعادن الثقيلة. على سبيل المثال، يمكن أن يؤدي وجود الزئبق إلى قمع إنتاج EPS في بعض العزلات ولكنه يحفزه في عزلات أخرى . يمكن أن تنتج سلالات مختلفة من *Azotobacter spp* أنواعا وكميات مختلفة من EPS . على سبيل المثال، قد تنتج بعض السلالات المزيد من EPS استجابة لمصادر كربون معينة أو في ظل ظروف نمو محددة . إذ يمكن أن يؤثر اختيار مصدر الكربون على EPS. على سبيل المثال، أنتجت بكتيريا *Azotobacter spp* المزروعة على حمض 4-هيدروكسي بنزويك كمصدر وحيد للكربون EPS، ولكن معدل ومدى إنتاج EPS يختلفان مقارنة بالنمو على السكريات (Vargas-García *et al* ., 2002 ; Gauri *et al* ., 2012) .

يمكن أن يؤثر وجود المعادن الثقيلة مثل الزئبق على إنتاج EPS. يمكن لبعض عزلات *Azotobacter spp* أن تنمو وتنتج EPS في وجود الزئبق، في حين أن البعض الأخر قد لا يفعل ذلك . هذه الأختلافات في إنتاج EPS ضرورية لفهم أدوار عديدات السكاريد الخارجية المحددة في تكوين الأغشية الحيوية، وتحمل المعادن الثقيلة، وتعزيز نمو النبات (Hindersah *et al* ., 2017). قد يكون الأختلاف في انتاج هذا بسبب حقيقة أن نشاط مضادات الأكسدة في EPS هو وظيفة لمجموعة من عدة عوامل لأن قدرة مضادات الأكسدة في EPS تعتمد بشكل أساسي على تمييزها الهيكلي وتكوين الأرتباط الجليكوسيدي كما أفاد Li واخرون، (2015) يمكن أن يكون ذلك أيضاً بسبب أنشطة أخرى تتعلق بوجود مكونات أخرى مضادة للأكسدة في مستخلص EPS الخام مثل الببتيدات والبروتينات والعناصر الدقيقة (Li *et al.*, 2015).

5-4 تقدير قابلية البكتريا في تحمل ظروف الجفاف

بعد خضع جميع العزلات المختارة قابليتها على انتاج EPS تم اختيار ال 10 عزلات الأكثر انتاجاً لـ EPS من كل بكتريا لتقيم كفائتها على تحمل الجفاف ومن ثم نحدد النوع .

1-5-4 تقدير قابلية عزلات بكتيريا *Bacillus spp* في تحمل ظروف الجفاف

تم اختيار 10من العزلات الأكثر انتاجاً لـ EPS (B2, B7, B1, B10, B16, B3,B11 , B19, B4,B18) بالتوالي لتحديد قابليتها و كفائتها لمقاومة الجفاف من خلال تعريضها لخمسة تراكيز متتآلية من PEG (0% ،10% ،15% ، 20% ، 25%) وتبينت النتائج أنّ العزلة (B4) و العزلة (B19) تفوقتا معنويا" وكانت أكثر تحملا من بقية العزلات إذ بلغت قيمة كثافة النمو (0.730) و (0.730) OD وعلى التوالي كما مبين بالجدول رقم (4-3)

الجدول رقم (4 -4) كفاءة عزلات بكتريا *Bacillus spp* المقاومة للجفاف

	Polyethylene glycol concentration					**Isolate No**
Average	%25	%20	%15	%10	0%	
0.560	0.340	0.440	0.560	0.630	0.830	B11
0.450	0.310	0.400	0.410	0.510	0.620	B3
0.386	0.290	0.320	0.390	0.410	0.520	B16
0.468	0.320	0.370	0.390	0.530	0.730	B10
0.720	0.570	0.590	0.660	0.840	0.940	B1
0.528	0.390	0.450	0.510	0.580	0.710	B7
0.730	0.530	0.600	0.740	0.810	0.970	B2
0.730	0.490	0.580	0.610	0.710	0.980	B18
0.730	0.560	0.640	0.770	0.820	0.950	B4
0.730	0.550	0.650	0.720	0.800	0.930	B19
0.023			**0.051**			L.S.D
	0.435	0.504	0.576	0.664	0.818	المعدل
			0.016			L.S.D

2-5-4 تقدير قابلية عزلات بكتيريا *Pseudomonas spp* في تحمل ظروف الجفاف

تم اختيار 10 من العزلات الأكثر انتاجاً لل EPS (Ps5، Ps18، Ps2، Ps8 ، Ps3، Ps16، Ps6، Ps10، Ps11، Ps1 على التوالي) قابليتها و كفائتها لمقاومة الجفاف من خلال تعريضها لخمسة تراكيز متتآلية من PEG600 (0% ، 10%، 15% ، 20% ، 25%) وتبينت النتائج أنَّ العزلة (Ps5) و العزلة (Ps18) كانتا معنويا و أكثر تحملا من بقية العزلات إذ بلغت كثافة النمو (0.768) و (0.802) وعلى التوالي كما مبين بالجدول رقم (5-3)

الجدول (4 - 5) كفاءة عزلات بكتريا *Pseudomonas spp* المقاومة للجفاف

Isolate No	Polyethylene glycol concentration					Average
	0%	%10	%15	%20	%25	
Ps5	0.960	0.880	0.750	0.710	0.540	**0.768**
Ps18	0.920	0.910	0.860	0.770	0.550	**0.802**
Ps2	0.940	0.810	0.760	0.690	0.550	**0.750**
Ps8	0.880	0.670	0.560	0.480	0.353	**0.589**
Ps3	0.780	0.630	0.610	0.460	0.310	**0.558**
Ps16	0.780	0.540	0.440	0.420	0.380	**0.512**
Ps6	0.800	0.600	0.470	0.303	0.450	**0.525**
Ps10	0.890	0.590	0.570	0.510	0.440	**0.525**
Ps11	0.870	0.560	0.283	0.350	0.290	**0.525**
Ps1	0.800	0.680	0.470	0.440	0.370	**0.525**
L.S.D (0.05)	**0.098**					0.044
Average	0.862	0.687	0.577	0.513	0.423	
L.S.D (0.05)	**0.031**					

3-5-4 تقدير قابلية عزلات بكتيريا.*Azotobacter spp* في تحمل ظروف الجفاف

تم اختيار 10 من العزلات الأكثر انتاجاً لـ EPS (Az9، Az14، Az3، Az1، Az19، Az10، Az15، Az7، Az2، Az6)

بالتوالي على قابليتها و كفائتها لمقاومة الجفاف من خلال تعريضها لخمسة تراكيز متتآلية من PEG (%0 ، %10، %15 ، %20 ، %25) وتبينت النتائج أنّ العزلة (AZ2) و العزلة (AZ15) كانتا أكثر تحملا من بقية العزلات إذ بلغت القيمة الـ OD (0.582) و (0.586) وعلى التوالي كما مبين بالجدول (3-6)

الجدول (4 - 6) كفاءة عزلات بكتريا *Azotobacter spp* المقاومة للجفاف

Isolate No	Polyethylene glycol concentration					Average
	0%	%10	%15	%20	%25	
Az6	0.880	0.660	0.440	0.380	0.270	**0.526**
Az2	0.770	0.680	0.610	0.540	0.310	**0.582**
Az7	0.700	0.670	0.620	0.580	0.320	**0.578**
Az15	0.730	0.680	0.540	0.530	0.450	**0.586**
Az10	0.740	0.660	0.540	0.490	0.310	**0.548**
Az19	0.730	0.660	0.590	0.520	0.380	**0.576**
Az1	0.670	0.660	0.600	0.410	0.330	**0.534**
Az3	0.690	0.560	0.400	0.400	0.310	**0.534**
Az14	0.820	0.720	0.510	0.350	0.180	**0.534**
Az9	0.840	0.720	0.360	0.320	0.180	**0.534**
L.S.D(0.05)	**0.058**					**0.026**
Average	0.757	0.667	0.521	0.452	0.304	
L.S.D(0.05)	**0.018**					

ومن هذه النتائج يتضح ان العزلات (B19 و B2) من عزلات بكتريا *Bacillus spp* و (Ps18 و Ps5) من عزلات بكتريا *Pseudomonas spp* و(Az15 و Az2) من عزلات بكتريا *Azotobacter spp* كانت العزلات الأكفأ في انتاج EPS وتم انتخابها لإجراءات اختبار قدرتها تحمل ظروف الجفاف لاحقاً .

تأثر إجمالي إنتاج EPS الذي تنتجه عزلات منتخبة بشكل كبير بإجهاد الجفاف. زاد إنتاج EPS مع زيادة إجهاد الجفاف مقارنة بالظروف غير المجهدة. أنتجت العزلة (Ps18) لبكتريا *Pseudomonas spp* أعلى كمية من EPS في ظل الاجهاد الملحي اذ بلغت (0.802)، تليها العزلة (Ps5) لبكتريا *Pseudomonas spp* بلغت (0.768) . بينما انتجت عزلات بكتريا *Bacillus spp* معدلات أقل من بكتريا *Pseudomonas spp* بلغت (0.730) للعزلتين (B19 و B2) . اما أقل معدل انتاج كان لبكتريا *Azotobacter spp* بلغت (0.586 و 0.582) للعزلات (Az15 و Az2) على التوالي . وتوافقت هذه النتائج مع (Yaseen *et al* ., 2020) .

وفقا (Lin *et al.* (2014، زاد تطور انتاج الكربوهيدرات خارج الخلية في ظل اجهادات بيئية مختلفة. وأشارت دراسة أجريت من قبل (Ghosh *et al.* (2019 عن زيادة في إنتاجية EPS مع زيادة مستويات اجهاد الجفاف في بكتريا *Bacillus spp* و *Pseudomonas spp* . (Lin *et al* ., 2014 ; Ghosh *et al*., 2019)

بينما أشار Tsegaye واخرون، (2019) الى أن عزلات EPS المنتجة لبعض سلالات البكتريا يمكن أن تنمو جيداً عند ظروف اجهاد مختلفة. وأشار Collins وMargesin ، (2019) أنهّ في ظل ظروف الإجهاد، تنتج الكائنات الحية الدقيقة EPS كواحدة من آليات الأستجابة للضغط لحماية خلاياها من الظروف الخارجية غير المواتية. يعمل EPS كحاجز انتشار بين جدار الخلية والبيئات القاسية ; 2019 , .(Collins & Margesin Tsegaye *et al* ., 2019)

4-5-4 التشخيص الكيموحيوي للعزلات الأكثر انتاجاً لـ EPS والمتحملة للجفاف

4-5-4-1 التشخيص الكيموحيوي للعزلات الأكثر انتاجاً لـ EPS والمتحملة للجفاف بكتريا *Bacillus spp*

عند إجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات بكتريا *Bacillus* المتحصل عليها في هذه الدراسة اتضح أن جميع العزلات كانت موجبة لصبغة غرام ومتحركة كما أنهّا سالبة لفحص الأوكسيديز و اليوريز، كما في جدول (3-7) .

إذ زرعت البكتريا على الوسط المغذي الصلب بعمل مكررين وبعد الحضن وجد تكون الأبواغ و هي ما يميز هذه البكتريا (Paul *et al*,. 2021).

تكون نتيجة اختبار *Bacillus spp* المزروعة إيجابية بالنسبة لإنزيم الكاتلاز في حالة استخدام الأوكسجين أو وجوده وتكون مكونة للأبواغ (Turnbull,1996) .

2-4-5-4 التشخيص الكيموحيوي للعزلات الأكثر انتاجاً لـ EPS والمتحملة للجفاف بكتريا *Pseudomonas spp*

عند إجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات بكتريا *Pseudomonas* المتحصل عليها في هذه الدراسة إتضح أن جميع العزلات كانت موجبة لاختباري الكاتاليز و الأوكسيديز وتوافق ذلك مع (Idowu *et al.*,2006) و سالبة لصبغة غرام ومتحركة كما أنّها موجبة لاختبار اليوريز و السترات وكذلك تبين في اختبار الحركة و تميع الجيلاتين و تخمر السكريات وانتاج H_2S موجبة، وكذلك النمو على وسط MacConkey agar medium وتغير لون الوسط يدل على انها موجبة . كما في جدول (3-7).

3-4-5-4 التشخيص الكيموحيوي للعزلات الأكثر انتاجاً لـ EPS والمتحملة للجفاف بكتريا *Azotobacter spp*

عند إجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات بكتريا *Azotobacter* المتحصل عليها في هذه الدراسة إتضح أن جميع العزلات كانت موجبة لاختباري الكاتاليز و الأوكسيديز وتوافقت هذه النتائج مع (Idowu *et al.*,2006) و سالبة لصبغة غرام ومتحركة كما أن لها القابلية على النمو في 1% من كل من NaCl وGlycerol وتتفق هذه النتائج مع ما حصل عليه (Sachin, 2009) بينما لم تتمكن من النمو في 0.1 % فينول إذ إن التراكيز العالية من الفينول تصبح مادة سامة لبعض أنواع جنس *Azotobacter* وتوافق ذلك مع (Revillas *et al* ., 2005) ولها القابلية على إنتاج الأندول . كما هو مبين في الجدول (3-7).

الجدول (4-7) الأختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا *Bacillus spp* ، *Pseudomonas spp* و *Azotobacter spp*

ت	الأختبار	*Bacillus spp* (B2 , B15)	*Pseudomonas spp* (Ps18 , Ps5)	*Azotobacter spp* (Az15 , Az2)
1	صبغة غرام	+	-	-
2	المظهر	عصوية الشكل	عصوية	مفردة أو ازواج أوبشكل سلاسل قصيرة
3	ظروف النمو	هوائية	هوائية	هوائية واختيارية لا هوائية
4	Catalase test	+	+	+
5	Oxidase test	-	+	+
6	Urease test	-	-	+
7	Indole test	-	+	+
8	Methyl Red	-	+	-
9	Kovac's	+	+	-
10	Citrate Test	+	+	+
11	إختبار الحركة	+	+	+
12	القابلية على تكوين صبغة السبورات	+	-	-
13	القابلية على النمو في 1% NaCl وGlycerol	n	n	+
14	القابلية على النمو في 0.1% فينول	n	n	+
15	Gelatin hydrolysis	+	+	+
16	^{o}C42-^{o}C4	n	+	n
17	Lactose	+	-	
18	H_2S	n	-	+
19	كلوكوز	+	+	+

(+):نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة , (n) لاتوجد نتيجة

شخصت ست عزلات بكتيرية كانت الأكثر انتاجا لـ EPS والأكثر تحملا للجفاف، حيث شخصت أربع عزلات (Ps18، Ps5، B15 ، B2) بجهاز الفايتك Vitek-2، و عزلتان بالأختبارات الكيموحيوية (Az15، Az2)

استنادا الى نتائج الفحص المجهري والفحوصات الكيموحيوية والرجوع إلى مصنف بيرجيز (Logan & Vose , 2009)، شخصت العزلات مثلما مبين في الجدول (3-8)

جدول (4- 8) تشخيص العزلات البكتيرية

ت	رمز العزلة	التشخيص
1	B2	*Bacillus subtillis*
2	B15	*BreviBacillus Choshinenensis*
3	Ps5	*Pseudomonas Putida*
4	Ps18	*Pseudomonas Fluresense*
5	Az2	*Azotobacter chroococcum1*
6	Az15	*Azotobacter chroococcum2*

4-6 تأثير العزلات البكتيرية في معدلات النتح لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف:

يبين الجدول (3 - 9) نتائج التحليل الأحصائي أنّه هناك فروقات معنوية بين العزلات البكتيرية على مستوى $p<0.05$ في زيادة معدلات نتح البادرات المعرضة لاجهاد الجفاف إذ تفوقت العزلة البكتيرية *Azotobacter*2 بإعطائها أعلى معدل للنتح (0.247 gm/ plant/ hour) و بنسبة زيادة بلغت (90%) مقارنة بالسيطرة (البادرات غير معرضة للجفاف) ويليها العزلة البكتيرية *Pseudomonas putida* نسبة زيادة للنتح بلغت (79 %).

يظهر الجدول نفسه انخفاض معنوي في قابلية بادرات الذرة الصفراء المعرضة للجفاف بزيادة مستويات الجفاف إذ انخفضت معدل النتح من (0.284) عند معاملة السيطرة الى (0.161) عند معاملة الري كل 72 ساعة و نسبة انخفاض بلغت (43.3 %).

والنتائج في الجدول توضح وجود تداخل معنوي ما بين اللقاح البكتيري ومستويات الجفاف فقد ارتفع معدل النتح للبادرات الملقحة بذورها بالعزلات البكتيرية وأعلى قيمة كانت (0.410) سجلت عند البادرات الملقحة ببكتيريا *Azotobacter chroococcum 2* والمروية كل 24 ساعة.

جدول (4 - 9) تأثير العزلات البكتيرية في دليل معدلات النتح لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف

معدلات النتح g/hour/plant				
العزلات / مستويات الجفاف	ريه كل 24 ساعة	ريه كل 48 ساعة	ريه كل 72 ساعة	معدل تاثير العزلات
Control	0.180	0.140	0.090	0.137
Bacillus subtilis	0.260	0.220	0.180	0.220
BreviBacillus	0.250	0.140	0.190	0.193
Pseudomonas putida	0.290	0.259	0.160	0.233
Pseudomonas fluresense	0.250	0.220	0.210	0.227
Azotobacter chroococcum 1	0.350	0.160	0.140	0.130
Azotobacter chroococcum 2	0.410	0.170	0.160	0.247
L.S.D (0.05)	**0.040**			**0.023**
معدل تأثير الجفاف	0.284	0.186	0.161	
L.S.D (0.05)	**0.015**			

اتفقت هذه النتائج مع دراسات سابقة و التي ذكرت أن بكتيريا *Azotobacter* التي يمكنها أن تلعب دورًا مهمًا في تعزيز نمو النبات بما في ذلك إنتاج منظمات النمو والحماية من مسببات الأمراض الجذرية وتعديل امتصاص النبات للمغذيات (Dey *et al.*, 2017) .

تشير بعض الدراسات إلى أن بعض البكتيريا يمكن أن تقلل بشكل غير مباشر من نتح النباتات من خلال تعزيز احتباس رطوبة التربة وامتصاص العناصر الغذائية. على سبيل المثال، أفاد (Zhao *et al.*,2017) أن تلقيح بكتيريا *Bacillus subtilis* قلل من النتح في نباتات القمح تحت الجفاف.

وجد Zlatev (2016) وجماعته أن الإجهاد الناتج عن الجفاف أدى إلى زيادة كبيرة في معدلات النتح في نباتات عباد الشمس. فالنباتات التي تتعرض لإجهاد الجفاف تزيد عادةً من معدلات النتح في محاولة لامتصاص الماء من التربة الجافة. ومع ذلك، يمكن أن يؤدي هذا إلى فقدان الماء والمزيد من الإجهاد. و يؤدي الجفاف إلى إجهاد مائي في نباتات الذرة الصفراء بسبب الأمداد المحدود بالمياه للجذور وزيادة معدلات النتح (Lisar *et al.*, 2012).

4-7 تأثير العزلات البكتيرية في قوة و حيوية البادرات الذرة تحت ظروف الجفاف:

يبين الجدول (3-10) تأثير نوع العزلات البكتيرية في حيوية البادرات و مقارنتها مع نتائج البادرات غير الملقحة بالبكتيريا و قد أوضحت النتائج الواردة في الجدول (3-11) بأنّ البكتيريا (2) *Azotobacter chroococcum* هي العزلة الأكثر تأثيراً في حيوية البادرات (0.253) وقد حققت

فروقاً معنوية مقارنة مع باقي العزلات الأخرى و تليها العزلة (1) *Azotobacter chroococcum* و نسبة زيادة في حيوية البادرات بلغت (84.6 %) و (51.9 %) لكل من عزلة *Azotobacter chroococcum* (2) و (1) *Azotobacter chroococcum* على التوالي مقارنة بحيوية البادرات غير ملقحة بالعزلات البكتيريا (السيطرة) .

كما أثرت مستويات الجفاف تأثيراً كبيراً في معدل حيوية البادرات إذ كانت (0.201) و (0.147) لكل من الري بعد 48 ، 72 ساعة لكل منهما مقارنة مع السيطرة التي كان معدل حيوية البادرات لها (0.194) بعد 24 ساعة من الري .

لوحظ من نتائج الجدول (3-10) ان الري بعد 72 ساعة هو الأكثر تأثيراً من الري بعد 48 ساعة ونسب انخفاض بلغت (23.3 %) من الري بعد72 ساعة مقارنة بالري بعد 24 ساعة .

كان التداخل ما بين العزلات البكتيرية و مستويات الجفاف بفارق احصائي و أعلى قيمة حيوية للبادرات سجلت عند المعاملة لبكتريا (2) *Azotobacter chroococcum* مع الري بعد (48 ساعة) في حين سجلت أقل قيمة (0.080) لحيوية البادرات في المعاملة (عدم تلقيح بالبكتيريا مع الري بعد 72 ساعة)

جدول (4-10) تأثير العزلات البكتيرية في دليل قوة و حيوية البادرات الذرة تحت ظروف الجفاف

قوة البادرات mgcm-1				
مستويات الجفاف / العزلات	ريه كل 24 ساعة	ريه كل 48 ساعة	ريه كل 72 ساعة	معدل تاثير العزلات
Control	0.170	0.160	0.080	0.137
Bacillus subtilis	0.190	0.180	070.1	0.180
brevi Bacillus	0.210	0.180	0.150	0.180
Pseudomonas putida	0.190	0.140	0.130	0.153
Pseudomonas fluresense	0.190	0.170	0.110	0.157
Azotobacter croccum1	0.260	0.240	0.120	0.207
Azotobacter croccum2	0.280	0.290	0.190	0.253
L.S.D (0.05)		**0.046**		**0.027**
معدل تأثير الجفاف	0.194	0.201	0.147	
L.S.D (0.05)		**0.018**		

أثبتت العديد من الدراسات التأثيرات الأيجابية للملقحات البكتيرية على قوة وحيوية بادرات الذرة الصفراء تحت ضغط الجفاف. حيث وجد Egamberdiyeva وجماعته (2002) أن التلقيح بالعزلات البكتيرية لـــ *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* أدى إلى تحسين الأنبات ونمو

الجذور وتحمل الإجهاد في بادرات الذرة في ظل ظروف الجفاف. وأظهر ان التلقيح باستخدام *Azotobacter chroococcum*و *Bacillus subtilis* أدى إلى تعزيز قوة البادرات ونمو الجذور وتحمل الجفاف في الذرة في ظل ظروف الإجهاد المائي (Yang *et al.*, 2014) .

وفي دراسة سابقة تبين التلقيح المشترك باستخدام *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* أدى إلى تحسين الأنبات ونمو شتلات الذرة وتحـــــــــمل لظل ظروف الجفاف (Zhang *et al.*, 2018).

4-8 تأثير العزلات البكتيرية في دليل شدة الإجهاد لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف:

بينت النتائج في الجدول (3-11) أنّ شدة الإجهاد للجفاف في بادرات الذرة المعرضة لمستويات جفاف مختلفة عند المعاملة بالعزلات البكتيرية الستة المختارة فقد كانت (0.817 الى 0.657)

لكل من العزلات *Bacillus subtilis*، *BreviBacillus* ، *Pseudomonas putida* ، *Pseudomonas fluresense*، *Azotobacter chroococcum* (1) ،*Azotobacter chroococcum* (2) على التوالي حيث سجلت أعلى شدة اجهاد في البادرات غير الملقحة (0.960) و سجلت أقل شدة اجهاد في البادرات الملقحة *Azotobacter chroococcum* (1) أما بالنسبة الى العزلات الخمس الباقية فقد خفضت شدة الإجهاد ولكن بشكل أقل من بكتيريا (*Azotobacter chroococcum* (1)) وحققت فارقاً احصائياً على باقي العزلات .

وبينت النتائج أنّ الإجهاد سبب زيادة معنوية في شدة الإجهاد بالمستويات (ري بعد 48 ساعة ، 72 ساعة) (0.721, 0.937) مقارنة بشدة الإجهاد للبادرات غير الملقحة (معاملة بالسيطرة، ري لكل 24 ساعة) حيث كانت القيمة (0.840) بزيادة بلغت 57.7 % عن البادرات غير مجهدة (0.594).

كما كان للتداخل أثر واضح في خفض شدة الإجهاد في البادرات فقد أعطت معاملة (التلقيح ببكتيريا 2 *Azotobacter chroococcum* مع الري 24 ساعة) أقل شدة اجهاد بلغت (0.310) وبنسبة انخفاض بلغت (63 %) و (72.32 %) عند مقارنتها مع البادرات غير المجهدة و البادرة المجهدة أعلى مستويات اجهاد الري بعد 72 ساعة.

جدول (4-11) العزلات البكتيرية في دليل شدة الإجهاد لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف

دليل شدة الإجهاد				
مستويات الجفاف / العزلات	ريه كل 24 ساعة	ريه كل 48 ساعة	ريه كل 72 ساعة	معدل تأثير العزلات
Control	0.840	0.920	1.120	0.960
Bacillus subtilis	0.790	0.750	0.910	0.817
BreviBacillus	0.550	0.710	0.920	0.727
Pseudomonas putida	0.670	0.710	0.950	0.777
Pseudomonas fluresense	0.420	0.619	0.970	0.667
Azotobacter chroococcum 1	0.580	0.660	0.720	0.653
Azotobacter chroococcum 2	0.310	0.690	0.970	0.657
L.S.D (0.05)		**0.078**		**0.045**
معدل تأثير الجفاف	0.594	0.721	0.937	
L.S.D (0.05)		**0.029**		

أن تلقيح نباتات الذرة بـ *Pseudomonas putida* تحت ظروف الإجهاد الناتج عن الجفاف إلى تحسين نسبة الوزن الطازج/الجاف ومحتوى المادة الجافة وإنتاج الحبوب مقارنة بغير الملقحة. حيث تمكنت *Pseudomonas putida*من إذابة كميات كبيرة من الفوسفات وتحسين قوة إنبات الشتلات تحت الإجهاد الناتج عن الجفاف (Kálmán *et al* ,. 2023) .

أن تلقيح نباتات الذرة بـ *Bacillus spp*. أظهرت انخفاضًا في علامات الإجهاد التأكسدي مثل مالونديالدهيد وبيروكسيد الهيدروجين في ظل ظروف الجفاف وبالتالي التقليل من شدة الإجهاد (Azeem *et al.*, 2023).

كشفت نتائج سابقة ان التلقيح بعزلات *Azotobacter spp* أكثر فعالية من حيث إذابة الفوسفات والبوتاسيوم وإنتاج siderophore مما أدى التلقيح إلى زيادة الوزن الجاف للبراعم وارتفاع النبات مقارنة بالنبات غير الملقحة . اذ زاد من الوزن الجاف للبراعم بشكل ملحوظ . (Shirinbayan *et al.*, 2019)

ركزت العديد من الدراسات السابقة على تحمل الجفاف بوساطة الميكروبات (Sandhya *et al.*, 2009)، وتوصلوا إلى استنتاج مفاده أن تلقيح الذرة بسلالة *Pseudomonas putida* أدى إلى تحسين نمو النبات وتحفيز مقاومة الجفاف واعطاء أقل شدة اجهاد .

تتوافق هذه النتائج مع النتائج الواردة في الدراسات السابقة (Pandey *et al.*, 2000 ; Hugh *et al.*, Richard 2003; Çakir, 2004)، والتي تنص على أن ارتفاع النبات والمادة الجافة للبراعم انخفضا مع تزايد شدة الإجهاد الناتج عن الجفاف وتوافقت أيضاً مع (Pervez *et al.*, 2004 ; Suralta

(*et al.*, 2010 ، حيث بناءً على المعايير الفينولوجية المسجلة في تجربة استفزاز الإجهاد الناتج عن الجفاف، وجد أن البكتيريا *Bacillus pumilus* و*Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas putida* تؤثر على السمات المدروسة بطرق متنوعة تحت إمداد مثالي بالمياه في بيئة مجهدة بالجفاف.

4-9 تأثير العزلات البكتيرية في دليل تحمل الإجهاد لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف :

أشارت النتائج في الجدول (3-12) حيث أظهرت نتائج التحليل الأحصائي أنّه هناك فروقات معنوية بين العزلات البكتيرية على مستوى $p<0.05$ في زيادة قابلية تحمل البادرات لاجهاد الجفاف إذ تفوقت العزلة البكتيرية 1 *Azotobacter chroococcum* بإعطائها أعلى معدل دليل تحمل (3.800) و بنسبة زيادة بلغت (107 %) مقارنة بالسيطرة (البادرات غير معرضة للجفاف) ويليها العزلة البكتيرية *Pseudomonas putida* نسبة زيادة قابلية التحمل بلغت (91 %).

يظهر الجدول نفسه انخفاض معنوي في قابلية تحمل بادرات الذرة الصفراء المعرضة للجفاف بزيادة مستوى الجفاف إذ انخفضت قابلية التحمل للجفاف من (2.700) عند معاملة السيطرة الى (2.414) عند معاملة الري كل 72 ساعة و نسبة انخفاض بلغت (10.59%).

اوضحت النتائج في الجدول توضح وجود تداخل معنوي ما بين اللقاح البكتيري ومستويات الجفاف فقد ارتفعت قابلية التحمل للبادرات الملقحة بذورها بالعزلات البكتيرية وأعلى قيمة لدليل التحمل (4.6) سجلت عند اللقاح البكتيري للعزلة البكتيرية (*Azotobacter chroococcum* 1) مع البادرات الملقحة بذورها والمروية لكل 48 ساعة .

جدول (4-12) تأثير العزلات البكتيرية في دليل تحمل الإجهاد لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف

دليل تحمل الإجهاد				
مستويات الجفاف / العزلات	**ريه كل 24 ساعة**	**ريه كل 48 ساعة**	**ريه كل 72 ساعة**	**معدل تأثير العزلات**
Control	2.100	2.400	1.000	1.833
Bacillus subtilis	3.000	3.600	2.400	3.000
BreviBacillus	2.300	3.100	2.200	2.533
Pseudomonas putida	3.400	4.100	3.000	3.500
Pseudomonas fluresense	2.300	2.400	2.100	2.267
Azotobacter chroococcum 1	4.400	4.600	2.400	3.800
Azotobacter chroococcum 2	2.000	2.000	1.500	1.833
L.S.D (0.05)	**0.472**			**0.273**
معدل تأثير الجفاف	2.700	2.971	2.414	
L.S.D (0.05)	**0.178**			

وجد ان بكتريا *B.Bacillus* تحفز نمو النبات و تزيد تحمل الجفاف من خلال طرق مباشرة و غير مباشرة مثل تخليق siderophore وزيادة الهرمونات النباتية و تحسين حافزية المغذيات و هذه النتائج تتفق مع دراسات سابقة و التي ذكرت بكتريا *B.subtillus* تزيد من تحمل الإجهاد المائي Fonseca *et al.*,2023) .

أثبتت العزلة *Bacillus subtilis* تفوقها في قدرتها على التعبير في نشاط مضادات الأكسدة وإمكانية مياه الأوراق ومحتوى الماء النسبي والتعبير الجيني المستجيب للجفاف و كانت العزلات البكتيرية جيدة في إفراز عديد السكاريد الخارجي و أظهرت أنّ تكوين الأغشية الحيوية حيث جميع هذه العوامل تزيد من قدرة البادرات الملقحة في تحمل ظروف الجفاف (Yasmeen *et al.*,2024).

وجدت بعض الدراسات أنّ تلقيح نبات أذان الفار *Arbidops.s* بكتيريا *B.subtillus* أدى الى تحسن تحمل اجهاد الجفاف المائي ، من خلال زيادة في نسخ وتنظيم الجينات المستحثة في الجفاف بسبب الإجهاد الناتج عن الجفاف بالنظر إلى هذه النتائج، فإنها يمكن استخدامها كلقاح حيوي يقلل بشكل فعال من الضرر الذي يلحق بالنباتات بسبب الإجهادات البيئية (Woo *et al.*,2020).

4-10 تأثير العزلات البكتيرية في استقرارية الغشاء البلازمي لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف:

يشير الجدول (3-13) الى نتائج التحليل الأحصائي أنّه هناك فروقات معنوية بين العزلات البكتيرية على مستوى $p<0.05$ في زيادة استقرارية الغشاء البلازمي للبادرات لإجهاد الجفاف إذ تفوقت العزلة البكتيرية 2 *Azotobacter chroococcum* بإعطائها أعلى استقرارية الغشاء البلازمي (57.643) و بنسبة زيادة بلغت (47.8%) مقارنة بالسيطرة (البادرات غير معرضة للجفاف) ويليها العزلة البكتيرية 1 *Azotobacter* نسبة زيادة استقرارية الغشاء البلازمي بلغت (45.6 %).

يظهر الجدول نفسه انخفاض معنوي في قابلية بادرات الذرة الصفراء المعرضة للجفاف بزيادة استقرارية الغشاء البلازمي إذ انخفضت قابلية التحمل للجفاف من (61.057) عند معاملة الري كل 72 الى (41.991) عند معاملة السيطرة و نسبة انخفاض بلغت (31.2 %).

اوضحت النتائج في الجدول وجود تداخل معنوي ما بين اللقاح البكتيري ومستويات الجفاف فقد ارتفعت استقرارية الغشاء البلازمي للبادرات الملقحة بذورها بالعزلات البكتيرية وأعلى قيمة استقرارية الغشاء البلازمي (83.000) سجلت عند اللقاح البكتيري للعزلة البكتيرية (*chroococcum* 2 *Azotobacter*) مع البادرات الملقحة بذورها والمروية لكل 72 ساعة .

الجدول (4-13) تأثير العزلات البكتيرية في دليل استقرارية الغشاء البلازمي لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف

استقرارية الغشاء البلازمي				
العزلات / مستويات الجفاف	ريه كل 24 ساعة	ريه كل 48 ساعة	ريه كل 72 ساعة	معدل تأثير العزلات
Control	30.630	34.170	52.130	38.977
Bacillus subtilis	62.730	39.000	40.000	47.243
BreviBacillus	32.770	39.630	55.430	42.610
Pseudomonas putida	36.030	40.300	57.580	44.637
Pseudomonas fluresense	45.140	52.180	71.330	56.217
Azotobacter chroococcum 1	44.140	58.270	67.930	56.780
Azotobacter chroococcum 2	42.500	47.430	83.000	57.643
L.S.D (0.05)	**3.349**			**1.934**
معدل تأثير الجفاف	41.991	44.426	61.057	
L.S.D (0.05)	**1.266**			

ان زيادة ضرر الغشاء مرتبط بتراكم مضادات الأكسدة الأنزيمية و اللا أنزيمية و ضرر الغشاء المتسبب من اجهاد الجفاف هو ناتج عن ضرر الإجهاد التاكسدي Oxidative stress و تسرب الأيونات هو أقل في البادرات الملقحة بذورها مقارنة بالبادرات غير الملقحة تحت ظروف الإجهاد و هذا يشير الى أنّ التلقيح بالعزلات البكتيرية أعطى تحملاً للنباتات أو البادرات تحت اجهاد الجفاف وقد تكون نفاذية اغشية أوراق البادرات الملقحة (Wang *et al.*,2013).

أظهرت أقل زيادة مقارنة بالبادرات المجهدة بالجفاف ونسب الضرر ازدادت حوالي (45 %) في البادرات غير المجهدة و علاقة الأرتباط الموجبة ما بين الإجهاد الجفافي و ضرر الغشاء لوحظت من قبل (Quan *et al.*,2004)، حيث لوحظ تسرب عالي (نسبة الضرر عالية) في نباتات الذرة المجهدة بالجفاف مقارنة بالسيطرة . وأنّ عزلات البكتريا في الدراسة الحآلية تعمل على تحفيز سحب المغذيات والعناصر من التربة ومن ضمنها البوتاسيوم حيث يعد البوتاسيوم مهمًا جدًا لتحمل الجفاف في النباتات من خلال مساهمته في إطالة الخلايا واستقرار الغشاء وتنشيط aquaporins وامتصاص الماء وتنظيم الثغور والتعديل الأسموزي (Wang *et al.*, 2013).

4-11 تأثير العزلات البكتيرية في الكلوروفيل لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف :

أجريت تجربة مختبرية باستخدام ست عزلات بكتيرية متحملة للجفاف ومنتجة لل EPS مستحث تحمل بادرات الذرة الصفراء للجفاف المستحث من خلال الري بعد 24، 48، 72 ساعة و بينت النتائج الموضحة في جدول (3-14) أنّ العزلات البكتيرية استطاعت أنّ تخفف الأضرار السلبية للجفاف بدلالة محتوى أوراق البادرات من صبغة الكلوروفيل إذ أوضحت النتائج المسجلة بعد 15 يوم امكانية العزلات البكتيرية في الحفاظ على محتوى الأوراق من صبغة الكلوروفيل و اشارت النتائج الى تفوق العزلة البكتيرية

Pseudomonas fluresense في الحفاظ على محتوى الكلوروفيل بل زيادة استقرارية الكلوروفيل بنسبة (32.5 %) مقارنة بمحتوى الكلوروفيل لبادرات السيطرة و نسبة الزيادة المتحققة من خلال تلقيح العزلات البكتيرية مؤكدة قدرة العزلات في زيادة من خلال التغلب على التأثيرات السلبية والحفاظ على محتوى الكلوروفيل فقد كان استقرارية الكلوروفيل (79.27) و (78.68) لعزلات (*Pseudomonas fluresense*) و (*Bacillus subtilis*) مقارنة مع معدل محتوى الأوراق للبادرات الخالية من اللقاح البكتيري و استطاع الإجهاد الجفاف من خفض محتوى أوراق البادرات من محتوى الكلوروفيل فقد كانت (67.44) الري بعد 72 ساعة قياسا مع الري بعد 24 ساعة و نسبة الأنخفاض كانت (9.76 %) و (16.19 %) لكل من الري بعد 48 و 72 ساعة على التوالي.

التداخل بين العزلات البكتيرية ومستوى الجفاف أكثر معنوي في معدل استقرارية الكلوروفيل البادرات وأعلى قيمة بلغت (86.110) عند التلقيح ببكتيريا *Azotobacter chroococcum*1 مع الري بعد 24 ساعة داخل محتوى الكلوروفيل بلغت (53.2) عند المعرضة للجفاف (الري بعد 72 ساعة وغير ملقحة بالبكتيريا) .

الجدول (4-14) تأثير العزلات البكتيرية في دليل الكلوروفيل لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف

دليل الكلوروفيل				
معدل تأثير العزلات	ريه كل 72 ساعة	ريه كل 48 ساعة	ريه كل 24 ساعة	مستويات الجفاف / العزلات
59.783	53.210	60.110	66.030	Control
78.683	75.650	79.710	80.690	*Bacillus subtilis*
75.267	69.950	71.830	84.020	*BreviBacillus*
75.670	71.610	74.710	80.690	*Pseudomonas putida*
79.270	72.550	81.620	83.640	*Pseudomonas fluresense*
74.030	68.540	71.350	82.200	*Azotobacter chroococcum 1*
71.927	60.620	69.050	86.110	*Azotobacter chroococcum 2*
2.726	**4.721**			**L.S.D (0.05)**
	67.447	72.626	80.483	معدل تأثير الجفاف
	1.784			**L.S.D (0.05)**

اجهاد الجفاف يقلل التخليق الحيوي لصبغات الكلوروفيل (محتوى الكلورفيل) و الذي ينتج عنه انخفاض مستوى معدلات البناء الضوئي (Mibei *et al.,* 2017) و محتوى كلوروفيل أوراق بادرات الذرة الصفراء انخفض بظروف الإجهاد في هذه الدراسة و زيادة الصبغات البناء الضوئي في بادرات الذرة الصفراء الملقحة بالعزلات البكتيرية ربما ناتج من تنشيط أو زيادة فعالية الأنزيمات الداخلة في مسارات التخليق الحيوي للكلوروفيل و محدودية انتتاج الجذور الحرة (Reactive oxegyne speices) أو زيادة ذوبانية و جاهزية المعادن العضوية مثل Mg & N (Khan & bano, 2016) .

ونتائج الدراسة تتفق مع نتائج دراسات سابقة بأنّ البكتيريا المحفزة لنمو النبات و منها *Bacillus spp.* بأن اضافتها تزيد محتوى الاوراق من الكلوروفيل لنباتات الذرة و هذا ناشيء عن زيادة تخليق الكلوروفيل و توازن المغذيات Nutrient balance. (Moreno-Galván *et al.,* 2020) وفي دراسة سابقة أدى التلقيح بعزلات ال *Azotobacter spp.* إلى زيادة محتوى الكلوروفيل والنيتروجين والفوسفور مقارنة مع غير الملقحة (Shirinbayan *et al.,* 2019) وهذا ايضاً يتفق مع الدراسة الحالية

12-4 تأثير العزلات البكتيرية في المحتوى الرطوبي للتربة لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف:

الجدول (3-15) يشير الى تأثير العزلات البكتيرية و مستويات الجفاف والتداخل بينهما في محتوى التربة الرطوبي لتربة التجربة حيث بين أنّ العزلات البكتيرية زادت من المحتوى الرطوبي للتربة وازداد محتوى التربة الرطوبي بشكل معنوي في جميع العزلات البكتيرية وسجلت العزلات (*Azotobacter chroococcum* 2, *Azotobacter chroococcum* 1, *Bacillus subtilis*) , 32.7 , 32.1 (33.8) على التوالي مقارنة بمحتوى التربة الرطوبي التي كانت (23.22) غير معاملة بالبكتيريا ونسب زيادة تقدر (45.84 %، 41.09 %، 38.4 %) على التوالي .

تبين من نتائج الجدول (3-16) أنّ محتوى التربة الرطوبي قد انخفض عند الري بعد كل 48 ساعة و 72 ساعة) و بشكل معنوي فقد كانت (27.37) و (22.19) على التوالي و نسبة انخفاض تقدر (% 37.7 و 45.5 %) على التوالي .

وكان التداخل بين مستويات الجفاف و العزلات البكتيرية قيد الدراسة أثر معنوي على محتوى رطوبي لتربة التجربة سجل عند المعاملة بالبكتيريا *Azotobacter chroococcum* 1 و ري كل 24 ساعة و أقل محتوى رطوبي قد سجل عند المعاملة بعدم التلقيح بالبكتيريا و ري بعد 72 ساعة.

الجدول (4-15) تأثير العزلات البكتيرية في دليل المحتوى المائي للتربة لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف

المحتوى المائي للتربة				
مستويات الجفاف / العزلات	ريه كل 24 ساعة	ريه كل 48 ساعة	ريه كل 72 ساعة	معدل تأثير العزلات
Control	31.240	20.190	18.240	23.223
Bacillus subtilis	46.130	28.110	27.370	33.870
BreviBacillus	36.200	22.130	20.090	26.140
Pseudomonas putida	39.090	25.810	23.310	29.403
Pseudomonas fluresense	40.150	23.390	22.140	28.560
Azotobacter chroococcum 1	48.170	29.010	21.120	32.767
Azotobacter chroococcum 2	44.320	29.010	23.110	32.147
L.S.D (0.05)	**2.260**			**1.305**
معدل تأثير الجفاف	40.757	25.379	22.197	
L.S.D (0.05)	**0.854**			

ذكر nasseem واخرون، (2024) أنّ تلقيح بذور نبات الذرة الصفراء و زراعتها في الترب المجهدة بالجفاف و غير مروية أنّ التلقيح بالعزلات البكتيرية *Bacillus* , *Pseudomonas* حسن نمو الذرة واحتفاظ التربة بالماء و ارتفاع محتوى التربة من المياه و الأوراق وزيادة وزن المجموع الجذري الخضري و المساحة الورقية و كذلك أشار الى انه بإمكان السلالات البكتيرية الأحتفاظ بمزيد من المياه في التربة لمدة أطول بالإضافة الى تفاعل مضادات الأكسدة و EPS معاً من أجل تحمل الجفاف . وكذلك أشار الى أن البادرات الملقحة بالعزلات البكتيرية أظهرت تحملا للجفاف و التربة الملقحة بالعزلات البكتيرية سجلت محتوى مائي أعلى من التربة الغير الملقحة .

المحتوى المائي النسبي للبادرات تأثر معنوياً بالترب الملقحة بالبكتيريا و أن رطوبة التربة التي تم الأحتفاظ بها لمدة أطول في الترب الملقحة بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة في ظروف الجفاف و غير الجفاف حيث إن الأحتفاظ بالمياه في التربة و امداد النباتات بشكل كافي من المياه مما يؤدي نموها بشكل أفضل من خفض شدة الإجهاد و دليل التحمل و قللت الضرر في الغشاء البلازمي و هذا يكون نتيجة عن زيادة أعداد البكتيريا في ترب التجربة وزيادة انتاج EPS و من ثم كبح التأثيرات السلبية لاجهاد الجفاف و تحسين نمو و تطور النباتات من خلال انتاج البرولين و الأحماض الأمينية و السكريات الذائبة و الأنزيمات و الذي ينتج امتصاص الماء للمغذيات من التربة . (Vardharajula *et al*,. 2011)

4-13 تأثير العزلات البكتيرية في المحتوى المائي للورقة لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف:

يشير الجدول (3-17) الى تأثير التلقيح بالعزلات البكتيرية في محتوى الأوراق الماء النسبي اذ كان محتوى الماء النسبي لأوراق البادرات غير الملقحة بالعزلات البكتيرية للسيطرة (66.92) . اما في أوراق البادرة التي تم تلقيح بذورها بالعزلات البكتيرية فقد ازداد محتوى الماء النسبي في جميع المعاملات حيث بلغ أقصاه (83.000) في أوراق البادرة الملقحة بذورها بالعزلة البكتيرية *Pseudomonas putida* وأدناه قد بلغ (71.026) في أوراق البادرات الملقحة بذورها بالعزلة *Brevi Bacillus* و التي اختلفت معنوياً عن عينة السيطرة .

ويبين الجدول نفسه ان الجفاف أثر معنوياً في محتوى الماء النسبي لأوراق البادرات اذ انخفض معنوياً و بشكل طردي مع زيادة مستويات الجفاف و صولاً الى اقل محتوى في معاملة الري كل 72 ساعة أي نسبة انخفاض عن السيطرة بقدر (52.4 %) .

تظهر النباتات المعرضة للجفاف انخفاض في المحتوى الماء النسبي و البكتريا المنتجة لل EPS تحافظ على محتوى الماء النسبي لأوراق نبات الذرة الصفراء بنسبة تراوحت 65-85 % وبكتيريا ال *Pseudomonas spp* سجلت قيم للـــــــ RWC اكبر من بكتيريا *.Bacillus spp*.

وكان التداخل مابين العزلات البكتيرية و مستويات الجفاف أثر معنوياً في محتوى الأوراق في الماء النسبي و أعلى نسبة سجلت (98.37) عند عدم معاملة البكتيريا *Pseudomonas putida* مع الري كل 48 ساعة في حين أقل محتوى ماء نسبي (52.170) سجل في المعاملة (عدم المعاملة بالبكتيريا) مع (الري بعد 72 ساعة) .

الجدول (4-16) تأثير العزلات البكتيرية في دليل المحتوى المائي للورقة لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف

المحتوى المائي للورقة				
مستويات الجفاف / العزلات	ريه كل 24 ساعة	ريه كل 48 ساعة	ريه كل 72 ساعة	معدل تأثير العزلات
Control	81.480	67.120	52.170	66.923
Bacillus subtilis	82.750	96.150	61.140	80.013
BreviBacillus	71.130	85.787	56.160	71.026
Pseudomonas putida	84.780	98.370	65.850	83.000
Pseudomonas fluresense	80.190	86.320	59.150	75.220
Azotobacter chroococcum 1	73.230	90.370	57.230	73.610
Azotobacter chroococcum 2	79.150	94.110	60.190	77.817
L.S.D (0.05)	**2.446**			**1.412**
معدل تأثير الجفاف	78.959	88.318	58.841	
L.S.D (0.05)	**0.924**			

تأثير مستويات الإجهاد المائي على قيم المحتوى المائي النسبي للأوراق حيث لوحظ عند استنزاف الماء زيادة في المحتوى المائي النسبي للأوراق و سجلت انخفاضاً معنوياً في قيم المحتوى المائي النسبي للنباتات المعرضة للإجهاد المائي . ويرجع سبب هذا الأنخفاض في المحتوى المائي النسبي للنباتات المعرضة للإجهاد المائي إلى عدم قدرة النبات على امتصاص الماء بسبب قلة رطوبة التربة مما يؤدي إلى انخفاض الضغط الانتفاخي (Turgor pressure) ونتح الخـــلايا النباتية. وتتفق هذه النتيجة مع (Fernández *et al.,* 2009 ; Kebede *et al.,* 2014) .

في دراسات سابقة بينت أن تلقيح نباتات الذرة ببكتيريا *Pseudomonas spp.* ادى الى تعزيز RWCلأوراق الذرة بشكل كبير في ظل ظروف الجفاف. اذ خففت *Pseudomonas spp.* المعزولة من منطقة الجذور لنبات Haloxylon ammodendron من إجهاد الجفاف من خلال تعزيزRWC (Das *et al.,*2024) .

وتتفق النتائج أيضاً مع (Yasmeen *et al.,* 2024) حيث أدى تلقيح نباتات الذرة ببكتيريا *Bacillus spp.*الى تعزيز RWC لأوراق الذرة بشكل كبير في ظل ظروف الجفاف حيث أظهرت *Bacillus subtilis* تحمل الجفاف وتعزيز RWC في نباتات الذرة في ظل ظروف الجفاف تعزز العزلات البكتيرية تحسين و الأحتفاظ لل RWC من خلال إنتاج سمات تعزز نمو النبات مثل -indole-3 acetic acid (IAA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase,

Exopolysaccharides, and phosphate solubilization حيث تساعد هذه السمات النباتات على إدارة امتصاص الماء والمغذيات بشكل أفضل في ظل ظروف الجفاف، مما يؤدي إلى التحسين RWC والنمو العام للنبات.

وتتفق النتائج مع (AL-Khazrj *et al.,* 2020) بأنّ التأثير الفعال لبكتيريا (*Azotobacter* ssp و *Pseudomonas ssp*) على المحتوى المائي النسبي في أوراق نبات الذرة، حيث يتضح أن قيم المحتوى المائي النسبي حققت أعلى متوسط عند إضافة الملقحات البكتيرية مقارنة بمعاملة السيطرة (Control) والتي سجلت انخفاضاً في المحتوى المائي للأوراق ، ويرجع ارتفاع المحتوى المائي النسبي في أوراق الذرة إلى دور البكتيريا في تحسين الحالة المائية للنبات عن طريق إفراز هرمونات تحفيز النمو مثل حمض الأندول الأسيتيك الذي يحفز نمو الجهاز الجذري للنبات (Dilfuza, 2011).

لوحظ أن التلقيح ببكتريا *Bacillus* عزز محتوى الماء النسبي (RWC) لأوراق النبات تحت إجهاد الجفاف. أدى التلقيح الفردي للسلالات البكتيرية إلى تعزيز طفيف في محتوى الماء النسبي للنباتات مقارنة بالبادرات غير ملقحة، والتي أظهرت انخفاضاً مع زيادة إجهاد الجفاف. أظهرت أوراق نباتات الذرة غير الملقحة زيادة كبيرة في تسربات الألكتروليت Electrolyte، بينما أظهرت النباتات المعاملة بالعزلات انخفاضاً في تسربات الألكتروليت (Agunbiade *et al.,* 2024).

ونبات الذرة الملقحة ببكتيريا *Pseudomonas putida* و المنتجة لـ EPS أظهرت محتوى ماء نسبي أعلى مقارنة بالسيطرة عن طريق تكوين تجمعات للتربة ومساعدة البكتيريا في الحفاظ على المحتوى الرطوبي للتربة بالأضافة الى حركة الماء عبر الجذور كما بين (Sandhya *et al,.*2010).

الأستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

5 - الأستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendation

5 - 1 الأستنتاجات :

نستنتج من الدراسة الحالية ما يلي :

1. الحصول على ثلاثة اجناس بكتيرية والمتمثلة لثلاثة أنواع بكتيرية (*Bacillus Pseudomona* , *Azotobacter*) منتجة لل EPS من خلال العزل و التشخيص من ترب مختلفة و متحملة للجفاف و تم استخدام العزلات الأكثر انتاجاً لل EPS وأكثر تحملاً للجفاف كلقاحات بكتيرية لنبات الذرة الصفراء .

2. كفاءة استعمال المخصب الحيوي البكتيري أدى الى تخفيف شدة الإجهاد في بادرات الذرة الصفراء وفي ظروف الإجهاد الجفافي من خلال زيادة كل من دليل التحمل، استقرارية الكلوروفيل وانخفاض شدة الإجهاد ونسبة الضرر الغشائي تحت ظروف الإجهاد الجفافي.

3. الإجهاد الجفافي قد أثرانخفاضا" سلبيا" وبصورة معنوية في انخفاض دليل التحمل و زيادة شدة الإجهاد وزيادة نسبة الضرر بالأغشية البلازمية واستقرارية الكلوروفيل.

4. تحسين صفات النمو لبادرات الذرة تحت ظروف الجفاف يعكس بان هذه العزلات البكتيرية هي من البكتريا المحفزة لنمو النبات بالإضافة الى تحسين قابلية PGBB على الأحتفاظ بالمياه من خلال انتاج EPS .

5. التقليل من التأثيرات السلبية لاجهاد الجفاف من خلال زيادة قوة البادرة و زيادة محتوى الكلوروفيل للأوراق و دليل التحمل و المحتوى المائي للأوراق بالإضافة الى خفض شدة الإجهاد و انخفاض نسبة الضرر في الغشاء البلازمي .

6. كشفت هذه الدراسة امكانية أخذ العزلات البكتيرية للبقاء على قيد الحياة تحت ظروف الجفاف وانتاج EPS و الذي يتفاعل مع النبات و الكشف على تحمل الجفاف في النباتات و الأحتفاظ بمياه التربة لفترة أطول .

7. يمكن أن يكون التلقيح باستخدام هذه العزلات استراتيجية فعالة للتحسين والحفاظ على المحتوى المائي للتربة و انتاج النباتات في المناطق الجافة .

5 – 2 التوصيات

بالأعتماد على النتائج التي تم التوصل إليها نوصي بما يلي :

1. اختيار كفاءة اللقاح البكتيري في زيادة نمو وتحمل أنواع أخرى من النباتات وتحت ظروف اجهاد جفافي طبيعي للتربة.
2. ضرورة اختيار كفاءة السلالات البكتيرية المنتجة للـ EPS والمتحملة للجفاف في تخفيف أنواع أخرى من الإجهادات مثل الإجهاد الملحي وتخفيف الأثار الضارة للمعادن الثقيلة في نمو وانتاجية النباتات كاستخدام المعالجة النباتية (Phytormidation).
3. اجراء تجارب حقلية لتقييم كفاءة العزلات البكتيرية في زيادة انتاجية النباتات تحت ظروف الإجهاد الجفافي.

المصادر

References

المصادر والمراجع
References

المصادر العربية :

الراشدي , راضي كاظم و تاج الدين , منذر ماجد .(1988). أحياء التربة المجهرية (العملي) . دار الحكمة – جامعة البصرة .

المصادر الأجنبية :

Abbasniayzare, S. K., Sedaghathoor, S., & Dahkaei, M. N. P. (2012). Effect of biofertilizer application on growth parameters of Spathiphyllum illusion. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, *12*(5), 669-673.

Abd-Alhamid, N., Hassan, H. S. A., Haggag, L. F., & Hassan, A. M. (2015). Effect of mineral and bio-fertilization on vegetative growth, leaf mineral contents and flowering of manzanillo olive trees. *Int. J. ChemTech Res*, *8*, 51-61..

Abdelaal, K., AlKahtani, M., Attia, K., Hafez, Y., Király, L., & Künstler, A. (2021). The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants. *Biology*, *10*(6), 520.

Abou-Dobara, M. I., El-Fallal, A. A., Toson, E., Abbas, A., & El-Feky, F. (2014). Optimization of Exopolysaccharides production by *Bacillus* subtilis. *Scientific Journal for Damietta Faculty of Science*, *3*(1), 11-21.

Adesulu, A. T., & Awojobi, K. O. (2014). Enhancing sustainable development through indigenous fermented food products in Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(12), 1338-1343.

Afzal, A., & Bano, A. (2008). *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (Triticum aestivum). *Int J Agric Biol*, *10*(1), 85-88.

Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, *26*(1), 1-20.

Akinsemolu, A. A. (2018). The role of microorganisms in achieving the sustainable development goals. *Journal of cleaner production*, *182*, 139-155.

Alabedin, S. S. Z., Mahdi, N. B., & Raoof, A. M. N. (2023). ROLE OF PLASMIDS IN THE MULTIPLE ANTIBIOTICS RESISTANCE OF E. COLI ISOLATED FROM THE URINE OF PATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTION IN KIRKUK CITY. *Open Access Repository*, *4*(02), 53-66.

Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC genomics*, *11*, 1-17.

Ali, I., He, L., Ullah, S., Quan, Z., Wei, S., Iqbal, A., ... & Ligeng, J. (2020). Biochar addition coupled with nitrogen fertilization impacts on soil quality, crop productivity, and nitrogen uptake under double-cropping system. *Food and Energy Security*, *9*(3), e208 .

Ali, S. Z., Sandhya, V., & Venkateswar Rao, L. (2014). Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. *Annals of microbiology*, *64*, 493-502.

Alori, E. T., Adekiya, A. O., & Adegbite, K. A. (2020). Impact of agricultural practices on soil health. *Soil Health*, 89-98.

Anckaert, A., Arguelles Arias, A., Hoff, G., Calonne-Salmon, M., Declerck, S., & Ongena, M. (2021). The use of *Bacillus spp*. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *50*(4), 1563-1589.

Argianas, A. (2015). Characterization of Exopolysaccharide (EPS) Produced by *Bacillus* subtilis Mutants.

Asadullah and A. Bano. 2018. Role of PGPR in the reclamationand revegetation of saline land. Pak. J. Bot., 51(1) DOI:10.30848/PJB2019-1(43

Ashraf, M. P. J. C., & Harris, P. J. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, *166*(1), 3-16.

Aslim, B., Yuksekdag, Z. N., & Beyatli, Y. (2002). Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. *Turkish Electronic*

Atlas, R. M., Brown, A. E., & Parks, L. C. (1995). *Experimental microbiology : laboratory manual*. Mosby.

Austin, D. A., Robertson, P. A. W., & Austin, B. (2003). Recovery of a new biogroup of Yersinia ruckeri from diseased rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). *Systematic and Applied Microbiology*, *26*(1), 127-131.

Azeem, M., Haider, M. Z., Javed, S., Saleem, M. H., & Alatawi, A. (2022). Drought stress amelioration in maize (Zea *mays* L.) by inoculation of *Bacillus spp*. strains under sterile soil conditions. *Agriculture*, *12*(1), 50.

Bakker, P. A. H. M., Weisbeek, P. J., & Schippers, B. (1986). The role of siderophores in plant growth stimulation by fluorescent *Pseudomonas spp*.

Bal, H. B., Nayak, L., Das, S., & Adhya, T. K. (2013). Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil*, *366*, 93-105.

Balíková, K., Vojtková, H., Duborská, E., Kim, H., Matúš, P., & Urík, M. (2022). Role of Exopolysaccharides of *Pseudomonas* in heavy metal removal and other remediation strategies. *Polymers*, *14*(20), 4253.

Bano, Q. U. D. S. I. A., Ilyas, N., Bano, A., Zafar, N. A. D. I. A., Akram, A. B. I. D. A., & Hassan, F. (2013). Effect of *Azospirillum* inoculation on maize *(Zea mays* L.) under drought stress. *Pak J Bot*, *45*(S1), 13-20.

Baron, E. J., Peterson, L. R., & Finegold, S. M. (1994). *Bailey & scott's diagnostic microbiology* (9th ed.). Mosby.

Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A. 2003. Cowan and Steel's manual for the identification of medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge University Press. Cambridge.

Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in agronomy*, *108*, 77-136.

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and soil*, *378*, 1-33.

Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, *13*(3), 1140.

Baweja, P., Kumar, S., & Kumar, G. (2020). Fertilizers and pesticides: Their impact on soil health and environment. *Soil health*, 265-285.

Bending, G. D., Turner, M. K., Rayns, F., Marx, M. C., & Wood, M. (2004). Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, *36*(11), 1785-1792.

Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, *84*(1), 11-18.

Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS microbiology ecology*, *93*(5), fix050.

Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Bhagat, N., Raghav, M., Dubey, S., & Bedi, N. (2021). Bacterial Exopolysaccharides : Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. *Journal of microbiology and biotechnology*, *31*(8), 1045.

Bhandary, T., & Alagesan, P. K. (2024). Assessment of bioactivity of the novel exopolysaccharide secreted by *Bacillus* subtilis isolated from the gut of marine anchovies. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, *12*(1), 205-212.

Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, *13*, 1-10.

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*, 1327-1350.

Bittencourt, P. P., Alves, A. F., Ferreira, M. B., da Silva Irineu, L. E. S., Pinto, V. B., & Olivares, F. L. (2023). Mechanisms and applications of bacterial inoculants in plant drought stress tolerance. *Microorganisms*, *11*(2), 502.

Bogati, K., & Walczak, M. (2022). The impact of drought stress on soil microbial community, enzyme activities and plants. *Agronomy*, *12*(1), 189.

Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B. I., Rodriguez-Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. (2013). Evolution of *Bacillus* thuringiensis Cry toxins insecticidal activity. *Microbial biotechnology*, *6*(1), 17-26.

Brennan, E. B., & Acosta-Martinez, V. (2018). Soil microbial biomass and enzyme data after six years of cover crop and compost treatments in organic vegetable production. *Data in Brief*, *21*, 212-227.

Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., & Moineau, S. (2003). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in Streptococcus thermophilus: a review. *Journal of dairy science*, *86*(2), 407-423.

Brown, A. E. (2007). Benson`s Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology.10thed.,P. 102-263. McGraw-Hill comp. Inc.,USA.

Bu, R., Ren, T., Lei, M., Liu, B., Li, X., Cong, R., ... & Lu, J. (2020). Tillage and straw-returning practices effect on soil dissolved organic matter, aggregate fraction and bacteria community under rice-rice-rapeseed rotation system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *287*, 106681.

Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., Hampel, M., & Okon, Y. (1998). Aggregation in *Azospirillum* brasilense: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiology*, *144*(7), 1989-1999.

Cania, B., Vestergaard, G., Krauss, M., Fliessbach, A., Schloter, M., & Schulz, S. (2019). A long-term field experiment demonstrates the influence of tillage on the bacterial potential to produce soil structure-stabilizing agents such as Exopolysaccharides and lipopolysaccharides. *Environmental Microbiome*, *14*(1), 1-14.

Cheng, L. (2015). *Biodiversity and function of ACC-deaminase producing bacteria associated with grass roots*. Rutgers The State University of New Jersey, School of Graduate Studies.

Chenu, C., & Roberson, E. B. (1996). Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharide as affected by water potential. *Soil Biology and Biochemistry*, *28*(7), 877-884.

Chenu, K. (2015). Characterizing the crop environment–nature, significance and applications. *Crop physiology*, 321-348.

Chieb, M., & Gachomo, E. W. (2023). The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. *BMC plant biology*, *23*(1), 407.

Chin-A-Woeng, T. F., Bloemberg, G. V., Mulders, I. H., Dekkers, L. C., & Lugtenberg, B. J. (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-

producing bacterium *Pseudomonas* chlororaphis PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular plant-microbe interactions*, *13*(12), 1340-1345.

Choudhary, D. K., Sharma, K. P., & Gaur, R. K. (2011). Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnology letters*, *33*, 1905-1910.

Chukwuneme, C. F., Babalola, O. O., Kutu, F. R., & Ojuederie, O. B. (2020). Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize. *Journal of Plant Interactions*, *15*(1), 93-105.

Cohn, F. (1872). Untersuchungen über Bakterien (Beitrage zur Biologie Pflauzen) . *Heft*, *2*, 1872.

Collee, J. G., Miles, R. S., & Watt, B. (1996). Tests for identification of bacteria. *Mackie and McCartney practical medical microbiology*, *14*, 131-49.

Collins, T., & Margesin, R. (2019). Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. Applied microbiology and biotechnology, 103, 2857-2871.

Cooksey, C. J. (2016). Quirks of dye nomenclature. 6. Malachite green. *Biotechnic & Histochemistry*, *91*(6), 438-444.

Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marion, B. P., & Swain, R. H. A. (1975). Medicinal microbiology, vol. II. *Churchill Livingstone, London*, *196*.

Dai, Q., Yan, B., Huang, S., Liu, X., Peng, S., Miranda, M. L. L., ... & Olszyk, D. M. (1997). Response of oxidative stress defense systems in rice (Oryza sativa) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiologia Plantarum*, *101*(2), 301-308.

Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B., & Kausar, R. (2016). Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *37*(1), 130-136.

Dar, A., Zahir, Z. A., Iqbal, M., Mehmood, A., Javed, A., Hussain, A., ... & Ahmad, M. (2021). Efficacy of rhizobacterial Exopolysaccharides in improving plant growth, physiology, and soil properties. *Environmental Monitoring and Assessment*, *193*, 1-15.

Das, K., Sau, S., Datta, P., & Sengupta, D. (2017). Influence of bio-fertilizer on guava (Psidium guajava L.) cultivation in gangetic alluvial plain of west bengal, India. *J. Exp. Biol. Agric. Sci.*, *5*, 476-482.

Dayeswari, D., Rayaprolu, S., & Jone, A. (2017). Effect of potting media on seed germination, seedling growth and vigour in TNAU Papaya Co. 8 (Carica papaya L.). *Int J Pure App Biosci*, *5*(3), 505-12.

de La Fuente Cantó, C., Simonin, M., King, E., Moulin, L., Bennett, M. J., Castrillo, G., & Laplaze, L. (2020). An extended root phenotype: the rhizosphere, its formation and impacts on plant fitness. *The Plant Journal*, *103*(3), 951-964.

Demidchik, V., & Maathuis, F. J. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*, *175*(3), 387-404.

Dey, R., Sarkar, K., Dutta, S., Murmu, S., & Mandal, N. (2017). Role of Azotobacter sp. isolates as a plant growth promoting agent and their antagonistic potentiality against soil borne pathogen (Rhizoctonia solani) under in vitro condition. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(11), 2830-2836.

Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P. I., Fall, D., Hocher, V., & Svistoonoff, S. (2020). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: Importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity*, *12*(10), 370.

Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of applied microbiology*, *99*(5), 1271-1281.

Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *106*, 85-125.

Egamberdiyeva, D., Juraeva, D., Gafurova, L., & Höflich, G. (2002, June). Promotion of plant growth of maize by plant growth promoting bacteria in different temperatures and soils. In Proceedings of 25th Annual Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture, Auburn, Alabama, USA (pp. 239-244).

Elkholy, A. I., Nour, M. A., Ali, H. M., & Soliman, S. A. (2023). Isolation and Identification of *Bacillus* subtilis for usage as probiotic bacteria. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 97-107.

Esipov, SE; Adanin, VM; Baskunov, BP; Kiprianova, EA; et al. (1975). "Novyĭ antibioticheski aktivnyĭ florogliutsid iz *Pseudomonas* aurantiaca" [New antibiotically active fluoroglucide from *Pseudomonas aurantiaca*]. *Antibiotiki* (in Russian). **20** (12): 1077–81.

Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2016). Co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria allows reduced application rates of N-fertilizer for rice plant. *Rhizosphere*, *2*, 5-12.

Evans, L. R., & Linker, A. (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of Pseudomonas aeruginosa. Journal of bacteriology, 116(2), 915-924.

Fasusi, O. A., Cruz, C., & Babalola, O. O. (2021). Agricultural sustainability: microbial biofertilizers in rhizosphere management. *Agriculture*, *11*(2), 163.

Fernández, J. E., Torres-Ruiz, J. M., Muriel, J. L., Romero, R., Martín-Palomo, M. J., Morales-Sillero, A., ... & Rubio-Casal, A. E. (2009, November). Influence of the soil water content and distribution on both the hydraulic and transpiration performance of'Manzanilla'olive trees. In VI International Symposium on Irrigation of Horticultural Crops 889 (pp. 323-330).

Fischer, R. A., & Maurer, R. (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research*, *29*(5), 897-912.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water science and technology*, *43*(6), 1-8.

Fonseca, M. D. C. D., Bossolani, J. W., de Oliveira, S. L., Moretti, L. G., Portugal, J. R., Scudeletti, D., ... & Crusciol, C. A. C. (2023). *Bacillus* subtilis inoculation improves nutrient uptake and physiological activity in sugarcane under drought stress. Microorganisms, 10(4), 809.

Foysal, M. J., & Lisa, A. K. (2018). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16*(2), 387-392.

Foysal, M. J., & Lisa, A. K. (2018). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16*(2), 387-392.

Fu, B., Chen, L., Huang, H., Qu, P., & Wei, Z. (2021). Impacts of crop residues on soil health: A review. *Environmental Pollutants and Bioavailability*, *33*(1), 164-173.

Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., & Hirsch, A. M. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS microbiology ecology*, *56*(2), 195-206 .

Gallant, A. J. E., Kiem, A. S., Verdon-Kidd, D. C., Stone, R. C., & Karoly, D. J. (2012). Understanding hydroclimate processes in the Murray-Darling Basin for natural resources management. *Hydrology and Earth System Sciences*, *16*(7), 2049-2068.

Gao, Y. J., Zhu, H. J., Chen, Y., Li, Y. H., Peng, Y. F., & Chen, X. P. (2018). Safety assessment of *Bacillus* thuringiensis insecticidal proteins Cry1C and Cry2A with a zebrafish embryotoxicity test. *Journal of agricultural and food chemistry*, *66*(17), 4336-4344.

Gauri, S. S., Mandal, S. M., & Pati, B. R. (2012). Impact of *Azotobacter* Exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, *95*, 331-338.

Ghosh, D., Gupta, A., & Mohapatra, S. (2019). A comparative analysis of exopolysaccharide and phytohormone secretions by four drought-tolerant rhizobacterial strains and their impact on osmotic-stress mitigation in Arabidopsis thaliana. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*, 1-15.

Ghosh, D., Gupta, A., & Mohapatra, S. (2019). A comparative analysis of exopolysaccharide and phytohormone secretions by four drought-tolerant rhizobacterial strains and their impact on osmotic-stress mitigation in Arabidopsis thaliana. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*, 1-15.

Gouda, S., Kerry, R. G., Samal, D., Mahapatra, G. P., Das, G., & Patra, J. K. (2018). Application of plant growth promoting rhizobacteria in agriculture. In *Advances in Microbial Biotechnology* (pp. 73-86). Apple Academic Press.

Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M. R., & Konradsen, F. (2007). The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC public health*, *7*, 1-15.

Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., ... & Valkoun, J. (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of experimental botany*, *60*(12), 3531-3544.

Gupta, A., Mishra, R., Rai, S., Bano, A., Pathak, N., Fujita, M., ... & Hasanuzzaman, M. (2022). Mechanistic insights of plant growth promoting bacteria mediated drought and salt stress tolerance in plants for sustainable agriculture. International Journal of Molecular Sciences, 23(7), 3741.

Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol*, *7*(2), 096-102.

Gutiérrez, M. E. M., Capalbo, D. M. F., de Oliveira Arruda, R., & de Oliveira Moraes, R. (2019). Bacillus thuringiensis. Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems: Biological Control and Functional Biodiversity, 245-259.

Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology*, *3*(4), 307-319.

Haggag, W. M., Abouziena, H. F., Abd-El-Kreem, F., & El Habbasha, S. (2015). Agriculture biotechnology for management of multiple biotic and abiotic environmental stress in crops. *J. Chem. Pharm. Res*, *7*(10), 882-889.

Harris, J. (2009). Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers?. *Science*, *325*(5940), 573-574.

Hashem, A., Tabassum, B., & Abd_Allah, E. F. (2019). *Bacillus* subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi journal of biological sciences*, *26*(6), 1291-1297.

Helmy, Q. ; Kardena, E. ; Nurachman, Z. and Wisjnuprapto.(2010). Application of Biosurfactant Produced by *Azotobacter* vinelandii AV01 for Enhanced Oil Recovery and Biodegradation of Oil Sludge. *International Journal of Civil and Environmental Engineering IJCEE.*, *10* (1):7-14.

Herbert, D., Phipps, P. J., & Strange, R. E. (1971). Chapter III chemical analysis of microbial cells. In *Methods in microbiology* (Vol. 5, pp. 209-344). Academic press.

Herter, S., Schmidt, M., Thompson, M. L., Mikolasch, A., & Schauer, F. (2011). Study of enzymatic properties of phenol oxidase from nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. *AMB express*, *1*, 1-14.

Hindersah, R., Mulyani, O., & Osok, R. (2017). Proliferation and exopolysaccharide production of*Azotobacter* in the presence of mercury. *Biodiversity Journal*, *8*(1), 21-26.

Hirsch, A. M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, *122*(2), 211-237.

Hirsch, A. M. (1999). Role of lectins (and rhizobial Exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current opinion in plant biology*, *2*(4), 320-326.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of determinate bacteriology.

Hua, G. K. H., Wang, L., Chen, J., & Ji, P. (2020). Biological control of Fusarium wilt on watermelon by fluorescent pseudomonads. *Biocontrol Science and Technology*, *30*(3), 212-227.

Hussey, M. A., & Zayaitz, A. (2007). Endospore stain protocol. *Am Soc Microbiol*, *8*, 1-11.

Husson, O., Sarthou, J. P., Bousset, L., Ratnadass, A., Schmidt, H. P., Kempf, J., ... & Lamichhane, J. R. (2021). Soil and plant health in relation to dynamic sustainment of Eh and pH homeostasis: A review. *Plant and Soil*, *466*(1), 391-447.

Idowu, A. B., Edema, M. O., & Adeyi, A. O. (2006). Distribution of bacteria and fungi in the earthworm Libyodrillus violaceous (Annelida: Oligochaeta), a native earthworm from Nigeria. Revista de biología tropical, 54(1), 49-58.

Ilyas, N., Mumtaz, K., Akhtar, N., Yasmin, H., Sayyed, R. Z., Khan, W., ... & Ali, Z. (2020). Exopolysaccharides producing bacteria for the amelioration of drought stress in wheat. *Sustainability*, *12*(21), 8876.

Isken, S., & de Bont, J. A. (1998). Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, *2*, 229-238.

Islam, M. Z., Sharif, D. I., & Hossain, M. A. (2008). A comparative study of *Azotobacter spp*. from different soil samples. *J Soil Nat*, *2*(3), 16-19.

Itelima, J. U., Bang, W. J., Onyimba, I. A., Sila, M. D., & Egbere, O. J. (2018). Bio-fertilizers as key player in enhancing soil fertility and crop productivity: A review.

Jabeen, S., Ali, M. F., Mohi ud Din, A., Javed, T., Mohammed, N. S., Chaudhari, S. K., ... & Rahimi, M. (2023). Phytochemical screening and allelopathic potential of phytoextracts of three invasive grass species. *Scientific Reports*, *13*(1), 8080.

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in plant science*, *8*, 292271.

Jayathilake, P. K. S., Reddy, I. P., Srihari, D., & Reddy, K. R. (2006). Productivity and soil fertility status as influenced by integrated use of N-fixing biofertilizers, organic manures and inorganic fertilizers in onion. *Journal of Agricultural Sciences–Sri Lanka*, *2*(1).

Jenkins, M. B., Virginia, R. A., & Jarrell, W. M. (1987). Rhizobial ecology of the woody legume mesquite (Prosopis glandulosa) in the Sonoran desert. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(1), 36-40.

Jha, P. N. (2015). Molecular identification and characterization of rhizospheric bacteria for plant growth promoting ability.

Jooste, M., Roets, F., Midgley, G. F., Oberlander, K. C., & Dreyer, L. L. (2019). Nitrogen-fixing bacteria and Oxalis–evidence for a vertically inherited bacterial symbiosis. *BMC Plant Biology*, *19*, 1-10.

Joseph, B., Patra, R. R., & Lawrence, R. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (Cicer arietinum L.). *International Journal of Plant Production*, *1*(2), 141-152.

Joshi, R. K., Bharat, S. S., & Mishra, R. (2020). Engineering drought tolerance in plants through CRISPR/Cas genome editing. *3 Biotech*, *10*(9), 400.

Kalam, S., Basu, A., & Podile, A. R. (2020). Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere. *Heliyon*, *6*(8).

Kálmán, C. D., Kálmán, L., Szél, S., Mórocz Salamon, K., Nagy, Z., Kiss, E., & Posta, K. (2023). Assessment of the influence of soil inoculation on changes in the adaptability of maize hybrids. Cereal Research Communications, 51(4), 1055-1071.

Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium Streptococcus phocae PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource technology*, *102*(7), 4827-4833.

Karimi, E., Aliasgharzad, N., Esfandiari, E., Hassanpouraghdam, M. B., Neu, T. R., Buscot, F., ... & Tarkka, M. T. (2022). Biofilm forming rhizobacteria affect the physiological and biochemical responses of wheat to drought. *AMB Express*, *12*(1), 93.

Kaur, H., Kaur, J., & Gera, R. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: a boon to agriculture. *Int J Cell Sci Biotechnol*, *5*, 17-22.

Kaushal, M., & Wani, S. P. (2016). Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Annals of Microbiology*, *66*, 35-42.

Kebede, H., Fisher, D. K., Sui, R., & Reddy, K. N. (2014). Irrigation methods and scheduling in the Delta region of Mississippi: Current status and strategies to improve irrigation efficiency. American Journal of Plant Sciences, 5(20), 2917.

Keen, E. C., Bliskovsky, V. V., Adhya, S. L., & Dantas, G. (2017). Draft genome sequence of the naturally competent *Bacillus* simplex strain WY10. *Genome Announcements*, *5*(46), 10-1128.

Khan, A. A., Rao, S. A., & McNeilly, T. (2003). Assessment of salinity tolerance based upon seedling root growth response functions in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, *131*, 81-89.

Khan, A., Wang, Z., Chen, Z., Bu, J., Adnan, M., & Zhang, M. (2021). Investigation of soil nutrients and associated rhizobacterial communities in different sugarcane genotypes in relation to sugar content. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *8*, 1-13.

Khan, M. B., Hussain, M., Raza, A., Farooq, S., & Jabran, K. (2015). Seed priming with CaCl2 and ridge planting for improved drought resistance in maize. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *39*(2), 193-203.

Khan, N., & Bano, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria and Ag-nano particle in the bioremediation of heavy metals and maize growth under municipal wastewater irrigation. *International Journal of Phytoremediation*, *18*(3), 211-221.

Khan, N., & Bano, A. (2019). Exopolysaccharide producing rhizobacteria and their impact on growth and drought tolerance of wheat grown under rainfed conditions. *PLoS one*, *14*(9), e0222302.

Khan, N., Bano, A., & Babar, M. A. (2017). The root growth of wheat plants, the water conservation and fertility status of sandy soils influenced by plant growth promoting rhizobacteria. *Symbiosis*, *72*, 195-205.

Khan, N., Bano, A., & Curá, J. A. (2020). Role of beneficial microorganisms and salicylic acid in improving rainfed agriculture and future food safety. *Microorganisms*, *8*(7), 1018.

Khan, N., Bano, A., & Zandi, P. (2018). Effects of exogenously applied plant growth regulators in combination with PGPR on the physiology and root

growth of chickpea (Cicer arietinum) and their role in drought tolerance. *Journal of plant interactions*, *13*(1), 239-247.

Khan, N., Bano, A., Rahman, M. A., Rathinasabapathi, B., & Babar, M. A. (2019). UPLC-HRMS-based untargeted metabolic profiling reveals changes in chickpea (Cicer arietinum) metabolome following long-term drought stress. *Plant, cell & environment*, *42*(1), 115-132.

Khoshru, B., Mitra, D., Khoshmanzar, E., Myo, E. M., Uniyal, N., Mahakur, B., ... & Rani, A. (2020). Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: an economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition*, *43*(20), 3062-3092.

Kim, M., & Han, M. (2011). Composition and distribution of bacteria in an operating rainwater harvesting tank. *Water Science and Technology*, *63*(7), 1524-1530.

Kimmel, S. A., & Roberts, R. F. (1998). Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by Lacto*Bacillus* delbrueckii ssp. bulgaricus RR. *International journal of food microbiology*, *40*(1-2), 87-92.

King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, *44*(2), 301-307.

King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, *44*(2), 301-307.

Kizilkaya, R. (2009). Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter spp*. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *J. Environ. Biol*, *30*(1), 73-82.

Kloepper, J. W. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proc. of the 4th Internet. Conf. on Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, 1978 (Vol. 2, pp. 879-882).

Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., & Roldán, A. (2008). Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional plant biology : FPB*, *35*(2), 141–151. https://doi.org/10.1071/FP07218.

Konnova, S. A., Brykova, O. S., Sachkova, O. A., Egorenkova, I. V., & Ignatov, V. V. (2001). Protective role of the polysaccharide-containing capsular components of *Azospirillum* brasilense. *Microbiology*, *70*, 436-440.

Kramer, P. J., & Boyer, J. S. (1995). *Water relations of plants and soils*. Academic press.

Krieg, N. R., & Holt, J. G. (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1. Williams and Wilkins. *Baltimore London*.

Krogh, P. H., Kostov, K., & Damgaard, C. F. (2020). The effect of Bt crops on soil invertebrates: a systematic review and quantitative meta-analysis. *Transgenic Research*, *29*(5), 487-498.

Kumar, A. (2016). Phosphate solubilizing bacteria in agriculture biotechnology: diversity, mechanism and their role in plant growth and crop yield. *Int. J. Adv. Res*, *4*(4), 116-124.

Kumar, M. A., Anandapandian, K. T. K., & Parthiban, K. (2011). Production and characterization of Exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming

marine bacterium. *Brazilian archives of biology and technology*, *54*, 259-265.

Kumar, V., & Pawar, K. (2018). A review on soil health and fertility management in organic agriculture through green manuring. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *7*(1S), 3213-3217.

Larson, D. L. (1995). Effects of climate on numbers of northern prairie wetlands. *Climatic Change*, *30*(2), 169-180.

Latif, M., Bukhari, S. A. H., Alrajhi, A. A., Alotaibi, F. S., Ahmad, M., Shahzad, A. N., ... & Mattar, M. A. (2022). Inducing drought tolerance in wheat through exopolysaccharide-producing rhizobacteria. *Agronomy*, *12*(5), 1140.

Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., Van Brussel, A. A., Carlson, R. W., & Kijne, J. W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium* leguminosarum binds host plant lectin. *Molecular microbiology*, *59*(6), 1704-1713.

Lazarte, J. N., Valacco, M. P., Moreno, S., Salerno, G. L., & Berón, C. M. (2021). Molecular characterization of a *Bacillus* thuringiensis strain from Argentina, toxic against Lepidoptera and Coleoptera, based on its whole-genome and Cry protein analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*, *183*, 107563.

Le Gall, S., Bérard, A., Page, D., Lanoe, L., Bertin, N., & Doussan, C. (2021). Increased exopolysaccharide production and microbial activity affect soil water retention and field performance of tomato under water deficit. *Rhizosphere*, *19*, 100408.

Leach, A. W., & Mumford, J. D. (2008). Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental pollution*, *151*(1), 139-147.

Li, C., Fu, X., Huang, Q., Luo, F., & You, L. (2015). Ultrasonic extraction and structural identification of polysaccharides from Prunella vulgaris and its antioxidant and antiproliferative activities. *European Food Research and Technology*, *240*, 49-60.

Li, Q., Bao, X., Lu, C., Zhang, X., Zhu, J., Jiang, Y., & Liang, W. (2012). Soil microbial food web responses to free-air ozone enrichment can depend on the ozone-tolerance of wheat cultivars. *Soil Biology and Biochemistry*, *47*, 27-35.

Lian, T., Mu, Y., Jin, J., Ma, Q., Cheng, Y., Cai, Z., & Nian, H. (2019). Impact of intercropping on the coupling between soil microbial community structure, activity, and nutrient-use efficiencies. *PeerJ*, *7*, e6412.

Lin, H., Chen, G., Long, D., & Chen, X. (2014). Responses of unsaturated *Pseudomonas* putida CZ1 biofilms to environmental stresses in relation to the EPS composition and surface morphology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*, 3081-3090.

Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M. (2012). Causes, effects and responses. Water stress, 25(1), 33.

Liu, J., Li, L., Peters, B. M., Li, B., Chen, D., Xu, Z., & Shirtliff, M. E. (2017). Complete genome sequence and bioinformatics analyses of *Bacillus* thuringiensis strain BM-BT15426. *Microbial pathogenesis*, *108*, 55-60.

Liu, R. C., Xiao, Z. Y., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., & Wu, Q. S. (2021). Mycorrhizal fungal diversity and its relationship with soil properties in Camellia oleifera. *Agriculture*, *11*(6), 470.

Liu, Z., Jiao, X., Lu, S., Zhu, C., Zhai, Y., & Guo, W. (2019). Effects of winter irrigation on soil salinity and jujube growth in arid regions. *PloS one*, *14*(6), e0218622.

Logan, N. A. (2009). *Bacillus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Nature.

Lugtenberg, B. J., Chin-A-Woeng, T. F., & Bloemberg, G. V. (2002). Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *81*, 373-383.

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, *63*(1), 541-556.

MacDonald, J. C. 1967. Pyocyanin in Antibiotec. Vol. 11, Springer-Verlag, New York. P. 52-65.

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria 3rd edition lippincott Williams and Williams.

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria, williams and wilkins. *Philadelphia, PA*, *113*(7).

Macfaddin, J. F. 1979. Biochemical tests for identification of medical bacteria, the Williams and Wilkins.

MacWilliams, M. P. (2012). Indole test protocol. *American Society for Microbiology, Washington, DC*.

Magdoff, F., & Van Es, H. (2021). *Building soils for better crops: Ecological management for healthy soils*. Sustainable Agriculture Research and Education Program.

Mali, G. V., & Bodhankar, M. G. (2009). Antifungal and phytohormone production potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from groundnut (Arachis hypogea L.) rhizosphere. *Asian J Exp Sci*, *23*(1), 293-7.

Marschner, H. (Ed.). (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press..

Martyniuk, S., & Martyniuk, M. (2003). Occurrence of *Azotobacter spp*. in some Polish soils. *Polish Journal of Environmental Studies*, *12*(3), 371-374.

Matthysse, A. G. (1983). Role of bacterial cellulose fibrils in Agrobacterium tumefaciens infection. *Journal of bacteriology*, *154*(2), 906-915.

Maylani, E. D., Yuniati, R., & Wardhana, W. (2020, July). The Effect of leaf surface character on the ability of water hyacinth, Eichhornia crassipes (Mart.) Solms. to transpire water. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 902, No. 1, p. 012070). IOP Publishing.

Medfu Tarekegn, M., Zewdu Salilih, F., & Ishetu, A. I. (2020). Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent Food & Agriculture*, *6*(1), 1783174.

Mibei, E. K., Ambuko, J., Giovannoni, J. J., Onyango, A. N., & Owino, W. O. (2017). Carotenoid profiling of the leaves of selected African eggplant accessions subjected to drought stress. Food Science & Nutrition, 5(1), 113-122.

Migula, W. (1894) Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* 1: 235–238.

Migula, W. (1900). *System der bakterien: Handbuch der morphologie, entwicklungsgeschichte und systematik der bakterien* (Vol. 2). Fischer.

Mitra, D., Djebaili, R., Pellegrini, M., Mahakur, B., Sarker, A., Chaudhary, P., ... & Mohapatra, P. K. D. (2021). Arbuscular mycorrhizal symbiosis: plant

growth improvement and induction of resistance under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition*, *44*(13), 1993-2028.

Mittelman, M. W., & Geesey, G. G. (1985). Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. *Applied and environmental microbiology*, *49*(4), 846-851.

Mitter, E. K., Tosi, M., Obregón, D., Dunfield, K. E., & Germida, J. J. (2021). Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: innovative biofertilizer technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*, 606815.

Morcillo, R. J., & Manzanera, M. (2021). The effects of plant-associated bacterial Exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. *Metabolites*, *11*(6), 337.

Moreno-Galván, A. E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., & Bonilla, R. R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. Applied Soil Ecology, 147, 103367.

Morrissey, J. P., Dow, J. M., Mark, G. L., & O'Gara, F. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture. *EMBO reports*, *5*(10), 922-926.

Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, *15*(1), A-3C.

Mrkovacki, N., & Milic, V. (2001). Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Annals of Microbiology*, *51*(2), 145-158.

Mubeen, M. U. H. A. M. M. A. D., Bano, A., Ali, B., Islam, Z. U., Ahmad, A., Hussain, S., ... & Nasim, W. (2021). Effect of plant growth promoting bacteria and drought on spring maize (*Zea mays* L.). *Pak. J. Bot*, *53*(2), 731-739 .

Munoz, R., Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. (2011). Release LTPs104 of the all-species living tree. *Systematic and applied microbiology*, *34*(3), 169.

Naseem, H., & Bano, A. (2014). Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*, *9*(1), 689-701.

Naseem, H., Ahsan, M., Shahid, M. A., & Khan, N. (2018). Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of basic microbiology*, *58*(12), 1009-1022.

Naseem, M., Chaudhry, A. N., Jilani, G., Alam, T., Naz, F., Ullah, R., ... & Zaman, S. (2024). Exopolysaccharide-producing bacterial cultures of *Bacillus* cereus and *Pseudomonas* aeruginosa in soil augment water retention and maize growth. *Heliyon*, *10*(4).

Nath Bhowmik, S., & Das, A. (2018). Biofertilizers: a sustainable approach for pulse production. *Legumes for soil health and sustainable management*, 445-485.

Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, *105*, 109-125.

Nielsen, P. H., & Jahn, A. (1999). Extraction of EPS. Microbial extracellular polymeric substances.

Nikolaidis, M., Hesketh, A., Mossialos, D., Iliopoulos, I., Oliver, S. G., & Amoutzias, G. D. (2022). A comparative analysis of the core proteomes within and among the *Bacillus* subtilis and *Bacillus* cereus evolutionary

groups reveals the patterns of lineage-and species-specific adaptations. *Microorganisms*, *10*(9), 1720.

Njira, K. O. W. (2013). Microbial Contributions in Alleviating Decline in Soil Fertility. *Microbiology Research Journal International*, *3*(4), 724–742.

Ojuederie, O. B., Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). Plant growth promoting rhizobacterial mitigation of drought stress in crop plants: implications for sustainable agriculture. *Agronomy*, *9*(11), 712.

O'Kelly, B. C. (2005). Method to compare water content values determined on the basis of different oven-drying temperatures. *Géotechnique*, *55*(4), 329-332.

Økstad, O. A., & Kolstø, A. B. (2010). Genomics of *Bacillus* species. In *Genomics of foodborne bacterial pathogens* (pp. 29-53). New York, NY: Springer New York.

Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2020). Succinic acid production as secondary metabolite from *Bacillus* megaterium ELI24. *The Natural Products Journal*, *10*(2), 153-157.

Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2021). Recent advancements for microorganisms and their natural compounds useful in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, *105*, 891-897.

Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2022). *Bacillus* thuringiensis based biopesticides for integrated crop management. In *Biopesticides* (pp. 1-6). Woodhead Publishing.

Padda, K. P., Puri, A., & Chanway, C. (2019). Endophytic nitrogen fixation–a possible 'hidden'source of nitrogen for lodgepole pine trees growing at unreclaimed gravel mining sites. *FEMS microbiology ecology*, *95*(11), fiz172.

Padda, K. P., Puri, A., & Chanway, C. P. (2018). Isolation and identification of endophytic diazotrophs from lodgepole pine trees growing at unreclaimed gravel mining pits in central interior British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, *48*(12), 1601-1606.

Page, W. J., & Shivprasad, S. (1991). *Azotobacter* salinestris sp. nov., a sodium-dependent, microaerophilic, and aeroadaptive nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *41*(3), 369-376.

Pal, S., Manna, A., & Paul, A. K. (1999). Production of poly (β-hydroxybutyric acid) and exopolysaccharide by *Azotobacter* beijerinckii WDN-01. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *15*, 11-16.

Palleroni, N. J. (2010). The *Pseudomonas* story. *Environmental microbiology*, *12*(6), 1377-1383.

Pan, H., Chen, M., Feng, H., Wei, M., Song, F., Lou, Y., ... & Zhuge, Y. (2020). Organic and inorganic fertilizers respectively drive bacterial and fungal community compositions in a fluvo-aquic soil in northern China. *Soil and Tillage Research*, *198*, 104540.

Pandey, R. K., Maranville, J. W., & Chetima, M. M. (2000). Deficit irrigation and nitrogen effects on maize in a Sahelian environment: II. Shoot growth, nitrogen uptake and water extraction. Agricultural water management, 46(1), 15-27.

Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *70*(11), 5607–5612. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332

Patel Priyanka, J., Trivedi Goral, R., Shah Rupal, K., & Saraf, M. (2019). Rhizospheric microflora: a natural alleviator of drought stress in

agricultural crops. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management: Volume 1: Rhizobacteria in Abiotic Stress Management*, 103-115.

Pathak, D. V., Kumar, M., & Rani, K. (2017). Biofertilizer application in horticultural crops. *Microorganisms for Green Revolution: Volume 1: Microbes for Sustainable Crop Production*, 215-227.

Paul, S. I., Rahman, M. M., Salam, M. A., Khan, M. A. R., & Islam, M. T. (2021). Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile Aeromonas septicemia in Labeo rohita. *Aquaculture*, *545*, 737156.

Paul, S. I., Rahman, M. M., Salam, M. A., Khan, M. A. R., & Islam, M. T. (2021). Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile Aeromonas septicemia in Labeo rohita. *Aquaculture*, *545*, 737156.

Paul, S., Parvez, S. S., Goswami, A., & Banik, A. (2024). Exopolysaccharides from agriculturally important microorganisms: conferring soil nutrient status and plant health. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129954.

Pawar, S. G., & Kamble, V. M. (2015). Evaluation of chlorophyll content and chlorophyll stability index of some antiallergenic medicinal plants. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*, *3*(1), 17-20.

Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., ... & Pei, Z. (2010). Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Applied and environmental microbiology*, *76*(12), 3886-3897.

Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R., & Nicolaus, B. (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of Exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*, *2011*(1), 693253.

Poveda, J. (2020). Use of plant-defense hormones against pathogen-diseases of postharvest fresh produce. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *111*, 101521.

Poveda, J., & González-Andrés, F. (2021). *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-17.

Prajapati, V. D., Jani, G. K., & Khanda, S. M. (2013). Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate polymers*, *95*(1), 540-549.

Prakash, J., & Mishra, S. (2022). Role of beneficial soil microbes in alleviating climatic stresses in plants. In *Microbiome Under Changing Climate* (pp. 29-68). Woodhead Publishing.

Prathap, M., & Bd, R.K. (2015). A Critical Review on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Pathology & Microbiology, 6*, 1-4.

Pršić, J., & Ongena, M. (2020). Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 594530.

Quan, R., Shang, M., Zhang, H., Zhao, Y., & Zhang, J. (2004). Improved chilling tolerance by transformation with betA gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize. Plant Science, 166(1), 141-149.

R Al-Abbasi, R. (2018). Quantification of exopolysaccharide produced by *Bacillus* subtilis and the effect of different factors on its production. *Rafidain Journal of Science*, *27*(1), 82-91.

Raghuwanshı, R. (2024). Prospects of Cropping with Polysaccharides Producing Microbes Under Drought Stress. *Research in Agricultural Sciences*, *55*(1), 2-10.

Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. Applied Soil Ecology, 138, 10-18.

Ramegowda, V., & Senthil-Kumar, M. (2015). The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of plant physiology*, *176*, 47-54..

Ramesh, A., Sharma, S. K., Sharma, M. P., Yadav, N., & Joshi, O. P. (2014). Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus* aryabhattai strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*, *73*, 87-96.

Ranganayaki, S., & Mohan, C. (1981). Effect of sodium molybdate on microbial fixation of nitrogen. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, *21*(8), 607-610.

Rani, M., Kaushik, P., Bhayana, S., & Kapoor, S. (2023). Impact of organic farming on soil health and nutritional quality of crops. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.

Ranjbar, S., Ahmadzadeh, M., & Mirzadi Gohari, A. (2021). Evaluation of eps E gene expression and the role of the exopolysaccharide of *Bacillus* amyloliquefaciens in the control of wheat take-all. *BioControl in Plant Protection*, *8*(2), 119-133.

Rasulov, B.A., Yili, A., & Aisa, H.A. (2013). Biosorption of Metal Ions by Exopolysaccharide Produced by *Azotobacter chroococcum* XU1. *Journal of Environmental Protection*, *2013*, 989-993.

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *21*(1), 49-68.

Revillas, J. J. ; Rodelas, B. ; Pozo, C. ; Martinez-Toledo, M. V. and Lopez J. G.(2005). Production of amino acids by Azotobacter vinelandii and Azotobacter chroococcum with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. Amino Acids, 28: 421–425.

Revillas, J. J., Rodelas, B., Pozo, C., Martínez-Toledo, M. V., & González-López, J. (2000). Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. *Journal of applied microbiology*, *89*(3), 486-493.

Roberson, E. B., & Firestone, M. K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and environmental microbiology*, *58*(4), 1284-1291.

Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., & Ruíz-Saínz, J. E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS microbiology letters*, *272*(2), 127-136.

Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2001). Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *The Plant Cell*, *13*(1), 11-29.

Saberi Riseh, R., Ebrahimi-Zarandi, M., Gholizadeh Vazvani, M., & Skorik, Y. A. (2021). Reducing drought stress in plants by encapsulating plant

growth-promoting bacteria with polysaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), 12979.

Sachin, N. D. (2009). Effect of Azotobacter chroococcum (PGPR) on the Growth of Bamboo (Bambusa bamboo) and Maize (Zea mays) Plants. Biofrontiers , 1(1): 24-31.

Saghafi, D., Delangiz, N., Lajayer, B. A., & Ghorbanpour, M. (2019). An overview on improvement of crop productivity in saline soils by halotolerant and halophilic PGPRs. *3 Biotech*, *9*(7), 261.

Salehizadeh, H., & Shojaosadati, S. A. (2003). Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus* firmus. *Water research*, *37*(17), 4231-4235.

Salsinha, Y. C. F., Indradewa, D., Purwestri, Y. A., & Rachmawati, D. (2020). Selection of drought-tolerant local rice cultivars from East Nusa Tenggara, Indonesia during vegetative stage. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *21*(1).

Salvetti, E., Harris, H. M., Felis, G. E., & O'Toole, P. W. (2018). Comparative genomics of the genus Lacto*Bacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(17), e00993-18.

Sánchez-León, E., Huang-Lin, E., Amils, R., & Abrusci, C. (2023). Production and Characterisation of an Exopolysaccharide by *Bacillus* amyloliquefaciens: Biotechnological Applications. *Polymers*, *15*(6), 1550.

Sandhya, V. S. K. Z., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas spp*. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant growth regulation*, *62*, 21-30.

Sandhya, V. Z. A. S., SK. Z, A., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. S. S. S. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the Exopolysaccharides producing Pseudomonas putida strain GAP-P45. *Biology and fertility of soils*, *46*, 17-26.

Sandhya, V., & Ali, S. Z. (2015). The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas* putida GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. *Microbiology*, *84*, 512-519.

Sansinenea, E. (2019). *Bacillus spp.*: As plant growth-promoting bacteria. *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications*, 225-237.

Sansinenea, E. (2021). Application of biofertilizers: Current worldwide status. In *Biofertilizers* (pp. 183-190). Woodhead Publishing.

Saribay, G. F. (2003). Growth and nitrogen fixation dynamics of Azotobacter chroococcum in nitrogen –free and OMW containing medium. Ms.C. Thesis. The graduate school of natural and applied sciences of the Middle East Technical University.

Sarkar, D., Rakshit, A., Al-Turki, A. I., Sayyed, R. Z., & Datta, R. (2021). Connecting bio-priming approach with integrated nutrient management for improved nutrient use efficiency in crop species. *Agriculture*, *11*(4), 372.

Sarwar, M. (2015). Biopesticides: an effective and environmental friendly insect-pests inhibitor line of action. *International Journal of Engineering and Advanced Research Technology*, *1*(2), 10-15.

Sathishkumar, R., Kannan, R., Jinendiran, S., Sivakumar, N., Selvakumar, G., & Shyamkumar, R. (2021). Production and characterization of exopolysaccharide from the sponge-associated *Bacillus* subtilis MKU

SERB2 and its in-vitro biological properties. *International journal of biological macromolecules*, *166*, 1471-1479.

Sati, D., Pande, V., & Samant, M. (2023). Isolation, and Characterization of Indigenous Rhizobacteria from Wheat (Triticum aestivum L.) and Determining their Drought Tolerance.

Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of applied microbiology*, *128*(6), 1583-1594.

Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & Antonius, S. (Eds.). (2019). *Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): prospects for sustainable agriculture*. Springer Singapore.

Sengupta, S., & Dey, S. (2019). Microbial exo-polysaccharides (EPS): role in agriculture and environment. *Agric Food*, *1*(12), 4-8.

Shakeel, M., Rais, A., Hassan, M. N., & Hafeez, F. Y. (2015). Root associated *Bacillus* sp. improves growth, yield and zinc translocation for basmati rice (Oryza sativa) varieties. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1286.

Shao, J., Li, Y., Li, Z., Xu, Z., Xun, W., Zhang, N., ... & Zhang, R. (2021). Participating mechanism of a major contributing gene ysnE for auxin biosynthesis in *Bacillus* amyloliquefaciens SQR9. *Journal of basic microbiology*, *61*(6), 569-575.

Sharma, P., & Abrol, V. (2012). Tillage effects on soil health and crop productivity: a review. *Crop Production Technologies*, 245-262.

Sharma, S., Villamor, J. G., & Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant physiology*, *157*(1), 292-304.

Shetty, K. G., Hetrick, B. A. D., & Schwab, A. P. (1995). Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. *Environmental Pollution*, *88*(3), 307-314.

Shirinbayan, S., Khosravi, H., & Malakouti, M. J. (2019). Alleviation of drought stress in maize (Zea mays) by inoculation with Azotobacter strains isolated from semi-arid regions. Applied soil ecology, 133, 138-145.

Silva, J. V., & Giller, K. E. (2020). Grand challenges for the 21st century: what crop models can and can't (yet) do. *The Journal of Agricultural Science*, *158*(10), 794-805.

Singh, B., Reddy, K. R., Redoña, E. D., & Walker, T. (2017). Screening of rice cultivars for morpho-physiological responses to early-season soil moisture stress. *Rice Science*, *24*(6), 322-335.

Singh, J. S., Koushal, S., Kumar, A., Vimal, S. R., & Gupta, V. K. (2016). Book review: microbial inoculants in sustainable agricultural productivity-Vol. II: functional application.

Skvortsov, I. M., & Ignatov, V. V. (1998). Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS microbiology letters*, *165*(2), 223-229.

Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

Sorokan, A., Veselova, S., Benkovskaya, G., & Maksimov, I. (2021). Endophytic strain *Bacillus* subtilis 26D increases levels of phytohormones and repairs growth of potato plants after Colorado potato beetle damage. *Plants*, *10*(5), 923.

Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, *38*, 401-419.

Spraker, J. E., Luu, G. T., & Sanchez, L. M. (2020). Imaging mass spectrometry for natural products discovery: a review of ionization methods. *Natural product reports*, *37*(2), 150-162.

Sreethu, S., Chhabra, V., Kaur, G., & Ali, B. (2024). Biofertilizers as a Greener Alternative for Increasing Soil Fertility and Improving Food Security Under Climate Change Condition. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 55(2), 261-285.

Steel, R.G.D., Torrie, J.H. and Dicky, D.A. (1997) Principles and Procedures of Statistics, A Biometrical Approach. 3rd Edition, McGraw Hill, Inc. Book Co., New York, 352-358.

Sun PingPing, S. P., Cui JianChao, C. J., Jia XiaoHui, J. X., & Wang WenHui, W. W. (2017). Isolation and characterization of *Bacillus* amyloliquefaciens L-1 for biocontrol of pear ring rot.

Suryawanshi, N., Naik, S., & Jujjawarapu, S. E. (2022). Exopolysaccharides and their applications in food processing industries. *Food Science and Applied Biotechnology*, *5*(1), 22-44.

Sutherland, I. W. (1972). Bacterial Exopolysaccharides. *Advances in microbial physiology*, *8*, 143-213.

Sutherland, I. W. (1977). Bacterial Exopolysaccharides-their nature and production, in. *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*, 27-96.

Szumigaj, J., ŻAKOWSKA, Z., & Klimek, L. (2008). Exopolysaccharide production by *Bacillus* strains colonizing packaging foils. *Polish journal of microbiology*, *57*(4), 281.

Tadesse, A. and Alem, M. (2006). Medical Bacteriology. EPHTI. PP. 433.

Tal, S., & Okon, Y. (1985). Production of the reserve material poly-β-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum* brasilense Cd. *Canadian journal of microbiology*, *31*(7), 608-613.

Talukder, S., Mamun, M. A. A., Hossain, M. S., Khan, M. A. R., Rahman, M. M., Talukder, M. R., ... & Biswas, J. C. (2022). Duration of low temperature changes physiological and biochemical attributes of rice seedling.

Tardy, V., Spor, A., Mathieu, O., Lévèque, J., Terrat, S., Plassart, P., ... & Maron, P. A. (2015). Shifts in microbial diversity through land use intensity as drivers of carbon mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *90*, 204-213.

Tejera, N. L. C. M. M. G. J., Lluch, C., Martinez-Toledo, M. V., & Gonzalez-Lopez, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and soil*, *270*, 223-232.

Tsegaye, Z., Gizaw, B., Tefera, G., Feleke, A., Chaniyalew, S., Alemu, T., & Assefa, F. (2019). Isolation and biochemical characterization of Plant Growth Promoting (PGP) bacteria colonizing the rhizosphere of Tef crop during the seedling stage. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, *3*(1), 013-027.

Turnbull, P. C. B. (1996). *Bacillus*: Barron's medical microbiology. *University of Texas Medical Branch*.

Upadhyaya, H. D., Wang, Y. H., Sastry, D. V., Dwivedi, S. L., Prasad, P. V., Burrell, A. M., ... & Klein, P. E. (2016). Association mapping of germinability and seedling vigor in sorghum under controlled low-temperature conditions. Genome, 59(2), 137-145.

VANHOOREN, P., & VANDAMME, E. J. (1998). Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial Exopolysaccharides. *Recent research developments in fermentation & bioengineering*, 253-300.

Vardharajula, S. (2014). Exopolysaccharide production by drought tolerant *Bacillus spp*. and effect on soil aggregation under drought stress. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *4*(1), 51.

Vardharajula, S., Zulfikar Ali, S., Grover, M., Reddy, G., & Bandi, V. (2011). Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus spp*.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, *6*(1), 1-14.

Vargas, L., Santa Brigida, A. B., Mota Filho, J. P., de Carvalho, T. G., Rojas, C. A., Vaneechoutte, D., ... & Hemerly, A. S. (2014). Drought tolerance conferred to sugarcane by association with Gluconacetobacter diazotrophicus: a transcriptomic view of hormone pathways. *PloS one*, *9*(12), e114744.

Vargas-Garcia, M. C., Lopez, M. J., Elorrieta, M. A., Suarez, F., & Moreno, J. (2003). Properties of polysaccharide produced by *Azotobacter* vinelandii cultured on 4-hydroxybenzoic acid. *Journal of applied microbiology*, *94*(3), 388-395.

Vargas-García, M. C., López, M. J., Elorrieta, M. A., Suárez, F., & Moreno, J. (2002). Physiology of exopolysaccharide production by *Azotobacter*

vinelandii from 4-hydroxybenzoic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *29*(3), 129-133.

Varshikar, D., & Tan, F. C. (2017). Salt and drought stress affects electron transport chain genes in rice. *Int. J. Adv. Appl. Sci*, *4*, 106-110.

Vázquez, M. M., César, S., Azcón, R., & Barea, J. M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum* , *Pseudomonas*, Trichoderma) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology*, *15*(3), 261-272.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, *21*(5), 573.

Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, *255*, 571-586.

Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, *184*, 13-24.

War Nongkhlaw, F. M., & Joshi, S. R. (2014). Epiphytic and endophytic bacteria that promote growth of ethnomedicinal plants in the subtropical forests of Meghalaya, India. *Revista de Biología Tropical*, *62*(4), 1295-1308.

Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS microbiology reviews*, *24*(3), 263-290.

Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J. F., Ferrer, A., & Peigné, J. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*, *34*(1), 1-20.

Williams, A., & Wimpenny, J. W. T. (1978). Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in continuous culture. *Microbiology*, *104*(1), 47-57.

Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H. C. (1999). *What are bacterial extracellular polymeric substances?* (pp. 1-19). Springer Berlin Heidelberg.

Wong, C. K. F., & Teh, C. Y. (2021). Impact of Biofertilizers on Horticultural Crops. *Biofertilizers: Study and Impact*, 39-103.

Woo, O. G., Kim, H., Kim, J. S., Keum, H. L., Lee, K. C., Sul, W. J., & Lee, J. H. (2020). *Bacillus* subtilis strain GOT9 confers enhanced tolerance to drought and salt stresses in Arabidopsis thaliana and Brassica campestris. Plant Physiology and Biochemistry, 148, 359-367.

Wu, Q. S., Srivastava, A. K., & Zou, Y. N. (2013). AMF-induced tolerance to drought stress in citrus: a review. *Scientia Horticulturae*, *164*, 77-87.

Xie, G., Su, B., & Cui, Z. (1998). Isolation and identification of N2-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. *Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica*, *38*(6), 480-483.

Xu, D., & Coˆte, J. C. (2003). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3′ end 16S rDNA and 5′ end 16S–23S ITS nucleotide sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *53*(3), 695-704.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., ... & Arakawa, M. (1992). Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology*, *36*(12), 1251-1275.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. nov.: proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and immunology*, *39*(11), 897-904.

Yakimovich, A. (2019). mSphere of influence: the rise of artificial intelligence in infection biology. *Msphere*, *4*(3), 10-1128.

Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, *14*(1), 1-4.

Yang, N., Nesme, J., Røder, H. L., Li, X., Zuo, Z., Petersen, M., ... & Sørensen, S. J. (2021). Emergent bacterial community properties induce enhanced drought tolerance in Arabidopsis. *npj Biofilms and Microbiomes*, *7*(1), 82.

Yang, W. S., Noh, J. H., Jeon, N. J., Kim, Y. C., Ryu, S., Seo, J., & Seok, S. I. (2015). High-performance photovoltaic perovskite layers fabricated through intramolecular exchange. *Science*, *348*(6240), 1234-1237.

Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Glöckner, F. O., & Rosselló-Móra, R. (2010). Update of the All-Species Living Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Systematic and applied microbiology*, *33*(6), 291-299.

Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzeby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. (2008). The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and applied microbiology*, *31*(4), 241-250.

Yaseen, R., Hegab, R., Kenawey, M., & Eissa, D. (2020). Effect of super absorbent polymer and bio fertilization on Maize productivity and soil fertility under drought stress conditions. *Egyptian Journal of Soil Science*, *60*(4), 377-395.

Yasmeen, T., Arif, M. S., Tariq, M., Akhtar, S., Syrish, A., Haidar, W., ... & Ali, S. (2024). Biofilm producing plant growth promoting bacteria in combination with glycine betaine uplift drought stress tolerance of maize plant. Frontiers in Plant Science, 15, 1327552.

Yousuf, J., Thajudeen, J., Rahiman, M., Krishnankutty, S., P. Alikunj, A., & A. Abdulla, M. H. (2017). Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. *Journal of basic microbiology*, *57*(11), 922-932.

Yu, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Liao, M., Li, B., Rong, X., ... & Zhang, Z. (2023). The genetic and phenotypic diversity of *Bacillus spp*. from the mariculture system in China and their potential function against pathogenic Vibrio. *Marine Drugs*, *21*(4), 228.

Zahir, Z. A., Munir, A., Asghar, H. N., Shaharoona, B., & Arshad, M. (2008). Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (Pisum sativum) under drought conditions. *J Microbiol Biotechnol*, *18*(5), 958-963.

Zaied, K. A., Abd El-Hady, A. H., Sharief, A. E., Ashour, E. H., & Nassef, M. A. (2007). Effect of horizontal DNA transfer in *Azospirillum* and *Azotobacter* strains on biological and biochemical traits of non-legume plants. *Journal of Applied Sciences Research*, *3*(1), 73-86.

Zambrano-Mendoza, J. L., Sangoquiza-Caiza, C. A., Campaña-Cruz, D. F., & Yánez-Guzmán, C. F. (2021). Use of biofertilizers in agricultural production. *Technology in agriculture*, *193*.

Zhang, C., Bengio, S., Hardt, M., Recht, B., & Vinyals, O. (2021). Understanding deep learning (still) requires rethinking generalization. *Communications of the ACM*, *64*(3), 107-115.

Zhang, P., Fang, F., Chen, Y. P., Shen, Y., Zhang, W., Yang, J. X., ... & Yan, P. (2014). Composition of EPS fractions from suspended sludge and biofilm and their roles in microbial cell aggregation. Chemosphere, 117, 59-65.

Zhao, M., & Running, S. W. (2010). Drought-induced reduction in global terrestrial net primary production from 2000 through 2009. *science*, *329*(5994), 940-943.

Zhgun, A., Avdanina, D., Shumikhin, K., Simonenko, N., Lyubavskaya, E., Volkov, I., & Ivanov, V. (2020). Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery. PLoS One, 15(4), e0230591.

Zhu, G. Y., Dobbelaere, S., & Vanderleyden, J. (2002). Use of green fluorescent protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum* irakense and A. brasilense. *Functional plant biology*, *29*(11), 1279-1285.

Summary

The study was conducted in the graduate studies laboratory at the College of Science, University of Karbala, and in the Ministry of Technological Sciences - General Authority for Research, with the aim of preparing a bacterial vaccine from some bacterial species that promote plant growth bacteria (PGPB).

The study included two main axes:

The first axis: Isolating 60 local bacterial isolates from soils suffering from drought and water scarcity. It included a series of experiments to diagnose the isolates morphologically and microscopically. It diagnosed 20 bacterial isolates from the following genera: Bacillus, Pseudomonas, Azotobacter. It also studied the ability of these genera to produce extracellular polysaccharide. All isolates produced sugar in varying proportions. 10 isolates from each genera were selected, and the most productive of extracellular polysaccharide were selected.

A study of the tolerance of the most productive bacterial isolates to levels of drought induced using concentrations of (25, 20, 15, 10, 0)% of 600 (peg-600) Polyethylene glycol. It selected two isolates from each genera that were the most productive of extracellular polysaccharide and drought tolerance. Biochemical tests were performed on the six isolates selected in the study and the following were diagnosed:

(Bacillus subtilli, BreviBacillus Choshinenensi, Pseudomonas Putida, Pseudomonas Fluresense, Azotobacter chroococcum1, Azotobacter chroococcum2) and the diagnosis was confirmed using Vitek-2 and API20 for the first isolates.

Second axis: Using the six diagnosed isolates in alleviating drought stress through a series of the following experiments where yellow corn seeds were soaked. *Zea mays* L. was inoculated with the bacterial filtrate of the six isolates under study for 24 hours. A factorial experiment was carried out according to a RandomizedcompleteDesign (RC) design to study the effect of bacterial isolates in improving the tolerance of yellow corn seedlings to drought stress conditions induced by different irrigation periods every (24, 48, 72) hours. They were grown in Growth chambers

under standard growth conditions of temperature and light intensity for 15 days. The results showed that: The use of bacterial isolates caused a significant increase in the drought tolerance index for unstressed yellow corn seedlings (irrigation every 24 hours) from 2.100 to 3.0), 2.3, 3.4, 2.3, 4.4, and stressed (irrigation every 48 hours) rose to (3.6, 3.1, 4.1, 2.4, 4.6) for each of the isolates Bacillus subtilis, BreviBacillus, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluresense, Azotobacter chroococcum1, respectively.

The isolates significantly affected the increase in the chlorophyll content of the leaves, as it increased from 66.03 in the leaves of unstressed seedlings to (86.11, 82.20, 83.64, 80.69, 84.02،80.69) for the isolates Bacillus subtilis, BreviBacillus, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluresense, Azotobacter1 chroococcum, Azotobacter chroococcum 2, respectively.

The isolates significantly affected the reduction in the severity of stress and the percentage of plasma membrane damage, and the percentage of decrease was recorded at 32% and 31.5% compared to the treatment with bacteria for the isolates Azotobacter1 chroococcum, Azotobacter chroococcum 2, respectively.

The isolates had a significant effect in increasing the soil moisture content and the highest moisture content of 33.070 was achieved by treatment with Bacillus subtilis.

Drought had a significant effect on most of the studied indicators and caused a significant increase in the stress intensity and the percentage of damage to the plasma membrane from (0.594) (41.991) respectively from non-stressed seedlings to (61.05) (0.937) in seedlings exposed to stress (irrigation every 72 hours) and a decrease in the seedling leaf content and chlorophyll stability from (80.438) to (67.447) and a decrease in the tolerance index from (2.7) to (2.41) and by a percentage of (9.7% and 8.93%) respectively.

The interaction between each of the bacterial isolates and the levels of drought had a significant effect on most of the studied characteristic.

University of Kerbala

College of Science

Department of Biology

study of the effect of exopolysaccharide produced by the plant growth promoting bacteria in alleviation of water stress in *Zea mays* L. plants

A thesis

Submitted to the council of the College of Science – University of Kerbala

In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology

By

Karar Kadhum Hashim

Kerbala University . college of science department of biology 2007

Supervised by

Assist Professor
Dr. Khalid Ali Hussein

Professor
Dr. Najeh Hashem Khadhum

Augest - 2024 A.D

Safar - 1446 A.H