نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد پنجم، شماره سوم، ۱۳۹٤
http://ejsms.gau.ac.ir

بررسی برخی ویژگی‌های افزاینده رشدی جدایه‌های باکتریایی به‌دست آمده از کودهای جانوری و شناسایی جدایه‌های برگزیده

الهام نورزاده‌روشن[1]، *رضا قربانی‌نصرآبادی[2]، مجتبی بارانی‌مطلق[2] و احد یامچی[3]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [2]استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [3]استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۹

چکیده

سابقه و هدف: رشد گیاهان در خاک‌های کشاورزی وابسته به فاکتورهای زیستی بسیاری می‌باشد. باکتری‌های افزاینده رشد گیاه از راه‌های مستقیم و غیرمستقیم می‌توانند مایه افزایش رشد و عملکرد در گیاهان زراعی شود. کاهش پیامدهای ناخواسته بهره‌گیری بیش از اندازه نهاده‌های کودی و رسیدن به سطح پایدار و مطلوب تولید از اهداف کشاورزی پایدار است. بهره‌گیری از ریزجانداران به‌دلیل بهبود حاصلخیزی خاک و جذب عناصر غذایی، منجر به افزایش رشد و عملکرد گیاهان و بهبود سلامت خاک می‌شود. هدف از این پژوهش جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها از کودهای جانوری، ارزیابی ویژگی‌های افزاینده رشدی گیاه آن‌ها و شناسایی جدایه‌های برگزیده بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش برای شناسایی ویژگی‌های افزاینده رشد باکتری‌ها، از ده نمونه کود جانوری سرزمین‌های گوناگون، ۲۷ جدایه در محیط NBRIP جامد بر پایه پیدایش هاله، تندی رشد و ویژگی‌های مورفولوژیک، خالص‌سازی شدند و سپس از دیدگاه ویژگی‌های PGP شامل توان ساخت اکسین، سیدروفور، HCN، حل کردن فسفات‌های نامحلول و تراوش آنزیم‌های پروتئاز، سلولاز، آلفا آمیلاز و فیتاز ارزیابی شد و در پایان جدایه‌های برگزیده بر پایه 16S rRNA شناسایی شدند.

یافته‌ها: از میان جدایه‌های بررسی شده جدایه شماره ۷ با آزادسازی ۱۳/۳ و ۳۷۳ میلی‌گرم در لیتر فسفر از فسفات آلومینیوم و تری‌کلسیم‌فسفات بیش‌ترین توان انحلال فسفات‌های نامحلول را نشان دادند. همبستگی منفی معنی‌داری ($r= -۰/۸۶, P\leq ۰/۰۱$) میان توان انحلال تری‌کلسیم فسفات و pH وجود داشت. همچنین جدایه ۲۱ بیش‌ترین میزان اکسین را به اندازه ۵۲/۸ میلی‌گرم در لیتر فراوری نمود. تنها جدایه‌های ۵۳ و ۳۰ توان ساخت HCN را دارا بودند. از مجموع ۲۷ جدایه باکتریایی بررسی شده تنها سه جدایه توان تراوش هر سه آنزیم پروتئاز، آلفا آمیلاز و کربوکسی متیل سلولاز را فرآوری نموده و جدایه ۴۹ بیش‌ترین هاله را در اندازه‌گیری هر سه آنزیم نشان داد. سنجش فعالیت فیتاز برون یاخته‌ای نشان داد که تنها ۶ جدایه توان ساخت این آنزیم هستند. آنالیز توالی‌های 16S rRNA جدایه‌های برگزیده نشان داد که جدایه‌های یاد شده همانندی بسیاری به باکتری‌های جنس‌های *Enterobacter*، *Sphingobium* و *Serratia* داشتند. تنها یکی از سه جدایه برگزیده هاله اندکی در محیط CAS-agar پدید آورد و دو جدایه دیگر بدون توان ساخت سیدروفور بودند.

* مسئول مکاتبه: rgnasr@yahoo.com

نتیجه‌گیری: ویژگی‌های افزاینده رشدی گیاه در جدایه‌های باکتریایی بررسی شده در این پژوهش نشان داد که برخی از جدایه‌ها توانایی بهره‌گیری بالقوه به‌عنوان باکتری افزاینده رشد گیاه را دارا می‌باشند. آن دسته از جدایه‌های توانمند در ساخت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و سلولاز نه تنها دارای توانایی بهره‌گیری در بخش کشاورزی هستند بلکه وابسته به اهمیت این دسته از آنزیم‌ها به‌ویژه پروتئاز و آمیلاز در صنعت می‌توانند از این نظر نیز مورد بررسی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: تری‌کلسیم فسفات، فسفات آلومینیوم، اکسین، فیتاز، افزاینده رشد گیاه

مقدمه

ریزوسفر جایگاهی است که برهمکنش‌های میان خاک، گیاهان و ریزجانداران در آن رخ می‌دهد. انواع ریزوباکتری‌هایی که بر روی رشد و کارکرد گیاه پیامد سودمند دارند را ریزوباکتری‌های افزاینده رشد گیاه (PGPR) می‌نامند. مهم‌ترین باکتری‌های محرک رشد گیاه شامل جنس‌های *Azospirillum*، *Pseudomonas*، *Enterobacter*، *Serratia*، *Bacillus* و *Arthrobacter* و قارچ‌های *Piriformospora* و *Trichoderma* و انواع دیگری از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (۹). راه‌های مستقیم پیامد آن‌ها بر رشد گیاه مانند ساخت فیتوهورمون‌ها، یونوفورها، افزایش دسترسی گیاه به فسفر از راه تجزیه آنزیمی و غیرآنزیمی فسفات‌های نامحلول آلی و معدنی، گسترش سیستم ریشه‌ای، فعالیت‌های آنزیمی چون ACC- دآمیناز و ساخت ریزوبیتوکسین برای کاهش پیامدهای زیان‌بار اتیلن استرسی و افزایش گره‌زایی و در پایان تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی به اثبات رسیده است (۳). روش غیرمستقیم کارکرد باکتری‌های PGPR استفاده از این باکتری‌ها در بیوکنترل عوامل بیمارگر گیاهی می‌باشد. از گروه سازوکارهای بازدارندگی این باکتری‌ها می‌توان ساخت متابولیت‌های ثانویه هم‌چون HCN را نام برد. HCN ساخته شده، سیستم تنفسی قارچ‌های بیماریزا را مختل نموده و از این راه مایه ایست رشد و فعالیت آن‌ها می‌شود (۵، ۴۶). سیدروفورها ترکیب‌های آلی با وزن مولکولی کم و لیگاندهای شیمیایی با توان ترکیبی بالا و ویژه برای پیوند شدن با آهن III هستند. کارایی باکتری‌های سازنده سیدروفورهای میکروبی در افزایش رشد گیاه می‌تواند به گونه غیرمستقیم و از راه بیوکنترل عوامل بیمارگر گیاهی و یا افزایش مستقیم رشد گیاه از راه افزایش جذب آهن در گیاه باشد (۳۲). هورمون‌های گیاهی کارایی مهمی در کنترل رشد و گسترش اندام‌های گیاهی دارند (۴۰). اکسین از مهم‌ترین هماهنگ‌کننده‌های رشد گیاه است. ایندول استیک اسید (IAA) از مهم‌ترین گونه‌های اکسین است که ساخت آن در گونه‌های باکتری‌های ریزوسفری گزارش شده است. IAA هم مایه افزایش درازی یاخته‌های گیاهی و هم مایه انگیزش تقسیم یاخته‌ای و تمایز در گیاه می‌شود (۱۱). خاک دارای دامنه گسترده‌ای از مواد آلی است که می‌تواند همانند یک منبع فسفر بهره‌گیری شود. برای این‌که فسفر آلی به ریخت فراهم برای جذب گیاه درآید باید در آغاز از راه آبکافت و هیدرولیز مواد آلی به ریخت کانی دگرگون گردد. کانی شدن بیش‌تر ترکیب‌های آلی فسفره با آنزیم‌های فسفاتاز انجام می‌پذیرد (۳۹). فیتات (میواینوزیتول هگزاکیس فسفات) از ریخت‌های مهم ترکیبات فسفاته می‌باشد که نزدیک ۸۰ درصد از فسفر کل در دانه غلات، لگوم‌ها و دانه‌های روغنی را می‌سازد (۱۹). فیتازها آنزیم‌هایی هستند که گروه‌های فسفر اینوزیتول هگزافسفات را آبکافت کرده و مایه

آزادسازی فسفر در محلول خاک و افزایش جذب فسفر در گیاه می‌گردند (۴۳). ریزجانداران حل‌کننده فسفات که گروه گسترده‌ای از ریزجانداران خاک را پدید می‌آورند با ساخت اسیدهای معدنی و آلی و ساخت آنزیم‌های فیتاز و فسفاتاز باعث انحلال فسفات‌های آلی و معدنی می‌شوند. شمار فراوانی از جانداران دست‌کم دارای دو گونه از آنزیم‌های فسفو مونو استراز، فسفاتازهای اسیدی و قلیایی، می‌باشند که دارای دامنه سوبسترایی گسترده‌ای هستند (۲۳). یکی از راه‌های به‌دست آوردن ریزجاندارانی با توانمندی‌های متفاوت و یا ویژگی‌های نوین، جداسازی آن‌ها از محیط‌هایی به‌جز اکوسیستم خاک است. بنابراین هدف از این پژوهش جداسازی و غربالگری جدایه‌های باکتریایی از کودهای جانوری و سنجش ویژگی‌های محرک رشدی مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها و در نهایت شناسایی جدایه‌های منتخبی بود که از توانمندی مطلوبی در آزادسازی فسفر از فسفات‌های معدنی نامحلول، تجزیه فیتات و نیز تولید اکسین برخوردار بودند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: برای جداسازی باکترهای حل‌کننده فسفات ده نمونه کود جانوری (مرغی، گاوی و گوسفندی) با رعایت اصول نمونه‌برداری میکروبی برداشته و فوری به آزمایشگاه رسانده شد.

جداسازی و ناب‌سازی براساس تولید هاله در محیط دارای منبع فسفر آلی (فیتات): برای جداسازی، در آغاز ۱۰ گرم از نمونه برداشته و در ۹۰ میلی‌لیتر آب سترون ریخته و برای ۳۰ دقیقه بر روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه گذاشته شد. پس از تکان دادن، آمیخته را برای ۱۰ دقیقه به حال سکون گذاشته و یک میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و به لوله آزمایش دارای ۹ میلی‌لیتر آب، افزوده و سری رقت‌ها، برای کشت بر روی محیط جامد آماده شد. برای جداسازی از رقت‌های 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} بر روی محیط جامد NBRIP[1] (۱۰ Glucose، ۵ $MgCl_2$، ۰/۲۵ $MgSO_4$، ۰/۲ KCl، ۰/۱ $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵ $CaCl_2$، ۱۵ Agar، ۵ Sodium phytate) (همه واحدها گرم بر لیتر می‌باشد) مایه‌زنی نموده و در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس خوابانیده شدند (۳۴). کلنی‌هایی که در پیرامون آن‌ها هاله پدید آمده و از دیدگاه ریخت‌شناسی ناهمانند بودند برای جداسازی و بررسی بیش‌تر برگزیده شدند.

آزمون پیدایش هاله: آزمون پیدایش هاله با بهره‌گیری از جدایه‌هایی که به روش یادشده جداسازی شدند، انجام گرفت، جدایه‌ها را در محیط پیش کشت رشد داده و سپس ۱۰ میکرولیتر از هر جدایه بر روی محیط جامد NBRIP ریخته و برای ۹۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوباسیون شده و قطر هاله به کلنی آن‌ها اندازه‌گیری شد. جدایه‌هایی که هاله پدید آوردند برای بررسی بیش‌تر گزینش و نگهداری شدند.

اندازه‌گیری کمی توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول (تری‌کلسیم فسفات و فسفات‌آلومینیوم): توانایی کمی انحلال فسفات‌های معدنی (تری‌کلسیم فسفات و فسفات آلومینیوم) جدایه‌های خالص‌سازی شده در محیط NBRIP مایع دارای ۲ گرم تری‌کلسیم فسفات یا ۱ گرم فسفات آلومینیوم اندازه‌گیری شد. برای این کار در آغاز جدایه‌ها را در محیط پیش‌کشت (نوترینت براث) مایه‌زنی کرده و برای ۴۸ ساعت بر روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرماگذاری نموده و سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط پیش‌کشت را به محیط NBRIP مایع مایه‌زنی نموده و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت، ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت را برداشته و سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور

1- National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium

در ۵ دقیقه) کرده، pH و فسفر آزاد شده در محلول رویی اندازه‌گیری شد. بعد از سانتریفیوژ ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر از معرف آمونیوم‌مولیبدات‌وانادات مخلوط و در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید

اندازه‌گیری توان ساخت اکسین: برای اندازه‌گیری توان ساخت اکسین جدایه‌های باکتریایی در آغاز آن‌ها را در محیط نوترینت براث (NB) کشت داده و پس از ۲۴ ساعت ازکشت جدایه‌های باکتریایی را در محیط تریپتون سوی براث (TSB) دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ال- تریپتوفان مایه‌زنی و برای ۴۸ ساعت شیک نموده و سپس ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت را برداشته و برای ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر از معرف سالکووسکی (۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ۷/۵ میلی‌لیتر $FeCl_3$) آمیخته نموده و برای ۲۰ دقیقه در دمای محیط گذاشته و در پایان نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد.

ساخت سیانید هیدروژن: برای اندازه‌گیری توانمندی ساخت سیانید هیدروژن در آغاز جدایه‌ها را در پلیت‌های دارای محیط کشت TSA غنی‌شده با گلایسین (۴/۴ گرم بر لیتر) کشت داده و سپس کاغذ صافی خیسانده شده در پیکرات سدیم (پیکریک اسید ۰/۵٪ و کربنات سدیم ۲٪) در بخش درونی پلیت گذاشته و پیرامون درب پلیت با نوار پارافیلم به خوبی بسته شد. پلیت‌ها برای ۱۲۰ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند و در پایان توانایی ساخت هیدروژن سیانید از راه دگرگونی رنگ در کاغذ صافی ارزیابی گردید (۱۴).

اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان ساخت آنزیم آلفا- آمیلاز: توان ساخت آنزیم α- آمیلاز به روش لی و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی پیدایش هاله انجام شد (۲۴). در این روش جدایه‌ها را بر روی محیط جامد حاوی (Starch، ۱٪؛ Glucose، ۰/۴٪، Yeast extract، ۰/۴٪ و Agar، ۱/۵٪) کشت داده و در دمای ۲۹ درجه سلسیوس برای سه روز در انکوباتور نگهداری شدند. برای دیدن توانایی پیدایش هاله نیز بعد از سه روز محیط را با محلول ایودین رنگ‌آمیزی کرده و جدایه‌هایی که در پیرامون کلنی آن‌ها، هاله پدید آمده بود به‌عنوان جدایه‌های توانمند در ساخت آنزیم α- آمیلاز شناسایی شد.

اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان ساخت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز: اندازه‌گیری توان ساخت آنزیم سلولاز در محیط مندل- ریس دارای کربوکسیل متیل سلولز (CMC) به‌عنوان تنها منبع کربن، انجام شد (۲۸). جدایه‌ها بر روی محیط CMC آگار دارای ۰/۴ گرم KH_2PO_4، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2$، ۰/۰۲ گرم NaCl، ۰/۰۲ گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۲/۵ گرم CMC و ۱۵ گرم آگار کشت داده شدند (۲۴). سپس پلیت‌ها برای ۱۰ روز در دمای ۲۹ درجه سلسیوس در انکوباتور خوابانیده شده و بعد از پایان زمان انکوباسیون برای بررسی پیدایش هاله در جدایه‌ها، پلیت‌ها را با محلول کنگورد (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) برای ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی کرده و سپس با NaCl یک نرمال پلیت را شسته و برای ۱۵ دقیقه این محلول بر روی پلیت نگهداری گردید. دوباره پلیت‌ها شسته شده و توان ایجاد هاله در جدایه‌ها بررسی گردید.

اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان ساخت آنزیم پروتئاز: برای این کار جدایه‌های برگزیده را به روش مورفر و همکاران (۱۹۹۵) بر روی محیط اسکیم میلک آگار دارای (Skim milk، ۵ گرم؛ Yeast extract، ۵ گرم؛ Blood agar، ۴ گرم و Agar ۱۴ گرم) کشت داده و برای ۴۸ ساعت در دمای ۲۹ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند (۲۷). سپس پیدایش هاله در

پیرامون کلنی همانند شناسه ساخت آنزیم پروتئاز آزمایش شد.

شناسایی جدایه‌های برگزیده: سه جدایه بر پایه ساخت بیش‌ترین مقادیر آنزیم فیتاز برون‌یاخته‌ای (جدایه ۱۳، حاصل از کود گاوی)، انحلال تری کلسیم فسفات و فسفات آلومینیوم (جدایه ۷، حاصل از کود گاوی) و IAA (جدایه ۲۱، حاصل از کود گوسفندی) همانند جدایه‌های برگزیده مورد شناسایی قرار گرفتند. در آغاز جدایه‌ها را در محیط پیش کشت LB در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت رشد داده و سپس آن‌ها را سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور برای ۱۰ دقیقه) نموده و پلت یاخته‌ای آن‌ها گردآوری گردید. استخراج DNA با بهره‌گیری از کیت (Qiagen DNeasy blood and tissue kit) انجام گردید. پرایمرهای یونیورسال 27f (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) و 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC) بهره‌گیری شد. آمیخته واکنش شامل ۲ میکرولیتر dNTP (۲/۵ میکرومول)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر DNA و ۰/۱ میکرولیتر Taq پلیمراز و حجم پایانی آن با آب دیونیزه سترون به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برای فراوان‌سازی DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۹۵ درجه سلسیوس و برای ۴ دقیقه آغاز و پس از آن ۳۵ چرخه فراوان‌سازی شامل دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۹۵ ثانیه انجام شد. در پایان نیز ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای تکمیل پایانی سنتز DNA نگه داشته شدند.

آزمون نیمه‌کمی توان ساخت سیدروفور: این آزمون تنها برای سه جدایه منتخب انجام گردید. برای آماده کردن محیط کشت CAS-Agar بر پایه روش بهبودیافته الکساندر و زوبرر (۱۹۹۱) چهار محلول (کاز آمینواسید، محلول غذایی، محلول معرف CAS-Fe، محلول بافر) به گونه جداگانه آماده و سترون شد (۲). سپس برای ساخت محلول پایانی این آزمون، در آغاز محلول غذایی به محلول بافر و محلول کاز آمینو اسید افزوده شده و همراه با همزدن آرام و بدون پیدایش حباب، محلول معرف Fe-CAS با آن‌ها آمیخته و در ظروف پتری پخش گردید. پس از جامد شدن محیط، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به روش لکه‌گذاری روی ظروف پتری‌ها مایه‌زنی شد. توانایی ساخت سیدروفور بر پایه دگرگونی رنگ محیط کشت از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری قطر هاله + کلنی نسبت به قطر کلنی باکتری در فواصل زمانی ۱۲۰ ساعت ارزیابی شد.

سنجش فعالیت آنزیم فیتاز برون‌یاخته‌ای: برای بررسی توان ساخت آنزیم فیتاز در جدایه‌ها با بهره‌گیری از روش هینونن و لاهتی (۱۹۸۱)، تمامی جدایه‌ها را در محیط مایع NB مایه‌زنی نموده و شیک (۱۵۰ دور در دقیقه) شدند (۱۸). سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط پیش‌کشت را برداشته و به محیط تخمیر مایع دارای فیتات افزوده نموده و در زمان‌های گوناگون (۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت) میزان فعالیت آنزیمی جدایه‌ها سنجیده شد. سنجش آنزیمی در حجم ۲ میلی‌لیتر و با بهره‌گیری از بافر استات‌سدیم دارای فیتات‌سدیم ۱۰ میلی‌مولار انجام شد. واکنش با افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف استن، اسید سولفوریک ۵ نرمال و آمونیوم مولیبدات ۱۰ میلی‌مولار (۱:۱:۲) متوقف شد. فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده فیتات در طول موج ۳۵۵ نانومتر اندازه‌گیری و یک واحد آنزیمی به‌صورت مقدار آنزیمی که میکرومول فسفات را در یک دقیقه آزاد می‌نماید، بیان گردید شد. منحنی استاندارد با بهره‌گیری از غلظت ۵ تا ۶۰۰ میلی‌مولار فسفات آماده گردید.

تجزیه آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون LSD (P<۰/۰۵) انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی و خالص‌سازی: پس از گذشت زمان انکوباسیون، کلنی‌های باکتریایی بر پایه اندازه هاله، ریخت‌شناسی، رنگ و تندی رشد به گونه بختانه برگزیده شدند. در پایان ۲۷ جدایه از روی محیط NBRIP نابسازی و برای آزمون هاله در محیط NBRIP حاوی فیتات به‌عنوان تنها منبع فسفره، بهره‌گیری شد.

آزمون هاله در محیط NBRIP حاوی فیتات: بر پایه اندازه‌گیری شاخص SI[1] (قطر هاله و کلونی تقسیم بر قطر کلونی) جدایه‌ها، به سه گروه SI<۲، ۲≤SI≤۳، SI>۳ گروه‌بندی شدند (جدول ۱). نیاز به یادآوری است که جدایه‌های ۳۷، ۵۱ و ۵۲ نیز توان پیدایش هاله را نداشتند. همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، ۴۸ درصد از جدایه‌های توانمند در پیدایش هاله، بیش‌ترین اندازه SI را در زمان ۲۴ ساعت از خود نشان دادند. ناهمانندی‌های جدایه‌های گوناگون از دیدگاه شناسه SI نشان می‌دهد که جدایه‌های باکتریایی بررسی شده توانمندی ناهمانندی در آزادسازی فسفر دارند (۳۶). توانمندی آزادسازی فسفر در محیط مایع در جدایه‌هایی که بدون توان پیدایش هاله در محیط جامد هستند، پیش‌تر نشان داده شده است (۱۷). بنابراین در این پژوهش نیز از جدایه‌هایی که بدون این توانمندی در محیط جامد بودند برای سنجش اندازه آزادسازی فسفر در محیط مایع بهره‌گیری شدند.

سنجش آزادسازی فسفر از تری‌کلسیم فسفات: با نگاه به جدول ۲، ۸۵/۱۸ درصد از جدایه‌ها توانایی انحلال تری‌کلسیم فسفات در محیط بافر را دارا بوده که از این میان جدایه ۷ با میزان ۳۷۳ میلی‌گرم برلیتر با pH ۳/۳۶ بیش‌ترین انحلال را در زمان ۴۸ ساعت از خود نشان داد و همچنین جدایه‌های ۸، ۳۷، ۴۲، ۵۲ هیچ انحلالی در محیط بافر مایع نشان ندادند. بیش‌ترین کاهش pH وابسته به جدایه ۷ با اندازه ۳/۶۴ واحد و کم‌ترین آن وابسته به جدایه ۳۰ با اندازه ۰/۱۷ واحد می‌باشد. نیاز به یادآوری است همبستگی منفی معنی‌داری میان بیشینه اندازه انحلال و pH (r= −۰/۸۶, P<۰/۰۱) وجود دارد. همان‌گونه که در جدول ۲ دیده می‌شود با نبود هاله در جدایه ۵۱، جدایه یاد شده در محیط مایع اندازه چشم‌گیری فسفر را آزاد نمود که با یافته‌های گوپتا و همکاران (۱۹۹۴) هم‌خوانی داشت (۱۷). از آن‌جایی‌که خاک محیطی بافر می‌باشد و در برابر دگرگونی pH پایدار است، بنابراین شناسایی جدایه‌هایی که توانایی شکستن pH محیط بافر را دارند جایگاه ویژه‌ای دارد. ساندرا و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که کودهای زیستی به‌ویژه باکتری‌های حل‌کننده فسفات از راه ساخت گونه‌های اسیدهای آلی مانند اسیدهای سیتریک، گلوتامیک و... pH خاک را کاهش می‌دهند (۴۵). کاهش pH خاک در اثر کاربرد کودهای زیستی نشانگر این است که اسیدی شدن خاک با اسیدهای آلی می‌تواند علت اصلی دسترسی بیش‌تر به عناصری مانند فسفر و پتاسیم تثبیت شده باشد. به‌نظر می‌رسد اسیدی شدن سازوکار اصلی در انحلال تری‌کلسیم فسفات باشد. در حقیقت، همبستگی منفی معنی‌دار میان اسیدی شدن محلول رویی و انحلال فسفات از منبع تری‌کلسیم فسفات نشان می‌دهد که ریزجانداران از ساخت اسیدهای آلی و/ یا منابع کی‌لیت‌کننده همانند یک سازوکار اصلی در آزادسازی فسفر از منابع معدنی نامحلول بهره‌گیری می‌کنند (۳۹).

1- Solubilization index

جدول ۱- مقادیر حداکثر شناسه SI جدایه‌های گوناگون.

Table 1. Maximum SI index values of different isolates.

SI (mm)	جدایه‌ها Strains			
	24	48	72	زمان (ساعت) Time(hour)
<2	49-30-29-1.14-1	12	-	
3<SI<2	33	18-23	53-17-15-14	
>3	36-34-26-24-24-20	21-8-7	42-16	

جدول ۲- آزادسازی فسفر ($mg\ l^{-1}$) از منبع تری‌کلسیم فسفات با جدایه‌ها در زمان‌های گوناگون.

Table 2. Release of phosphorus ($mg\ l^{-1}$) form tricalcium phosphate source by isolates at different times.

72	48	24	جدایه‌ها strains	72	48	24	جدایه‌ها strains
	ساعت Hour				ساعت Hour		
76.9	46.8	2.45	24	142	133	77.9	1
2.17	1.30	0.350	26	305	374	323	7
2.17	1.63	3.15	29	0.00	0.00	0.00	8
1.86	1.95	0.35	30	29.5	7.72	1.28	12
225	193	84.3	33	4.28	6.61	10.3	13
236	204	24.8	34	301	328	327	14
167	138	182	36	268	210	207	14.1
0.00	0.00	0.00	37	3.00	2.10	1.99	15
0.00	0.00	0.00	42	146	103	68.0	16
2.17	0.960	0.28	49	134	128	107	17
218	146	4.70	51	297	267	213	18
0.00	0.00	0.00	52	20.3	18.3	2.35	20
262	263	248	53	344	359	362	21
				189	154	3.85	23

اندازه‌گیری فسفر آزاد شده از فسفات آلومینیوم: در یافته‌های به‌دست آمده از این اندازه‌گیری، ۲۲ جدایه توانایی انحلال فسفات آلومینیوم را در محیط بافر نشان دادند اما اندازه این انحلال ناچیز بوده است. همان‌گونه که دیده می‌شود بیش‌ترین انحلال را جدایه ۷ در زمان ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی، به‌میزان ۱۳/۳ میلی‌گرم بر لیتر در pH ۲/۴ نشان داد. ولی این جدایه بیش‌ترین انحلال تری‌کلسیم‌فسفات را در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی از خود نشان داد. با توجه به این‌که pH تا این اندازه کاهش یافته اما اندازه انحلال ناچیز می‌باشد. بنابراین به دیده می‌رسد که انحلال فسفات آلومینیوم وابسته به کاهش pH نیست و کی‌لیت شدن سازوکار اصلی در انحلال این گروه از ترکیبات فسفاته باشد (۳۸). همچنین ۱۶ جدایه روند

افزایشی و ۵ جدایه روند کاهشی در میزان انحلال فسفات آلومینیوم نشان دادند و ۶ جدایه نیز هیچ انحلالی نشان ندادند. ساخت و آزادسازی پروتون و منابع کی‌لیت‌کننده به‌وسیله میکروب‌ها در زیستگاه هوازی از سازوکارهای آزادسازی فسفر از منبع فسفات‌های آلومینیوم و آهن است. هر چند که پژوهش‌ها نشان داده است که باکتری‌ها و قارچ‌ها توانمندی کمی در انحلال فسفات‌های آهن و آلومینیوم دارند (۴۸، ۶). یافته‌های به‌دست آمده از این پژوهش‌ها نشان‌دهنده این است که در خاک‌های دارای اندازه فراوان فسفات‌های آهن و آلومینیوم، انحلال میکروبی این کانی‌ها از کارایی کم‌تری برخوردار است. این شاید یکی از دلایل حاصلخیزی کم در خاک‌هایی با ویژگی‌های یادشده باشد.

جدول ۳- آزادسازی فسفر ($mg\ l^{-1}$) از فسفات آلومینیوم با جدایه‌ها در زمان های گوناگون.

Table 3. Release of phosphorus ($mg\ l^{-1}$) from aluminum phosphate source by isolates at different times.

72	48	24	جدایه‌ها strains	72	48	24	جدایه‌ها strains
	ساعت Hour				ساعت Hour		
2.79	1.35	0.350	24	1.32	1.21	1.18	1
0.930	0.580	0.350	26	13.3	8.06	4.78	7
0.620	0.605	2.45	29	0.00	0.00	0	8
1.55	1.63	2.80	30	10.1	9.36	4.50	12
2.79	2.25	0.00	33	0.00	0.330	0	13
4.34	3.58	0.35	34	5.96	7.27	6.07	14
6.99	7.36	2.07	36	7.62	5.12	4.89	14.1
0.00	0.00	0.00	37	2.98	2.78	2.75	15
0.00	0.00	0.00	42	0.00	0.00	0.00	16
0.310	0.00	0.00	49	0.00	0.00	0.00	17
3.32	1.99	0.00	51	6.63	4.94	1.40	18
0.00	0.660	0.670	52	3.32	1.99	0.00	20
6.65	4.98	0.00	53	4.03	0.320	0.00	21
				2.17	0.00	0.00	23

اندازه‌گیری کمی آنزیم فیتاز برون‌یاخته‌ای: آنزیم‌های فیتاز به گونه درون‌یاخته‌ای و برون‌یاخته‌ای بوده یا آمیخته‌ای از فعالیت درون‌یاخته‌ای و برون‌یاخته‌ای را از خود نشان می‌دهند و این مسأله بیان می‌نماید که ریزموجودات جایگاه‌های گوناگونی را برای هیدرولیز اینوزیتول فسفات‌ها مورد بهره‌گیری قرار می‌دهند. فیتازهای برون‌یاخته‌ای باکتریایی نسبت به فیتازهای درون‌یاخته‌ای ساخته‌شده به‌وسیله مخمرها از توانمندی بیش‌تری در تجزیه فیتات برخوردار هستند (۲۰). بررسی توان ساخت آنزیم برون‌یاخته‌ای در جدایه‌های گوناگون نشان داد که تنها ۶ جدایه از ۲۷ جدایه باکتریایی بررسی شده توان ساخت فیتاز برون‌یاخته‌ای را دارا هستند (جدول ۴). یافته‌های ما نشان داد که از محیط‌های جامد تنها می‌توان برای

جداسازی جدایه‌هایی که به گونه بالقوه توان تجزیه فیتات را دارا هستند، بهره‌گیری نمود. همان‌گونه که یافته‌های غربالگری اولیه در محیط جامد دارای فیتات به‌عنوان تنها منبع فسفر نشان داد (جدول ۱)، به‌جز ۳ جدایه، تمامی جدایه‌های بررسی شده دارای توانمندی ایجاد هاله در پیرامون کلنی‌ها بودند که در واقع شناسه‌ای اولیه برای جداسازی ریزجانداران تجزیه‌کننده فیتات در نظر گرفته می‌شود. گرچه روند غربالگری ریزجانداران مبتنی بر جداسازی آن‌ها در محیط جامد است ولی یافته‌های به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که هیچ‌گونه همخوانی میان فعالیت آنزیم فیتاز و ایجاد هاله در محیط جامد دارای فیتات به‌عنوان تنها منبع فسفره، وجود ندارد. این یافته‌های با یافته‌های قربانی‌نصرآبادی و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی داشت. هاله شفاف ایجاد شده در پیرامون کلنی‌های گوناگون ممکن است ناشی از تراوش آنزیم، ساخت اسید یا منابع کی‌لیت‌کننده باشد (۱۵).

جدایه‌های باکتریایی، معمولاً به گونه برون‌یاخته‌ای توانایی کمی در ساخت آنزیم فیتاز دارند و یافته‌های به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که توان ساخت آنزیم برون‌یاخته‌ای در جدایه‌های باکتریایی بررسی شده نیز کم بوده است. برای اطمینان از تراوش آنزیم فیتاز در مورد جدایه‌های باکتریایی بهتر است فعالیت آنزیم فیتاز درون‌یاخته‌ای نیز اندازه‌گیری شود. هر چند که تراوش آنزیم در مورد باکتری‌های گرم مثبت مثل باکتری *Bacillus* sp. KHU-10 و جدایه‌های *Streptomyces* به گونه برون‌یاخته‌ای می‌باشد (۱۰، ۳۱).

جدول ٤- فعالیت آنزیم فیتاز برون‌یاخته‌ای ($mU\ ml^{-1}$) در جدایه‌های گوناگون.

Table 4. Extracellular of phytase activity ($mU\ ml^{-1}$) in different strains.

جدایه‌ها Strains	8	13	15	19	34	53
فعالیت آنزیم Enzyme activity	7^{d}	27^{a}	5.5^{de}	9^{c}	12^{b}	4^{e}

اندازه‌گیری توان ساخت HCN: اندازه‌گیری توان ساخت سیانیدهیدروژن از راه دگرگونی رنگ در کاغذ صافی در پنج سطح (زرد کم‌رنگ، عدم ساخت؛ کرم، کم‌ترین ساخت؛ نارنجی، ساخت کم؛ قهوه‌ای روشن، ساخت میانه و آجری، ساخت فراوان) ارزیابی می‌شود. بر این پایه همه جدایه‌های آزمون شده گذشته از جدایه‌های شماره ۵۳ (سطح چهار) و ۳۰ (سطح دو) از دیدگاه ساخت HCN منفی بودند. سیانید آزاد شده از ریزجانداران همانند یک متابولیت ثانویه است و مایه برتری نسبی ریزجانداران سازنده آن می‌شود. گرچه سیانید توان از میان بردن آنزیم‌های فرآیندهای متابولیک را دارا است ولی کارایی آن به‌عنوان یک ماده کنترل‌کننده بیولوژیک به خوبی شناخته شده است (۱۳). کریمر و سوئیسی (۲۰۰۱) پیشنهاد کرده‌اند که توانایی ساخت HCN توسط باکتری‌های PGPR یک قابلیت بالقوه و مکانیزمی مناسب برای کنترل زیستی علف‌های هرز می‌باشد که باید همانند یک جنبه جدید در روش‌های تقویت و تحریک رشد گیاه و افزایش کارکرد محصول مورد توجه بیش‌تر قرار گیرد (۲۱).

اندازه‌گیری توان ساخت اکسین: یکی از مهم‌ترین راه‌هایی که باکتری‌ها می‌توانند بر رشد و نمو گیاهان اثر بگذارند تولید هورمون ایندول-۳- استیک اسید می‌باشد. این هورمون باعث توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه و به دنبال آن افزایش جذب عناصر غذایی توسط آن می‌گردد.

جدول ۵- اکسین ساخته شده ($mg\ l^{-1}$) در جدایه‌های گوناگون پس از سه روز.

Table 5. Auxin production ($mg\ l^{-1}$) in different strains after three days.

جدایه‌ها Strains	Auxin (mgl^{-1})	جدایه‌ها strains	Auxin (mgl^{-1})	جدایه‌ها strains	Auxin (mgl^{-1})	جدایه‌ها strains	Auxin (mgl^{-1})
1	41.6^{c}	15	3.80^{lm}	24	6.06^{ij}	36	7.31^{i}
7	4.99^{kl}	16	46.5^{b}	26	0.00^{q}	37	0.590^{op}
8	1.07^{op}	17	35.4^{d}	29	8.86^{h}	42	0.00^{q}
12	26.2^{e}	18	1.90^{no}	30	18.1^{f}	49	4.81^{kl}
13	19.3^{f}	20	0.170^{q}	33	24.3^{e}	51	16.2^{g}
14	7.25^{i}	21	52.8^{a}	34	0.00^{q}	52	0.00^{q}
14.1	3.09^{mn}	23	34.1^{d}	53	4.85^{kl}		

یافته‌ها نشان داد که از میان جدایه‌های یاد شده تعداد ۲۳ جدایه توانایی ساخت ایندول استیک اسید را داشته و بیش‌ترین اندازه ساخت اکسین وابسته به جدایه شماره ۲۱ به‌میزان ۵۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر بوده و جدایه‌های ۲۶، ۳۴، ۴۲ و ۵۲ نیز توان ساخت اکسین نبودند (جدول ۵). تخمین زده شده است که ۸۰ درصد از باکتری‌های ریزوسفری توان ساخت IAA را دارند (۴). بسیاری از باکتری‌ها از طریق سنتز اکسین به رشد بهتر گیاهان کمک می‌کنند و معمولاً بیش‌ترین اندازه IAA در باکتری‌ها در مرحله ایست رشد آن‌ها ساخت می‌شود. گونه‌های باکتری‌های افزاینده رشد مثل *Azospirillum*، *Pseudomonas*، *Enterobacter*، *Bradyrhizobium* از طریق ساخت IAA منجر به بهبود رشد گیاه می‌شوند (۲۲، ۴۷). هرچند که اندازه ساخت IAA در جدایه‌های باکتریایی گوناگون به مسیرهای بیوسنتزی، محل ژن‌ها، توالی‌های تنظیمی و حضور آنزیم‌های فعال در تبدیل IAA بستگی دارد. گرچه سنتز IAA متأثر از عوامل محیطی نیز می‌باشد. ساخت فیتو هورمون‌هایی مثل اکسین به‌وسیله جوامع میکروبی با پژوهشگران گوناگون گزارش شده است (۱، ۴۲). همچنین اکسین عمده‌ترین تنظیم‌کننده رشد گیاهی است که به‌وسیله ریزجانداران حل‌کننده فسفات (PSM) نیز ساخت می‌شود (۳۵). کومار و همکاران (۲۰۰۸) دیدند که *انتروباکترها* در محیط LB دارای ال- تریپتوفان، IAA ساخته و بیش‌ترین اندازه نیز ۴۱/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (۲۲).

اندازه‌گیری نیمه‌کمی آنزیم‌های آلفا آمیلاز، پروتئاز، کربوکسی متیل سلولاز: یافته‌های بررسی ساخت آنزیم با جدایه‌های باکتریایی مورد بهره‌گیری در این پژوهش از طریق پیدایش هاله در پیرامون کلنی در محیط‌های سنجش آن‌ها نشان داد که توانمندی آن‌ها از دیدگاه ساخت آنزیم‌های بررسی شده بسیار متفاوت است. همان‌گونه که در جدول ۶ نشان داده شده است، ۱۶ جدایه توان ساخت آنزیم آلفا- آمیلاز داشته و ۶ جدایه از دیدگاه ساخت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و نیز ۱۴ جدایه از دیدگاه ساخت آنزیم پروتئاز مثبت بودند. از مجموع ۲۷ جدایه باکتریایی بررسی شده تنها سه جدایه توان ساخت هر سه آنزیم پروتئاز، آلفا آمیلاز و کربوکسی متیل سلولاز را دارا بوده و جدایه ۴۹ بیش‌ترین هاله را در سنجش هر سه آنزیم نشان داد. همچنین جدایه‌های ۱، ۸، ۱۲، ۱۳، ۲۳، ۲۴ و ۵۱ توان ساخت هیچ‌یک از آنزیم‌های مورد سنجش را از خود نشان ندادند.

سلولز پلیمری است خطی از واحدهای گلوکز که با پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند و یکی از فراوان‌ترین کربوهیدرات‌های موجود در طبیعت می‌باشد (۴۱). سلولزها آنزیم‌هایی هستند که قادرند پیوندهای گلیکوزیدی را بشکنند (۷، ۸). سلول‌های باکتریایی و قارچی می‌توانند برای هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی آنزیم‌های سلولاز تولید کنند. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از نوع هوازی یا بی‌هوازی، مزوفیل یا ترموفیل باشند (۴۴، ۲۸، ۱۲، ۲۶).

باکتری‌هایی که بروز یا شدت بیماری‌های گیاهی را کاهش می‌دهند اغلب همانند عوامل بیوکنترل و آنتاگونیست شناخته می‌شوند. آنزیم‌های کیتیناز، پروتئاز، سلولاز، زایلناز از گونه‌های تجزیه‌کننده دیواره یاخته‌ای قارچ‌ها و مخمرها بوده و می‌توانند منجر به کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زا گردند (۳۳). کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی از طریق ریزجانداران می‌تواند به گونه مستقیم و با ساخت مواد مؤثر بر یک یا چند مرحله از چرخه زندگی پاتوژن یا به گونه غیرمستقیم و با فعال کردن سازوکارهای القاء مقاومت گیاه میزبان در مقابل عامل بیماری‌زا باشد (۲۵). همچنین آنزیم‌های کیتیناز، سلولاز، آمیلاز، اوره‌از و پروتئاز در تجزیه ماده آلی از اهمیت بسیار زیادی برخوردارند و بنابراین در حاصلخیزی خاک کارایی مهمی دارند. نیتروژن به‌دست آمده از تجزیه پروتئین برای حفظ چرخه دائمی نیتروژن میان گیاهان و اجزاء خاک ضروری می‌باشند.

جدول ٦- اندازه‌گیری نیمه‌کمی آنزیم‌های آلفا آمیلاز، پروتئاز و سلولاز.

Table 6. Semi-quantitative measurement of alpha-amylase, protease and cellulose enzymes.

پروتئاز Protease	سلولاز cellulase	آلفا- آمیلاز α- amylase	جدایه‌ها strains	پروتئاز protease	سلولاز cellulase	آلفا- آمیلاز α-amylase	جدایه‌ها strains
-	-	-	24	-	-	-	1
+++	-	++	26	++	-	-	7
+	-	+	29	-	-	-	8
+++	-	++	30	-	-	-	12
-	-	++	33	-	-	-	13
-	-	+	34	+	-	+	14
+++	-	+	36	+	-	+	14.1
-	+++	+	37	++	++	+++	15
-	+	++	42	+	-	-	16
+++	+++	+++	49	+++	-	++	17
-	-	-	51	-	-	+	18
+++	++	-	52	+++	+++	+	20
+	-	-	53	-	-	+	21
				-	-	-	23

- عدم هاله، + قطر هاله ۲-۱، ++ قطر هاله ۳-۲، +++ قطر هاله ۳ < میلی‌متر.

- No halo, + diameter of the halo 1-2, ++ diameter of the halo 2 - 3, +++ diameter of the halo > 3 mm.

اندازه‌گیری سیدروفور: سیدروفورهای ساخته شده با باکتری‌های PGPR از طریق ایجاد محدودیت آهن در ریزوسفر موجب مهار پاتوژن‌های ریشه و کاهش احتمال بیماری‌های گیاهی می‌شوند (۳۷). آهن وابسته به کارایی‌های متعدد آن از جمله شرکت در ساختار سیتوکروم، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها به‌عنوان کوفاکتور از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (۱۶). ساخت اندازه کافی سیدروفور به‌وسیله ریزجاندارانی توانمند در کنترل بیولوژیک می‌تواند منجر به محدود کردن توانایی دسترسی آهن فریک برای پاتوژن‌ها شده (۳۰) و نیز ممکن است منجر به القاء مقاومت میزبان در مقابل پاتوژن گردد (۲۹). بر پایه یافته‌های به‌دست آمده از سنجش سیدروفور، از سه جدایه ۷، ۱۳ و ۲۱ فقط جدایه ۲۱ هاله ضعیفی در محیط CAS agar فرآوری نمود و دو جدایه دیگر توان ساخت سیدروفور نبودند.

شناسایی جدایه‌های برگزیده: بر پایه یافته‌های به‌دست آمده از توالی خوانی، میزان همانندی توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA با جدایه‌های GenBank با استفاده از الگوریتم BLAST مورد مقایسه قرار گرفت. یافته‌های به‌دست آمده از توالی خوانی در جدول ۷ نشان داده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود ناهمانندی‌هایی در توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA با گونه‌های شناخته شده است.

جدول ۷- شناسایی جدایه‌های برگزیده بر پایه توالی 16S rRNA.

Table 7. Identification of selected isolates by 16S rRNA sequence.

جدایه‌ها Strains	نزدیک‌ترین سویه شناسایی شده Most closely related strain	شماره دسترسی در GenBank Accession number in GenBank	تشابه ژن (٪) Gene identity (%)
7	*Serratia marcescens* MSSRF QS71	KJ877659.1	99.82
13	*Sphingobium yanoikuyae* CH1-1-2	KMB871861.1	99.91
21	*Enterobacter hormaechei* DD3	KP260658.1	99.40

نتیجه‌گیری کلی

ویژگی‌های افزاینده رشد در باکتری‌های بررسی شده در این پژوهش نشان داد که برخی از جدایه‌ها توانایی بهره‌گیری بالقوه به‌عنوان گونه‌های افزاینده رشد گیاه را دارا می‌باشند. میزان انحلال فسفات‌های آلومینیوم و تری‌کلسیم فسفات نشان داد که علی‌رغم کاهش pH محیط در هر دو مورد، میزان آزادسازی فسفر از منبع تری‌کلسیم فسفات به مراتب بیش‌تر از فسفات آلومینیوم بوده و نشان‌دهنده آن است که بر خلاف تری‌کلسیم فسفات آزادسازی فسفر از فسفات آلومینیوم ناشی از کاهش pH نیست. گرچه شماری از جدایه‌ها دارای فعالیت فیتاز برون‌یاخته‌ای بودند ولی اندازه‌گیری فعالیت فیتاز درون‌یاخته‌ای نیز در جدایه‌های بررسی شده بایستی انجام پذیرد. آن دسته از جدایه‌های توانمند در ساخت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و کربوکسی متیل سلولاز نه تنها دارای توانایی بهره‌گیری در بخش کشاورزی هستند بلکه به‌دلیل اهمیت این دسته از آنزیم‌ها به‌خصوص پروتئاز و آمیلاز در صنعت می‌توانند بررسی و آزمایش شوند. ارزیابی جدایه‌ها نشان داد که دارای توانمندی‌های ناهمانندی هستند و برای بررسی کارایی آن‌ها در بهبود رشد و کارکرد گیاه بهتر است از آن دسته از جدایه‌هایی بهره‌گیری شود که دارای سازوکارهای ناهمانندی در بهبود رشد گیاهان می‌باشند.

منابع

1.Ahemad, M., and Khan, M.S. 2012. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing Pseudomonas putida isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. Chemosphere. 86: 945-950.

2.Alexander, D.B., and Zuberer, D.A. 1991. Use of Chrome Azurol S reagents to evaluate siderophore producing by rhizosphere bacteria. Biol. Fertil. Soils. 12: 39-45.

3.Antoun, H., and Kloepper, J.W. 2001. Plant growth promoting rhizo-bacteria, P 1477-1480. In: S. Brenner and J.H. Miller (Eds.), Encyclopedia of Genetics. Academic, New York.

4.Asghar, H.N., Zahir, Z.A., and Arshd, M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yeild and oil content of canola (*Brassica nappus* L.). Aust J. Agr. Res. 55: 187-194. (Iran Persian)

5.Bagnasco, P. 1998. Fluorescent *pseudomonas* spp. As biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. Soil Biol. Biochem. 30: 1317-1322.

6.Banik, S., and Dey, B.K. 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganisms. Plant Soil. 69: 353-364.

7.Bayer, E.A., Lamed, R., and Himmel, M.E. 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. J. Environ. Biotechnol. 18: 4. 237-245.

8.Bhat, M.K. 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Adv. 18: 3. 355-383.

9.Chadha, N., Mishra, M., Prasad, R., and Varma, A. 2014. Root endophytic fungi: research update. J. Biol. Life Sci. 5: 135-158.

10.Choi, Y.M., Suh, H.J., and Kim, J.M. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from Bacillus sp KHU-10. J. Prot. Chem. 20: 287-292.

11.Cleland, R.E. 1990. Auxin and cell elongation, P 132-148. In: P.J. Davies (Ed.), Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

12.Criquet, S. 2002. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. J. Microbiol. Methods. 50: 6. 165-173.

13.Devi, K.K., Seth, N., Kothamasi, S., and Kothamasi, D. 2007. Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (rambur) by cyanide poisoning under in vitro conditions. Curr. Microbiol. 54: 74-78.

14.Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., and Perez, G. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in Chamaecytisus proligerus, a forage tree shrub legume endemic to the Canary Island. Plant Soil. 226: 967-978.

15.Ghorbani-Nasrabadi, R., Greiner, R., Alikhani, H.A., and Hamedi, J. 2012. Identification and determination of extracellular phytate-degrading activity in actinomycetes. World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 2601-2608.

16.Guerinot, M.L. 1991. Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legumes symbiosis. Plant Soil. 130: 199-209.

17.Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R.C., and Saxena, R.K. 1994. Amodified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganism. J. Gen. Appl. Microbiol. 40: 255-260.

18.Heinonen, J.K., and Lahti, R.J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Anal. Biochem. 113: 313-317.

19.Jorquera, M.A., Hernandez, M.T., Rengel, Z., Marschner, P., and De la Luz, M.M. 2008. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytatemineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. Biol. Fertil. Soils. 44: 8. 1025-1034.

20.Konietzny, U., and Greiner, R. 2004. Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. Braz. J. Microbiol. 35: 11-18.

21.Kremer, R., and Souissi, T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Microbiol. 43: 182-186.
22.Kumar, K.V., Singh, N., Behl, H.M., and Srivastava, S. 2008. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in Brassica juncea grown in fly ash amended soil. Chemosphere. 72: 678-683.
23.Lehninger, A.L. 1981. Biochemistry: the molecular Basis of cell structure and function, 2nd end. Worth publishers, New York, 833p.
24.Li, S., Shen, W., Chen, X., Shi, G., and Wang, Z. 2011. Secretory expression of *Rhizopus oryzae* a-Amylase in *Kluyveromyces lactis*. Afr. J. Biotechnol. 10: 4190-4196.
25.Macagnan, D., Romeiro, R.S., Pomella, A.W.V., and deSouza, J.T. 2008. Production of lytic enzymes and siderophores and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex Crinipellis) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. Biol. Control. 47: 309-314.
26.Majidi, S., Roayaei, M., and Ghezelbash, G. 2011. Carboxymethyl cellulase and filter paperase activity of new strains isolated from Persian Gulf. Microbiol. J. 1: 8-16.
27.Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathol. 44: 40-50.
28.Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., and Mattiasson, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. J. Biochem. 83: 177-187.
29.Meziane, H., Van Der Sluis, I., Van Loon, L.C., Hofte, M., and Bakker, P.A.H.M. 2005. Determinant of Pseuodomona putida WCS358 involved in inducing systematic resistance in plants. Mol. Plant Pathol. 6: 177-185.
30.Miethke, M., and Maraheil, M. 2007. Siderophore-based iron acquistion and patogen control. Microbiol. Mole. Biol. Rev. 71: 3. 413-451.
31.Mohamed, A.M., Tork, S., Al-Garni, S.M., and Kabli, S.A. 2015. Production and characterization of phytase from *Streptomyces luteogriseus* R10 isolated from decaying wood samples. Inter. J. Agric. Biol. 17: 515-522.
32.Mukesh, P., Suma, S., Singaracharya, M.A., and Lakshmipathi, V. 2004. Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. World J. Microbiol. Biotechnol. 20: 531-534.
33.Nabti, E.A., Bensidhoum, L.A., Tabli, N.A., Dahel, D.A., Weiss, B., Rothballer, M.R., Schmid, M.B., and Hartmann, A. 2014. Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated fromsalt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. Europ. J. Soil Biol. 61: 20-26.
34.Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening of phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol Lett. 170: 265-270.
35.Oves, M., Khan, M.S., and Zaidi, A. 2013. Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. Eur. J. Soil Biol. 56: 72-83.
36.Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M.M., and Yarzabal, L.A. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. Soil Biol. Biochem. 39: 2905-2914.
37.Podile, A.R., and Kishore, G.K. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria, P 195-230, In: S.S. Gnanamanickam (Ed.), Plant-associated bacteria. Springer, The Netherlands.
38.Puente, M.E., Li, C.Y., and Bashan, Y. 2009. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. Environ. Exp. Bot. 66: 389-401.
39.Rodriguez, H., and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech. 17: 319-339.
40.Sarwar, M., and Frankenberger, W.T. 1994. Influence of L-trypyophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. Plant and Soil. 160: 97-104.
41.Schulein, M. 2000. Protein engineering of cellulose. Biochemica et Biophysica Acta. 5: 239-252.

42. Singh, M.V. 2008. Micronutrient deficiencies in crops and soils in India, P 93-125, In: V.J. Alloway (Ed.), Micronutrient deficiencies in global crop production. Springer Science Buisness Media, Berlin.
43. Sreedevi, S., and Reddy, B.N. 2013. Screening for efficient phytase producing bacterial strains from different soils. Int. J. Biosci. 3: 1. 76-85.
44. Sun, Y., and Cheng, J. 2001. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. Bioresour. Technol. 38: 7. 1-11.
45. Sundara, B., Natarajan, V., and Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane yields. Field Crops Res. 77: 43-49.
46. Usharani, G., Kanchana, D., Jayanti, M., Suranraj, P., and Sujitha, D. 2013. Evaluation of certain resistance inducing chemicals against sheath blight incidence in paddy (*oryza sativa* L.). Int. J. Microbiol. Res. 4: 3. 333-335.
47. Wani, P.A., Khan, M.S., and Zaidi, A. 2007. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by green gram plants. Chemosphere. 70: 36-45.
48. Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Adv. Agron. 69: 99-151.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 5(3), 2015
http://ejsms.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Study of some growth promotion properties of bacterial isolates from animal manures and identification of selected isolates

E. Nourzade Roshan[1], *R. Ghorbani Nasrabadi[2], M. Barani Motlagh[2] and A. Yamchi[3]

[1]M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 07/19/2015; Accepted: 10/31/2015

Abstract

Background and Objectives: Plants growth in agricultural soils are affected by several biological factors. Plant growth promoting bacteria can improve growth and yield of agronomic plants through direct and indirect mechanisms. Minimizing consequences of using high amount of fertilizers and obtaining sustained level are the aims of sustainable agriculture. Using microorganisms due to improving soil fertility and nutrients uptake, lead to increase growth and yield of plants and ameliorate soil health. The aim of this research was to isolate and purify bacterial isolates from animal manures, to evaluate their plant growth promotion characteristics and identify the selected isolates.

Material and Methods: In order to characterize growth promotion properties of bacteria in this study, 10 samples of animal manures from different regions were collected. 27 isolates based on halo production, growth rate and morphological characteristics in NBRIP medium were purified and then their typical PGP including auxin, Siderophore, HCN production, insoluble phosphates solubilization and secretion of protease, Cellulase, α-amylase and phytase were evaluated and finally selected isolates based on 16SrRNA were identified.

Results: Among all of the isolates, maximum phosphorous from tri-calcium phosphate (373 mg/l) and aluminum phosphate (13.3 mg/l) was released by isolates NO. 7. Significant negative correlation ($r= -0.86$, $P\leq0.01$) between maximum solubilization of tri-calcium phosphate and pH was observed. Isolate NO. 21 produced greatest amount of auxin (52.8 mg/l). Only isolates NO. 30 and 53 were positive in HCN production. Among 27 isolates only three of them had the ability to secret protease, cellulase and α-amylase. The utmost halo was measured by isolate NO. 49 in production of these three enzymes. Evaluation of extracellular phytase production showed that only 6 isolates were capable to produce the enzyme. The analysis of the 16S rRNA of the selected isolates showed highly similarity to bacteria belonging to the genera *Enterobacter*, *Sphingobium, Serratia*. Only one of the three selected isolates produced weak halo in CAS-agar medium and another two isolates didn't show the siderophore prodction capability.

Conclusion: Plant growth promotion characteristics of bacterial isolates, in this research, showed that some of the isolates had the potential to be used as PGPB. Those isolates capable of producing protease, amylase and cellulase enzymes not only have usability in agriculture but also because of the importance of this group of enzymes, especially protease and amylase in industry, can also be considered.

Keywords: Tri-calcium phosphate, Aluminum phosphate, Auxin, Phytase, Plant growth promotion

* Corresponding Authors; Email: rgnasr@yahoo.com