Archive of SID

جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم از ریزوسفر گیاهان غیرزراعی در شمال غرب ایران

اسماعیل کریمی*[۱]، ناصر علی‌اصغر زاد[۲]، محمدرضا نیشابوری[۲]، عزت‌اله اسفندیاری[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸)

چکیده

باکتری‌های ریزوسفری تشکیل دهنده بیوفیلم با ویژگی‌های مطلوب محرک رشدی می‌توانند تأثیر زیادی بر تولید گیاهان زراعی در شرایط تنش داشته باشند. بنابراین به‌منظور مطالعه این باکتری‌ها، ۵۰ نمونه ریزوسفری از ریشه گیاهان وحشی گندمیان تهیه و پس از تهیه سوسپانسون در شرایط آزمایشگاهی روی محیط کشت TSA کشت و باکتری‌ها خالص‌سازی شدند. نتایج نشان داد که بیش از ۹۰ درصد باکتری‌های به‌دست آمده توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا بوده و می‌توانند در پنج گروه روشناور، چسبندگی زیاد، چسبندگی متوسط، چسبندگی ضعیف و بدون قابلیت چسبیدن تقسیم‌بندی شوند. ارزیابی تنوع ژنتیکی باکتری‌های مؤثر جداسازی شده نشان داد که در شرایط این مطالعه به شش جنس مختلف باکتریایی تعلق دارند، اما بالغ بر ۸۰ درصد آن‌ها از جنس *باسیلوس* بودند. نتایج مقاومت به خشکی روی ۶۸ جدایه از ۱۳۰ جدایه جداسازی شده با قدرت بالای تشکیل بیوفیلم با روش سوربیتول مشخص نمود که در پتانسیل ماتریک ۲۵- بار تمامی جدایه‌ها قادر به فعالیت و رشد بودند. از نظر ویژگی‌های محرک رشدی تمامی جدایه‌ها قادر به تولید هورمون اکسین در محدوده شش تا ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده، ۹۶ درصد از جدایه‌ها قادر به تخریب ۱-آمینو سیکلوپروپان کربوکسیلیک اسید و تولید آلفا کتو بوتیریک اسید تا ۲/۱۴ میکرومول در ۳۶ ساعت بودند. توانایی انحلال فسفر بین ۱/۲ تا ۲۵۱ میلی‌گرم بر لیتر و قدرت آزادسازی پتاسیم از کانی مسکوویت در آن‌ها بین ۹۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود. در بین باکتری‌های مورد مطالعه فقط ۴/۴۱ درصد دارای توان تولید سیدروفور بودند. به‌نظر می‌رسد که مجموعه باکتریایی خوبی در این مطالعه شناسایی شده‌اند که می‌توانند به‌عنوان محرک رشد گیاهان در آزمایش‌های گلخانه‌ای و گلدانی و سپس مزرعه‌ای در شرایط تنش کم‌آبی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آزاد سازی پتاسیم، 16S rDNA ، ACC- دآمیناز، *باسیلوس*، تنش کم‌آبی، هورمون اکسین

کریمی ا.، علی اصغرزاد ن.، نیشابوری م. ر.، اسفندیاری ع. ۱۳۹۸. جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی باکتری¬های تشکیل دهنده بیوفیلم از ریزوسفر گیاهان غیرزراعی در شمال غرب ایران. تحقیقات کاربردی خاک. جلد شماره. ص: ۱۴-۲۸.

۱-استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه (مکاتبه کننده)
۲-استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۳-استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه
*پست الکترونیک: sm_ka80@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جمعیت دنیا با سرعت رشد قابل توجهی در حال افزایش بوده و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ جمعیت دنیا به حدود نه میلیارد نفر برسد که این موضوع می‌تواند امنیت غذایی را با چالشی جدی در زمینه تأمین مواد غذایی مواجه نماید (Foley *et al*., 2011). از سوی دیگر روند تغییر اقلیم در جهان به گونه‌ای است که پدیده گرمایش زمین و بروز شرایط کم‌آبی در اکوسیستم‌ها قابل پیش‌بینی است (E.E.A., 2011). اگرچه در حال حاضر کاهش آب یک چالش کلیدی در زمینه تولید محصولات کشاورزی در دنیا به‌شمار می‌آید و ۷۰ درصد اراضی قابل کشت را با محدودیت تولید مواجه کرده است، اما تغییرات اقلیمی یاد شده در آینده می‌تواند تولید محصولات کشاورزی را با محدودیت‌های بیش‌تری مواجه نماید. بنابراین، آگاهی و درک روش‌های بهبود رشد و ادامه حیات گیاهان در شرایط محدودیت آب قابل دسترس، از اهمیت خاصی در علوم گیاهی معاصر برخوردار خواهد بود. اگرچه گزینش‌های سنتی ارقام مقاوم به کمبود آب و در کنار آن بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک برای بهبود مقاومت گیاهان به شرایط خشکسالی به‌کار گرفته شده است. ولی، به سبب زمان‌بر بودن این روش‌ها و در کنار آن چالش‌های مرتبط با سلامتی محصولات مهندسی ژنتیکی شده، استفاده از عملیات به‌زراعی نوین به‌عنوان روشی همسو و کارآمد نیز در دستور کار محققان مختلف قرار گرفته است (Fleury *et al*., 2010). سال‌های زیادی است که نقش ارزنده باکتری‌های محرک رشد گیاهان که در ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند، به‌خوبی شناخته شده و به‌طور عملی در علم کشاورزی به‌صورت کود زیستی[1] و عامل کنترل زیستی[2] در راستای افزایش تولید محصولات مختلف کشاورزی به‌کار گرفته شده‌اند. تأثیر این باکتری‌ها به‌حدی در گیاهان میزبان نمود پیدا می‌کند که ذخایر ژنتیکی این مجموعه باکتریایی به‌عنوان ژنتیک دوم گیاه نیز شناخته می‌شود (Shintu & Jayaram, 2015). اخیراً به‌کارگیری ریزموجودهای محرک رشد گیاه برای بهبود مقاومت گیاه به کم‌آبی به‌صورت جدی مطرح شده و آزمایش‌های موفقیت‌آمیزی نیز در این خصوص انجام گرفته است (Timmusk & Wagner, 1999). اگرچه سازوکار دقیق افزایش مقاومت به تنش کم‌آبی توسط باکتری‌های ریزوسفری دقیقاً مشخص نیست. اما، احتمال می‌رود که تغییر معماری سیستم ریشه گیاهان با تولید هورمون‌های رشد مانند اسید آبسیزیک، اسید جیبرلیک، سیتوکینین و اکسین (Postma & Lynch, 2011) و تولید آنزیم ACC- دآمیناز (Glick, 2014)، القاء مقاومت سیستمیک و ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی (Vardharajula *et al*., 2010)، بیان ژن‌های پاسخ به تنش (Shinozaki & Yamaguchi, 2007)، تولید پلی‌ساکاریدهای برون سلولی و تشکیل بیوفیلم (Alami et al., 2000)، تولید ترکیبات سیگنال آلی فرار گیاهی و باکتریایی (Zhang *et al*., 2017) و تنظیمات اسمزی در برهمکنش گیاه با باکتری‌های ریزوسفری (Shintu & Jayaram, 2015) از دلایل ایجاد مقاومت به کم‌آبی باشند. خاک زیستگاه انواع متنوعی از میکروب‌ها بوده که دارای قابلیت‌ها و کارکردهای اکولوژیکی متنوعی هستند. یافته‌های اخیر در این خصوص تأکید دارند که گزینش و دستیابی به میکروب‌های کارآمد اولین مسئله مهم در به‌کارگیری آن‌ها در مدیریت تنش‌های محیطی می‌باشد. لذا، جستجوی باکتری‌ها در ریزوسفر گیاهان بومی که تنش‌های محیطی را در سالیان درازی تجربه کرده و کلکسیون خوبی از باکتری‌های مفید را در ریزوسفر خود جمع کرده‌اند، راهکاری مناسب می‌باشد. علاوه‌بر این بایستی باکتری‌هایی مورد کنکاش قرار گیرند که خود دارای مقاومت مطلوبی در شرایط تنش‌های محیطی نظیر کم‌آبی، حضور فلزات سنگین، حمله پروتوزوآها و غیره، باشند. باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم از جمله باکتری‌های ریزوسفری بوده که به‌عنوان گزینه‌ای مناسب در این زمینه مطرح شده و از این ویژگی به‌عنوان راهکاری محافظتی بهره گرفته‌اند (Wang *et al*., 2012). بیوفیلم در واقع اجتماعی از سلول‌های میکروبی (باکتری، قارچ، جلبک و سایر میکروب‌ها) است که به یک سطح جاندار یا بی‌جان متصل شده و توسط مواد پلیمری خارج سلولی احاطه می‌شوند. این ساختار پلیمری که با سازمان‌دهی خاصی نیز طراحی می‌گردد به‌طور عمده از پلی‌ساکاریدها تشکیل شده و مقادیری پروتئین و اسیدهای نوکلئیک نیز در آن یافت می‌شوند. برآورد می‌شود که ۹۹ درصد فعالیت های میکروبی در

1-Biofertilizer

2- Biocontrol

www.SID.ir

Archive of SID

اکوسیستم چسبیده به سطوح یعنی همان بیوفیلم‌ها انجام می شود و از آنجایی که زندگی به شکل بیوفیلمی تغییرات چشمگیری در بعد مولکولی نیز به‌همراه دارد، بنابراین، درک ساختار بیوفیلم‌ها، پویایی و کارکردشان به بخش مهمی در میکروبیولوژی و علوم کاربردی مرتبط با آن تبدیل شده است (Seneviratne *et al*., 2010).

از سوی دیگر مسئله مهم در کاربرد موفقیت آمیز PGPRها در عرصه کشاورزی وابسته به توانایی کلنیزاسیون مؤثر ریشه گیاهان توسط آن‌ها می‌باشد. به‌دلیل حضور عوامل مشترک ژنتیکی، فرآیند کلنیزاسیون سطح گیاهان توسط جمعیت میکروبی همیار گیاه، شباهت بسیاری به تشکیل بیوفیلم در سطوح غیرزنده دارد (Wang *et al*., 2012). از آنجایی که باکتری های تشکیل دهنده بیوفیلم قابلیت برقراری ارتباط شیمیایی با یکدیگر از طریق سنجش حد نصاب[1] را دار هستند، به‌عنوان یک پیکره واحد عمل نموده و بنابراین شانس بالایی در کلنیزا سیون ریشه گیاهان در مقابل میکروب های رقیب دارند و می‌توانند به‌منظور بهره‌گیری پروبیوتیک نیز کاربرد داشته باشند (Seneviratne *et al*., 2010). لذا، نقش بیوفیلم در تعاملات گیاه میکروب نمی‌تواند ناچیز شمرده شود و آشنایی با بهبود رشد گیاه از طریق توسعه مایه تلقیح بیوفیلمی بایستی به‌صورت دیدگاهی کلان در ارتقاء رشد گیاه مورد توجه قرار گیرد.

با تمام مزایای ذکر شده در مورد زندگی بیوفیلمی باکتری ها، وجود طبیعی PGPRهای تشکیل دهنده بیوفیلم در خاک به اندازه کافی مورد بررسی قرار نگرفته است و حالت بیوفیلمی PGPRها و اعمال آن‌ها بسیار ناشناخته است. از سوی دیگر محدودیت‌های کم‌آبی در آینده نزدیک باعث خواهد شد که جهت پاسخ به مطالبات غذایی جمعیت، فعالیت های کشاورزی به مناطق کم حاصلخیزتر نیز گسترش یابد (Foley, *et al.* 2011). با عنایت به موارد مطرح شده به‌نظر می‌رسد که دستیابی به باکتری‌های بیوفیلمی رهیافتی سهل الوصول در خصوص مدیریت این چنین شرایطی چاره ساز باشد. لذا، این مطالعه به‌منظور جداسازی باکتری‌های بیوفیلمی از ریزوسفر گیاهان وحشی گندمیان منطقه هشترود، ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی ویژگی‌های مهم محرک رشدی گیاهی آن‌ها در خاک‌های غیرحاصلخیز به‌همراه مطالعه توان PGPRای آن‌ها انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب محل نمونه‌برداری

نمونه برداری‌های این مطالعه از مناطق غیرزراعی شهرستان هشترود واقع در استان آذربایجان شرقی انجام شد (شکل ۱). برای این منظور با بازدید میدانی از ۵۰ نقطه مختلف، ۵۰ نمونه ریشه گیاه به‌همراه خاک ریزوسفری از گندمیان چچم[2]، یولاف وحشی[3]، جومیش[4]، جوموشک[5] و علف گندمی ریشک‌دار[6] برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی باکتری‌ها

به این منظور برای هر نمونه بخش کوچکی از ریشه به‌همراه خاک محکم چسبیده به آن بریده شده و در داخل ۱۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژیکی استریل به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر تکانده شد. از این سوسپانسیون ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت جامد TSA[7] به‌صورت یکنواخت پخش شد. نمونه‌ها به انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شده و پس از ۱۲۰ ساعت نگهداری کلنی‌های موکوئیدی تند رشد به‌صورت چشمی انتخاب شده و پس از خالص‌سازی از آن‌ها اسلنت و ذخیره گلیسرولی تهیه شد (Timmusk *et al*, *2014*).

ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم

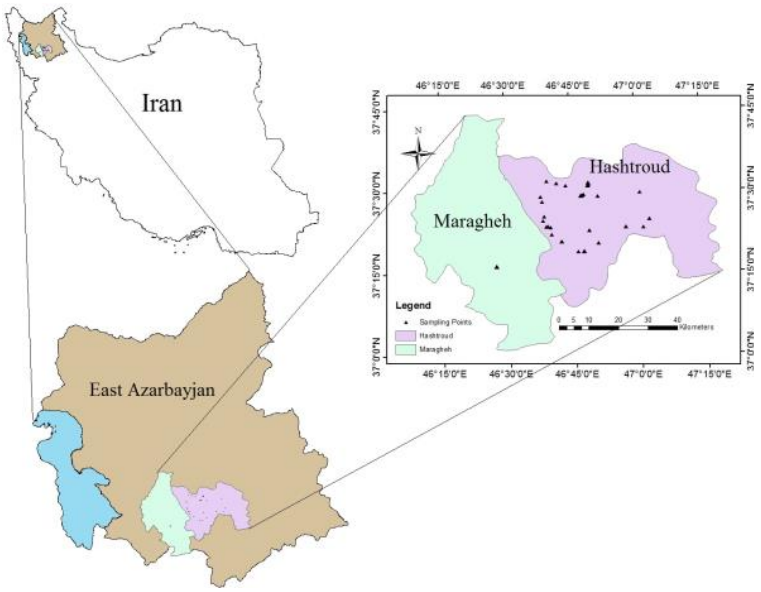
برای این منظور از روش پلیت میکروتیتر استفاده شد. ابتدا یک لوپ پر از کلنی باکتری به یک لوله حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح شده و این لوله به‌مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، قرار داده شد. پس از گذشت این مدت و یکسان سازی باکتری‌ها، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته و به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل TSB[8]، تلقیح شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از آن در داخل چاهک‌های پلیت میکروتیتر ریخته شد، این مرحله

1- Qurum sensing
2-*Lolium temulentum*
3-*Avena fatua*
4-*Bromus tectorum*
5- *Hordeum murinum*
6- *Agropyron caninum*
7- *Tripticase soya agar*
8- Tripticase soya broth

www.SID.ir

Archive of SID

با در نظر گرفتن سه تکرار انجام شد. در چاهک شاهد، فقط محیط کشت استریل TSB افزوده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، قرار داده شد. سپس، محتوای داخل چاهک‌ها، تخلیه و شستشوی چاهک‌ها یک بار با سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. پلیت‌ها به شدت تکان داده شدند تا سلول‌های غیرمتصل حذف شوند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۰ درصد به چاهک‌ها برای ثبیت سلول‌ها اضافه شده و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه و در دمای آزمایشگاه، سطح چاهک‌ها خشک شدند. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۰/۱ درصد به‌مدت پنج دقیقه، رنگ آمیزی شدند. بعد از پنج دقیقه، چاهک‌ها با آب شهری به آرامی شسته شده و با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۱۱ درصد به عنوان حلال، پر شدند. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار جذب نوری در چاهک‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر، توسط دستگاه ELISA Reader خوانده شده و بر اساس عدد به‌دست آمده از آن باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم به‌صورت زیر گروه‌بندی شدند: بدون چسبندگی (OD<ODc)، چسبندگی ضعیف (ODc<OD<2xODc)، چسبندگی متوسط (2xODc<OD<4xODc)، چسبندگی قوی (4xODc<OD) و روشناور. در این راستا، OD میزان جذب طول موج ۵۷۵ نانومتر برای هر نمونه و ODC میزان جذب طول موج ۵۷۵ نانومتر برای شاهد بدون باکتری می‌باشد. در حالت روشناوری باکتری در سطح محیط کشت به صورت یک لایه نازک در بیوفیلم رشد می‌کند (Srdjan *et al.*, 2000).



شکل ۱- نقاط نمونه برداری در شهرستان هشترود، آذربایجانشرقی، ایران

Figure 1. Sampling site in Hashtrood, East Azerbaijan, Iran

آزمون مقاومت به خشکی

برای آزمون مقاومت به خشکی باکتری‌ها از محیط کشت TSA با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد سوربیتول، استفاده شد. پس از تهیه این محیط کشت‌ها، هر ظرف پتری به ۱۶ قسمت مساوی تقسیم شد. در هر ظرف پتری چهار جدایه با سه تکرار کشت شده و به‌مدت سه شبانه روز در گرم‌خانه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای کشت این جدایه‌ها نخست هر جدایه به‌صورت جداگانه در داخل پنج میلی‌لیتر محیط کشت TSB به‌صورت شبانه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور رشد داده شدند و از این کشت باکتریایی میزان پنج میکرولیتر روی محیط کشت حاوی سوربیتول منتقل شد. پس از اتمام آزمایش توان زنده‌مانی و رشد جدایه‌ها ثبت شد (Kavamura *et al.*, 2013).

آزمون توانایی تولید اکسین

بدین منظور، ابتدا جدایه‌ها به‌مدت یک شب در محیط TSB کشت داده شدند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری ها با سه تکرار به محیط LB[1] حاوی پنج میلی‌مولار ال-تریپتوفان منتقل شده و برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تکان داده شدند. این سوسپانسیون‌ها سانتریفیوژ شده و آنگاه یک میلی‌لیتر از محلول رویی با چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی (شامل ۱۵۰میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵/۷ میلی‌لیتر کلرید آهن نیم مولار) مخلوط شدند. مخلوط حاصل به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق و در شرایط تاریکی نگهداری شده و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شدند. محلول‌های استاندارد برای تخمین میزان تولید این هورمون شامل صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ ، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر از اسید ایندول استیک بودند (Bent *et al.*, 2000).

آزمون توانایی تولید ACC دآمیناز

برای این منظور جدایه‌ها در پنج میلی‌لیتر محیط کشت TSB در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از رشد مطلوب تا فاز سکون سلول‌ها با سانتریفیوژ جمع‌آوری شده و دو بار با بافر ۰/۱ مولار Tris-HCl (pH=7.5) استریل شستشو داده شدند و در دو میلی‌لیتر محیط کشت DF[2] با غلظت نهایی سه میلی‌مولار ACC در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۶ ساعت روی شیکر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. فعالیت ACC دآمیناز با اندازه‌گیری آلفا-کتوبوتیرات تولید شده در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Saleh&Glick, 2001). برای برآورد میزان تجزیه ACC محلول‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار آلفا کتوبوتیرات به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند (Khan & Lee, 2016).

آزمون توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول

به‌منظور بررسی توان جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول، از محیط کشت اسپربر مایع (شامل ۱۰ گرم کلوکز، نیم گرم عصاره مخمر، ۰/۱۴ گرم از $Ca_3(PO_4)_2$ ، ۰/۳۲ گرم از $CaCl_2$ و ۲/۵ گرم از $MgSO_4.7H_2O$ استفاده شد. برای این منظور جدایه‌ها در پنج میلی‌لیتر محیط کشت TSB در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. میزان ۲۰۰ میکرولیتر از این کشت شبانه به لوله‌های حاوی محیط کشت اسپربر مایه‌زنی شده و به‌مدت سه روز روی شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تکان داده شدند و سپس سوسپانسیون هر باکتری سانتریفیوژ شده و غلظت فسفر در مایع روشناور با روش مولیبدات- وانادات ارزیابی و با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر قرائت شد (Nosrati *et al.*, 2015). شاهد این ارزیابی محیط کشت بدون باکتری بود که در سه تکرار انجام شد.

آزمون توانایی آزادسازی پتاسیم از کانی حاوی پتاسیم (مسکوویت)

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری به پنج میلی‌لیتر محیط مایع الکساندروف (گلوکز (پنج گرم)، مسکوویت نامحلول پودری (سه گرم)، $MgSO_4.7H_2O$ (نیم گرم)، $CaCO_3$ (یک دهم گرم)، $FeCl_3$ (شش هزارم گرم) و $Ca_3(PO_4)_2$ (دو گرم) در لیتر) با سه تکرار تلقیح شد. نمونه‌ها به‌مدت هفت روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار داده شدند. در ادامه باکتری‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و مقدار پتاسیم آزاد شده در روشناور با استفاده از روش فلیم فوتومتری مورد سنجش قرار گرفت (Archana *et al.*, 2013). هم‌چنین، نمونه شاهد با محیط کشت بدون باکتری در سه تکرار تهیه شد.

ارزیابی توان تولید سیدروفور

برای این منظور مقدار ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت شبانه باکتری‌ها به‌صورت نقطه‌ای و در سه تکرار روی محیط کشت CAS آگار قرار گرفتند. تولید یک هالهٔ نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتری مؤید تولید سیدروفور و جدا شدن آهن از CAS است. قطر این هاله پس از سه روز محاسبه شد (Gupta & Gopal, 2008).

شناسایی ژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه

به این منظور از کشت تازه باکتری‌ها DNA استخراج شده و با استفاده از پرایمر های اختصاصی 27F (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) و 1492R (5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3) در دستگاه ترموسایکلر منطقه 16S rDNA باکتری‌ها تکثیر شده و پس از حصول اطمینان از تکثیر بر روی آگارز

1- Luria Bertani

2- Dworking and Foster minimal medium

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۵ درصد، با استفاده از دستگاه توالی یاب به روش سانجر و کالسون (Sanger & Coulson, 1975) در موسسه هلمهولتز آلمان بخش تحقیقات اکولوژیکی توالی‌یابی شده و با استفاده از بانک اطلاعاتی و برنامه BLAST باکتری‌ها شناسایی شدند (Timmusk, *et al.* 2014).

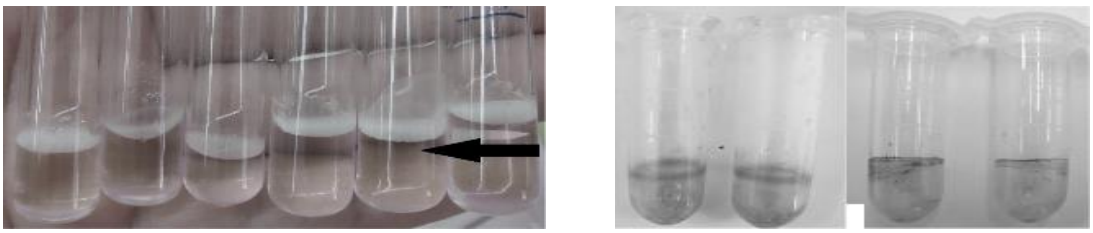
نتایج و بحث

جداسازی باکتری‌های بیوفیلمی

در مجموع با بررسی کلنی‌های موکوئیدی، ۱۲۸ جدایه باکتریایی تند رشد از ریزوسفر پنج گونه غیرزراعی گرامینه جداسازی شدند.

توانایی تشکیل بیوفیلم و شناسایی ژنتیکی باکتری‌ها

بیوفیلم های میکروبی در شرایط سکون در محیط کشت‌های میکروبی تحت شرایط هوازی می‌توانند روی سطح جامد[1] در دیواره و یا ته ظرف و یا روی سطح محیط کشت مایع به حالت رو شناور تشکیل شوند که حالت اخیر با اسامی مختلفی[2] در منابع علمی گزارش شده است (Stewart & Franklin, 2008). بر طبق نتایج این بررسی از بین ۱۲۸ باکتری مورد مطالعه بالغ بر ۹۰ درصد آن‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند و هر دو نوع بیوفیلم مذکور در آن‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۲).



شکل ۲- تشکیل بیوفیلم روشناور متصل به دیوار در سطح محیط کشت *TSB* (سمت چپ) و تشکیل بیوفیلم در سطح داخلی لوله پلاستیکی بعد از رنگ آمیزی با کریستال ویوله (سمت راست)

Figure 2. Pellicle formation in connection to tube wall on TSB medium surface (left) and biofilm formation at inner surface of plastic vial after Crystal violate staining (right)

بیوفیلم روشناور با چشم به راحتی قابل مشاهده بود، ولی سنجش بیوفیلم چسبیده (SSA) بر سطوح جامد با رنگ آمیزی به‌وسیله کریستال ویوله ارزیابی شد (شکل ۲). این دسته از باکتری‌های SSA بر مبنای توانایی اتصال و چسبندگی طبق روش سرجان و همکاران (Srdjan *et al.*, 2000) در چهار گروه دسته‌بندی شدند. ادامه مطالعه با استفاده از تمامی باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم روشناور و باکتری‌های به شدت چسبنده گروه (SSA) انجام شد که در مجموع ۶۴ ایزوله از ۱۳۰ ایزوله جداسازی شده را در بر می‌گرفتند (شکل ۳).

نتایج بررسی و شناسایی ژنتیکی این ۶۴ باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم نشان داد که این باکتری‌ها متعلق به جنس‌های *باسیلوس*[3]، *سودوموناس*[4]، *پنی باسیلوس*[5]، *آرتروباکتری*[6]، *پانتوآ*[7] و *استافیلوکوک*[8] بوده و بالغ بر ۸۰ درصد باکتری‌های جداسازی شده متعلق به جنس *باسیلوس* می‌باشند (شکل ۴).

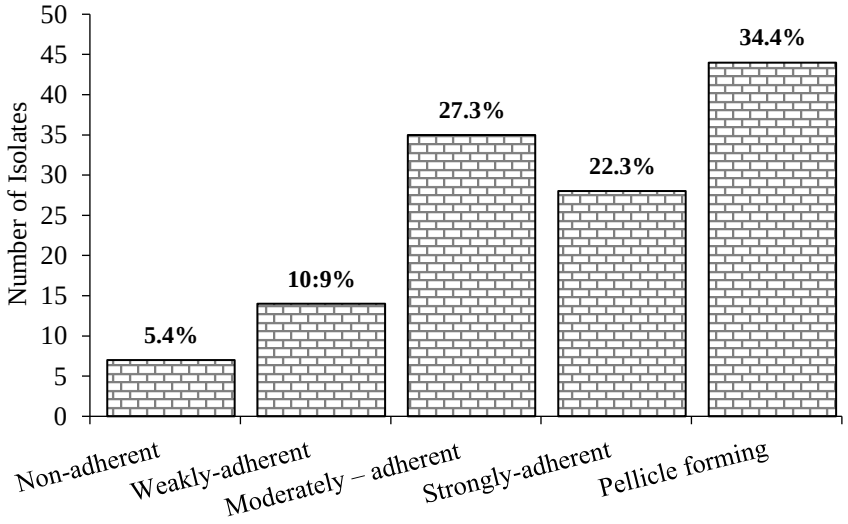
از آنجایی که جمعیت میکروبی ریزوسفری معمولاً متأثر از اثر ریزوسفری بوده و به‌وجود فاکتورهای جذب و دفع میکروبی در ریزوسفر از جمله ترشحات گیاه وابسته است. لذا به‌نظر می‌رسد که در شرایط این مطالعه گیاهان گندمیان غیرزراعی ارتباط هم‌زیستی مناسبی با جنس *باسیلوس* دارند. از سوی دیگر، از آنجایی که اغلب *باسیلوس‌ها* واجد ویژگی‌های فیزیولوژیکی سودمندی نظیر وجود دیواره سلولی چند لایه، توانایی تولید اندو اسپور، تولید آنتی بیوتیک، مولکول‌های سیگنال پپتیدی و آنزیم‌های برون سلولی می‌باشند؛ لذا بقا و توزیع آن‌ها در محیط‌های پر تنش مانند خاک نسبت به سایر میکروب‌ها شرایط مطلوب‌تری دارد. پاندی و همکاران

1- Surface-associated (SSA) biofilms
2- Air-Liquid Interface (ALI), pellicle, floating biofilm
3- *Bacillus*
4- *Pseudomonas*
5- *Paenibacillus*
6- *Arthrobacter*
7- *Pantoea*
8- *Staphylococcus*

www.SID.ir

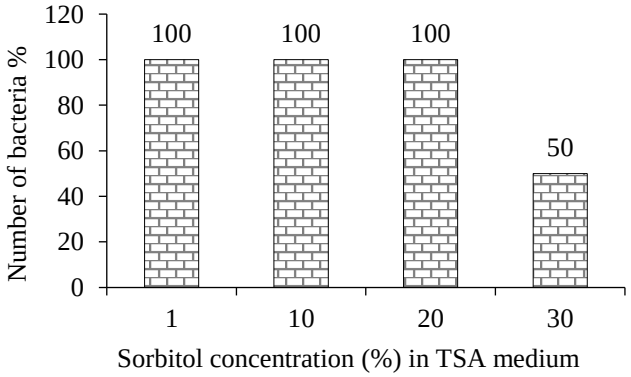
Archive of SID

(Pandey & Palni, 1997) با مطالعه جمعیت میکروبی ریزوسفر در گیاه چای نشان دادند که *باسیلوس‌ها* غالب‌ترین جمعیت باکتریایی را دارا بوده و از بین گونه‌های مختلف *باسیلوس* دو گونه *B. subtilis* و *B. mycoides* دارای بیش‌ترین جمعیت میکروبی بودند. این محققین با شمارش جمعیت میکروبی دریافتند که این دو گونه از *باسیلوس‌ها* دارای پتانسیل کلنیزاسیون مطلوب‌تری در گیاه چای نسبت به بقیه باکتری‌ها می‌باشند. تشکیل بیوفیلم در اغلب باکتری‌ها گزارش شده است و تقریباً ۸۰ درصد آن‌ها در طبیعت زندگی به شکل بیوفیلمی (دسته جمعی در داخل محفظه‌ای پلیمری) را نسبت به حالت پلانکتونی (آزادزی) ترجیح می‌دهند. این شیوه زندگی تصادفی نبوده و تحت کنترل ژنتیک موجود بسته به شرایط محیطی می‌باشد و مزایای فراوانی برای باکتری علاوه‌بر استفاده از محفظه پلیمری به‌عنوان سپر حفاظتی در خصوص بهره‌مندی از مزایای حد نصاب و انتقال افقی ژن به‌همراه دارد (Yan *et al*., 2016). به‌طور شگفت‌آوری تمام باکتری‌هایی که بیوفیلم روشناور را تشکیل می‌دادند از گروه *باسیلوس‌ها* بودند که در زمره قویترین شکل بیوفیلم‌ها محسوب می‌شود. *باسیلوس‌ها* از جمله باکتری‌های ریزوسفری هستند که در زمینه تشکیل بیوفیلم بسیار مورد توجه می‌باشند.



شکل ۳- گروه‌بندی توانایی تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها (تعداد و درصد)

Figure 3. Categorization of biofilm forming ability of bacteria (number and percentage).
Non-adherent OD<ODc, Weakly-adherent (ODc< OD<2xODc), Moderately – adherent (2xODc<OD< 4xODc), Strongly-adherent (4xODc < OD) and Pellicle forming
OD_C: OD_{595} for control OD: OD_{595} for samples



شکل ۴- شماری از باکتریهای مقاوم به کم‌آبی روی محیط کشت TSB در غلظت‌های مختلف سوربیتول.

Figure 4. Number of water deficite tolerance bacteria on the TSB medium with diffrent sorbitol concentration

www.SID.ir

Archive of SID

بر طبق مطالعات موریکاوا و همکاران (Morikawa *et al.*, 2016) با بررسی تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های *B. subtilis* و *B. cereus* عوامل ژنتیکی درگیر در فرآیند تشکیل بیوفیلم را بررسی نمودند و ژن comER را به‌عنوان عامل مهم در تشکیل بیوفیلم معرفی کرده‌اند. شرایط تخلیه اکسیژنی و تولید گاما-پلی گلوتامات از شرایط اولیه تشکیل این نوع بیوفیلم در باکتری *B. subtilis* محسوب می‌شوند. یان و همکاران (Yan *et al.*, 2016) اخیراً تأثیر مثبت باکتری‌های بیوفیلمی محرک رشد در رشد گیاهان در شرایط تنش را گزارش کرده‌اند. در این راستا، *B. subtilis* GB03، *P. polymyxa* و *B. amyloliquefaciens* به‌عنوان باکتری‌های بیوفیلمی توانسته‌اند عملکرد گیاهان در شرایط تنش کم‌آبی را بهبود ببخشند (Abd El-Daim, 2015).

کسیم و همکاران (Kasim *et al.*, 2016) با جداسازی باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم در مصر و شناسایی ژنتیکی برخی از آن‌ها با تلقیح *B. amyloliquefaciens* به دو کولتیوار گیاه جو کارایی این باکتری را در رشد گیاه جو تحت شرایط تنش شوری بسیار مطلوب ارزیابی نموده‌اند. تیموسک و همکاران (Timmusk *et al.*, 2014) در آزمایشی با باکتری جنس *پنی باسیلوس* تشکیل دهنده بیوفیلم، اثر آن‌ها را در تحمل به تنش کم‌آبی در گیاه گندم و بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فرآیندهای دفاعی گیاه میزبان بر ضد تنش کم‌آبی گزارش نموده‌اند و با بررسی‌های میکروسکوپی کلینیزاسیون مؤثر توسط آن در ریشه گیاه گندم را به اثبات رساندند. کریمی و همکاران (Karimi *et al.*, 2017) با انجام آزمایشی گلدانی تحت شرایط تنش کم‌آبی تأثیر سه باکتری مختلف از جنس *باسیلوس* با قدرت تشکیل بیوفیلم بر رشد گندم را مورد بررسی قرار دادند. بر طبق نتایج این محققان، مایه‌زنی باکتریایی با بهبود فعالیت های آنزیم‌های آنتی اکسیدان باعث افزایش عملکرد زیستی شده و معماری ریشه گندم تغییر یافت. از این‌رو، سنوراتین و همکاران (Seneviratne *et al.*, 2008) کودهای زیستی بیوفیلمی را نسل جدیدی از این کودها ذکر نموده و به‌عنوان یک معیار برای گزینش میکروب‌های محرک رشد معرفی کردند. با توجه به یافته های فوق به‌نظر می‌رسد باکتری های جنس *باسیلوس* موفقیت زیادی را در این خصوص به‌همراه خواهند داشت.

مقاومت به تنش کم آبی

بر اساس رابطه $\Psi = RT \ln a_w$ (a_w فعالیت آبی، T دما بر حسب کلوین، R ثابت گازی) غلظت‌های سوربیتول مورد استفاده در ایجاد تنش برای انجام این مطالعه که به‌ترتیب برابر با ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد بود، می‌توانند باعث منفی شدن پتانسیل آب به میزان ۱۱/۳۸، ۲۴/۹- و ۳۶/۳- بار در محیط کشت باکتری گردند. نتایج این بخش نشان داد که تمامی باکتری‌های مورد مطالعه بدون هیچ تغییری در روند رشد نسبت به کنترل (یک درصد سوربیتول) در ۱۰ درصد سوربیتول به‌خوبی قادر به رشد بودند. تمامی باکتری‌ها با اندک تغییراتی قادر به رشد در محیط کشت حاوی ۲۰ درصد سوربیتول بودند ولی، فقط ۵۰ درصد از باکتری های مورد مطالعه توانستند در محیط کشت حاوی ۳۰ درصد سوربیتول رشد کنند (شکل ۵). جالب توجه آن هست که اعمال تنش کم‌آبی با افزایش غلظت سوربیتول در برخی از باکتری‌های مورد بررسی، ریخت شناسی کلنی به شکل مشهودی تغییر یافته و دامنه کلنی و لزجیت آن بیش‌تر می‌شد (شکل ۵).

با توجه به اینکه در پتانسیل ایجاد شده در غلظت ۳۰ درصد سوربیتول (۲۴/۹- بار) گیاهی قادر به رشد نخواهد بود، لذا، نتایج این بخش نشان داد که تمامی باکتری‌های مذکور احتمالاً می‌توانند در شرایط کم‌آبی در خاک نقش‌های اکولوژیکی خود را به‌خوبی انجام دهند. در کنار تنظیمات اسمزی ناشی از پاسخ دفاعی باکتری به شرایط تنش کم‌آبی افزایش ترشحات پلیمری باکتری ها که آلگینات، سلولز و پلی ان-استیل گلوگز[1] آمین از شناخته شده‌ترین آن‌ها می‌باشند، تأثیر بسزایی در روند حفظ رطوبت در اطراف کلنی باکتری‌ها دارا می‌با شند. بر طبق مطالعه چانگ و همکاران (Chang *et al.*, 2007) در شرایط تنش کم‌آبی ترشح آلگینات بوسیله *Pseudomonas putida* علاوه‌بر تأثیر در معماری بیوفیلم این باکتری، باعث ایجاد محیط هیدراته در اطراف باکتری شده و موجب افزایش قدرت تحمل آن به شرایط کم‌آبی شد. این محققان هم‌چنین گزارش کردند که در

1- Alginate, Cellulose and Poly N-acetylglucosamine

www.SID.ir

Archive of SID

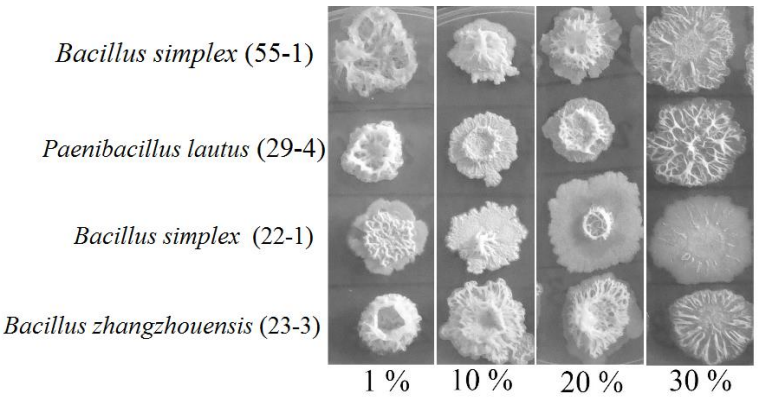
شرایط کم‌آبی این باکتری آلگینات بیش‌تری را نیز تولید می‌کند. عبدالدایم (Abd El-Daim, 2015) با انجام مطالعه‌ای با باکتری ریزوسفری AZP2 در شرایط تنش کم‌آبی علاوه‌بر تأیید نقش مثبت این باکتری در بهبود عملکرد گندم تشکیل بیوفیلم در ریزوسفر را به دلیل ماهیت پلی‌ساکاریدی عامل مهمی برای حفظ رطوبت در اطراف ریشه گزارش کرده است.

نتایج بررسی ویژگی‌های محرک رشدی جدایه‌های مورد مطالعه

نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی توانایی‌های متفاوت و معنی‌داری در ارتباط با صفات محرک رشدی دارا هستند (جدول ۱).

توانایی تولید اکسین

تمامی باکتری‌های این مطالعه قادر بودند که هورمون اکسین را در حضور پیش ماده آن یعنی ال-تریپتوفان تولید کنند. توانایی باکتری‌های مورد مطالعه از این نظر متنوع بود و دامنه تولید اکسین در آنها بین ۱۰ تا ۶۵ میلی‌گرم در لیتر متفاوت بود که برخی از کارآمدترین آن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. بیش از ۸۰ درصد باکتری‌های ریزوسفری قادر به تولید هورمون اکسین می‌باشند. اکسین به‌طور گسترده‌ای ریشه گیاه را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. افزایش اندازه، وزن و شمار انشعابات ریشه از مواردی هستند که متاثر از اکسین بوده و بنابراین با قرار گرفتن حجم بیش‌تری از خاک در اختیار گیاه میزان دسترسی به عناصر در آن و نهایتاً عملکرد افزایش می‌یابد. یکی دیگر از نتایج مهم تلقیح با باکتری تولید کننده اکسین تشکیل ریشه‌های نابجا با منشاء ساقه‌ای است. هم‌چنین، اکسین باعث تمایز بخشی از بافت ساقه به‌عنوان بافت ریشه‌ای می‌شود (Kumar & Saraf, 2015). ترشح اکسین در حالت بیوفیلمی در PGPRها به‌میزان بیش‌تری در مقایسه با زندگی پلانکتونی صورت می‌گیرد (Seneviratne *et al*., 2008).



شکل ۵- تغییرات مرفولوژیکی کلنی برخی از جدایه ها با قابلیت تشکیل بیوفیلم روشناور با غلظتهای مختلف سوربیتول TSA در محیط کشت

Figure 5. Morphological variation of bacterial colonies in different concentrations of sorbitol (1, 10, 20 and 30 %) by four pellicle forming bacteria.

جدول ۱- تجزیه واریانس خصوصیات محرک رشد گیاهی در ۶۸ باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم

Table 1. Analysis of variance PGP ability in 68 biofilm forming bacteria

Source of variation	df	MS			
		K relaesing	P solublization	ACC deaminase	Auxin production
Bacteria	68	3416**	6632**	0.799**	338**
Error	124	184	135	0.06585	7.97
CV (%)		9.50	38.1	35.8	17.6

www.SID.ir

Archive of SID

توانایی تولید ACC دآمیناز

تمامی باکتری‌های جداسازی شده قادر بودند که پیش ماده تولید اتیلن ۱-آمینو سیکلو پروپان-۱-اسید کربوکسیلیک (ACC) تجزیه نموده و آن را به‌عنوان منبع نیتروژن مورد استفاده قرار دهند توان برخی از این جدایه‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

اتیلن هورمون مهمی بوده که می‌تواند تأثیر مضری بر رفتار رشدی گیاهان خشکی‌زی داشته و رشد آن را محدود کند. از این دیدگاه جلوگیری از تولید این هورمون توسط ریز موجودات همراه ریشه آن می‌تواند به‌عنوان یک تغییر فیزیولوژیکی برون ساختاری در تعاملات میکروب گیاه با سودمندی دوجانبه مطرح باشد و هر قدر این توانایی در ریزموجود بالاتر باشد می‌توان ادعا نمود که به همان میزان سودمندی باکتری برای گیاه بیش‌تر است. معدودی از باکتری‌های PGPR آنزیم ACC-دآمیناز تولید می‌کنند و این آنزیم می‌تواند ACC را به کتوبوتیرات و آمونیوم تبدیل نموده و میزان تولید اتیلن را در گیاهان در حال رشد و یا در معرض استرس کاهش دهد. کلنیزاسیون ریشه گیاهان با اینگونه از PGPRها با کاهش سطح تولید اتیلن از تأثیر سوء تنش‌های محیطی مانند خشکی، پاتوژن‌های گیاهی، خشکی و عناصر سنگین می‌کاهد (Kumar & Saraf, 2015).

جدول ۲- برخی از ایزوله‌ها با توانایی نسبتا بالای تولید ایندول استیک اسید در محیط کشت LB حاوی پنج میکرومولار پس از ۳ روز

Table 2. Some isolates with relatively higher IAA production in LB medium with 5 mM tryptophan after 3 days.

Bacteria	Type of biofilm	Production ($\mu g\ mL^{-1}$)
Bacillus atrophaeus 10-1	Strongly-adherent (4xODc < OD)	18.07
Bacillus toyonensis 29-2		45.33
Paenibacillus lautus 29-4		29.72
Bacillus simplex 32-1		62.08
Bacillus simplex 38-2		37.06
Bacillus simplex 40-1		39.20
Bacillus atrophaeus 54-1	Pellicle	30.35
Bacillus simplex 8-3		19.25
Bacillus zhangzhouensis 23-3		20.14
Bacillus simplex 31-2		32.19
Bacillus mojavensis 34-3		22.79
Bacillus atrophaeus 39-2		23.98
Bacillus simplex 42-2		21.76
Bacillus velezensis 45-4		19.72
Bacillus zhangzhouensis 47-2		22.95
Bacillus simplex 48-2		20.14
Staphylococcus petrasii 52-1		39.60

توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول

از بین ۶۸ باکتری به استثنای پنج جدایه، سایر جدایه‌ها قادر بودند که فسفر مورد نیاز خود را از منبع تری کلسیم فسفات بدست آورند. نتایج این مطالعه نشان داد که قدرت انحلال این منبع نامحلول فسفات در خاک توسط باکتری‌های مورد مطالعه با سرعت یکسانی انجام نگرفته و قابلیت آن‌ها در این زمینه متفاوت است. در تمامی موارد مقدار شاهد از مقادیر به دست آمده برای نمونه‌ها کسر شدند. کم‌ترین میزان آن صفر و بیش‌ترین مقدار آن ۲۵۱ قسمت در میلیون متعلق به باکتری *Bacillus simplex* جدایه ۱-۳ بود. اگرچه اغلب باکتری‌های مورد بررسی توانایی قابل توجهی در این زمینه نداشتند ولی در بین باکتری‌های مورد بررسی تعداد معدودی از آن‌ها به‌طور محسوسی توانستند فسفر را از این منبع نامحلول آزاد سازی کنند (جدول ۳). نقش باکتری‌ها در حلالیت فسفر در سال ۱۹۰۳ شناخته شد و هم اکنون مشخص شده که این قابلیت به‌واسطه ترشح اسیدهای آلی شلات کننده مانند استیک، لاکتیک، مالیک، سوکسینیک، تارتاریک، گلوکونیک، ۲-کتوگلوکونیک، اگزالیک و سیتریک توسط میکروب‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

صورت می‌گیرد (Kumar & Saraf, 2015). تخمین زده می‌شود که PSB[1]ها حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد جمعیت میکروبی خاک را شامل می شوند و از بین آن‌ها قسمت عمده و کارآمدتر از نظر پویایی متابولیکی در ریزوسفر گیاهان قرار دارند. قابلیت دسترسی فسفر در اغلب خاک‌ها یک میکروگرم بر لیتر بوده در حالی که گیاهان برای رشد مطلوب تقریباً ۳۰ میکرومول بر لیتر نیاز دارند و بنابراین به‌نظر می‌رسد که باکتری‌های ریزوسفری نقش عمده‌ای در تأمین فسفر گیاهان دارند. جایا سینگراکی و سنو یراتن (Jayasinghearachchi & Seneviratne, 2006) نشان داده‌اند که کاربرد مستقیم FRBs[2] در خاک فسفر قابل استفاده را ۱۵ برابر افزایش داده است و این ماده تلقیح بیوفیلمی را می‌توان به‌طور مؤثر در حلالیت زیستی سنگ فسفات استفاده کرد.

توانایی رهایش پتاسیم از کانی مسکوویت

تمامی جدایه‌های مورد مطالعه توانستند باعث رهایش پتاسیم از کانی مسکوویت شوند. میزان آزادسازی بین ۹۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. پتاسیم سومین عنصر پرمصرف گیاهی بوده که بیش از ۹۰ درصد این عنصر در خاک در شکل نامحلول آن در سنگ‌ها و کانی‌های خاک جای گرفته و برای گیاه به شکل غیرقابل دسترس هستند. گزارش شده است که باکتری‌های ریزوسفری KSB[3] می‌توانند پتاسیم را از منابع نامحلول آن یعنی میکا، ایلایت و ارتوکلاز از طریق فرآیندهایی نظیر تولید اسیدهای آلی آزاد کرده و به شکل محلول در بیاورند (Saiyad *et al*., 2015). در مطالعه‌ای که توسط ژانگ و کونق (Zhang & Kong, 2014) انجام گرفته است میزان آزادسازی پتاسیم از کانی‌های نامحلول توسط ۲۷ جدایه باکتریایی بین ۰/۵۹ تا ۴/۴ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود. نتایج مایه‌زنی برخی از این باکتری‌ها همراه با پودر فلدسپار میکا در کشت تنباکو نشان داد که میزان پتاسیم محلول در تیمارهای مایه‌زنی شده در ریزوسفر گیاه تنباکو نسبت به شرایط بدون تلقیح به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. بر طبق نتایج به‌دست آمده جدایه‌های مورد مطالعه توانستند به میزان قابل توجهی باعث آزادسازی این عنصر از کانی مسکوویت شوند. از آنجایی که این کانی یکی از مهم‌ترین منابع نامحلول پتاسیم در خاک‌های جوان نظیر خاک‌های کشور ما محسوب می‌شود، بنابراین به‌نظر می‌رسد در صورت تلقیح گیاهان با این جدایه‌ها بخش قابل توجهی از نیاز گیاهی با تکیه بر این منبع تأمین شود.

توانایی تولید سیدروفور

نتایج این بخش که با ایجاد هاله نارنجی و زرد رنگ در اطراف کلنی‌ها در محیط کشت CAS-agar مشخص می‌شد، نشان داد که از بین ۶۸ باکتری فقط سه باکتری *Bacillus simplex* 36-1، *Bacillus mojavensis* 25-3 و *Bacillus simplex* 32-1 در بین باکتری‌های مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور را دارا بودند. نسبت قطر هاله به قطر کلنی باکتری در این باکتری‌ها به‌ترتیب برابر با ۱، ۲/۵ و ۱/۷ بود. نتایج تحقیقات نشان داده است که باکتری‌های ریزوسفری می‌توانند با تولید سیدروفورهای مختلف به روند جذب آهن کمک کنند، سیدروفور عامل کلاتکننده مهمی برای آهن فریک بوده و می‌تواند باعث جذب آهن در محیط‌هایی شود که قابلیت جذب آن کم می‌باشد (Ipek & Estiken, 2017). هم‌چنین، تولید سیدروفور عامل مهمی در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا نیز محسوب می شود. با توجه به اینکه گیاهان گندمیان به لحاظ تأمین آهن دارای فرآیند کارآتری هستند از این‌روبه‌نظر می‌رسد که باکتری‌های ریزوسفری در این خصوص نقش زیادی بر عهده ندارند (Crowley *et al*., 1991).

جدول ۳- برخی از ایزوله‌ها با توانایی نسبتاً زیاد در حلالیت TCP

Table 3. Some isolates with relatively higher ability to solubilize TCP.

P solublization rate (mg l^{-1})	Bacteria
251	*Bacillus simplex* 3-1
109	*Bacillus aryabhattai* 27-1
110	*Bacillus simplex* 32-1
191	*Bacillus zhangzhouensis* 38-2
185	*Bacillus simplex* 49-1
153	*Bacillus mojavensis* 31-2

1- phosphate-solubilizing bacteria (PSB)
2- Fungal-Rhizobium biofilm
3- K Soloblization Bacteria

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- برخی از باکتریهای مؤثر به همراه خصوصیات مورد مطالعه آنها، که می‌توانند برای آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای پیشنهاد شوند

Table 4. Some of effective bacteria with their studied traits which can be suggested for greenhouse or field experiments

Bacteria	Strain	Biofilm forming ability OD=595 nm	IAA production µgr.ml^{-1}	ACC deaminase activity µMol. 36 hr^{-1}	P solubilizing ability (mgr.l^{-1})	K releasing ability from muscovite (mgr.l^{-1})
Bacillus atrophaeus	10-1	0.34	18.07	0.46	00.00	141.55
Bacillus toyonensis	29-2	0.68	45.33	0.65	00.00	147.61
Paenibacillus lautus	29-4	0.31	29.72	1.33	29.99	138.31
Bacillus simplex	32-1	0.66	62.08	0.20	110.19	125.45
Bacillus atrophaeus	54-1	0.55	30.35	0.90	00.00	141.80
Bacillus simplex	8-3	Pellicle forming	19.25	1.25	11.09	011.50
Bacillus toyonensis	18-2		17.13	0.83	10.22	103.25
Bacillus zhangzhouensis	23-3		20.14	0.95	14.46	150.71
Bacillus atrophaeus	39-2		23.98	2.14	14.57	125.41
Bacillus velezensis	45-4		19.72	1.04	26.30	130.60

نتیجه گیری کلی

مجموعه باکتریایی حاضـــر از مناطق غیرزراعی و دارای خاک‌های غیر حاصـلخیز جداســازی شــدند. با توجه به اینکه اغلب جدایه‌ها از جنس *باسـیلوس* بودند، لذا به‌نظر می‌رسـد که سـازگاری در ریزوسـفر و توانایی آن‌ها برای فعالیت در ریزوســفر مطلوب‌تر از بقیه باکتری‌ها باشــد. تشکیل بیوفیلم در کنار مقاومت مناسب آن‌ها برای رشد و فعالیت در شــرایط تنش اســمزی و ماتریک، آن‌ها را گزینه مناســبی برای کاربرد در کشــاورزی دیم مطرح می‌کند. همانگونه که در جداول ۲ و ۳ اشاره شده است عده‌ای از آن‌ها دارای توانایی بالایی در تولید هورمون اکسین بوده و فعالیت آنزیم ACC دآمیناز در آن‌ها بسیار مطلوب می‌باشــد. بنابراین، مزیت دیگر آن‌ها احتمالاً تغییر معماری ریشــه خواهد بود که خود عامل مهمی در سازگاری گیاهان به شرایط تنش کم‌آبی است. از سوی دیگر تأمین عناصــر که در شــرایط تنش کم‌آبی دچار اختلال می‌شــود ممکن اســت با کاربرد این باکتری‌ها بهبود پیدا کند. جدول ۴ بیانگر باکتری‌هایی اســت که می‌توان از این مجموعــه بــه‌عنوان گزینــه آزمون‌هــای گلخانه‌ای و مزرعه‌ای ترجیحاً پیشنهاد کرد.

تشکر و قدردانی

نویســندگان این مقاله از مدیریت و کارکنان اداره جهاد کشاورزی شهرستان هشترود در استان آذربایجان شرقی به دلیل پشتیبانی و ایجاد شرایط لازم برای نمونه‌برداری از نقاط مختلف شــهرســتان نهایت تشــکر و قدردانی را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Abd El-Daim I.A., 2015. Use of rhizobacteria for the alleviation of plant stress PhD. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

Alami Y., Achouak W., Marol C., and Heulin T. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing Rhizobium sp. strain isolated from sunflower roots. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 3393-8.

Archana D.S., Nandish M.S., Savlagi V.P. and Alagawadi A.R. 2013. Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizospher soil. *Bioinfolet*, 10: 248-257.

Bent E., Tuzan S., Chanway C.P. and Enebak S. 2000. Alteration in plant growth and in root hormone levels of *lodgeple pines* inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 793-800.

Chang W.S., van de Mortel M., Nielsen L., Nino de Guzman G., and Li X. 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 189: 8290–8299.

Crowley D.E., Wang Y.C., Reid C.P.P., and Szaniszlo P.J. 1991. Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil*, 130 :179-198.

E.E.A., 2011. Europe's Environmentan Assessment of Assessments. European Environment Agency, Copenhagen.

Fleury D., Jefferies S., Kuchel H. and Langridge P. 2010. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61: 3211–3222.

Foley J.A., Ramankutty N., Brauman K.A., Cassidy E.S., and Gerber J.S. 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478: 337–342.

Glick B.R, 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169: 30–39.

Gupta A., and Gopal M. 2008. Siderophore production by plant growth promoting rhizobacteria. *Indian Journal of Agricultral Research*, 42: 153 -156.

Ipek M., and Estiken A. 2017. The action of PGPR on micronutrient availability on soil and plant under calacareous soil condition: An evalution over Fe nutrition. *Plant and Microb Interaction in Agro-Ecological*, 5: 81-100.

Jayasinghearachchi H.S., and Seneviratne G. 2006. Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal–rhizobial biofilms. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 405-408.

Karimi E., Aliasgharzad N., Neishabouri M. R., and Esfandiari E. 2017. Effect of biofilm PGPRs in alleviation of terminal growth stage water shortage on wheat's component yield and root. *Iranian Journal of Dryland Agriculture*, 6: 89-102. (In Persian)

Kasim W.A., Gaafar RM, Abou-Ali R.M, Omar M.N., and Hewait H.M. 2016. Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Science*, 61: 217–227.

Kavamura V.N., Santos S.N., Silva J.L., Parma M.M., Avila L.A., Visconti A., Zucchi T.D., Taketani R.G., Andreote F.D., Melo I.S. 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research*, 168: 183–191.

Khan L.A., Lee I.J. 2016. Indol acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21: 58-64.

Kumar J.C., and Saraf M. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Journal of Agricultural Research and Development*, 5:0108-0119:

Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R., and Kanaya S. 2006: Biofilm formation by a Bacillus subtilis strain that produces c-polyglutamate. *Microbiology*, 152: 2801–2807.

Nosrati R., Owlia P., Sderi H., Rasooli I., Malbobi M.A. 2014. Phosphate solublization characteristic of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strain. *Iranian Journal of Microbiology*, 6: 285-295. (In Persian)

www.SID.ir

Archive of SID

Pandey A., and Palni L.M.S. 1997. *Bacillus* species: The dominant bacteria of the rhizosphere of established tea. *Microbiological Research*, 152: 359-365.

Postma J.A., and Lynch J.P. 2011. Root cortical aerenchyma enhances growth of *Zea mays* L. on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus and potassium. *Plant Physiology*, 156: 1190–1201.

Saiyad S.A., Jhala Y.K., Vyas R.V. 2015. Comparative efficiency of five potash and phosphate solubilizing bacteria and their key enzymes useful for enhancing and improvement of soil fertility. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5: 1-6.

Saleh-Lakha S., and Glick BR. 2006. Plant growth-promoting bacteria. *In*: van Elsas J.D., Jansson J.K., Trevors J.T. (Eds) Modern Soil Microbiology. CRC/Thomson Publishing, Boca Raton, FL/UK, pp. 503–520.

Sanger F., Coulson A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94 (3): 441–8.

Seneviratne G., Kecskes M.L., and Kennedy I.R. 2008. Biofilmed biofertilisers: Novel inoculants for efficient nutrient use in plants. *In*: Kennedy I.R., Choudhury A.T., Kecskes M.L., Rose M.T. (Eds.) Efficient nutrient use in rice production in Vietnam achieved using inoculants biofertilisers. Proceedings of a project (SMCN/2002/073) workshop held in Hanoi, Vietnam, 12–13 October 2007. ACIAR Proceeding No. 130, ACIAR, Canberra. pp. 126–130.

Seneviratne G., Weerasekara M.L.M.A.W., Seneviratne K.A.C.N., Zavahir J.S, Kecskes M.L., and Kennedy I.R. 2010. Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial cction. *In*: Maheshwari D.K. (Eds) Plant Growth and Health Promoting Bacteria (Microbiology Monographs). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58: 221–227.

Shintu P.V., and Jayaram K.M. 2015. Phosphate solubilising bacteria (*Bacillus polymyxa*) an effective approach to mitigate drought in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Tropical Plant Research*. 2:17–22.

Srdjan S., Dragana V., Ivana D., Branislava S., and Milena S.V. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40:175–179.

Stewart P.S., and Franklin M.J. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 199–210.

Vardharajula S., Ali S.Z., Grover M., Reddy G., and Venkateswaralu B. 2010. Effect of plant growth promoting Pseudomonas spp. on compatible solutes antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 62: 21–30.

Wang C.J., Yang W., Wang C., Gu C., Niu D.D., Liu H.X., Wang Y.P., and Guo J.H. 2012. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PLoS One*, 7: 525-565.

Yan F., Yu Y., Wang L., Luo Y., Guo J., and Chai Y. 2016. The comER Gene Plays an Important Role in Biofilm Formation and Sporulation in both *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Frontier in Microbiology*, 7: 1025-1037.

Zhang C., and Kong F. 2014. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology*, 82: 18–25.

Zhang H., Kim M.S., Krishnamachari V., Payton P., Sun Y., Grimson M., Farag M.A., Ryu, C.M. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. *Planta*, 226: 839–851.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation, Molecular Identification, and Assessing Plant Growth Promoting Activities of Biofilm Forming Bacteria from Gramineae Rhizosphere in North West of Iran

Esmaeil Karimi[1*], Naser Aliasgharzad[2], Mohammad Reza Neishabouri[2], Ezatollah Esfandiari[3]

(Received: August 2017 Accepted: February 2018)

Abstract

Plant-associated rhizospheric bacteria which form biofilms have higher positive effects on plants in fluctuating environments. Thus, to study of these bacteria, 50 rhizospheric samples were taken from grass geramineae roots. After preparing the suspension, 100 microlitere was cultured on TSA medium and then pure culture of bacteria was prepared. Resulted showed that up to 90% of these isolates were able to form biofilm, so that they could be categorized in five groups as: pellicle, very adherent, moderately adherent, weakly adherent and non-adherent. 16S rDNA analysis revealed six different genus of bacteria. *Bacillus* are the predominant group (80%) of robust biofilm forming in the grass geramineae rhizosphere. The water deficit tolerance of isolates was assessed by rising concentration of sorbitol (1, 10, 20 and 30 %, w/v). All isolates were able to grow in -25 bar matric potential. Isolates showed good potential to producing auxins ranging from 6 - 65 µg mL^{-1}, ACC-deaminase activity (up to 2.14 µmol α-ketobutyrate in 36 h), $Ca_3(PO_4)_2$ solublization ranging from 1.2 – 251 mg L^{-1} and K releasing ability 90 to 250 mg L^{-1}. Only three bacteria were able to produce siderophore. It seems that these isolates can be suitable candidates for doing some greeanhaous or pot experiment subjected to protecting plants against water deficit stress. Moreover, they can act as plant growth promoting bacteria as well.

Keywords: Auxin hormon, 16S rDNA, ACC-deaminase, *Bacillus*, K releasing, Water deficit stress

Karimi E., Aliasgharzad N., Neishabouri M. R. and Esfandiari E. 2019. Isolation, Molecular Identification, and Assessing Plant Growth Promoting Activities of Biofilm Forming Bacteria from Gramineae Rhizosphere in North West of Iran. *Applied Soil Research*, 7(2):14-28.

1- Asisistant professor, Department of Soil Science, University of Maragheh, Iran.
2- Professor, Department of Soil Science, University of Tabriz, Iran
3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Maragheh, Iran
* Corresponding Author Email: sm_ka80@yahoo.com

www.SID.ir