2nd International Conference on Agricultural Engineering and Natural Resources
دومین کنفرانس بین المللی مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی
16th to 17th February 2016 - Iran, Tehran/ ۲۷ و ۲۸ بهمن ماه ۱۳۹۴
Archive of SID

Evaluation of plant growth promoting characteristics of some strains of Bacillus Bacteria

Sara Younesi, Ahmad Asgharzadeh, Farokh Darvish Kojouri

Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Science and Research, E-mail: sara_yonesi@yahoo.com
Department of Soil Biology, Soil and Water Research Institute, E-mail: a_asgharzadeh_2000@yahoo.com
Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Science and Research, E-mail: f-darvish@srbiau.ac.ir

Abstract. Plant Growth Promoting Rhizobacteria(PGPR) is referred to a heterogeneous group of beneficial rhizosphere bacteria that could enhance plant yield through one or more mechanisms. In this study, some of Plant Growth Promoting Characteristics such as solubilizing of insoluble inorganic phosphate, auxin, ability to production of ACC-deaminase enzyme and siderophore production were evaluated in 10 strains of Bacillus bacteria selected from the available bank of Soil Biology Department of Soil and Water Research Institute. To evaluate the ability of solubilizing of insoluble inorganic phosphate, sperber solid media was used that showed only *Bacillus subtilis4* has a poor ability in this area. Result showed that these strain have a poor ability to produce auxin and the highest amount of auxin was produced by *B. pumillus*(2/42 µg/ml). The ability of strains to utilize ACC was assayed by a spectrophotometric method(405 nm) comparing the growth rate of bacteria in DF medium with ACC as well as the medium containing ammonium sulphate that revealed *B. megaterium* with the measured number of 1/569 was the best strain in this case. Siderophore experiment showed that none of the bacteria were able to produce orange halo in CAS-Agar plates and only *B. megaterium* produced a colony with the diameter of 5/1 mm after 48 hours. Other strains did not grow at all.
Keywords: PGPR, Bacillus, Phosphate solubilization, auxin, Acc-deaminase enzyme, siderophore

بررسی خصوصیات محرک رشد گیاهی سویه هایی از باکتری های جنس باسیلوس

[۱]سارا یونسی، [۲]احمد اصغرزاده، [۳]فرخ درویش کجوری

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، sara_yonesi@yahoo.com
[۲]استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، کرج، a_asgharzadeh_2000@yahoo.com
[۳]استاد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، f-darvish@srbiau.ac.ir

چکیده

باکتری های ریزوسفری محرک رشد گیاه(PGPR)، به گروه مختلفی از باکتری ها اطلاق می شود که با یک یا چند مکانیسم، عملکرد گیاهان را افزایش می دهند. در این پژوهش ده سویه از باکتری های جنس باسیلوس از نظر خصوصیات PGPR شامل توان حل کنندگی فسفات، توان تولید اکسین، توان تولید آنزیم ACC- د آمیناز و توان تولید سیدروفور مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق از باکتری های باسیلوس جداسازی و خالص شده موجود در بخش بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب استفاده شد. جهت بررسی توان حل کنندگی فسفات از محیط اسپربر استفاده شد که تنها باکتری *Bacillus subtilis4* نتیجه مثبت ضعیفی را نشان داد. آزمایش توان تولید اکسین نشان داد که سویه های مورد بررسی اکسین کمی تولید می کنند و حداکثر توان تولید اکسین ۲/۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر توسط *B. pumillus* می باشد. در توان تولید آنزیم ACC- د آمیناز، باکتری *B. megaterium* با ۱/۵۶۹ که نشان دهنده نسبت جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر در محیط DF حاوی ACC به محیط DF حاوی سولفات آمونیوم است، بهترین سویه شناخته شد. در بررسی سیدروفور، هیچ کدام از باکتری ها در محیط CAS- آگار ایجاد هاله نارنجی رنگ نکردند و فقط باکتری *B. megaterium* پس از گذشت ۴۸ ساعت تشکیل کلنی داد که متوسط قطر آن ۵/۱ میلی متر بود. سایر باکتری ها اصلا رشد نکردند.

واژه های کلیدی : PGPR، باسیلوس، حل کنندگی فسفات، اکسین، آنزیم ACC- د آمیناز، سیدروفور

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

کشاورزی پایدار به نمون هایی از کشاورزی اطلاق می شود که در آن از تکنیک های ویژه ای استفاده می شود و علاوه بر استفاده مناسب از منابع محیطی، مخاطراتی آنها را تهدید نمی کند. به خاطر هدفی که کشاورزی پایدار دنبال میکند توجه ویژه ای به میکروارگانیسم های کارامد و مفید خاک لحاظ می شود . میکروارگانیسم های ریزوسفری به سه گروه مفید، مضر و بی اثر طبقه بندی شده اند (Whipps, 2001). باکتریهای ریزو سفری که به طور مستقیم و غیرمستقیم اثرات مفیدی در رشد و توسعه گیاهان دارند به عنوان باکتری های ریزوسفری محرک رشد (Plan Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)شناخته می شوند (Asghar, 2002). در مقابل باکتری های ریزوسفری که بر رشد و عملکرد گیاهان تاثیر منفی دارند، باکتری های ریزوسفری مضر یا باکتری های مضر (Deleterious Rhizobacteria) نامیده می شوند (Kremer, Sarwar, 1995). باکتری های ریزوسفری محرک رشد قادرند از روش های مستقیم یا غیر مستقیم بر رشد گیاه اثرگذار باشند. اثر مستقیم شامل افزایش انحلال عناصر غذایی کم محلول مانند فسفر، تولید ACC- د آمیناز، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور (از دیدگاه افزایش قابلیت جذب آهن)، رهاسازی متابولیت های ثانویه نظیر تنظیمگرها یا هورمون های رشدی و موادی از این قبیل و یا تسهیل جذب عناصر غذایی از محیط رشد گیاه است اما تاثیر غیر مستقیمPGPR ها در تحریک رشد گیاه زمانی رخ می دهد که از اثرات زیانبار یک یا چندین عوامل بیماریزا کاسته یا به کلی بازداشته می شود(Ping, Boland, 2004). رقابت برای جذب مواد و اشغال جایگاه های مناسب برای فعالیت پاتوژن ها، تولید آنتی بیوتیک، تولید سیدروفورها، آنزیم های لیتیک و تولید سیانید هیدروژن از مکانیسم های مورد استفاده در این روش می باشند. جنس های مختلفی از باکتری ها جز دسته باکتری های محرک رشد گیاه هستند اما از این بین باکتری های جنس باسیلوس از موثرترین باکتری ها در افزایش شاخص های رشد گیاه می باشند. با وجود اهمیتی که باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار به عنوان باکتری های محرک رشد، حل کننده فسفر، تولید کننده انواع هورمونهای تنظیم کننده رشد، افزایش مقاومت گیاهان به شوری و خشکی و مخصوصا توان کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای خاکزی را داشته اند، این جنس از باکتری ها در کشور چندان مورد توجه قرار نگرفته اند واین در حالی است که به دلیل توان اسپورزایی این باکتریها بیش از دیگر انواع باکتری های محرک رشد توان ماندگاری داشته و به راحتی به عنوان کودهای بیولوژیک و مایه تلقیح قابل فرمولاسیون هستند . از طرف دیگر با توجه به وجود کلکسیونی از باکتری های این جنس در مؤسسه تحقیقات خاک و آب، بخش تحقیقات بیولوژی خاک، در این تحقیق بر آن شدیم که خصوصیات PGPR این جنس از باکتری ها را مورد مطالعه قرار دهیم.

PSB باکتری های حل کننده فسفات های نامحلول (Phosphate solubilizing bacteria) را شامل می شود. باکتری های حل کننده بسیاری در خاک وجود دارد، ولی تعداد این باکتری ها در مقایسه با باکتری های معمول در ریزوسفر گیاهان قابل توجه نمی باشد. بنابراین مقدار فسفر آزاده شده به وسیله این باکتری ها معمولاً به اندازه ای نیست که افزایش کافی در رشد گیاهان ایجاد کند. لذا تلقیح گیاهان با یک باکتری خاص، با تراکم جمعیت بسیار بیشتر از آنچه در خاک یافت می شود لازم است تا سودمندی ناشی از خصوصیت انحلال فسفات آن باکتری در افزایش رشد و عملکرد محلول به طور معنی داری بروز نماید(رودریگوئز و فافا، ۱۹۹۹). از جمله عوامل موثر بر تعداد باکتری های حل کننده فسفات در خاک پوشش گیاهی، رطوبت خاک و pH می باشد. در آزمایشی مشخص شد که مناسب ترین دامنه pH برای فعالیت باکتری های حل کننده فسفات ۷/۸ تا ۸/۲ است (زاپاتا، ۱۹۸۹). PSB به عنوان کود بیولوژیک از سال ۱۹۵۰ مورد استفاده قرار می گرفته است(کوداشو،۱۹۵۶).رهاسازی فسفر توسط PSB از شکل های تثبیت شده و غیرمحلول یک جنبه مهم از دسترس بودن فسفر در خاک ها می باشد. شواهد محکمی مبنی بر توانایی تغییر فسفر خاک توسط باکتری ها به شکل های در دسترس گیاه وجود دارد. زیست توده ی میکروبی فسفر محلول را در بدن خود جذب می کند و از جذب شدن و تثبیت آن جلوگیری می کند(جورجسن، ۲۰۰۹) .جنس های مهم باکتری های حل کننده فسفات، سودوموناس، باسیلوس می باشد (موتسارا، ۱۹۹۵).

هورمون های گیاهی نقش مهمی در کنترل رشد و توسعه گیاه دارند (Frankenberger, Sarwar, 1994). هورمون اندول-۳- استیک اسید(Indole-3-acetic acid) که به اختصار IAA نوشته می شود، مهمترین نوع اکسین طبیعی و اولین هورمون گیاهی بود که در سال ۱۹۸۸ کشف شد و علاوه بر گیاهان بسیاری از میکروارگانیسم ها نیز توانایی سنتز آن را دارا می باشند. تولید اکسین توسط باکتری های ریزوسفری به کرات گزارش شده است. تولید اکسین در ریزوسفر به دلیل وجود جمعیت بالای میکروبی و فراوانی سوبسترا در این ناحیه می باشد. گزارش شده که ۸۰ درصد از باکتری های جدا شده از ریزوسفر گیاهان مختلف توانایی تولید IAA را داشته اند (Dobelaere, 2003).

اتیلن یکی از هورمون های تنظیم کننده رشد گیاهی است که در مراحل رسیدگی میوه، فتوسنتز، تنفس، تعرق، جنین زایی، ریشه زایی، تکامل اندام های جنسی، جوانه زنی بذور و بسیاری خصوصیات دیگر گیاه نقش دارد. مشخص شده که اتیلن علاوه بر این اثرات دارای اثرات بازدارندگی در رشد گیاهان نیز می باشد و فرایند پیر شدن در گیاه را تسریع می نماید. میزان اتیلن در شرایط تنشی به میزان قابل توجهی

www.SID.ir

Archive of SID

در گیاه افزایش پیدا می کند و باعث پیری زودرس گیاه می گردد. برخی باکتری های ریزوسفری خاک از طریق مکانیسم هایی که با هورمون گیاهی اتیلن در ارتباطند می توانند باعث افزایش رشد گیاه شوند. در این رابطه میتوان به تولید ریزوبیتوکسین توسط برخی سویه های ریزوبیومی و تولید آنزیم ACC- دآمیناز اشاره کرد. تولید آنزیم ACC- د آمیناز توسط برخی سویه های PGPR عموماً در شرایط اعمال تنش های محیطی بر گیاه اهمیت پیدا می کند و نتیجه نهایی آن، برآیند اثرات متقابل بسیار پیچیده این آنزیم با هورمون های گیاهی و خصوصاً اکسین و اتیلن می باشد. باکتری هایی با توانایی تولید آنزیمACC- د آمیناز می توانند گیاهان را در برابر اثرات مضر تنش های محیطی چون فلزات سنگین، غرقاب، پاتوژن های گیاهی، خشکی و شوری محافظت کنند.

توان تولید سیدروفور از جمله ویژگی هایی است که بر اساس آن باسیلوس ها را در گروه باکتری های محرک رشد گیاه قرار داده اند. در سال های اخیر توانایی تولید سیدروفور در سویه های متعددی از گونه های مختلف این باکتری ها به اثبات رسیده است. سیدروفورها ترکیب های آلی با وزن مولکولی کم (۵۰۰ تا ۲۰۰۰ دالتون) ولیگاندهای شیمیایی با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای پیوند شدن با آهن سه ظرفیتی هستند. این مواد توسط سلول های میکروبی به منظور مقابله با تنش کمبود فرم قابل جذب آهن (<20µM) ترشح و این عنصر را به فرم کلات محلول درمی آورند که در این حالت برای سلول هایی که دارای پذیرنده های غشایی اختصاصی باشند، قابل دسترس می گردد (1994,Payne;1991,Guerinot). گرچه توان تولید سیدروفور در تمام باکتری های هوازی، بی هوازی اختیاری و همین طور در قارچ ها وجود دارد(Alexander,Zuberer,1991) ولی پتانسیل تولید این مواد در گونه های مختلف میکروبی و حتی در سویه های متعدد داخل هر گونه، بسیار متفاوت است. این پتانسیل از سطح ناچیز و غیرقابل تشخیص با روش های متداول تا مقادیر زیاد در حد چند صد میکرومول تغییر می کند و تنها انواعی که دارای توان تولید بالاتری هستند، می توانند بر قابلیت دسترسی آهن در محیط رشد خود اثر بگذارند.

۲- مواد و روش ها

بررسی باکتری های دارای توان حل کنندگی فسفات: برای شناسایی باکتری های حل کننده فسفات ، باکتری ها روی پلیت های اسپربر (sperber) تلقیح می شوند. برای این کار از لوپ سوزنی استفاده می شود و باکتری ها از روی محیط کشت باسیل آگار روی پلیت اسپربر برده می شوند. با استفاده از لوپ، باکتری ها به صورت نقطه ای در چهار قسمت پلیت تلقیح می شوند. سپس پلیت ها برعکس شده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار می گیرند. برای ارزیابی پلیت ها را در برابر نور گرفته، باکتری هایی که در اطرافشان هاله شفاف ایجاد کرده اند، توانایی حل کنندگی فسفات را دارا می باشند.

محیط کشت اسپربر شامل مواد زیر است: گلوگز ۱۰ گرم در لیتر، yeats extract به مقدار ۰/۵ گرم در لیتر، CaCl2 به میزان ۰/۱ گرم در لیتر، MgSO4 .7H2O به میزان ۰/۲۵ گرم در لیتر، tricalcium phosphate به مقدار ۲/۵ گرم در لیتر و آگار ۱۰ گرم در لیتر که روی pH حدود ۷/۲ تنظیم می شود.

بررسی توان تولید اکسین: به منظور بررسی توان تولید اکسین، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت TSB بر روی شیکر کشت داده می شوند تا سوسپانسیون باکتری به دست آید. محیط کشت TSB شامل مواد زیر است : ۵ /۲ گرم در لیتر دکستروز، ۲/۵ گرم در لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۵ گرم در لیتر کلرید سدیم، ۳ گرم درلیتر پپتون سویا و ۱۷گرم در لیتر تریپتون . pH این محیط به روی ۷/۲ تنظیم می شود. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری توسط سمپلر به ۲۵ میلی‌لیتر محیط TSB حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر L-tryptophane منتقل می گردد. بعد از ۴۸ ساعت و در دمای آزمایشگاه، سوسپانسیون باکتری با دورمعادل ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با ۴ میلی‌لیتر معرف Salkowskiمخلوط می گردد. این معرف شامل مواد زیر می باشد: ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر $FeCl_3 . 6H_2O$ ۰/۵ مولار .

این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در ۵۳۵ نانومتر قرائت می شود. (Patten and Glick, 2002).

جهت تهیه استانداردها، ابتدا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه (TSB) تهیه شده، سپس به میزان ۰/۰۵ گرم IAA داخل محیط ریخته شده و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار می گیرد. سپس از محلول حاصل غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شده و میزان جذب نور آنها بوسیله دستگاه قرائت می شود. به همان میزان که به سوسپانسیون باکتری معرف اضافه می شود، به غلظت های مختلف IAA نیز اضافه می شود و یک طیف رنگ قرمز به دست می آید. به این صورت که سری رقت های پایین رنگ روشن و زرد دارند و هر چه به سمت غلظت های بالاتر می رویم، طیف رنگ صورتی و قرمز می شود.

جهت ارزیابی نتایج آزمون، مقدار تولید اکسین هر جدایه با مقایسه مقدار جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید با نرم افزار اکسل محاسبه می گردد.

بررسی توان تولید آنزیم ACC- د آمیناز: آزمون توان تولید آنزیم ACC- د آمیناز به روش آمیکو و همکاران (۲۰۰۵) با کمی تغییرات انجام گرفت. به منظور بررسی توان سویه های مورد مطالعه در استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن که می تواند نشانه تولید آنزیم ACC- د آمیناز توسط باکتری باشد، به روش زیر عمل شد: ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت TSB بر روی شیکر کشت داده می شوند تا سوسپانسیون باکتری به دست آید. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه هر سویه به ۲۰ میلی لیتر از سه محیط: DF حاوی ۳ میلی مولار ACC، محیط DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم (به عنوان شاهد مثبت) و محیط DF فاقد ACC و سولفات آمونیوم (به عنوان شاهد منفی) تلقیح گردید. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در ۴۰۵ نانومتر برای هر سه محیط قرائت شد. توان تولید آنزیم ACC- د آمیناز بر اساس میزان رشد باکتری در محیط حاوی ACC در مقایسه با رشد (جذب نور) آن در محیط های شاهد، قابل ارزیابی خواهد بود.

محیط کشت DF شامل مواد زیر است : ۴ گرم در لیتر،KH2PO4 ، ۶ گرم در لیتر Na2HPO4 ، ۰/۲ گرم در لیتر MgSO4.7H2O ، ۲ گرم در لیتر گلوکز، ۲ گرم در لیتر گلوکنیک اسید، ۲ گرم در لیتر سیتریک اسید و هم چنین عناصر میکرو شامل: ۱ میلی گرم در لیتر FeSO4.7H2O ، ۱۰ میکروگرم در لیتر H3BO3 ، ۱۰ میکروگرم در لیتر MnSO4.7H2O ، ۱۲۴/۶ میکروگرم در لیتر ZnSO4.7H2O ، ۷۸/۲۲ میکروگرم در لیتر CuSO4.7H2O و ۱۰ میکروگرم در لیتر MoO3 با pH تنظیم شده بر روی ۷/۲ .

توان تولید سیدروفور: این آزمون براساس روش اصلاح شده الکساندر و زوبر (۱۹۹۱) با استفاده از محیط CAS Blue Agar انجام گرفت. برای تهیه این محیط چهار محلول به طور مجزا تهیه، استریل و سپس با هم مخلوط شدند.

الف- محلول معرف Fe-Cas: این محلول از اختلاط ۱۰ میلی لیتر FeCl3.6H2O یک میلی مولار (در محلول ۱۰ میلی مولار اسید کلریدریک) با ۵۰ میلی لیتر محلول شامل ۶۰/۵ میلی لیتر Chrome Azurol S (CAS) (۱/۲۱ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه شد. این مخلوط ارغوانی تیره به همراه تکان های پیوسته به ۴۰ میلی لیتر محلول آب مقطر شامل ۷۲/۸ میلی گرم Hexadecyl thrimethyl ammonium bromide(HDTMA) (۱/۸۲میلی گرم در لیتر) اضافه شد. محلول آبی تیره به دست آمده اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سرد شد.

ب- محلول بافر: برای تهیه محلول بافر، ۳۰/۲۴ گرم PIPES در ۷۵۰ میلی لیتر محلول نمکی حل شد. محلول نمکی شامل ۰/۳ گرم KH2PO4 ، ۰/۵ گرم NaCl و ۱ گرم NH4Cl است. pH این محلول با استفاده از محلول ۵۰ درصد KOH در ۶/۸ تنظیم گردید و سپس حجم نهایی آن به ۸۰۰ میلی متر رسانده شد. مخلوط به دست آمده پس از افزودن ۱۵ گرم آگار اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سرد شد.

ج- محلول غذایی: شامل ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی گرم MgSO4.7H2O ، ۱۱ میلی گرم CaCl2.7H2O ، ۱/ ۱۷، گرم MnSO4.7H2O ، ۱/۴ میلی گرم H3BO3 ، ۰/۰۴ میلی گرم CuSO4.5H2O ، ۱/۲ میلی گرم ZnSO4.7H2O و ۱ میلی گرم Na2MoO4.7H2O در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر است. این محلول نیز پس از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سرد گردید.

د- محلول کازآمینواسید: برای تهیه این محلول، ۳ گرم کازآمینواسید در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس به وسیله کاغذ صافی غشایی با قطر ۰/۴۵ میکرون استریل شد.

پس از آماده شدن ۴ محلول بالا، محلول غذایی به محلول بافر و محلول کازآمینواسید اضافه گردید. سپس همراه با هم زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول معرف Fe-Cas به آن ها اضافه و در پلیت پخش گردید .پلیت های شامل محیط Cas Agar پس از انجماد با تیغ استریل به ۴ قسمت مساوی تقسیم شدند و از سوسپانسیون تازه جدایه ها به اندازه ۵ میکرو لیتر در وسط هر قسمت با روش قطره گذاری تلقیح شدند .توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ آبی به نارنجی و با اندازه گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری ها و در فواصل زمانی مشخص ارزیابی گردید .هم چنین قطر کلنی باکتری و نسبت قطر هاله به قطر کلنی نیز اندازه گیری و محاسبه شد .لازم به ذکر است که برای جلوگیری از خطا در نقطه گذاری و هم چنین اختلاف قطر محیط ها در پتری تکرار گذاشته شده و متوسط ۳ تکرار را مقایسه می کنند.

۳- نتایج و بحث

نتیجه بررسی باکتری های دارای توان حل کنندگی فسفات: فرم های معدنی فسفر در خاک اغلب به صورت ترکیباتی با کلسیم، آهن، آلومینیوم بوده و برای گیاهان غیر قابل جذب می باشند. این درحالیست که باکتری های محرک رشد گیاه با استفاده از مکانیسم هایی از قبیل تولید آنزیم فسفاتاز و تولید اسیدهای آلی اشکال کم محلول و نامحلول فسفر را به شکل محلول و قابل جذب گیاه در می آورند (Bashan and Holguin,۱۹۹۷). به عنوان مثال نقش اسیدهای آلی در حلالیت فسفات های نامحلول به کاهش pH ، کلات نمودن کاتیون ها و رقابت با فسفر جهت اشغال مکان های جذب در خاک نسبت داده می شود. همچنین گزارش شده است که اسیدهای آلی ممکن است کمپلکس های محلول با یون های فلزی پیوند شده با فسفر از قبیل کلسیم، آلومینیوم و آهن تشکیل دهند و بدین طریق باعث آزادسازی فسفر می شوند (Omar,1998). این آزاد شدن فسفر باعث افزایش توانایی جذب فسفر توسط گیاه و متعاقبا افزایش شاخص های رشد آن می گردد. . مهسور و ساتیآوانی (۲۰۱۲) در مطالعه ای توانستند دو گونه *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* متعلق به جنس باسیلوس را از ریزوسفر گیاه *groundnut* جداسازی کنند که هردو دارای توان انحلال ترکیبات معدنی فسفر در محدوده های متفاوتی از pH و دما (بیشترین میزان انحلال در دمای ۴۰ درجه سلسیوس) بودند. وانگا و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود توانستند

www.SID.ir

Archive of SID

یک ایزوله از گونه *Bacillus thuringiensis* را از ریزوسفر گیاه چای در خاک های اسیدی جداسازی کنند. این ایزوله که دارای بیشترین توان انحلال فسفات های معدنی از بین ایزوله های جداسازی شده بود، قادر به افزایش میزان فسفر محلول خاک از ۱۴/۷ به ۲۳/۴ میلی گرم در کیلوگرم شد. در مطالعه حاضر نیز از بین ده سویه باکتری مورد بررسی سویه *B. subtilis4* دارای توان حل کنندگی فسفات در حد ضعیفی بود. این توانایی انحلال فسفر توسط این سویه منجر به افزایش عملکرد شاخص های رشد در تیمار با آن خواهد شد.

نتیجه بررسی توان تولید اکسین: هورمون های گیاهی از جمله اکسین، نقش مهمی در رشد و توسعه گیاه دارند. اکسین ها در توسعه سلولی، تقسیم سلولی، سرعت رشد گیاه، فتوتروپیسم و ژئوتروپیسم و به خصوص جوانه زنی ریشه و افزایش رشد آن نقش دارند(۱۹۹۵ ,Arshad and Frankenberger). بنابراین یکی از مهم ترین معیار ها برای سنجش اثرات مفید باکتری های محرک رشد گیاه تولید اکسین و افزایش رشد ریشه می باشد. نهایتا باکتری هایی که توانایی بیشتری در تولید اکسین دارند، قادرند میزان رشد ریشه های جانبی، ریشه های نابه جا و طول ریشه های ابتدایی را بیشتر افزایش دهند چیزی که متعاقبا منجر به افزایش توانایی گیاه برای استقرار در خاک، جذب مواد غذایی و افزایش رشد می گردد(Glick *et al.*,۱۹۹۸). تساوکلووا و همکاران در مطالعات خود بر روی دو گیاه *Paphiopedilum appletonianum* و *Pholidota articulate* توانستند انواع گوناگونی از باکتری ها از جمله باکتری های جنس باسیلوس را از ریشه این گیاهان جداسازی کنند. ایزوله های به دست آمده از این جنس که همگی دارای توان تولید ایندول استیک اسید (اکسین) بودند، بیشترین توان تولید اکسین خود را در فاز انتهایی رشد نشان دادند. بقایی و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مطالعه خود بر روی ایزوله ای از جنس باسیلوس نشان دادند که این ایزوله از طریق تولید اکسین شرایط مناسب تری را جهت رشد و افزایش عملکرد گیاه زراعی گندم ایجاد کرده است. در این مطالعه سویه *B. pumillus* بیشترین میزان اکسین را (۲/۴۲ میکروگرم در میلی لیتر) تولید کرده است که این خود باعث افزایش وزن خشک و حجم ریشه خواهد شد. نتایج حاصل از بررسی اکسین نشان داد که ۳۰ درصد از باکتری های مورد مطالعه قادر به تولید اکسین نبودند یا در حد بسیار ضعیفی اکسین تولید می کردند که قابل اندازه گیری نبود(جدول۴-۱). کمترین مقدار اکسین تولید شده در سویه *B. subtilis25-8* و به میزان ۰/۰۳ میکروگرم در میلی لیتر مشاهده شد.

بررسی توان تولید آنزیم ACC- د آمیناز: دپتی و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود بر روی تاثیر تنش خشکی بر روی گیاه *Trigonella foenum-graecum* نشان دادند که تلقیح این گیاه با باکتری *Bacillus subtilis* (LDR2) که مولد آنزیم ACC- دآمیناز بوده است، از طریق کاهش سطح اتیلن تنشی گیاه منجر به تحمل هرچه بیشتر تنش خشکی و افزایش رشد آن شده است. زو و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود توانستند ۲۲ ایزوله از پنج گونه مختلف جنس باسیلوس را از بذر گوجه فرنگی جداسازی کنند که همگی دارای توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز بودند. از این بین ایزوله HYT-12-1 *Bacillus subtilis* دارای بیشترین توان تولید آنزیم ACC دآمیناز بود. مطالعات ایشان همچنین نشان داد که تلقیح بذر گوجه فرنگی با این ایزوله منجر به بیشترین میزان جوانه زنی و افزایش رشد گیاه شده است. نتیجه بررسی توان مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن نشان داد (جدول ۴-۲) که سویه های *B. polymixa* و *B. subtilis25-8* به ترتیب حداکثر و حداقل توانایی استفاده از ACC را داشتند. سویه *B. polymixa* به خوبی در محیط DF حاوی ACC رشد کرده و میزان جذب نور قرائت شده آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر در محیط DF حاوی ACC برابر ۰/۵۰۳ بود. نسبت جذب نور در محیط DF حاوی ACC به محیط DF حاوی سولفات آمونیوم بین مقادیر ۰/۱۴۷ تا ۱/۵۹۶ متغییر بود.

توان تولید سیدروفور: زیانمی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات خود بر روی باکتری *Bacillus subtilis* سویه CAS15، جداسازی شده از ریزوسفر فلفل، نشان دادند که این باکتری از طریق تولید سیدروفور و ایجاد کمبود آهن برای پاتوژن این گیاه (*Fusarium wilt*) به عنوان یک کنترل کننده بیولوژیک عمل کرده و ضمن کنترل بیماری مذکور منجر به افزایش عملکرد اندام هوایی، تعداد گل و کاهش زمان لازم برای گل دهی شده است. زو و یانگ (۲۰۱۵) در مطالعات خود توانستند ۱۹ باکتری تولید کننده سیدروفور را از طریق محیط کشت O-CAS agar جداسازی کنند. از این بین باکتری *Bacillus subtilis* سویه MB8 قادر به تولید بیشترین مقدار سیدروفور در این محیط شد که این خود منجر به تاثیر مثبت این سویه به عنوان یک بیوکنترل در از بین بردن پاتوژن های گیاهی می شود. نتایج حاصل از ارزیابی تولید سیدروفور نشان داد که هیچ کدام از باکتری های مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور را نداشتند و تنها باکتری *B. megaterium* بعد از دو روز تشکیل کلونی داد.

۴- نتیجه گیری

در این بررسی سویه *B. subtilis4* دارای توان حل کنندگی فسفات در حد ضعیفی بود که این توانایی انحلال فسفر منجر به افزایش عملکرد شاخص های رشد و همچنین جذب بیشتر عنصر غذایی فسفر در تیمار با آن خواهد شد.

در پژوهش حاضر، سویه *B. pumillus* بیشترین میزان اکسین را (۲/۴۲ میکروگرم در میلی لیتر) تولید کرد که این خود باعث افزایش وزن خشک و حجم ریشه خواهد شد. هم چنین این سویه با داشتن توانایی بیشتر در تولید اکسین، قادر است میزان رشد ریشه های جانبی، ریشه های نابه جا و طول ریشه های ابتدایی را بیشتر افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

دهد. چیزی که متعاقبا منجر به افزایش توانایی گیاه برای استقرار در خاک، جذب مواد غذایی و افزایش شاخص های رشدی می گردد.
سویه *B. polymixa* حداکثر توانایی استفاده از ACC را داشت. بنابراین در شرایط تنش، تیمار با این باکتری از طریق کاهش سطح اتیلن تنشی گیاه می تواند منجر به تحمل هرچه بیشتر تنش خشکی و افزایش رشد گیاه شود.

جدول۴-۱- نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید اکسین باکتری ها

تیمار باکتری	توان تولید اکسین (میکروگرم در میلی لیتر µg/ml)
B. subtilis4	۰/۱۷
B. megaterium	۰/۰۶
B. licheniformis	nd*
B. licheniformis22	۰/۳۳
B. mycoides	۱/۴۲
B. polymixa	nd
B. pumillus	۲/۴۲
B. firmus	۰/۹۱
B. circulanse	nd
B. subtilis25-8	۰/۰۳

*nd = کمتر از حد قابل اندازه گیری

جدول۴-۲- نتایج حاصل از ارزیابی توان باکتری ها در مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن

تیمار باکتری	محیط DF بدون منبع ازت	محیط DF+ACC	محیط DF+ سولفات آمونیوم	(جذب نور در DF+ACC) ÷(جذب نور در DF+سولفات آمونیوم)
B. subtilis4	۰/۲۱۹	۰/۳۷۵	۱/۲۲۲	۰/۳۰۶
B. megaterium	۰/۲۱۵	۰/۳۹۹	۰/۲۵۰	۱/۵۹۶
B. licheniformis	۰/۰۵۸	۰/۳۳۵	۰/۶۴۹	۰/۵۱۶
B. licheniformis 22	۰/۱۲۵	۰/۳۸۷	۱/۲۷۹	۰/۳۰۲
B. mycoides	۰/۱۲۰	۰/۳۹۸	۱/۲۵۸	۰/۳۱۶
B. polymixa	۰/۲۸۱	۰/۵۰۳	۱/۳۱۵	۰/۳۸۲
B. pumillus	۰/۲۳۳	۰/۴۳۸	۰/۵۰۷	۰/۸۶۳
B. firmus	۰/۲۳۳	۰/۳۳۱	۱/۰۵۰	۰/۳۱۵
B. circulanse	۰/۲۵۰	۰/۴۶۹	۱/۲۹۳	۰/۳۶۲
B. subtilis 25-8	۰/۲۷۳	۰/۱۹۱	۱/۲۹۳	۰/۱۴۷

۵- مراجع

[۱] احمدی فر، ف. روستایی، علی. شهریاری، د. و خداکرمیان، غ. ۱۳۸۴. و تقی نسب، م. ۱۳۸۶. کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی خیار به وسیله جدایه باکتری های باسیلوس و سودوموناس. پژوهش کشاورزی آب، خاک و گیاه در کشاورزی. جلد پنجم. شماره سوم

[۲] ثقفی، ک. بررسی تاثیر جنس و ترکیب ریزو باکتریهای محرک رشد گیاه در گندم تحت تنش شوری. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره). قزوین. ۱۳۹۰

[۳] ساریخانی، م. علی اصغرزاد، ن. و ملبوبی، م. بهبود تغذیه فسفر در گیاه گندم با تلقیح باکتری های حل کننده فسفات. مجله مدیریت خاک و تولید پایدار. جلد۳. شماره۱. ۱۳۹۲

[۴] علیخانی، ح. صالع راستین، ن. و آنتون، ه. ارزیابی توان تولید سیدروفور در سویه های ریزوبیومی بومی خاک های ایران. مجله علوم خاک و آب. جلد۱۷. شماره۲. ۱۳۸۲

[۵] فلاح نصرت آباد، ع. و شریعتی، ش. بررسی تاثیر باکتری های سودوموناس و باسیلوس در عملکرد گندم و جذب عناصر غذایی و مقایسه آن با کود شیمیایی و آلی. نشریه آب و خاک. جلد۲۸. شماره ۵. ۱۳۹۳

[6] Baghaee Ravaria,S., Heidarzadeh, N.2013. Isolation and characterization of rhizosphere auxin producing Bacilli and evaluation of their potency on wheat growth improvement. Archives of Agronomy and Soil Science, 60:7, 895-905.

[7] Deepti, B., Deepamala, M., Nidhi, B., Chandan, Ch, S., Alok, K.2013. ACC Deaminase-Containing *Bacillus subtilis* Reduces Stress Ethylene-Induced Damage and Improves Mycorrhizal Colonization and Rhizobial Nodulation in*Trigonella foenum-graecum* Under Drought Stress. Journal of Plant Growth Regulation, Volume 32, Issue 4, pp 809-822.

[8] Maheswar,N.U and Sathiyavani, G.2012. Solubilization of phosphate by Bacillus Sps, from groundnut rhizosphere (Arachishypogaea L). Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 4(8):4007-4011.

[9] Tsavkelova. E, A., CherdyntsevaT,A., Botina.S,G., Netrusov.2007. A, I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiological Research Volume 162, Pages 69–76.

[10] Wanga.T. Liua,M.Q., Li,H.X.2014. Inoculation of phosphate-solubilizing bacteria*Bacillus thuringiensis* B1 increases available phosphorus and growth of peanut in acidic soil. Acta Agriculturae Scandinavica, Soil & Plant Science,Volume 64, Issue 3.

[11] Xianmei. Yu., Chengxiang. Ai، Xin, Li و. Zhou. Guangfang.2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil BiologyVolume 47, Issue 2, March–April 2011, Pages 138–145.

[12] Xu M, Sheng J, Chen L, Men Y, Gan L, Guo S, Shen L.2014. Bacterial community compositions of tomato (Lycopersicum esculentum Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing Bacillus subtilis (HYT-12-1) on tomato seedlings. World J Microbiol Biotechnol 3:835-45.

[13] Zhu.H. Yang.H., 2015.Isolation and Characterization of a Highly Siderophore Producing Bacillus subtilis Strain. Advances in Applied Biotechnology.Volume 332 of the series Lecture Notes in Electrical Engineering pp 83-92.

www.SID.ir