تاثیر ریزوباکترهای محلول‌کننده فسفات بر رشد ذرت در مرحله‌ی رویشی

فرزانه محمدی[۱]، فرخ رخ‌بخش زمین*[۲]، سید محمدرضا خوشرو[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

* نویسنده مسئول: rokhbakhsh@iauk.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۱۴، پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۶

چکیده

امروزه کاربرد کودهای زیستی به‌عنوان جانشین کودهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از برخی گونه‌های *انتروباکتر* با قدرت افزایش رشد گیاهی به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم، در کودهای زیستی گزارش شده‌اند. تحقیق حاضر با هدف جدا کردن *انتروباکترهای* محلول-کننده فسفات و ارزیابی اثر آن‌ها بر رشد ذرت صورت پذیرفت. بر این اساس پس از جداسازی کلنی‌های خالص، آزمایش‌های شناسایی بیوشیمیایی در محیط‌های اسپربر و اکسید روی انجام و در ادامه سایر ویژگی‌ها مانند تولید آمونیاک و سیانید هیدروژن، تثبیت نیتروژن، احیاء نیترات و میزان مقاومت آن‌ها در برابر عوامل محیطی نیز ارزیابی گردید. بر این اساس، ۴۲ جدایه باکتری قابلیت محلول‌سازی فسفات را داشتند. ۵ نژاد با بهترین نتایج از آزمون‌های برون‌تنی و درون‌تنی جهت ادامه تحقیق مدنظر قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از 16SrRNA نژادهای فوق، تحت عناوین *انتروباکتر کلواکه*، *انتروباکتر هرموچی* و گونه‌ای از *انتروباکتر* شناسایی شدند. همه نژادها توانایی انحلال فسفات و روی و توانایی تحمل نمک تا ۷٪ و رشد در اسیدیته ۵ تا ۹ و قابلیت رشد در دماهای ۴ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد را دارا بودند و بر اساس آزمون گلدان به طور قابل-ملاحظه‌ای باعث افزایش ارتفاع ساقه و طول ریشه گردیدند. با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های فوق، ظرفیت قابل توجه ایزوله‌های ریزوسفری ذرت مشهود می‌باشد و نمایانگر پتانسیل زیاد این نژادها جهت کاربرد در تولید کودهای زیستی است.

واژه‌های کلیدی: ذرت، محلول‌سازی فسفات و روی، گونه *انتروباکتر*، ریزوباکترهای محرک رشد گیاهی

مقدمه

بیشترین فسفر موجود در خاک بخصوص در اغلب خاک‌های گرم و خشک ایران به شکل نامحلول است و در دسترس گیاه نمی‌باشند. باکتری‌های محلول‌کننده‌ی فسفات و تثبیت کننده‌ی نیتروژن، از مهمترین عوامل مرتفع کننده مشکلات فوق می‌باشند. از طرف دیگر بواسطه استفاده از عوامل فوق، مزایای اقتصادی و زیست محیطی نیز متصور می‌باشد زیرا استفاده از کودهای شیمیایی که هزینه‌های بالا و آلودگی شدید زیست محیطی را در پی دارد نیز کاهش می‌یابد (۱). بهره‌گیری از موجودات مفید خاکزی به منظور بهبود وضعیت حاصلخیزی خاک، افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی و تأمین سلامتی گیاه از مهمترین شیوه‌های علمی و کاربردی است. این میکروارگانیسم‌ها توانایی انحلال فسفات و تبدیل آن‌ها به شکل محلول را دارند و یکی از راه‌های موثر برای افزایش قابلیت جذب عناصر در خاک-های ایران که اغلب از نوع آهکی و قلیایی‌اند می‌باشند. یکی از استراتژی‌های مقابله با رفع کمبود عناصر غذایی، تلقیح بذر گیاهان زراعی با انواع مختلفی از ریزوباکتر-های مفید می‌باشد (۲، ۳). به‌عنوان مثال، کاربرد برخی ریزوباکترها به عنوان کود زیستی منجر به افزایش جذب فسفر، نیتروژن و در نتیجه بهبود رشد چندین گیاه زارعی شده است (۴) و جوانه‌زنی، رشد گیاه، جذب عناصر غذایی، ارتفاع گیاه و تعداد شاخه افزایش یافته است (۵). ذرت به دلیل اهمیت فزاینده‌ای که در تغذیه انسان و دام داشته و سازگاری گسترده‌ای که با مناطق آب و هوایی معتدل و گرمسیری ایران دارد، یکی از گیاهان زراعی راهبردی و استراتژیک محسوب می‌شود (۱). بر این اساس، هدف مطالعه‌ی حاضر شناسایی ریزوباکترهایی با پتانسیل و ظرفیت افزایش رشد مرحله رویشی در ذرت بوده است.

مواد و روش‌ها

۱) نمونه‌گیری: مزرعه ذرت در روستای طوهان و در فاصله‌ی ۱/۵ کیلومتری جیرفت در استان کرمان مدنظر قرار گرفت. چندین گیاه به طور تصادفی انتخاب شدند و بعد ریشه گیاهان و خاک ریزوسفری متصل به ریشه در داخل کیسه پلاستیکی استریل قرار داده شد و در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل گردید. نمونه‌گیری از ریزوسفر چندین بار در زمان‌های مختلف تکرار شد تا بیش از ۱۰۰ جدایه ظاهراً متفاوت حاصل گردد (۶).

۲) تهیه رقت و کشت جدایه‌ها: در شرایط آسپتیک مقدار ۵ گرم از خاک اطراف ریشه (خاک ریزوسفری) به ۴۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک استریل اضافه شد و همچنین مقدار ۵ گرم از ریشه نیز با تیغ استریل جدا گردید و به ۴۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک استریل در ظرف دیگر افزوده شد، سپس ارلن‌های فوق به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در ادامه رقت‌های متوالی (10^{-1}-10^{-9}) تهیه گردید و سپس به طور جداگانه از هر رقت با استفاده از سمپلر، ۱۰۰ میکرو لیتر به پلیت‌های لوریا آگار (برحسب گرم/ لیتر: پپتون ۱۰، عصاره مخمر ۵، نمک طعام ۱۰، آگار ۱۷) با pH=۷ افزوده و پس از پخش کردن رقت‌ها در محیط، در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند و سپس هر یک از کلنی‌های حاصل خالص‌سازی گردیدند (۷).

۳) آزمایش‌های شناسایی بیوشیمیایی

آزمون محلول‌سازی فسفات: پس انجام فرآیند خالص‌سازی، باکتری‌های مورد نظر در لوله‌های حاوی ۲۵ گرم بر لیتر لوریا براث (مرک) تلقیح شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور شیکردار قرار گرفتند. آزمون فعالیت حل‌کنندگی فسفات معدنی مربوط به تمامی جدایه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت اسپربر[1] (برحسب گرم/ لیتر: گلوکز ۱۰، عصاره مخمر ۰/۵، کلرید کلسیم ۰/۱، سولفات منیزیم ۰/۲۵، تری‌فسفات کلسیم ۲/۵، آگار ۱۷) با pH معادل ۷ انجام شد (۱۹) و بدین‌ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از لوریا براث با رشد باکتری ۲۴ ساعته به روش لکه-گذاری بر روی پلیت‌های اسپربر تلقیح گردید و به مدت یک هفته در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در صورت رویت هاله، قطر هر یک که ناشی از انحلال فسفات بود با خط‌کش اندازه‌گیری شد. این آزمایش سه بار تکرار گردید (۸).

آزمون محلول‌سازی روی: جهت تعیین توانایی ریزوباکترها در قابلیت انحلال اکسید روی، پلیت‌هایی با محتوای محیط کشت اکسید روی (برحسب گرم/ لیتر: اکسید روی ۱/۲، گلوکز ۱۰، سولفات آمونیوم ۰/۵، کلرید پتاسیم ۰/۲، سولفات منیزیم ۰/۱، عصاره مخمر ۰/۵، سولفات منگنز ۰/۰۰۰۱، سولفات آهن ۰/۰۰۰۱، آگار ۱۷) با pH=۷ تهیه گردید. در ادامه یک کشت تازه از ایزوله‌ها تهیه شد. مشابه فرآیند صورت پذیرفته در قسمت مربوط به محلول‌سازی فسفات، تلقیح انجام گردید و پلیت‌ها به مدت یک هفته در ۳۰ درجه سانتی-گراد قرار داده شدند و قطر هاله‌های احتمالی ناشی از انحلال روی با خط‌کش اندازه‌گیری شدند (۹).

بررسی قابلیت تثبیت نیتروژن: هر یک از کلنی‌های مورد نظر در ۵ میلی‌لیتر لوریا براث تلقیح گردیدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند. سپس ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ صورت پذیرفت و محلول رویی تخلیه گردید و ۳ بار با سرم فیزیولوژیک استریل عمل شست و شو انجام شد. در ادامه ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک استریل به رسوب باکتری اضافه گردید و پس از ورتکس لوله، سوسپانسیون میکروبی حاصل شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول فوق به صورت لکه‌گذاری به محیط کشت‌های فاقد نیتروژن جنسون و بورک (مرک) اضافه گردید و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در این محیط کشت‌ها رشد باکتری‌ها در طی ۹۶ ساعت بررسی شد (۹).

[1] Sperber

آزمون احیاء نیترات: از کلنی‌هایی که یک شب از رشد آن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد سپری شده بود به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر نیترات براث (۹ گرم/لیتر- مرک) تلقیح و بمدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در خاتمه ۳ قطره معرف الف (۴ گرم سولفانیلیک اسید در ۵۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید) و ۳ قطره معرف ب (۳ میلی‌لیتر ان و ان- دی‌متیل ۱ نفتیل آمین در ۵۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۵ مولار) به لوله‌ها افزوده شد (۱۰).

آزمون تولید آمونیاک: پس از تهیه‌ی کشت شبانه از باکتری‌ها، ایزوله‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر لوله‌های پپتون براث (۱۵ گرم/لیتر- مرک) به طور جداگانه تلقیح و برای ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بر اساس روش کاپوسینو و شرمن ۰/۵ میلی‌لیتر معرف نسلر به هر لوله اضافه گردید (۱۱).

توانایی تولید سیانید هیدروژن: باکتری‌ها به شکل خطی بر روی محیط کشت نوترینت آگار (۲۸ گرم/ لیتر- مرک) غنی شده با ۴/۴ گرم گلیسین (آلمان) در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر کشت گردیدند. به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت برای سپری شدن زمان رشد به انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در ادامه کاغذهای صافی استریل شده در فور، در محلول پیکرات سدیم (پیکریک اسید ۰/۵ درصد و کربنات سدیم ۲ درصد- آلمان) غوطه‌ور شدند و بعد توسط پنس استریل بر روی کشت استریک قرار گرفتند و درب پلیت‌ها نیز با پارافیلم بسته شد و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز گرمخانه-گذاری شدند و توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی گردید (۱۲).

۴) ارزیابی مقاومت ریزوباکترهای انتخابی در برابر برخی از عوامل محیطی

بررسی تاثیر pH: کشت‌های جوان ۲۴ ساعته از ریزوباکترها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید و هر باکتری در ۳ پلیت حاوی لوریا آگار با pHهای متفاوت ۵، ۸ و ۹ به صورت لکه‌گذاری کشت و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار گرفتند (۱۳).

بررسی تاثیر نمک: مشابه قسمت الف، از ریزوباکترها کشت‌های جوان تهیه و هر یک در ۴ پلیت لوریا آگار واجد غلظت‌های متفاوت NaCl به‌صورت ۰، ۰/۵، ۴ و ۷ درصد با روش لکه‌گذاری کشت داده شدند و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار گرفتند (۱۴).

بررسی تاثیر دما: در این آزمون همانند دو روش قبل عمل گردید و ریزوباکترها در ۳ پلیت حاوی لوریا آگار به صورت لکه‌گذاری کشت داده شدند و در انکوباتورهایی با دماهای ۴، ۳۷ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۱۵).

مقاومت ریزوباکترها در برابر فلزات سنگین:

۵ ایزوله‌ی انتخابی (بر اساس نتایج محلول-سازی فسفات و روی) به پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار که دارای ۶٪، ۸٪، ۹٪ از نمک‌های فلزات سنگین به نام‌های کلرید مس، کلرید نیکل، کلرید منگنز، نیترات سرب، سولفات روی (آلمان) بودند به صورت لکه‌گذاری تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس امکان رشد باکتری‌ها بر روی این محیط‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶).

۵) آزمون آنتی‌بیوگرام: بعد از تهیه‌ی کشت جوان (۲۴ ساعته) در محیط لوریا براث، کدورتی از باکتری‌ها معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. سپس با کمک سوآپ استریل به صورت چمنی کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار (۲۱ گرم/لیتر- هایمدیا) صورت گرفت و با استفاده از پنس استریل دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (دیسک/میکروگرم) بنام‌های آمیکاسین (۳۰)، آموکسی-سیلین (۲۵)، نورفلوکساسین (۱۰)، جنتامایسین (۱۰)، آمپی‌سیلین (۱۰)، نالیدیسیک اسید (۱۵)، سیپروفلوکساسین (۵)، تری‌متوپریم (۲۵) بر روی محیط فوق منتقل گردیدند. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند (۱۷). در ادامه

این مطالعه آزمون سلولاز، کاتالاز، دی‌ان‌از[2]، همولیز، ایندول و اکسیداز بر روی جدایه‌های مزبور انجام گردید.

۶) درصد جوانه زنی: بذرهای گیاه ذرت در شرایط آسپتیک توسط آب مقطر استریل شست و شو و با الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه خیسانده و سپس عمل شست و شو مجدداً انجام گردید و با هیپوکلریت ۱۰ درصد به مدت ۱ دقیقه خیسانده و باز هم عمل شست و شو صورت پذیرفت. بذرها در آب مقطر استریل به مدت ۳ ساعت خیسانده شدند. سپس به پلیت‌های استریلی که توسط کاغذ صافی استریل پوشیده شده بودند توسط پنس استریل منتقل گردیدند. به پلیت‌ها جهت خیس شدن کاغذها آب مقطر استریل اضافه شد و در هود میکروبیولوژی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. درصد جوانه‌زنی بذرها پس از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸).

۷) آزمون گلدان: در ابتدا مانند آزمون درصد جوانه‌زنی تمام مراحل اجرا شد. باکتری‌های منتخب جدا شده از خاک، در محیط لوریا براث در زیر هود کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت به انکوباتور شیکردار ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و پس از آن لوله‌ها را در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و پس از آن محلول رویی دور ریخته و به رسوب حاصله سرم فیزیولوژیک استریل اضافه شد و سوسپانسیونی معادل نیم مک‌فارلند تهیه گردید و به بذر گیاه تلقیح شد. گلدان‌ها با خاک ماسه بادی پر شدند. به همه‌ی گلدان‌ها به میزانی آب اضافه گردید تا آبی از گلدان‌ها نشت نکند (ظرفیت نگهداری آب) و بذر-های جوانه‌دار که به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت با سوسپانسیون میکروبی قرار گرفته بودند با پنس استریل در داخل حفره‌هایی با قطر ۱ سانتیمتر و عمق ۳ سانتیمتر که در خاک گلدان ایجاد شده بود قرار گرفتند. در داخل هر گلدان تعداد ۵ بذر با حداکثر فاصله کشت داده شد و در کل ۳ گلدان به عنوان شاهد انتخاب و برای هر باکتری هم ۳ گلدان تست انتخاب گردید. همه-ی گلدان‌های مورد بررسی و شاهد با آب مقطر استریل آبیاری شدند. بعد از گذشت ۲ هفته از زمان کشت، در مرحله رشد رویشی و قبل از گل‌دهی، گیاهان به آرامی از گلدان‌ها خارج گردیدند و برای اندازه‌گیری شاخص-های مورد نظر به آزمایشگاه منتقل شدند. ارتفاع ساقه و طول ریشه ذرت‌ها اندازه‌گیری شدند. در خاتمه نمونه‌ها در دمای اتاق و در سایه خشک گردیدند و وزن خشک ساقه و ریشه نیز اندازه‌گیری شد (۹).

۸) تجزیه و تحلیل آماری تغییرات مورفولوژیک گیاهان ذرت تحت اثر ریزوباکترهای انتخابی: داده‌های بدست آمده بر اساس آزمون مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار اس.پی.اس.اس[3] با ورژن ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (۱۹).

۹) شناسایی مولکولی باکتری‌های انتخابی: ۵ باکتری که تست گلدان آن‌ها نسبت به گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند جهت شناسایی انتخاب شدند. دستورالعمل استخراج دی.ان.آ[4] طبق کیت شرکت سازنده انجام گرفت. در تکثیر ژن 16S rRNA باکتریایی از پرایمرهای F28 و R1492 به‌عنوان جفت پرایمر جهت دستیابی به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز با توالی زیر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (۲۰-۲۲):

27F: 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG3', 1492R: 5'CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT3'

بعد از انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز با ولتاژ ۱۰۰ ولت و مشاهده باند مربوط به قطعه تکثیر شده، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تخلیص و تعیین توالی به همراه پرایمرهای پیشرو به شرکت بیونر کره جنوبی با واسطه شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) ارسال گردید تا توالی‌های محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ارسال شده مشخص و تأیید شدند. در نهایت توالی‌های نهایی با سایر توالی‌های باکتریایی موجود در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا[5] مقایسه شدند. در نهایت جنس و گونه‌ای که بیشترین شباهت را با

[2] DNase

[3] SPSS
[4] DNA
[5] NCBI

توالی‌های به دست آمده داشت گزارش شدند. در تحقیق حاضر از نرم‌افزار کروماس (ورژن ۲، ۳، ۴) جهت بررسی کیفیت و ویرایش توالی‌های واصل شده استفاده شد. نهایتاً توالی بدست آمده در مقابل داده‌های توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن به شیوه‌ی بلاست بررسی گردید (۲۳).

نتایج

۱) نتایج ریزوباکترهای خالص‌سازی شده: از رقت‌های پورپلیت شده در محیط لوریا آگار، کلنی‌های متفاوت رشد یافته خالص‌سازی گردیدند که بر این اساس ۱۲۰ ایزوله متفاوت احتمالی حاصل گردید.

۲) یافته‌های حاصل از غربالگری باکتری‌ها: آزمون انحلال فسفات در ارتباط با تمام ریزوباکترها با استفاده از محیط اسپربر صورت گرفت و ۴۲ باکتری محلول‌کننده‌ی فسفات مشاهده گردید. باکتری‌های مزبور با کدهای IAUK[6] از شماره ۳۱۰۱ تا ۳۱۴۲ نامگذاری و در ادامه تمامی آزمون‌ها بر روی این باکتری‌ها انجام شد. بازده انحلال فسفات و روی باکتری‌های محلول‌کننده بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

(رابطه ۱)

بازده انحلال (SE) = [(Z) قطر هاله ÷ (N) قطر کلنی] ×۱۰۰

نتایج آزمون‌های محلول‌سازی فسفات و روی، قابلیت تثبیت نیتروژن، احیاء نیترات، تولید آمونیاک، ایندول و سیانید هیدروژن و تولید آنزیم‌های سلولاز، کاتالاز و دی‌ان‌از، قابلیت همولیز خون مربوط به ۵ جدایه‌ی برتر که جهت ادامه تحقیق انتخاب شدند در جدول ۱ ذکر شده است و نتایج سایر ریزوباکترهای ضعیف و خارج شده از بررسی‌های غربالگری، ارایه نشده‌اند.

۳) نتایج شناسایی میکروارگانیسم به روش تعیین ترادف 16S rRNA: ۵ جدایه‌ی برتر انتخاب شده مطابق جدول ۱ تعیین هویت شدند. بدین‌ترتیب که با تعیین توالی 16S rRNA حاصل از هر باکتری و مقایسه با توالی‌های موجود در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا شناسایی هر یک به تفکیک انجام شد.

بر اساس جدول ۱، همه نمونه‌های انتخابی جهت انجام مراحل بعدی، قابلیت انحلال فسفات و روی را داشتند. *انتروباکتر* نژاد ۳۱۴۰ با قدرت انحلال ۳۴۶/۱ بهترین محلول‌کننده فسفات و *انتروباکتر* نژاد ۳۱۳۱ با قدرت انحلال ۵۷۱/۴ بهترین محلول‌کننده روی بود.

۴) بررسی تاثیر عوامل محیطی بر روی رشد ریزوباکترهای انتخابی: ۵ ایزوله فوق‌الذکر، توانایی تحمل اسیدیته ۹-۵ و نمک در غلظت‌های ۷-۰ و دماهای ۴۰-۴ را از خود بروز دادند. شوری و خشکی از مهمترین تنش‌هایی هستند که باعث کاهش قابلیت تولید محصولات کشاورزی در خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک می‌شوند.

۵) نتایج مقاومت در برابر فلزات سنگین: توانایی رشد و یا عدم رشد ۵ ایزوله‌ی برتر، بر روی محیط‌های لوریا آگار حاوی پنج فلز سنگین به میزان ۹-۶ درصد مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها بر روی تمامی فلزات به جز سولفات روی و ۹۱/۸ درصد بر روی سولفات روی توانایی رشد داشتند. قابل ذکر است که ایزوله ۳۱۰۲ تنها نژادی ارزیابی گردید که نسبت به غلظت‌های بیش از ۸٪ حساس بوده و قابلیت رشد خود را از دست داده است. بر این مبنا، تمامی *انتروباکترها* در تحقیق حاضر توانایی تحمل غلظت‌های متفاوت فلزات سنگین را در خاک‌های مختلف داشتند که از جمله ویژگی‌های چشمگیر ایزوله‌های یاد شده است.

۶) نتایج آنتی‌بیوگرام: با توجه به اینکه باکتری‌هایی که پتانسیل کاربرد در کودهای زیستی را می‌یابند نباید دارای ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند لذا سلامت زیستی ریزوباکترهای مورد بررسی می‌بایست ارزیابی می‌گردید. بر این اساس اثر ۸ آنتی‌بیوتیک معرفی شده، بر روی ۵ ایزوله‌ی برتر بررسی شد. بر این اساس، ۸۲/۵ درصد باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس، ۵ درصد نیمه حساس و ۱۲/۵ درصد مقاوم بودند. نتایج

[6] Islamic Azad University of Kerman

مزبور در مورد حساسیت ریزوباکترهای فوق نسبت بـه ۸ آنتی‌بیوتیک مهم و متداول، بسیار ارزنده و چشمگیر بود و ادامه‌ی بررسی‌ها را امکان‌پـذیر نمـود (جزئیـات نتـایج ارایه نگردیده است).

۷) درصد جوانه‌زنی: درصد جوانه‌زنی بذر هیبریدی ذرت بر اساس فرمول زیر، ۸۳/۳۳ محاسبه گردید.

(رابطه ۲)

(تعداد بذر جوانه زده ÷ تعداد بذر کاشته شده) = درصد جوانه زدن

۸۳/۳۳٪ = ۱۰۰ × (۳۰ ÷ ۲۵) = ۱۰۰ ×

۸) نتایج آزمون‌های آماری: ظرفیـت نگهـداری آب گلدان‌ها به میزان ۶۰۰ میلی‌لیتر محاسبه شد. نتـایج حاصل از تأثیر ریزوباکترها بر رشد ذرت توسط نـرم‌افـزار SPSS با ورژن ۱۹ مورد تجزیه و تحلیـل قـرار گرفـت. *انتروباکتر کلواکه و انتروبـاکتر هرمـوچی* بـر روی ارتفـاع ساقه و طول ریشه، در مقایسـه بـا کنتـرل دارای تفـاوت معنی‌داری (سـطح $P \leq 0.05$) بودنـد (شـکل ۱ و ۲). علاوه بر اینکه در مورد *ریزوبـاکتر* نـژاد ۳۱۳۱ بیشـترین اثر مشاهده شد، حتی تاثیر مثبت این *ریزوبـاکتر* نسـبت به تاثیر مثبت *ریزوباکترهای* ۳۱۰۲ و ۳۱۲۵ نیـز تفـاوت معنی‌دار و قابل توجهی داشت.

جدول ۱- ویژگی‌های باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاهی همراه با برخی از خصوصیات آنزیماتیک آن‌ها
Table 1- characteristics of plant growth promoting rhizobacteria with their enzymatic traits

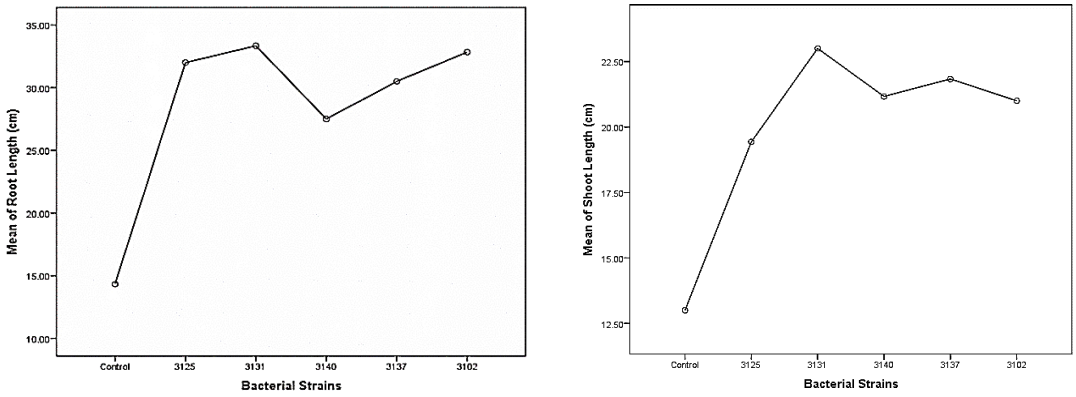
نژاد[۱] IAUK	نزدیک‌ترین هم‌خوانی[۲]	تشابه هویتی٪[۳]	انحلال مواد معدنی٪[۴]		تثبیت نیتروژن[۵]	احیاء نیترات[۶]
			فسفات	روی	در جنسون و بورک	
۳۱۰۲	*E. cloacae*	٪۹۵	۳۲/۰	۴۱/۱	+	+
۳۱۲۵	*E. cloacae*	٪۹۵	۳۲/۳	۴۰/۰	+	+
۳۱۳۱	*E. cloacae*	٪۹۴	۲۹/۲	۵۷/۱	+	+
۳۱۳۷	*E.hormaechei*	٪۹۷	۳۰/۷	۴۵/۰	+	+
۳۱۴۰	*Enterobacter sp*	٪۹۷	۳۴/۶	۳۳/۶	+	+

[۱]Strain no.(IAUK)، [۲]Closest match، [۳]% Identity Similarity، [۴]% Solubility capacity، [۵][رشد (+) عـدم رشـد (-)]، [۶][تغییر رنگ قرمز (+) عدم تغییر رنگ (-)]

ادامه جدول ۱

نژاد[۱] IAUK	آمونیاک[۷]	سیانید هیدروژن[۸]	ایندول[۹]	سلولاز[۱۰]	کاتالاز[۱۱]	دی- ان- از[۱۲]	همولیز خون[۱۳]
۳۱۰۲	+	-	-	-	+	-	γ
۳۱۲۵	+	-	-	-	+	-	γ
۳۱۳۱	+++	-	-	-	+	-	γ
۳۱۳۷	+	-	-	-	+	-	γ
۳۱۴۰	+	-	-	-	+	-	γ

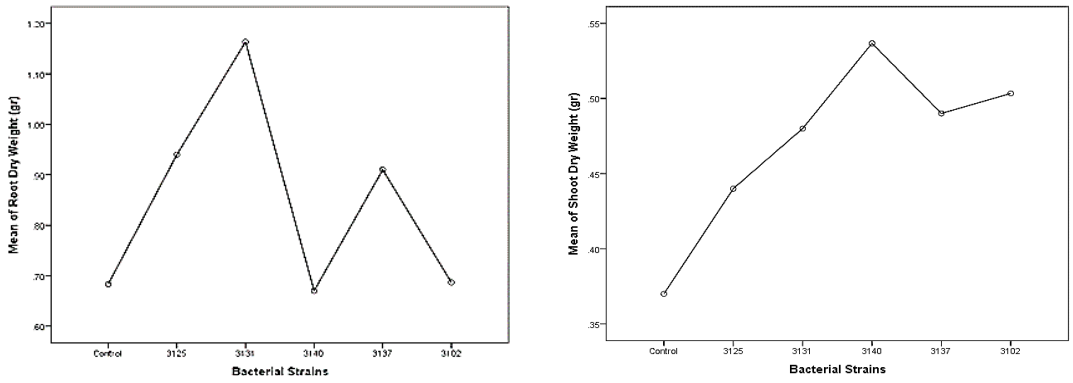
[۷][آجری (+++) زرد پر رنگ (++) زرد (+)]، [۸][عدم تغییر رنگ (-) رنگ قهوه ای (+)]، [۹][عدم تغییر رنگ (-) تغییر رنـگ (+)]، [۱۰][عدم هاله (-) هاله (+)]، [۱۱][تولید حبـاب (+) عـدم تولیـد حبـاب (-)]، [۱۲][عـدم هالـه (-) هالـه (+)]، [۱۳][عـدم همـولیز (γ) همولیز(α)]



ب الف

شکل ۱- تأثیر باکتری‌ها بر ارتفاع ساقه (الف) و طول ریشه (ب)

Figure 1- effects of bacteria on shoot height (a) and root length (b)



ب الف

شکل ۲- تأثیر باکتری‌ها بر وزن خشک ساقه (الف) و ریشه (ب)

Figure 2- Effect of bacteria on dry weight of shoot (a) and root (b)

بحث

در تحقیقی در خصوص غربالگری و جداسازی باکتری محلول‌کننده‌ی مواد معدنی از منطقه ریزوسفری برنج، ۱۵ ریزوباکتر محلول‌کننده روی حاصل گردید و نژاد ZOB-8 با بازده انحلال ۲۲۳/۴ بیشترین قدرت انحلال روی را داشت (۲۴). بر اساس تحقیق فوق باکتری‌های محلول‌کننده روی در خاک‌های مختلف یافت می‌شوند اما این باکتری‌ها از نظر قدرت انحلال عنصر فوق با هم تفاوت دارند. در پژوهشی دیگر *کلبسیلا پنومونیه* قدرت انحلال فسفات و روی به ترتیب ۲۷۷ و ۱۵۷ را داشت و باعث افزایش رشد ذرت می‌گردید اما قابل ذکر است *انتروباکتر* نژاد ۳۱۳۱ دارای قدرت انحلال روی بیشتری می‌باشد (۲۵).

در تحقیقات متعددی که در کشورهای پاکستان و ایران صورت پذیرفت در مورد بازده انحلال فسفات به ترتیب نتایج ۲۶۰ و ۲۷۷ حاصل گردید که نسبت به نتیجه‌ی ۳۴۶/۱ تحقیق حاضر ظرفیت و توانایی کم‌تری می‌باشد (۱۰، ۲۳)، ولی در تحقیقاتی که توسط دانشمندان کشورهای کنیا، تایلند، چین صورت گرفت در مورد بازده انحلال فسفات به ترتیب نتایج ۴۱۲/۵، ۴۹۹/۸، ۳۷۵/۰ حاصل شد که نسبت به نتیجه‌ی این تحقیق قابلیت بیشتری مشاهده گردید (۲۴، ۳۳، ۳۸). طبق تحقیقی که در شهر کرج نیز انجام شد، ۷۷/۵ درصد از باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر گیاه سنبل الطیب دارای توانایی انحلال فسفات بودند و ۱/۸۶ سانتی‌متر بزرگ‌ترین هاله‌ی محلول‌سازی فسفات بود که ریزوباکترها ایجاد کرده بودند، با وجود اینکه در تحقیق

حاضر، بزرگ‌ترین هاله ۴/۵ سانتیمتر است که توسط *انتروباکتر* ها به وجود آمد (۲۲). بر این اساس قدرت انحلال فسفات نامحلول توسط ریزوباکترها در خاک‌های مختلف، متفاوت است و از جمله تلاش‌های بسیاری از محققین، یافتن نژادهای بومی مناطق مختلف کشاورزی است که بیشترین راندمان محلول‌سازی فسفات را در خود داشته و امکان کاربرد در کودهای زیستی را داشته باشند.

در مورد اثرات متقابل مثبت بین باکتری‌های آزادزی تثبیت کننده‌ی نیتروژن و تحریک رشد گیاهی نیز گزارش‌های متعددی وجود دارد. در تحقیقات مختلف نشان داده شد که تعدادی از گونه‌های باکتریایی متعلق به خانواده‌ی *انتروباکتر، آزوسپریلیوم، آلکالیجنز، آرتروباکتر، اسینتوباکتر، باسیلوس، بولخولدریا، اروینیا، فلاووباکتریوم، سودوموناس، ریزوبیوم، سراشیا* و مرتبط با ریزوسفر گیاهان مختلف از طریق عملکردهای مختلف از جمله تثبیت نیتروژن بر رشد گیاه اثر مفیدی دارند (۵، ۳۹). در تحقیق صورت پذیرفته نیز *انتروباکتر کلواکه* و *انتروباکتر هرموچی* با تثبیت نیتروژن در شرایط برون-تنی ظرفیت و توانایی و پتانسیل افزایش رشد گیاهی را نمایان‌گر ساختند. از جمله فواید کود بیولوژیک نیتروژن‌دار در سایر پژوهش‌ها می‌توان افزایش توسعه‌ی ریشه و جذب بهتر آب و مواد غذایی را ذکر کرد که به بدنبال آن رشد گیاه افزایش می‌یابد و با افزایش رشد و نمو گیاه افزایش وزن خشک نیز قابل پیش‌بینی خواهد بود (۲۶).

یکی از ویژگی‌های مهم ریزوباکترهای افزایش‌دهنده رشد گیاهی که به طور غیرمستقیم رشد گیاه را تحت-تأثیر قرار می‌دهد تولید آمونیاک است. در تحقیق حاضر تمام *انتروباکترها* قادر به تولید آمونیاک بودند. *انتروباکتر* نژاد ۳۱۳۱ نسبت به سایر باکتری‌ها توانایی بیشتری در تولید آمونیاک داشت. در سایر پژوهش‌ها ذکر گردیده که باکتری‌های *انتروباکتر، باسیلوس، اسینتوباکتر، سودوموناس، میکروکوکوس* جدا شده از خاک ریزوسفری در ۲ منطقه‌ی متفاوت در هندوستان، توانایی تولید آمونیاک را داشتند (۲۷).

در مطالعه‌ای که توسط محققین در سال ۲۰۱۵ بر روی تاثیر باکتری نمک دوست بر وزن خشک ریشه و شاخساره گندم در خاک‌های شور انجام شد، در این ارتباط تیمارهای تلقیح شده با جدایه‌های باکتری در مقایسه با شاهد در همه سطوح شوری، باعث افزایش در وزن خشک ریشه و اندام هوایی شدند (۲۸). در مطالعه-ی انجام شده کلیه‌ی ریزوباکترها از جمله *انتروباکتر* ۳۱۰۲، ۳۱۲۵، ۳۱۳۱، ۳۱۳۷ و ۳۱۴۰ قادر به تحمل شوری از ۰ تا ۷ درصد بودند و با توجه به اینکه همگی بومی و ایزوله شده از خاک‌های نسبتا خشک و شور بودند لذا پتانسیل زیادی برای استفاده در مزارع نه تنها استان کرمان بلکه سایر مناطق ایران را نیز دارا خواهند بود.

ریزوباکترها به دلیل متحمل بودن نسبت به فلزات سنگین قادر به جذب سطحی یا درونی آلاینده‌های فلزی و همچنین احیای فلزات به فرم‌هایی با سمیت کمتر می‌باشند و بدین طریق موجب زدایش یا تثبیت آن‌ها می‌شوند. علاوه براین، ریزوباکترهای محرک رشد گیاه از طریق مکانیسم‌های مختلفی می‌توانند رشد گیاه را در خاک‌های آلوده به فلز بهبود بخشند (۲۹).

بر اساس تحقیقات متعدد، باکتری‌های محلول کننده‌ی فسفات، باعث افزایش رشد در چندین محصول از جمله ذرت، سویا، نخود، بادام زمینی و برنج بودند (۳۰-۳۴). پژوهشگران پس از جداسازی *انتروباکتر پانتوئیا* از ریزوسفر ذرت و سویا، ریزوباکتر فوق را به بذر ذرت تلقیح و مشاهده کردند این باکتری افزایش معنی-داری در شاخص‌های رشد گیاهی (وزن خشک ساقه و ریشه، سطح برگ) نشان داد (۳۵). تحقیقی که در سال ۲۰۱۵ انجام شد بیانگر این مطلب بود که *انتروباکتر* جداسازی شده از خاک ریزوسفری مزرعه ذرت شهرستان زرند، پس از تلقیح به بذر ذرت باعث افزایش طول ساقه، وزن خشک ساقه و ریشه شده است (۳۶). تلقیح باکتری‌های محلول‌کننده‌ی فسفات با بذر ذرت سبب تأثیر معنی‌داری بر قطر ساقه و طول ذرت می‌شود (۳۷). در پژوهش دیگر، *انتروباکتر هرموچی* را به عنوان محلول‌کننده فسفات از گیاه آلوئه‌ورا جداسازی و شناسایی گردید و مشاهده شد که پس از تلقیح *انتروباکتر هرموچی* به گیاه فوق جذب فسفر و رشد ریشه افزایش یافته است (۳۸). نتیجه‌ی تحقیقی دیگر که به منظور بررسی ویژگی‌های *انتروباکتر هرموچی* بر رشد ریشه‌ی گوجه‌فرنگی در خاک‌های خشک و شور انجام شد نشان داد که باکتری فوق پتانسیل تولید

ترکیبات مختلف بیولوژیکی مانند تولید ایندول و کربوهیدرات‌ها به عنوان منبع انرژی را دارد و از همین طریق بر رشد ریشه‌ی گیاه اثر مثبت می‌گذارد و تحمل زنده ماندن در ریشه‌ی گوجه‌فرنگی در خاک‌های خشک و شور با دمای بالا را دارد (۳۹). در گزارش دیگر *انتروباکتر کلواکه* به عنوان باکتری محرک رشد گیاه در برخی گیاهان بوده است. طبق تحقیقات پژوهشگران بر روی جداسازی باکتری‌های افزایش‌دهنده‌ی رشد گیاهی از ریشه‌ی سیب‌زمینی در هندوستان مشخص شد که *انتروباکتر کلواکه* AB2 به عنوان تلقیح و کود زیستی یک جایگزین کارآمد و مناسبی برای کودهای شیمیایی است (۴۰). در تحقیق دیگر دو باکتری جداسازی شده از خاک گلخانه‌ای در کره جنوبی که توانایی تولید ایندول و انحلال فسفات نامحلول را داشتند *انتروباکتر هرموچی* و *انتروباکتر لودویگی* بودند. این دو گونه‌ی باکتریایی دارای پتانسیل زیادی به عنوان کود زیستی هستند و از طریق انحلال فسفات و تولید ایندول باعث حاصلخیزی خاک و افزایش رشد گیاه می‌شوند (۴۱).

نتیجه‌گیری

ریزوباکترها از طریق تثبیت زیستی نیتروژن، محلول کردن فسفر و پتاسیم و سایر عملکردهای دیگر بصورت مستقیم و غیرمستقیم، باعث افزایش رشد گیاهان زراعی می‌شوند. کاربرد کودهای زیستی واجد باکتری‌های محرک رشد مهم‌ترین راهبرد در مدیریت تلفیقی تغذیه‌ی گیاهی برای سیستم کشاورزی پایدار می‌باشد. بنابراین تلاش برای تهیه و تولید کودهای زیستی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و از دیدگاه زیست‌محیطی نیز قابل پذیرش هستند. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان‌دهنده‌ی ظرفیت احتمالی و چشمگیر ایزوله‌های ریزوسفری فوق‌الذکر به عنوان کاندیداهای مورد استفاده جهت کاربرد در کودهای زیستی است تا پس از تهیه بیوفرتیلایزر[7] و استفاده آن در مزارع استان و کشور، افزایش رشد گیاه ذرت یا سایر گیاهان همراه با کاهش مصرف کودهای شیمیایی امکان‌پذیر گردد.

[7] Biofertilizer

سپاسگزاری

از پرسنل آزمایشگاه‌های تحقیقاتی نهایت تقدیر بعمل می‌آید.

حمایت مالی

از پشتیبانی حوزه معاونت پژوهش و فناوری و مدیریت توسعه و منابع دانشگاه آزاد اسلامی کرمان تقدیر می‌گردد.

References

1-Fathi A. Effect of phosphate solubilization microorganisms and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components of corn. Scientia Agriculturae. 2017;18(3):66-9.

2-Rosas SB, Rovera M, Andres J, Correa N, editors. Effect of phosphorous solubilizing bacteria on the rhizobia-legume simbiosis. First international meeting on microbial phosphate solubilization. Springer;2007.

3-Zaidi A, Khan MS. Co-inoculation effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Glomus fasciculatum* on green gram-*Bradyrhizobium* symbiosis. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 2006;30(3):223-30.

4-Roesti D, Gaur R, Johri B, Imfeld G, Sharma S, Kawaljeet K, et al. Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. Soil Biology and Biochemistry. 2006; 38(5):1111-20.

5-Rudresh D, Shivaprakash M, Prasad R. Effect of combined application of Rhizo-

bium, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). Applied soil ecology. 2005;28(2):139-46.

6-Nagaraju Y, Triveni S, Subhashreddy R, Jhansi P. Biofilm formation of zinc solubilizing, potassium releasing bacteria on the surface of fungi. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017;6(4):2037-47.

7-Shakeela S, Padder S, Bhat Z. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with medicinal plant *Picrorhiza Kurroa*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2017;6(3):157-68.

8-Ramachandran K, Srinivasan V, Hamza S, Anandaraj M, editors. Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. First international meeting on microbial phosphate solubilization. Springer;2007.

9-Rokhbakhsh-Zamin F, Sachdev D, Kazemi-Pour N, Engineer A, Pardesi KR, Zinjarde S, et al. Characterization of plant-growth-promoting traits of Acinetobacter species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2011;21(6): 556-66.

10-Singh R, Pandey D, Kumar A, Singh M. PGPR isolates from the rhizosphere of vegetable crop *Momordica charantia*: characterization and application as biofertilizer. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017;6(3):1789-802.

11-Moustaine M, Elkahkahi R, Benbouazza A, Benkirane R, Achbani E. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology. 2017;2(2):238708.

12-Mandal S, Dutta P, Majumdar S. Plant growth promoting and antagonistic activity of Bacillus strains isolated from rice rhizosphere. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2017;8:408-15.

13-Shruti K, Arun K, Yuvneet R. Potential plant growth-promoting activity of rhizobacteria *Pseudomonas* sp in *Oryza sativa*. Journal of Natural Product and Plant Resource. 2013;3(4):38-50.

14-Paul EA. Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. Academic Press;2007.

15-Zabihi H, Savabghi GH, Khavazi K, Ganjali A. Response of wheat growth and yield to application of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of phosphorus fertilization. Iranian journal of field crops research. 2009;7(1):41-51. [In Persian]

16-Gammack SM, Paterson E, Kemp JS, Cresser MS, Killham K. Factors affecting the movement of microorganisms in soils. Soil biochemistry. 1992;7:263-305.

17-Farooq N, Raheem A, Ali B. Waterborne *Escherichia coli*: Biosafety and screening as plant growth promoting rhizobacteria. Journal of pure and applied microbiology. 2014;8(5):3963-71.

18-De Gregorio PR, Michavila G, Ricciardi Muller L, de Souza Borges C, Pomares MF, Saccol de Sá EL, et al. Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants. Plos one. 2017; 12(5):e0176930.

19-Katiyar D, Hemantaranjan A, Singh B, Malakar AK. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria *Enterobacter hormaechei* and their suppression efficacy against *Colletotrichum falcatum* in combination with Chitosan. International Journal of Plant & Soil Science. 2017:1-12.

20-de Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, et al. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. Oral Microbiol Immunol. 2006; 21(1):61-8.

21-Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and environmental microbiology. 2008;74(8):2461-70.

22-Palkova L, Tomova A, Repiska G, Babinska K, Bokor B, Mikula I, et al. Evaluation of 16S rRNA primer sets for characterisation of microbiota in paediatric patients with autism spectrum disorder. Scientific Reports. 2021;11(1): 6781.

23-Sunithakumari K, Devi SP, Vasandha S. Zinc solubilizing bacterial isolates from the agricultural fields of Coimbatore, Tamil Nadu, India. Current Science. 2016:196-205.

24-Gandhi A, Muralidharan G, Sudhakar E, Murugan A. Screening for elite zinc solubilizing bacterial isolate from rice rhizosphere environment. International Journal of Recent Scientific Research. 2014;5(12):2201-4.

25-Hadian G, Rokhbakhsh-Zamin F, Khoshroo SMR. 1394. Increase corn growth by *Klebsiella pneumoniae* 1021 isolated from the Koohpayeh farming site of Islamic Azad University of Kerman. The First National Conference on New Achievements in Biosciences and Agriculture, Tehran. Civilica, https://civilica.com/doc/417931. [In Persian]

26-Emam Y, Eilkaie M. Effect of plant density and chlormequat chloride (CCC) on morphological characteristics and grain yield of winter rape seed cv. Talayeh. Iranian Journal of Crop Sciences. 2002; 4(1):1-8.

27-Kumar A, Kumar A, Devi S, Patil S, Payal C, Negi S. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. Recent research in science and technology. 2012;4(1):1-5.

28-Atouei MT, Pourbabaee AA, Shorafa M. Alleviation of salinity stress on some growth parameters of wheat by exopolysaccharide-producing bacteria. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science. 2019;43(5): 2725-33.

29-Reza NM, Rezvan N. Plant growth promoting rhizobacteria and their role in remediation of heavy metal contaminated soils. Journal of Human and Environment. 2015;32:33-48. [In Persian]

30-Akhtar M, Siddiqui Z. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Rhizobium* sp. on the growth, nodulation, yield and root-rot disease complex of chickpea under field condition. African Journal of Biotechnology. 2009; 8(15).

31-Ashrafuzzaman M, Hossen FA, Ismail MR, Hoque A, Islam MZ, Shahidullah S, et al. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. African Journal of Biotechnology. 2009;8(7).

32-Fernández LA, Zalba P, Gómez MA, Sagardoy MA. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. Biology and Fertility of Soils. 2007;43(6):805-9.

33-Hameeda B, Harini G, Rupela O, Wani S, Reddy G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiological research. 2008;163(2): 234-42.

34-Taurian T, Anzuay MS, Angelini JG, Tonelli ML, Ludueña L, Pena D, et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. Plant and Soil. 2010; 329(1):421-31.

35-Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annals of Microbiology. 2010; 60(4):579-98.

36-Safizadeh F, Rokhbakhsh-Zamin F, Khoshroo SMR. 2015. Investigating the increase in the growth of corn (*Zea mays* L.) in the seedling stage by *Enterobacter* 1060 isolated from the suburban farms of Kerman. The first national conference on new achievements in biological and agricultural sciences. Tehran. Civilica, https: //civilica.com/doc/417928. [In Persian]

37-Mahdi Z, Iraj A, Gholamabbas A, Hamid I, Gholamali A. Regression relationships and correlation between grain maize traits under different fertilizer treatments and drought stress conditions. Agroecology. 2010;3(1):64-50.

38-Gupta M, Kiran S, Gulati A, Singh B, Tewari R. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. Microbiological research. 2012;167(6): 358-63.

39-Amaya-Gómez CV, Porcel M, Mesa-Garriga L, Gómez-Álvarez MI. A framework for the selection of plant growth-promoting rhizobacteria based on bacterial competence mechanisms. Applied and environmental microbiology. 2020; 86(14):e00760-20.

40-Preeti V, Shahi S. Isolation and characterization of bacterial isolates from potato rhizosphere as potent plant growth promoters. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2015;4(3):521-8.

41-Walpola BC, Arunakumara K. Assessment of phosphate solubilization and indole acetic acid production in plant growth promoting bacteria isolated from green house soils of Gonju-Gun, South Korea. Tropical Agricultural Research and Extension. 2016;18(1).

Effect of Phosphate Solubilizing Rhizobacteria on the Growth of Maize in the Seedling Stage

Farzaneh Mohammadi[1], Farokh Rokhbakhsh-Zamin[*2], Sayed Mohammad Reza Khoshroo[2]

1-M.S, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

2-Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

* Corresponding Author: rokhbakhsh@iauk.ac.ir

Received: 14/9/2021, Accepted: 17/9/2021

Abstract

There is a great consideration on the usage of biofertilizers as the alternative for chemical fertilizers. Some species of *Enterobacter* are described to be used in biofertilizers with direct and indirect plant growth promotion. This research aims to isolate phosphate solubilizing bacteria (PSB) and evaluate their effects on maize growth. So, rhizobacteria were isolated from the maize rhizosphere, and screening was performed on Sperber and Zinc oxide media. Other rhizobacterial traits such as ammonia and hydrogen cyanide production, nitrogen fixation, nitrate reduction, and the effect of environmental factors were also evaluated. Out of 42 PSB, 5 isolated strains with the best results were used for further tests and they were identified based on their 16S rRNA gene sequence as *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hermoche,* and *Enterobacter* sp. All selected strains were able to solubilize phosphate and zinc and could tolerate NaCl up to 7% and grow in pH 5 to 9, and finally, they could grow in temperatures in a range of 4 to 44ºC. All 5 isolates could significantly increase shoot height and root length, and wet weight of shoot and root. Finally, according to the *in-vitro* and *in-vivo* results, the evaluated capabilities of bacterial strains isolated from maize are attractive and highlighted and it makes them good candidates for the construction of novel biofertilizers.

Keywords: Maize, Phosphate and Zinc Solubilization, *Enterobacter* sp., PGPR