E-ISSN: 2538-2187 | P-ISSN: 2251-7901

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology

https://jab.alzahra.ac.ir/
Vol. 37, No.3. (2024) Autumn, 36-46
https://doi.org/10.22051/jab.2024.44085.1574

Paper Type: Original Article

Isolation and Molecular Identification of Plant Growth-Promoting Bacteria from Phyllosphere and Rhizosphere of *Triticum aestivum* L.

Farahnaz Javanmardi*[1], Seyed Mohammad Mehdi Mahmoodi[2], Hasan Rostami[2]

[1]*Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran;*(Assistant Professor: Corresponding author: fa.javanmardi@iau.ac.ir).*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.*

Citation:

Javanmardi, F., Mahmoodi, S. M. M. & Rostami, H. (2024). Isolation and molecular identification of plant growth-promoting bacteria from phyllosphere and rhizosphere of *Triticum aestivum* L. *The quarterly scientific journal of applied biology, Volume* 37 (Issue No. 3), PP. 36-46

Received: 2023.06.24 Accepted: 2024.06.05

Abstract

Introduction: A significant number of soil bacteria are capable of nitrogen fixation, phosphate solubilization and auxin production. Such bacteria can play an effective role in improving plant growth. The purpose of this research was to isolate, identify and investigate the performance of such bacteria on the growth rate of lentil.

Methods: Thirty bacterial samples were isolated from phyllosphere and rhizosphere of wheat. Nitrogen-free culture medium was used to identify nitrogen-fixing bacteria, and NBRIP culture medium was used to evaluate the ability of solubilization of phosphate. The ability of the isolates to produce auxin was investigated by the Salkowski method. Also, the effect of two superior isolates on the longitudinal growth of stem and root of lentil were investigated.

Results: Out of 14 phyllospheric and 16 rhizospheric isolates, 2 isolates A and B, which were isolated from the rhizosphere and phyllosphere of wheat, respectively, and had the highest ability for the desired parameters, were identified based on sequencing a portion of 16S rDNA gene. Isolate A with nitrogen fixation and phosphate solubilization ability was 98% similar to *Bacillus cereus* and isolate B with auxin production ability was 99% similar to *Arthrobacter globiformis*. isolate A by 8% and isolate B by 50% were able to increase the longitudinal growth of lentil stem.

Conclusion: The wheat rhizosphere have bacteria capable of nitrogen fixation, phosphate solubilization, and auxin production. Applying such strains can play an effective role in improving plant growth and reducing the use of chemical fertilizers.

Keywords: Indole acetic acid, Nitrogen fixation, Phosphate solubilization

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۷، شماره ۳، پیاپی ۸۱، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۴۶-۳۶
https://jab.alzahra.ac.ir
https://doi.org/10.22051/jab.2024.44085.1574

نوع مقاله: پژوهشی

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های محرک رشد گیاه از فیلوسفر و ریزوسفر گندم زراعی (*Triticum aestivum* L.)

فرحناز جوانمردی*[1]، سید محمدمهدی محمودی[2]، حسن رستمی[3]

[1]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.
(*نویسنده مسئول: *fa.javanmardi@iau.ac.ir*)
[2]استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.
[3]دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۰۴/۰۳ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۳/۰۳/۱۶

چکیده

مقدمه: تعداد قابل توجهی از باکتری های خاک دارای قابلیت تثبیت نیتروژن، محلول سازی فسفات و تولید اکسین هستند. چنین باکتری هایی می توانند نقش موثری در بهبود رشد گیاهان داشته باشند. هدف از این پژوهش، جداسازی، شناسایی و بررسی عملکرد چنین باکتری هایی بر میزان رشد گیاه عدس بود.

روش‌ها: تعداد ۳۰ نمونه باکتری، از فیلوسفر و ریزوسفر گندم جداسازی شدند. از محیط کشت فاقد نیتروژن جهت شناسایی باکتری های تثبیت کننده نیتروژن، و از محیط کشتNBRIP جهت بررسی توانایی محلول سازی فسفات نامحلول استفاده شد. توانایی جدایه ها در تولید اکسین با روش سالکوفسکی بررسی شد. همچنین تاثیر دو جدایه برتر، بر میزان رشد طولی ساقه و ریشه گیاه عدس بررسی شد.

یافته‌ها: از ۱۴ جدایه فیلوسفری و ۱۶ جدایه ریزوسفری، ۲ جدایه الف و ب که به ترتیب از ریزوسفر و فیلوسفر گندم جداسازی شده بودند و بیشترین توانایی را در خصوص پارامترهای مورد نظر داشتند، براساس تعیین توالی بخشی از ژن 16S rDNA شناسایی شدند. جدایه الف با قابلیت تثبیت نیتروژن و محلول سازی فسفات به میزان ۹۸ درصد مشابه *باسیلوس سرئوس* و جدایه ب با قابلیت تولید اکسین به میزان ۹۹ درصد مشابه *آرتروباکتر گلوبیفورمیس* بود. جدایه الف به میزان ۸ درصد و جدایه ب به میزان ۵۰ درصد توانستند رشد طولی ساقه عدس را افزایش دهند.

نتیجه‌گیری: ریزوسفر گندم دارای باکتری هایی با قابلیت تثبیت نیتروژن، محلول سازی فسفات و تولید اکسین است. به کارگیری چنین سویه هایی، می تواند نقش موثری در بهبود رشد گیاهان و کاهش مصرف کودهای شیمیایی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: ایندول استیک اسید، تثبیت نیتروژن، محلول سازی فسفات

مقدمه

امروزه به دلیل افزایش جمعیت جهان، کاهش منابع آب شیرین و فرسایش خاک، ضرورت استفاده از روش های نوین در جهت افزایش حاصلخیزی خاک و تولید بیشتر محصولات زراعی بیش از پیش احساس می شود. تحقیقات نشان داده اند که بسیاری از مزارع کشاورزی با مشکل کمبود نیتروژن مواجه هستند و کودهای نیتروژنی پرمصرف ترین نهاده در کشاورزی محسوب می شوند [1]. معمول ترین و پرمصرف ترین کودهای نیتروژنی، کود اوره است. متاسفانه کارآیی کود اوره پایین بوده و تنها کمتر از ۵۰ درصد این کود می تواند توسط گیاهان جذب شود [2]. در واقع بخش قابل توجهی از کودهای اوره توسط پدیده هایی همچون تبخیر، تصعید، شوره برداری و آبشویه شدن از دسترس گیاهان خارج می شود. مسئله به همین جا ختم نمی شود، زیرا تبخیر، تصعید و شوره برداری اوره از طریق ایجاد گازهای گلخانه ای NO، N_2O و NH_3 موجب مشکلات زیست محیطی نیز خواهند شد. همچنین پدیده آبشویه می تواند با وارد نمودن کودهای نیتروژنی به سفره های آب، موجب آلودگی آب های زیرزمینی شود [3]، [4]، [5]. وجود چنین مسائلی، ضرورت تحقیق و بررسی در جهت یافتن جایگزین های مناسب برای جبران کمبود نیتروژن خاک را آشکار می سازد. در این خصوص، تثبیت زیستی نیتروژن بیش از همه مورد توجه قرار گرفته است. تثبیت زیستی نیتروژن فرآیندی است که توسط برخی از باکتری ها، سیانوباکترها و اکتینومایست ها قابل انجام است. در این فرآیند، آنزیم نیتروژناز در نقش یک کاتالیزور موجب احیای نیتروژن به آمونیاک شده که یون آمونیوم حاصله، در مراحل بعدی به شکل اسیدهای آمینه و سایر ترکیبات نیتروژنی در سلول های گیاه ذخیره می گردد. پروکاریوت هایی که دارای فعالیت نیتروژناز می باشند اغلب در ارتباط نزدیک با گیاهان یافت می شوند. تحقیقات نشان داده اند که بخش قابل توجهی از فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن توسط باکتری های همزیست با ریشه گیاهان صورت می گیرد و باکتری های آزادزی موجود در خاک سهم کمتری دارند [6]، [7]، [8]. در واقع باکتری های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن، نیتروژن تثبیت شده را درون سیتوپلاسم و پیکره خود نگاه می دارند و این ترکیبات بعد از مرگ و متلاشی شدن سلول های باکتری می تواند به خاک اضافه شده و در اختیار ریشه گیاهان قرار گیرد. اما نکته قابل تامل این است که برخی از این باکتری های آزادزی علاوه بر توانایی تثبیت نیتروژن، از قابلیت های دیگری همچون تولید هورمون های محرک رشد، قابلیت حل کنندگی فسفات، افزایش مقاومت گیاه به تنش ها، تولید ویتامین ها و کنترل عوامل بیماری زای گیاهی نیز برخوردار می باشند [9]، [10]. اگرچه مشخص گردیده که بیش از ۷۰ درصد این باکتری ها راندمان پایینی برای تثبیت نیتروژن دارند، اما وجود آنها به عنوان بخشی از چرخه نیتروژن در طبیعت و همچنین دیگر قابلیت های مفید آنان سبب شده که در مطالعات کشاورزی نوین مورد توجه خاص قرار گیرند [11]، [10]، [12]، [7]، [8].

اندام های هوایی گیاه (فیلوسفر) و خاک اطراف ریشه (ریزوسفر)، زیستگاه های مناسبی برای باکتری ها و دیگر میکروارگانیسم ها محسوب می شوند. تحقیقات مختلف نشان داده اند که تعداد قابل توجهی از این ریزجانداران از قابلیت تولید هورمون های محرک رشد گیاه برخوردار می باشند [13]، [14]، [15]، [16]. اکسین یکی از مهم ترین هورمون های گیاهی می باشد که نقش مهمی در رشد و توسعه اندام های گیاهی دارد. شناخته شده ترین اکسین ها، ایندول-۳- استیک اسید است. این هورمون از طریق متابولیسم ال- تریپتوفان به عنوان پیش ماده، توسط گیاهان و بسیاری از ریزجانداران خاک از قبیل باکتری ها، قارچ ها و جلبک ها تولید می شود [16]، [17]. قابلیت باکتری ها برای تولید هورمون اکسین در ریزوسفر بستگی به میزان در دسترس بودن مواد اولیه بیوسنتز این ماده در خاک و همچنین توانایی جذب اکسین تولیدی توسط ریشه گیاه دارد [18]، [19]. حداقل پنج مسیر متابولیسمی مختلف توسط باکتری های تولید کننده ایندول استیک اسید به کار می رود که دو مسیر ایندول-۳- استامید (Indole-3-acetamide) و ایندول-۳- پیرووات (Indole-3-pyruvate) از متداول ترین و شناخته شده ترین آنها محسوب می گردند [20]، [18]، [21]، [22].

در کشاورزی، فسفات به فرم کود شیمیایی فسفاته به خاک اضافه می شود، البته بیشتر فسفات موجود در کودهای شیمیایی به سرعت به فرم غیر محلول درآمده و از دسترس گیاهان خارج می شوند. تحقیقات مختلف نشان داده اند که تعداد قابل توجهی از باکتری های آزادزی ساکن ریزوسفر با ترشح اسیدهای آلی، اسیدهای معدنی و یون های پروتون موجب کاهش pH خاک می شوند، که این مسئله می تواند میزان حلالیت عناصر خاک و در نتیجه دسترسی ریشه گیاه را به عناصر مهمی همچون فسفر و روی افزایش دهد [23]، [24]، [25]. تقریبا همه میکروارگانیسم های محلول ساز فسفات، زمانی که در یک سوبسترای کربنی ساده رشد می کنند، می توانند گلیکولیک اسید (Glycolic acid)، گلوکونیک اسید (Gluconic acid) و ۲-کتو گلوکونیک اسید (2- Keto gluconic acid) تولید نمایند. این اسیدهای آلی همگی از عواملی هستند که باعث انحلال فسفات می شوند [26]، [27]، [28]. علاوه بر این، بعضی از این باکتری ها آنزیم های فسفاتاز ترشح می کنند که می تواند ترکیبات آلی فسفات را هیدرولیز و به فرم محلول درآورد [29]، [30].

هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های تثبیت کننده نیتروژن، محلول ساز فسفات و تولید کننده ایندول استیک اسید (اکسین) بود. شناسایی و به کارگیری باکتری های بومی با چنین ویژگی هایی می تواند نقش موثری در کشاورزی ارگانیک و کاهش نیاز به مصرف کودهای شیمیایی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری ها

به منظور جداسازی باکتری های مورد نظر، از مزارع اطراف شهرستان کازرون چندین نمونه گیاه گندم جمع آوری گردید. نمونه ها به دو بخش ساقه و ریشه تقسیم شدند و به طور جداگانه در کیسه های نایلونی بسته بندی و در محفظه حاوی کیسه های یخ با دمای ۶ درجه سانتیگراد در کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از بخش فیلوسفر گیاهان به کمک سوآب استریل مرطوب نمونه برداری گردید. از خاک متصل به ریشه گیاهان نیز پس از رقیق سازی متوالی در سرم فیزیولوژی نمونه برداری شد. نمونه ها به طور جداگانه در سطح محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و به مدت ۳ روز در گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. از کلنی های رشد کرده به تدریج نمونه برداری گردید و جهت خالص سازی، مجددا در پلیت های جدید کشت داده شدند.

جهت بررسی توانایی تثبیت نیتروژن، از محیط کشت نیمه جامد فاقد نیتروژن استفاده شد. برای این منظور K_2HPO_4 ۰/۵ گرم، $CaCO_3$ ۰/۵ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۱ گرم، NaCl ۰/۱ گرم، $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۲۵ گرم، $NaMoO_4$ ۰/۲۵گرم، گلوکز ۵ گرم و آگار ۳/۲ گرم را با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰۰ میلی لیتر رسانده و pH محیط کشت بر روی ۷ تنظیم گردید. باکتری های جداسازی شده را در پلیت های مزبور کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند [8].

جهت بررسی توانایی محلول‌سازی فسفات، از محیط کشت NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) که حاوی نمک نامحلول فسفات بود استفاده شد. برای تهیه این محیط بایستی $MgCl_2$ ۲/۵ گرم، $Ca_3(PO_4)_2$ ۲/۵ گرم، $MgSO_4$ ۰/۱۲ گرم، KCl ۰/۱ گرم، $(NH_4)_2SO_4$ ۰/۵ گرم، گلوکز ۵ گرم و آگار ۷/۵ گرم را با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰۰ میلی لیتر رسانده و pH محیط کشت بر روی ۷ تنظیم گردد. پس از استریل شدن و تهیه پلیت های کشت، باکتری‌های جداسازی شده را به‌صورت خطی در وسط پلیت‌ها کشت داده و پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در محفظه مرطوب و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [26]، [27].

جهت بررسی توانایی تولید ایندول استیک اسید، به تعداد باکتری‌های جداسازی شده، لوله‌های حاوی محیط کشت نوترینت براث آماده شد و باکتری‌های مورد بررسی در آنها کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس لوله‌های کشت به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. ۲ میلی لیتر از مایع رویی لوله‌ها را به لوله‌های خالی همسان انتقال داده و یک لوله حاوی محیط نوترینت براث استریل نیز به‌عنوان لوله شاهد در نظر گرفته شد. به تمامی لوله‌ها میزان ۴ میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (Salkowski) تازه تهیه شده و ۲ قطره ارتوفسفریک اسید اضافه گردید. معرف سالکوفسکی از مخلوط نمودن ۳ میلی‌لیتر $FeCl_3$ نیم مولار با ۱۵۰ میلی‌لیتر $HClO_4$ ۳۵ درصد به‌دست آمد. لوله‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی به مدت یک ساعت نگهداری شدند. تغییر رنگ لوله‌ها به صورتی تا قرمز نشانه تولید ایندول استیک اسید بود. همچنین به‌منظور افزایش دقت، جذب نوری لوله‌ها (نسبت به لوله شاهد) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [17].

جدایه‌هایی که بیشترین قابلیت تثبیت نیتروژن، محلول‌سازی فسفات و تولید اکسین را داشتند انتخاب کرده و جهت شناسایی دقیق جنس و گونه آنها از روش مولکولی استفاده گردید. برای این منظور ابتدا با استفاده از کیت استخراج DNA (فرمنتاز K0512) ژنوم باکتری‌ها را استخراج و با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی ۲۷F با توالی نوکلئوتیدی (5´AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3´) و ۱۴۹۲R با توالی نوکلئوتیدی (5´GGTTACCTTGTTACGACTT3´) که بخشی از ژن 16S rDNA را تکثیر می‌نمایند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت [31].

درنهایت، محصولات واکنش جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران واگذار گردید و نتیجه تعیین توالی در پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین در این تحقیق از آزمون آماری مربع کای (Chi square) جهت بررسی و مقایسه داده‌های به‌دست آمده درخصوص تعداد و عملکرد جدایه‌های فیلوسفری و ریزوسفری نسبت به یکدیگر استفاده گردید.

بررسی تاثیر و عملکرد جدایه ها بر میزان رشد دانه های عدس

حدود ۵ کیلوگرم خاک کشاورزی را به مدت ۴۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل نموده و مقداری از آن جهت آنالیز شیمیایی، به مرکز آزمایشگاهی خاک آزما پارس شیراز ارسال گردید. تعداد ۶۰ دانه عدس را به منظور ضدعفونی کردن سطحی، ابتدا با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی کرده و در نهایت سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. تعداد ۱۲ عدد گلدان پلاستیکی با قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متر را تا نیمه از نمونه خاک پر کرده و در ۴ گروه A، B، C و شاهد (۳ گلدان در هر گروه) قرار داده شدند. به کمک پنس استریل، در هر گلدان ۵ دانه عدس در فواصل مناسب از یکدیگر و در عمق ۲ سانتی‌متری از سطح خاک کاشته شدند. تمامی گلدان‌ها در گلخانه و در شرایط یکسان از نظر دما و میزان تابش نور قرار داده شدند. گلدان‌های هر گروه مطابق **جدول ۱** با تناوب یک بار در هفته آبیاری می‌شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های باکتری مورد نیاز برای آبیاری گلدان‌ها، ۱۸ ساعت قبل از زمان آبیاری، در محیط نوترینت براث و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده می‌شدند سپس با افزودن تدریجی محیط کشت استریل به لوله‌های کشت باکتری و مقایسه کدورت حاصله با لوله ۱ مک فارلند، غلظت باکتری‌ها معادل ۳×۱۰^{۸} باکتری در میلی‌لیتر تنظیم می‌شد. ضمنا در فواصل بین هفته‌ای نیز هر زمان که گلدان‌ها نیاز به آبیاری داشتند، با آب مقطر استریل و به میزان مساوی آبیاری می‌شدند.

جدول ۱- ترکیب مایع آبیاری در گروه های مختلف با تناوب یک بار آبیاری در هفته

Table 1- Composition of watering liquid in different groups with the frequency of watering once a week

Watering liquid of the pots	amount of solution (ml)			
	A group	B group	C group	Control group
liquid culture of *Bacillus cereus*	5	-	2.5	-
liquid culture of *Arthrobacter globiformis*	-	5	2.5	-
Sterile nutrient broth	-	-	-	5
Sterile D.W.	100	100	100	100
Total volume	105	105	105	105

پس از گذشت حدود ۲۰ روز، گیاهان رشد کرده را با دقت از گلدان ها خارج نموده و طول ساقه و ریشه هر گیاه برحسب میلی متر اندازه گیری شد و با استفاده از آزمون آماری تی (t-student test) ، ارتباط بین نوع مایع آبیاری به کار رفته، با میزان رشد طولی ساقه و ریشه گیاه عدس مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

در مرحله جداسازی و شناسایی اولیه باکتری ها، براساس خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی، ۳۰ جدایه متفاوت (۱۴ جدایه از فیلوسفر و ۱۶ جدایه از ریزوسفر گیاه گندم) شناسایی شدند. **جدول ۲** برخی از خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی این جدایه ها را نشان می دهد.

در این تحقیق، قابلیت تثبیت نیتروژن، محلول سازی فسفات نامحلول و تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه های فیلوسفری و ریزوسفری مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده، ۵ جدایه فیلوسفری (۳۶ درصد) و ۷ جدایه ریزوسفری (۴۴ درصد) قادر به تثبیت نیتروژن بودند. ۴ جدایه فیلوسفری (۲۹ درصد) و ۴ جدایه ریزوسفری (۲۵ درصد) قادر بودند نمک نامحلول فسفات را در اطراف خود حل کنند. همچنین،۴ جدایه فیلوسفری (۲۹ درصد) و ۷ جدایه ریزوسفری (۴۴ درصد) از قابلیت تولید ایندول استیک اسید برخوردار بودند (**شکل ۱**).

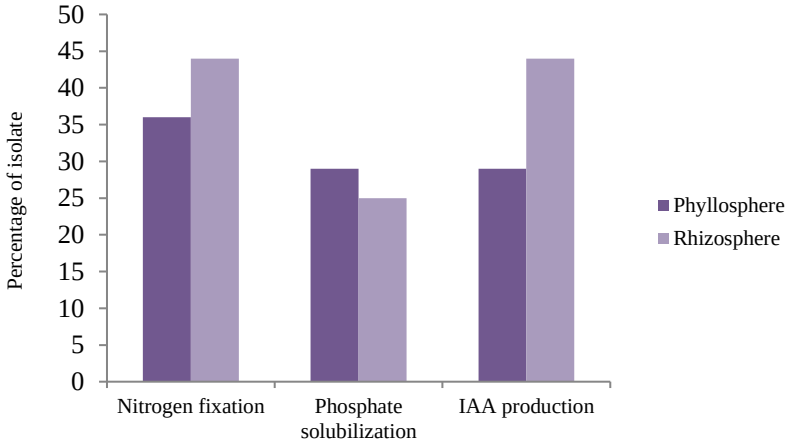
جدول ۲- خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی باکتری های جداسازی شده

Table 2- Physical and biochemical characteristics of isolated bacteria

Isolate	Bacterial shape: Number of isolates (%)				Spore formation (%)		Catalase (%)		Oxidase (%)		Gram reaction (%)	
	Pleomorphic	Coccus	Rod	Cocco bacilli	−	+	−	+	−	+	−	+
Phyllospheric	2 (14)	2 (14)	5 (36)	5 (36)	13 (93)	1 (7)	1 (7)	13 (93)	12 (86)	2 (14)	4 (29)	10 (71)
Rhizospheric	0 (0)	0 (0)	10 (63)	6 (37)	8 (50)	8 (50)	3 (19)	13 (81)	14 (87)	2 (13)	6 (37)	10 (63)

اعداد جدول؛ تعداد جدایه ها. اعداد داخل پرانتز؛ درصد جدایه ها

Table numbers; number of isolates. numbers in parentheses; percentage of isolates



شکل ۱- درصد جدایه های تثبیت کننده نیتروژن، محلول ساز فسفات و تولید کننده ایندول استیک اسید

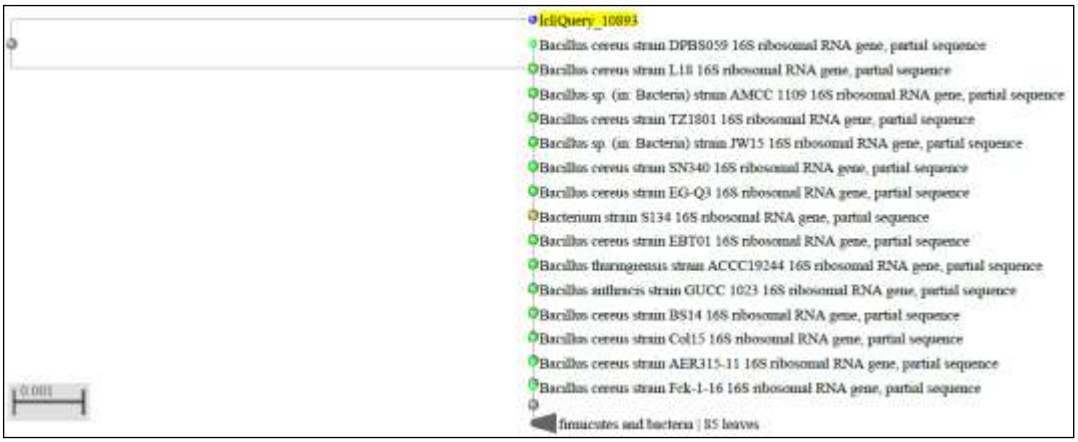
Figure 1- Percentage of nitrogen fixing, phosphate solubilizing and indole acetic acid producing isolates

در تحقیق حاضر، توانایی جدایه ها در محلول سازی فسفات نامحلول، بر اساس تشکیل هاله شفاف در اطراف منطقه رشد باکتری بررسی گردید. **شکل ۲** تصویری از این آزمون را نشان می دهد.

شکل ۲- چپ؛ محیط کشت اولیه حاوی نمک نامحلول فسفات. راست ؛ هاله شفاف ایجاد شده در اطراف خط رشد باکتری به دلیل محلول سازی فسفات

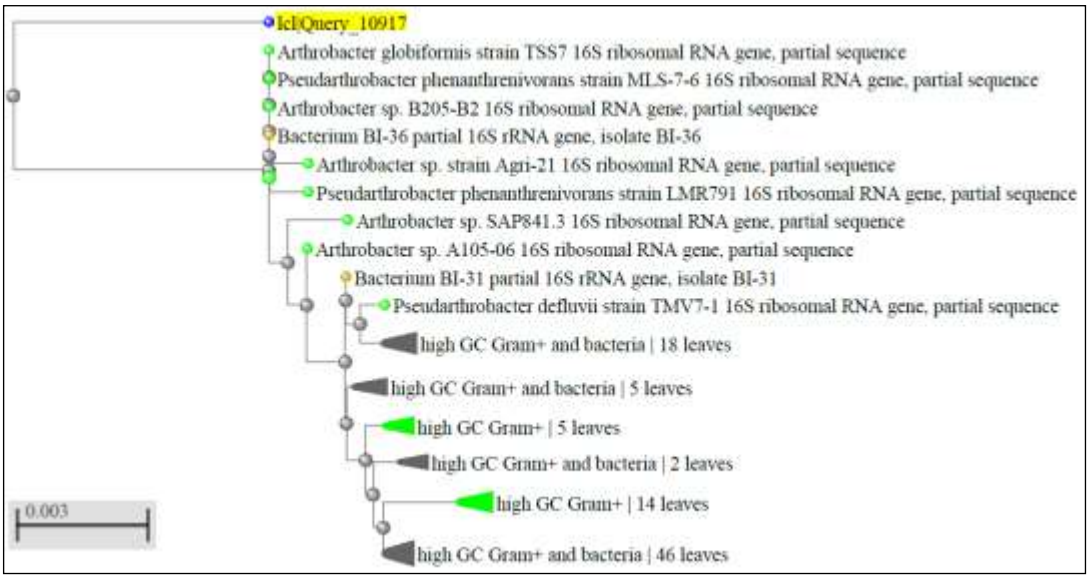
Figure 2- Left; Primary culture medium containing insoluble phosphate salt. Right ; A clear halo created around the bacterial growth line due to phosphate solubilization

در بین جدایه‌ها، دو جدایه که از بیشترین توانایی درخصوص شاخص‌های مورد نظر برخوردار بودند، جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. جدایه الف که از ریزوسفر گندم جداسازی شده بود، قادر به رشد در محیط کشت فاقد نیتروژن بود و همچنین از قابلیت محلول‌سازی فسفات کلسیم با غلظت ۰/۵ درصد نیز برخوردار بود. تعیین توالی بخشی از ژن 16S rDNA به طول ۱۳۴۳ نوکلئوتید نشان داد که این جدایه به میزان ۹۸ درصد مشابه باکتری *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) سویه DPBS059 می‌باشد. تعیین توالی جدایه ب نیز که از فیلوسفر گندم جداسازی شده بود و بیشترین توانایی تولید ایندول استیک اسید را داشت ناحیه‌ای ژنی به طول ۱۱۱۷ نوکلئوتید را ایجاد نمود و مشخص گردید که این جدایه به میزان ۹۹ درصد مشابه باکتری *آرتروباکتر گلوبیفورمیس* (*Arthrobacter globiformis*) سویه TSS7 می‌باشد. **شکل‌های ۳ و ۴** به ترتیب درخت فیلوژنی جدایه مشابه *باسیلوس سرئوس* و جدایه مشابه *آرتروباکتر گلوبیفورمیس* را که براساس روش Neighbor joining موجود در سایت NCBI ترسیم شده اند نشان می‌دهند.



شکل ۳- درخت فیلوژنی جدایه مشابه *باسیلوس سرئوس* سویه DPBS059

Figure 3- Phylogenetic tree of isolate similar to *Bacillus cereus* DPBS059



شکل ۴- جدایه مشابه باکتری *آرتروباکتر گلوبیفورمیس* سویه TSS7

Figure 4- Phylogenetic tree of isolate similar to *Arthrobacter globiformis* TSS7

در تحقیق حاضر، تاثیر حضور باکتریهای مورد بررسی، بر میزان رشد طولی ساقه و ریشه گیاه عدس بررسی شد که نتایج آزمون آماری تی، در **جداول ۳ و ۴** نشان داده شده است.

جدول ۵ نیز نتایج آنالیز شیمیایی نمونه خاک مورد استفاده جهت کشت گیاه عدس را نشان می دهد.

جدول ۳- تاثیر باکتری های مورد بررسی بر میزان رشد طولی ساقه عدس

Table 3- Effect of investigated bacteria on the longitudinal growth rate of lentil stem

	A group	B group	C group	Control group
Average stem length	102.7	142.9	147.9	95.1
standard deviation	2.84	2.72	1.71	2.43
t-test (compared to the control group)	7.93846	50.69956	68.8358	-
Error probability	P < 0.00001	P < 0.00001	P < 0.00001	-

سطح معنی داری (α= 0.05) گروه A: *باسیلوس سرئوس*، گروه B: *آرتروباکتر گلوبیفورمیس*، گروه C: هر دو

Significant level (α= 0.05) Group A: *Bacillus cereus*, Group B: *Arthrobacter globiformis*, Group C: both

جدول ۴- تاثیر باکتری های مورد بررسی بر میزان رشد طولی ریشه عدس

Table 4- Effect of investigated bacteria on the longitudinal growth rate of lentil root

	A group	B group	C group	Control group
Average root length	23.7	28.1	28.9	22.9
standard deviation	2.29	2.53	2.36	2.45
t-test (compared to the control group)	0.92503	5.79479	6.84257	-
Error probability	P = 0.181426	P < 0.00001	P < 0.00001	-

سطح معنی داری (α= 0.05) گروه A: *باسیلوس سرئوس*، گروه B: *آرتروباکتر گلوبیفورمیس*، گروه C: هر دو

Significant level (α= 0.05) Group A: *Bacillus cereus*, Group B: *Arthrobacter globiformis*, Group C: both

جدول ۵- نتایج آنالیز شیمیایی نمونه خاک مورد استفاده جهت کشت عدس

Table 5- Results of chemical analysis of soil sample used for lentil cultivation

Test (unit)	Result
pH	7.89
EC (ds/m)	1.22
% SP	56
N - NH_4^+ (ppm)	17
N - NO_3^- (ppm)	23
P (ppm)	17.5
CEC (meq/100g)	18.97

EC: جریان الکتریکی(شوری) خاک SP: درصد اشباع آب در خاک، CEC: ظرفیت تبادل کاتیونی خاک

EC: Electric conductivity of the soil, SP: percentage of water saturation in the soil, CEC: Cation exchange capacity of soil

به طور کلی ریزوسفر گیاهان در مقایسه با ناحیه فیلوسفر، از نظر تعداد و تنوع میکروارگانیسم جایگاه اکولوژیکی مناسب تری می باشد، زیرا محیط فیلوسفر دائما در معرض تنش های محیطی همچون دما، خشکی محیط، اشعه ماورای بنفش خورشید و وزش باد قرار دارد. اما ناحیه ریزوسفر تقریبا از اغلب این تنش ها مصون می باشد. ضمن اینکه باکتری های ریزوسفری از مزیت استفاده از ترشحات آلی ریشه گیاه نیز برخوردارند [14]، [15]. در تحقیق حاضر، مشخص شد که تعداد باکتری های بیشتر و متنوع تری می توان از ناحیه ریزوسفر گندم جداسازی نمود. همانطور که در **جدول ۱** نشان داده شده است، اغلب باکتری های جداسازی شده در این تحقیق به ویژه باکتری های ناحیه ریزوسفر گیاه، از نوع میله ای بودند. باکتری های میله ای از نسبت سطح به حجم بیشتری در مقایسه با باکتری های کروی برخوردارند لذا بهتر می توانند در محیط خاک، آب و املاح و دیگر نیازهای غذایی خود را جذب نمایند [3]. در این تحقیق همچنین مشخص گردید که اغلب جدایه ها (۷۱ درصد جدایه¬های فیلوسفری و ۶۳ درصد جدایه های ریزوسفری) گرم مثبت بودند. با توجه به اینکه باکتری های گرم مثبت دیواره سلولی ضخیم-تری داشته و قادرند فشارهای اسمزی بالاتر را که به واسطه خشکی محیط ایجاد می گردد تحمل نمایند، این مسئله قابل توجیه می باشد. با انجام رنگ آمیزی اسپور مشخص گردید که ۷ درصد باکتری های فیلوسفری و ۵۰ درصد باکتری های ریزوسفری اسپوردار بودند. توانایی تولید اسپور جهت مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی یکی از ویژگی هایی است که در جنس های باسیلوس (*Bacillus*) و کلاستریدیوم (*Clastridium*) که هر دو از باکتری های متداول در محیط خاک هستند مشاهده می شود [3].

در تحقیق حاضر مشخص گردید که نواحی فیلوسفر و ریزوسفر گیاه گندم می تواند دارای باکتری های تثبیت کننده نیتروژن که به صورت آزاد و غیرهمزیست عمل می کنند باشد. در این خصوص آنالیز آماری مربع کای انجام گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که اگرچه تعداد این جدایه ها در ناحیه ریزوسفر گیاه گندم بیشتر از ناحیه فیلوسفر آن می باشد، اما نمی توان اختلاف آماری معنی داری بین این دو ناحیه مشاهده کرد (P >۰/۰۵) در دیگر مطالعاتی هم که در خصوص تعداد جدایه های فیلوسفری و ریزوسفری گیاهان انجام گرفته، مشخص گردیده است که باکتری های تثبیت کننده نیتروژن به تعداد بیشتری در ناحیه ریزوسفر (در مقایسه با فیلوسفر) یافت می شوند [13]، [14]، [15]. در یک تحقیق، بر اساس ردیابی ژن کد کننده آنزیم دی نیتروژناز ردوکتاز در سویه

های جداسازی شده، توانایی تثبیت نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت. در آن تحقیق نتیجه گیری شد که تعداد قابل توجهی از باکتری های تثبیت کننده نیتروژن را می توان از فیلوسفر و به ویژه ریزوسفر گیاهان جداسازی نمود [12]، [14].

در بخش دیگری از تحقیق حاضر، به مطالعه باکتری های محلول ساز فسفات پرداخته شد و مشخص گردید که نواحی فیلوسفر و ریزوسفر گندم می تواند حاوی چنین باکتری هایی باشد. باکتری های محلول ساز فسفات گروهی از باکتری های مفید بوده که با هیدرولیز کردن ترکیبات آلی و معدنی نامحلول فسفات، آن را به فرم محلول و قابل جذب برای گیاهان تبدیل می کنند. این عمل به واسطه ترشح اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم صورت می گیرد و موجب می شود که گروه های هیدروکسیل و کربوکسیل این اسیدهای آلی، با جذب کاتیون های متصل به فسفات، موجب آزاد شدن یون فسفات به فرم محلول شوند [32]، [33]. برخی تحقیقات نشان داده اند که علاوه بر باکتریهای ریزوسفری، قارچهای مختلفی نیز از جمله گونه های *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*) میتوانند در انحلال فسفات موثر باشند [34]، [23]، [25]، [35].

در تحقیق حاضر، درخصوص نتایج محلول سازی فسفات، آنالیز آماری مربع کای انجام گرفت و نتایج نشان داد که نمی توان تفاوت معنی داری بین تعداد باکتری های فیلوسفری با باکتری های ریزوسفری از نظر میزان محلول سازی فسفات مشاهده کرد (P >۰/۰۵) در یک مطالعه که در خصوص باکتری های فیلوسفری و ریزوسفری گیاه نخود انجام گرفته بود مشخص گردید که اغلب جدایه های محلول ساز فسفات متعلق به ناحیه ریزوسفر گیاه و از جنس های *سودوموناس* (*Pseudomonas*) و *سراشیا* (*Serratia*) می باشند [26].

در این تحقیق، در خصوص توانایی تولید ایندول استیک اسید، بین جدایه های فیلوسفری با جدایه های ریزوسفری مقایسه ای صورت گرفت. اگرچه نتایج عددی، حاکی از وجود تعداد بیشتر باکتری های تولید کننده ایندول استیک اسید در ناحیه ریزوسفر گیاه گندم، در مقایسه با ناحیه فیلوسفر این گیاه بود اما آنالیز آماری مربع کای تفاوت معنی داری را بین این دو ناحیه نشان نداد (P >۰/۰۵) در یک مطالعه دیگر نیز که از روش سالکوفسکی جهت بررسی توانایی جدایه ها در تولید ایندول استیک اسید استفاده شده بود، باکتری های *ازتوباکتر* (*Azetobacter*) و *سودوموناس* (*Pseudomonas*) به عنوان مهمترین باکتری های ریزوسفری مولد ایندول استیک اسید معرفی شده بودند [17].

در تحقیق حاضر، از بین سایر جدایه ها، ۲ جدایه که از بیشترین توانایی در خصوص شاخص های مورد نظر برخوردار بودند جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. یک جدایه مشابه باسیلوس سرئوس و جدایه دیگر مشابه *آرتروباکتر گلوبیفورمیس* بود. *باسیلوس سرئوس* یک باکتری میله ای گرم مثبت، متحرک، اسپوردار، بی هوازی اختیاری بوده که به فراوانی در خاک یافت می شود. اگرچه برخی از نژادهای آن به واسطه تولید انتروتوکسین بیماریزا بوده و می توانند مسمومیت غذایی ایجاد کنند، دیگر نژادهای آن (همانطور که در این تحقیق مشخص گردید) می توانند از قابلیت های زیستی مناسبی برخوردار باشند [6]. در دیگر تحقیقات نیز توانایی برخی از باکتری های بیماریزای انسانی همچون *سالمونلا* (*Salmonella*) و یا بیماریزا در گیاهان همچون *اروینیا* (*Erwinia*) در تولید ایندول استیک اسید گزارش شده است [20]. جنس *آرتروباکتر* نیز یکی از باکتری های بسیار متداول در محیط خاک می باشد که گرم مثبت و هوازی اجباری است. در فاز رشد میله ای شکل بوده اما در فاز سکون به سلول های کروی شکل بسیار کوچکی تغییر وضعیت می دهد که این تغییر شکل ظاهری به واسطه تکثیر غیر معمول این باکتری انجام می پذیرد. سلول های کروی این باکتری مقاومت قابل توجهی در برابر خشکی محیط و فقر مواد غذایی دارند و می توانند در محیط خاک به خوبی شرایط دشوار را تحمل نمایند [3].

در تحقیق حاضر، عملکرد و تاثیر دو جدایه الف و ب به صورت مجزا و ترکیبی، بر میزان رشد طولی ساقه و ریشه گیاه عدس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که محلول آبیاری حاوی جدایه الف (*باسیلوس سرئوس*) که توانایی تثبیت نیتروژن و محلول سازی فسفات را داشت، به میزان ۸ درصد، و محلول آبیاری جدایه ب (*آرتروباکتر گلوبیفورمیس*) که توانایی تولید ایندول استیک اسید را داشت، به میزان ۵۰ درصد رشد طولی ساقه گیاه عدس را افزایش دادند. همچنین محلول آبیاری حاوی هر دو جدایه الف و ب نیز به میزان ۵۵/۵ درصد رشد طولی ساقه گیاه عدس را افزایش داد (**جدول ۳**). در خصوص رشد طولی ریشه گیاه عدس، نتایج نشان داد که حضور *آرتروباکتر گلوبیفورمیس* در مایع آبیاری گیاه می تواند موجب افزایش طول ریشه به میزان ۲۲/۷ درصد (در مقایسه با گروه شاهد) شود اما محلول آبیاری حاوی *باسیلوس سرئوس* تنها ۳/۵ درصد به رشد طولی ریشه گیاه عدس افزود که این مقدار از نظر آماری معنی دار نبود. همچنین محلول آبیاری حاوی هر دو باکتری نیز به میزان ۲۶/۲ درصد موجب رشد طولی ریشه گیاه عدس شد (**جدول ۴**). با توجه به این نتایج، به نظر می رسد که تولید ایندول استیک اسید (در مقایسه با تثبیت نیتروژن و محلول سازی فسفات) تاثیر بیشتری بر رشد طولی ساقه و ریشه گیاه عدس داشته است و گروه های آبیاری (ب) و (ج) که در

ترکیب آنها *آزتروباکتر گلوبیفورمیس* به کار رفته بود، میانگین افزایش طول بالاتری در مقایسه با گروه آبیاری (الف) نشان داده اند. با توجه به اینکه ایندول استیک اسید یک هورمون مهم گیاهی می باشد و نقش مستقیمی در رشد و توسعه سلول ها و بافت های گیاه دارد، این نتایج چندان دور از انتظار نمی باشد [19].

نتایج آنالیز شیمیایی نمونه خاک مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که تقریبا همه پارامترهای خاک در وضعیت مطلوبی قرار داشتند. به ویژه دو عنصر نیتروژن و فسفر که در این تحقیق مورد توجه بودند، در حد مناسبی در نمونه خاک مورد استفاده حضور داشتند. بطور کلی میزان نیتروژن بهینه خاک که به صورت یون های آمونیوم و نیترات می باشد بین ۲۰ تا ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک بوده و میزان فسفر مطلوب نیز بایستی بیش از ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم خاک باشد [3]، [6]. با توجه به اعداد **جدول ۵** مشخص می گردد که خاک مورد استفاده در این تحقیق از نظر محتوای نیتروژن و فسفر کمبودی نداشته است و احتمالا یکی از دلایلی که موجب شده باکتری تثبیت کننده نیتروژن و حلال ساز فسفات نقش کم رنگ تری (در مقایسه با باکتری تولید کننده ایندول استیک اسید) در افزایش طول ساقه و ریشه گیاه عدس داشته باشد، فراهم بودن عناصر نیتروژن و فسفر در حد مطلوب گیاه بوده است.

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که می توان از فیلوسفر و ریزوسفر گیاهان بومی، باکتری هایی با قابلیت تثبیت نیتروژن، حلال سازی فسفات و تولید ایندول استیک اسید جداسازی نمود. انجام تحقیقات بیشتر در خصوص استفاده از چنین سویه هایی به عنوان مکمل و یا جایگزین کودهای شیمیایی می تواند نقش موثری را در جهت افزایش و بهبود وضعیت محصولات زراعی ایفا نموده و کشاورزی را به سمت تولید محصولات ارگانیک سوق دهد.

اعلام تعارض منافع

نگارندگان در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد و نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

سپاسگزاری

از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون که زمینه استفاده از امکانات آزمایشگاه میکروبیولوژی را فراهم کردند، صمیمانه سپاسگزاری می کنیم.

منابع

[1] Nadarajan, S., Sukumaran, S. (2021). Chemistry and toxicology behind chemical fertilizers. *Academic press 12*, 195-229.

[2] Hernida, L. & Agustian, J. (2019). Slow release urea fertilizer synthesized through recristallization of urea incorporating natural bentonite using various binders. *Envinmental technology & innovation 13*, 113-121.

[3] Atlas R. M. and Bartha R. (1998). Microbial ecology: Fundamentals and Applications (4th edn). BCPC, USA. pp: 99-132.

[4] Khan, N., Bano, A. M. D. & Babar, A. (2020). Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. *Public Library of Science 15*, e0231426.

[5] Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant and Soil, 225*, 571-586.

[6] Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Bender, K. S. (2015). Brock biology of microorganisms. (14th edn). PE. USA. pp: 912-920.

[7] Saharan, B. S. and& Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research, 21*, 1-30.

[8] Zafar, Y., Ashraf, M. & Malik, K. A. (1986). Nitrogen fixation associated with the roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* L.) Kunth). *Plant and Soil, 90*, 93–106.

[9] Alori, E. T., Glick, B. R. & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology, 8*, 971-978.

[10] Orr, C. H., James, A., Leifert, C., Cooper, J. M. & Cumming, S. P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology, 77*, 211-220.

[11] Din, I., Khan, H., Ahmad Khan, N. & Khil A. (2021) Inoculation of nitrogen fixing bacteria in conjugation with integrated nitrogen sources induced changes in phenology, growth, nitrogen assimilation and productivity of wheat crop. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 20,* 459–466.

[12] Ren, N., Wang, Y., Ye, Y., Zhao, Y., Huang, Y., Fu, W. & Chu X. (2020) Effects of Continuous Nitrogen Fertilizer Application on the Diversity and Composition of Rhizosphere Soil Bacteria. *Front Microbiol, 11,* 1948.

[13] Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, M. A. & Islam M. Z. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology, 8,* 1247-1252.

[14] Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R. & et al. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *International Society for Microbial Ecology, 6,* 1378–1390.

[15] Mwajita, M. R., Murage, H., Tani, A. & Kahangi, E. M. (2013). Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. *Springerplus, 2,* 606-613.

[16] Sarwar, M. & Kremer, R. J. (1995). Enhanced suppression of plant growth through production of L- tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil, 172,* 261-269.

[17] Ahmad, F., Ahmad, I. & Sahir Khan, M. (2005). Indole acetic acid production by indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology, 29,* 29-34.

[18] Keswani, C., Satyendra, S., Singh, P., Cueto, L., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S. & et al. (2020). Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology, 104,* 8549–8565.

[19] Park, S., Kim, A. L. & Hong, Y. K. (2021). A highly efficient auxin-producing bacterial strain and its effect on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 19,* 128-134.

[20] Cox, C. E., Brandl, M. T., de Moraes, M. H., Gunasekeraet, S. & Teplitski, M. (2018). Production of the plant hormone auxin by *Salmonella* and its role in the interactions with plants and animals. *Frontiers in Microbiology, 8,* 2668-2672.

[21] Mohite B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 13,* 638–649.

[22] Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. & Babalola, O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33* (11), 197.

[23] Eramma Sahana & Rajashree (2021). Phosphate solublizing Bacteria as a Biofertilizer. *Biological Forum, 13* (4), 76-79.

[24] Khan, M. S., Zaidi, A. & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture- a review. *Agronomy for Sustainable Development, 27* (1), 29–43.

[25] Kumar, A., Kumar, A. & Patel, H. (2018). Role of microbes in phosphorous availability and acquisition by plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 7* (5), 1344-1347.

[26] Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J. & Chob, H. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry, 37,* 1970-1974.

[27] Richardson, A. E. & Simpson, R. J. (2021). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology, 156,* 989-996.

[28] Rodriguez, H. & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology, 17,* 319-339.

[29] Nautiyal, C. S., Bhadauria, S. & Kumar, P. (2000). Stress Induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters, 182,* 291-296.

[30] Sundra, B., Natarajam, V. & Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research, 77,* 43-49.

[31] Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M. & Kudo, T. (2003). Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiology Letters, 221* (2), 299–304.

[32] Alikhani, H. A., Saleh-Rastin, N. & Antoun, H. (2006). Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant Soil, 287,* 35-41.

[33] Selvi, K. B. J., Paul, J. A., Vijaya, V. & Saraswathi, K. (2017). Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochemistry and Molecular Biology Journal, 3,* 1.

[34] Elias, F., Woyessa, D. & Muleta, D. (2016). Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology, 7,* 211-222.

[35] Vyas, P. & Gulati, A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonas. *BMC Microbiology, 22,* 9 -174.