

## Evaluation of the Ability of Rhizosphere Isolates to Solubilize low-Soluble Zn under in-vitro Conditions and their Ability to Supply Zn to Maize

Bahman Khoshru<sup>1\*</sup>, Mohammad Reza Sarikhani<sup>2</sup>, Adel Reyhanitabar<sup>2</sup>, Shahin Oustan<sup>3</sup>,  
Mohammad Ali Malboobi<sup>4</sup>

Received: 27 November 2021 Accepted: 13 February 2022

1- PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

2- Assoc. Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

3- Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

4- National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Department of Plant Biotechnology, Tehran, Iran.

\*Corresponding Author: bahmankhoshru@yahoo.com

### Abstract

**Background & Objective:** In this study, isolation and identification of potent zinc solubilizing bacteria was performed to further evaluate the effect of selected isolates on supply to maize plant (single cross cultivar 704).

**Materials & Methods:** Isolation of bacteria from rhizospheres of maize, wheat and sunflower was done in different cities of East Azerbaijan province using serial dilution method. Isolates were screened based on their ability to form a transparent halo in a solid medium containing low-soluble sources of zinc, acid and siderophore production. Evaluation of plant growth-promoting properties was performed for selected zinc-solubilizing isolates. The experiments were performed in two phase's in-vitro and greenhouse conditions in a completely randomized statistical design with three replications.

**Results:** A total of 20 bacterial isolates were obtained from the rhizosphere of the studied plants. In qualitative evaluation, the results showed that the isolates of ZP13 in zinc phosphate source, ZO11 in zinc oxide source and ZC10 in zinc carbonate source had the highest solubility with HD/CD ratio of 1.74, 1.68 and 1.61, respectively. In quantitative evaluation of zinc solubility, ZP13 isolate in zinc phosphate (24.64 mg / l), ZC10 isolate in zinc carbonate (19.48 mg / l) and ZO11 isolate in zinc oxide (26.54 mg / l) had the highest solubility. The superior zinc isolates in the greenhouse were ZO11 and ZO14. The two isolates ZO11 and ZO14 in comparison with the negative control treatment led to an increase in zinc uptake of 179.7 and 62.37% in the root and 155.1 and 110.6% in the shoot part of maize, respectively. Identification of isolates ZO11 and ZO14 showed that they belong to *Acinetobacter calcoaceticus* and *Agromyces italicus*, respectively.

**Conclusion:** According to the results of this experiment, the potential of selected isolates (ZO11 and ZO14) can be used to supply the zinc element required by plants in the form of biofertilizer and as a healthy and eco-friendly solution.

**Keywords:** Zinc Solubilizing Bacteria, Siderophore, Organic Acids, pH Reduction

## ارزیابی توان جدایه‌های ریزوسفری در انحلال Zn کم‌محلول در شرایط درون‌شیشه‌ای و بررسی توانایی آنها در تأمین Zn گیاه ذرت

بهمن خوشرو<sup>۱\*</sup>، محمدرضا ساریخانی<sup>۲</sup>، عادل ریحانی‌تبار<sup>۲</sup>، شاهین اوستان<sup>۳</sup>، محمدعلی ملبوبی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۴

۱- دانشجوی دکتری علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استاد علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۴- استاد بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

\*مسئول مکاتبه: Email: bahmankhoshru@yahoo.com

### چکیده

**اهداف :** در این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های توانمند حل‌کننده روی انجام گرفت تا در ادامه تاثیر جدایه‌های منتخب بر تأمین روی گیاه ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ ارزیابی شود.

**مواد و روش‌ها:** جداسازی باکتری‌ها از ریزوسفر گیاهان ذرت، گندم و آفتابگردان در شهرهای مختلف استان آذربایجان شرقی و با بهره‌گیری از روش سری‌های رقت انجام شد. جدایه‌ها بر اساس توان تشکیل هاله شفاف در محیط جامد حاوی منابع کم‌محلول روی، تولید اسید و سیدروفور غربالگری شده و در ادامه جدایه‌های منتخب برای تعیین دقیق‌تر توان حل‌کنندگی روی مورد آزمون کیفی و کمی (در محیط مایع) قرار گرفتند. ارزیابی ویژگی‌های افزایشی رشد گیاه برای جدایه‌ها منتخب حل‌کننده روی انجام گرفت. آزمایش در دو فاز درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

**یافته‌ها :** در مجموع ۲۰ جدایه باکتریایی از ریزوسفر گیاهان مورد بررسی بدست آمد. در ارزیابی کیفی، نتایج نشان داد که جدایه ZP13 در منبع فسفات روی، ZO11 در منبع اکسید روی و ZC10 در منبع کربنات روی با نسبت HD/CD به ترتیب ۱/۷۴، ۱/۶۸ و ۱/۶۱ دارای بیشترین توان انحلال بودند. در ارزیابی کمی انحلال روی نیز در فسفات روی جدایه ZP13 با مقدار ۲۴/۶۴ میلی‌گرم بر لیتر، جدایه ZC10 در کربنات روی با ۱۹/۴۸ میلی‌گرم بر لیتر و جدایه ZO11 در اکسید روی با مقدار ۲۶/۵۴ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین توان انحلال را داشتند. جدایه‌های برتر آزمایش در بخش گلخانه‌ای، ZO11 و ZO14 بودند. این دو جدایه ZO11 و ZO14 در مقایسه با تیمار شاهد منفی منجر به افزایش جذب روی به ترتیب ۱۷۹/۷ و ۶۲/۳۷ درصد در ریشه و ۱۵۵/۱ و ۱۱۰/۶ درصد در شاخصاره گیاه ذرت شدند. شناسایی جدایه‌های ZO11 و ZO14 نشان داد که متعلق به *Acinetobacter calcoaceticus* و *Agromyces italicus* هستند.

**نتیجه‌گیری :** طبق نتایج این آزمایش، می‌توان از پتانسیل ایزوله‌های منتخب (ZO11 و ZO14) برای تأمین عنصر روی مورد نیاز گیاهان در قالب کود زیستی و بعنوان یک راهکار سالم و دوستدار محیط زیست بهره برد.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری‌های حل‌کننده روی، سیدروفور، اسیده‌های آلی، کاهش pH

## مقدمه

روی (Zn) یکی از عناصر کم مصرف در فرآیند رشد و نمو در گیاهان می‌باشد. این عنصر در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی، فرآیندهای متابولیکی و همچنین واکنش‌های اکسایش-کاهش نقش اساسی ایفا می‌کند (کاستیلو و همکاران ۲۰۱۸، هوبنر و هاس ۲۰۲۱). علاوه بر این، روی در ساختار بسیاری از آنزیم‌های دخیل در فرآیندهای متابولیسم نیتروژن، انتقال انرژی و سنتز پروتئین نقش اساسی دارد (کاستیلو و همکاران ۲۰۱۸). روی در خاک‌های آهکی بیشتر به شکل ترکیبات بسیار کم‌محلول هیدروکسید و یا کربنات روی وجود دارد که بخش عمده آنها به شکل غیرقابل استفاده برای گیاهان می‌باشند (اودو ۱۹۷۰، رنگل و همکاران ۲۰۱۵). بیش از ۵۶ درصد خاک‌های زراعی ایران، غلظت روی قابل عصاره‌گیری با DTPA، کمتر از ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم داشته و تنها ۳۱ درصد از خاک‌ها بیشتر از ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی قابل جذب دارند. سطح بحرانی روی در خاک‌های ایران بین ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد (شهبازی و بشارتی ۲۰۱۳).

شکل‌های مختلف روی در خاک به صورت تبدیلی و محلول، پیوند شده با کربنات‌ها، متصل به اکسیدهای آهن و منگنز، پیوند شده با مواد آلی و باقیمانده تقسیم بندی می‌شوند. شکل‌های تبدیلی و محلول برای گیاه قابل جذب می‌باشند، در حالی‌که شکل متصل به اکسیدها و کانی‌های اولیه و ثانویه تقریباً غیرقابل جذب برای گیاه هستند (ژانگ و همکاران ۲۰۱۵). پژوهشگران گزارش کرده‌اند که روی پیوند شده با مواد آلی قابلیت استفاده زیادی برای گیاه ندارد، زیرا اجزای مواد آلی با وزن مولکولی زیاد مقدار کمی از عناصر پیوند شده را آزاد می‌کنند (کالا-ریورو و همکاران ۱۹۹۹).

براساس مطالعات، حدود ۹۰ درصد روی کل خاک (به ویژه در خاک‌های آهکی) در بخش باقیمانده قرار داشته و به دلیل واکنش با اجزای خاک تثبیت شده و به شکل غیرقابل استفاده برای گیاه تبدیل می‌شود

(حمیدپور و همکاران ۲۰۱۲، ریحانی‌تبار و همکاران ۲۰۰۷). کالا-ریورو و همکاران (۱۹۹۹) نیز گزارش کردند که در خاک‌های آهکی، روی بیشتر به شکل باقیمانده بود و پس از آن به ترتیب شکل‌های کربناتی و اکسیدهای آهن و منگنز وجود دارند.

علاوه بر برهمکنش‌های عناصر با اجزای آلی و غیرآلی خاک، برهمکنش‌های بیولوژیک و ارتباط بین فعالیت‌های ریزجانداران با سیستم خاک-گیاه بر فراهمی عناصر در خاک مؤثر است. گزارش‌هایی مبنی بر افزایش قابلیت دسترسی روی کم‌محلول بواسطه باکتری‌های ریزوسفری وجود دارد (باپیری و همکاران ۲۰۱۲، گونتیا-میشرا و همکاران ۲۰۱۷، ایدایو و همکاران ۲۰۱۷، خوشرو و همکاران ۲۰۲۰b). این باکتری‌ها توانایی افزایش رشد و عملکرد گیاه را با افزایش عرضه عناصر غذایی معدنی کم تحرک در خاک مانند روی را دارند که باکتری‌های حل‌کننده روی یا ZSB<sup>۱</sup> نامیده می‌شوند (گرگوری و همکاران ۲۰۱۷). سازوکار محلول‌سازی روی از طریق دفع متابولیت‌هایی مانند اسیدهای آلی، ترشح پروتون یا تولید عوامل کی‌لیت‌کننده انجام می‌گیرد (گوتتی و همکاران ۲۰۱۳، وید و همکاران ۲۰۱۴).

در مطالعه‌ای اقدام به جداسازی و شناسایی ZSB از ریزوسفر برنج و ارزیابی آنها برای رشد نهال برنج گردید. مشاهده شد که ZSB به صورت مطلوبی هر دو ترکیب کم محلول Zn (اکسید و کربنات روی) را حل می‌کند، اگر چه انحلال اکسید روی بیشتر از کربنات روی بود. جدایه ZSB3 با مقدار ۶۲/۴۸ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین محلول سازی Zn را در محیط کشت ثبت کرد. همبستگی مثبت بین محلول سازی Zn و کاهش pH محیط کشت برای اکثر جدایه‌ها بدست آمد. ZSBها همچنین دارای ویژگی‌های محرک رشدی (PGP<sup>۲</sup>) از قبیل استفاده از ACC، تولید اگزوپلی ساکارید (EPS<sup>۳</sup>)، محلول سازی فسفات و پتاسیم بودند. شناسایی جدایه‌های ZSB با استفاده از ژن 16S rRNA نشان داد که آنها متعلق به *Pseudomonas*، *Ralstonia picketti*

<sup>3</sup> Exopolysaccharide

<sup>1</sup> Zinc-solubilizing bacteria

<sup>2</sup> Plant Growth-Promoting

### آزمایشات درون شیشه‌ای جداسازی باکتری‌ها

نمونه برداری از خاک‌های ریزوسفری گیاهان ذرت، گندم و آفتابگردان در شهرهای مختلف آذربایجان شرقی انجام شد. مزارع نمونه‌برداری مذکور فاقد تناوب زراعی بوده و دارای سیستم زراعی مدرن (کشت با تراکتور مجهز به ردیف‌کار) و سیستم کوددهی NPK شیمیایی به همراه کود دامی بودند. غربالگری اولیه جدایه‌های باکتریایی با استفاده از محیط‌های Nutrient agar (NA) (شوین و نیلندز ۱۹۸۷) CAS<sup>۱</sup> broth M9 (باروچا و همکاران ۲۰۱۳) و TMS<sup>۲</sup> (سارواوانان و همکاران ۲۰۰۷) انجام شد. NA برای ارزیابی عمومی (غیر اختصاصی) باکتری‌های ساکن ریزوسفر گیاهان مورد استفاده قرار گرفت، CAS و M9 نیز به ترتیب برای غربالگری اولیه باکتری‌های تولید کننده سیدروفور و اسید استفاده گردید و در نهایت TMS حاوی ۰/۱ درصد از منابع مختلف روی کم‌محلول (فسفات روی، اکسید روی و کربنات روی) برای غربالگری اولیه جدایه‌های حل‌کننده روی کم‌محلول به طور جداگانه در محیط TMS استفاده شد. برای کشت جدایه‌های خاک‌های ریزوسفری از روش سری رقت‌ها استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های نهایی (۱۰<sup>-۹</sup>، ۱۰<sup>-۸</sup>، ۱۰<sup>-۷</sup> و ۱۰<sup>-۶</sup>) در ۳ تکرار روی محیط کشت جامد NA و TMS استفاده شد (دینش و همکاران ۲۰۱۵).

### آزمون نیمه‌کمی و کمی توان حل‌کنندگی جدایه‌ها برای Zn نا محلول

برای بررسی نیمه‌کمی توان حل‌کنندگی Zn جدایه‌ها از محیط پایه تریس جامد (دارای آگار ۱/۵ درصد) دارای ۰/۱ درصد روی کم‌محلول استفاده گردید که در این محیط از سه نوع منبع Zn کم‌محلول اکسید روی، کربنات روی و فسفات روی بطور جداگانه استفاده شد. جدایه‌ها در پلیت‌ها کشت شده و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بمدت ۷ روز انکوبه شده و بعد از این مدت

*Klebsiella aeruginosa* و *Burkholderia cepacia* بهترین حل‌کننده Zn مربوط به جنس *Ralstonia* بود. نتایج مزرعه‌ای نیز نشان داد که استفاده از ZSB به افزایش و رشد نشاهای برنج کمک می‌کند. علاوه بر این ZSB می‌تواند به فراهمی زیستی روی در برنج و غلات دیگر کمک کند (گونتی-میشرا و همکاران ۲۰۱۷).

باکتری‌های *Azotobacter chroococcum* و *Bacillus edaphicus* توانایی افزایش فراهمی روی در محیط خاک را نشان داده‌اند (وو و همکاران ۲۰۰۶). افزایش غلظت روی در گیاهان مختلف تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد گیاه توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (دینش و همکاران ۲۰۱۸، باپیری و همکاران ۲۰۱۲).

در راستای نیل به کشاورزی پایدار که هدف آن استفاده از راهکارهای سازگار با محیط زیست است می‌توان از پتانسیل‌های ریزجانداران و متابولیت‌های آنها برای تأمین روی مورد نیاز برای رشد گیاهان استفاده نمود که امروزه استفاده از پتانسیل‌های زیستی به‌عنوان عوامل دوستدار محیط زیست و جایگزینی آن‌ها به جای ترکیبات شیمیایی موردتوجه ویژه است (فس و بندیتو ۲۰۱۸). مشکل تأمین روی مورد نیاز گیاهان در خاک‌های آهکی با pH بالا به دلیل پایین بودن حلالیت ترکیبات حاوی روی می‌باشد که فرآهمی این عنصر را برای گیاهان با چالش جدی مواجه ساخته است. استفاده از باکتری‌های حل‌کننده روی یکی از راه‌های مواجهه با این مشکل می‌باشد. لذا هدف این پژوهش جداسازی باکتری‌های توانمند حل‌کننده روی و بررسی جدایه‌های برتر آزمایش در تأمین روی برای گیاه ذرت می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### زمان و محل اجرای آزمایش

این تحقیق در سال ۱۳۹۹ و در دو مرحله درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای در ساختمان شماره دو دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در منطقه کرکج انجام شد.

<sup>2</sup> Tris Minimal Salt

<sup>1</sup> Chrome Azurol S

آن، از بستر پایه باگاس - پرلیت (با نسبت ۱:۱) ضد عفونی شده استفاده شد. میزان تلقیح برابر ۲۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری (با جمعیت CFU/ml  $10^8$ ) بر ۵۰ گرم بستر میکروبی بود (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۸).

### آزمایش گلخانه‌ای

از یک خاک آهکی ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان و از عمق ۲۰-۳۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری شد و سپس برخی ویژگی‌های خاک مورد نظر تعیین شد. برای این منظور بعد از هواخشک کردن خاک مورد نظر و عبور از الک دو میلی‌متری، بافت خاک (کلوت ۱۹۸۶)، درصد کربن آلی (نلسون و سامرز ۱۹۸۲)، فسفر قابل جذب (اولسن و سامرز، ۱۹۸۲)، پتاسیم قابل جذب (توماس ۱۹۸۲) و آهن و روی قابل جذب آن اندازه‌گیری شد (لیندزی و نورول ۱۹۸۷). آزمایش گلخانه‌ای با شرایط دمایی ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت هوای ۶۰ درصد و نور روز ۱۴ ساعت انجام شد.

### آماده‌سازی خاک و اعمال تیمارها

برای هر گلدان ۲/۵ کیلوگرم خاک غیر استریل استفاده گردید. پنج بذر ذرت ضد عفونی شده (Single Cross 704) در هر گلدان کاشته شد. برای ضد عفونی بذر از هیپوکلریت سدیم (۵/۰ درصد) استفاده شد. پس از جوانه زنی و رشد اولیه، تعداد گیاهان در هر گلدان به دو عدد کاهش یافت. آزمایش شامل تیمارهای کود میکروبی، تیمارهای کنترل مثبت و منفی بود. تیمارهای کودهای میکروبی شامل جدایی‌های منتخب حل‌کننده روی بود (بدست آمده در شرایط درون‌شیشه‌ای). مقدار مصرف کود میکروبی، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در گلدان بود (شامل حامل باگاس و پرلیت + ۱۰۰ میلی‌گرم در گلدان از منابع کم‌محلول روی بطور جداگانه بود). در کودهای میکروبی از هیچ منبع محلول روی (کود شیمیایی) استفاده نشد. تیمار کنترل مثبت شامل کود شیمیایی روی از منبع سولفات روی بود (حاوی ۱ میلی‌گرم روی

قطر هاله به کلنی برای جدایی‌ها تعیین گردید (ساراوانان و همکاران ۲۰۰۷a). برای بررسی کمی توان حل‌کنندگی روی در جدایی‌ها و تاثیر آنها روی pH، کشت جدایی‌ها در محیط مایع (فاقد آگار) حاوی منابع مختلف روی کم‌محلول ۰/۱ درصد (به طور جداگانه) انجام شد. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع در ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته و اتوکلاو شد سپس اقدام به تلقیح باکتری‌ها به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نموده و در نهایت در شیکر-انکوباتور گرماگذاری گردیدند (دمای ۲۸ درجه سلسیوس بمدت ۷ روز). بعد از اتمام زمان تعیین شده، نمونه‌ها از انکوباتور بیرون آمده و پس از سانتریفوژ (۶۰۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه) اقدام به اندازه‌گیری pH و غلظت Zn در محلول صاف رویی توسط دستگاه جذب اتمی شد (ساراوانان و همکاران ۲۰۰۷a).

### ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی جدایی‌های برتر

ارزیابی نیمه‌کمی و کمی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول در محیط اسپریر جامد و مایع (اسپریر ۱۹۵۸)، آزمون کمی میزان رهاسازی پتاسیم از کانی‌های میکا در محیط الکساندروف مایع حاوی کانی میکای سفید (موسکویت) و میکای سیاه (بیوتیت) (هو و همکاران ۲۰۰۶)، تولید اکسین جدایی‌ها در حضور و عدم حضور ال-تریپتوفان (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط معدنی حداقل  $DF^1$  (بریک و همکاران ۱۹۹۱)، تولید سیدروفور در محیط سوکسینات با در حضور معرف CAS (ساین و نیلندز) و تولید اسید در محیط مایع M9 (سمبروک و راسل ۲۰۰۱) برای تمام جدایی‌ها انجام گرفت.

### تهیه مایه تلقیح میکروبی

در این پژوهش باکتری‌های توانمند از نظر انحلال روی در قالب مایه تلقیح میکروبی مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفتند. برای استفاده از جدایی‌ها، باکتری‌ها در محیط NB کشت شده و بمدت ۴۸ ساعت در ۲۸ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. پس از

<sup>1</sup> Dworkin and Foster minimal broth

بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی استفاده گردید (بوراتین ۲۰۱۳؛ ساریخانی و همکاران ۲۰۱۹).

### طرح آزمایشی و تحلیل آماری

آزمایش درون‌شیشه‌ای و گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی (ارزیابی اکسین و پتاسیم درون‌شیشه‌ای بصورت فاکتوریل) و به ترتیب با اعمال ۳ تکرار و با در نظر گرفتن ۶ تیمار باکتریایی منتخب به همراه تیمارهای شاهد منفی و مثبت انجام شد. داده‌ها از طریق نرم افزار آماری SPSS آنالیز شده و نمودارها نیز از طریق نرم افزار Excel ترسیم شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

نتایج جداسازی باکتری‌های بدست آمده از خاک‌های ریزوسفری ذرت، گندم و آفتابگردان در شهرهای مختلف آذربایجان شرقی در جدول ۱ آورده شده است. غربالگری اولیه بر اساس پارامترهای تولید اسید و تولید سیدروفور، توان تشکیل هاله شفاف در محیط TMS (حاوی ۰/۱ درصد منابع کم‌محلول روی بصورت جداگانه) بود. در مجموع ۲۰ جدایه متفاوت از ۱۰ شهر بدست آمد که در ادامه آزمایشات تکمیلی روی آنها انجام گرفت.

بر کیلوگرم خاک). تیمار کنترل مثبت فاقد باکتری بود. تیمار کنترل منفی که فاقد کود میکروبی و کود شیمیایی روی بود. نیتروژن از منبع اوره (۳۰۰ میلی گرم اوره بر کیلوگرم خاک)، پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم (۱۵۵ میلی گرم سولفات پتاسیم بر کیلوگرم خاک)، فسفر از منبع سوپرفسفات تریپل (۱۵۵ میلی گرم سوپرفسفات تریپل بر کیلوگرم خاک) و آهن از منبع Fe-EDDHA (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) به همه گلدانها بر اساس توصیه کودی اضافه شد (ملکوتی ۲۰۰۱). آبیاری گلدان‌ها برمبنای توزین و در محدوده ۰/۷-۰/۸ FC تنظیم شده و بمدت ۱۰۷ روز تا شروع گلدهی انجام شد.

### صفات اندازه‌گیری شده

در پایان دوره رشد، پارامترهای رشد گیاه مانند ارتفاع و قطر ساقه، شاخص کلروفیل (با دستگاه SPAD)، وزن تر و خشک شاخساره و ریشه و غلظت و جذب روی گیاهان اندازه‌گیری شد. برای عصاره گیاهی از روش هضم خشک استفاده شد (والینگ و همکاران ۱۹۸۹). از طیف سنجی جذب اتمی (-Shimadzu AA-6200، ژاپن) برای تعیین غلظت روی گیاه استفاده شد (لیندزی و نورول ۱۹۸۷).

### شناسایی جدایه‌های برتر

برای شناسایی جدایه‌های برتر آزمایش از ویژگی‌های ریخت شناسی، واکنش گرم، خصوصیات



شکل ۱- غربالگری اولیه جدایه‌ها در محیط TMS حاوی منابع کم‌محلول روی.

جدول ۱- جدایه‌های باکتریایی حاصل از خاک‌های ریزوسفری شهرهای مختلف استان آذربایجان شرقی.

ردیف	جدایه	گیاه میزبان	شهر	مختصات مکان نمونه برداری	تولید اسید	تولید سیدروفور	Zn-O	Zn-PO4	Zn-CO3
1	ZC5	ذرت	مراغه	N46.22665214; E37.39414134	+	-	-	-	+
2	ZC10	ذرت	اهر	N47.03313732; E38.86335879	+	-	-	+	+
3	ZO6	آفتابگردان	مراغه	N46.22665214; E37.39414134	-	+	+	-	-
4	ZO9	ذرت	ورزقان	N46.64552254; E38.50652428	-	-	+	-	-
5	ZO10	ذرت	اهر	N47.03313732; E38.86335879	-	+	+	+	-
6	ZO11	آفتابگردان	اهر	N47.06489468; E38.46970732	+	+	+	+	+
7	ZO13-1	ذرت	هریس	N47.12103796; E38.25455456	+	-	+	-	-
8	ZO13-2	ذرت	هریس	N47.12103796; E38.25455456	-	+	+	-	-
9	ZO13-3	ذرت	هریس	N47.12103796; E38.25455456	-	-	+	-	-
10	ZO13-4	ذرت	هریس	N47.12103796; E38.25455456	-	+	+	-	-
11	ZO14	ذرت	سراب	N47.55103970; E37.94337397	+	+	+	+	+
12	ZP3	ذرت	عجب شیر	N45.89475200; E37.47692043	+	-	-	+	-
13	ZP5	ذرت	مراغه	N46.22665214; E37.39414134	-	-	+	-	-
14	ZP6	آفتابگردان	مراغه	N46.22665214; E37.39414134	+	-	-	+	-
15	ZP7	گندم	مراغه	N46.22665214; E37.39414134	-	+	-	+	-
16	ZP9	ذرت	ورزقان	N46.64552254; E38.50652428	-	+	-	+	-
17	ZP10	ذرت	اهر	N47.03313732; E38.86335879	+	-	-	+	-
18	ZP13	ذرت	هریس	N47.12103796; E38.25455456	+	+	+	+	+
19	ZP14	ذرت	سراب	N47.55103970; E37.94337397	+	-	-	+	-
20	ZP15	ذرت	بوستان آباد	N46.84087658; E37.85058333	+	+	+	+	+

نکته: علامت مثبت در تولید اسید و سیدروفور نشان‌دهنده تغییر رنگ محیط و علامت مثبت در انحلال منابع کم‌محلول روی نشان‌دهنده تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی بود.

ZC10 و ZO10، ZO11، ZP13، ZP15 از بین ۲۰ جدایه دارای توانایی خوبی در پارامترهای غربالگری شده بودند (دارای بیشترین تعداد علامت + بودند). در ادامه آزمایشات تکمیلی برای ارزیابی دقیق‌تر همه جدایه‌ها انجام گرفت.

طبق نتایج جدول ۱، از ۲۰ جدایه بدست آمده، ۶۰ درصد توان تولید اسید، ۵۵ درصد توان تولید سیدروفور را نشان دادند. همچنین توان تشکیل هاله در TMS حاوی اکسید روی؛ ۵۵ درصد، در فسفات روی؛ ۵۰ درصد و در کربنات روی؛ ۳۰ درصد بود. در غربالگری اولیه مشخص گردید که ۶ جدایه ZO14،

## ارزیابی نیمه کمی ارزیابی انحلال روی

نتایج نشان داد که جدایه ZP13 در منبع فسفات

روی، ZO11 در منبع اکسید روی و ZC10 در منبع

کربنات روی با نسبت HD/CD به ترتیب ۱/۷۴، ۱/۶۸ و

۱/۶۱ دارای بیشترین توان انحلال بودند (جدول ۲).

جدول ۱: ارزیابی نیمه کمی انحلال روی (HD/CD) در حضور منابع مختلف روی کم محلول در روزهای ۳، ۵، ۸ و ۱۲ پس از کشت نقطه ای اولیه.

فسفات روی				کربنات روی				اکسید روی				جدایه
D12	D8	D5	D3	D12	D8	D5	D3	D12	D8	D5	D3	
۱/۲۱	۱/۲۲	۱/۱۸	۱/۱۰	۱/۳۵	۱/۱۷	۱/۱۴	۱/۱۱	۱/۲۲	۱/۱۸	۱/۱۵	۱/۱۲	ZC5
۱/۲۹	۱/۲۶	۱/۱۷	۱/۱۰	۱/۶۱	۱/۵۴	۱/۳۴	۱/۱۹	۱/۱۹	۱/۱۶	۱/۱۳	۱/۱۱	ZC10
۱/۱۸	۱/۱۶	۱/۱۵	۱/۱۳	۱/۲۲	۱/۱۷	۱/۱۳	۱/۱۱	۱/۲۵	۱/۱۹	۱/۱۶	۱/۱۳	ZO6
۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۱۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۲۴	۱/۱۹	۱/۱۵	۱/۱۱	ZO9
۱/۳۰	۱/۱۹	۱/۱۴	۱/۰۰	۱/۱۹	۱/۱۶	۱/۱۳	۱/۱۰	۱/۵۶	۱/۴۲	۱/۲۸	۱/۱۸	ZO10
۱/۳۷	۱/۳۱	۱/۲۳	۱/۱۹	۱/۳۲	۱/۲۵	۱/۱۹	۱/۱۶	۱/۶۸	۱/۴۹	۱/۳۷	۱/۲۱	ZO11
۱/۱۶	۱/۱۵	۱/۱۴	۱/۱۲	۱/۱۵	۱/۱۳	۱/۰۹	۱/۰۶	۱/۲۴	۱/۱۹	۱/۱۵	۱/۱۲	ZO13-1
۱/۱۳	۱/۱۳	۱/۱۲	۱/۱۱	۱/۱۲	۱/۱۲	۱/۱۱	۱/۱۱	۱/۱۸	۱/۱۷	۱/۱۴	۱/۱۳	ZO13-2
۱/۱۶	۱/۱۴	۱/۱۲	۱/۱۱	۱/۱۵	۱/۱۴	۱/۱۳	۱/۱۲	۱/۲۱	۱/۱۷	۱/۱۴	۱/۱۲	ZO13-3
۱/۱۴	۱/۱۴	۱/۱۳	۱/۱۱	۱/۱۷	۱/۱۷	۱/۱۵	۱/۱۳	۱/۲۱	۱/۹۰	۱/۶۰	1.13	ZO13-4
۱/۴۵	۱/۳۴	۱/۲۶	۱/۱۷	۱/۴۳	۱/۳۶	۱/۲۷	۱/۱۹	۱/۵۱	۱/۳۹	۱/۲۶	۱/۱۸	ZO14
۱/۲۵	۱/۱۹	۱/۱۳	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	ZP3
۱/۴۲	۱/۳۴	۱/۲۲	۱/۱۳	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	ZP5
۱/۲۰	۱/۱۸	۱/۱۵	۱/۱۲	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	ZP6
۱/۱۴	۱/۱۳	۱/۱۱	۱/۰۰	۱/۱۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۱۲	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	ZP7
۱/۳۲	۱/۲۴	۱/۱۷	۱/۱۳	۱/۱۲	۱/۱۰	۱/۱۰	۱/۰۰	۱/۱۵	۱/۱۵	۱/۱۴	۱/۱۳	ZP9
۱/۱۵	۱/۱۴	۱/۱۲	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	ZP10
۱/۷۴	۱/۵۹	۱/۳۸	۱/۱۹	۱/۳۱	۱/۲۴	۱/۱۹	۱/۱۵	۱/۳۳	۱/۲۶	۱/۲۱	۱/۱۴	ZP13
۱/۳۸	۱/۲۹	۱/۲۴	۱/۱۹	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	ZP14
۱/۷۰	۱/۵۴	۱/۴۳	۱/۲۵	۱/۳۲	۱/۲۶	۱/۲۱	۱/۱۶	۱/۳۶	۱/۲۸	۱/۲۱	۱/۱۵	ZP15



شکل ۲- تشکیل هاله شفاف (در روز دوازدهم) در اطراف کلنی باکتری نشان دهنده انحلال روی (چپ: فسفات روی؛ راست: اکسید روی)

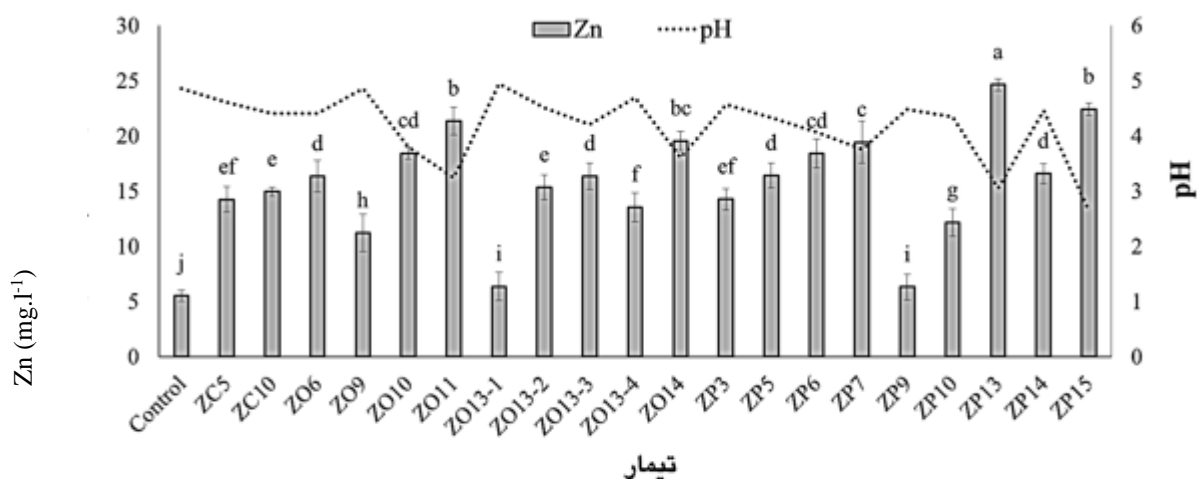


معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد (جدول ۳). بیشترین انحلال فسفات روی برای جدایه ZP13 با مقدار ۲۴/۶۴ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد ۶۲/۶۷ درصد افزایش انحلال روی را نشان داد. ZP15 و ZO11 به ترتیب با ۲۲/۴۱ و ۲۱/۳۲ میلی‌گرم بر لیتر در رتبه بعدی قرار داشتند (شکل ۳). همچنین نتایج نشان داد که تأثیر pH بر انحلال روی کاملاً آشکار و معنی‌دار بود (جدول ۴).

با توجه به نتایج آزمایش فوق، مشخص شد که نوع منبع کم‌محلول Zn مورد استفاده در محیط TMS بر رفتار انحلال روی توسط جدایه‌ها تأثیر گذاشته است. محدوده انحلال روی (HD/CD) در کربنات روی ۱-۱/۶۸، در کربنات روی ۱-۱/۷۴ و در اکسید روی ۱-۱/۶۸ بدست آمد (شکل ۲).

### ارزیابی کمی توان انحلال روی فسفات روی

نتایج نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر توانایی حل‌کنندگی روی از منبع فسفات روی کم‌محلول اختلاف



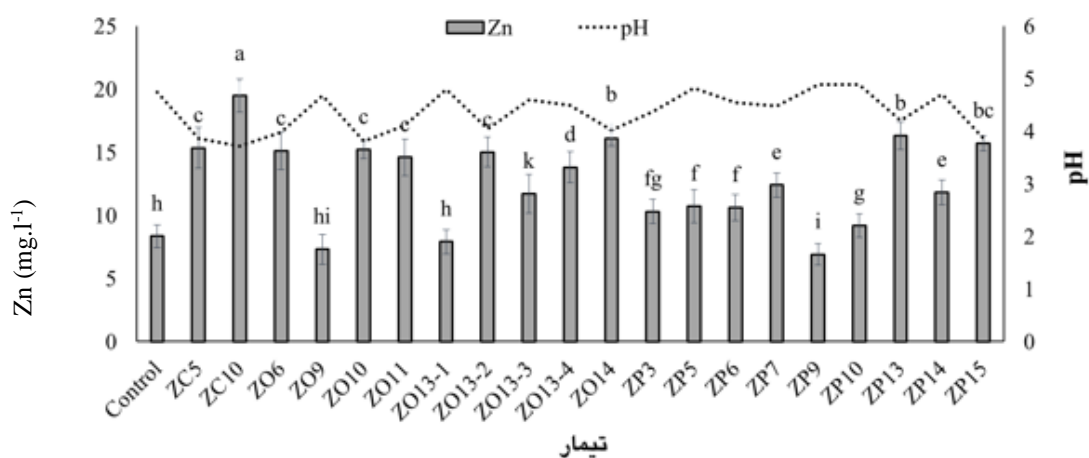
شکل ۳- انحلال فسفات روی توسط جدایه‌ها همراه با تغییرات pH محیط کشت (در روز هفتم)

### اکسید روی

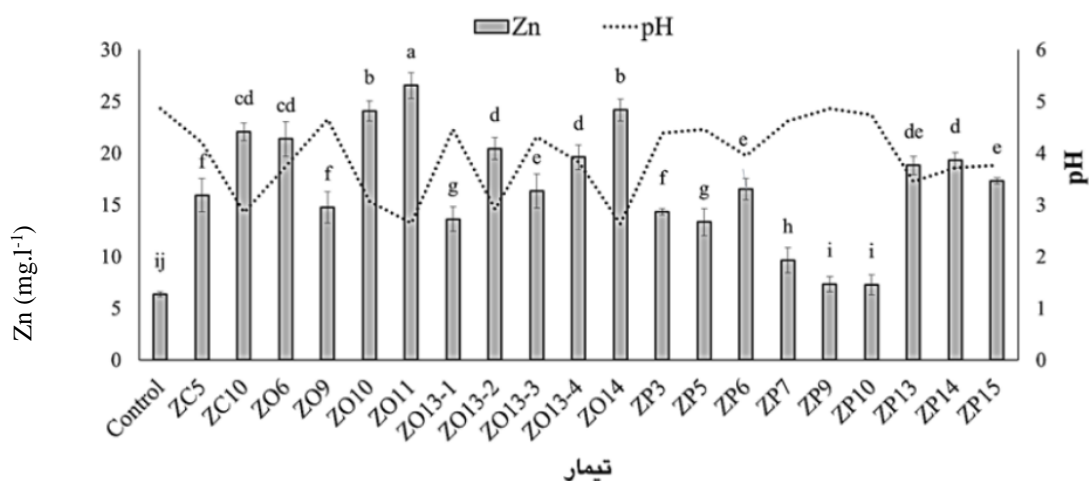
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌ها از نظر توان محلول‌سازی اکسید روی وجود دارد ( $P < 0.01$ ). جدایه ZO11 با مقدار ۲۶/۵۴ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین توان انحلال را داشت که ۷۶/۱۷ درصد بیشتر از تیمار شاهد بود. جدایه‌های ZO10، ZO14 و ZC10 به ترتیب در رتبه های بعدی قرار داشتند (شکل ۵). اثر pH بر انحلال اکسید روی توسط جدایه‌ها، بالا و کاملاً معنی‌دار بود (جدول ۴).

### کربنات روی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که بین جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری از نظر توان حل‌کنندگی روی کم‌محلول از منبع کربنات روی وجود دارد ( $P < 0.01$ ). جدایه ZC10 با ۱۹/۴۸ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین توان انحلال را نشان داد که در مقایسه با تیمار شاهد ۵۷/۱۳ درصد بیشتر بود. جدایه‌های ZO14، ZP13 و ZP15 نیز در رتبه های بعدی قرار داشتند (شکل ۴). همچنین نتایج این بخش نشان داد که اثر pH بر انحلال کربنات روی زیاد و معنی‌دار است (جدول ۴).



شکل ۴- انحلال کربنات روی توسط جدایه‌ها همراه با تغییرات pH محیط کشت (در روز هفتم)



شکل ۵- انحلال اکسید روی توسط جدایه‌ها همراه با تغییرات pH محیط کشت (در روز هفتم)

جدول ۳- تجزیه واریانس ارزیابی توان جدایه‌ها در انحلال منابع مختلف روی کم‌محلول

میانگین مربعات		فسفات روی	درجه آزادی	منابع تغییرات
اکسید روی	کربنات روی			
۴۸/۲۸۲**	۵۸/۷۹**	۵۴/۱۳۷**	۲۱	جدایه
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۴۲	خطا
۹/۲۸	۸/۴۱	۲/۷۷		ضریب تغییرات (%)

\*\* معنی‌دار در سطح ۱ درصد ( $P < 0.01$ )

جدول ۴: ضرایب همبستگی پیرسون بین انحلال روی و تغییرات pH

فسفات روی	کربنات روی	اکسید روی	همبستگی
-۰/۸۵**	-۰/۸۹**	-۰/۹۲**	pH

\*\* : معنی‌دار در سطح ۱ درصد ( $P < 0.01$ )

جدول ۵: ضرایب همبستگی پیرسون بین انحلال روی و تولید سیدروفور

فسفات روی	کربنات روی	اکسید روی	همبستگی
-۰/۷۱*	-۰/۵۱	-۰/۵۸*	سیدروفور

\* : معنی‌دار در سطح ۵ درصد ( $P < 0.05$ )

مشاهده کرد که انحلال منابع کم‌محلول روی (فسفات روی (۰/۸۵)، کربنات روی (۰/۸۹) و اکسید روی (۰/۹۲)) به pH بستگی دارد. علاوه بر کاهش pH، تولید سیدروفور از دیگر عواملی است که در محلول‌سازی روی نقش دارد (ژو و همکاران ۲۰۱۵). ضریب همبستگی بین تولید سیدروفور و انحلال روی از سه منبع مختلف در جدول ۵ آورده شده است.

با نگاه کلی به آزمایش‌های درون‌شیشه‌ای ارزیابی توان انحلال روی از سه منبع فسفات، اکسید و کربنات روی، مشخص گردید که از بین ۲۰ جدایه، جدایه‌های ZP13، ZO11، ZC10، ZO14، ZP15 و ZO10 جدایه‌های توانمند حل‌کننده روی هستند. نتایج ویژگی‌های افزاینده رشد گیاه در جدایه‌های منتخب در جدول ۶ آورده شده است.

ارزیابی انحلال روی کم‌محلول از سه منبع فسفات، اکسید و کربنات نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان قابلیت انحلال توسط جدایه‌های باکتریایی وجود دارد. درحالی که مقدار روی در هر سه منبع برابر (۰/۱ درصد) بود اما انحلال روی در سه منبع یکسان نبود و بیشترین روی آزاد شده برابر با اکسید روی (۲۶/۵۴ میلی‌گرم بر لیتر) < فسفات روی (۲۴/۶۴ میلی‌گرم بر لیتر) < کربنات روی (۱۹/۴۸ میلی‌گرم بر لیتر) بود. در روش نیمه کمی، میزان انحلال یا تشکیل هاله (HD/CD) به ترتیب برابر با فسفات روی (۱/۷۴) < اکسید روی (۱/۶۸) < کربنات روی (۱/۶۱) بود. برای بررسی رابطه خطی بین دو متغیر pH و انحلال روی، ضریب همبستگی پیرسون نیز محاسبه شد (جدول ۴). این ضریب قدرت و جهت رابطه بین دو متغیر را نشان می‌دهد. می‌توان

جدول ۶- ارزیابی خواص محرک رشد گیاه برای جدایه‌های منتخب.

اکسین بدون تریپتوفان (mg.l <sup>-1</sup> )	اکسین با تریپتوفان (mg.l <sup>-1</sup> )	سیدروفور (میکرومولار)	پتاسیم- بیوتیت (mg.l <sup>-1</sup> )	پتاسیم- موسکوویت (mg.l <sup>-1</sup> )	فسفر (mg.l <sup>-1</sup> )	جدایه
۶/۰۷ <sup>e</sup> ± ۰/۵۸	۶/۱۸ <sup>d</sup> ± ۰/۶۱	۰/۱۵ <sup>f</sup> ± ۰/۰۰۶	۵/۴۹ <sup>h</sup> ± ۰/۴۳	۳/۵۲ <sup>h</sup> ± ۰/۲۱	۲۹/۶۵ <sup>h</sup> ± ۲/۴۷	Control
۱۲/۲۳ <sup>c</sup> ± ۱/۰۹	۱۳/۴۶ <sup>b</sup> ± ۱/۲	۱۷/۱۱ <sup>d</sup> ± ۱/۰۵	۷/۳۱ <sup>f</sup> ± ۰/۵۴	۵/۴۴ <sup>f</sup> ± ۰/۳۷	۷۷/۵۴ <sup>de</sup> ± ۴/۹۶	ZC10
۱۲/۳۵ <sup>bc</sup> ± ۱/۱۵	۱۳/۳۷ <sup>b</sup> ± ۱/۲۶	۲۵/۷ <sup>cd</sup> ± ۱/۶۵	۶/۶۹ <sup>g</sup> ± ۰/۵۲	۴/۵۹ <sup>g</sup> ± ۰/۲۸	۴۳/۲۳ <sup>ef</sup> ± ۳/۲۸	ZO10
۱۲/۱۲ <sup>c</sup> ± ۱/۱۲	۱۴/۳۹ <sup>a</sup> ± ۱/۲۸	۲۳/۳۱ <sup>c</sup> ± ۱/۴۲	۸/۳۱ <sup>e</sup> ± ۰/۶۱	۵/۸۵ <sup>de</sup> ± ۰/۴	۳۷/۶۳ <sup>g</sup> ± ۲/۳۰	ZO11
۱۳/۴۹ <sup>a</sup> ± ۱/۱۴	۱۴/۰۴ <sup>ab</sup> ± ۱/۱۵	۲۷/۲۱ <sup>b</sup> ± ۱/۶۳	۱۴/۹۸ <sup>b</sup> ± ۱/۱۳	۱۰/۵۷ <sup>a</sup> ± ۰/۷۱	۸۴/۱۲ <sup>c</sup> ± ۵/۴	ZO14
۹/۶۳ <sup>d</sup> ± ۰/۸۵	۱۳/۳۲ <sup>b</sup> ± ۱/۱۹	۳۱/۵۵ <sup>a</sup> ± ۱/۹۱	۱۸/۵۹ <sup>a</sup> ± ۱/۴۱	۹/۰۲ <sup>b</sup> ± ۰/۶۱	۹۱/۶۸ <sup>b</sup> ± ۶/۷۱	ZP13
۱۲/۴۴ <sup>b</sup> ± ۱/۱۶	۱۳/۰۹ <sup>bc</sup> ± ۱/۲۴	۱۶/۴۷ <sup>e</sup> ± ۱/۲۵	۱۰/۱۷ <sup>cd</sup> ± ۰/۷۹	۷/۴۸ <sup>cd</sup> ± ۰/۴۷	۱۰۳/۷ <sup>a</sup> ± ۶/۶۱	ZP15

نکته: حروف بالای مقادیر نشان دهنده تفاوت معنی داری است ( $p < 0.01$ ). مقادیر ارائه شده ± خطای استاندارد می‌باشند.

## آزمایش گلخانه‌ای

ویژگی‌های خاک مورد استفاده برای کشت گلدانی در جدول ۷ آورده شده است.

جدول ۷- ویژگی‌های خاک مورد استفاده برای کشت گلخانه‌ای

CCE (%)	Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg.kg <sup>-1</sup> )	Available P (mg.kg <sup>-1</sup> )	Available K (mg.kg <sup>-1</sup> )	Organic C (%)	EC (dS.m <sup>-1</sup> )	pH	عمق نمونه‌برداری (cm)	بافت
۲/۸۵	۰/۵۸	۰/۷۸	۳	۱۹۸	۰/۱۷	۲/۹	۷/۵۶	۲۰-۰	لوم شنی

## شاخص‌های رشدی و مورفولوژیکی

مقایسه با تیمار کنترل مثبت باعث افزایش میانگین پارامترهای ذکر شده گردیدند. در قطر ساقه نیز جدایه ZO11 با ۷/۳۵ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد مثبت، دارای بالاترین میانگین بود. تیمار ZO14 در قطر ساقه دارای بالاترین میانگین بود و از نظر آماری با تیمار شاهد مثبت در یک گروه آماری قرار داشت. در قطر ساقه سه جدایه ZO11، ZP15 و ZO14 به ترتیب با ۲۵/۹، ۲۵/۵ و ۲۴/۸ درصد افزایش در مقایسه با تیمار شاهد مثبت، دارای بالاترین میانگین بودند (جدول ۸). می‌توان اینطور گفت که با توجه به نتایج بدست آمده، در شاخص‌های رشدی-مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده، سه جدایه ZO11، ZP15 و ZO14 جدایه‌های برتر بودند.

در پارامتر شاخص کلروفیل، تیمارهای ZP15 و ZO11 دارای بالاترین میانگین بودند که به ترتیب منجر به افزایش ۳۲/۳۵ و ۳۰/۲۸ درصدی نسبت به شاهد کنترل مثبت شده بودند. جدایه‌های مذکور در وزن تر شاخصاره نیز دارای بالاترین میانگین بودند و منجر به افزایش ۱۲/۹ و ۱۲/۴ درصدی وزن تر شاخصاره در مقایسه با تیمار شاهد مثبت شده بودند. جدایه‌های مذکور همچنین در وزن خشک شاخصاره نیز به ترتیب منجر به افزایش ۱۱/۸ و ۱۱/۱ درصدی نسبت به تیمار شاهد مثبت شدند. تیمارهای باکتریایی ZO11 و ZO14 در وزن تر ریشه به ترتیب با ۵/۴۵ و ۵/۳۲ درصدی و در وزن خشک ریشه به ترتیب با ۷/۲۵ و ۶/۹۴ درصدی در

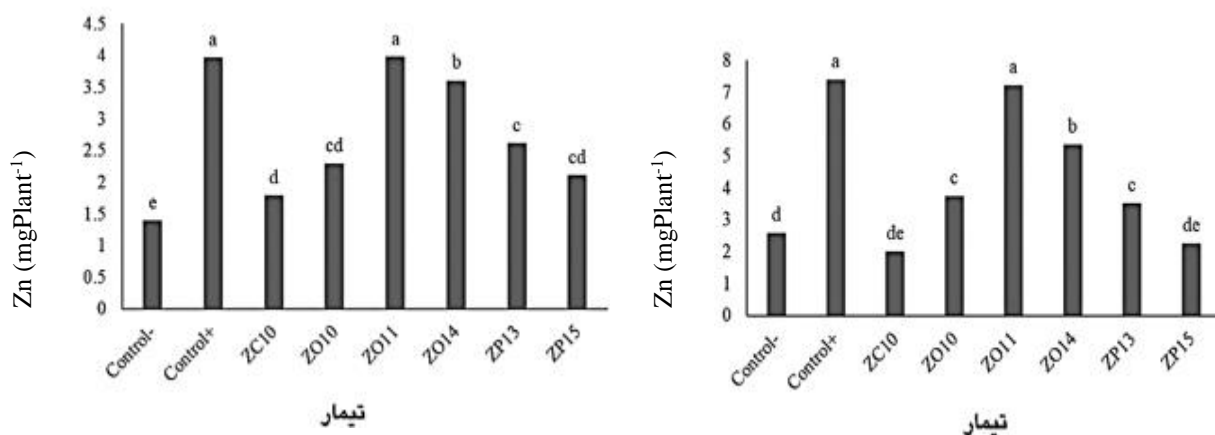
جدول ۸- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر خصوصیات رشدی و مورفولوژیکی گیاه

تیمار	شاخص کلروفیل (SPAD)	وزن تر شاخصاره (g)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک شاخصاره (g)	وزن خشک ریشه (g)	قطر ساقه (cm)	ارتفاع ساقه (cm)	حجم ریشه (cm <sup>3</sup> )
Control -	۶/۵۷ <sup>d</sup> ± ۰/۵۴	<sup>c</sup> ± ۱۵/۸	<sup>d</sup> ± ۹/۵۵	<sup>d</sup> ± ۲/۳۲	۲۸/۶۰ <sup>c</sup> ± ۱/۵۴	۱/۲۴ <sup>c</sup> ± ۰/۰۸	۱۰۱/۶ <sup>c</sup> ± ۷/۵۳	۱۰۷/۱ <sup>e</sup> ± ۷/۵۱
Control +	۹/۶۰ <sup>b</sup> ± ۰/۸۷	<sup>b</sup> ± ۲۰/۱	<sup>ab</sup> ± ۱۳/۳	۴۷/۵ <sup>b</sup> ± ۲/۴	۳۶/۳۰ <sup>a</sup> ± ۲/۷۸	۱/۵۴ <sup>a</sup> ± ۰/۱۱	۱۳۰/۱ <sup>a</sup> ± ۹/۱۲	۱۷۶/۸ <sup>b</sup> ± ۱۳/۵
ZC10	۶/۰۰ <sup>d</sup> ± ۰/۵۹	<sup>b</sup> ± ۱۹/۶	<sup>cd</sup> ± ۱۱/۲	<sup>bc</sup> ± ۲/۵۹	۲۹/۲۰ <sup>b</sup> ± ۱/۶۳	۱/۲۷ <sup>bc</sup> ± ۰/۰۸	۱۲۳/۳ <sup>b</sup> ± ۸/۴۳	۱۵۶/۴ <sup>c</sup> ± ۱۱/۵
ZO10	۷/۷۰ <sup>c</sup> ± ۰/۶۴	<sup>bc</sup> ± ۱۷/۱	<sup>c</sup> ± ۱۰/۲	<sup>cd</sup> ± ۳/۷۹	۳۱/۶ <sup>b</sup> ± ۱/۶۵	۱/۳۱ <sup>bc</sup> ± ۰/۰۹	۱۱۶/۳ <sup>b</sup> ± ۷/۵۸	۱۷۳/۴ <sup>b</sup> ± ۱۲/۶
ZO11	۱۲/۰۷ <sup>a</sup> ± ۱/۱۴	<sup>a</sup> ± ۱۸/۵	<sup>a</sup> ± ۱۲/۴	۵۳/۰۹ <sup>a</sup> ± ۴/۲	۳۸/۹۳ <sup>a</sup> ± ۳/۴۲	۱/۶۵ <sup>a</sup> ± ۰/۱۱	۱۲۵/۶ <sup>b</sup> ± ۸/۶۱	۲۲۲/۷ <sup>a</sup> ± ۱۶/۴
ZO14	۹/۱۰ <sup>b</sup> ± ۰/۹۵	<sup>b</sup> ± ۲۱/۱	<sup>a</sup> ± ۱۲/۴	<sup>bc</sup> ± ۳/۸۷	۳۷/۹۰ <sup>a</sup> ± ۲/۳۴	۱/۵۶ <sup>ab</sup> ± ۰/۱	۱۳۲/۶ <sup>a</sup> ± ۹/۲۳	۲۱۹/۳ <sup>a</sup> ± ۱۴/۵
ZP13	۶/۸۳ <sup>d</sup> ± ۰/۵۳	<sup>b</sup> ± ۲۰/۴	<sup>b</sup> ± ۱۱/۵	<sup>b</sup> ± ۳/۹۴	۲۵/۳۳ <sup>ab</sup> ± ۲/۹۵	۱/۳۷ <sup>b</sup> ± ۰/۰۹	۱۱۴/۳ <sup>b</sup> ± ۷/۷۶	۱۴۲/۱ <sup>d</sup> ± ۹/۴۳
ZP15	۱۲/۷۳ <sup>a</sup> ± ۰/۹۸	<sup>a</sup> ± ۱۸/۸	<sup>b</sup> ± ۱۰/۸	<sup>a</sup> ± ۴/۵۳	۳۵/۶۷ <sup>ab</sup> ± ۳/۱۲	۱/۵۴ <sup>ab</sup> ± ۰/۱۱	۱۲۷/۲۵ <sup>b</sup> ± ۸/۲۳	۲۲۱/۳ <sup>a</sup> ± ۱۵/۷

## جذب روی ریشه و شاخصاره

بین جدایه‌ها از نظر جذب روی بخش ریشه و شاخصاره گیاه ذرت، اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد وجود داشت. جدایه ZO11 دارای بالاترین جذب روی در بین تیمارهای باکتریایی بود، عملکرد این جدایه در جذب روی، مشابه تیمار کنترل مثبت (کود شیمیایی سولفات روی) بود (شکل ۶). این جدایه در مقایسه با تیمار شاهد منفی منجر به افزایش جذب روی به ترتیب ۱۷۹/۷ درصد در ریشه و ۱۵۵/۱ درصد در بخش شاخصاره گیاه ذرت شد. توانایی‌های این جدایه در شرایط آزمایشگاهی شامل تولید اکسین (وابسته به تربیتوفان) و انحلال روی بود (جدول ۶). جدایه ZO14 دومین جدایه برتر حل‌کننده روی بود که در مقایسه با تیمار شاهد منفی منجر به افزایش جذب روی به ترتیب ۶۲/۳۷ درصد در ریشه و ۱۱۰/۶ درصد در بخش شاخصاره گیاه ذرت شد (شکل ۶). این جدایه در شاخص‌های ارتفاع و قطر ساقه، حجم ریشه، وزن تر و خشک کل، عملکرد بالاتری نسبت به تیمار شاهد کنترل مثبت نشان داد (جدول ۸). این جدایه در شرایط آزمایشگاهی، خواص محرک رشد گیاهی چندگانه از جمله: تولید هورمون اکسین (در حضور و عدم حضور تربیتوفان)، تولید سیدروفور، انحلال فسفر، آزادکنندگی پتاسیم را از خود نشان داده بود. جدایه ZP15 در شرایط

آزمایشگاهی ویژگی‌های مختلف افزایش‌دهنده رشد گیاه از خود نشان داده بود (از جمله: توان انحلال روی از منبع فسفات روی، تولید اکسین غیر وابسته به تربیتوفان، توان انحلال فسفر و پتاسیم) و در شرایط گلخانه‌ای در ویژگی‌های رشدی-مورفولوژیکی مانند شاخص کلروفیل، حجم ریشه، وزن تر و خشک ریشه دارای عملکردی بالاتر از تیمار شاهد مثبت بود. با این حال این جدایه در جذب روی کارآمد نبود و کمبود عنصر روی در گیاه ذرت نمایان شد. جدایه ZP13 با وجود توانایی خوب در شرایط آزمایشگاهی (تولید سیدروفور، تولید اکسین وابسته به تربیتوفان، توان انحلال فسفر و پتاسیم)، عملکرد متوسطی را در شرایط گلخانه‌ای نشان داد. این جدایه در شرایط درون‌شیشه‌ای بیشترین میزان تولید سیدروفور را داشت (جدول ۶) ولی به نظر می‌رسد در حضور آهن (استفاده شده در قالب کود شیمیایی) اقدام به تولید سیدروفور نمی‌کند. دو جدایه ZC10 و ZO10 عملکرد ضعیفی در همه پارامترهای اندازه‌گیری شده (رشدی-مورفولوژیکی) از خود نشان دادند (اگرچه آنها در شرایط درون‌شیشه‌ای توانایی خوبی در انحلال به ترتیب کربنات و اکسید روی داشتند). در نهایت می‌توان گفت که دو جدایه ZO11 و ZO14 به عنوان جدایه‌های برتر این آزمایش بودند.



شکل ۶- تاثیر تیمارهای مختلف آزمایش از نظر جذب عنصر روی بخش ریشه و شاخصاره گیاه ذرت

به افزایش قابل توجه محتوای روی در دانه ذرت شده است (بیاری و همکاران ۲۰۰۸). میشر و همکاران (۲۰۱۲) گزارش داد که تلقیح کنسرسیوم دو باکتری *Rhizobium leguminosarum* PR1 و *Pseudomonas sp.* جذب روی را در برنج بهبود بخشید و محتوای روی دانه برنج را در مقایسه با تیمار شاهد بدون تلقیح ۱۳۳ درصد افزایش داد. علائم کمبود روی در گندم و جو با تلقیح با باسیلوس M-13 و *P. aeruginosa* TNSK2 مرتفع شده است (صدقیانی و همکاران ۲۰۰۹).

#### شناسایی جدایه‌ها

جدایه‌های برتر این آزمایش ZO11 و ZO14 بودند. طبق جدول ۹، این دو جدایه متعلق به *Acinetobacter calcoaceticus* و *Agromyces italicus* هستند.

PGPRهای مختلف حل‌کننده روی با کلونیزاسیون ریشه و انحلال ترکیبات پیچیده روی به ترکیبات ساده تر، فراهمی زیستی روی را برای ریشه افزایش داده و در ادامه با افزایش جذب روی، رشد و نمو گیاه را بهبود می‌بخشند (گوتتی و همکاران ۲۰۱۳، خوشرو و همکاران ۲۰۲۰b). گزارشات مختلفی وجود دارد که تلقیح ZSB بر روی گیاهان باعث افزایش محتوای روی گیاه شده است (طارق و همکاران ۲۰۰۷، بیاری و همکاران ۲۰۰۸، حسین و همکاران ۲۰۱۵، خوشرو و همکاران ۲۰۲۰a). وایتینگ و همکاران (۲۰۰۱) گزارش دادند که دسترسی زیستی روی در ریزوسفر به دلیل تلقیح با ZSB حدود ۴۵ درصد افزایش یافته است. افزایش ۱۸ درصدی روی در گیاه گندم به دلیل تلقیح با دو باکتری *Azotobacter Azospirillum* گزارش شده است (الویا و همکاران ۲۰۱۲). به طور مشابه تلقیح این دو باکتری در گیاه ذرت منجر

جدول ۹- نتایج شناسایی باکتری‌ها

سویه باکتری	نوع گرم	مورفولوژی	کاتالاز	اکسیداز	شناسایی	کد دسترسی در پایگاه NCBI
ZC10	+	کوکوباسیل	-	-	<i>Agromyces sp.</i>	MZ618724
ZO10	+	باسیل	+	-	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	MZ618725
ZO11	-	کوکوباسیل	+	+	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	MZ618723
ZO14	+	باسیلی-شبه کوکسی	+	-	<i>Agromyces italicus</i>	MZ618722
ZP13	-	باسیل	+	-	<i>Pantoea agglomerans</i>	MZ618689
ZP15	-	باسیل	-	+	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	MZ618688

#### نتیجه‌گیری کلی

نتیجه‌گیری کلی. تفاوت بود. برای مثال جدایه ZO11، تنها توانایی انحلال روی از منبع اکسید روی را نشان داد. توانایی انحلال روی در این جدایه برای فسفات روی، متوسط و برای کربنات روی، پایین بود. وابستگی انحلال روی کم‌محلول به pH کاملاً آشکار و معنی‌دار بود ولی وابستگی انحلال به تولید سیدروفور برای فسفات روی و اکسید روی، کم و برای کربنات روی غیرمعنی‌دار بود. نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای با نتایج ارزیابی درون‌شیشه‌ای انحلال از منبع اکسید روی تطابق خوبی نشان داد (در هردو آزمایش دو جدایه ZO11 و ZO14 برتر بودند).

طبق نتایج این آزمایش میزان روی آزاد شده در حالت کیفی به صورت اکسید روی < فسفات روی < کربنات روی بود و در حالت کمی به صورت فسفات روی < اکسید روی < کربنات روی بود. دلیل تفاوت بین این دو روش را می‌توان به ماهیت روش اندازه‌گیری (وجود یا عدم وجود تکان خوردن<sup>۱</sup> محیط کشت) و نوع باکتری (ویژگی‌هایی مانند تحرک باکتری، نوع تنفس و غیره) نسبت داد. مشخص گردید که رفتار حل‌کنندگی جدایه‌ها در برابر منابع مختلف کم‌محلول روی کاملاً

<sup>۱</sup> Shaking

می‌توان به افزایش فراهمی زیستی روی کم‌محلول برای گیاه، تولید اکسین و سیدروفور اشاره کرد. لازم به ذکر است که جدایه‌های برتر این آزمایش پس از آزمایش‌های تکمیلی (مانند آزمایشات مزرعه‌ای) می‌توانند به عنوان کاندیدای مناسب برای تولید کود زیستی و کمک به رشد و نمو گیاه (با تمرکز بر تامین عناصر مغذی به ویژه روی) در نظر گرفته شوند.

#### سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از رساله مقطع دکتری تخصصی بوده که در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی خاک و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شده است که بدینوسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های آنان قدردانی می‌نمایند.

همچنین نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای با نتایج آزمایش‌های درون‌شیشه‌ای ارزیابی تولید اکسین در حضور تریپتوفان نیز مطابقت بالایی نشان داد (در هر دو آزمایش دو جدایه ZO11 و ZO14 برتر بودند).

جدایه *Acinetobacter calcoaceticus* ZO11 (با ویژگی‌هایی مانند تولید اکسین، تولید اسید، تولید سیدروفور در مقدار کم) بعنوان جدایه برتر حل‌کننده روی بوده و می‌تواند به عنوان کود زیستی روی مورد توجه قرار بگیرد. در این آزمایش مشخص گردید که جدایه *Agromyces italicus* ZO14 (به عنوان عضوی از کلاس *Actinobacteria*) هر چند در رتبه پایین‌تر از ZO11 قرار داشت ولی با ویژگی‌های چندگانه تحریک‌کنندگی رشد گیاه خود توانایی رفع کمبود روی در گیاه ذرت را نشان داد. این جدایه برای اولین بار و در این مطالعه گزارش می‌گردد. از اثرات این باکتری

#### منابع مورد استفاده

- Bapiri A, Asgharzadeh A, Mujallali H, Khavazi K and Pazira E. 2012. Evaluation of zinc solubilization potential by different strains of Fluorescent Pseudomonads. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 16(3): 147-153.
- Bharucha UD, Patel KC, Trivedi UB. 2013. In vitro screening of isolates for its plant growth promoting activities from the rhizosphere of Alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3(5):79-88.
- Biari A, Golami A. and Rahmani HA. 2008. Growth promoting and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in arid region of Iran. *Australian Journal of Biological Sciences*, 8: 1015-1020.
- Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, Mc Ginnis SD, Merezhuk Y and Raytselis Y. 2013. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41:W29-W33.
- Bric JM, Bostock RM and Silverstone SE. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2): 535-538.
- Cala-Rivero V, De La Flor Masedo M and Vigil De La Villa R. 1999. Effect of soil properties on zinc retention in agricultural calcareous soils. *Agrochimica*, 43(1): 46-54.
- Castillo-González J, Ojeda-Barrios D, Hernández-Rodríguez A and González-Franco AC. 2018. Robles-Hernández L, López-Ochoa GR. Zinc metalloenzymes in plants. *Interciencia*, 43(4):242-248.
- Castillo-González J, Ojeda-Barrios D, Hernández-Rodríguez A, González-Franco AC, Robles-Hernández L, López-Ochoa GR. 2018. Zinc metalloenzymes in plants. *Interciencia*, 43(4):242-248.
- Dinesh R, Anandaraj M, Kumar A, Bini YK, Subila KP and Aravind R. 2015. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*, 173: 34-43.

- Dinesh R, Srinivasan V, Hamza S, Sarathambal C, Anke Gowda SJ, Ganeshamurthy AN, Gupta SB, Aparna Nair V, Subila KP, Lijina A and Divya VC. 2018. Isolation and characterization of potential Zn solubilizing bacteria from soil and its effects on soil Zn release rates, soil available Zn and plant Zn content. *Geofisica Internacional*, 321:173-186.
- Eleiwa ME, Hamed ER and Shehata HS. 2012. The role of biofertilizers and/or some micronutrients on wheat plant (*Triticum aestivum* L.) growth in newly reclaimed soil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(17):3359-69.
- Fess TL and Benedito VA. 2018. Organic versus conventional cropping sustainability: A Comparative System Analysis. *Sustainability*, 10(1):272-281.
- Gontia-Mishra I, Sapre S and Tiwari S. 2017. Zinc solubilizing bacteria from the rhizosphere of rice as prospective modulator of zinc biofortification in rice. *Rhizosphere*, 3:185-190.
- Goteti PK, Emmanuel LDA, Desai S and Shaik MHA. 2013. Prospective zinc solubilizing bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (*Zea mays* L.). *International journal of Microbiology*, 7(2): 421-432.
- Gregory PJ, Wahbi A, Adu-Gyamfi J, Heiling M, Gruber R, Joy EJ and Broadley MR. 2017. Approaches to reduce zinc and iron deficits in food systems. *Global Food Security*, 17 (4): 217-224.
- Hamidpour M, Afyuni M, Khadivi E, Zorpas A and Inglezakis V. 2012. Composted municipal waste effect on chosen properties of calcareous soil. *International Agrophysics*, 26(4):365-374.
- Hu X, Chen J and Guo J. 2006. Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9): 983-990.
- Hübner C and Haase H. 2021. Interactions of zinc-and redox-signaling pathways. *Redox Biology*, 41:101916.
- Hussain A, Arshad M, Zahir ZA and Asghar M. 2015. Prospects of zinc solubilizing bacteria for enhancing growth of maize. *Pakistan journal of Agricultural Sciences*, 52(4): 18-26.
- Idayu O, Maizatun N, Radziah O, Halimi MS and Edaroyati MW. 2017. Inoculation of zinc-solubilizing bacteria with different zinc sources and rates for improved growth and zinc uptake in rice. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(5):1137-1140.
- Khoshru B, Mitra D, Khoshmanzar E, Myo EM, Uniyal N, Mahakur B, Mohapatra PK, Panneerselvam P, Boutaj H, Alizadeh M, Cely MV. 2020a. Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: an economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition* 30:1-31.
- Khoshru B, Mitra D, Mahakur B, Sarikhani M R, Mondal R, Verma D and Pant K. 2020b. Role of soil rhizobacteria in utilization of an indispensable micronutrient zinc for plant growth promotion. *Journal of Natural Remedies*, 21(6): 47-58.
- Klute A. 1986. *Methods of soil analysis. Part I: physical and mineralogical methods*. ASA, Inc. SSSA Inc. Madison, Wisconsin USA.
- Malakoti MJ. 2001. *Sustainable Agriculture and Yield Increase by Optimizing Fertilizer Consumption in Iran*, Third Edition, Sana Publications, Tehran, Iran.
- Nelson DW and Sommers L. 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter (Pp. 539-579). *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. 2nd Ed. Argon. Mongor. No. 9. ASA and SSSA, Madison.
- Olsen SR, Sommer LE. 1982. Phosphorus (Pp. WI. 403-430). In: Klute A (Ed). *Methods of Soil Analysis: Chemical and Microbiological Properties*, part 2. 2nd Ed. Argon. Mongor. No. 9. ASA and SSSA, Madison.
- Rengel Z. 2015. Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2):397-409.



- Reyhani Tabar A, Najafali Karimian M, Moez Ardalan S and Savaqhebi Gh. 2007. Zn adsorption properties in some calcareous soils of Iran, 10<sup>th</sup> Iranian Soil Science Congress, Karaj, Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran. (In Persian).
- Sadaghiani MR, Barin M and Jalili F. 2008. The Effect of PGPR inoculation on the growth of wheat. International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology, Turkey, 891– 898.
- Sambrook JDW and Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. 1 Cold Spring Harbor, New York.
- Saravanan VS, Kalaiarasan P, Madhaiyan M and Thangaraju M. 2007a. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion ( $Zn^{2+}$ ) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. Letters in Applied Microbiology, 44(3): 235-241.
- Saravanan VS, Madhaiyan M and Thangaraju M. 2007b. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Chemosphere, 66(9):1794-1798.
- Sarikhani MR, Khoshru B and Greiner R. 2019. Isolation and identification of temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria as a potential microbial fertilizer. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35(8):126-137.
- Sarikhani MR, Oustan S, Ebrahimi M and Aliasghar zad N. 2018. Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. European Journal of Soil Science, 69(6): 1078-1086.
- Schwyn B and Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160(1):47-56.
- Shahbazi K and Besharati H. 2013. Overview of agricultural soil fertility status of Iran. Land Management Journal, 1:1-15.
- Sperber JI. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research, 9(6):782-787.
- Tariq M, Hameed S, Malik KA and Hafeez FY. 2007. Plant root associated bacteria for zinc mobilization in rice. Pakistan Journal of Botany, 39(1): 245-253.
- Thomas GW. 1982. Exchangeable cations (Pp. 159-165). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.
- Udo EJ, Bohn HL and Tucker TC. 1970. Zinc adsorption by calcareous soils. Soil Science Society of America Journal. 1970 May; 34(3):405-417.
- Vaid SK, Kumar B, Sharma A, Shukla AK and Srivastava PC. 2014. Effect of Zn solubilizing bacteria on growth promotion and Zn nutrition of rice. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 14(4):889-910.
- Waling I, Vark WV, Houba VJG and Van der Lee JJ. 1989. Soil and plant analysis, a series of syllabi, part 7: Plant analysis procedures. Wageningen Agriculture University.
- Whiting SN, de Souza MP, Terry N (2001) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. Environmental Science and Technology, 35(15):3144-50.
- Wu SC, Luo YM, Cheung KC and Wong MH. 2006. Influence of bacteria on Pb and Zn speciation, mobility and bioavailability in soil: a laboratory study. Environmental Pollution, 144(3):765-773.
- Zhang W, Zheng C, Song Z, Deng A and He Z. 2015. Farming systems in China: Innovations for sustainable crop production. In Crop Physiology (Second Edition), 43-64.
- Zhu H, Yang H. 2015. Isolation and characterization of a highly siderophore producing *Bacillus subtilis* strain (Pp. 83-9). In: Advances in Applied Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg.