

دستورالعمل فنی

دستورالعمل کار با سویه‌های آنتاگونیست استریتومایسی از آزمایشگاه تا مزرعه

(جداسازی، مشخص نمودن توانمندی‌های کنترل زیستی و تهیه فرمولاسیون اولیه)



نویسندگان

ابراهیم کریمی

اکرم صادقی

رسالة محمد بن عبد الله



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: دستورالعمل فنی کار با سویه‌های آنتاگونیست/ستریتوما یسس از آزمایشگاه تا مزرعه
(جداسازی، مشخص نمودن توانمندی‌های کنترل زیستی و تهیه فرمولاسیون اولیه)

نویسندگان: ابراهیم کریمی و اکرم صادقی

ویراستار علمی:

ویراستاران ادبی:

تهیه شده در: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
شمارگان:

نوبت انتشار: اول

سال انتشار:

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است



شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۶۶۳۶۵ به تاریخ ۱۴۰۳/۰۸/۲۹ است



دستورالعمل فنی کار با سویه‌های آنتاگونیست

استرپتومایسس از آزمایشگاه تا مزرعه

(جداسازی، مشخص نمودن توانمندی‌های کنترل زیستی و تهیه فرمولاسیون اولیه)

نویسندگان

ابراهیم کریمی

اکرم صادقی

فهرست مطالب

مقدمه	۵
جداسازی و خالص سازی سویه های باکتریایی اکتینومیستی از خاک	۷
آزمون کشت متقابل	۹
آزمون تولید ترکیبات فرار ضد قارچی	۱۰
آزمون تولید ترکیبات مایع ضد قارچی	۱۱
بررسی میکروسکوپی وضعیت میسلیم بیمارگر در برهمکنش با سویه آنتاگونیست	۱۲
آزمون تولید سیانید هیدروژن (روش نخست)	۱۳
آزمون تولید سیانید هیدروژن (روش دوم)	۱۳
آزمون تولید کیتیناز	۱۴
آزمون تولید سلولاز	۱۵
آزمون تولید پروتئاز	۱۶
آزمون تولید سیدروفور به روش CAS-Agar (روش کیفی)	۱۶
آزمون تولید سیدروفور به روش اسپکتروفوتومتری (روش کمی)	۱۸
آزمون کراس استریک جهت ارزیابی آنتاگونیستی سویه های منتخب باکتریایی	۱۹
شناسایی مولکولی سویه های باکتریایی	۲۰
تهیه فرمول اولیه سویه های باکتریایی جهت پیاده سازی آزمون های گلخانه /مزرعه	۲۲
منابع	۲۳

مقدمه

یکی از مشکلات مربوط به کشاورزی امروزی مربوط به بیمارگرهای گیاهی است که بین ۳۰ تا ۴۰ درصد زیان‌های محصول را به همراه دارند. آفت‌کش‌های شیمیایی، مشکلات بهداشتی انسانی و محیط زیستی و همچنین مقاومت میکروبی را برای این تیمارها به ارمغان آورده‌اند. توسعه سیستم‌های بیوکنترلی راهکاری مؤثر جهت کاهش آلودگی محیط زیست و خطر ایجاد مقاومت ناشی از قارچ‌کش‌های شیمیایی است. بر پایه پژوهش‌ها و گزارش‌های گوناگون علمی، بکارگیری گونه‌های *Streptomyces* و یا کشت صاف شده آنها برای کنترل بیماری‌های قارچی گیاهان مؤثر است. کارایی برخی از گونه‌های این جنس در حفاظت از گیاهان و همچنین حضور مستمر آنها در ناحیه شدیداً رقابتی ریزوسفر به دلیل پتانسیل بالای آن در تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه زیست فعال محلول و ترکیبات آلی فرار است. در این زمینه گزارش‌های فراوانی از کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی خاک‌زاد از جمله *Pythium*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium spp.*, *altimum* Rejon-Martinez et al., 2022; Olanrewaju and (Babalola, 2019; Vurukonda et al., 2018). در حال حاضر در سطح بین‌المللی، دو محصول بیوکنترل تجاری از این باکتری‌ها موجود است که مواد فعال موجود در آنها سویه‌های زنده/استرپتومایسس هستند. این دو محصول با نام‌های مایکواستاپ (Mycostop®) محتوی باکتری *Streptomyces griseoviridis* و اکتینوویت (Actinovate®) محتوی باکتری *Streptomyces lydicus* WYEC هستند (Newitt et al., 2019). زمانی که محصولی در بازار نمود پیدا می‌کند این نمود برآمده از "نیازی" است که از سوی "بهره-برداران" احساس شده است و می‌تواند تضمینی باشد برای ورود سایر فعالان تا از نظر توجیه اقتصادی مشکل عمده‌ای احساس نکنند.

گونه‌های مختلف باکتری *Streptomyces* می‌توانند سطوح ریشه‌های گیاهان مختلف را کلنیزه کنند، در انواع مختلف خاک زنده بمانند و همچنین اسپورهایی تولید کنند که به واسطه آنها بتوانند طول دوره زنده‌مانی خود را در طبیعت افزایش داده و در شرایط سخت محیطی مدت‌ها زنده باقی بمانند. سویه‌های گوناگون *Streptomyces* دارای توان تولید طیف وسیعی از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، انواع آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی بیمارگرها و ترکیبات آلی فرار هستند. نظر به این ویژگی، استرپتومایسس‌ها می‌توانند از میزبان‌های گیاهی مختلفی در برابر بیمارگرها در خاک، ریزوسفر و اندوسفر محافظت کنند (Abbasi et al., 2021; Rostami Mehruieyeh et al., 2021; Pacios-Michelena et al., 2021; Newitt et al., 2019; Sadeghi et al., 2012, 2017; Karimi et al., 2012).

بررسی‌ها نشان داده بخش مهمی از فعالیت بیوکنترلی باکتری‌های آنتاگونیست به توان تولیدی آنزیم‌های تجزیه کننده از سوی آنها مانند هیدرولازها برمی‌گردد که به واسطه آنها می‌توانند دیواره بیمارگرهای قارچی را مورد تخریب قرار دهند (Sadeghi et al., 2017; Shafi et al., 2017). در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است تولید آنزیم کیتیناز توسط باکتری‌هایی چون *Streptomyces* از مهمترین سازوکارها در فعالیت

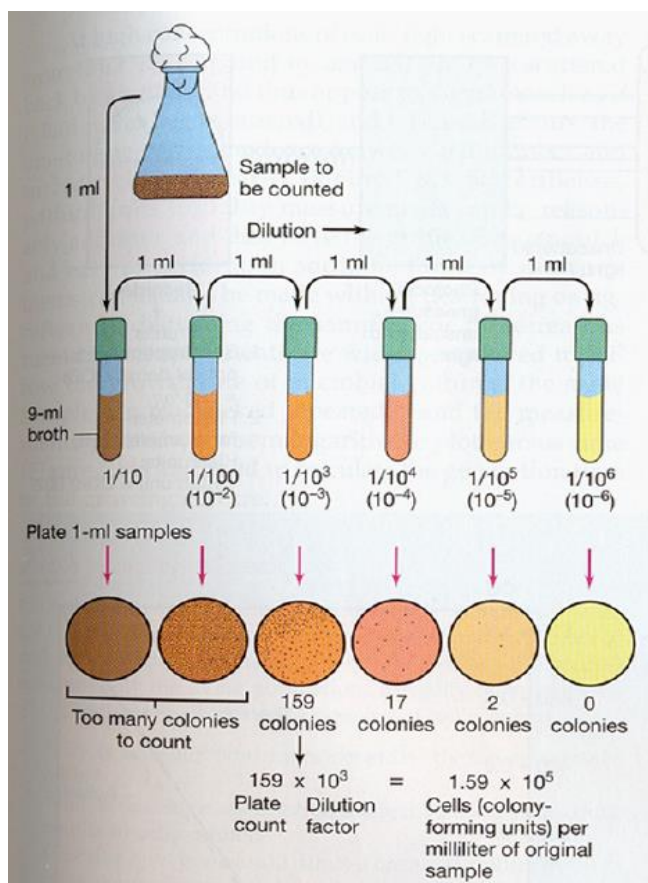
آنتاگونیستی آنها در برابر قارچ‌های بیمارگر از جمله گونه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* و *Sclerotinia minor* به شمار می‌رود. البته تولید کیتیناز تنها سازوکار آنتاگونیستی نبوده و آنزیم‌های دیگری چون اندگلوکوناز، سلولاز و پروتئاز نیز به عنوان ابزار بیوکنترلی مهم در برابر بسیاری از قارچ‌های بیمارگر گزارش شده است. تولید آنزیم ۱، ۳-اندوگلوکاناز از سوی برخی گونه‌های *Streptomyces* گزارش شده است که نقش مهمی در تجزیه دیواره سلولی بیمارگرهای قارچی دارد (Galeano Vanegas et al., 2020; El-Tarabily et al., 2000).

بررسی‌ها در زمینه ترکیبات فرار *Streptomyces* نشان می‌دهد این مواد می‌توانند اثرات گسترده‌ای بر روی خود ارگانیسم‌های تولید کننده و همسایگان میکروبی خود داشته باشند. این ترکیبات می‌توانند پروفایل‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها را تغییر دهند، به عنوان ترکیبات ضد قارچی یا آنتی‌بیوتیکی عمل کنند، رفتارهای گروهی مانند تحرک و تشکیل بیوفیلم را افزایش دهند و تغییرات گسترده‌ای را در بیان ژن میکروب‌های مجاور ایجاد کنند (Jones et al., 2018). ترکیبات فرار می‌توانند به عنوان مولکول‌های پیام‌رسانی (سیگنالینگ) عمل کنند که بر بیان ژن، متابولیسم و رفتار گروهی ریزجانداران پاسخ دهنده تأثیر می‌گذارد (Jones and Elliot, 2017). مشخص شده است که تولید ترکیبات فرار در *Streptomyces* به آنها اجازه می‌دهد تا شرایط محیطی مانند pH تعدیل شود. این ترکیبات می‌توانند به عنوان مولکول‌های سیگنال دهنده عمل نموده و بر روی بیان ژن و رفتار گروهی در جوامع میکروبی تأثیر بگذارند. اکثر مطالعات نقش‌های اکولوژیکی مواد و ترکیبات فرار را در ارتباط و رقابت بین گونه‌های غیر مرتبط بررسی کرده‌اند (Pacios-Michelena et al., 2021).

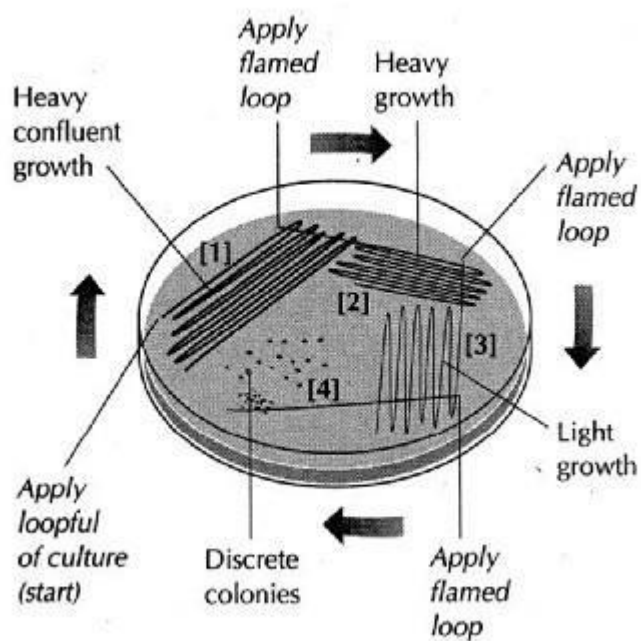
سیدروفورها ترکیبات کلاته‌کننده‌ای به شمار می‌روند که میل ترکیبی بالایی به آهن دارند. این ترکیبات مربوط به سازوکارهایی هستند که می‌توانند در کنترل بیولوژیکی برای سرکوب بیمارگرهای گیاهی استفاده شوند. سیدروفورهای تولید شده توسط ریزجانداران در ریزوسفر می‌توانند دسترسی و جذب آهن را افزایش دهند. محروم کردن یک عامل بیمارگر از آهن، در نهایت منجر به مهار آن می‌شود. گذشته از این، سیدروفورها همچنین رشد گیاه را تقویت نموده، جمعیت ریزوباکترها را تقویت کرده و سایر ریزجانداران را از نیچ اکولوژیکی فراهم آمده توسط ریزوسفر حذف می‌کنند (Pacios-Michelena et al., 2021; Sadeghi et al., 2017). گزارش شده است که چندین اکتینوباکتری کلنیزه کننده ریشه می‌توانند سیدروفور تولید کنند (Palaniyandi et al., 2013). گزارش شده است گونه‌های تولید کننده سیدروفور *Streptomyces monomycini* و *S. rimosus*، توانسته به خوبی بیمارگر گیاهی مهمی چون *Phytophthora drechsleri* را به خوبی کنترل نماید (Sadeghi et al., 2017). نشان داده شده است که سیدروفور هیدروکسامات تولید شده از سوی *S. acidiscabies* E13 باعث ارتقای رشد لوبیا چشم بلبلی می‌شود. سیدروفورهای هیدروکسامات ترشح شده از سوی *S. tendae* F4 به طور قابل توجهی باعث رشد و بهبود جذب کادمیوم در آفتابگردان شده است (Dimkpa et al., 2008).

جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های باکتریایی اکتینومیسیتی از خاک

برای جداسازی باکتری‌های اکتینومیسیتی از خاک، سه محیط کشت مورد استفاده و بهره‌برداری قرار می‌گیرد. محیط کشت نخست Starch Casein Agar (SCA) شامل نشاسته محلول ۱۰ گرم، کازئین ۰/۳ گرم، نیتрат پتاسیم ۲ گرم، کلرید سدیم ۲ گرم، K_2HPO_4 ۲ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵ گرم، کربنات کلسیم ۰/۲ گرم، $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۱ گرم، آگار ۱۵ گرم در لیتر و $pH=7.2$ است. محیط کشت دوم Actinomycetes Isolation Agar (AIA) شامل Heart infusion broth ۲۵ گرم، کازئین هیدرولیزه ۴ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم، دکستروز ۵ گرم، Cysteine HCl ۱ گرم، نشاسته محلول ۱ گرم، فسفات پتاسیم ۱۵ گرم، فسفات آمونیم ۱ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، کلرید کلسیم ۰/۲ گرم، آگار ۲۰ گرم در لیتر و $pH=7.2$ است. هر دو محیط پس از اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، اجازه می‌دهیم تا به ۵۰ درجه سلسیوس رسیده و در این دما با افزودن ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از Amphotericin B به محیط کشت از رشد قارچ جلوگیری می‌کنیم (Muleta and Assefa, 2018). محیط کشت سوم نیز Water Agar (WA) شامل ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر با $pH=7.2$ است. توضیح بیشتر اینکه در این محیط، اکتینومیسیت‌ها به صورت لکه‌های گچی ریز مشاهده می‌شوند که بایستی با دقت از این محیط کشت ساده به محیط کشت غنی‌تر مانند Glucose Yeast extract Malt extract (GYM) شامل گلوکز ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۴ گرم، عصاره مالت ۴ گرم و آگار ۱۵ گرم در لیتر با $pH=7.2$ واکشت داد (Sadeghi et al., 2017). در ادامه تا با استفاده از روش سری رقت (Serial dilution)، از خاک‌های نمونه‌برداری شده ناحیه ریزوسفری و یا خاک بالک، سری‌های رقت تهیه می‌شود (شکل ۱). برای این کار به میزان ۱ گرم خاک در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک سترون (۹ گرم در لیتر کلرید سدیم) ریخته و نیم ساعت در ۱۵۰ rpm شیک نموده و سپس تا ۶ سری لوله آزمایش جدید محتوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک سترون را با ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک سری نخست تلقیح می‌کنیم (پیش از هر تلقیح بایستی هر لوله آزمایش به خوبی تکان داده شود). در پایان نیز از سری‌های 10^3 ، 10^5 و 10^7 به میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون بر روی یکی از سه محیط کشت اشاره شده در بالا (بسته به امکانات) منتقل نموده و با پیپت پاستور پارو می‌زنیم (Blaize et al., 2023; Muleta and Assefa, 2018). پس ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، کلنی‌های به دست آمده به محیط جامد جدید واکشت داده می‌شود. کشت‌های به دست آمده را برای خالص‌سازی نیاز است تا با کشت چهار منطقه‌ای خالص نمود (شکل ۲) (Andersson and Lood, 2023). از این کلنی‌ها کشت‌های مایعی در محیط مایع GYM با $pH=7.2$ تهیه نموده و جهت نگهداری بلند مدت با گلیسرول ۶۰ درصد اتوکلاو شده (غلظت نهایی ۱۵ درصد) ترکیب نمود. برای افزایش ماندگاری سویه‌ها می‌توان همراه با گلیسرول به سویه‌ها Skim milk اتوکلاو شده (۱۱۰ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه) با غلظت ۱۰ درصد افزود. ویال‌های تهیه شده را جهت پیش‌فریز شدن در ازت مایع انداخته و سپس در فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری می‌کنیم (شکل ۳) (Jain et al., 2020; Cody et al., 2008).



شکل ۱. تهیه سری رقت جهت جداسازی سویه‌های باکتریایی از نمونه‌های خاک ریزوسفری و یا بالک



شکل ۲. کشت مخطط (streak plating) جهت خالص‌سازی سویه‌های باکتریایی

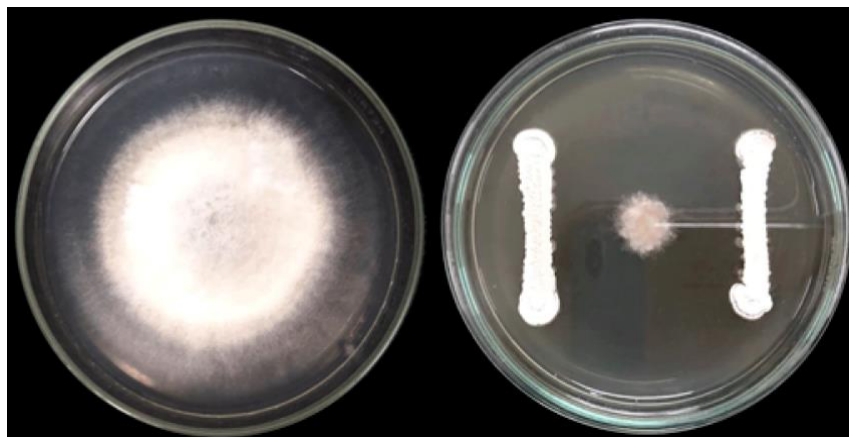


شکل ۳. نگهداری سویه‌های باکتریایی در فریز -۸۰ درجه سلسیوس زیر گلیسرول (غلظت نهایی ۱۵ درصد)

آزمون کشت متقابل

برای این منظور ابتدا کشت خطی سویه‌های باکتریایی، در دو سوی پلیت حاوی محیط کشت جامد Potato Dextrose Agar (PDA) انجام می‌دهیم (شکل ۴) و سپس در ادامه یک بلوک پنج میلی‌متری از کشت تازه قارچ بیمارگر در وسط پلیت یاد شده تلقیح می‌شود. کشت‌های فوق به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و در پایان نیز میزان بازدارندگی سویه‌ها از رشد پرگنه قارچ بیمارگر، بر پایه فرمول زیر محاسبه می‌گردد (Colombo et al., 2019). در صورتی که قارچ بیمارگر، سرعت رشد بالایی داشته باشد؛ بهتر است سویه‌های باکتریایی دو تا سه روز زودتر کشت داده شده و در روز چهارم نسبت به کشت قارچ بیمارگر اقدام شود تا در این فاصله مواد مترشحه باکتری وارد محیط کشت شده تا بدین وسیله از واکنش منفی کاذب جلوگیری شود.

$$\text{میزان رشد پرگنه بیمارگر در تیمار - میزان رشد پرگنه بیمارگر در پتری دیش شاهد} \times 100 = \text{درصد بازدارندگی}$$

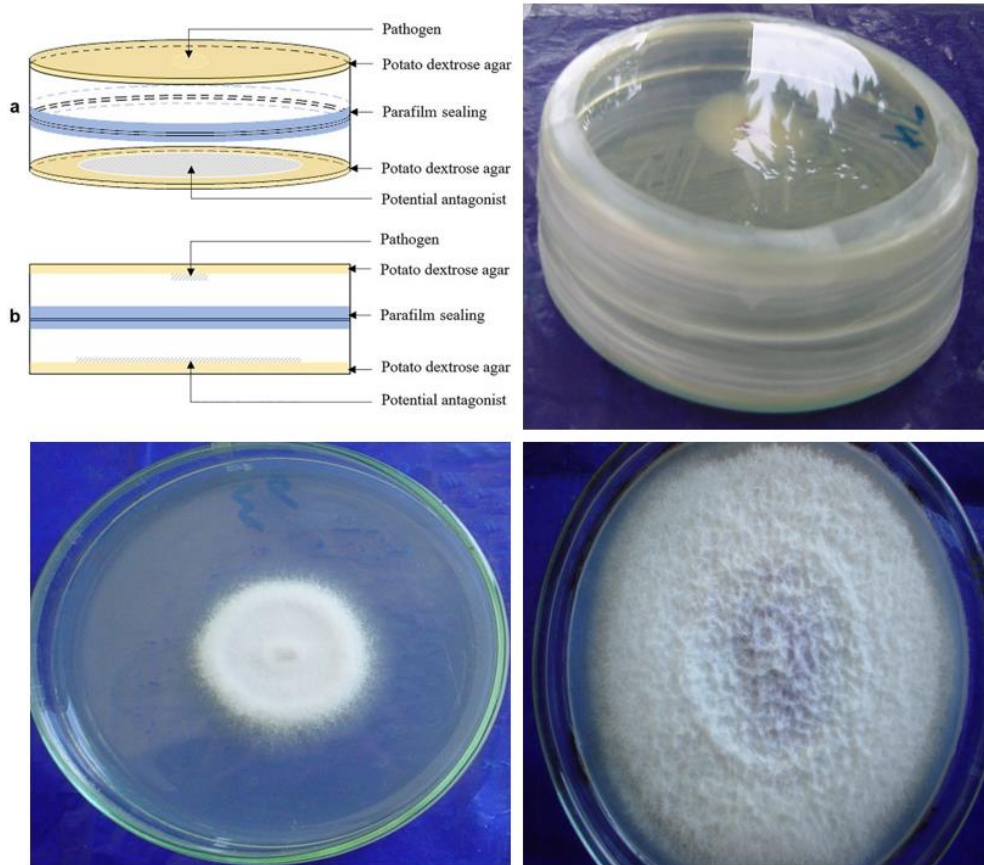


شکل ۴. ارزیابی برهمکنش باکتری و قارچ بیمارگر در کشت متقابل (راست: تیمار و چپ: شاهد)

آزمون تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

برای این منظور ابتدا سوسپانسیونی با غلظت 10^4 cfu/ml باکتری از کشت تازه سویه‌های باکتریایی در سرم فیزیولوژیک سترون تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت GYM محتوی ۱۵ گرم آگار و pH=7.2 و یا محیط کشت جامد (NA) Nutrient Agar حاوی دو درصد گلوکز افزوده و با پیت پاستور پخش می‌نماییم. سپس یک بلوک ۵ میلی‌متری از کشت تازه قارچ بیمارگر در وسط پلیت دوم حاوی محیط کشت PDA تلقیح می‌کنیم. در شرایط سترون، درب پلیت‌های کشت باکتری و قارچ بیمارگر برداشته و دو پتری‌دیش را بر روی یکدیگر قرار داده و با استفاده از نوار پارافیلیم یا سلفون، فاصله میان پلیت‌ها مسدود می‌شود (شکل ۵). در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده می‌کنیم. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند. درصد بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر نیز بر پایه فرمول زیر محاسبه می‌کنیم (Darlis et al., 2023; Jalaluldeen et al., 2014; Fiddaman and Rossall, 1993).

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{میزان رشد پرگنه بیمارگر در تیمار} - \text{میزان رشد پرگنه بیمارگر در پتری‌دیش شاهد}}{\text{میزان رشد پرگنه بیمارگر در پتری‌دیش شاهد}} \times 100$$



شکل ۵. ارزیابی تولید ترکیبات فرار ضد قارچی توسط سویه باکتریایی (بالا: نحوه چیدمان پلیت‌ها در آزمون به صورت شماتیک و واقعی، پایین راست: تیمار شاهد، پایین چپ: تیمار متأثر از مواد فرار آنتاگونیست)

آزمون تولید ترکیبات مایع ضد قارچی

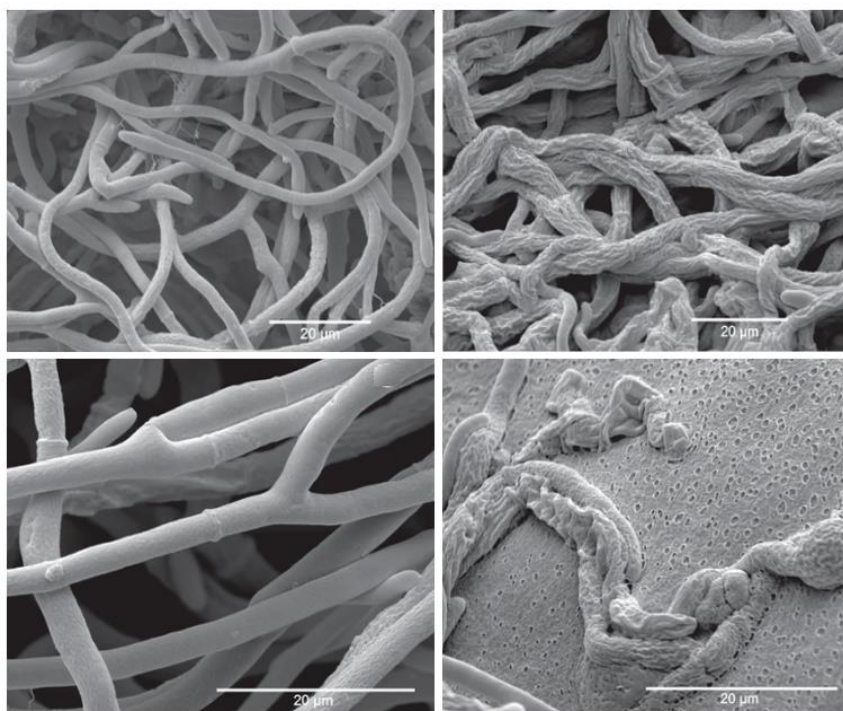
برای این کار ابتدا کشت مایع ۵ روزه از سویه اکتینومیستی در محیط کشت مناسب این دسته از باکتری‌ها یعنی محیط کشت مایع GYM با $\text{pH}=7.2$ در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تهیه می‌کنیم. سپس محیط‌های با سانتریفوژ در $4000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه و متعاقب آن با سانتریفوژ در $8000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه، نسبت به حذف زیست‌توده اکتینومیستی اقدام می‌نماییم. عصاره‌های به دست آمده، به وسیله پمپ خلاء از صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرونی و یا فیلترهای سر سرنگی (میکروپور) جهت سترون‌سازی عبور داده می‌شوند. محیط کشت اتوکلاو شده PDA با حجم‌های ۱۵، ۱۷ و ۱۹ میلی‌لیتری نیز در ارلن تهیه نموده و به ترتیب ۵، ۳ و ۱ میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده هر یک از باکتری‌ها در دمای پیش از جامد شدن PDA ریخته شده و سپس آنها را به پلیت می‌کنیم. بدین ترتیب غلظت‌های ۰.۲۵٪، ۱۵٪ و ۵٪ حجمی/حجمی از ترکیبات مایع سویه‌های باکتریایی فراهم می‌شود. برای تیمار شاهد، محیط کشت مایع GYM بدون باکتری جهت رعایت نسبت‌های یاد شده استفاده می‌شود. پس از آن در وسط هر پتری‌دیش یک بلوک ۵ میلی‌متری از کشت تازه بیمارگر قارچی تلقیح نموده و میزان بازداري از رشد پرگنه بیمارگر پس از ۷ روز یادداشت می‌گردد (Muleta and Assefa, 2018; Berg et al., 1994).

بررسی میکروسکوپی وضعیت میسلیموم بیمارگر در برهمکنش با سویه آنتاگونیست

علاوه بر سنجش ماکروسکوپی سویه‌های آنتاگونیست، نیاز است تا اثرات آنها روی قارچ بیمارگر در مقیاس میکروسکوپی نیز بررسی شود. برای این کار از حاشیه پرگنه متأثر از آزمون آنتاگونیستی، نمونه‌های میکروسکوپی تهیه نموده و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی‌های $40\times$ و $100\times$ مورد مشاهده قرار می‌دهیم. در این بررسی، وضعیت میسلیموم نسبت به شاهد مورد مقایسه قرار می‌گیرد. به طور معمول واکنش‌هایی چون تولید واکوئل‌های متعدد، بزرگ‌تر شدن واکوئل‌ها، ضخیم شدن دیواره سلولی بیمارگر، ایجاد ناحیه‌هایی با هاله‌های روشن در هیف، پاره شدن انتهای هیف و ریختن مایع درون سلولی به بیرون از آن و همچنین بدشکلی‌های متعدد در ساختار هیف از نشانه‌های آثار تخریبی سویه‌های باکتریایی بر روی قارچ بیمارگر است (شکل ۶ و ۷) (Baptista et al., 2022; Sellem et al., 2017).



شکل ۶. ارزیابی وضعیت میسلیموم بیمارگر در برهمکنش با سویه باکتریایی آنتاگونیست با میکروسکوپ نوری



شکل ۷. ارزیابی وضعیت میسلیم بیمارگر در برهمکنش با سویه باکتریایی آنتاگونیست با میکروسکوپ الکترونی (چپ: شاهد و راست: متاثر از سویه آنتاگونیست)

آزمون تولید سیانید هیدروژن (روش نخست)

برای اندازه‌گیری سیانید هیدروژن ابتدا سویه‌های باکتریایی در پلیت‌های حاوی محیط کشت Tryptic Soy Agar (TSA) غنی شده با گلیسین (۴/۴ گرم در لیتر) کشت داده می‌شوند. سپس کاغذ صافی‌های خیس‌انده شده در پیکرات سدیم (پیکریک اسید ۵٪ و کربنات سدیم ۲٪) در بخش داخلی درب پلیت گذاشته می‌شود. پلیت‌ها به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری کرده و توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی، برابر با جدول زیر ارزیابی می‌گردد (شکل ۸ و جدول ۱) (Reetha et al., 2014; Jalaluldeen et al., 2014; Lorck, 1948).

آزمون تولید سیانید هیدروژن (روش دوم)

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن، ابتدا سوسپانسیون هر یک از باکتری‌ها از کشت تازه به طور جداگانه در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر سویه باکتریایی روی محیط کشت Nutrient Agar (NA) پخش می‌شود. قطعاتی از کاغذ صافی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر در محلول معرف سیانید هیدروژن شامل ۵ میلی‌لیتر اتیل استواستات مس، ۵ میلی‌گرم ۴ و ۴ (متیلن بیس) - (N - N) - دی متیل آنیلین)) و ۲ میلی‌لیتر کلروفرم، غوطه‌ور می‌گردد. سپس قطعات کاغذ صافی آغشته به معرف مذکور درون درب پتری‌دیش حاوی کشت باکتری آنتاگونیست قرار گرفته و به صورت وارونه در ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شده و تغییر رنگ کاغذ صافی به رنگ آبی پس از ۱۸-۳ ساعت را نشانه تولید سیانید هیدروژن تفسیر می‌نماییم.

طبیعتاً برای بازداري از خروج سیانید هیدروژن بهتر است پارافيلم یا سلفون پیرامون پلیت‌ها بیشتر از حالت معمول پیچیده شود (Castric and Castric, 1983).

جدول ۱. شاخص رنگی میزان تولید سیانید هیدروژن در سوبه‌های باکتریایی مورد آزمایش

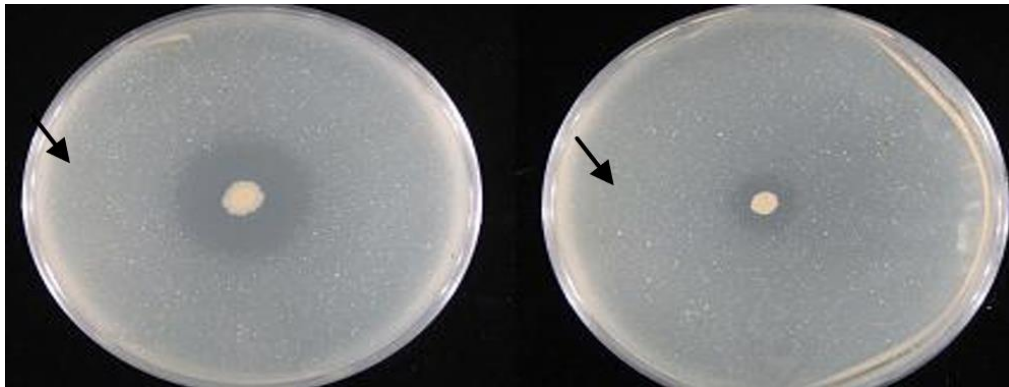
درجه بندی سطوح سیانوزنی	رنگ کاغذ معرف	توان تولید HCN
۱	زرد	عدم تولید
۲	کرم	حداقل
۳	نارنجی	نسبتاً کم
۴	قهوه ای روشن	نسبتاً زیاد
۵	آجری	حداکثر



شکل ۸. ارزیابی تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری (راست: واکنش مثبت و چپ: واکنش منفی)

آزمون تولید کیتیناز

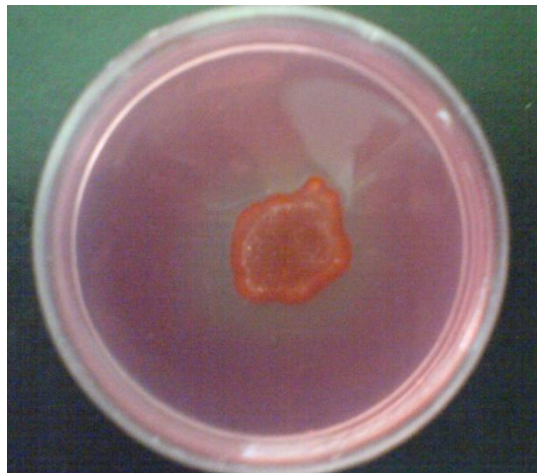
پیش از این آزمون نیاز است تا ابتدا کیتین کلوئیدی تهیه گردد. بدین منظور چهل گرم کیتین در ۴۰۰ میلی لیتر HCl غلیظ ترکیب نموده و به مدت ۲ ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ rpm تیمار می‌شود. سپس با افزودن آهسته ۲ لیتر آب مقطر سرد، کیتین را به صورت سوسپانسیون کلوئیدی رسوب می‌دهیم. سوسپانسیون به دست آمده، با فیلتراسیون همراه با مکش روی کاغذ صافی جمع‌آوری و با تعلیق آن در ۵ لیتر آب شیر شسته می‌شود. این شستشو تا زمانی که PH سوسپانسیون به ۳/۵ برسد بایستی تکرار شود. در پایان نزدیک به ۸۵ درصد از کیتین به صورت کلوئید بازیافت خواهد شد. برای انجام آزمون کیتیناز نیز بلوک یک سانتی‌متری از کشت باکتریایی به پلیت حاوی ۱/۵ درصد آگار همراه با ۰/۴ درصد کیتین کلوئیدی با ۷/۲ pH منتقل و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز نگهداری می‌شود. در طی این زمان، تولید هاله روشن پیرامون کشت باکتریایی به عنوان فعالیت کیتینازی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (شکل ۹) (Gonfa et al., 2023; Kuddus and Ahmad, 2013; Hsu and Lockwood, 1975).



شکل ۹. ارزیابی فعالیت کیتینازی سویه‌های باکتریایی (راست: فعالیت ضعیف و چپ: فعالیت قوی)

آزمون تولید سلولاز

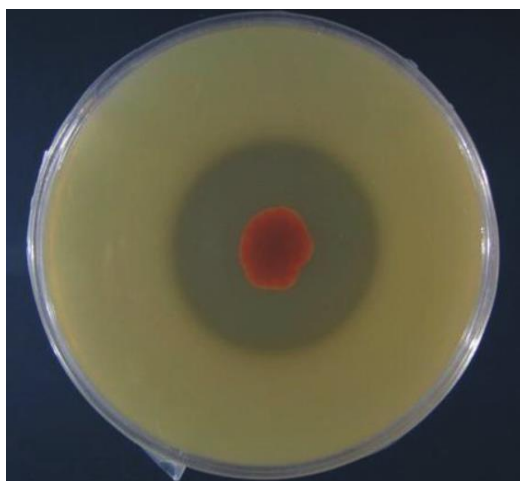
برای بررسی تولید این آنزیم ابتدا محیط کشت شامل ۲/۵ گرم Carboxymethyl cellulose، ۰/۴ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۰۲ گرم CaCl_2 ، ۰/۰۲ گرم NaCl ، ۰/۰۲ گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تهیه و تحت دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو می‌شود. پتری دیش‌های حاوی این محیط به صورت لکه‌ای توسط استرین‌های باکتریایی تلقیح و به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند. پس از این مدت، پتری دیش‌ها را با استفاده از معرف کنگو قرمز (۱ میلی گرم در ۱ میلی لیتر آب مقطر) به مدت یک دقیقه آغشته نموده و سپس با کلرید سدیم یک مولار، کنگو قرمز را شسته و تولید هاله روشن پیرامون کلنی باکتری‌های مد نظر بررسی می‌شود (شکل ۱۰) (Sadeghi et al., 2017; Majidi et al., 2011).



شکل ۱۰. ارزیابی فعالیت سلولازی سویه‌های باکتریایی

آزمون تولید پروتئاز

برای ارزیابی تولید این آنزیم توسط سویه‌های باکتریایی، ابتدا محیط کشت جامد Skim Milk Agar (SMA) شامل ۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خونی و ۱۳/۵ گرم آگار تهیه و تحت دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود. پتری دیش‌های حاوی محیط SMA به صورت لکه‌ای با کشت تازه‌ای از سویه‌های باکتریایی تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف پرگنه باکتری مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (شکل ۱۱) (Prajapati et al., 2022; Jalaluldeen et al., 2014; Maurhofer et al., 1994).



شکل ۱۱. ارزیابی فعالیت پروتئازی سویه‌های باکتریایی

آزمون تولید سیدروفور به روش CAS-Agar (روش کیفی)

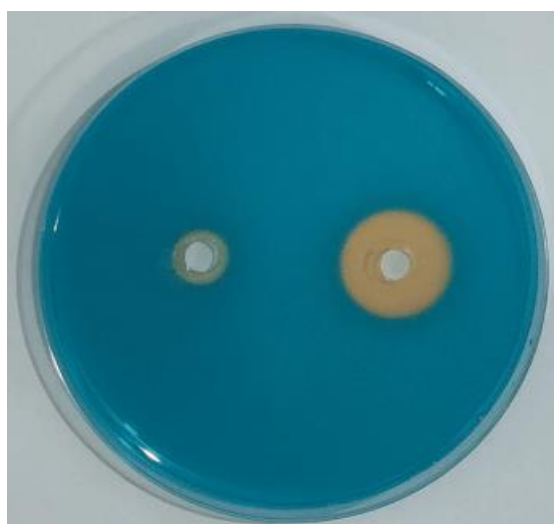
به منظور بررسی توان تولید سیدروفور توسط سویه‌ها، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط Tryptic Soy Broth (TSB) کشت داده می‌شوند. در این روش برای تشخیص نیمه کمی توان تولید سیدروفور، ۱۵ میکرولیتر سوسپانسیون تازه باکتری با روش لکه‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط جامد CAS کشت می‌دهیم (Hussein et al., 2024; Sadeghi et al., 2012; Alexander and Zubber, 1991; Manninen and Mattila-Sandholm, 1994). برای تهیه این محیط چهار محلول به شرح زیر به صورت جداگانه تهیه، استریل و در ادامه با هم ترکیب می‌شوند. پس از آماده شدن چهار محلول زیر، محلول بافر و محلول کازامینواسید را با یکدیگر ترکیب نموده و سپس محلول غذایی به آن افزوده می‌شود. سپس همراه با به هم زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول معرف Fe-CAS به آنها افزوده و در پلیت‌ها توزیع می‌شود. پلیت‌ها را با سویه‌های باکتریایی تلقیح کرده، در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری نموده و توانایی تولید سیدروفور با تغییر رنگ محیط کشت از آبی به نارنجی، در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی می‌شود (شکل ۱۲).

محلول معرف *Fe-CAS*: این محلول از ترکیب ۱۰ میلی لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ یک میلی مولار (در محلول ۱۰ میلی مولار اسید کلریدریک) با ۵۰ میلی لیتر محلول حاوی ۶۰/۵ میلی گرم CAS (۱/۲۱ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه می‌شود. این مخلوط ارغوانی تیره به آرامی و همراه با تکان دادن پیوسته به ۴۰ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۷۲/۸ میلی گرم HDTMA (۱/۸۲ میلی گرم در یک میلی لیتر) اضافه می‌شود. محلول آبی تیره حاصل، اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد می‌شود.

محلول بافر: برای تهیه محلول بافر، ۳۰/۲۴ گرم PIPES در ۷۵۰ میلی لیتر محلول نمکی حل می‌شود. محلول نمکی حاوی ۰/۳ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۵ گرم NaCl و ۱ گرم NH_4Cl است. pH این محلول با استفاده از محلول ۵۰ درصد KOH در ۶/۸ تنظیم شده و سپس حجم نهایی آن به ۸۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود. مخلوط حاصل پس از افزودن ۱۵ گرم آگار اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد می‌شود.

محلول غذایی: این محلول حاوی ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۱ میلی گرم CaCl_2 ، ۱/۱۷ میلی گرم $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۴ میلی گرم H_3BO_3 ، ۰/۰۴ میلی گرم $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۲ میلی گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و ۱ میلی گرم $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر است. این محلول پس از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سلسیوس سرد می‌شود.

محلول کازآمینواسید: برای تهیه این محلول، ۳ گرم کازآمینواسید در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل می‌شود و سپس با گذاردن آن از کاغذ صافی غشائی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون، استریل می‌شود.



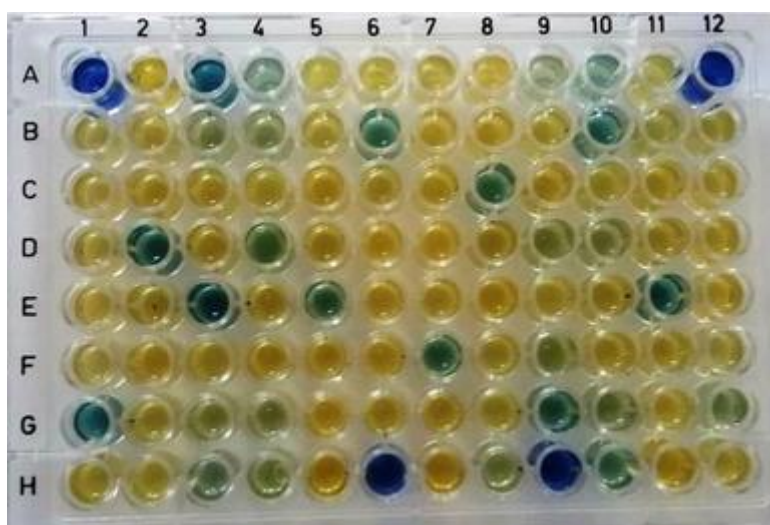
شکل ۱۲. ارزیابی کیفی توان تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی به روش CAS-Agar

آزمون ارزیابی تولید سیدروفور به روش اسپکتروفتومتری (روش کمی)

تجربه نشان داده برخی سویه‌های مثبت در روش CAS-Agar واکنش‌های منفی کاذب می‌دهند. در برخی منابع اشاره شده است که به دلیل وجود ماده HDTMA در روش پلیت، از رشد برخی سویه‌های میکروبی بازداری می‌شود. بنابراین روش دوم در این دستورالعمل مطرح می‌شود. در این زمینه ارزیابی کمی تولید سیدروفور می‌تواند با دو منظور انجام شود؛ یکی بحث کمی نمودن تولید سیدروفور در سویه‌هایی که در روش Cas-Agar غربال شده‌اند و دوم اینکه از همان اول با روش کمی نسبت به سنجش تولید سیدروفور اقدام نمود تا منفی‌های گزارش شده از اعتبار بالاتری برخوردار باشند و هم اینکه امکان ارزیابی میزان تولید در این روش فراهم بوده و بدینوسیله هزینه و زمان مدیریت می‌شود.

برای این کار نیاز به برداشت مایع رویی کشت‌های باکتریایی رشد یافته در محیط کشت LB Broth است (Arora and Verma, 2017). ابتدا یک میلی‌لیتر محیط کشت مایع را در ویال ۲ میلی‌لیتری ریخته، پس از سترون نمودن با اتوکلاو، ۱۰ میکرولیتر کشت باکتریایی تازه (10^8 cfu/ml) تلقیح می‌نماییم. پس از انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت، کشت‌های باکتریایی با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شوند. رسوی میکروبی به دست آمده را دور ریخته و از مایع رویی (سوپرناتانت) برای ارزیابی میزان سیدروفور استفاده می‌کنیم. در صورت سنجش با کووت، به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی هر کشت باکتریایی را با ۰/۵ میلی‌لیتر معرف CAS مخلوط نموده و پس از ۲۰ دقیقه چگالی نوری (OD) در طول موج ۶۳۰ نانومتر سنجش می‌شود. در صورت سنجش با میکروپلیت، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر کشت باکتریایی را با ۱۰۰ میکرولیتر معرف CAS مخلوط نموده و پس از ۲۰ دقیقه چگالی نوری (OD) در طول موج ۶۳۰ نانومتر گرفته می‌شود (شکل ۱۳). سیدروفور تولید شده توسط سویه‌ها بر حسب درصد واحد سیدروفور (psu) بر پایه فرمول زیر اندازه‌گیری می‌کنیم که در آن A_r میزان جذب مرجع (محلول CAS و محیط کشت تلقیح نشده) و A_s میزان جذب نمونه (محلول CAS و مایع رویی بدون سلول از نمونه) است.

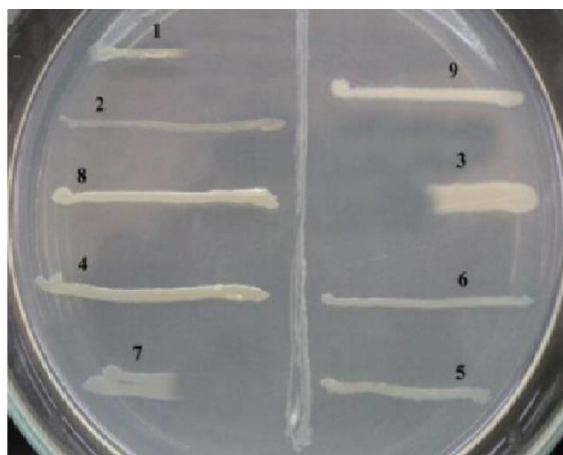
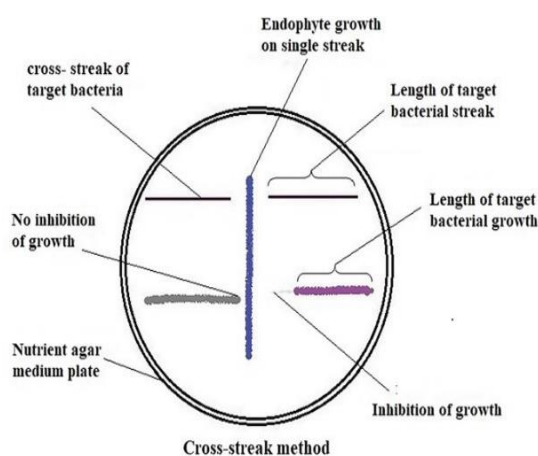
$$\text{Siderophore production (psu)} = \frac{(A_r - A_s) \times 100}{A_r}$$



شکل ۱۳. ارزیابی کمی توان تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی با روش اسپکتروفوتومتری. چاهک‌های آبی: واکنش منفی و چاهک‌های زرد و نارنجی: واکنش مثبت

آزمون کراس استریک جهت ارزیابی آنتاگونیستی سویه‌های منتخب باکتریایی

روش کشت کراس استریک (Cross streak) یکی از تکنیک‌های مهم در میکروبیولوژی است که به منظور بررسی تعاملات آنتی‌میکروبی و شناسایی اثرات آنتاگونیستی بین ریزجانداران به کار می‌رود. دلیل استفاده از این روش در مباحث بیوکنترل این است که نیاز داریم آنتاگونیستی احتمالی سویه‌های منتخب جهت استفاده در آزمون‌های گلخانه و یا مزرعه بررسی شود تا در تیمارهای ترکیبی، سویه‌های منتخب دارای آنتاگونیستی با یکدیگر حضور هم‌زمان نداشته باشند. در این روش، ابتدا یک کشتی از سویه باکتریایی مورد آزمایش به صورت خطی در مرکز پلیت محتوی محیط کشت جامد GYM کشیده می‌شود. پس از انکوباسیون اولیه به مدت ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس که اجازه می‌دهد سویه باکتریایی رشد کرده و مواد متابولیکی خود را تولید نماید، میکروب دوم به صورت متقاطع و ۹۰ درجه از روی خط اول کشت داده می‌شود. سپس پلیت‌ها دوباره به مدت ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه می‌شود. نتایج این آزمون به صورت وجود یا عدم وجود ناحیه‌ای از مهار رشد میکروب دوم در اطراف خط اول نشان داده می‌شود. اگر میکروب اول ترکیبات ضد میکروبی تولید کند، این ترکیبات در محیط GYM پخش شده و رشد میکروب دوم را مهار می‌کنند که به صورت ناحیه‌ای روشن‌تر یا عدم رشد در اطراف خط اول قابل مشاهده است (شکل ۱۴). نیاز به یادآوری است که این روش به صورت شعاعی نیز امکان‌پذیر است که در آن کشت سویه نخست به صورت لکه‌ای در وسط پلیت انجام شده و کشت‌های دوم مربوط به سایر سویه‌ها به صورت شعاعی در پیرامون کشت نخست خواهد بود (Yadav and Tiwari, 2023; Malek et al., 2015).

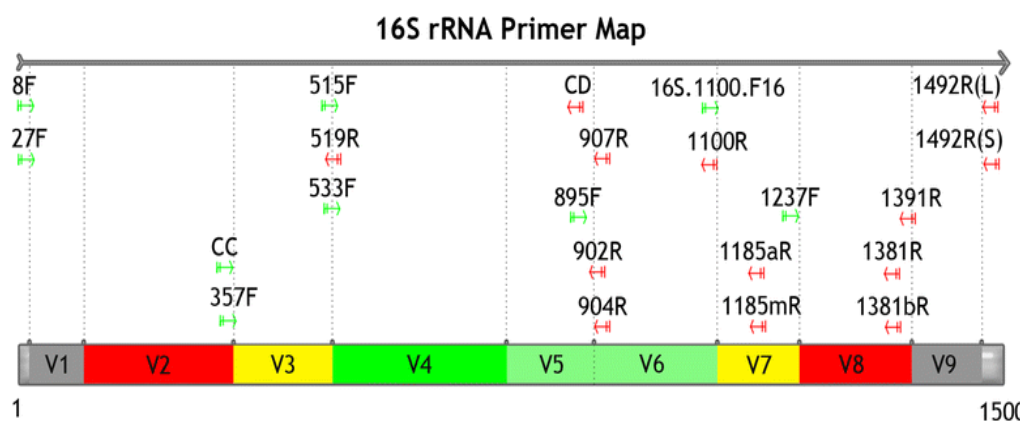


شکل ۱۴. بررسی آنتاگونیستی سویه‌های بیوکنترلی با کراس استریک (چپ: تصویر شماتیک و راست: تصویر واقعی)

شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی

برای شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی از روش PCR و توالی‌یابی ناحیه 16S rRNA استفاده می‌شود (شکل ۱۵) (Hussein et al., 2024; Abellan-Schneyder et al., 2021; Sadeghi et al., 2017). پس از تکثیر و توالی‌یابی قطعات مد نظر، شناسایی گونه‌ها با استفاده از نرم افزارهای MEGA11 و BLAST انجام می‌شود. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی نیز شامل جفت پرایمر عمومی 27f و 1492 به شرح زیر است. نمونه‌ای از اجزای واکنش و همچنین شرایط چرخه‌های PCR نیز در جداول ۲ و ۳ آورده شده است که البته بسته به شرایط کار نیاز است تا بهینه‌سازی شود (Dos Santos et al., 2019).

27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'



شکل ۱۵. نواحی متغیر ۹ گانه 16s rRNA و نقشه پرایمرهای آن با تاکید بر پرایمرهای عمومی 27F و 1492R

جدول ۲. اجزای واکنش PCR در شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی

ترکیب	حجم (میکرولیتتر)
PCR buffer 10x	۲/۵
MgCl ₂ (50 mM)	۱
dNTPs (2 mM)	۲/۵
Taq polymerase (5 U/ul)	۰/۲
27F primer	۱
1492 primer	۱
DNA template	۱
ddWater	۱۵/۸

جدول ۳. چرخه‌های واکنش PCR در شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی

دقیقه	دما (سلسیوس)	مرحله از واکنش زنجیره‌ای
۵ دقیقه	۹۶	Initial Denaturation
۴۰ ثانیه	۹۴	Denaturation
۳۰ ثانیه	۵۷	Annealing
۱ دقیقه	۷۲	Extension
۱۰ دقیقه	۷۲	Final Extension

تهیه فرمول اولیه سویه‌های باکتریایی جهت پیاده‌سازی آزمون‌های گلخانه/مزرعه

برای این کار ابتدا کشت مایعی از سویه‌های منتخب با توان بیوکنترلی در محیط مایع GYM (۵ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس) تهیه می‌کنیم. کشت‌های به دست آمده در ۵۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و زیست توده حاصل را نگه داشته و مایع رویی را دور می‌ریزیم. با استفاده از سرم فیزیولوژیک (کلرید سدیم ۰/۹ درصد) زیست توده را رسوسپان نموده و در ادامه با استفاده از روش سری رقت (serial dilution) که در بخش‌های پیشین به آن اشاره شد، نسبت به بررسی میزان cfu/ml هر سویه باکتریایی اقدام می‌کنیم. تنظیم حجم نهایی محلول میکروبی و تیمار و یا تلقیح آنها بایستی به گونه‌ای باشد که در نهایت، جمعیت باکتریایی به گیاه هدف با غلظت 10^6 cfu/ml و یا 10^6 cfu/g برسد. در تیمار بذر به صورت پوشش میکروبی (بذر مال نمودن یا سید کوتینگ) و یا در تیمار ریشه گیاهچه‌ها و نشاءها بهتر است از زیست‌پلی‌مرهایی چون کربوکسی متیل سلولوز (CMC) و یا صمغ عربی (gum arabic) مرغوب استفاده شود (حالت پودری صمغ عربی بهتر از حالت پولکی است). نسبت‌های متنوعی در مورد استفاده از این دو زیست‌پلی‌مر در منابع علمی دیده می‌شود. نویسندگان دستورالعمل حاضر به طور معمول همانند بیشتر پژوهشگران عرصه میکروبی از نسبت ۱ درصد بهره می‌برند. افزودن چند قطره تویین (tween) به فرمولاسیون می‌تواند در کارایی و بهتر عمل نمودن فرمولاسیون اولیه کمک کننده باشد. تویین، یک سورفکتانت غیر یونی و امولسی‌فایر است که کاربردهای متعددی در فرمولاسیون‌های باکتریایی دارد. این ماده قادر است کشش سطحی آب را کاهش دهد که این امر باعث افزایش قابلیت دسترسی باکتری‌ها به سطوح مختلف می‌شود. نکته پایانی اینکه در صورت نیاز به استفاده از فرمولاسیون اولیه جامد در مورد سویه‌های استرپتومایسس، بسترهای سترون شده‌ای چون ماسه بادی معمولی و یا ماسه بادی آسیاب شده همراه با نمک کلرید سدیم از بسترهای مناسب به شمار می‌روند؛ به ویژه زمانی که سویه‌های منتخب به شوری مقاوم باشند. در این حالت می‌توان از درصد بیشتر نمک در فرمول اولیه استفاده کرد تا انبارداری هم بالا برود و همچنین آلودگی تا زمان استفاده رخ ندهد (Zhang et al., 2022; Palupi et al., 2017; Karimi and Sadeghi, 2015; Biari et al., 2011; Dawar et al., 2008).

منابع

- Abbasi, S., Spor, A., Sadeghi, A. and Safaie, N., 2021. *Streptomyces* strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. Scientific reports, 11(1), p.9317.
- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M.S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M. and Neuhaus, K., 2021. Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. Msphere, 6(1), pp.10-1128.
- Alexander, D.B. and Zuberer, D.A., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of soils, 12, pp.39-45.
- Andersson, T. and Lood, R., 2023. Pure cultures and streak plating: isolation of single bacterial colonies from a mixed sample. Journal of Visualized Experiments (JoVE), p. e10509.
- Arora, N.K. and Verma, M., 2017. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. 3 Biotech, 7(6), p.381.
- Baptista, J.P., Teixeira, G.M., de Jesus, M.L.A., Bertê, R., Higashi, A., Mosela, M., da Silva, D.V., de Oliveira, J.P., Sanches, D.S., Brancher, J.D. and Balbi-Pena, M.I., 2022. Antifungal activity and genomic characterization of the biocontrol agent *Bacillus velezensis* CMRP 4489. Scientific Reports, 12(1), p.17401.
- Berg, G., Knaape, C., Ballin, G. and Seidel, D., 1994. Biological control of *Verticillium dahliae* Kleb. by natural occurring rhizosphere bacteria. Archives of Phytopathology & Plant Protection, 29(3), pp.249-262.
- Biari, A., Gholami, A. and Asadi Rahmani, H., 2011. Effect of different plant growth promotion bacteria (*Azotobacter*, *Azospirillum*) on growth parameters and yield of field maize. Water and Soil, 25(1).
- Castric, K.F. and Castric, P.A., 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 45(2), pp.701-702.
- Cody, W.L., Wilson, J.W., Hendrixson, D.R., McIver, K.S., Hagman, K.E., Ott, C.M., Nickerson, C.A. and Schurr, M.J. 2008. Skim milk enhances the preservation of thawed -80 C bacterial stocks. Journal of microbiological methods, 75(1), pp.135-138.
- Colombo, E.M., Pizzatti, C., Kunova, A., Gardana, C., Saracchi, M., Cortesi, P. and Pasquali, M., 2019. Evaluation of in-vitro methods to select effective streptomycetes against toxigenic fusaria. PeerJ, 7: e6905.
- Darlis, D., Jalloh, M.B., Chin, C.F.S., Basri, N.K.M., Besar, N.A., Ahmad, K. and Rakib, M.R.M., 2023. Exploring the potential of Bornean polypore fungi as biological control agents against pathogenic *Ganoderma boninense* causing basal stem rot in oil palm. Scientific Reports, 13(1), p.10316.
- Dawar, S., Hayat, S., Anis, M. and Zaki, M.J., 2008. Effect of seed coating material in the efficacy of microbial antagonists for the control of root rot fungi on okra and sunflower. Pak. J. Bot, 40(3), pp.1269-1278.

Dimkpa, C.O., Svatos, A., Dabrowska, P., Schmidt, A., Boland, W. and Kothe, E., 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere*, 74(1), pp.19-25.

Dos Santos, H.R.M., Argolo, C.S., Argôlo-Filho, R.C. and Loguercio, L.L., 2019. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. *BMC microbiology*, 19, pp.1-14.

El-Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Al-Hassani, H.A., Sivasithamparam, K., McKenna, F. and Hardy, G.S.J., 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant pathology*, 49(5), pp.573-583.

Fiddaman, P.J. and Rossall, S., 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(2), pp.119-126.

Galeano Vanegas, N.F., Marulanda Moreno, S.M., Padilla Hurtado, B.E., Mantilla Afanador, J.G., Ceballos Aguirre, N. and Restrepo Franco, G.M., 2020. Antagonism of plant growth promoting rhizobacteria against the causal agent of the vascular wilting of tomato. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(2), pp.35-43.

Gonfa, T.G., Negessa, A.K. and Bulto, A.O., 2023. Isolation, screening, and identification of chitinase-producing bacterial strains from riverbank soils at Ambo, Western Ethiopia. *Heliyon*, 9(11).

Hsu, S.C. and Lockwood, J., 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied microbiology*, 29(3), pp.422-426.

Hussein, S.N., Safaie, N., Shams-Bakhsh, M. and Al-Juboory, H.H., 2024. Harnessing rhizobacteria: Isolation, identification, and antifungal potential against soil pathogens. *Heliyon*, 10(15).

Jain, A., Jain, R., Jain, S. 2020. Preservation of Microorganisms: Stabs, Slants, Lyophilization and Cryopreservation. In: *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.

Jalaluldeen, A.M., Sijam, K., Othman, R. and Ahmad, Z.A.M., 2014. Isolation and characterization of actinomycetes with in-vitro antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* from rhizosphere of chilli. *Methodology*, 3, pp.45-51.

Jones, S., Pham, C., McKillip, J., Zambri, M., Carlson, E., and Elliot, M., 2018. *Streptomyces* volatile compounds influence exploration and microbial community dynamics by altering iron availability. *BioRxiv* 396606.

Jones, S.E., and Elliot, M.A., 2017. *Streptomyces* Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours. New York, NY: Elsevier.

Karimi, E. and Sadeghi, A., 2015. Study on optimum growth condition and designing formulation for increasing shelf life of *Streptomyces rimosus* strain C-2012 as biocontrol agent. *Journal of Microbial Biology*, 4(15), pp.109-122.

Karimi, E., Sadeghi, A., Abbaszadeh Dahaji, P., Dalvand, Y., Omidvari, M. and Kakuei Nezhad, M., 2012. Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. *Biocontrol Science and Technology*, 22(3), pp.333-349.

Kuddus, M. and Ahmad, I.Z., 2013. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1), pp.39-46.

Lorck, H., 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum* 1: 142-146.

Majidi, S., Roayaei, M., Ghezelbash, G., 2011. Carboxymethyl cellulase and filter paperase activity of new strains isolated from Persian Gulf. *Microbiology Journal*, 1(1), pp.8-16.

Malek, N.A., Zainuddin, Z., Chowdhury, A.J.K. and Abidin, Z.A.Z., 2015. Diversity and antimicrobial activity of mangrove soil actinomycetes isolated from Tanjung Lumpur, Kuantan. *Jurnal Teknologi*, 77(25).

Manninen, M. and Mattila-Sandholm, T., 1994. Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores. *Journal of Microbiological Methods*, 19(3), pp.223-234.

Manninen, M. and Mattila-Sandholm, T., 1994. Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores. *Journal of Microbiological Methods*, 19(3), pp.223-234.

Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas, and G. Defago. 1994. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced production. *Plant pathology*, 44:40-50.

Muleta, A. and Assefa, F., 2018. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from rhizosphere and agricultural soils. *African Journal of Biotechnology*, 17(22), pp.700-715.

Newitt, J.T., Prudence, S.M., Hutchings, M.I. and Worsley, S.F., 2019. Biocontrol of cereal crop diseases using streptomycetes. *Pathogens*, 8(2), p.78.

Newitt, J.T., Prudence, S.M., Hutchings, M.I. and Worsley, S.F., 2019. Biocontrol of cereal crop diseases using streptomycetes. *Pathogens*, 8(2), p.78.

Olanrewaju, O.S. and Babalola, O.O., 2019. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, pp.1179-1188.

Pacios-Michelena, S., Aguilar Gonzalez, C.N., Alvarez-Perez, O.B., Rodriguez-Herrera, R., Chavez-Gonzalez, M., Arredondo Valdes, R., Ascacio Valdes, J.A., Govea Salas, M. and Ilyina, A., 2021. Application of *Streptomyces* antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, p.696518.

Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Zhang, L. and Suh, J.W., 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, pp.9621-9636.

Palupi, T., Ilyas, S., Machmud, M. and Widajati, E., 2017. Effect of seed coating with biological agents on seed quality of rice. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 18(2), pp.727-732.

Prajapati, V., Patel, S., Ray, S. and Patel, K.C., 2022. Identification of protease enzymes involved in biocontrol activity. Practical Handbook on Agricultural Microbiology, pp.323-329.

Reetha, A.K., Pavani, S.L. and Mohan, S., 2014. Hydrogen cyanide production ability by bacterial antagonist and their antibiotics inhibition potential on *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci, 3(5), pp.172-178.

Rejon-Martinez, G.A., Rios-Muniz, D.E., Contreras-Leal, E.A. and Evangelista-Martinez, Z., 2022. Antagonist activity of *Streptomyces* sp. Y20 against fungi causing diseases in plants and fruits. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 25(2).

Rostami Mehrueiyeh, R., Shahidi Bonjar, G.H., Aghighi, S. and Sadeghi, A., 2021. Isolation and molecular identification of melon (*Cucumis melo*) rhizosphere inhabitant Actinomycetes with plant growth promoting activity under biotic stress caused by *Macrophomina phaseolina*. Agricultural Biotechnology Journal 13 (2), 21-44. Agricultural Biotechnology Journal, 13(2), pp.21-44.

Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P.A., Javid, M.G., Dalvand, Y. and Askari, H., 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, pp.1503-1509.

Sadeghi, A., Koobaz, P., Azimi, H., Karimi, E. and Akbari, A.R., 2017. Plant growth promotion and suppression of *Phytophthora drechsleri* damping-off in cucumber by cellulase-producing *Streptomyces*. BioControl, 62, pp.805-819.

Sellem, I., Triki, M.A., Elleuch, L., Cheffi, M., Chakchouk, A., Smaoui, S. and Mellouli, L., 2017. The use of newly isolated *Streptomyces* strain TN258 as potential biocontrol agent of potato tubers leak caused by *Pythium ultimum*. Journal of basic microbiology, 57(5), pp.393-401.

Shafi, J., Tian, H. and Ji, M., 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 31(3), pp.446-459.

Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D. and Stefani, E., 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. International journal of molecular sciences, 19(4), p.952.

Yadav, M.K. and Tiwari, S.K., 2023. Methods for determination of antimicrobial activity of bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, 92(6), pp.745-765.

Zhang, Y., Li, Y., Liang, S., Zheng, W., Chen, X., Liu, J. and Wang, A., 2022. Study on the preparation and effect of tomato seedling disease biocontrol compound seed-coating agent. Life, 12(6), p.849.

