دستورالعمل فنی

راهنمای جداسازی، شناسایی و ارزیابی اکتینومیست‌های محرک رشد گیاهی

نویسندگان

اکرم صادقی

ابراهیم کریمی

مریم عبداللهی

بسم الله الرحمن الرحيم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: راهنمای جداسازی، شناسایی و ارزیابی اکتینومیست‌های محرک رشد گیاهی
نویسندگان: اکرم صادقی، ابراهیم کریمی و مریم عبداللهی
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 ۶۶۶۹۷ به تاریخ ۱۴۰۳/۱۱/۰۷ است

دستورالعمل فنی راهنمای جداسازی، شناسایی و ارزیابی اکتینومیست های محرک رشد گیاهی

نویسندگان
اکرم صادقی
ابراهیم کریمی
مریم عبداللهی

فهرست مطالب

مقدمه ۵

جداسازی اکتینومیست‌ها از منابع مختلف ۷

نگهداری و ذخیره‌سازی سویه‌های اکتینومیست..... ۹

روش‌های شناسایی اکتینومیست‌ها..... ۱۰

ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی اکتینومیست‌ها..... ۱۴

تولید آنزیم هیدرولیز کننده توسط جدایه‌های محرک رشد..... ۲۰

کراس استریک جدایه‌های محرک رشد..... ۲۱

بررسی مقاومت اکتینومیست‌ها به تنش‌های محیطی ۲۲

بررسی نحوه استقرار باکتری‌های محرک رشد ۲۳

ارزیابی ویژگی محرک رشد گیاهی باکتری‌های اکتینومیست در گلخانه..... ۲۴

منابع ۲۷

مقدمه

تغذیه صحیح گیاه یکی از عوامل مهم در بهبود کمی و کیفی محصول به شمار می‌آید. عدم مصرف مناسب کودها در بخش کشاورزی علاوه بر کاهش عملکرد کمی، باعث تولید محصولاتی با کیفیت پایین می‌شود. در صورت مصرف بهینه کودها در مزارع و باغ‌ها می‌توان کمبود عناصر غذایی را در خاک و گیاه رفع کرد و البته در ادامه زنجیره غذایی نیز عناصر غذایی مورد نیاز دام و در نهایت انسان را تامین نمود. متاآنالیز انجام شده در زمینه پیش‌بینی تقاضای جهانی غذا نشان داده است که تا سال ۲۰۵۰ تقاضا برای غذا نسبت به سال ۲۰۱۰ بین ۳۵ تا ۵۶ درصد افزایش خواهد یافت. برای دستیابی به چنین تقاضای فزاینده‌ای نیاز به افزایش بهره‌وری در تولید محصولات کشاورزی است که این نتیجه را می‌توان با ترکیب عوامل متعددی از جمله کنترل موثر آفات، بهبود روش‌های کشت، اصلاح خاک و افزایش استفاده از عناصر غذایی به دست آورد (Kettlewell et al., 2023).

کودها از نهاده‌های بسیار مهم برای تولید و سودآوری عرصه کشاورزی به شمار رفته و به منظور تکمیل ذخیره مواد غذایی طبیعی خاک به کار می‌روند. بنابراین، مصرف انواع کودها برای افزایش عملکرد در واحد سطح الزامی است. با این همه، بررسی‌ها نشان داده که تنها ۳۰ تا ۵۰ درصد از کودهای شیمیایی مورد استفاده در خاک توسط گیاهان جذب شده و مازاد آن در خاک مانده یا آبشویی و وارد آب‌های روان و زیرزمینی می‌شود که خطری مهم برای محیط‌زیست و آبزیان است (Mozner et al., 2012). از سوی دیگر، افزودن مداوم کودهای شیمیایی به خاک با بر هم زدن ساختمان خاک منجر به کاهش کیفیت و حاصلخیزی خاک و تغییر اسیدیته آن می‌شود (Han et al., 2015). موضوع دیگری که در تولیدات گلخانه‌ای اهمیت داشته و روی میزان عملکرد محصول تاثیرگذار است مبحث آفات و بیماری‌ها است که برای کشاورزان چالشی بزرگ به شمار می‌رود. عوامل بیماری‌زا، گیاهان را از مراحل اولیه رشد تا مرحله برداشت تحت تأثیر قرار می‌دهند. به منظور غلبه بر این مشکلات از گذشته روش‌های گوناگونی از جمله سموم شیمیایی استفاده شده است (Mihajlovic et al., 2017). با این حال، علاوه بر اینکه این روش‌ها به طور کامل و موثر عوامل بیماری‌زا را از خاک حذف نکرده‌اند، مصرف بیش از اندازه چنین ترکیباتی موجب خسارت‌های جبران ناپذیری به سلامت انسان، منابع آبی و محیط زیست نیز شده است که مغایر با اهداف و چشم اندازهای توسعه پایدار است (نصیرزاده و همکاران، ۱۴۰۰). با عنایت به معضلات مذکور در زمینه استفاده از مواد شیمیایی، پیدا کردن جایگزینی مناسب برای مواد شیمیایی که هزینه تولید کمتری داشته و تولید آن توسط خود کشاورزان نیز ممکن باشد و از سوی دیگر نه تنها خطری برای انسان، جانداران و محیط زیست محسوب نشود بلکه منجر به بهبود مداوم کیفیت خاک و گیاهان نیز باشد امری ضروری است (Supaporn et al., 2013). باکتری‌های محرک رشد که در فرمولاسیون کودهای زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توانند: مواد غذایی مورد نیاز گیاه را فراهم کنند، جذب مواد غذایی را تسهیل کنند، سمیت فلزات سنگین را برای گیاه کاهش دهند و از ورود عوامل بیماری‌زا به گیاه جلوگیری کنند. این باکتری‌ها همچنین می‌توانند مقاومت گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زا را افزایش داده و نیاز به استفاده از سموم شیمیایی را کاهش دهند. این دسته از مواد زیستی با نظر به چنین پتانسیل‌هایی می‌توانند یکی از گزینه‌های مهم جایگزین در حوزه مصرف سموم و کودهای شیمیایی باشند (Galeano Vanegas et al., 2020).

استفاده از کودهای زیستی با عملکرد چندگانه و به عنوان مکمل کودهای شیمیایی، برای دستیابی به محصولات با کیفیت و سالمتر، یکی از راهکارهای مهم به سمت کشاورزی ارگانیک و توسعه پایدار است (Nousheen et al., 2021; Mahapatra et al., 2022). این مواد به صورت پوشش با بذر، خاک و یا کودهای آلی مصرف می‌شوند. مهمترین

سازوکارهای تاثیر کودهای زیستی بر رشد گیاه شامل تثبیت نیتروژن، توانایی حل کنندگی فسفر و روی نامحلول، تولید سیدروفور و افزایش قابلیت جذب آهن، اکسایش زیستی گوگرد و کاهش pH، تجزیه سیلیکات‌ها و آزادسازی عناصری همچون پتاسیم است (خسروی، ۱۴۰۰). کودهای زیستی همچنین به واسطه تولید اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و سیتوکینین‌ها از طریق تأثیر بر مرفولوژی ریشه، بر رشد گیاهان اثر می‌گذارند (Nousheen et al., 2021; Mahapatra et al., 2022; Thomas and Singh., 2019). به عبارت دیگر، استفاده از باکتری‌های محرک رشد در کشاورزی می‌تواند چندین مزیت بالقوه از جمله بهبود رشد گیاه، افزایش جذب مواد مغذی و کاهش وابستگی به کودهای شیمیایی، افزایش تحمل به تنش، رویکرد سازگار با محیط زیست و همسویی با شیوه های کشاورزی پایدار را داشته باشد (Joshi et al., 2023).

تاکنون انواع زیادی ازPGPRها یا باکتری‌های محرک رشد گیاهی شناخته شده‌اند که اثرات مثبت آن‌ها بر رشد و سلامت گیاه از چند دهه گذشته گزارش شده است. اکتینومیست‌ها گروهی از باکتری‌های خاک‌زی هستند که به‌طور گسترده در محیط‌های طبیعی، شامل خاک، ریزوسفر گیاهان، بافت‌های داخلی گیاهان (اندوفیت‌ها) و سطح برگ‌ها (فیلوسفری) یافت می‌شوند. این باکتری‌ها به‌ویژه به دلیل توانایی در تولید متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعال، نظیر ترکیبات ضدباکتریایی و ضدقارچی، نقش مهمی در افزایش سلامت گیاهان و تقویت بازده کشاورزی دارند و به عنوان جایگزینی ایمن و دوستدار محیط‌زیست برای آفت‌کش‌های شیمیایی شناخته می‌شوند (Abbasi et al. 2021; Rostami Mehrueiyeh et al. 2021; Pacios-Michelena et al. 2021). در میان اکتینومیست‌ها، استرپتومایسس (*Streptomyces*) یکی از جنس‌های شناخته‌شده‌ای است که به دلیل توانایی در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، سیدروفورها، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی بیمارگرها، و هورمون‌های رشد گیاهی بسیار مورد توجه بوده‌است. این باکتری‌ها به‌ویژه در محیط‌های رقابتی ریزوسفر زنده مانده و با تولید ترکیبات زیست‌فعال گیاه را در برابر تنش‌های زیستی (مانند بیماری‌های قارچی و باکتریایی) و غیرزیستی (مانند شوری، خشکی و کمبود مواد مغذی) محافظت می‌کنند. همچنین برخی از گونه‌های *Streptomyces* توانایی تثبیت نیتروژن را دارند و می‌توانند نیاز گیاه به کودهای نیتروژنی را کاهش داده، به کاهش مصرف کودهای شیمیایی کمک کنند (Sadeghi et al. 2012, 2017; Karimi et al. 2012). کاربرد باکتری‌های *Streptomyces* به عنوان کودهای زیستی در پژوهش‌های مختلف اثربخشی خود را نشان داده است. اکتینومیست‌ها به دلیل تنوع متابولیت‌های زیست‌فعال خود و تعامل مثبت با گیاهان، نه تنها در کنترل بیماری‌ها مؤثرند بلکه به‌عنوان کودهای زیستی به بهبود تغذیه گیاه نیز کمک می‌کنند. آن‌ها از طریق تولید سیدروفورها جذب مواد مغذی مانند آهن را افزایش می‌دهند که نه تنها به رشد گیاه کمک می‌کند، بلکه با محدود کردن دسترسی عوامل بیماری‌زا به این ماده حیاتی، آن‌ها را مهار می‌نماید. تولید ترکیبات فرار توسط *Streptomyces* نیز نقش مهمی در تنظیم بیان ژن، متابولیسم و رفتار میکروارگانیسم‌های اطراف ایفا کرده و به عنوان مولکول‌های سیگنال‌دهنده به بهبود عملکرد گیاه و مقاومت آن در برابر شرایط نامساعد محیطی کمک می‌کند (Newitt et al., 2019; Jones et al. 2018; Jones and Elliot. 2017).

ارزش بازار کودهای زیستی بین سال‌های ۲۰۱۶ تا ۲۰۲۲ با نرخ رشد (CAGR) ۱۳/۶ درصد افزایش یافته و از ۶۱۰ میلیون دلار در سال ۲۰۱۵ به ۱/۵ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۲ رسیده و پیش بینی می‌شود به ۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۵ برسد. با این روند ، پیش بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ ارزش این بازار به بیش از ۹۰ میلیارد دلار برسد (خسروی،

۱۴۰۰). در حال حاضر تولید کودهای زیستی به عنوان جایگزین کودهای شیمیایی به عنوان یکی از اولویت‌های مهم در اسناد بالادستی کشور و برنامه های وزارت جهاد کشاورزی و شرکت‌های دانش بنیان کشور قرار دارد. با وجود اینکه سال‌ها است مطالعه بر روی کودهای زیستی در کشور آغاز شده است، اما میزان تولید و مصرف کودهای زیستی در مقایسه با کودهای شیمیایی بسیار ناچیز است. خرید کودهای شیمیایی در کشور سالانه و به طور منظم از تولیدات داخل و یا از طریق واردات همراه با خروج ارز انجام می‌شود. از سوی دیگر، بررسی‌ها نشان داده متوسط مصرف کودها و سموم شیمیایی در ایران بالاتر از میانگین جهانی آن است (خسروی، ۱۴۰۰؛ نشاط و همکاران، ۱۳۹۵). از این رو به کارگیری تمهیدات موثر برای کاهش مقدار مصرف این نهاده‌ها و جایگزینی آن‌ها با کودهای زیستی در راستای منافع اقتصادی و زیست محیطی کشور امری ضروری و حیاتی است.

این دستورالعمل فنی با هدف ارائه یک راهنمای جامع برای جداسازی، شناسایی و ارزیابی اکتینومیست‌های محرک رشد گیاهی تدوین شده است. با در نظر گرفتن این دستورالعمل، محققان و کارشناسان کشاورزی می‌توانند این باکتری‌ها را از محیط‌های طبیعی مختلف جدا کرده و ویژگی‌های زیستی و عملکردی آن‌ها را برای استفاده به عنوان کودهای زیستی و عوامل بیوکنترلی ارزیابی کنند. سوالات اساسی که این دستورالعمل به آن‌ها پاسخ می‌دهد عبارتند از:

۱) چگونه می‌توان اکتینومیست‌ها را از محیط‌های طبیعی مختلف جداسازی و برای تولید کود زیستی استفاده کرد؟

۲) کدام ویژگی‌های زیستی این باکتری‌ها می‌تواند به بهبود رشد گیاه و افزایش مقاومت آن در برابر بیماری‌ها کمک کند؟

۳) چگونه می‌توان پایداری اکتینومیست‌ها را در برابر تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و دماهای نامساعد ارزیابی کرد؟

پاسخ به این سوالات، مسیر تولید کودهای زیستی کارآمد، ایمن و دوستدار محیطزیست را هموار می‌کند و می‌تواند به بهبود عملکرد محصولات کشاورزی مبتنی بر آن‌ها، حفظ سلامت خاک و کاهش وابستگی به کودها و سموم شیمیایی کمک کند. توسعه کودهای زیستی از این طریق، گامی مهم در راستای کشاورزی پایدار و افزایش بهره‌وری و سلامت محصولات کشاورزی و حفاظت از محیطزیست خواهد بود (Pacios-Michelena et al. 2021; Palaniyandi et al. 2013; Dimkpa et al. 2008).

۱. جداسازی اکتینومیست‌ها از منابع مختلف

نخستین قدم در بررسی خصوصیات زیستی و کاربردی اکتینومیست‌ها در کشاورزی ، جداسازی این باکتری‌ها از منابع طبیعی است. اکتینومیست‌ها در بخش‌های مختلف محیط طبیعی از جمله درون بافت‌های گیاهی (اندوفیت‌ها)، روی سطح برگ‌ها (فیلوسفری‌ها) و در ناحیه ریشه (ریزوسفری‌ها) یافت می‌شوند. هر یک از این بخش‌ها ویژگی‌های خاصی دارند و بنابراین روش‌های جداسازی برای هر کدام باید متناسب با ویژگی‌های آن منبع باشد.

۱,۱. اکتینومیست‌های اندوفیت

برای جداسازی اکتینومیست‌های اندوفیتی، از بافت‌های داخلی گیاهان استفاده می‌شود. این فرآیند نیازمند استخراج باکتری‌ها از بافت‌های درونی گیاه و انتقال آن‌ها به محیط کشت مناسب است. قسمت‌های مختلف گیاه شامل ریشه، ساقه یا برگ به‌طور دقیق از گیاه سالم و بدون آسیب برداشت می‌شوند (Sharma et al. 2023). برای جلوگیری از

آلودگی خارجی، بافت‌های گیاهی ابتدا به مدت ۲-۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد غوطه‌ور می‌شوند و سپس با آب مقطر استریل (سترون) به‌طور کامل شسته می‌شوند (Bano et al. 2021). پس از ضدعفونی سطحی بافت، بافت داخلی گیاه (مانند ریشه، ساقه یا برگ) با دقت جدا شده و به‌طور مستقیم در محیط‌های کشت مانند Actinomycetes Isolation Agar (AIA) یا Glucose Yeast Extract Malt Agar (GYM or ISP2) قرار داده می‌شوند. سپس در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲-۳ روز نگهداری می‌شوند (Reddy et al. 2019). در صورت رشد باکتری‌ها به صورت تک کلنی، از هر کدام کشت مجزا تهیه و نگهداری می‌شود. در صورتیکه باکتری‌ها به صورت یک مجموعه رشد کرده باشند باید از هر مجموعه یک سوسپانسیون با سری رقت 10^{1} تا 10^{4} تهیه و به محیط کشت GYM انتقال داده شود. پس از مشاهده و تایید رشد کلنی‌های اکتینومیستی، هر کلنی برای خالص‌سازی باید به روش کشت چهار منطقه‌ای به محیط کشت GYM منتقل شود (Singh et al., 2020).

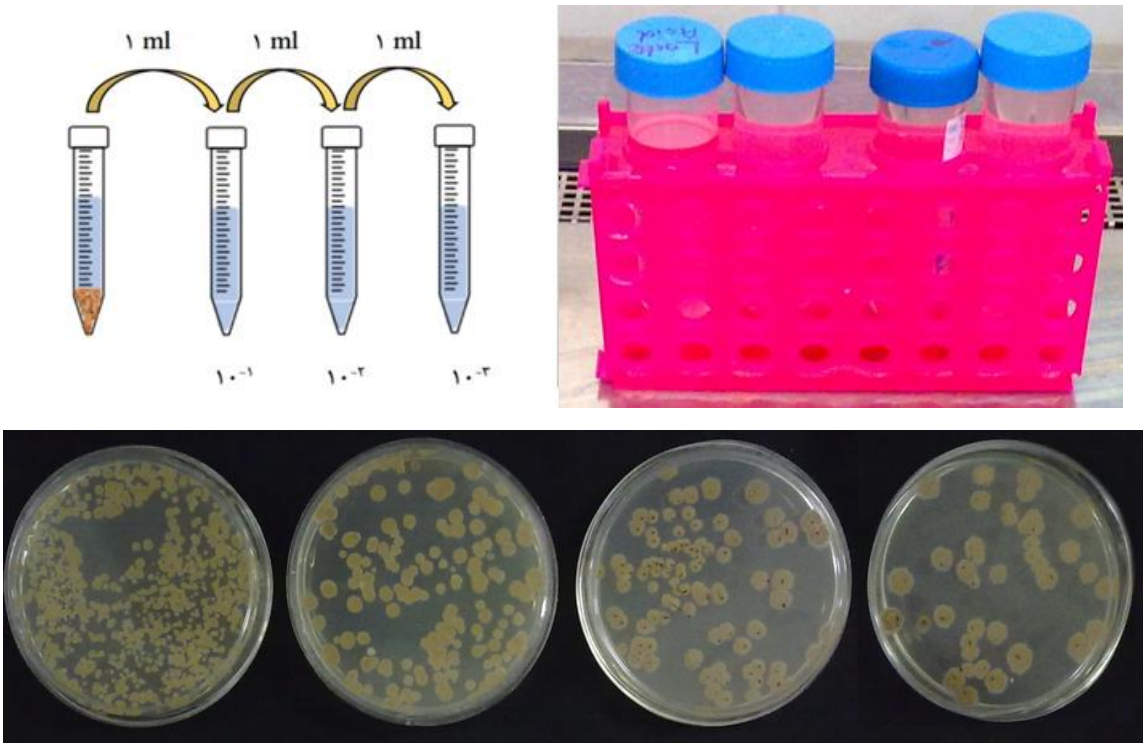
۲،۱. اکتینومیست‌های فیلوسفری

برای جداسازی اکتینومیست‌های فیلوسفری از سطح برگ گیاهان، ابتدا باید برگ‌های گیاه به‌طور دقیق جمع‌آوری شوند و پس از ضدعفونی سطحی برگ، با استفاده از روش‌های جداسازی، باکتری‌ها از سطح برگ جدا شوند. برگ‌های گیاهان سالم و بدون آسیب‌دیدگی از نواحی مختلف گیاهان مورد نظر برداشت می‌شوند. این برگ‌ها باید به‌طور دقیق و با رعایت اصول بهداشتی جمع‌آوری شوند. برگ‌های گیاهی در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۳-۲ دقیقه غوطه‌ور می‌شوند. سپس به‌طور کامل با آب مقطر استریل شسته می‌شوند. برگ‌های ضدعفونی شده در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (NaCl 0.9%) سترون قرار داده می‌شوند و با استفاده از شیکر در سرعت ۱۵۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه شیک می‌شوند تا باکتری‌ها از سطح برگ جدا شوند. از سوسپانسیون به‌دست‌آمده، سری رقت از 10^{1} تا 10^{4} در سرم فیزیولوژیک سترون تهیه می‌شود. از هر سری رقت ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون بر روی محیط کشت انتخابی مانند Starch Casein Agar (SCA)یا Actinomycetes Isolation Agar (AIA) انتقال داده می‌شود و با استفاده از پیپت پاستور به‌طور یکنواخت در سطح محیط کشت پخش می‌شود. پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند تا کلنی‌ها رشد کنند. پس از این مدت، کلنی‌های اولیه بر روی محیط‌های کشت تازه انتقال داده می‌شوند. به‌منظور خالص‌سازی جدایه‌ها، باکتری‌های به‌دست‌آمده باید به روش کشت چهار منطقه‌ای کشت شوند تا از خلوص سویه‌ها اطمینان حاصل شود (Singh et al., 2020; Reddy et al. 2019).

۳،۱. اکتینومیست‌های ریزوسفری

برای جداسازی اکتینومیست‌های ریزوسفری، از خاک‌های ناحیه ریزوسفری گیاهان استفاده می‌شود. این خاک‌ها شامل باکتری‌های مفیدی هستند که در اطراف ریشه گیاهان به‌ویژه در ناحیه ریزوسفری مستقر می‌شوند. نمونه‌برداری باید از خاکی که در سطح و در مجاورت ریشه گیاه قرار دارد انجام شود. این نمونه‌ها باید با رعایت اصول بهداشتی جمع‌آوری و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل شوند. در ابتدا، یک گرم از خاک نمونه‌برداری شده به ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک سترون اضافه شده و در شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه شیک می‌شود تا باکتری‌ها از خاک جدا شوند. از سوسپانسیون تهیه‌شده، سری رقت‌های 10^{1} تا 10^{4} در سرم فیزیولوژیک سترون تهیه می‌شود. هر سری رقت به‌طور دقیق و به‌منظور انجام کشت صحیح، در لوله‌های آزمایش قرار می‌گیرد. از هر سری رقت، ۱۰۰ میکرولیتر به محیط

کشت انتخابی انتقال داده می‌شود (شکل ۱). این محیط‌ها می‌توانند شامل Starch Casein Agar (SCA)، Actinomycetes Isolation Agar (AIA) یا محیط‌های مشابه مانند GYM باشند. سوسپانسیون با استفاده از پیپت پاستور خمیده به‌طور یکنواخت در سطح محیط کشت پخش می‌شود. پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند تا کلنی‌ها به‌خوبی رشد کنند. در این مدت، باکتری‌های اکتینومیست‌های جدا شده از خاک به‌طور واضح بر روی محیط کشت رشد کرده و قابل شناسایی می‌شوند. به‌منظور خالص‌سازی جدایه‌ها، می‌توان از روش کشت چهار منطقه‌ای استفاده کرد (Singh et al. 2020; Reddy et al. 2019).



شکل ۱) تهیه سری رقت میکروبی در سرم فیزیولوژیک (بالا) و پلیت‌های کشت شده نمونه خاک ریزوسفری تا چهار رقت (پایین، از چپ به راست رقت‌های متناظر لوله‌های آزمایش

۲. نگهداری و ذخیره‌سازی سویه‌های اکتینومیست

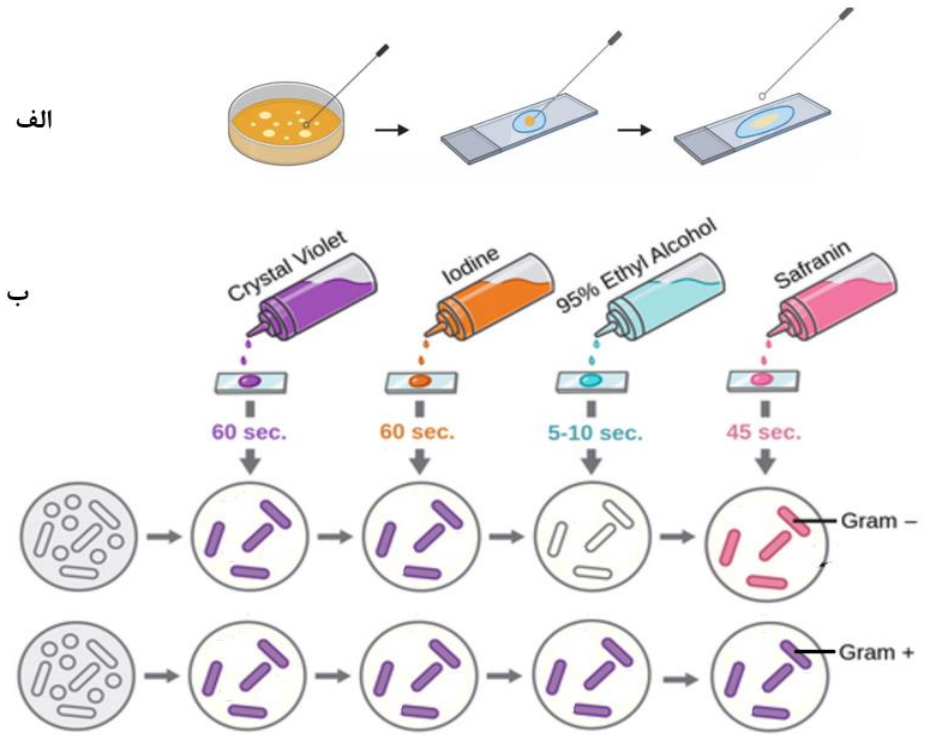
پس از جداسازی و خالص‌سازی اکتینومیست‌ها، سویه‌های جدا شده باید برای نگهداری طولانی‌مدت ذخیره شوند. برای این منظور هر جدایه خالص در محیط مایع GYM کشت داده می‌شود. بعد از ۷۲ ساعت، کشت آماده شده با گلیسرول ۶۰ درصد استریل تا رسیدن غلظت نهایی گلیسرول به ۱۵ درصد، ترکیب شده و در ویال‌های مخصوص (cryovials) استریل ذخیره می‌شود. برای حفظ ماندگاری طولانی‌مدت، ویال‌ها، در ازت مایع به مدت چند دقیقه قرار داده می‌شوند و سپس در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند.

۳. روش‌های شناسایی اکتینومیست‌ها

۱،۳. روش‌های ریخت‌شناسی

۱،۱،۳. رنگ‌آمیزی گرم (Gram staining)

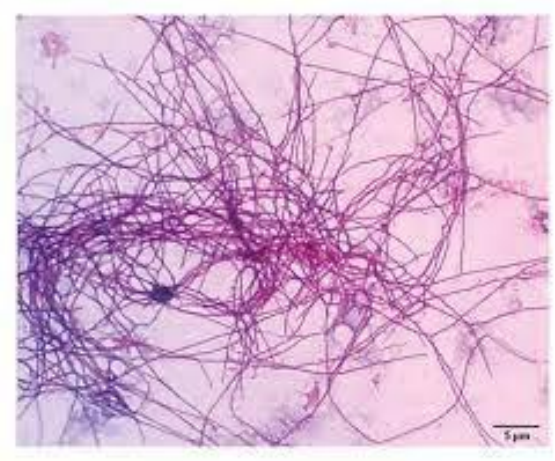
اکتینومیست‌ها گرم مثبت هستند، به این معنی که در رنگ‌آمیزی گرم به دلیل دیواره سلولی ضخیم، رنگ کریستال ویولت (ویوله) را حفظ می‌کنند و به رنگ بنفش دیده می‌شوند. لایه نازکی از نمونه باکتری رشد کرده را روی یک صفحه لام قرار می‌دهند. بهتر است نمونه از کناره‌های لام، فاصله داشته باشد. در صورت کم بودن غلظت در کشت مایع باکتری، ابتدا سانتریفیوژ انجام می‌شود، سپس از رسوب باکتری نمونه تهیه شده و روی لام قرار می‌گیرد، نمونه باید در مجاورت هوا کاملا خشک شود. با عبور دادن لام از روی شعله (۴-۳ مرتبه) و یا با استفاده از صفحه گرم کننده، نمونه بر روی لام تثبیت می‌شود. گاهی از الکل‌ها برای تثبیت نمونه استفاده می‌شود. در مرحله رنگ آمیزی ابتدا سطح نمونه به مدت ۱ دقیقه با رنگ کریستال ویوله پوشش داده می‌شود. سپس رنگ با آب شسته می‌شود. در مرحله بعد سطح نمونه به مدت ۱ دقیقه با محلول لوگل (محلول ید) پوشش داده می‌شود و بعد از آن با آب شسته می‌شود. سپس با یک محلول رنگ بر (مثلا استن یا الکل)، به مدت ۱۰ ثانیه لام را شسته و بعد از آن، لام با آب شست و شو داده می‌شود. در این مرحله سطح لام با سافرانین به مدت ۱ دقیقه پوشانده می‌شود. در انتها شست و شو با آب انجام می‌شود و سپس لام را خشک می‌کنند. نمونه تهیه شده برای بررسی با میکروسکوپ نوری آماده است. باکتری‌هایی که در زیر میکروسکوپ به رنگ قرمز دیده شوند را گرم منفی و باکتری‌هایی که به رنگ بنفش دیده شوند را گرم مثبت می‌نامند (شکل ۲).



شکل۲) روش تهیه لام از سویه‌های باکتریایی و مراحل رنگ‌آمیزی گرم

۲،۱،۳. بررسی میکروسکوپی

با میکروسکوپ نوری، می‌توان ساختارهای هیف‌مانند، زنجیره اسپور و الگوهای رشد رشته‌ای اکتینومیست‌ها را مشاهده کرد. برای بررسی جزئی‌تر، باید از میکروسکوپ الکترونی استفاده کرد (شکل ۳).



شکل ۳) تصویر میکروسکوپی (میکروسکوپ نوری) از یک باکتری اکتینومیستی

۳،۱،۳. ساختار اسپورها

نوع، تعداد و موقعیت اسپورها در اکتینومیست‌ها اطلاعات مهمی برای تشخیص و ندی فراهم می‌کند. به عنوان مثال، برخی از اکتینومیست‌ها اسپورهایی به صورت رشته‌های طولانی دارند که می‌تواند با استفاده از راهنما برای شناسایی آنها مفید باشد.

۲،۳. استفاده از محیط‌های کشت ISP

محیط‌های کشت ISP (International Streptomyces Project) مجموعه‌ای از محیط‌های کشت اختصاصی هستند که در سال ۱۹۶۰ برای شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌های اکتینومیستی، به ویژه *استرپتومایسس*‌ها، معرفی شدند (جدول ۱). این محیط‌ها دارای ترکیبات خاصی هستند که رشد و ویژگی‌های خاص گونه‌های مختلف را به طور اختصاصی تحریک و شناسایی آنها را تسهیل می‌کنند.

ISP1 (محیط پپتون–آهن): این محیط برای تولید رنگیزه‌های مشخص توسط گونه‌های *استرپتومایسس* طراحی شده و می‌تواند به تمایز برخی از گونه‌ها بر اساس رنگ کمک کند.

ISP2 (محیط مالت–آگار): برای تحریک رشد هیف‌ها و بررسی خصوصیات رشته‌ای اکتینومیست‌ها به‌ویژه *استرپتومایسس*‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این محیط نیز به شناسایی گونه‌های مختلف بر اساس رنگ و ظاهر کلنی‌ها کمک می‌کند.

ISP3 تا ISP7 این محیط‌ها شامل ترکیبات مختلف مانند گلیسرول، پپتون، آمینواسیدها و دیگر مواد غذایی هستند که می‌توانند به رشد گونه‌های متفاوت کمک کنند. محیط ISP7 به دلیل داشتن pH پایین می‌تواند گونه‌های مقاوم به اسید را شناسایی کند. بر اساس تغییرات رنگ، ساختار و رشد در این محیط‌ها، می‌توان نوع و جنس اکتینومیست‌ها را تا حدودی شناسایی کرد. محیط‌های ISP با توجه به تغییرات ظاهری و رشد باکتری در آنها، امکان طبقه‌بندی نسبی اکتینومیست‌ها را فراهم می‌کنند (Parte et al., 2012).

جدول۱- معرفی سری محیط های کشت ISP و محتویات هر کدام از آن‌ها

نام محیط	محتویات
ISP1	پپتون/آهن/آگار
ISP2	عصاره مخمر/عصاره جو-آگار
ISP3	آرد جو دوسر-آگار
ISP4	نمکهای معدنی/نشاسته- آگار
ISP5	گلیسرول/آسپارژین-آگار
ISP6	پپتون/عصاره مخمر/آهن- آگار
ISP7	تیروزین- آگار

۳,۳. شناسایی مولکولی بر اساس توالی ژن *16s rRNA*

شناسایی مولکولی به عنوان یک روش دقیق و مدرن در شناسایی اکتینومیست‌ها به کار می‌رود. در این روش از توالی ژن *۱۶s rRNA* استفاده می‌شود که یکی از ژن‌های کلیدی و پرکاربرد در شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌ها به شمار می‌رود. این ژن در تمام باکتری‌ها وجود دارد، اما دارای بخش‌های متغیری است که می‌تواند بین گونه‌ها و جنس‌های مختلف تفاوت داشته باشد (Hussein et al., 2024; Sadeghi et al., 2017).

۳,۳. ۱. استخراج ماده وراثتی (DNA)

ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری در محیط GYM مایع را به مدت ۳ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی حذف می‌شود. به رسوب حاصل ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه و مخلوط می‌شود. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (2X) شامل ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۲۵ میلی‌مولار EDTA، ۱ درصد SDS و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئیناز K به سوسپانسیون افزوده می‌شود. نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس انکوبه می‌شوند. پس از آن، ۴۰۰ میکرولیتر آمونیوم استات ۷/۵ مولار به هر لوله افزوده و به مدت ۲ تا ۳ دقیقه تکان داده می‌شود. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و ۷۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به تیوپ جدید منتقل می‌شود. سپس ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد افزوده می‌شود. تیوپ‌ها دو تا سه بار به آرامی با دست تکان داده شده و به مدت یک شب در دمای ۲۰- تا ۳۰- درجه سلسیوس قرار می‌گیرند. پس از این مدت، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل دو بار با ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شسته می‌شود. در نهایت، رسوب در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه خشک شده و در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل می‌شود. نمونه‌ها برای نگهداری طولانی‌مدت در دمای ۴ درجه سلسیوس یا فریزر ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره می‌شوند. (Sadeghi et al. 2014).

۳,۳. ۲. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

شناسایی باکتری‌های منتخب بر اساس آنالیز توالی زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی (ژن *16s rRNA*) و با استفاده از آغازگرهای ۲۷F (5′- AGAGTTTGATCCTGGCTCAGA-3′) و ۱۴۹۲R (5′- AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3′) انجام می‌شود (Blanco et al. 2002). برای انجام PCR می‌توان ازمخلوط

Master mix آماده استفاده کرد و یا با مقدارهای مشخص آن را تهیه کرد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی: ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام می‌شود.

۳,۳. ۳. اطمینان از صحت استخراج DNA ژنومی و محصول PCR

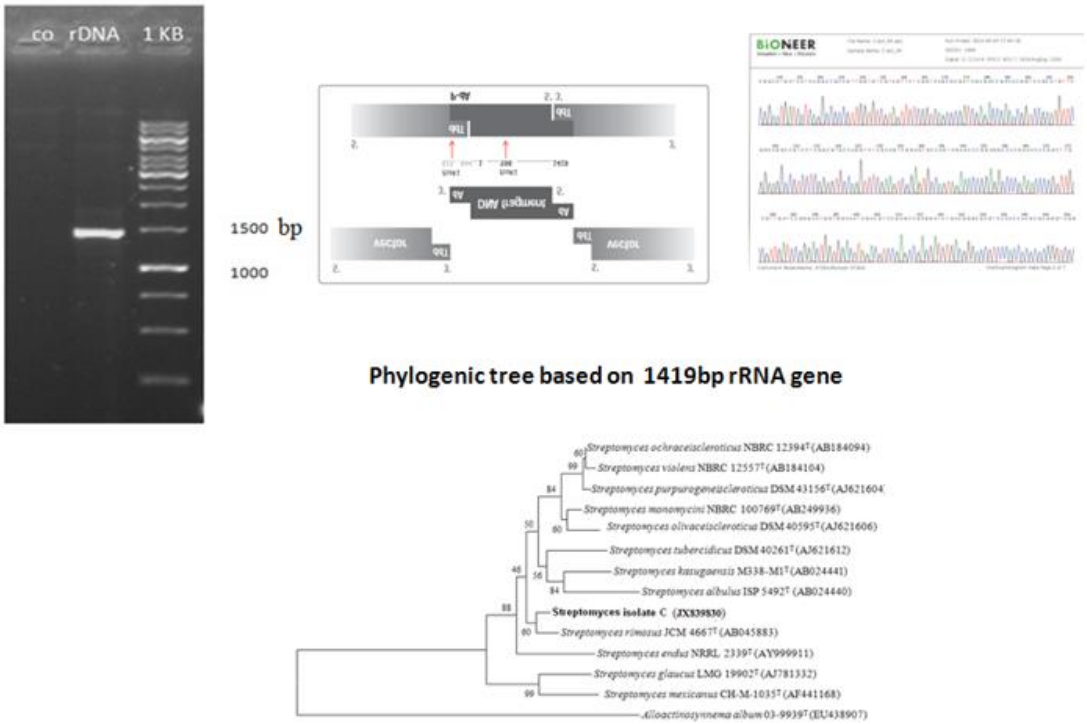
یک میکرولیتر از هر نمونه استخراج شده در ۹۹۹ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون رقیق شده و غلظت DNA موجود در هر نمونه توسط دستگاه نانو دراپ و برحسب نانوگرم DNA موجود در هر میکرولیتر محلول (ng/µl) قرائت می شود. همچنین با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نسبت DNA استخراج شده به پروتئین موجود در نمونه (تعیین نسبت جذب در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) تخمین زده می‌شود. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده می‌شود.

۳,۳. ۴. توالی‌یابی

توالی‌یابی بخش تکثیر شده از روی ژن *16s rRNA* انجام می‌شود. در این مرحله، توالی نوکلئوتیدی این ژن با دقت بالا تعیین می‌شود. پس از مشاهده قطعه تکثیر شده مورد نظر (حدود ۱۴۰۰ جفت باز) روی ژل آگارز و مقایسه با نشانگر اندازه DNA با نام تجاری (Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix)، محصول حاصل برای توالی‌یابی ارسال می‌شود.

۳,۳. ۵. رسم درخت تبارزایی

از توالی‌های به دست آمده و ارسال شده توسط شرکت‌هایی که در این زمینه فعالیت می‌کنند می‌توان برای تحلیل‌های روابط خویشاوندی یا فیلوژنتیک استفاده کرد. این کار به پژوهشگران اجازه می‌دهد که ارتباطات تکاملی اکتینومیست‌های مورد مطالعه را با دیگر باکتری‌ها بررسی کنند. توالی حاصل پس از بررسی توسط نرم افزار DNASTAR جهت تعیین درصد همولوژی اولیه با سایر توالی‌های موجود در بانک داده NCBI استفاده می‌شود و در نهایت برای تعیین میزان شباهت (همولوژی) توالی ژنومی 16s rDNA جدایه‌ها با سایر باکتری‌ها بر اساس میزان تشابه جفت باز از نرم افزار (EzTaxon-e server http://eztaxon-e.ezbiocloud.net) استفاده می‌شود. پس از هم ترازی توالی‌ها با استفاده از الگوریتم CLUSTAL W، از نرم افزار MEGA (روش Neighbor-joining) برای رسم درخت فیلوژنی استفاده می‌شود (شکل ۴). لازم به ذکر است این نرم افزار نسخه های متعددی دارد. اگر چه جدید ترین نسخه آن (MEGA 11) به صورت رایگان در دسترس است اما با استفاده از نسخه های قدیمی تر نیز می توان درخت تبار زایی یا فیلوژنتیک را رسم کرد.



شکل۴) تصویری شماتیک از مراحل شناسایی مولکولی یک جدایه اکتینومیستی

۴. ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی اکتینومیست‌ها

۱،۴. تولید اکسین

به منظور بررسی توان جدایه‌ها برای تولید اکسین، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت TSB (شامل ۰/۲۵ گرم در لیتر دکستروز، ۰/۲۵ گرم در لیتر دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، ۵ گرم در لیتر کلرید سدیم و ۷/۵ گرم در لیتر تریپتون) کشت داده می‌شوند. سپس ۵۰ میکرو لیتر از کشت تازه باکتری در محیط GYM مایع به ۲۵ میلی‌لیتر محیط DF (شامل ۲ گرم در لیتر NaH_2PO_4، ۰/۲ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲ گرم در لیتر کلرید کلسیم، ۱ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ گرم در لیتر اسید سیتریک و همچنین عناصر کمینه شامل: ۵ میلی‌گرم در لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۵ میلی‌گرم در لیتر H_3BO_3، ۱/۲۴ میکروگرم در لیتر $MnSO_4.H_2O$، ۰/۷۸ میکروگرم در لیتر $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۷۹ میکروگرم در لیتر $CuSO_4.5H_2O$ و ۱ میکروگرم در لیتر MoO_4) با pH برابر ۷ منتقل می‌شود. بعد از ۴۸ ساعت، کشت باکتری سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول بالای آن با ۴ میلی‌لیتر معرف سالکوسکی (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۷۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ – مولار) مخلوط می‌شود. این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور آن در ۵۳۵ نانومتر قرائت می‌شود (Glick and Patten, 2002). مقدار اکسین تولید شده

توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از ایندول استیک اسید محاسبه می‌شود.

۲,۴. تولید سیدروفور

سیدروفورها مولکول‌هایی هستند که با به دام انداختن یا کلاته کردن آهن باعث فراهم‌سازی آن برای گیاهان می‌شوند. شناسایی تولید سیدروفور توسط اکتینومیست‌ها در محیط Chrome Azurol S (CAS) صورت می‌گیرد. ۵ میکرولیتر کشت تازه باکتری به روش لکه‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط جامد کروم آزورول اس آگار (Chrome azurol S) که به اختصار CAS-Agar✱ نامیده می‌شود کشت می‌شود (Hussein et al., 2024; Sadeghi et al., 2012; Manninen and Mattila-Sandholm, 1994; Alexander and Zubber, 1991).

✱این محیط به روش زیر و با ساخت محلول‌های ۱ تا ۴ تهیه می‌شود:

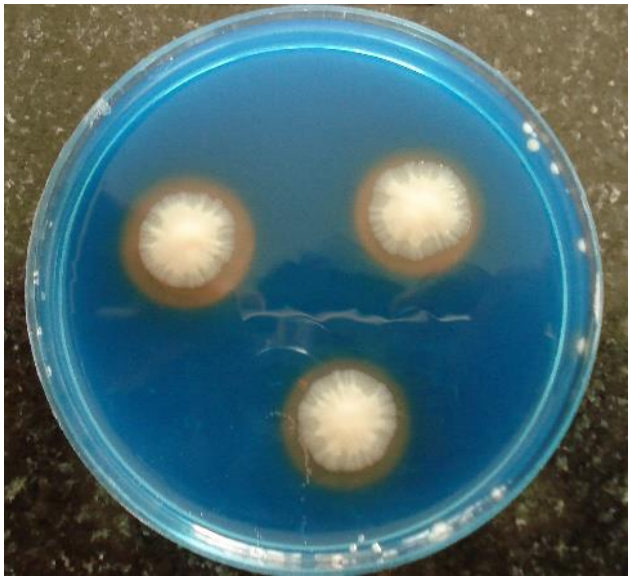
محلول معرف Fe-CAS (محلول ۱): این محلول از اختلاط ۱۰ میلی لیتر $FeCl_3$-$6H_2O$ یک میلی مولار (در اسید کلریدریک ۱۰ میلی مولار) با ۵۰ میلی لیتر محلول CAS (۱/۲۱ میلی گرم در لیتر) تهیه می شود. محلول ارغوانی تیره حاصله به آرامی و همراه با تکان دادن پیوسته به ۴۰ میلی لیتر محلول HDTMA (hexadecyltrimethylammonium) (۱/۸۲ میلی گرم در لیتر) اضافه می شود. محلول حاصل که دارای رنگ آبی تیره است اتوکلاو شده و در دمای محیط تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد می شود. این محلول باید به صورت تازه تهیه شود.

محلول بافر(محلول ۲): محلول شماره دو با حل کردن ۳۰/۲۴ گرم بافر PIPES در ۷۵۰ میلی لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۳ گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم NaCl و ۱/۰ گرم NH_4Cl تهیه می شود و pH آن با KOH ۵۰٪ به ۶/۸ می رسد. قبل ازاتوکلاو، به محلول فوق ۱۵ گرم آگار اضافه و با افزودن آب مقطر حجم آن به ۸۰۰ میلی لیتر می رسد. بعد از اتوکلاو تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد می شود.

محلول غذائی (محلول ۳): حاوی دو گرم گلوکز، دو گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی گرم $MgSO_4$- $7H_20$، ۱۱ میلی گرم $CaCl_2$، ۱/۱۷ میلی گرم $MnSO_4$- H_2O، ۱/۴ میلی گرمH_3BO_3، ۰/۰۴ میلی گرم $CuSO_4.5H_2O$، ۱/۲ میلی گرم $ZnSO_4$- $7H_2O$ و ۱/۰ میلی گرمNa_2MoO_4- $2\ H_2O$ است. این محلول نیز به صورت جداگانه اتوکلاو و سرد می شود.

محلول کازامینو اسید (محلول ۴): مقدار سه گرم کازامینو اسید به ۳۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می شود. این محلول با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل می شود.

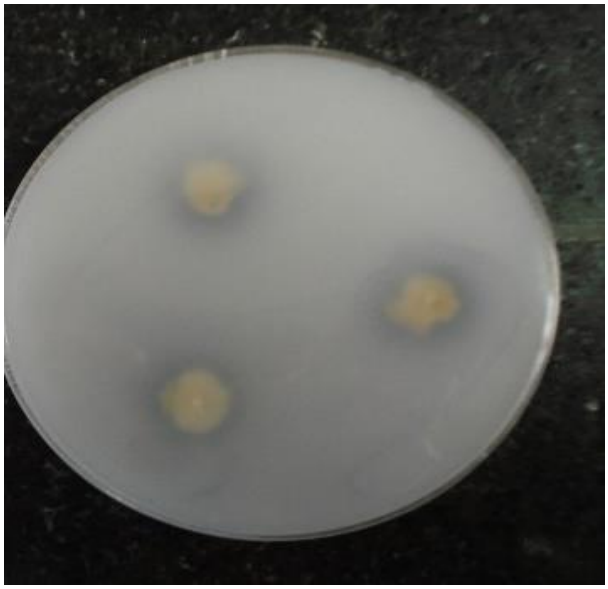
برای تهیه محیط ابتدا محلول چهار و سپس محلول سه به محلول بافر (محلول ۲) اضافه می شود. در آخر محلول معرف (محلول ۱) به آرامی و با هم زدن اضافه می شود. مخلوط نهایی در پلیت های ۹ سانتیمتری توزیع می شود. پنج میکرولیتر از کشت تازه باکتری بر روی سطح محیط لکه گذاری می شود. این پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری می شوند. تولید سیدروفور باعث جدا شدن آهن از CAS می‌شود که نتیجه آن تولید یک هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتری است (شکل ۵). قطر این هاله پس از سه روز ثبت و نسبت قطر هاله به قطر کلنی محاسبه می شود.



شکل۵) ارزیابی تولید سیدروفور، تشکیل هاله نارنجی در اطراف کلنی‌های اکتینومیستی بر روی محیط CAS-Agar

۳,۴. انحلال فسفات آلی و معدنی

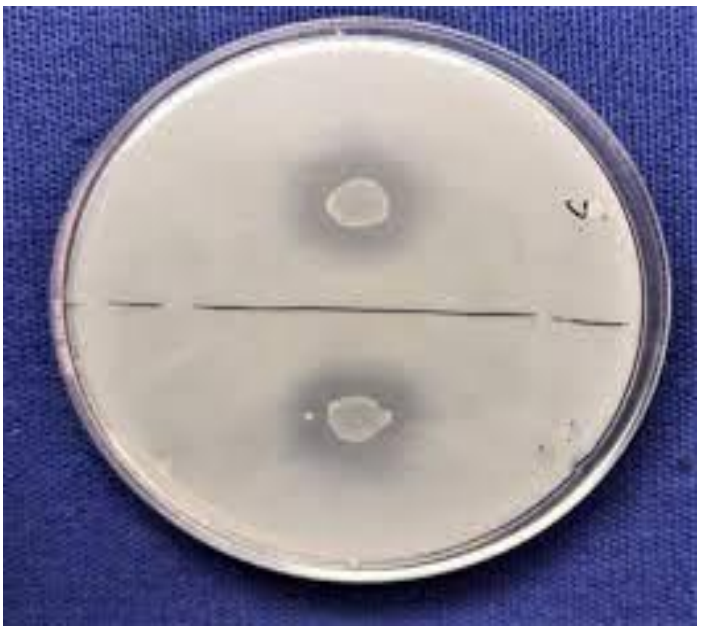
برای آماده‌سازی یک لیتر محیط کشت Pikovskaya ابتدا ۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم کلسیم فسفات، ۰,۵ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰,۲ گرم NaCl، ۰,۱ گرم $MgSO_4$، ۰,۰۰۲ گرم $MnSO_4$، و ۰,۰۰۲ گرم $FeSO_4$ را در آب مقطر حل می‌کنند. سپس حجم محلول را به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده و پس از افزودن ۲۰ گرم آگار، pH محیط را به هفت رسانده و اتوکلاو می‌کنند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه اکتینومیست در پلیت حاوی محیط Pikovskaya کشت داده می‌شود. پس از چند روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی‌ها نشانه توانایی اکتینومیست‌ها در انحلال فسفات است (شکل ۶) (Smirnova et al., 2023; Soltani et al.2010).



شکل۶) ارزیابی انحلال فسفات توسط سویه‌های باکتری، تشکیل هاله شفاف اطراف هر کلنی نشان دهنده انحلال فسفات معدنی است

۴،۴. انحلال پتاسیم

برای انجام آزمون انحلال پتاسیم توسط اکتینومیست‌ها، ابتدا محیط کشت Aleksandrow آماده می‌شود. این محیط شامل گلوکز (۱۰ گرم)، کانی پتاسیم‌دار مانند میکا یا فلدسپار (۰،۲ گرم)، کلسیم فسفات (۲ گرم)، سولفات منیزیم (۰،۵ گرم)، کلرید سدیم (۰،۵ گرم) و در صورت نیاز آگار (۱۵ گرم برای کشت جامد) است که در ۱ لیتر آب مقطر حل شده و با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل می‌شود. سپس، سویه‌های اکتینومیست موردنظر به‌صورت خطی روی محیط جامد یا در محیط مایع کشت و در انکوباتور با دمای ۳۰–۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۴–۷ روز نگهداری می‌شوند. بررسی کیفی با مشاهده کشت‌های جامد انجام می‌شود. وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها در این کشت‌ها نشان‌دهنده انحلال پتاسیم است. قطر این هاله‌ها با خط‌کش دقیق اندازه‌گیری می‌شود. در بررسی کمی، محیط مایع پس از انکوباسیون سانتریفیوژ می‌شود (۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و محلول شفاف به دست آمده برای اندازه‌گیری پتاسیم محلول استفاده می‌شود. میزان پتاسیم آزادشده با استفاده از اسپکتروفتومتر یا فتومتر شعله‌ای تعیین شده و نتایج با نمونه شاهد (بدون تلقیح) مقایسه می‌شود. برای اطمینان از صحت آزمون، از کنترل مثبت (سویه‌ای با توانایی شناخته‌شده در انحلال پتاسیم) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) استفاده می‌شود. اگر هاله شفاف اطراف کلنی مشاهده شود یا غلظت پتاسیم محلول افزایش یابد، نشان‌دهنده توانایی اکتینومیست در انحلال پتاسیم است. نتایج نهایی به‌صورت کیفی و کمی ثبت و تحلیل می‌شود. (شکل ۷) (Verma et al. 2015).



شکل۷) ارزیابی انحلال پتاسیم توسط سویه‌های باکتری، تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی ها نشان دهنده انحلال پتاسیم است

۵،۴. انحلال سیلیس

برای بررسی توانایی اکتینومیست‌ها در انحلال سیلیس، ابتدا محیط کشت اختصاصی تهیه می‌شود. این محیط شامل گلوکز (۱۰ گرم)، پودر کوارتز یا منبع دیگری از سیلیس مانند سیلیکات سدیم یا دی‌اکسید سیلیکون (۰،۵ گرم)، فسفات

دی‌پتاسیم (۱ گرم)، سولفات منیزیم (۰,۵ گرم)، کلرید سدیم (۰,۵ گرم) و آب مقطر است که در اتوکلاو استریل می‌شود. محیط می‌تواند به‌صورت جامد (با افزودن آگار) یا مایع آماده شود. سپس، سویه‌های اکتینومیست مورد نظر روی محیط جامد به‌صورت خطی کشت داده شده یا در محیط مایع تلقیح می‌شوند و در انکوباتور با دمای ۳۰–۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۴–۷ روز نگهداری می‌شوند. برای بررسی کیفی، محیط جامد بررسی می‌شود و وجود هاله شفاف یا تغییر رنگ اطراف کلنی‌ها به دلیل آزاد شدن اسید سیلیسیک نشان‌دهنده انحلال سیلیس است. برای بهتر دیده شدن ناحیه روشن پیرامون باکتری می‌توان از رنگ بروموکرسل پرپل (bromocresol purple) نیز استفاده نمود (شکل ۸). در بررسی کمی، محیط مایع پس از انکوباسیون سانتریفیوژ می‌شود تا سلول‌ها و ذرات معلق جدا شوند. سپس میزان اسید سیلیسیک آزادشده با استفاده از معرف مولیبدات آمونیوم تعیین می‌شود. این واکنش یک کمپلکس آبی‌رنگ تولید می‌کند که شدت رنگ آن با مقدار اسید سیلیسیک آزاد متناسب است. شدت رنگ با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای اطمینان از صحت آزمون، از کنترل مثبت (یک سویه شناخته‌شده با توانایی انحلال سیلیس) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) استفاده می‌شود. هاله شفاف اطراف کلنی در محیط جامد یا افزایش جذب نوری محلول در محیط مایع، نشان‌دهنده توانایی اکتینومیست در انحلال سیلیس است. نتایج به‌صورت کیفی و کمی ثبت و تحلیل می‌شوند تا توانایی سویه‌ها در انحلال سیلیس رتبه‌بندی شود (Soni et al. 2023).

شکل ۸) ارزیابی انحلال سیلیس توسط سویه های باکتری، اطراف باکتری در اثر رنگ بروموکرسل بلو زرد رنگ شده است اما سایر بخش‌های محیط کشت بدون تغییر و به رنگ بنفش باقی مانده است

۶,۴. تثبیت نیتروژن

این آزمایش برای تعیین توانایی باکتری در احیای نیترات به نیتریت یا تولید گازهای نیتروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. احیای نیترات به نیتریت یا نیتروژن ملکولی (N_2) معمولاً در شرایط بی هوازی اتفاق می‌افتد. اکثر باکتری‌های هوازی و بی هوازی اختیاری در نبود اکسیژن، نیترات را احیاء می‌کنند. محصول نهایی احیای نیترات اکثراً به صورت نیتریت، آمونیاک،

نیتروژن مولکولی و هیدروکسیل آمین است. احیاء نیترات به نیتروژن ملکولی یا اکسید نیترو (NO) نیترات زدایی نامیده می شود. در فرآیند نیترات زدایی اگر غلظت نیترات بالا باشد ممکن است که اکسید نیترو تجمع پیدا کند، ولی وقتی که غلظت نیترات پایین باشد، اکسید نیترو به ملکول نیتروژن احیاء می‌شود. بنابراین در آزمایش احیاء نیترات حضور آخرین محصول کاتابولیک یا عدم حضور نیترات در محیط بررسی می‌شود. محیط بکار گرفته شده محیط مایع حاوی نیترات (Nitrate Broth) با pH برابر ۷ و یا محیط نیترات آگار با pH برابر ۸/۶ است. اجزاء اصلی محیط عبارت است از عصاره گوشت (۳ گرم/لیتر)، پیتون (۵ گرم/لیتر) نیترات پتاسیم (۱ گرم/لیتر)، آب مقطر (۱ لیتر) که برای جامد شدن به آن مقدار ۱۵گرم آگار اضافه می‌شود. روش تهیه محیط به این شکل است که اجزاء سازنده محیط را با دقت وزن کرده و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر می‌رسانیم. سپس محیط مایع را در لوله‌های آزمایش توزیع کرده و در هر یک از آنها یک لوله دورهام را به صورت وارونه در داخل محلول قرار می‌دهیم. لوله‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل کرده و تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۱۰-۴ نگهداری می‌کنیم. با لوپ استریل کمی از کشت تازه جدایه باکتری مورد نظر برداشته و هر لوله حاوی محیط نیترات را به صورت سنگین تلقیح می‌کنیم. در این آزمایش از دو شاهد نیز بطور همزمان استفاده می‌شود. لوله شاهد مثبت، با یک باکتری که از نظر احیای نیترات مثبت است تلقیح می‌شود و لوله شاهد منفی اصلا تلقیح نمی‌شود. لوله‌های کشت داده شده به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه می‌شوند. در این آزمایش برای تشخیص احیاء نیترات و تولید نیتریت از دو معرف A و B استفاده می‌شود. معرف A دارای آلفا – نفتیل آمین یا دی متیل – نفتیل آمین است. برای تهیه معرف A مقدار ۵ گرم آلفا– نفتیل آمین یا ۶ گرم دی متیل– نفتیل آمین را در ۱۰۰۰ میلی لیتر اسید استیک به ملایمت حرارت داده تا به طور کاملا حل شود. معرف آماده شده در بطری شیشه‌ای قهوه‌ای نگهداری می‌شود. معرفB دارای ۸ گرم اسید سولفانیلیک است که در ۱۰۰۰ میلی لیتر استیک اسید حل می‌شود و مانند معرف A باید در بطری شیشه‌ای قهوه‌ای دربسته و در تاریکی نگهداری شود (Vaziri, 1984).

تفسیر نتایج آزمایش تثبیت نیتروژن

ابتدا لوله‌های دورهام از نظر تولید گاز مورد مشاهده و بررسی قرار می‌گیرند. اگر حباب گاز در داخل لوله دورهام مشاهده شود و باکتری مورد آزمایش اکسیداز مثبت باشد پاسخ آزمون برای نیترات زدایی مثبت است و جدایه مورد آزمایش دنیتریفیکاتور محسوب می‌شود. اما اگر گاز موجود باشد و باکتری مورد آزمایش تخمیر کننده باشد و یا اگر گازی در لوله دورهام مشاهده نشود، از معرف نیتریت استفاده می‌شود. به این منظور ابتدا قسمت‌های مساوی از معرف‌های A و B را مخلوط و تقریباً ۱۰ قطره از مخلوط حاصل را به لوله محتوی محیط کشت شده افزوده و به آرامی تکان می دهیم. ظهور رنگ قرمز پس از ۱ تا ۲ دقیقه، بیانگر مثبت بودن آزمایش از نظر احیای نیترات و تولید نیتریت است. در صورت عدم مشاهده رنگ قرمز به همین لوله حاوی معـرف نیتریت، مقدار کمی –حدود ۲۰ میلی گرم –از پودر روی کاملاً خالص افزوده و مخلوط به آرامی تکان داده می‌شود. اگر پس از ۵ تا ۱۰ دقیقه هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نشد، نشانه حذف نیترات از محیط است و آزمون احیای نیترات مثبت ارزیابی می‌شود. اما در صورت ظهور رنگ صورتی تا قرمز، نتیجه آزمایش احیای نیترات در مورد جدایه مورد آزمون منفی است. به این معنی که نیترات به حالت احیاء نشده در محیط باقی مانده و پس از افزودن روی به نیتریت تبدیل شده است و این نیتریت تازه تشکیل شده با معرف‌هـا واکنش داده و رنگ قرمز را تولید کرده است (Vaziri, 1984).

۷،۴. تولید ACC–دآمیناز

آزمون توان تولید آنزیم ACC–دآمیناز به روش آمیکو و همکاران (۲۰۰۵) با کمی تغییرات انجام می‌گیرد. به منظور بررسی توان جدایه‌های مورد مطالعه در استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن که می‌تواند نشانه تولید آنزیم ACC–دآمیناز توسط باکتری باشد، جدایه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت TSB کشت داده می‌شوند. سپس ۵۰ میکرولیتر از

کشت تازه هر جدایه به ۲۰ میلی لیتر از سه محیط DF حاوی ۳ میلی‌گرم ACC ، محیط DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم به عنوان شاهد مثبت و محیط DF فاقد ACC و سولفات آمونیوم (به عنوان شاهد منفی) اضافه می‌شود. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، کلنی هایی که در هر سه محیط رشد کرده باشند به عنوان مثبت (تولید کننده آنزیم) در نظر گرفته می شوند (Abbasi et al., 2020).

۸,۴. فعالیت آنتاگونیستی

اکتینومیست‌ها با تولید ترکیبات ضد قارچی و ضد باکتریایی به کنترل بیماری‌های گیاهی کمک می‌کنند. برای بررسی فعالیت آنتاگونیستی این باکتری‌ها از کشت همزمان آن‌ها در محیط PDA(Potato Dextrose Agar) به همراه بیمارگر قارچی یا باکتریایی استفاده می‌شود. به این منظور نخست جدایه‌های اکتینومیستی را به صورت خطی روی محیط کشت می‌دهیم. پس از ۲۴ ساعت، بیمارگر قارچی یا باکتریایی را در مرکز پلیت کشت می‌دهیم. وجود ناحیه بازدارندگی از رشد در اطراف کلنی جدایه بیمارگر نشان‌دهنده فعالیت آنتاگونیستی جدایه اکتینومیستی است (شکل ۹) (Gonfa et al., 2023; Kuddus and Ahmad, 2013; Hsu and Lockwood, 1975).

شکل ۹) ارزیابی برهمکنش باکتری و قارچ بیمارگر (راست: شاهد و چپ: قارچ بیمارگر در وسط و باکتری‌های آنتاگونیست در چهار طرف پلیت)

۵. تولید آنزیم هیدرولیز کننده توسط جدایه‌های محرک رشد

برای بررسی تولید آنزیم‌های پروتئاز، کیتیناز و سلولاز توسط سویه‌های باکتریایی، از محیط‌های کشت جامد اختصاصی استفاده می‌شود. برای پروتئاز، محیط Skim Milk Agar (SMA) شامل ۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خون دار (blood agar) و ۱۳,۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تهیه شده و پس از تلقیح با سویه‌های باکتریایی و انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت، تشکیل هاله بی‌رنگ اطراف کلنی نشان‌دهنده فعالیت پروتئازی است. برای کیتیناز، محیط آگار حاوی ۱,۵ درصد آگار و ۰,۴ درصد کیتین کلوئیدی استفاده شده و پس از تلقیح با سویه‌های باکتریایی و یک هفته انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، تشکیل هاله روشن اطراف کلنی‌ها

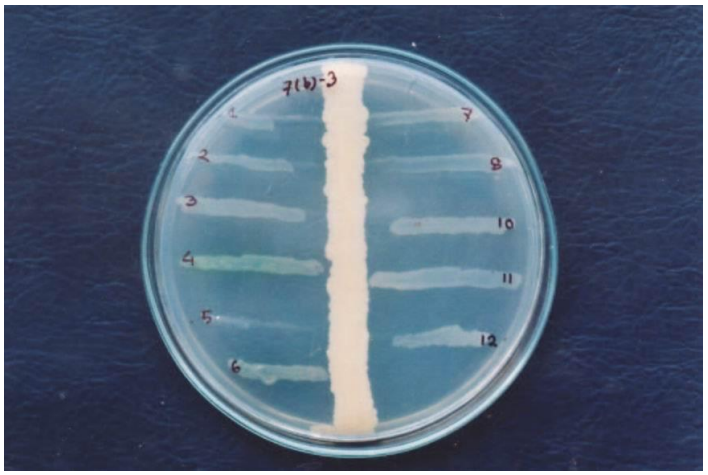
نشان‌دهنده فعالیت کیتینازی است. برای سلولاز، محیط کشت حاوی ۲,۵ گرم کربوکسی متیل سلولز، ۰,۴ گرم KH_2PO_4، ۰,۰۲ گرم $CaCl_2$، ۰,۰۲ گرم NaCl، ۰,۰۲ گرم $FeSO_4.7H_2O$ و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تهیه شده و پس از تلقیح با سویه‌های باکتریایی و یک هفته انکوباسیون و رنگ‌آمیزی با معرف کنگو قرمز و شستشو با کلرید سدیم یک مولار، تشکیل هاله روشن فعالیت سلولازی را نشان می‌دهد (شکل ۱۰).

ج ب الف

شکل ۱۰) ارزیابی تولید آنزیم‌های هیدرولیزی توسط اکتینومیست‌های محرک رشد، الف: پروتئاز ب: سلولاز ج: کیتیناز

۶. کراس استریک جدایه‌های محرک رشد

روش کشت کراس استریک یکی از تکنیک‌های مفید در بررسی اثرات آنتاگونیستی بین سویه‌های میکروبی است. در این روش، سویه اول به‌صورت خطی یا لکه‌ای در مرکز پلیت حاوی محیط کشت جامد مانند GYM کشت می‌شود. پس از انکوباسیون اولیه به مدت ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، باکتری دوم به‌صورت عمودی یا شعاعی کشت می‌شود. پس از انکوباسیون مجدد، نواحی مهار رشد باکتری دوم در اطراف باکتری اول نشان‌دهنده تولید ترکیبات آنتی‌میکروبی توسط باکتری اول است. این روش برای شناسایی تعاملات و جلوگیری از حضور هم‌زمان سویه‌های آنتاگونیست در ترکیبات میکروبی استفاده می‌شود (شکل ۱۱) (Soni et al. 2023; Malek et al., 2015).



شکل۱۱) بررسی توان آنتاگونیستی سویه‌های محرک رشد با استفاده از روش کراس استریک

۷. بررسی مقاومت اکتینومیست‌ها به تنش‌های محیطی

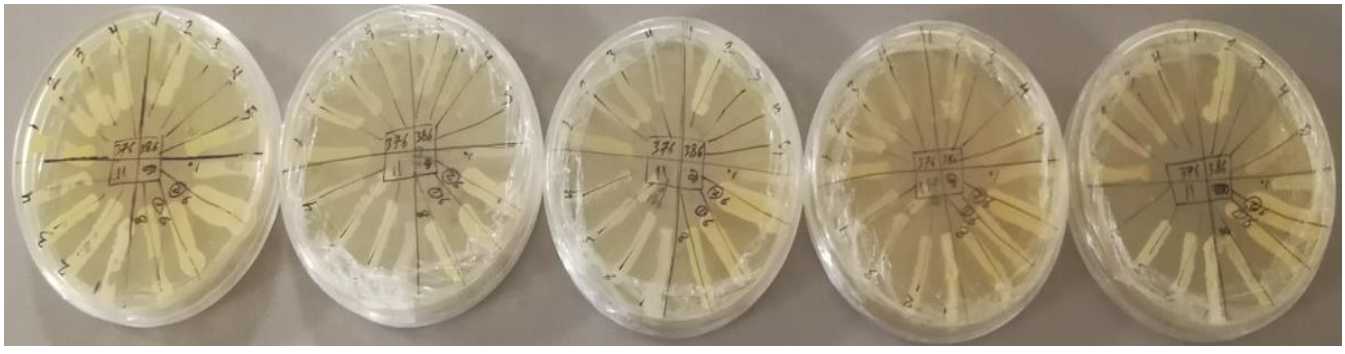
این بخش به منظور ارزیابی تحمل اکتینومیست‌ها به شرایط محیطی دشوار انجام می‌شود. این ارزیابی برای تعیین توانایی اکتینومیست‌ها در زنده ماندن و عملکرد در شرایط مختلف اقلیمی و محیطی در زمان استفاده از آن‌ها برای کاربردهای زیست‌فناوری، کشاورزی و زیست‌پالایی ضروری است. این آزمایش‌ها شامل بررسی تحمل به خشکی، شوری و دماهای مختلف است.

۱،۷. تحمل خشکی

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که می‌تواند بقای میکروارگانیسم‌ها، به ویژه در محیط‌های بیابانی و نیمه‌خشک را محدود کند. برای بررسی مقاومت اکتینومیست‌ها به خشکی، از محیط کشت حاوی پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)برای شبیه‌سازی شرایط کمبود آب، استفاده می‌شود. این ماده با کاهش پتانسیل آب محیط، شرایطی مشابه با تنش خشکی ایجاد کند، بدون اینکه اثر سمی مستقیم بر باکتری داشته باشد. در این آزمایش، اکتینومیست‌ها در محیط کشت LB (لوریا براس) حاوی غلظت‌های مختلف PEG (۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪) کشت داده می‌شوند. پس از انکوباسیون، کلنی‌های باکتریایی از نظر اندازه و تعداد در هر غلظت بررسی می‌شوند. رشد یا عدم رشد در هر غلظت PEG می‌تواند به عنوان شاخصی برای تعیین تحمل خشکی اکتینومیست‌ها مورد استفاده قرار گیرد. اندازه کلنی‌ها و تراکم آن‌ها در هر غلظت، نشانگر مقاومت نسبی جدایه اکتینومیستی به شرایط خشکی است؛ هرچه غلظت PEG بالاتر و رشد باکتری بیشتر باشد، نشان‌دهنده مقاومت بالاتر آن به خشکی است (Ashry et al., 2022).

۲،۷. تحمل شوری

شوری یک عامل محدودکننده دیگر برای رشد میکروارگانیسم‌ها است. تحمل به شوری می‌تواند برای کاربردهای زیست‌فناوری در خاک‌ها یا آب‌های شور مورد استفاده قرار گیرد. برای بررسی اثر شوری، اکتینومیست‌ها در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک NaCl (۳٪، ۶٪ ، ۹٪ و ۱۲٪) کشت داده می‌شوند. نمک با افزایش فشار اسمزی محیط، شرایط شوری را شبیه سازی می‌کند. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، رشد کلنی‌ها از نظر کیفیت (شکل و اندازه) و کمیت (تعداد کلنی‌ها) بررسی می‌شود. اگر اکتینومیست‌ها در غلظت‌های بالاتر NaCl بتوانند رشد کنند، نشان‌دهنده تحمل آنها به شوری بالاتر است. با مقایسه میزان رشد در غلظت‌های مختلف، می‌توان میزان تحمل به شوری هر جدایه اکتینومیست را تعیین کرد (شکل ۱۲) (Ventosa et al. 2015).



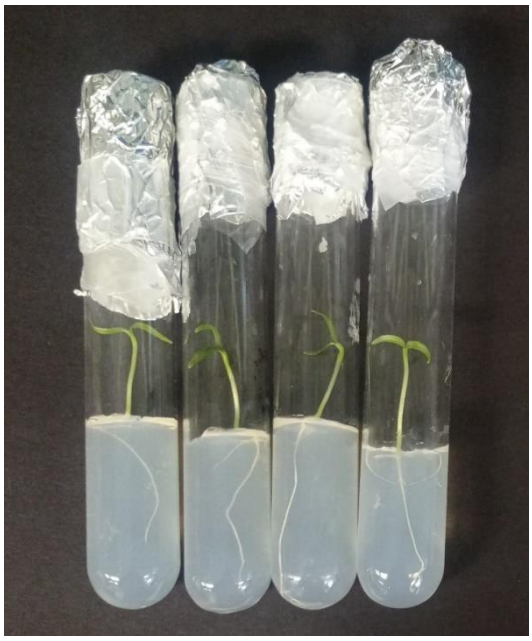
شکل۱۲) بررسی تحمل به شوری سویه‌های محرک رشد باکتریایی (چپ به راست غلظت NaCl: صفر، ۳٪، ۶٪ ، ۹٪، و ۱۲٪)

۳,۷. تحمل دماهای بالا و پائین

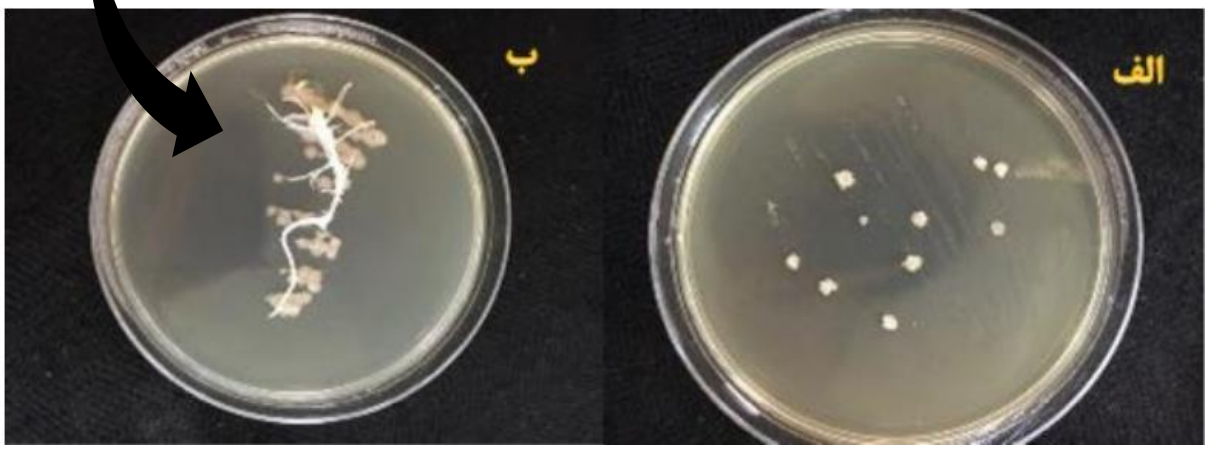
اکتینومیست‌ها ممکن است در محیط‌های بسیار گرم یا بسیار سرد نیز مورد استفاده قرار گیرند، به همین دلیل بررسی تحمل آن‌ها به دامنه دمایی گسترده حائز اهمیت است. این آزمایش برای شناسایی توانایی اکتینومیست‌ها در بقا و رشد در دماهای مختلف طراحی شده است. به این منظور هر یک از جدایه‌های اکتینومیستی در محیط‌های کشت جداگانه کشت داده شده و در دماهای ۴، ۱۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس تیمار می‌شوند. این دماها نمایانگر شرایط دمایی مختلف هستند که می‌توانند با شرایط محیط‌های سرد، معتدل و گرم مطابقت داشته باشند. دماهای پایین (۴ و ۱۰ درجه) برای ارزیابی تحمل به سرما، و دماهای بالا (۴۰ و ۵۰ درجه) برای ارزیابی تحمل به گرما در نظر گرفته شده‌اند. پس از انکوباسیون، رشد و کیفیت کلنی‌ها در هر دما مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. کلنی‌های سالم و با کیفیت در دماهای مختلف، نشان‌دهنده توانایی آن‌ها در تحمل شرایط دمایی متنوع است. اکتینومیست‌هایی که در دماهای بسیار بالا یا بسیار پایین قادر به رشد باشند، برای کاربرد در محیط‌های دمایی غیرمعمول مناسب هستند (Sarikhaniet al., 2019).

۸. بررسی نحوه استقرار باکتری‌های محرک رشد

برای این منظور، ابتدا لوله‌های شیشه‌ای استریل ۲۰ سانتی متری با ۲۵ میلی لیتر محیط آب- آگار(pH=6) پر می‌شوند. پس از ضد عفونی سطحی بذرها با هیپوکلریت سدیم و آبکشی آن‌ها با آب مقطر استریل، به مدت ۲۰ دقیقه داخل سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی با cfu برابر با 10^6 در هر میلی‌لیتر قرار داده می‌شوند. به عنوان شاهد از سرم فیزیولوژی استریل بدون باکتری استفاده می‌شود. در هر لوله استریل، یک بذر کشت شده و به مدت یک هفته در دمای مناسب برای آن گیاه نگهداری می‌شود (شکل ۱۳). برای بررسی اندوفیت شدن باکتری‌ها، ریشه‌های گیاه کشت شده در این شرایط پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم و الکل با سرم فیزیولوژی استریل شسته و به قطعات ۲ سانتیمتری تقسیم می‌شود. این قطعات به مدت ۳ دقیقه در ۲ میلی لیتر سرم استریل ورتکس می‌شوند. از این سرم، سریال رقت تهیه شده و روی محیط کشت GYM کشت می‌شود. برای بررسی کلنیزه شدن باکتری، ریشه‌ها به صورت سالم روی محیط کشت GYM قرار داده می‌شوند (شکل ۱۴) (علی پور کافی و همکاران، ۱۴۰۰).



شکل ۱۳) رشد بذور تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد



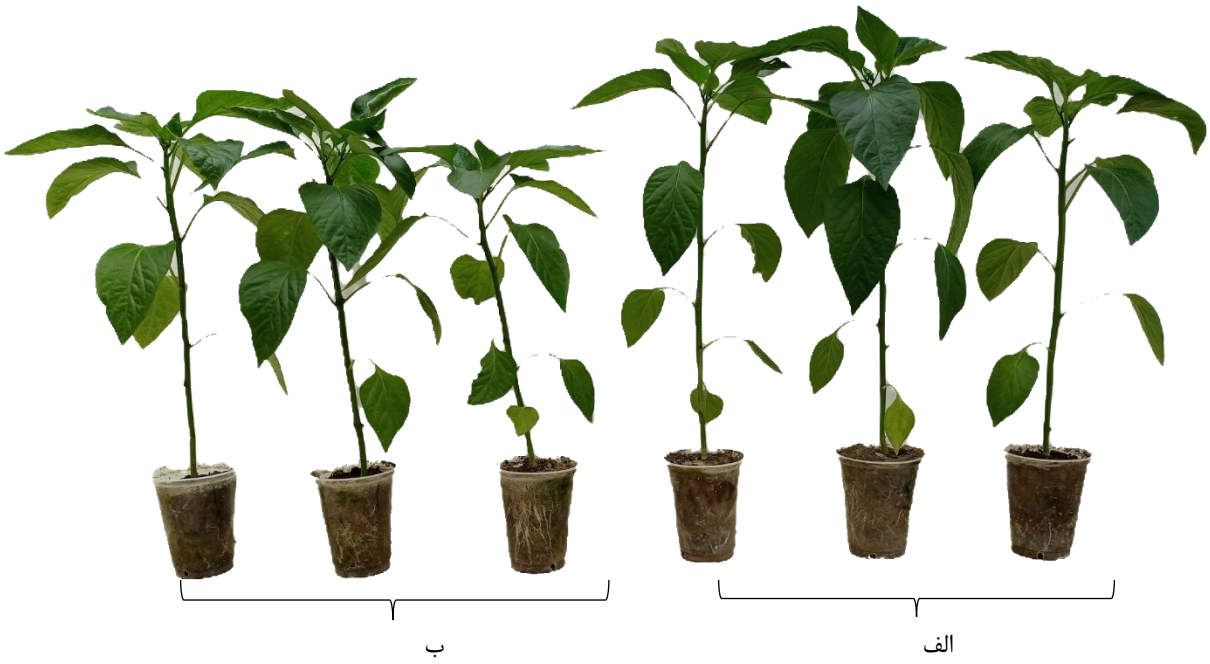
شکل۱۴) نحوه استقرار باکتری‌های محرک رشد در ریشه، الف: باکتری‌های اندوفیت ب: کلنیزه شدن باکتری‌های محرک رشد بر روی ریشه

۹. ارزیابی ویژگی محرک رشد گیاهی باکتری‌های اکتینومیست در گلخانه

برای ارزیابی ویژگی محرک رشد گیاهی، باکتری‌های اکتینومیست به سه روش مختلف تهیه و پای گیاه ریخته می‌شوند. در روش اول باکتری‌ها در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت GYM کشت می‌شوند. ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و بر روی شیکر با دور 120 rpm به مدت ۴ روز قرار داده می‌شوند. سپس سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ در 8000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده‌شده و پس از حذف روشناور، رسوب باکتری در ۵۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی سوسپانسیون شده و یک میلی لیتر پای هر گیاه ریخته می‌شود. در روش دوم، پس از انجام همه مراحل

انجام شده در روش اول، ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون نهایی تهیه شده به ۲۵۰ گرم ماسه استریل اضافه و به خوبی مخلوط می شود. این مخلوط از این پس فرمولاسیون باکتری نامیده می‌شود. پنج گرم از فرمولاسیون باکتری و یا ماسه بدون باکتری (به عنوان شاهد) بلافاصله پس از انتقال گیاهچه یا نشاء به گلدان بر روی سطح هر گلدان در کنار طوقه گیاه اضافه می‌شود. در روش سوم، یک میلی لیتر از کشت مایع باکتری بدون انجام سانتریفوژ و جداسازی سلول باکتری پای بوته‌ها ریخته می‌شود. وجود تیمار شاهد در هرسه روش ارزیابی ضروری است. پس از سپری شدن زمان لازم و رشد گیاهان، بوته‌ها را از خاک خارج کرده و اندازه گیری صفاتی مانند وزن خشک و طول گیاهان انجام می شود (شکل ۱۷–۱۵). در مرحله بعدی آنالیز آماری داده‌های به دست آمده در مقایسه با تیمارهای شاهد، ویژگی محرک رشدی سویه‌ها را تعیین می‌کند.

شکل ۱۵) ارزیابی ویژگی محرک رشد گیاهی جدایه‌های مختلف اکتینومیست. از راست به چپ ویژگی محرک رشدی باکتری‌ها نسبت به کنترل و یکدیگر بیشتر می‌شود.



شکل ۱۶) الف: گیاه تلقیح شده با باکتری محرک رشد ب: گیاه شاهد (بدون تلقیح باکتری)

شکل ۱۷) افزایش ریشه زایی در گیاه تیمار شده با باکتری محرک رشد (سمت راست) در مقایسه با کنترل (سمت چپ)

منابع

خسروی ه. ۱۴۰۰. مروری بر پژوهش‌ها و کاربرد کودهای زیستی در زراعت گندم در ایران، نشریه علمی مدیریت اراضی، ۹ (۲).

نشاط، ا.، احمدیان، م.، خلیلیان، ص .و وکیل پور، م. ۱۳۹۵. تعیین مقدار بهینه اقتصادی مصرف نهاده های شیمایی آلاینده محیط زیست در تولید گندم آبی دشت ورامین .اقتصاد کشاورزی و توسعه، ۲۴ (۹۵): ۱۴۵-۱۲۳ .

علی‌پور کافی، س.، محمدی، ع.، کریمی، ا. ۱۴۰۰. ارزیابی کارایی دو سویه *Amycolatopsis* sp. strain 1119 و *Pseudomonas* sp. strain P3-57 در گلخانه تجاری خیار و بررسی نحوه استقرار آن‌ها و تاثیر آن‌ها بر جمعیت میکروبی خاک. ایمنی زیستی، ۱۴ (۲): ۴۴-۳۱

نصیرزاده، ف.، عی قرلو، م.، خلقتی بناء، ف .و صادقی ، ا. ۱۴۰۰. نیترات و نیتریت :منابع، تاثیر بر سلامتی انسان و کاهش تجمع نیترات در محصولات کشاورزی با استفاده از کودهای زیستی. مجله ایمنی زیستی، ۱۴ (۲): ۱۵-۱.

Abbasi, S., Sadeghi, A., Safaie, N. (2020). *Streptomyces* alleviate drought stress in tomato plants and modulate the expression of transcription factors ERF1 and WRKY70 genes. Journal of Applied Microbiology, 265, 109206.

Abbasi, S., Spor, A., Sadeghi, A., Safaie, N. (2021). *Streptomyces* strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. Journal of Applied Microbiology, 11(1), 9317.

Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., Shamsbakhsh, M. (2019). *Streptomyces* strains induce resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato through different molecular mechanisms. Journal of Applied Microbiology, 10, 1505.

Alexander, D., Zuberer, D. (1991). Use of chrome azur-ol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Journal of Applied Microbiology, 12, 39-45.

Ashry, N.M., Alaidaroos, B.A., Mohamed, S.A., Badr, O.A., El-Saadony, M.T., Esmael, A. (2022). Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Journal of Applied Microbiology, 29(3), 1760-1769.

Bano, A., et al. (2021). Surface Sterilization Techniques in Microbial Isolation from Plant Tissues. Journal of Applied Microbiology, 22(2), 134-142.

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

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

Glick, B.R., Patten, C.L. (2002). Regulation of indole acetic acid production in bacteria. Journal of Applied Microbiology, 68(12), 6195-6203.

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

Han, J., Shi, J., Zeng, L., Xu, J., Wu, L. (2015). Effects of nitrogen fertilization on the acidity and salinity of greenhouse soils. Journal of Applied Microbiology, 22(4), 2976–2986.

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

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

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

Jones, S.E., Elliot, M.A. (2017). *Streptomyces* exploration: competition, volatile communication and new bacterial behaviours. Journal of Applied Microbiology, New York, NY: Elsevier.

Joshi, A., Mahawar, S., Kajala, R., Chauhan, S., Jain, D. (2023). Importance of silica solubilising bacteria in agriculture. Journal of Applied Microbiology, 18, 38.

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

Kettlewell, P., Byrne, R., Jeffery, S. (2023). Wheat area expansion into northern higher latitudes and global food security. Journal of Applied Microbiology, 351, 108499.

Kuddus, M., Ahmad, I.Z. (2013). Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. Journal of Applied Microbiology, 11(1), 39-46.

Mahapatra, D.M., Satapathy, K.C., Panda, B. (2022). Biofertilizers and nanofertilizers for sustainable agriculture: Phycoprospects and challenges. Journal of Applied Microbiology, 803, 149990.

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

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

Mihajlovic, M., Rekanovic, E., Hrustic, J., Grahovac, M., Brankica, T. (2017). Methods for management of soilborne plant pathogens. Journal of Applied Microbiology, 32(1), 9-24.

Mozner, Z., Tabi, A., Csutora, M. (2012). Modifying the yield factor based on more efficient use of fertilizer - The environmental impacts of intensive and extensive agricultural practices. Journal of Applied Microbiology, 16, 58–66.

Newitt, J.T., Prudence, S.M., Hutchings, M.I., Worsley, S.F. (2019). Biocontrol of cereal crop diseases using streptomycetes. Journal of Applied Microbiology, 8(2), 78.

Nousheen, S., Ajmal, I., Song, Y. (2021). Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. Journal of Applied Microbiology, 13(4), 1868.

Pacios-Michelena, S., Aguilar Gonzalez, C.N., Alvarez-Perez, O.B., Rodriguez-Herrera, R., Chavez-Gonzalez, M., Arredondo Valdes, R., Ilyina, A. (2021). Application of Streptomyces antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. Journal of Applied Microbiology, 5, 696518.

Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Zhang, L., Suh, J.W. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. Journal of Applied Microbiology, 97, 9621-9636.

Parte, A., Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Ludwig, W., Suzuki, K.I. (2012). Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 5: the Actinobacteria. Journal of Applied Microbiology, Springer Science & Business Media.

Reddy, K., et al. (2019). Actinomycetes isolation from plant roots and their biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology, 41(7), 871-880.

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

Rostami Mehrueiyeh, R., Shahidi Bonjar, G.H., Aghighi, S., 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*. Journal of Applied Microbiology, 13(2), 21-44.

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

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

Sadeghi, A., Soltani, B.M., Nekouei, M.K., Jouzani, G.S., Mirzaei, H.H., Sadeghizadeh, M. (2014). Diversity of the ectoines biosynthesis genes in the salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation. Journal of Applied Microbiology, 169(9-10), 699-708.

Sarikhani, M.R., Khoshru, B., Greiner, R. (2019). Isolation and identification of temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria as a potential microbial fertilizer. Journal of Applied Microbiology, 35(8), 126.

Sharma, A., et al. (2023). Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from medicinal plants. Journal of Applied Microbiology, 16(4), 203-210.

Smirnova, I., Sadanov, A., Baimakhanova, G., Faizulina, E., Tatarkina, L. (2023). Use of a consortium of agronomically important microorganisms for growing soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Journal of Applied Microbiology, 17(1).

Singh, R., et al. (2020). Endophytic actinobacteria: isolation, identification, and purification methods. Journal of Applied Microbiology, 49, 115-123.

Soltani, A.A., Khavazi, K., Asadi-Rahmani, H., Omidvari, M., Dahaji, P.A., Mirhoseyni, H. (2010). Plant growth promoting characteristics in some *Flavobacterium* spp. isolated from soils of Iran. Journal of Applied Microbiology, 2(4), 106.

Soni, S., Meena, M.K., Kumar, K., Shrimali, N., Singh, A.P., Mahale, M.M., Yadav, S. (2023). Functional characterization of rhizobia for multiple plant growth promoting activities. Journal of Applied Microbiology, 13(11), 3443-3452.

Supaporn, P., Kobayashi, T., Supawadee, C. (2013). Factors affecting farmers' decisions on utilization of rice straw compost in Northeastern Thailand. Journal of Applied Microbiology, 114(1), 21–27.

Thomas, L., Singh, I. (2019). Microbial biofertilizers: types and applications. Journal of Applied Microbiology, Biofertilizers for sustainable agriculture and environment (pp. 1-19). Springer, Cham.

Vaziri, M. (1984). Nitrogen fixation and its role in agriculture. Journal of Applied Microbiology, 10(2), 45-59.

Ventosa, A., de la Haba, R.R., Sanchez-Porro, C., Papke, R.T. (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. Journal of Applied Microbiology, 25, 80-87.

Verma, J.P., et al. (2015). Potassium-solubilizing microorganisms: Mechanisms and applications in enhancing agricultural productivity. Journal of Applied Microbiology, 15(2), 347-355.