

Evaluation of Iron Content in Calcareous Soil Treated With Bacteria Producing Siderophore under Drought Stress

AHMAD ALI POURBABAEI^{1*}, FARZANEH SHOABI¹, HOSSEIN ALI ALIKHANI¹, SOMAYEH EMAMI¹

1. Department of Soil Science, College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran.

(Received: Nov. 26, 2019- Revised: Jan. 22, 2020- Accepted: Jan. 25, 2020)

ABSTRACT

Despite the abundance of iron in the earth's crust and soil, this nutrient is not usually available for plants in calcareous soil with high pH. In the present study four superior isolates with alternative physiological traits (No. 3, 8, 20 and 23) isolated from 10 soil samples for producing siderophore and their contribution in solubilizing insoluble iron-containing compounds in calcareous soil were evaluated. Results showed that in spite of higher halo diameter to colony diameter of isolate No. 23 in CAS agar medium (3.46mm) at soil incubation test, DTPA-extractable iron using isolates No. 3 and 20 was greater than the ones in isolate No. 23 as 10.7 and 14.67 percent, respectively. Greatest amount of DTPA-extractable iron in the soil sample was obtained during 40-days incubation. Molecular test showed that isolate 20 was 99 percent similar to the strain *Bacillus Sporothermodurans*. Biochemical tests also revealed that isolate 8 probably belong to *Enterobacteriaceae* family and isolates 3 and 23 belong to *Pseudomonas* Genus.

Keywords: Iron, Siderophore-Producing Bacteria, Calcareous Soil, Soil Moisture.

*Corresponding Author's Email: Pourbabaei@ut.ac.ir

ارزیابی میزان آهن در خاک آهکی تیمارشده با باکتری‌های مولد سیدروفور تحت تنش خشکی

احمدعلی پوربابایی^{*}، فرزانه شعبی^۱، حسینعلی علیخانی^۱، سمیه امامی^۱

۱. گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۵ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۱۱/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱۱/۵)

چکیده

با وجود فراوانی آهن در پوسته زمین و خاک، معمولاً این عنصر جزء عناصر غذایی محدود برای گیاهان به خصوص در خاک‌های آهکی با pH بالا به شمار می‌آید. در این پژوهش چهار جدایه توانمند با صفات فیزیولوژیک متفاوت (تحت شماره‌های ۳، ۸، ۲۰ و ۲۳) از نظر تولید سیدروفور از ۱۰ نمونه خاک جداسازی شده و نقش آن‌ها در انحلال ترکیبات آهن‌دار غیر محلول در خاک آهکی بررسی شد. نتایج نشان داد که علی‌رغم بیشتر بودن قطر هاله به کلنی جدایه ۲۳ در محیط CAS Agar (۴۳/۶ میلی‌متر)، در آزمون گلخانه‌ای، آهن قابل استخراج با DTPA توسط جدایه‌های ۳ و ۲۰ به ترتیب ۱۰/۷ و ۱۴/۶۷ درصد بیشتر از جدایه ۲۳ است. بیشترین میزان آهن قابل استخراج با DTPA از هر دو نمونه خاک در دوره‌ی انکوباسیون ۴۰ روزه به دست آمد. آزمایش‌های مولکولی نشان داد که جدایه ۲۰ به میزان ۹۹ درصد مشابه سویه *Bacillus sporothermodurans* می‌باشد. همچنین بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی مشخص شد که جدایه ۸ احتمالاً متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* و جدایه‌های ۳ و ۲۳ متعلق به جنس *سودوموناس* هستند.

واژه‌های کلیدی: آهن، باکتری‌های مولد سیدروفور، خاک آهکی، رطوبت خاک.

مقدمه

در مناطق خشک و نیمه خشک با خاک‌های آهکی مانند کشور ایران و مناطق وسیعی از دنیا، کلروز یا زردی بین رگبرگ‌ها در برگ‌های جوان گیاهان به علت کمبود آهن رایج است؛ این در حالی است که اکثر خاک‌های دنیا از نظر مقدار مطلق آهن بسیار غنی می‌باشند و به طور میانگین غلظت آهن در خاک‌های زراعی ۲۰-۴۰ گرم بر کیلوگرم می‌باشد (Cornell and Schwertmann, 2003). در شرایط تهویه و pH سازگار با رشد گیاهان، به واسطه اکسیداسیون سریع و در پی آن، تشکیل هیدروکسیدهای غیر محلول آهن آزاد و قابل جذب گیاه در خاک بسیار اندک است (Epstein and Bloom, 2005). حلالیت آهن با کاهش pH به شدت افزایش می‌یابد؛ به طوری که از pH حدود ۷، به ازاء هر یک واحد کاهش pH، حلالیت آهن ۱۰۰۰ بار افزایش می‌یابد اما در چنین pH، رشد اکثر گیاهان مختل خواهد شد (Crowley, 2006). جبران این کمبود با استفاده از کودهای شیمیایی رایج (کلات آهن) به جز در مورد درختان میوه سودآور، برای سایر محصولات زراعی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست، همچنین تولید ژنوتیپ‌های مقاوم به کمبود آهن که به لحاظ فیزیولوژیک در جذب آهن موثر باشند و یا انتخاب رقم‌های مقاوم در شرایط مزرعه‌ای نیز به دلیل غیریکنواخت بودن خاک‌ها و شرایط محیطی بسیار پیچیده است. به دلیل وجود این قبیل

مشکلات، امکان استفاده از توانایی گروه‌های میکروبی تولیدکننده سیدروفور مورد توجه بیشتری می‌باشد. لذا تولید این ترکیبات را می‌توان از جمله روش‌های زیستی دانست که موجب افزایش حلالیت و قابلیت جذب آهن در خاک‌های قلیایی می‌شوند (Ferreira et al., 2019).

با توجه به سازگاری ریزسازواره‌ها با شرایط محیطی و اقلیمی زیستگاه خود، استفاده از باکتری‌های غیربومی که از مناطقی با ویژگی‌های متفاوت نسبت به شرایط اقلیمی کشور به دست آمده‌اند، برای تولید کود زیستی و استفاده از آن‌ها در شرایط اقلیمی کشور، مسلماً از کارایی کافی برخوردار نخواهد بود. بنابراین استفاده از باکتری‌های بومی که با شرایط خاک و اقلیم کشور سازگار هستند، برای تولید کود زیستی از ارزش ویژه‌ای برخوردار است. Sarode et al. (2007) تعدادی از باکتری‌های مولد سیدروفور را از ریزوسفر تعدادی از گیاهان مهم جداسازی و مورد شناسایی قرار دادند. در این مطالعه باکتری *P.putida DFC* 31 قادر بود که جوانه‌زنی و رشد بذرهای بادام زمینی را بهبود بخشد و بر روی قارچ‌های بیماری‌زای *فوزاریوم* و *آسپرژیلوس* اثر بازدارندگی خوبی داشته باشد. تجزیه سیدروفورها نشان داد که مولکول سیدروفور حاوی گروه‌های کلات‌کننده آهن شامل هیدروکسامات‌ها و کاتکلات بودند.

بررسی Biari et al. (2008) نشان داد که تلقیح ذرت با

آگار پخش شد. صفحه‌ها به مدت ۲۴ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه قرار داده شدند. بعد از گذشت مدت زمان مذکور با توجه به خصوصیات ظاهری باکتری از هر پلیت ۴-۵ کلنی انتخاب شد و پس از خالص‌سازی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمون تولید سیدروفور توسط باکتری‌ها با استفاده از روش (Schwyn and Neilands, 1987) و بر اساس استفاده از محیط کشت پایه‌ای به نام کروم آزرول-اس (CAS)^۱ بر روی جدایه‌ها صورت گرفت. هاله نارنجی اطراف کلنی‌ها نشان‌دهنده توان تولید سیدروفور بوده و ارزیابی توان تولید سیدروفور توسط باکتری‌ها از طریق محاسبه نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD)^۲، ۱۲۰ ساعت پس از کشت انجام شد. اندازه‌گیری کمی تولید ایندول استیک اسید (اکسین) به روش بریک در محیط کشت مایع رنگی در نتیجه استفاده از محلول سالکوفسکی و با قرائت دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (Bric et al., 1991). مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. در مرحله بعد به منظور بررسی توان جدایه‌های ریزوسفری در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول، از محیط کشت اسپربر استفاده شد (Sperber, 1958).

به منظور بررسی تأثیر جدایه‌های انتخاب شده در فراهمی آهن در خاک‌های آهکی در شرایط تنش خشکی، آزمایشی به صورت فاکتوریل و بر مبنای طرح بلوک‌های کامل تصادفی در دو نمونه خاک آهکی با سه تکرار، همراه با چهار سویه باکتری مولد سیدروفور به همراه تیمار شاهد (فاقد باکتری) در سه سطح رطوبتی (۶۰-۴۵، ۷۰-۶۰ و ۸۵-۷۰ درصد ظرفیت زراعی) انجام شد. از میان خاک‌های نمونه‌برداری شده با توجه به مقادیر آهن قابل جذب گیاه، دو نمونه خاک آهکی جهت عملیات انکوباسیون انتخاب شد. نمونه خاک‌ها پس از هوا خشک شدن و عبور از الک دو میلی‌لیتری به طور یکنواخت مخلوط شده و خصوصیات شیمیایی و فیزیکی آن‌ها اندازه‌گیری شد و برای استفاده در گلدان از الک چهار میلی‌متری عبور داده شدند (Sparks, 1996).

جهت تهیه زادمایه از جدایه باکتری‌های منتخب، ابتدا جدایه باکتری‌ها بر روی محیط جامد نوترینت آگار بازکشت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از رشد جدایه باکتری‌ها، یک لوپ از کشت تازه هر جدایه به درون یک فلاسک یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط نوترینت براث مایه‌زنی و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت با شدت ۱۲۰ دور در دقیقه (rpm) تکان داده شدند. سپس یکسان‌سازی جمعیت به نحوی صورت

باکتری‌های آروسپریلیوم لیپوفروم و آرتوباکتر کروکوم تأثیر معنی‌داری در افزایش ارتفاع، وزن خشک ساقه، تعداد دانه و جذب نیتروژن، فسفر، پتاسیم، روی، آهن و مس گذاشت. *Khosravi et al.* (2009) در یک آزمایش گلدانی اثر تلقیح ریشه نهال سیب با چند سویه باکتری‌های بومی خاک بر جذب عناصر و برخی شاخص‌های رشد را بررسی کردند و نتایج نشان داد که تلقیح، جذب پتاسیم، منیزیم، آهن، منگنز، روی و بر را توسط برگ‌ها و همچنین مقادیر جذب ازت، پتاسیم، فسفر، منگنز و روی توسط ریشه را افزایش داده است. *Mohammadi et al.* (2010)، افزایش عملکرد دانه ناشی از استفاده از باکتری‌های محرک رشد در گیاهان زراعی نظیر گندم و آفتابگردان را گزارش کردند. نتایج بررسی *Hamidi et al.* (2011) نشان داد که تلقیح ترکیبی گیاه ذرت با باکتری‌های آروسپریلیوم لیپوفروم، آروسپریلیوم براسیلنس و سودوموناس فلورسنس موجب افزایش وزن خشک ریشه، ساقه و طول گیاه شد. تحقیقات *Braccini et al.* (2012) نیز نشان داد که تلقیح گیاه ذرت با زادمایه مایع حاوی باکتری آروسپریلیوم براسیلنس باعث افزایش وزن خشک گیاه و عملکرد دانه در مقایسه با شاهد شد.

با وجود اینکه مطالعات زیادی در زمینه تلقیح مستقیم باکتری‌های مولد سیدروفور بر روی بذور گیاهان زراعی، قلمه گیاهان زینتی بوته محصولات باغبانی در سطح دنیا و ایران صورت گرفته است اما مطالعات اندکی به بررسی تغییرات غلظت آهن محلول در خاک تحت تأثیر تلقیح این باکتری‌ها در شرایط خشکی پرداخته پرداختند. از این رو پژوهش حاضر به جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد سیدروفور و تأثیر این باکتری‌ها روی تغییرات زمانی غلظت آهن محلول خاک در سطوح مختلف آبیاری می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی باکتری‌های مولد سیدروفور، نمونه‌برداری در تیر ماه سال ۱۳۹۰ از خاک‌های منطقه هشتگرد-نظر آباد کرج تحت کشت‌های مختلف در عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری انجام شد. بدین منظور ۱۰ نمونه خاک تهیه شد. سپس نمونه‌ها تا آغاز مراحل جداسازی در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جداسازی، مقدار ۱۰ گرم از خاک ریزوسفری به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (نه گرم در لیتر نمک طعام) اضافه شد. سپس با استفاده از این رقت اولیه (10^{-1})، سری‌های بعدی رقت 10^{-2} تا 10^{-7} در سرم فیزیولوژیک تهیه شد. سپس از هر رقتی، ۰/۱ میلی‌لیتر بر روی محیط کشت نوترینت

گرفت که سوسپانسیون جدایه باکتری (زادمایه)ها دارای جمعیت تقریبی 1×10^8 cfu/ml سلول باکتری باشد.

یک روز قبل از شروع عملیات، گلدان ها به رطوبت های مورد نظر رسیدند و برای جلوگیری از تبخیر، درب گلدان ها با یک لایه کاغذ آلومینیومی که روی آن سوراخ های کوچکی برای تنفس میکروب ها ایجاد شده بود، پوشانده شدند. میزان ۲۵ میلی لیتر مایه تلقیح با استفاده از پیپت استریل به نمونه ها اضافه شد. همچنین برای تیمار شاهد ۲۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. سپس گلدان ها در دمای ۲۷ الی ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ روز قرار گرفتند و در بازه های زمانی ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز از گلدان ها نمونه برداری انجام شد. نمونه برداری در عمق یکسان از همه گلدان ها به صورت یکنواخت انجام شد و پس از هوا خشک نمودن به مدت ۲۴ ساعت و عبور از الک دو میلی متری، میزان آهن قابل استخراج با HNO_3 چهار نرمال (معادل آهن کل) و DTPA (معادل آهن محلول) با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Shimadzo japan-AA 670 اندازه گیری شدند (Sparks, 1996).

شناسایی باکتری ها بر اساس برگی منوال و با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی مانند: رنگ آمیزی گرم، آزمون OF، آزمون سترات، آزمون لسیتیناز، آزمون تریپل شوگر آبیرون و تست اوره از انجام شد (Parry et al., 1983). برای شناسایی مولکولی جدایه ها پس از استخراج DNA، PCR آن از ژن 16S rRNA تکثیر و از طریق شرکت تکاپوزیست به شرکت Macrogen در کره جنوبی ارسال شده و با توالی خوان ABI3730 XL، خوانده شد. ترادف دریافت شده از شرکت، توسط نرم افزار chromas بازخوانی و ویرایش شده و سپس با استفاده از ابزار BLAST، نوکلئوتیدی با توالی های ثبت شده در پایگاه داده اطلاعات ژنومی Eztaxon مقایسه شده و میزان شباهت آن با سویه های مختلف ثبت شده، تعیین شد (Sambrook et al., 2001).

نتایج حاصل به کمک نرم افزار MSTAT- C تجزیه و جداول تجزیه واریانس مربوطه تهیه شد. همچنین مقایسه میانگین داده ها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح پنج درصد محاسبه شد.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج حاصل از آزمون توان تولید سیدروفور سعی شد که جدایه های ۳، ۸، ۲۰ و ۲۳ با ویژگی های متفاوت از بین جدایه های جداسازی شده به منظور عملیات گلخانه ای انتخاب شده و صفات محرک رشدی در آن ها بررسی شود. همان طور که در جدول (۱) مشاهده می شود، بیشترین قطر هاله به کلنی مربوط

به جدایه ۲۳ با مقدار $3/46$ میلی متر در روز پنجم بود. توانایی بسیار بالای تولید سیدروفور توسط جدایه های مختلفی از باکتری های سودوموناس گزارش شده است (Meyer, 2000). نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید سیدروفور توسط Abbas-Zadeh et al. (2010) نشان داد که تمام سویه های سودوموناس توانستند بر روی محیط کشت CAS آگار هاله نارنجی رنگ که دلیلی بر تولید سیدروفور است، ایجاد کنند. متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلونی در سویه ها بین $0/37$ تا $2/73$ متغیر بود. تمامی جدایه ها قادر به تولید IAA بودند و اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در بین جدایه ها از لحاظ تولید IAA مشاهده نشد. مقدار تولید در بین جدایه های بررسی شده از $41/42$ تا $78/96$ ppm (متغیر بود و متوسط آن، $63/96$ ppm به دست آمد (جدول ۱)). گزارش شده که بیش از ۸۰ درصد باکتری های ریزوسفری توان تولید IAA را از پیش ماده ال-تریپتوفان موجود در ترشحات ریشه ای یا از پروتئین های آزاد شده از سلول های باکتریایی مرده دارند (Patten and Glick, 2002). Anjum et al. (2011) گزارش نمودند که تمامی جدایه های ریزوبیومی جداسازی شده از گره های ریشه لوبیا قرمز در حضور ال-تریپتوفان توانایی تولید IAA را دارند. بر اساس نتایج آزمون نیمه کمی توان انحلال فسفات های نامحلول معدنی مشخص شد که سه جدایه ۳، ۲۰ و ۲۳ توان حل فسفات را دارند. متوسط قطر هاله به کلنی $2/11$ میلی متر و جدایه ۲۳ دارای حداکثر نسبت HD/CD ($2/67$ میلی متر) بود. جدایه ۸ فاقد توان انحلال فسفات های نامحلول معدنی بود (جدول ۱). بررسی همبستگی بین میزان فسفر انحلال یافته و pH محیط نشان داد که رابطه معنی داری بین این دو شاخص وجود دارد. Rashid et al. (2004) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. بر اساس نتایج آزمون توان تولید سیانید هیدروژن مشخص شد که تنها جدایه ۳ قادر به تولید سیانید هیدروژن می باشد. این جدایه توانست در مدت یک روز رنگ زرد محیط را به آجری تغییر دهد. نتایج آزمایش های بیوشیمیایی در جدول (۲) گزارش شده است. آزمون گرم نشان داد که جدایه های ۳، ۸ و ۲۳ گرم منفی و جدایه ۲۰ گرم مثبت هستند. آزمون KOH نیز موید آزمون گرم بود. نتایج آزمون اکسیداز نشان داد که جدایه های ۸ و ۲۰ اکسیداز منفی و جدایه های ۳ و ۲۳ اکسیداز مثبت هستند. در آزمون کاتالاز نیز دیده شد که جدایه ها کاتالاز مثبت هستند؛ همچنین تمامی جدایه ها ستراتاز مثبت و لیسیتیناز منفی بودند. در مجموع بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی و مورفولوژیک مشخص شد که جدایه ۸ احتمالاً متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* و جدایه های ۳ و ۲۳ متعلق به جنس *سودوموناس* هستند. بر اساس مقایسه توالی 16S rRNA، جدایه ۲۰ به میزان ۹۹ درصد مشابه

الامکان شوری و میزان آهک آن برای رشد گیاه مناسب باشد. pH و بافت خاک مورد استفاده نیز از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد؛ چرا که سنگین بودن بافت و در نتیجه کاهش سطح اکسیژن و نسبت $O_2: CO_2$ موجب کاهش تولید سیدروفور می‌شود (Tavaria and Zuberer, 1998).

جدول ۱- خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های منتخب در آزمون گلخانه‌ای

جدایه	Sid (HD/ CD) (mm)	تولید IAA (ppm)	P (HD/ CD) (mm)	تولید HCN
۳	۳/۱۷	۷۴/۲۴	۲/۰۰	آجری
۸	۱/۴۰	۷۸/۹۶	-	زرد
۲۰	۱/۵۵	۴۱/۴۲	۱/۶۶	زرد
۲۳	۳/۴۶	۶۱/۲۴	۲/۶۷	زرد

جدول ۲- خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های منتخب در آزمون گلخانه‌ای

جدایه	گرم	KOH	اکسیداز	کاتالاز	تحرک	آرژنین دی هیدرولاز	ذوب ژلاتین	OF	سیتراز	لیسیتیناز
۳	-	-	+	+	+	+	+	+/-	+	-
۸	-	-	-	+	-	-	+	+/+	+	-
۲۰	+	+	-	+	+	-	+	+/-	+	-
۲۳	-	-	+	+	-	+	+	+/-	+	-

جدول ۳- نتایج آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی دو خاک منتخب در آزمون گلخانه‌ای

مقادیر در خاک نمونه اول	مقادیر در خاک نمونه دوم	خصوصیات خاک
لوم شنی	لوم شنی	بافت
۱۴/۸۳	۱۲/۷۶	درصد ظرفیت زراعی (FC)
۸/۵	۸/۳	pH (عصاره اشباع)
۰/۸۲	۰/۶۲	EC عصاره اشباع (ds/m)
۰/۵۵	۲/۰۴	ماده آلی (%/.) به روش والکی بلک
۱۰/۱۷	۶/۱	کربنات کلسیم معادل (%/.) به روش کلسیمتری
۰/۰۵	۰/۰۳	نیتروژن کل (%/.) به روش کج‌لدال
۷/۲۶	۰/۵۳	فسفر (mg/ kg) به روش اولسن
۲۴۹/۳۷	۱۳۹/۸۷	پتاسیم (mg/ kg) به روش عصاره گیری با استات آمونیوم
۲/۰۱	۲/۰۹	آهن قابل استخراج با DTPA (mg/ kg)

آمده، اعمال شرایط رطوبتی مختلف در فعالیت باکتری‌ها تأثیری نداشته و اختلاف معنی‌داری در میزان آهن در شرایط رطوبتی مختلف مشاهده نشد. اعمال دوره‌های ۲۰ روزه انکوباسیون در میزان فعالیت باکتری‌ها در جهت محلول ساختن آهن، اثربخش بوده و همان‌طور که در جدول (۵) مشاهده می‌شود، پس از گذشت ۴۰ روز بیشترین میزان آهن محلول در خاک وجود دارد. در این دوره میزان آهن محلول نسبت به ۲۰ روز اول ۶۹ درصد افزایش داشته است؛ در حالی که با گذشت زمان بیش از ۴۰ روز میزان آهن محلول روند نزولی گرفته و در دوره ۲۰ روز سوم، ۲۳۴/۹۱ درصد کاهش پیدا کرده است. اعمال تیمارهای متفاوت

Bacillus sporothernodurans سویه‌ی M₂₁₅ بود که در Gen Bank با شماره MN880169 ثبت شد.

نتایج آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی دو نمونه خاک مورد استفاده در آزمون گلخانه‌ای در جدول (۳) نشان داده شده است. برای انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای به خاکی با میزان آهن پایین نیاز بود تا امکان تولید سیدروفور توسط جدایه‌های منتخب در آن تحقق یابد، زیرا یکی از مهمترین عوامل موثر در تولید سیدروفورهای میکروبی، مقدار آهن قابل جذب موجود در محیط می‌باشد. به همین دلیل در بررسی توان تولید سیدروفور ریزسازواره‌های مختلف، از محیط کشت بدون آهن یا محیط کشت با آهن حداقل استفاده می‌شود. تولید سیدروفور معمولاً زمانی آغاز می‌شود که غلظت آهن III کمتر از $20 \mu M$ باشد. همچنین حتی

نتایج تجزیه واریانس آهن قابل استخراج با HNO_3 چهار نرمال و DTPA (ppm) در جدول (۴) نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان آهن قابل استخراج با HNO_3 چهار نرمال در دو خاک دارای مقادیر متفاوتی می‌باشد و در نتیجه میزان محلول‌سازی آن نیز متفاوت بوده است؛ به طوری که میزان آهن قابل استخراج با HNO_3 چهار نرمال در خاک یک ۷/۲۴ درصد بیشتر از خاک دو بوده، در حالی که میزان آهن محلول (آهن قابل استخراج با DTPA) در خاک یک ۸۵/۷۱ درصد بیشتر از خاک دو بوده است که این امر می‌تواند حاکی از فعالیت بیشتر ریزسازواره‌ها در خاک یک باشد. همچنین بر اساس نتایج به دست

باکتری برای محلول ساختن آهن در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی دار داشته است. بر اساس نتایج به دست آمده، جدایه‌های ۲۰ و ۳ بیشترین فعالیت را در جهت محلول ساختن آهن داشته‌اند؛ به طوری که توانسته‌اند میزان آهن محلول را به ترتیب به میزان ۴۶/۵۹ و ۴۱/۴۸ درصد افزایش دهند.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس تأثیر اعمال تیمارهای مختلف بر مقدار آهن خاک (mg/kg)

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
آهن قابل استخراج با DTPA	آهن قابل استخراج با HNO ₃		
۱۲۵/۰۴**	۲۱۷۰۴۷۰۸/۹۸**	۱	شماره خاک (A)
۰/۰۹ n.s	۲۲۳۹۹۹۲/۰۵ n.s	۲	رطوبت (B)
۰/۰۳ n.s	۵۰۴۲۲۲/۵۹*	۲	AB
۱۴۰/۷۹**	۵۱۱۷۵۲۴۵/۳۳**	۲	دوره انکوباسیون (C)
۲۶/۲۸**	۱۴۳۹۰۵۸۵/۰۱**	۲	AC
۱/۳۴**	۳۵۲۷۵۵۵/۷۴*	۴	BC
۰/۴۶ n.s	۱۹۹۵۴۲۵/۵۶ n.s	۴	ABC
۵/۸۵**	۵۹۸۴۶۰/۹۶ n.s	۴	باکتری (D)
۰/۵۴ n.s	۲۴۷۱۷۸۴/۳۹ n.s	۴	AD
۱/۴۹**	۵۱۹۱۱۰/۰۵ n.s	۸	BD
۳/۲۳**	۱۵۲۱۷۴۸/۳۸ n.s	۸	ABD
۳/۰۰**	۴۱۱۲۷۳۵/۲۵**	۸	CD
۱/۹۶**	۲۰۹۲۷۱۹/۲۸ n.s	۸	ACD
۱/۲۹**	۲۵۸۴۶۲۳/۸۳ n.s	۱۶	BCD
۳/۱۳**	۴۳۸۸۹۳۷/۹۳**	۱۶	ABCD
۰/۲۴	۱۴۰۹۴۱۴/۲۸	۱۷۸	خطا

**، * و ns به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی داری.

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده تأثیر انکوباسیون و باکتری‌های محرک رشد بر میزان آهن خاک (mg/kg)

زمان نمونه برداری	آهن قابل استخراج با H ₃ NO ₃	آهن قابل استخراج با DTPA
۲۰ روزه	۷۲۵۲ b	۲/۱۰ b
۴۰ روزه	۸۶۱۶ a	۳/۵۵ a
۶۰ روزه	۸۴۹۳ a	۱/۰۶ c
جدایه باکتری	آهن قابل استخراج با H ₃ NO ₃	آهن قابل استخراج با DTPA
شاهد	۸۰۲۴ a	۱/۷۶ c
۳	۸۱۴۶ a	۲/۴۹ a
۸	۸۰۶۴ a	۲/۱۰ b
۲۰	۸۲۹۱ a	۲/۵۸ a
۲۳	۸۰۷۶ a	۲/۲۵ b

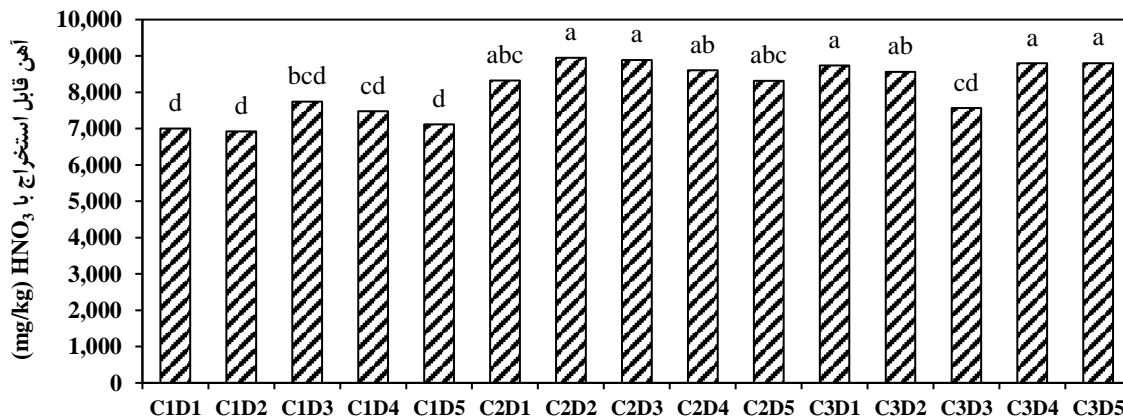
میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند.

و دوره انکوباسیون ۴۰ روزه، بیشترین تأثیر را در فعالیت باکتری‌های محرک رشد گیاه داشته است. کاهش میزان آهن انحلال یافته می‌تواند به دلیل مورد استفاده قرار گرفتن آن توسط ریزسازواره‌ها باشد. همچنین احتمال تغییر ماهیت شیمیایی آهن از فرم محلول به فرم نامحلول نیز وجود دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که زمان نمونه برداری نباید بیش از ۴۰ روز به طول

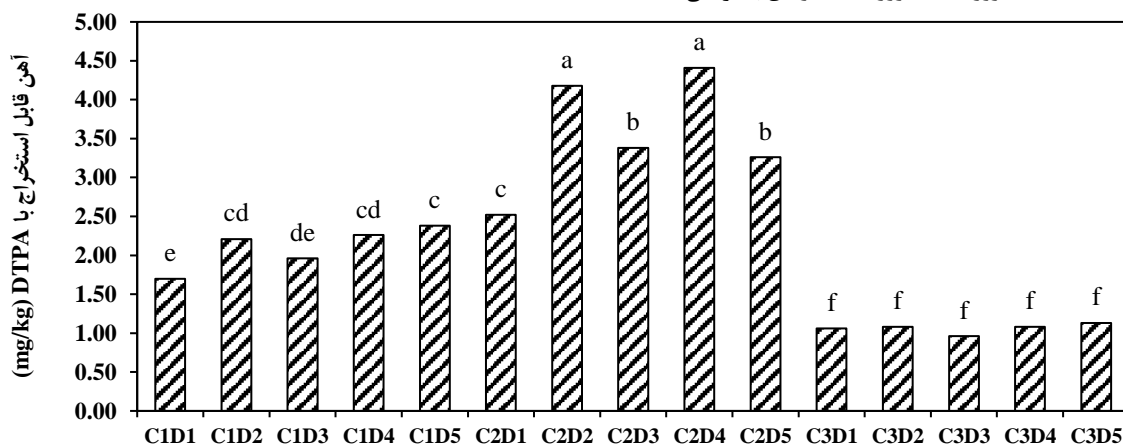
اثرات متقابل تأثیر دوره انکوباسیون در باکتری‌های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل استخراج با HNO₃ و DTPA در شکل‌های (۱ و ۲) قابل مشاهده می‌باشند. بر این اساس، دوره انکوباسیون ۲۰ روزه کمترین تأثیر را در باکتری‌های محرک رشد گیاه بر میزان آهن قابل استخراج با HNO₃ داشته است. در مورد آهن قابل استخراج با DTPA، دوره انکوباسیون ۶۰ روزه، کمترین

شد. در خصوص آهن قابل استخراج با DTPA نیز می توان گفت که بیشترین میزان آن در دوره انکوباسیون ۴۰ روزه و سطح رطوبتی ۰/۶ - ۰/۷ و ۰/۴۵ - ۰/۶ درصد رطوبت زراعی رخ داد.

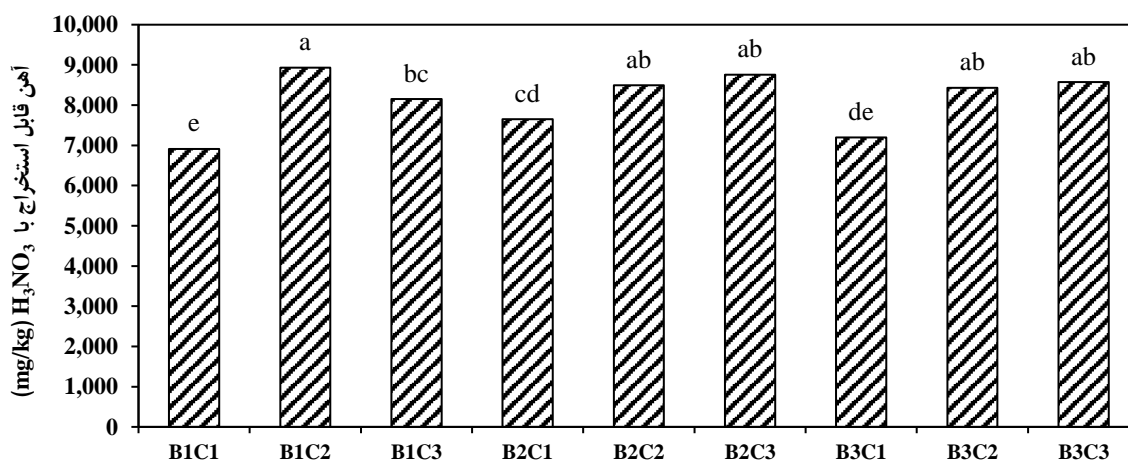
بیانجامد. اثرات متقابل تأثیر دوره انکوباسیون در رطوبت خاک بر مقدار آهن قابل استخراج با HNO_3 و DTPA نیز در شکل های (۳ و ۴) دیده می شوند. کمترین میزان آهن قابل استخراج با HNO_3 در دوره انکوباسیون ۲۰ روزه در پایین ترین سطح رطوبت مشاهده



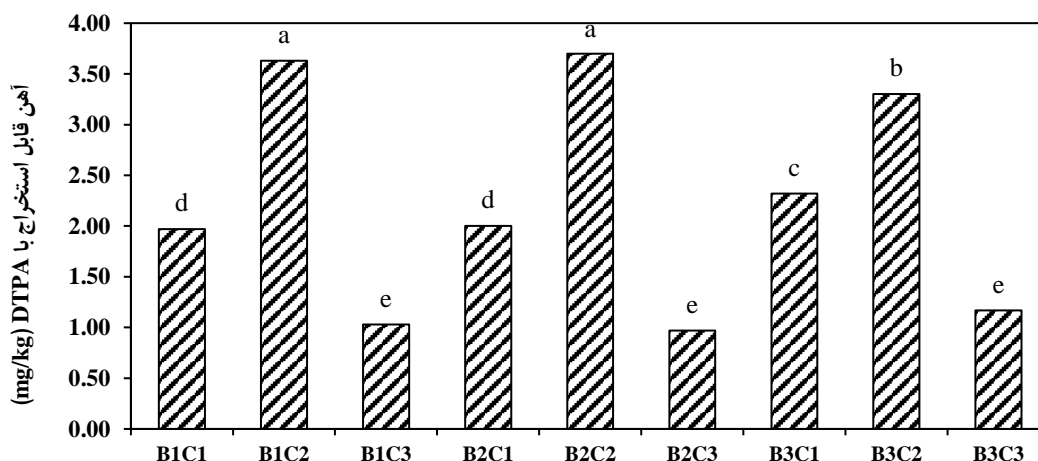
شکل ۱- اثرات متقابل تأثیر دوره انکوباسیون در باکتری های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل استخراج با HNO_3 خاک. C: دوره انکوباسیون؛ C₁: ۲۰ روز، C₂: ۴۰ روز، C₃: ۶۰ روز، D: تیمارهای باکتریایی؛ D₁: شاهد، D₂: جدایه ۸، D₃: جدایه ۲۰، D₄: جدایه ۳، D₅: جدایه ۲۳.



شکل ۲- اثرات متقابل تأثیر دوره انکوباسیون در باکتری های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل استخراج با DTPA خاک. C: دوره انکوباسیون؛ C₁: ۲۰ روز، C₂: ۴۰ روز، C₃: ۶۰ روز، D: تیمارهای باکتریایی؛ D₁: شاهد، D₂: جدایه ۸، D₃: جدایه ۲۰، D₄: جدایه ۳، D₅: جدایه ۲۳.



شکل ۳- اثرات متقابل تأثیر دوره انکوباسیون در رطوبت خاک بر مقدار آهن قابل استخراج با HNO_3 خاک. B: سطوح مختلف رطوبتی B1: ۰/۶ - ۰/۴۵، B2: ۰/۷ - ۰/۸۵، B3: ۰/۶ - ۰/۷؛ C: دوره انکوباسیون؛ C₁: ۲۰ روز، C₂: ۴۰ روز، C₃: ۶۰ روز



شکل ۴- اثرات متقابل تأثیر دوره انکوباسیون در رطوبت خاک بر مقدار آهن قابل استخراج با DTPA خاک. B: سطوح مختلف رطوبتی B1: ۰/۶-۰/۴۵، B2: ۰/۷-۰/۴۵، B3: ۰/۶-۰/۸۵، C: دوره انکوباسیون C1: ۲۰ روز، C2: ۴۰ روز، C3: ۶۰ روز

شده است. بر اساس این نتایج، بیشترین میزان آهن در خاک یک مشاهده می‌شود که در این خاک سطح بحرانی رطوبت با تیمار شاهد، کمترین میزان آهن را به خود اختصاص داده است.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تأثیر شماره خاک در سطوح مختلف رطوبتی در باکتری‌های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل استخراج با DTPA (mg/kg) در جدول (۶) نشان داده

جدول ۶- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تأثیر نمونه‌های متفاوت خاک در سطوح مختلف رطوبتی در باکتری‌های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل

استخراج با DTPA (mg/kg)			
تیمار	آهن قابل استخراج با DTPA	تیمار	آهن قابل استخراج با DTPA
A ₁ B ₁ D ₁	۲/۱۰ ef	A ₂ B ₁ D ₁	۱/۵۲ g-j
A ₁ B ₁ D ₂	۲/۹۳ b-d	A ₂ B ₁ D ₂	۱/۴۳ g-j
A ₁ B ₁ D ₃	۲/۸۱ cd	A ₂ B ₁ D ₃	۱/۴۹ g-j
A ₁ B ₁ D ₄	۴/۱۵ a	A ₂ B ₁ D ₄	۱/۸۸ fg
A ₁ B ₁ D ₅	۲/۵۹ c-e	A ₂ B ₁ D ₅	۱/۲۲ h-j
A ₁ B ₂ D ₁	۲/۴۰ d-e	A ₂ B ₂ D ₁	۱/۰۵ j
A ₁ B ₂ D ₂	۴/۱۲ a	A ₂ B ₂ D ₂	۱/۱۳ ij
A ₁ B ₂ D ₃	۲/۴۴ de	A ₂ B ₂ D ₃	۱/۶۱ f-i
A ₁ B ₂ D ₄	۲/۷۷ cd	A ₂ B ₂ D ₄	۲/۱۴ ef
A ₁ B ₂ D ₅	۲/۷۸ cd	A ₂ B ₂ D ₅	۱/۸۶ fg
A ₁ B ₃ D ₁	۲/۴۵ de	A ₂ B ₃ D ₁	۱/۰۴ j
A ₁ B ₃ D ₂	۲/۹۴ b-d	A ₂ B ₃ D ₂	۲/۴۲ de
A ₁ B ₃ D ₃	۳/۰۱ bc	A ₂ B ₃ D ₃	۱/۲۲ h-j
A ₁ B ₃ D ₄	۲/۸۸ cd	A ₂ B ₃ D ₄	۱/۶۸ f-h
A ₁ B ₃ D ₅	۳/۴۲ b	A ₂ B ₃ D ₅	۱/۶۷ f-h

A: شماره خاک، A₁: خاک ۱، A₂: خاک ۲، B: سطوح مختلف رطوبتی، B₁: ۰/۶-۰/۴۵، B₂: ۰/۷-۰/۴۵، B₃: ۰/۶-۰/۸۵، D: تیمارهای باکتریایی، D₁: شاهد، D₂: جدایه ۸، D₃: جدایه ۲۰، D₄: جدایه ۳، D₅: جدایه ۲۳

شد. جدول (۸) نیز نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تأثیر سطوح رطوبتی در دوره انکوباسیون در باکتری‌های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل استخراج با DTPA (mg/kg) را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل شده، بیشترین میزان آهن خاک در این حالت نیز متعلق به دوره انکوباسیون ۴۰ روزه و جدایه‌های ۳ و ۸ بوده است. کمترین مقدار آهن در هر دو خاک، در دوره انکوباسیون ۶۰ روزه مشاهده شد.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تأثیر نمونه‌های متفاوت خاک در دوره انکوباسیون در باکتری‌های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل استخراج با DTPA نیز در جدول (۷) قابل مشاهده است. بیشترین میزان آهن متعلق به خاک یک، دوره انکوباسیون ۴۰ روزه و جدایه‌های ۳ و ۸ است و کمترین مقدار آن به دوره انکوباسیون ۶۰ روزه تعلق دارد. در خاک دو نیز بیشترین میزان آهن در دوره‌ی انکوباسیون ۴۰ روزه و جدایه ۸ مشاهده

جدول ۷- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تأثیر نمونه‌های متفاوت خاک در دوره انکوباسیون در باکتری‌های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل استخراج با DTPA (mg/kg)

تیمار	آهن قابل جذب با DTPA	تیمار	آهن قابل جذب با DTPA
A ₁ C ₁ D ₁	۲/۲۴ e-h	A ₂ C ₁ D ₁	۱/۱۶ k-n
A ₁ C ₁ D ₂	۲/۴۶ d-g	A ₂ C ₁ D ₂	۱/۹۷ g-i
A ₁ C ₁ D ₃	۲/۶۷ de	A ₂ C ₁ D ₃	۱/۲۴ k-n
A ₁ C ₁ D ₄	۲/۵۱ d-f	A ₂ C ₁ D ₄	۲/۰۱ f-i
A ₁ C ₁ D ₅	۲/۸۵ d	A ₂ C ₁ D ₅	۱/۹۰ h-j
A ₁ C ₂ D ₁	۳/۳۸ c	A ₂ C ₂ D ₁	۱/۶۵ i-k
A ₁ C ₂ D ₂	۶/۱۷ a	A ₂ C ₂ D ₂	۲/۲۰ e-h
A ₁ C ₂ D ₃	۴/۳۰ b	A ₂ C ₂ D ₃	۲/۴۶ d-g
A ₁ C ₂ D ₄	۵/۸۶ a	A ₂ C ₂ D ₄	۲/۹۶ cd
A ₁ C ₂ D ₅	۴/۵۳ b	A ₂ C ₂ D ₅	۲/۰۰ f-i
A ₁ C ₃ D ₁	۱/۳۲ k-m	A ₂ C ₃ D ₁	۰/۸۰ m-o
A ₁ C ₃ D ₂	۱/۳۵ kl	A ₂ C ₃ D ₂	۰/۸۲ m-o
A ₁ C ₃ D ₃	۱/۳۰ k-m	A ₂ C ₃ D ₃	۰/۶۲ o
A ₁ C ₃ D ₄	۱/۴۳ jk	A ₂ C ₃ D ₄	۱/۶۸ f-h
A ₁ C ₃ D ₅	۱/۴۰ k	A ₂ C ₃ D ₅	۱/۶۷ f-h

A: شماره خاک، A₁: خاک ۱، A₂: خاک ۲، C: دوره انکوباسیون، C₁: ۲۰ روز، C₂: ۴۰ روز، C₃: ۶۰ روز، D: تیمارهای باکتریایی، D₁: شاهد، D₂: جدایه ۸، D₃: جدایه ۲۰، D₄: جدایه ۳، D₅: جدایه ۲۳

جدول ۸- نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تأثیر سطوح رطوبتی در دوره انکوباسیون در باکتری‌های محرک رشد گیاه بر مقدار آهن قابل استخراج با DTPA (mg/kg)

تیمار	آهن قابل جذب با DTPA	تیمار	آهن قابل جذب با DTPA
B ₁ C ₁ D ₁	۱/۷۵ k-p	B ₂ C ₃ D ₄	۳/۹۸ b
B ₁ C ₁ D ₂	۱/۸۲ j-o	B ₂ C ₃ D ₅	۳/۵۰ b-e
B ₁ C ₁ D ₃	۲/۱۱ h-l	B ₂ C ₃ D ₁	۰/۹۱ s
B ₁ C ₁ D ₄	۲/۴۷ g-j	B ₂ C ₃ D ₂	۱/۰۱ rs
B ₁ C ₁ D ₅	۱/۷۱ l-q	B ₂ C ₃ D ₃	۰/۹۱ s
B ₁ C ₂ D ₁	۲/۵۱ f-i	B ₂ C ₃ D ₄	۰/۹۸ s
B ₁ C ₂ D ₂	۳/۷۶ bc	B ₂ C ₃ D ₅	۱/۰۴ q-s
B ₁ C ₂ D ₃	۳/۳۶ b-e	B ₃ C ₁ D ₁	۱/۶۸ l-r
B ₁ C ₂ D ₄	۵/۶۱ a	B ₃ C ₁ D ₂	۳/۱۲ c-f
B ₁ C ₂ D ₅	۲/۹۱ e-g	B ₃ C ₁ D ₃	۱/۸۹ i-n
B ₁ C ₃ D ₁	۱/۱۷ o-s	B ₃ C ₁ D ₄	۱/۹۱ i-m
B ₁ C ₃ D ₂	۰/۹۴ s	B ₃ C ₁ D ₅	۳/۰۱ d-g
B ₁ C ₃ D ₃	۰/۹۶ s	B ₃ C ₂ D ₁	۲/۴۵ g-j
B ₁ C ₃ D ₄	۰/۹۷ s	B ₃ C ₂ D ₂	۳/۶۲ b-d
B ₁ C ₃ D ₅	۱/۱۰ p-s	B ₃ C ₂ D ₃	۳/۴۶ b-e
B ₂ C ₁ D ₁	۱/۶۷ l-r	B ₃ C ₂ D ₄	۳/۶۵ b-d
B ₂ C ₁ D ₂	۱/۶۹ l-q	B ₃ C ₂ D ₅	۳/۳۷ b-e
B ₂ C ₁ D ₃	۱/۸۶ i-n	B ₃ C ₃ D ₁	۱/۰۹ p-s
B ₂ C ₁ D ₄	۲/۳۹ g-k	B ₃ C ₃ D ₂	۱/۲۹ m-s
B ₂ C ₁ D ₅	۲/۴۰ g-j	B ₃ C ₃ D ₃	۰/۹۹ s
B ₂ C ₂ D ₁	۲/۵۸ f-h	B ₃ C ₃ D ₄	۱/۲۶ m-s
B ₂ C ₂ D ₂	۵/۱۶ a	B ₃ C ₃ D ₅	۱/۲۳ n-s
B ₂ C ₂ D ₃	۳/۳۰ c-e		

B: سطوح مختلف رطوبتی، B₁: ۰/۶ - ۰/۷، B₂: ۰/۴۵ - ۰/۶، B₃: ۰/۸۵ - ۰/۷، C: دوره انکوباسیون، C₁: ۲۰ روز، C₂: ۴۰ روز، C₃: ۶۰ روز، D: تیمارهای باکتریایی، D₁: شاهد، D₂: جدایه ۸، D₃: جدایه ۲۰، D₄: جدایه ۳، D₅: جدایه ۲۳

باکتری‌ها در زمان‌های مختلف پس از تلقیح نشان دادند که جمعیت برخی انواع باکتری‌های محرک رشد در فاصله پنج الی ۱۰ هفته پس از تلقیح ثابت بوده و یا به کندی افزایش می‌یابد (El-hawary *et al.*, 2002).

نتیجه‌گیری

به منظور بررسی پتانسیل جدایه‌های بومی مولد سیدروفور در انحلال و قابل جذب ساختن فرم نامحلول آهن، از ۱۰ نمونه خاک زراعی اطراف کرج، جدایه‌هایی با صفات محرک رشدی متفاوت جداسازی شد. با توجه به نتایج حاصل از سنجش تولید سیدروفور بر روی جدایه‌ها، چهار جدایه ۳، ۸، ۲۰ و ۲۳ برای عملیات گلخانه‌ای انتخاب شدند. بالاترین مقادیر تولید سیدروفور و انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی، متعلق به جدایه ۲۳ و پس از آن جدایه ۳ بود. همچنین جدایه ۳، تنها جدایه قادر به تولید سیانید هیدروژن بود. غلظت سیدروفورهای باکتریایی در خاک بین ۳۰۰-۴ میکرومول و غلظت انواع قارچی بین ۲۴۰-۳۰ میکرومول در گرم خاک متفاوت بود. بر اساس نتایج به دست آمده در میان جدایه‌های منتخب، جدایه ۲۳ (متعلق به جنس *سودوموناس*) بیشترین میزان سیدروفور را در محیط CAS Agar تولید نمود؛ به طوری که قطر هاله به کلنی ایجاد شده توسط این جدایه ۲/۲۳ برابر جدایه ۲۰ بود، در حالی که جدایه ۲۰ (*Bacillus sporothermodurans*) بیشترین تأثیر را در افزایش مقدار آهن قابل استخراج با DTPA در خاک داشت. این جدایه در مدت ۴۰ روز توانست میزان آهن قابل استخراج با DTPA را به میزان ۴۶/۵۹ درصد افزایش دهد، در حالی که این مقدار برای جدایه ۲۳ برابر ۲۷/۸۴ درصد بود. مقدار آهن قابل استخراج با DTPA در خاک توسط جدایه ۲۰ نسبت به جدایه ۲۳، ۱۴/۶۷ درصد بیشتر افزایش پیدا کرد. در سه دوره ماند ایجادشده، کمترین مقدار آهن قابل استخراج با DTPA در خاک متعلق به دوره انکوباسیون ۶۰ روزه و بیشترین این مقدار برای دوره انکوباسیون ۴۰ روزه بود. افزایش آهن محلول در این دوره نسبت به ۲۰ روز اول ۶۹ درصد و نسبت به دوره‌ی ۶۰ روزه ۲۳۴/۹۱ درصد بود.

REFERENCES

- Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary-Nejati, A. R. and Miransari, M. (2010). Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(2), 281-288.
- Anjum, M., Zahir, Z., Arshad, M. and Ashraf, M. (2011). Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiate* L.) seedlings under axenic conditions. *Soil Environment*, 30 (1), 18- 26.

توانایی تولید سیدروفورهای میکروبی توسط طیف بسیار گسترده‌ای از قارچ‌ها و باکتری‌ها ثابت شده است. اگرچه توان تولید سیدروفور در تمام باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری و همین طور در قارچ‌ها وجود دارد ولی پتانسیل تولید این مواد در گونه‌های مختلف میکروبی و حتی در سویه‌های متعدد داخل هر گونه بسیار متفاوت است (Ferreira *et al.*, 2019). نقش جدایه‌های تولیدکننده سیدروفور می‌تواند از طریق کلات کردن آهن سه ظرفیتی باشد که فراهمی آهن را به طور موضعی افزایش یا سمیت آهن دو ظرفیتی به سوی گیاه را از طریق تجمع آهن ترسیب‌شده به درون سلول‌های باکتریایی کاهش دهد (Saha *et al.*, 2016). توانایی برای تولید سیدروفور یکی از ویژگی‌هایی است که باعث می‌شود ریزسازواره‌ها، رقابت موفق‌تری در محیط داشته باشند (Das and Barooah, 2018) و ارتباط بین گیاه و باکتری را آسان ساخته و کمک به کلونیزاسیون ریشه، ساقه‌ها و برگ‌ها می‌کنند (Compant *et al.*, 2005). Sharma and Johri (2002) گزارش کردند که بالاترین میزان تولید سیدروفور (۲۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از میان *Pseudomonas spp.* سویه‌های GRP3A و PRS₉ و *P. chlororaphis* ATCC 9446، در سویه PRS₉ بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در محیط SSM و PSCM مشاهده شد. همچنین افزایش در درصد جوانه‌زنی و رشد گیاه ذرت در اثر تلقیح بذر با سویه‌های GRP3A و PRS₉ از نتایج این پژوهش بود. این دو محقق در نهایت استفاده از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) که مولد سیدروفور هستند را یکی از بهترین راهکارها برای افزایش حاصلخیزی در خاک‌های قلیایی پیشنهاد کردند. در نتایج بررسی ۱۰ سویه *Pseudomonas* مولد سیدروفور جداسازی شده از خاک‌های تحت کشت ذرت، برنج و یونجه مشاهده شد که این جدایه‌ها را می‌توان به عنوان کودهای زیستی بالقوه و نیز به عنوان عوامل کنترل زیستی مورد استفاده قرار داد (Suresh *et al.*, 2010). عوامل غیرزیستی مانند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و عوامل زیستی از قبیل وجود رقابت بین باکتری‌ها و رشد ریشه گیاه زراعی در محیط می‌تواند فعالیت باکتری‌ها را محدود کند. همچنین برخی محققین با مطالعه بر روی جمعیت

- Biari, A., Gholami, A. and Rahmani, H.A. 2008. Growth Promoting and Enhanced Nutrient Uptake of Maize (*Zea mays* L.) by Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Arid Region of Iran. *Journal of Biological Sciences*, 8 (6), 1015-1020.
- Braccini, A.L., Dan, L.G.M., Piccinin, G.G., Albrecht, L.P., Barbosa, M.C. and Ortiz, A.H.T. (2012). Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bioregulators in maize. *Revista Caatinga*, 25 (2), 58-64.

- Bric, J. M., Bostock, R. M., and Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 535-538.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4951-4959.
- Cornell, R.M. and Schwertmann, U. (2003). The iron oxides, 2nd edn. Wiley-VCH, Weinheim.
- Crowley, D.E. (2006). Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: Barton, L.L. and Abadi'a, J. (Eds) *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*, Springer, Netherlands. 169–198.
- Das, S., and Barooah, M. (2018). Characterization of siderophore producing arsenic-resistant *Staphylococcus* sp. strain TA6 isolated from contaminated groundwater of Jorhat, Assam and its possible role in arsenic geocycle. *BMC Microbiology*, 18, 104.
- El-Hawary, M.I., El-hawary, I.F., El-Ghamry, A.M. and El-Naggar, E. (2002). Effect of application of biofertilizer on the yield and NPK uptake of some wheat genotypes as affected by the biological properties of soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(11), 1181-1185.
- Epstein, E. and Bloom, A.J. (2005). Mineral Nutrition of Plants: *Principles and Perspectives*. 2nd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Ferreira, C.M.H., Vilas-Boas, Â., Sousa, C.A. Soares, H.M.V.M. and Soares, E.V. (2019). Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*, 9, 78.
- Hamidi, A., Asgharzadeh, A., Chaokan, R. and Khalvati, M.A. (2011). Maize (*Zea mays* L.) seed Biofortification by plant growth promoting bacteria (PGPB). *International journal of Agronomy and Plant Production*, 2, 194-205.
- Khosravi, H., Samar, S.M., Fallahi, E., Davoodi, H. and Shahabian, M. (2009). Inoculation of Golden Delicious' apple trees on M9 root stock with *Azotobacter* improves nutrient uptake and growth indices. *Journal of Plant Nutrition*, 32, 946-953.
- Meyer, D.M. (2000). Pyoverdins: pigments siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent pseudomonads species. *Arch Microbiology*, 174, 135- 142
- Mohammadi, R., Olamaee, M., Ghorbani Nasrabadi, R. and Chakeralhossaini, M.R. (2010). Effects of urea fertilizer, organic matter and plant growth promoting rhizobacteria on N uptake and yield of wheat (*Triticum aestivum* cv. Alvand). *Journal of Plant Production*, 17, 77-92.
- Parry, J.M., Turnbull, P.C.B. and Gibson, J.R. (1983). A colour atlas of *Bacillus* species: Wolfe Medical Publications Ltd.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. (2002). Role of pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3795- 3801
- Rashid, M.S., Khalil, N., Ayub, S., Alam, S. and Latif, F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 187-196
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984-3999.
- Sambrook, J., Russell, D. W., and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). *Immunol*, 49, 895-909.
- Sarode, P.D., Rane, M.P., Chaudhari, B.L. and Chincholkar, S.B. (2007). Screening for siderophore producing PGPR from black cotton soils of North Maharashtra. *Current trends in Biotechnology and pharmacy*, 1(1), 96- 105.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56.
- Sharma, A. and Johria, B.N. (2003). Growth promoting influence of siderophore- producing Pseudomonas Strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological Research*, 158(3), 243- 248.
- Sparks, D.L. (1996). Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods, Soil Science Society of American, Inc. American Society of Agronomy, Inc, Madison Wisconsin, USA.
- Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9(6), 778-781.
- Suresh, A., Pallavi, P., Srinivas, P., Kumar, V. P. and Reddy, S.R. (2010). Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. *African Journal of Microbiology Research*, 4(14), 1491-1494.
- Tavaria, F.K. and Zuberers, D.A. (1998). Effect of low CO₂ on colonization of maize roots by a genetically altered *pseudomonas putida* (L1019). *Biology and Fertility of Soils*, 26, 43- 49