Evaluation of the role of plant growth-promoting bacteria in biological control of *Salmonella typhimurium* pathogen

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Published online

Keywords:

hydrogen cyanide

protease

Salmonella

Siderophore

soil

ABSTRACT

Introduction

Human pathogens, such as *Salmonella*, pose a threat to public health and food security by contaminating soil and agricultural products. This contamination can lead to salmonellosis in consumers. Recognizing the role of plant growth-promoting bacteria in enhancing soil quality and suppressing pathogens, this study investigated their effects on controlling *Salmonella typhimurium* in soil. The aim was to mitigate the spread of this pathogen in crops, the food chain, and groundwater.

Materials and Methods

The study involved both laboratory and pot experiments. In the laboratory, we measured the optical density of *Salmonella* in broth medium and the colony diameter on solid medium to screen the antagonistic properties of plant growth-promoting bacteria. We evaluated their ability to produce siderophores, lipase, protease enzymes, and hydrogen cyanide, which are known to inhibit pathogen growth. In the pot experiments, we tested the effectiveness of these isolates, individually and in a consortium, at 2 and 15 days, to determine their capacity to reduce *Salmonella typhimurium* growth in soil.The pot experiment was conducted as a factorial in a completely randomized design with three replications. The factors included inoculation with antagonistic bacteria (control (lacking antagonistic isolates and test strain), test strain *Salmonella typhimurium*, *Bacillus* sp. strain SS4, *Bacillus rugosus* strain CS5, *Priestia aryabhattai* strain CL1, *Bacillus vallismortis* strain AS4, and a microbial consortium comprising a mixture of 4 bacterial isolates) and the period of incubation time (2 and 15 days). To confirm the bacteria grown in the *Salmonella*-specific medium, DNA extraction was performed, and electrophoresis of the PCR products was conducted.

Results The results of laboratory study indicated that out of the 11 antagonistic isolates tested, four bacteria—*B. rugosus* CS5, *B. vallismortis* AS4, *P. aryabhattai* CL1, and *Bacillus* sp. SS4—exhibited the highest inhibition of *Salmonella* growth in liquid culture. In solid culture, *B. vallismortis* AS4, *B. rugosus* CS5, *P. aryabhattai* CL1, and *Bacillus* sp. SS4, respectively, showed the greatest suppression of this pathogen. The four selected bacteria demonstrated the capability to produce siderophores. The highest protease production index, with values of 2.9 and 2.5, were observed in *B. rugosus* CS5 and *P. aryabhattai* CL1, respectively. *B. vallismortis* AS4 was noted for its exclusive production of lipase. Additionally, *P. aryabhattai* CL1 and *B. rugosus* CS5 were capable of producing hydrogen cyanide, with concentrations of 0.48 mg/mL and 0.2 mg/mL, respectively. The pot experiment results indicated that all four bacteria significantly reduced the pathogen population in soil 15 days post-inoculation. Notably, *Bacillus* sp. SS4 and the microbial consortium were more effective, decreasing the population by 40.30×10^3 and 221.8×10^3CFU/g of soil, respectively. The electrophoresis results of the PCR products confirmed the presence of the *Salmonella typhimurium* in the plates.

Conclusion

Given the substantial impact of plant growth-promoting bacteria in diminishing the *Salmonella typhimurium* population in soil after 15 days, it is advisable to inoculate these bacteria into the soil as a method of pathogen control, in accordance with the procedures outlined in this study.

Author Contributions

Motahare Abedinzadeh carried out the experiment and wrote the original draft of the manuscript. Naeimeh Enayatizamir and Ehsan Shokri verified the analytical methods and supervised the research. Ehsan Shokri handled the laboratory analysis. Shahla Kian Amiri investigated the findings. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript, but Naeimeh Enayatizamir wrote the final version of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Data underpinning the findings of this study can be found within the tables, figures, and detailed explanations provided in this article.

Acknowledgements

پذیرفته شده

The authors would like to express their gratitude to Shahid Chamran University of Ahvaz (SCU.AS1402.248) and the Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (081-05-05-002-9901-01003).

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Cite this article: (year). **Evaluation of the role of plant growth-promoting bacteria in biological control of *Salmonella typhimurium* pathogen**.
Journal Title, (),. DOI:

© The Author(s).
Publisher: University of Tehran Press.
DOI:

ویراستاری نشده

Evaluation of the role of plant growth-promoting bacteria in biological control of *Salmonella typhimurium* pathogen

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Published online

Keywords:

Hydrogen cyanide

Protease

Salmonella

Siderophore

Soil

ABSTRACT

Human pathogens such as *Salmonella* enter agricultural soils from various sources. *Salmonella* is one of the most common food-borne microorganisms and is a causative agent of infections shared between humans and animals. In the current study, some plant growth-promoting bacteria were used to control the pathogen *Salmonella typhimurium*. The results showed that, in order, 1) *Bacillus rugosus* CS5, 2) *Bacillus vallismortis* AS4, 3) *Priestia aryabhattai* CL1 and 4) *Bacillus sp.* SS4 had the highest inhibitory effect on the grrowth of *Salmonella* in liquid medium. However, in solid medium, the bacteria 1) *B. vallismortis* AS4, 2) *B. rugosus* CS5, 3) *P. aryabhattai* CL1 and 4) *Bacillus* sp. SS4 exhibited the greatest inhibition of this pathogen's growth. The ability to produce siderophores, proteases, lipases, and hydrogen cyanide was investigated in these four bacteria. All four bacteria were capable of producing siderophore. The highest protease production index, with values of 2.5 and 2.9, belonged to *P. aryabhattai* CL1 and *B. rugosus* CS5, respectively. *B. vallismortis* AS4 was capable of producing lipase. Both *P. aryabhattai* strain CL1 and *B. rugosus* strain CS5 had the ability to produce HCN, with values of 0.48 mg/mL and 0.2 mg/mL, respectively. The simple impact of four separate bacteria and a microbial consortium on the *Salmonella* population in soil was investigated. The results showed that the *Salmonella* population decreased 15 days after inoculation due to the treatments. The greatest reduction in the the population of this pathogen was related to the microbial consortium and the *Bacillus* sp. strain SS4 treatment, with a 92 % and 98 % reduction in population compared to the control, respectively. The findings indicate a positive effect of plant growth-promoting bacteria in soil for controlling *S. typhimurium*, which could reduce the negative impacts of the pathogen's presence in soil, thereby enhancing human health and food security.

Cite this article: (year). Evaluation of the role of plant growth-promoting bacteria in biological control of *Salmonella typhimurium* pathogen

Journal Title, DOI:

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI:

ویرایشاری نشده

ارزیابی نقش باکتری‌های محرک رشد گیاه در کنترل زیستی پاتوژن *Salmonella typhimurium*

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت:

تاریخ بازنگری:

تاریخ پذیرش:

تاریخ انتشار:

کلیدواژه‌ها:

پروتئاز

خاک

سالمونلا

سیانید هیدروژن

سیدروفور

چکیده

پاتوژن‌های انسانی هم‌چون *سالمونلا* از منابع متعددی وارد خاک‌های کشاورزی می‌شوند. *سالمونلا* از رایج‌ترین میکروارگانیسم‌های منتقله از غذا می‌باشد که عامل ایجاد عفونت‌های مشترک بین انسان و حیوان است. در مطالعه حاضر از برخی باکتری‌های محرک رشد گیاه به منظور کنترل پاتوژن *Salmonella typhimurium* استفاده شده است. نتایج نشان داد که به ترتیب ۱) *Bacillus rugosus* CS5 ، ۲) *Bacillus vallismortis* AS_4 ، ۳) *Priestia aryabhattai* CL_1 و ۴) *Bacillus* sp. SS4 بیشترین اثر بازدارندگی رشد *سالمونلا* را در محیط مایع داشتند؛ اما در محیط جامد باکتری‌های ۱) *B. vallismortis* AS_4، ۲) *B. rugosus* CS_5، ۳) *P. aryabhattai* CL_1 و ۴) *Bacillus* sp. SS_4 بیشترین بازدارندگی رشد این پاتوژن در محیط جامد را نشان دادند. توانایی تولید سیدروفور، پروتئاز، لیپاز و سیانید هیدروژن توسط این ۴ باکتری بررسی شد. هر چهار باکتری دارای توانایی تولید سیدروفور بودند. بیشترین شاخص تولید پروتئاز با مقادیر ۲/۹ و ۲/۵ متعلق به *B. rugosus* CS_5 و *P. aryabhattai* CL_1 بود. *B. vallismortis* AS_4 دارای توانایی تولید لیپاز بود. *P. aryabhattai* strain CL_1 و *B. rugosus* strain CS_5 دارای توانایی تولید HCN با مقادیر ۰/۴۸ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بودند. تاثیر چهار باکتری به صورت جداگانه و کنسرسیوم میکروبی بر جمعیت *سالمونلا* در خاک بررسی شد. نتایج نشان داد جمعیت *سالمونلا* ۱۵ روز پس از تلقیح به خاک تحت تاثیر تیمارها کاهش یافت. بیشترین کاهش جمعیت این پاتوژن مربوط به کنسرسیوم میکروبی و تیمار *Bacillus* sp. *strain* SS_4 به ترتیب با ۹۲ و ۹۸ درصد کاهش جمعیت نسبت به شاهد بود. نتایج حاکی از تأثیر مثبت باکتری‌های محرک رشدی در خاک به منظور کنترل پاتوژن *S. typhimurium* بود که می‌تواند علاوه بر کاهش اثرات منفی حضور پاتوژن در خاک، سلامت جامعه بشری و بهبود امنیت غذایی را در پی داشته باشد.

استناد: (سال). ارزیابی نقش باکتری‌های محرک رشد گیاه در کنترل زیستی پاتوژن *Salmonella typhimurium*. *عنوان مجله*.

DOI:

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI:

ویرایشگری نشده

مقدمه

سالمونلا باکتری گرم منفی از خانواده *انتروباکتریاسه*، بی‌هوازی اختیاری، میله‌ای شکل و از رایج ترین میکروارگانیسم‌های منتقله از غذا می‌باشد که عامل ایجاد عفونت‌های مشترک بین انسان و حیوان بوده است (Rahman, 2015) که از منابع متعددی از جمله (آب آبیاری آلوده و کودهای دامی و یا آلی) وارد خاک‌های کشاورزی می‌شوند (Jechalke et al., 2019). آلودگی محصولات به *سالمونلا* قبل از برداشت و همچنین در کل زنجیره تولید رخ می‌دهد (Rahman et al., 2022). با وجود گسترش کم *سالمونلا* در مزارع (۱۰ تا ۲۶ درصد)، این پاتوژن در مقایسه با سایر پاتوژن‌های باکتریایی ماندگاری بیشتری در خاک نشان داده است (Andino and Hanning, 2015 ; Arthurson et al., 2011). پاتوژن *سالمونلا* به عنوان یک پاتوژن انسانی در حدود ۳۰۰ روز در خاک باقی می‌ماند و ماندگاری آن در خاک‌های آلوده عامل اصلی در آلودگی محصولات کشاورزی و همچنین به خطر افتادن سلامت کشاورزان است (Karmakar et al., 2018). عوامل محیطی (همانند تنش‌ها) و خاک؛ علاوه بر فعل و انفعالات بین میکروب‌های مفید خاکزی همانند باکتری‌های محرک رشد گیاه و پاتوژن‌ها، در وضعیت ماندگاری *سالمونلا* نقش داشته‌اند (Karmakar et al., 2018). بیشتر تحقیقات صرفاً بر روابط متقابل بین یک گونه باکتریایی و یک پاتوژن (یعنی یک پاتوژن و یک آنتاگونیست) متمرکز شده‌اند؛ اما می‌توان از چندین گونه باکتری محرک رشد گیاه (کنسرسیوم باکتریایی)، به عنوان بخشی کارآمد از تنوع زیستی خاک‌ها به منظور مهار و یا کنترل پاتوژن *سالمونلا* در خاک نیز استفاده نمود (Adedeji et al., 2020). سالمونلوز[1] از جمله بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوانات است که در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به پاتوژن *سالمونلا* ایجاد می‌شود. جمعیت‌های پایین سلول‌های *سالمونلا* (۱۰ تا ۱۰۰ سلول) نیز منجر به ایجاد آلودگی در محصولات و شیوع سالمونلوز می‌شوند (Finn et al., 2013). همچنین عواملی هم‌چون نوع محصول مصرفی، سروارهای *سالمونلا*، وضعیت فیزیولوژیکی پاتوژن و حساسیت میزبان در دوز عفونت[2]موثر بوده‌اند (Lozano-Villegas et al., 2023 ; López et al., 2012). تخمین زده شده است که سالیانه ۹۳/۸ میلیون نفر در سراسر جهان به بیماری سالمونلوز مبتلا می‌شوند که ۱۵۵۰۰۰ مورد آن منجر به مرگ شده است (Eng et al., 2015)؛ ۸۶ ٪ این افراد از طریق مصرف محصولات غذایی آلوده به این بیماری مبتلا شده‌اند که ۱۵ درصد آن به دلیل مصرف میوه و سبزیجات آلوده بوده است. بنابراین مدیریت شیوع این پاتوژن و کنترل بقا آن در محیط خاک می‌تواند مانع از آلودگی محصولات کشاورزی و گسترش مرگ و میر گردد. تنوع بالای میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی به دلیل موفقیت در رقابت به منظور اشغال آشیان اکولوژیکی و ایجاد محدودیت‌هایی در رشد پاتوژن می‌تواند عامل اصلی در کنترل و مرگ پاتوژن *سالمونلا* محسوب گردند (Bauer et al., 2018).

باکتری‌های محرک رشد گیاه بّخش اعظمی از میکروبیوم خاک را تشکیل می‌دهند که توانمندی بالایی در کنترل عوامل زیستی و غیر زیستی و هم چنین بهبود رشد گیاهان و ارتقا تولید محصولات نشان داده‌اند (Dhawi, 2023 ; Jiao et al., 2021). در صورت حضور گیاه در خاک، تغییرات مرفولوژی ریشه و افزایش سطح جذب آب و عناصرغذایی منجر به بروز رقابت میان باکتری-های محرک رشد و پاتوژن‌ها می‌گردد که در نهایت به دلیل محدودیت در عوامل رشد بقا پاتوژن به شدت کاهش خواهد یافت (Nawaz et al., 2020 Gowtham et al., 2016). مکانیسم‌های متعدد محرک رشدی از جمله: تولید ترکیبات ضد پاتوژن (مانند آنتی بیوتیک‌ها) ، پپتیدهای ضد میکروبی، متابولیت‌های باکتریوسین، تولید سیدروفورهای میکروبی سموم و آنزیم‌ها در کنار عامل رقابت موفقیت‌آمیز از مهم‌ترین عوامل کنترل زیستی پاتوژن‌ها در خاک محسوب می‌شوند (Jiao et al., 2021 ; Compant et al., 2005). در میان این عوامل تولید سیدروفور، ترکیبات آنتی بیوتیک و باکتریوسین‌ها به عنوان سه مکانیسم اصلی کنترل زیستی در مطالعات آزمایشگاهی شناخته شده‌اند (Jiao et al., 2021). مطالعات در زمینه کنترل پاتوژن‌های گیاهی توسط سویه‌های محرک رشدی گسترده است؛ اما در زمینه کنترل پاتوژن *Salmonella typhimurium* در خاک توسط این باکتری‌های محرک

ویرایش اولیه

---

[1] Salmonellosis

[2] Infection dose

[3] Plant growth promoting bacteria (PGPBs)

رشدی مطالعات زیادی صورت نگرفته است. به حضور پاتوژن *سالمونلا* و ماندگاری آن در خاک اشاره شده است (Peng et al., 2022). شواهدی از درونی شدن سویه *Salmonella enterica* در دو گیاه کاهو و ذرت به دلیل حضور و ماندگاری این پاتوژن در خاک گزارش شده است. در این مطالعه اشاره شده است که رفتار *سالمونلا* در گیاه بسیار شبیه به پاتوژن گیاهی بوده است (Jechalke et al., 2019). در پژوهشی توسط Johnson et al., (۲۰۲۰) ؛ باکتری‌های محرک رشد آلودگی سویه *Salmonella enterica* را در طول کشت به حداقل رسانده است (Johnson et al., 2020). در پژوهشی دیگر باکتری *Bacillus thuringiensis* به عنوان عامل کنترل زیستی *Salmonella enterica* در گیاه اسفناج معرفی شده است (Zhao et al., 2021). کنسرسیوم‌های میکروبی از جمله *Bacillus spp.* در مطالعات به عنوان عوامل رایج و تأثیرگذار در کنترل زیستی گزارش شده‌اند. اخیرا جدایه‌ی *Bacillus* فعالیت آنتاگونیستی قابل توجهی علیه *Salmonella enterica* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان داده است و از کلونیزاسیون جوانه ماش توسط پاتوژن جلوگیری نموده است (Chahar et al., 2023). کنسرسیوم باکتریایی *Bacillus* sp. به عنوان عامل کنترل زیستی بیماری آنتراکتوزوم قارچی در گیاه فلفل موفق عمل نموده است (Yanti et al., 2020). اثر باکتری *Bacillus subtilis* جداسازی شده از خاک در مهار *S. typhimurium* تأثیر گذار بوده است (Podnar et al., 2022). در پژوهشی دیگر سویه‌ی پروبیوتیک *Bacillus* عامل مهار *S. tphimurium* در نمونه‌های محیطی و طیور بوده است (Zhang et al., 2022). در این پژوهش فرض شده است که باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند به طور مؤثری جمعیت سالمونلا را در خاک کاهش دهند و استفاده از کنسرسیوم باکتریایی به جای یک گونه باکتریایی منفرد، اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد *سالمونلا* خواهد داشت. با توجه به امکان آلودگی محصولات مورد مصرف انسان از طریق حضور *سالمونلا* در خاک، پژوهش حاضر با هدف کنترل این پاتوژن با کمک باکتری‌های محرک رشد گیاه انجام شده است؛ که در نهایت منجر به جلوگیری از انتشار این پاتوژن به آب‌های زیرزمینی در کنار حفظ سلامت کارگران و حیوانات ساکن در مزرعه خواهد شد.

روش‌شناسی پژوهش

تهیه *سالمونلا تیفی موریوم* و جدایه‌های آنتاگونیست

باکتری بیماریزا *Salmonella typhimurium* با شماره دسترسی ATCC 14028 از استیتو پاستور تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. بلافاصله پس از انتقال سویه مورد نظر، یک تک کلنی از پلیت اصلی به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مغذی[1] استریل انتقال یافت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدلCOMBI-sv120 شرکتFINEPCR) با دمای ۳۷ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت. کدورت محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل infinite M200PRO از شرکت TECAN) در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی گردید. از باکتری در پلیت‌های حاوی محیط اختصاصی گزیلوز لیزین دزوکسی کولات (XLD) و همچنین محیط غیراختصاصی تریپتیک سوی آگار (TSA) کشت شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. تعداد ۹ جدایه باکتری از کلکسیون میکروبی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شدند (جدول ۱).

[1] Nutrient broth

ویراستاری نشده

جدول ۱. باکتری‌های مورد استفاده به منظور کنترل *Salmonella typhimurium*

نام	شماره دسترسی	کد جدایه
Bacillus sp.	OR826353	SS_4
Staphylococcus xylosus	OR805561	SR_2
Staphylococcus gallinarum	OR805560.1	SR_3
Bacillus sp.	OR816114	CS_1
Bacillus rugosus	PP731994	CS_5
Priestia aryabhattai	OR805559	CL_1
Bacillus paralicheniformis	OR805514	CR_1
Bacillus vallismortis	OR821792	AS_4
Priestia filamentosa	OR805490	AL_4

ویرایشاری شده

غربالگری جدایه‌های آنتاگونیست در محیط مایع و جامد

یک تک کلنی از جدایه‌های باکتریایی و همچنین سویه تست به فلاسک‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع مغذی استریل انتقال یافت. پس از تلقیح، سوسپانسیون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۰ تا ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. میزان کدورت تمام سوسپانسیون‌ها یکسان گردید و بر روی دانسیته نوری معادل یک تنظیم شد. سوسپانسیون‌ها پس از تنظیم کدورت با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ (مدل ۳۰ k شرکت sigma) شدند. به رسوب حاصل ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و نمونه‌ها به خوبی مخلوط شدند. در نهایت هر یک از سوسپانسیون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند (Luo et al., 2024). مجددا سوسپانسیون‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند و عصاره رویی جدایه‌های آنتاگونیست و سویه تست جمع آوری شد. عصاره رویی هر یک از جدایه‌ها به صورت جداگانه به ۵ میلی‌لیتر کشت شبانه سویه تست اضافه شدند و در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند (Luo et al., 2024). ارزیابی ویژگی آنتاگونیستی در زمان‌های مختلف تا ۲۴ ساعت با قرائت کدورت هر یک از سوسپانسیون‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر صورت گرفت. داده‌های به‌دست آمده به صورت اندازه‌های تکرار شده در زمان با نرم افزار استاتیستیک نسخه ۸/۱ آنالیز شدند که در آن تیمار آنتاگونیست به عنوان تیمار بین گروهی و زمان به عنوان تیمار درون گروهی در نظر گرفته شد.

از میان ۱۱ جدایه، ۴ جدایه توانمند شامل سویه‌های AS_4 , CL_1 , CS_5 , SS_4 بر اساس کم‌ترین میزان کدورت در سویه تست و ممانعت از رشد سویه تست در ارزیابی اولیه، به منظور ارزیابی روابط آنتاگونیستی در محیط کشت جامد انتخاب شدند. در این ارزیابی از روش پیشنهادی Balouriri و همکاران (۲۰۱۶)؛ معروف به روش کراس استریک با کمی تغییرات استفاده شد (Balouiriet al., 2016). از کشت تازه جدایه‌های برتر آنتاگونیست در محیط مایع مغذی با دانسیته نوری معادل یک در وسط پلیت ۸ سانتی‌متری حاوی محیط کشت آگار مغذی[1] به صورت خطی کشت شد. به طور همزمان در دو طرف خط کشت هر جدایه ، پاتوژن بدون هیچ گونه تماس با خط کشت جدایه‌ها قطره گذاری گردید. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. این آزمایش با چهار تکرار صورت گرفت. نمونه شاهد نیز که تنها دارای کشت سویه تست بود در نظر گرفته شد. قطر کلنی

[1] Nutrient Agar

(برحسب میلی‌متر) پاتوژن در حضور و عدم حضور باکتری‌های محرک رشد اندازه‌گرفته شد و درصد بازدارندگی رشد پاتوژن با مقایسه با میزان رشد پاتوژن در عدم حضور باکتری آنتاگونیست محاسبه شد. آنالیز داده‌ها به صورت طرح کاملا تصادفی با نرم افزار استاتیستیک نسخه ۸/۱ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

تعیین برخی ویژگی‌های بازدارندگی رشد پاتوژن در باکتری‌های محرک رشد

با توجه به نتایج غربالگری جدایه‌های آنتاگونیست در محیط کشت جامد و مایع؛ جدایه‌های برتر با بیشترین فعالیت مهارکنندگی برای تعیین تولید سیدروفور، آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز و سیانید هیدروژن انتخاب شدند. توان تولید سیدروفور در جدایه‌های آنتاگونیست بر اساس روش Alexander and Zuberer (1991) انجام شد. محیط کشت پایه آگار کروم آزول- اس (CAS- Agar)، پس از استریل شدن در پلیت توزیع شد. برای تهیه این محیط، چهار محلول بطور مجزا تهیه، استریل و با هم مخلوط شدند. محلول معرف Fe-CAS ، محلول بافر، محلول غذایی و محلول کازوآمینواسید ۳ درصد (وزنی/ وزنی) که با استفاده از صافی ۰/۲ میکرون استریل شدند. از هر یک از سویه‌های آنتاگونیست با دانسیته نوری یک به میزان ۵ میکرولیتر در فاصله ۱/۵ سانتی‌متری از حاشیه پلیت قطره‌گذاری شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ مشخص محیط CAS-Agar از آبی به نارنجی رنگ در اطراف کلنی جدایه‌های آنتاگونیستی بعد از ۴۸ ساعت بررسی گردید.

تولید آنزیم پروتئاز توسط جدایه‌های آنتاگونیست با استفاده از محیط کشت جامد اسکیم میلک بررسی شد. میزان ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیستی و جدایه‌های تست با کدورت یکسان بر روی محیط کشت جامد قطره‌گذاری شدند. پلیت‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. فعالیت پروتئازی با ایجاد هاله شفاف آشکار شد. شاخص پروتئولیتیکی با محاسبه نسبت قطر هاله + قطر کلنی بر قطر کلنی ارزیابی شد (Fitriyanto et al., 2020).

تولید آنزیم لیپاز توسط باکتری‌های محرک رشد مورد استفاده در محیط کشت جامد حاوی توئین ۲۰ و پپتون بررسی شد (Ghodsalavi et al., 2013). تمام مواد به جز توئین با هم ترکیب و در اتوکلاو استریل شدند. سپس توئین تا نزدیکی نقطه جوش به صورت جداگانه حرارت داده شد و با محیط استریل مخلوط شد. از کشت تازه هر جدایه در پلیت قطره‌گذاری شد و به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شد. باکتری‌هایی که دارای توانایی تولید آنزیم لیپاز هستند در اطراف کلونی خود رسوب ایجاد می‌کنند، که نشان دهنده مثبت بودن جواب آزمون است (Ghodsalavi et al., 2013).

تولید HCN توسط جدایه‌های آنتاگونیست در لوله حاوی محیط کشت مایع استریل حاوی گلیسین (۴/۴ گرم در لیتر) بررسی شد. از کاغذ صافی برش‌هایی نواری به اندازه لوله‌ها تهیه و استریل شدند. از کشت تازه جدایه‌ها به لوله‌ها تلقیح کرده؛ سپس کاغذها آغشته به محلول پیکرات سدیم، حاوی ۲ درصد کربنات سدیم و ۰/۵ درصد اسید پیکریک، شده و در داخل لوله آویزان شدند. درب لوله‌ها با پنبه و فویل بسته و با پارافیلم کاملا درزگیری شد تا از خروج گاز سیانید هیدروژن جلوگیری شود. لوله‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس درون شیکرانکوباتور نگهداری شدند. ایجاد رنگ نارنجی تا قهوه‌ای روی کاغذ بیانگر تولید HCN است، کاغذهای رنگی شده را درون لوله حاوی آب مقطر گذاشته تا رنگ موجود به آب انتقال یابد. مقدار جذب نوری محلول در طول موج ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت HCN با استفاده از غلظت‌های مختلف KCN به عنوان استاندارد تخمین زده شد (Hogg & Ahlgren, 1942).

آزمایش گلدانی

تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر روی *سالمونلا* در کشت گلدانی بررسی شد. نمونه خاک با ویژگی‌های ذکر شده در جدول ۲؛ از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج تهیه شد. پس از کوبیدن، نمونه‌ها هوا خشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. نمونه‌های خاک اتوکلاو و در گلدان‌های ۵ کیلوگرمی قرار گرفتند. تیمارهای آزمایش شامل شاهد منفی (فاقد جدایه آنتاگونیست و سویه تست)، شاهد مثبت (تلقیح سویه تست*S. typhimurium* و بدون تلقیح باکتری محرک رشد) ، تلقیح *Bacillus* sp. strain SS_4 به خاک دارای پاتوژن، تلقیح *B. rugosus* strain CS_5 به خاک دارای پاتوژن ، تلقیح *P. aryabhattai* strain Cl_1 به خاک

ویرایش اندازی نشده

دارای پاتوژن ، تلقیح *B. vallismortis* strain AS_4 به خاک دارای پاتوژن و تلقیح کنسرسیوم میکروبی شامل مخلوطی از ۴ جدایه آنتاگونیست به خاک دارای پاتوژن) و زمان (۲ و ۱۵ روز) بود. خاک گلدان‌ها بوسیله جدایه‌های آنتاگونیستی با جمعیت یکسان (10^6 CFU/g soil) تلقیح و در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند (Chahar et al., 2023). پس از طی دوره انکوباسیون، تمام گلدان‌ها بوسیله سویه تست (10^6 CFU/g soil) آلوده گردیدند. در نهایت پس از اعمال آلودگی پاتوژن وجود یا عدم وجود پاتوژن در فواصل زمانی ۲ و ۱۵روز بررسی گردید. هر یک از ارزیابی‌ها در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها به صورت اندازه‌های تکرار شده در زمان با نرم افزار استاتیستیک نسخه ۸/۱ انجام شد که در آن مایه‌زنی باکتری به خاک به عنوان تیمار بین گروهی و زمان به عنوان تیمار درون گروهی در نظر گرفته شد.

جدول ۲. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

ویژگی	واحد	مقدار در نمونه خاک
EC	dS/m	۴/۲۲
pH	-	۷/۲
بافت	-	Clay loam
پتاسیم قابل دسترس	mg/kg	۲۰۱/۲
فسفر قابل دسترس	mg/kg	۸/۱
نیتروژن کل	mg/kg	۰/۰۶
کربن آلی	%	۰/۵۸
ظرفیت زراعی	%	۲۷
C/N	%	۰/۹۶
درصد رطوبت اشباع	%	۴۱

جمعیت باکتری در تمام گلدان‌ها پس از تهیه سری رقت‌دهی در بافر فسفات (۱۰ میلی مولار با pH ۷/۲) و کشت بر روی محیط کشت XLD و شمارش کلنی‌های رشد یافته انجام شد(Chahar et al., 2023). داده‌های به دست آمده از این آزمایش با نرم افزار SAS V 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) تجزیه واریانس شدند. مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. داده ها بصورت میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شدند.

تأیید حضور پاتوژن *سالمونلا* رشد یافته در محیط اختصاصی XLD

پس از شمارش جمعیت پاتوژن در تیمارها، از تک کلنی باکتری *سالمونلا* رشد یافته در پلیت‌های XLD به محیط مایع مغذی تلقیح شد. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل وبه مدت ۳ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته و به رسوب مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث استریل اضافه شد. مجددا محیط به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. به رسوب ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل اضافه و به آرامی تکان داده شد. محلول شیری رنگ در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری قرار گرفت. پس از این مدت، سانتریفیوژ شد و مایع رویی حاوی DNA استخراجی بود (Maelegheer & Nulens, 2017). مقدار ۵۰ میکرولیتراز مایع رویی برداشته و درون میکروتیوپ استریل نگه‌داری شد. اطراف آن به منظور جلوگیری از آلودگی با پارافیلم پوشانده شد و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. واکنش PCR با مقادیر و غلظت‌های ذکر شده در جدول ۳ با برنامه دمایی ذکر شده در جدول ۴ انجام شد.

از پرایمرهای INVA و STY (جدول ۴) به منظور تکثیر هر دو ژن اختصاصی سویه تست استفاده گردید (Pui et al., 2011). محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل و الکتروفورز گردید. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به منظور مشاهده اندازه باندها از دستگاه Gel Documentation (Scientifica Safe) استفاده شد. محصول PCR به منظور تأیید نهایی

ویراستاری نشده

با دو ژن اختصاصی *S. typhimurium* (ژن INVA و ژن STY)، با اندازه مشخص در محدوده ی 100-200bp مقایسه شدند (Pui et al., 2011;Paião et al., 2013).

جدول ۳ . اجزا و مقادیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ترکیبات	غلظت نهایی(میکرومولار)	مقدار(میکرولیتر)
Master Mix	–	۱۲
الگوی DNA		۱µL(۲۵ng/ µL)
پرایمر رفت	۰/۵	۱
پرایمر برگشت	۰/۵	۱
آب مقطر دوبار تقطیر		۵
حجم نهایی		۲۰

جدول ۴ . پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پرایمر	توالی رفت	توالی برگشت
INVA	5′GCTGCTTTCTCTACTTAAC3′	5′ GTAATGGAATGACGAACAT3′
STY	5′CACCTGATATAGACGTCCAA3′	5′ TATAGATGTTGTCGCCAA3′

جدول ۵. برنامه دمایی تکثیر توالی در واکنش زنجیره پلیمراز

مرحله	تعداد سیکل	مراحل	دما(سلسیوس)	زمان (دقیقه)
اول	۱	واسرشت اولیه ژنوم	۹۵	۵
دوم	۳۵	واسرشت شدن	۹۰	۱
		اتصال	۵۳	۳۰
		سنتز	۷۲	۲
سوم	۱	سنتز نهایی	۷۲	۵

یافته های پژوهش

غربالگری جدایه‌های آنتاگونیست در محیط مایع و جامد

تجزیه واریانس داده‌ها نشان دهنده تأثیر معنی‌دار زمان و عامل بازدارنده بر میزان دانسیته نوری *سالمونلا* بود اثر متقابل زمان و عوامل بازدارنده معنی‌دار نبود (جدول ۶).

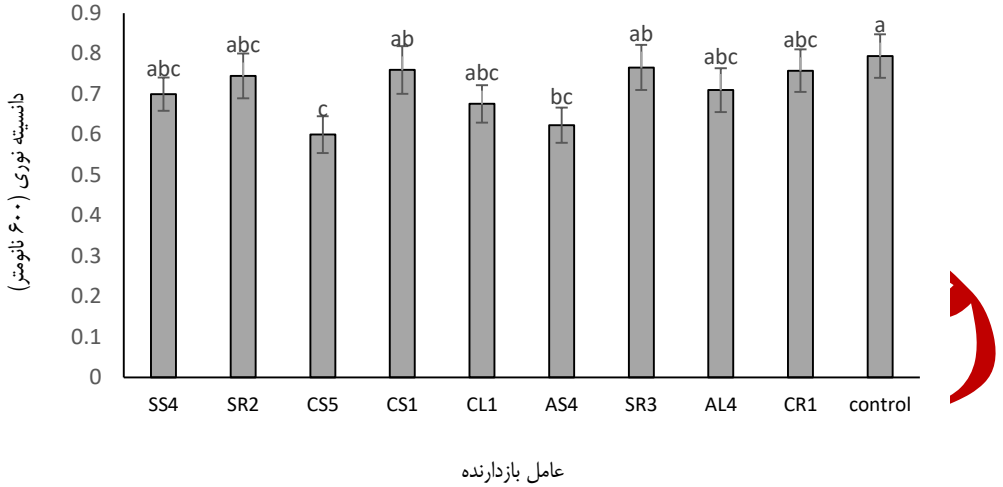
جدول ۶. میانگین مربعات اثر زمان و عامل بازدارنده بر دانسیته نوری سالمونلا در محیط مایع.

منابع تغییر	درجه آزادی	دانسیته نوری *سالمونلا*
عامل بازدارنده (تیمار بین گروهی)	۹	۰/۰۸۳**
خطا	۲۰	۰/۰۱۹
زمان (تیمار درون گروهی)	۶	۱/۵۵**
زمان*عامل بازدارنده	۵۴	۰/۰۰۵ns
خطا	۱۲۰	۰/۰۰۷

**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

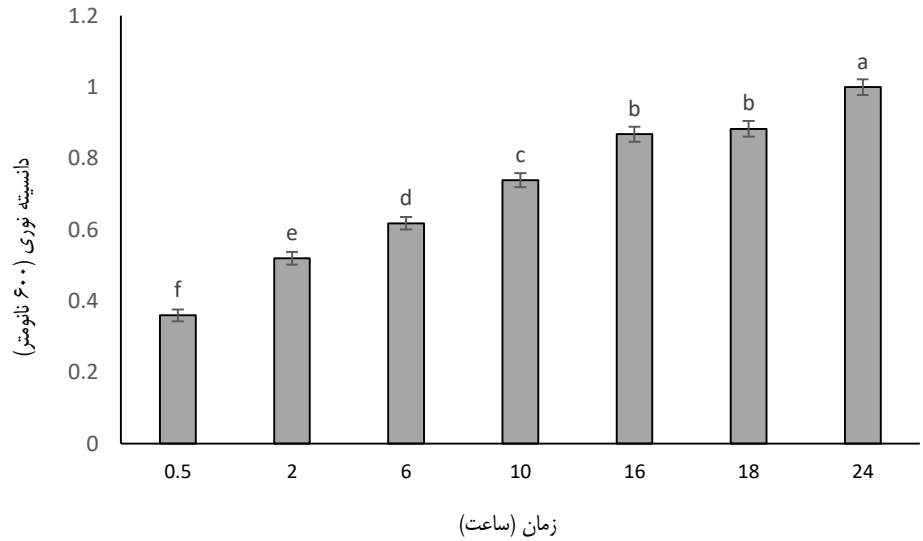
ویراستاری نشده

غربالگری جدایه‌های آنتاگونیست، بر اساس اثرات مهاری سوپرناتانت جدایه‌های آنتاگونیست بر رشد سویه تست نسبت به کنترل (بدون عامل بازدارنده) در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱. تاثیر سوپرناتانت مربوط به کشت جدایه‌های آنتاگونیست (عامل بازدارنده) بر دانسیته نوری *سالمونلا* در محیط مایع.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان دانسیته نوری نشان می‌دهد که به ترتیب ۱) *B. rugosus* strain CS_5 ، ۲) *B. vallismortis* strain AS_4، ۳) *P. aryabhattai* strain Cl_1 و ۴) *Bacillus* sp. strain SS_4 بیشترین اثر مهارکنندگی بر رشد سویه تست در محیط مایع داشته‌اند. تاثیر زمان انکوباسیون نشان‌دهنده افزایش دانسیته نوری سالمونلا پس از ۲۴ ساعت بود (شکل ۲). سوپرناتانت جدایه‌های آنتاگونیستی فعالیت مهارکنندگی متفاوتی را در ارزیابی اولیه بر اساس زمان از خود نشان دادند. بخش اعظمی از میکروبیوم خاک را باکتری‌های ریزوسفری و اندوفیتی محرک رشد گیاه تشکیل می‌دهند. حضور این باکتری‌ها بر روی ریشه گیاهان یا در ناحیه ریزوسفر و بروز تعاملات مثبت در خاک نقش مهمی در تعدیل شرایط به نفع میکروارگانسیم‌های مفید و بر علیه پاتوژن‌ها داشته است؛ این تعاملات در نهایت رشد گیاهان را ارتقا می‌بخشد (Jiao et al., 2021).



شکل ۲. تاثیر زمان بر دانسیته نوری *سالمونلا* در محیط مایع. ستون‌های با حروف مشابه از نظر آماری با آزمون توکی در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

اثرگذاری سویه‌های متعدد ریزوسفری محرک رشد در کنترل زیستی قارچ بیمارگر گیاهی بررسی شده است (Kashisaz et al., 2024). مطالعات در زمینه کنترل پاتوژن‌های گیاهی توسط سویه‌های متعدد محرک رشدی گسترده است؛ اما در زمینه کنترل پاتوژن *سالمونلا* منحصرا سویه *تیفی موریوم* در خاک توسط این باکتری‌های محرک رشدی مطالعات چندانی انجام نشده است. استفاده از باکتری‌های محرک رشد *B. subtilis* UD1022 باعث کنترل *S. enterica* در کشت گیاه کاهو شده است (Johnson et al., 2020). پاتوژن *سالمونلا* در خاک دارای ماندگاری است (Peng et al., 2022). ورود سویه *سالمونلا انتریکا* در دو گیاه کاهو و ذرت به دلیل حضور و ماندگاری این پاتوژن در خاک گزارش شده است (Jechalke et al., 2019). بنابراین نقش باکتری‌های محرک رشدی در بقا و یا سرکوب پاتوژن *سالمونلا* قبل از ورود به گیاه برجسته خواهد بود. در مطالعه‌ای سوپرناتانت باکتری *Pseudomonas fragi* CECT 30069 در برابر ۳ پاتوژن غذایی (*S. enteritidis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*) فعالیت مهاری بیشتری نسبت به سوپرناتانت باکتری *Shewanella baltica* CECT ۳۰۰۷۵ نشان داده است (Condò et al., 2022). مهارکنندگی سوپرناتانت‌های جدایه‌های آنتاگونیست نشان‌دهنده وجود یکسری ترکیبات مهارکننده فعال مترشحه از این جدایه‌ها می‌باشد (Santos et al., 2022). در پژوهش ما بر اساس غربالگری اولیه در محیط مایع، به ترتیب جدایه‌های *B. rugosus* strain CS_5 و *B. vallismortis* strain AS_4 دارای بیشترین مهار کنندگی بودند (شکل۱).

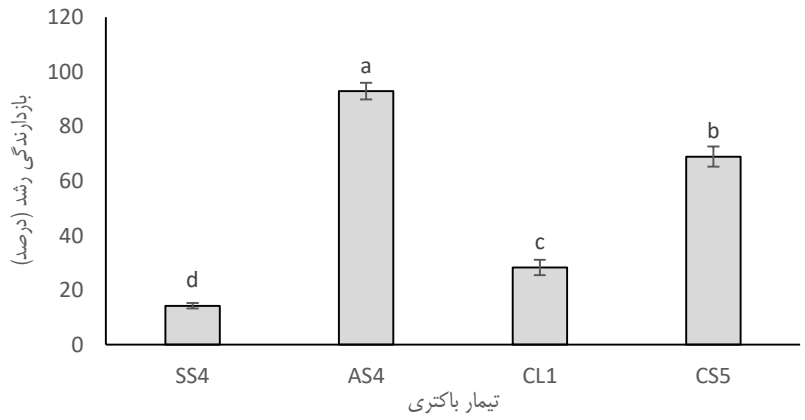
تجزیه واریانس داده‌های بازدارندگی رشد سالمونلا در محیط جامد توسط چهار جدایه باکتریایی نشان دهنده تأثیر معنی‌دار باکتریهای محرک رشد بر کاهش رشد سالمونلا بود (جدول ۷).

جدول ۷. میانگین مربعات اثر عامل بازدارنده بر بازدارندگی رشد *سالمونلا* در محیط جامد.

منابع تغییر	درجه آزادی	دانسیته نوری *سالمونلا*
عامل بازدارنده	۳	۵۲۴۷/۷۹**
خطا	۱۶	۳۱/۶۷
ضریب تغییرات(٪)		۱۱/۰۲

** معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد را نشان می‌دهد.

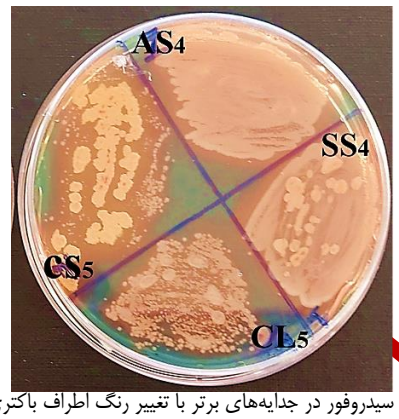
همچنین نتایج غربالگری جدایه‌های آنتاگونیست با تعیین درصد بازدارندگی رشد *سالمونلا* در حضور باکتری‌های محرک رشد (شکل ۳)؛ نشان داد که بیشترین بازدارندگی رشد با مقدار ۹۲ درصد در حضور جدایه‌ی *B. vallismortis* strain AS_4 و کمترین مقدار (۱۴ درصد) در حضور *Bacillus* sp. SS_4 بود. نتایج حاصل از فعالیت مهارکنندگی ۴ جدایه برتر انتخاب شده در محیط جامد در مقایسه با محیط مایع کمی متفاوت بود. در محیط جامد به ترتیب بیشترین بازدارندگی رشد به ترتیب ۱) *B. vallismortis* AS_4 ، ۲) *B. rugosus* CS_5 ، ۳) *P. aryabhattai* CL_1 و ۴) *Bacillus* sp. SS_4 بود.



شکل ۳. تاثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر بازدارندگی رشد *سالمونلا* در محیط جامد. ستون‌های با حروف مشابه از نظر آماری با آزمون توکی در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

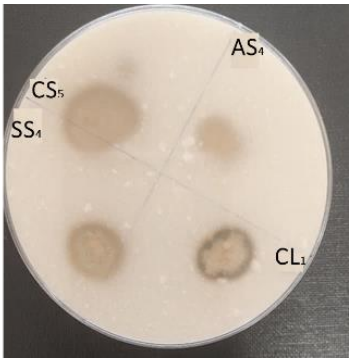
برخی خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های آنتاگونیست

چهار جدایه CS_5 ، SS_4، CL_1 و AS_4 دارای توانایی تولید سیدروفور بودند (شکل 4). تولید سیدروفور از مکانیسم‌های بازدارنده رشد عوامل بیماریزا محسوب می‌شود (Sheng et al., 202; Kumar et al., 2018). با تولید سیدروفور توسط جدایه‌های آنتاگونیستی، رشد پاتوژن‌ها به دلیل محدودیت دسترسی به آهن به عنوان یک ماده مغذی در محیط مهار می‌شود (Timofeeva et al., 2022).



شکل ۴. توانایی تولید سیدروفور در جدایه‌های برتر با تغییر رنگ اطراف باکتری به رنگ نارنجی.

تولید آنزیم پروتئاز توسط جدایه‌ها در شکل 5 نشان داده شده است. به ترتیب ۱) *B. rugosus* strain CS_5 و ۲) *P. aryabhattai* strain CL1 دارای بیشترین شاخص پروتئولیتیکی به میزان ۲/۹ و ۲/۵۵ بودند. شاخص پروتئولیتیکی *Bacillus* sp. strain SS_4 عدد ۲/۲۴ و شاخص پروتئولیتیکی *B. vallismortis* strain AS_4 عدد ۲ محاسبه شد. جدایه *B. vallismortis* strain AS_4 دارای توانایی تولید لیپاز بود. تولید آنزیم‌های هیدرولیتیکی برای تخریب ساختارهای پلیمری پیچیده در پاتوژن‌ها برای دریافت منبع غذایی کربن و رشد بیشتر جدایه‌های آنتاگونیست صورت می‌گیرد (Mishra et al., 2020). جدایه *B. rugosus* strain CS5 دارای بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز بود. تخریب دیواره سلولی پاتوژن‌های گیاهی از طریق تولید آنزیم‌های هیدورلیتیکی هم‌چون پروتئاز، سرین پروتئاز و glucanase β -1,3 و کیتیناز گزارش شده است (Mishra et al., 2020). بنابراین تولید آنزیم‌های هیدرولیتیکی می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های موثر در مهار پاتوژن در این پژوهش به شمار رود. آنزیم‌های هیدرولیتیکی ترشح شده توسط باکتری‌های محرک رشدی مانند لیپازها، گلوکوناز‌ها، کیتینازها و لیگنینازها در تجزیه دیواره سلولی قارچ‌های بیماریزا موثر هستند؛ اما ترشح آنزیم‌هایی همچون سلولاز و پروتئاز که در تجزیه سلولز و همچنین سایر پلیمرهای دیواره سلولی باکتری‌های بیماریزا تخصصی عمل نموده‌اند؛ عامل اصلی در کنترل پاتوژن‌های باکتریایی می‌باشند (Mishra et al., 2020). گزارشی مبنی بر اثرات منفی ترشح این آنزیم‌ها توسط باکتری‌های محرک رشد گیاهان در آسیب به بافت گیاهی وجود ندارد. بنابراین تنها نقش آن‌ها در تضاد با پاتوژن‌ها بوده است (Menendez et al., 2015;Santoyo et al., 2021).



شکل ۵. توانایی تولید آنزیم پروتئاز در جدایه‌های برتر.

دو جدایه *P. aryabhattai* strain CL_1 و *B. rugosus* strain CS_5 دارای توانایی تولید HCN با مقادیر ۰/۴۸ و ۰/۲ میلی‌گرم

ویرایش نشده

در میلی‌لیتر بودند. هیدروژن سیانید یک ترکیب مفید در کنترل زیستی پاتوژن‌ها محسوب می‌گردد که توسط باکتری‌های محرک رشدی تولید می‌شود و به دلیل سمیت رشد پاتوژن‌های گیاهی را محدود می‌نماید. در اثر تولید هیدروژن سیانید توسط باکتری‌های ریزوسفری و اندوفیتی محرک رشد گیاه، تخریب دیواره سلولی میکروارگانیسم بیماری‌زا رخ داده و پاتوژن مهار می‌گردد Bahadur (Gouda et al., 2018; et al., 2017). مهار انتقال الکترون و مختل نمودن تأمین انرژی سلول در اثر تولید HCN منجر به مرگ موجودات زنده می‌گردد (Abd El-Rahman et al., 2019) . تولید HCN توسط بسیاری از جنس‌های باکتریایی دیگر از جمله *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhazibium* نیز گزارش شده است (Agbodjato and Babalola, 2024).

آزمایش گلدانی

جمعیت میکروبی اولیه خاک قبل از شروع آزمایش ۶۱/۳۹ × ۱۰^{۶} CFU/g Soil محاسبه شد که پس از سترون کردن خاک در اتوکلاو به صفر رسید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر متقابل جدایه‌های آنتاگونیست و زمان بر جمعیت *S. typhimurium* در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۸). این نشان می‌دهد که هر دو عامل زمان و نوع باکتری به عنوان عامل بازدارنده رشد تأثیر قابل توجهی بر کاهش جمعیت پاتوژن دارند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین تعداد پاتوژن در شاهد مثبت (خاک دارای *S. typhimurium* و بدون تلقیح باکتری بازدارنده رشد) و در مدت زمان ۱۵ روز اندازه‌گیری شد. در مقابل، کمترین جمعیت پاتوژن پس از تیمار شاهد منفی (بدون افزودن باکتری بازدارنده) در تیمار مایه‌زنی شده با *Bacillus* sp. اندازه‌گیری شد (جدول ۹). این نتایج نشان می‌دهد که مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد به خاک می‌تواند به طور مؤثری جمعیت پاتوژن جمعیت پاتوژن را کاهش دهد. در تیمارهای *Bacillus* sp.، *B. rugosus*، *P. aryabhattai* ، *B. vallismortis* و مخلوط چهار باکتری در مدت زمان ۱۵ روز، جمعیت پاتوژن در مقایسه با تیمار شاهد مثبت به ترتیب ۹۸ ، ۹۰، ۹۱، ۹۰ و ۹۲ درصد کاهش یافت (جدول ۹). تیمار خاک با *Bacillus* sp. strain SS4 و پس از آن کنسرسیوم باکتری‌ها، در مدت زمان ۱۵ روز بالاترین نقش را در کاهش جمعیت *S. typhimurium* داشتند.

جدول ۸. میانگین مربعات اثر باکتری و زمان بر جمعیت پاتوژن *سالمونلا*

منابع تغییر	درجه آزادی	دانسیته نوری سالمونلا
عامل بازدارنده (تیمار بین گروهی)	۶	۳/۴۶E+۱۲**
خطا	۱۴	۱/۷۷E+۰۸
زمان (تیمار درون گروهی)	۱	۱/۹۵E+۱۳**
زمان*عامل بازدارنده	۶	۲/۰۳E+۱۲**
خطا	۱۴	۱/۶۴E+۸

**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های محرک رشد می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند تولید ترکیبات ضد میکروبی، رقابت برای مواد مغذی و آشیان اکولوژیک، و القای مقاومت سیستمیک در گیاهان، به کنترل پاتوژن‌ها کمک کنند (Peng et al., 2022; Pellegrini et al., 2023). به عنوان مثال، باکتری‌های جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* به دلیل توانایی در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات ضد میکروبی، به عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی مؤثر شناخته شده‌اند (Kumar et al., 2020; Pellegrini et al., 2023). تولید سیدروفور، تولید آنزیم‌های هیدرولیتیکی کاتالاز و پروتئاز و تولید سیانید هیدروژن از مکانیسم‌های تأثیرگذار در کنترل پاتوژن بوده‌اند. سرکوب رشد پاتوژن توسط باکتری *B. subtilis* با مکانیسم‌هایی هم‌چون تثبیت نیتروژن، افزایش حلالیت فسفر و تولید سیدروفور گزارش شده است (Hashem et al., 2019). سرکوب پاتوژن‌های قارچی گیاهی توسط باکتری *B. subtilis* FJ3 با مکانیسم‌های تولید آنزیم‌های هیدرولیتیکی، تولید IAA، سیدروفور، تشکیل بیوفیلم و انحلال

ویرایش نشده

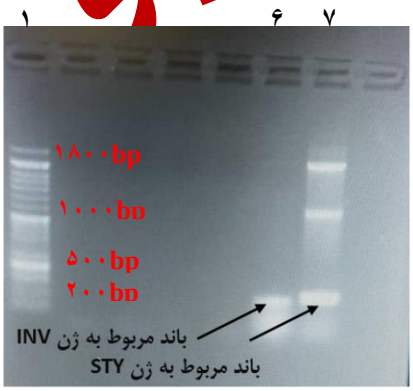
فسفر گزارش شده است (Jan et al., 2023). به نقش آنتاگونیستی *Bacillus* spp. در کنترل زیستی پاتوژن به دلیل تولید ترکیبات آنتی بیوتیک، هیدورلازها و سیدروفور اشاره شده است (Miljaković et al., 2020). بر اساس نتایج جنس *Bacillus* sp. strain SS_4 بیشترین بازدارندگی رشد پاتوژن را از خود نشان داد.

جدول ۹. مقایسه میانگین برهمکنش اثر باکتری محرک رشد و زمان بر جمعیت *سالمونلا* در خاک (CFU/g Soil)

تیمار / زمان (روز)	*Bacillus* sp. SS4	*B. rugosus* CS5	*B. vallismortis* AS_4	*P. aryabhattai* CL1	کنسرسیوم میکروبی	شاهد منفی	شاهد مثبت
۲	۲/۱۹ ×۱۰^{۶} c	۲/۱۹ ×۱۰^{۶} c	۲/۲۸ ×۱۰^{۶} b	۲/۲۸ ×۱۰^{۶} b	۲/۲۸ ×۱۰^{۶} b	۰/۰۰ f	۲/۳ ×۱۰^{۶} b
۱۵	۳۰/۴۰ ×۱۰^{۳} f	۲۷۰/۶۳ ×۱۰^{۳} d	۲۸۶/۵۶ ×۱۰^{۳} d	۲۴۹/۵۳ ×۱۰^{۳} de	۲۲۱/۸ ×۱۰^{۳} e	۰/۰۰ f	۲/۹۴ × ۱۰^{۶} a

اعداد دارای حروف مشابه از نظر آماری با آزمون توکی در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

با توجه به رشد این پاتوژن در خاک فاقد باکتری محرک رشد (شاهد مثبت) غیرقابل کشت بودن این باکتری در محیط اختصاصی XLD رد می‌شود. به منظور تأیید کلنی‌های رشد یافته در پلیت‌های حاوی محیط اختصاصی XLD استخراج DNA انجام و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR از تک کلنی‌های مشاهده شده در پلیت‌های XLD (شکل ۵)؛ حضور پاتوژن *S. typhimurium* را در خاک‌های آلوده تأیید نمود. چاهک ۶ و ۷ به ترتیب باندهای مربوط به تکثیر DNA استخراج شده کلنی باکتری رشد یافته در محیط اختصاصی XLD توسط ژن‌های اختصاصی *سالمونلا تیفی موریوم* با وزن 200bp را نشان می‌دهند.



شکل۵. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR، چاهک یک: DNA ladder ، چاهک شش: باند مربوط به ژن INV و چاهک هفت: باند مربوط به ژن STY.

نتیجه‌گیری

آلودگی خاک یکی از محدودیت‌ها به منظور تولید محصولات غذایی سالم و بهبود امنیت غذایی است. پاتوژن *سالمونلا* در مقایسه با سایر پاتوژن‌های باکتریایی ماندگاری بیشتری در خاک نشان داده است (Peng et al., 2022). پاتوژن *سالمونلا* در مقایسه با سایر پاتوژن‌های باکتریایی ماندگاری بیشتری در خاک نشان داده است. تولید غذای سالم و بدون پاتوژن‌هایی مانند *سالمونلا* از

ویرایشی نشده

اهمیت زیادی برخوردار است. نتایج این مطالعه نشان داد باکتری‌های محرک رشد مورد استفاده توانایی کنترل *سالمونلا* را در شرایط آزمایشگاهی و خاک دارا هستند. این باکتری‌ها احتمالا با مکانیسم‌هایی مانند تولید سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنزیم‌های هیدرولیتیکی باعث کنترل این پاتوژن شدند. با کنترل این پاتوژن خطرناک در خاک، از انتقال آن به آب‌های زیرزمینی و گیاه جلوگیری خواهد شد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از دانشگاه شهید چمران اهواز (SCU.AS1402.248) و پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (-05-05 -081 002-9901-01003) تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

Abd El-Rahman, A. F., Shaheen, H. A., Abd El-Aziz, R. M., & Ibrahim, D. S. S. (2019). Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, Meloidogyne incognita. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *29*(1). https://doi.org/10.1186/s41938-019-0143-7

Adedeji, A. A., Häggblom, M. M., & Babalola, O. O. (2020). Sustainable agriculture in Africa: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to the rescue. *Scientific African*, *9*. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00492

Agbodjato, N. A., & Babalola, O. O. (2024). Promoting sustainable agriculture by exploiting plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve maize and cowpea crops. *PeerJ*, *12*(4), 1–34. https://doi.org/10.7717/peerj.16836

Andino, A., & Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*, *2015*(Table 3). https://doi.org/10.1155/2015/520179

Arthurson, V., Sessitsch, A., & Jäderlund, L. (2011). Persistence and spread of Salmonella enterica serovar Weltevreden in soil and on spinach plants. *FEMS Microbiology Letters*, *314*(1), 67–74. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02140.x

Bahadur, I., Maurya, B. R., Meena, V. S., Saha, M., Kumar, A., & Aeron, A. (2017). Mineral Release Dynamics of Tricalcium Phosphate and Waste Muscovite by Mineral-Solubilizing Rhizobacteria Isolated from Indo-Gangetic Plain of India. *Geomicrobiology Journal*, *34*(5), 454–466. https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1219431

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Bauer, M. A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2018). Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. *Microbial Cell*, *5*(5), 215–219. https://doi.org/10.15698/mic2018.05.628

Chahar, M., Gollop, R., Kroupitski, Y., Shemesh, M., & Sela Saldinger, S. (2023). Control of Salmonella in mung bean sprouts by antagonistic spore-forming Bacilli. *Food Control*, *143*(July 2022). https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109276

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & 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*(9), 4951–4959. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005

Condò, C., Gómez, I., Farfán, M., & Rius, N. (2022). Assessing the inhibitory activity of culture supernatants against foodborne pathogens of two psychrotrophic bacteria isolated from river trout. *Archives of Microbiology*, *204*(6), 1–8. https://doi.org/10.1007/s00203-022-02919-5

Dhawi, F. (2023). The Role of Plant Growth-Promoting Microorganisms (PGPMs) and Their Feasibility in Hydroponics and Vertical Farming. *Metabolites*, *13*(2). https://doi.org/10.3390/metabo13020247

Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, *8*(3), 284–293. https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243

Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A., & Fanning, S. (2013). Mechanisms of survival, responses, and sources of salmonella in low-moisture environments. *Frontiers in Microbiology*, *4*(NOV), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331

Fitriyanto, N. A., Hadi, S., Bahtiyar, M. I., Prasetyo, R. A., & Erwanto, Y. (2020). Characterization and growth profile of proteolytic strain PK-4 isolated from local slaughterhouse wastewater. *BIO Web of Conferences*, *28*, 2–5. https://doi.org/10.1051/bioconf/20202803001

Ghodsalavi, B., Ahmadzadeh, M., Soleimani, M., Madloo, P. B., & Taghizad-Farid, R. (2013). Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of Valeriana officinalis. *Australian Journal of Crop Science*, *7*(3), 338–344.

Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, *206*(October 2017), 131–140. https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016

Gowtham, H. G., Hariprasad, P., Nayak, S. C., & Niranjana, S. R. (2016). Application of rhizobacteria antagonistic to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici for the management of Fusarium wilt in tomato. *Rhizosphere*, *2*, 72–74. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.07.008

Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd_Allah, E. (2019). Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(6), 1291–1297. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004

Hogg, P.G. & Ahlgren, H.L. (1942). A rapid method for determining hydrocyanic acid content of single plants of Sudan grass. *Agronomy Journal* 34, 199-200.

Jan, F., Arshad, H., Ahad, M., Jamal, A., & Smith, D. L. (2023). In vitro assessment of Bacillus subtilis FJ3 affirms its biocontrol and plant growth promoting potential. *Frontiers in Plant Science*, *14*(July), 1–18. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1205894

Jechalke, S., Schierstaedt, J., Becker, M., Flemer, B., Grosch, R., Smalla, K., & Schikora, A. (2019). Salmonella establishment in agricultural soil and colonization of crop plants depend on soil type and plant species. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAY), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00967

Jiao, X., Takishita, Y., Zhou, G., & Smith, D. L. (2021). Plant Associated Rhizobacteria for Biocontrol and Plant Growth Enhancement. *Frontiers in Plant Science*, *12*(March). https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634796

Johnson, N., Litt, P. K., Kniel, K. E., & Bais, H. (2020). Evasion of Plant Innate Defense Response by Salmonella on Lettuce. *Frontiers in Microbiology*, *11*(April), 1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00500

Karmakar, K., Nath, U., Nataraja, K. N., & Chakravortty, D. (2018). Root mediated uptake of Salmonella is different from phyto-pathogen and associated with the colonization of edible organs. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1578-9

Kumar, P., Thakur, S., Dhingra, G. K., Singh, A., Pal, M. K., Harshvardhan, K., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2018). Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *15*(June), 264–269. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.019

Kumar, A., Singh, S., Gaurav, A.K., Srivastava, S. & Verma, J.P. (2020). Plant growth-promoting bacteria: biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. *Frontiers in microbiology*, *11*, p.1216.

López, F. E., de las Mercedes Pescaretti, M., Morero, R., & Delgado, M. A. (2012). Salmonella Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? *Food Research International*, *45*(2), 842–851. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.009

Lozano-Villegas, K. J., Herrera-Sánchez, M. P., Beltrán-Martínez, M. A., Cárdenas-Moscoso, S., & Rondón-Barragán, I. S. (2023). Molecular Detection of Virulence Factors in Salmonella serovars Isolated from Poultry and Human Samples. *Veterinary Medicine International*, *2023*. https://doi.org/10.1155/2023/1875253

Luo, F., Chen, H., Wei, W., Liu, H., Chen, Y., & Li, S. (2024). Screening of Antagonistic Bacillus against Brown Rot in Dendrocalamus latiflorus and Preparation of Applying Bacterial Suspension. *Plant Pathology*

Journal, *40*(1), 1–15. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2023.0107

Maelegheer, K., & Nulens, E. (2017). Same-day identification and antibiotic susceptibility testing on positive blood cultures: a simple and inexpensive procedure. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *36*(4), 681–687. https://doi.org/10.1007/s10096-016-2849-8

Menendez, E., Garcia-Fraile, P., & Rivas, R. (2015). Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioengineering*, *2*(3), 163–182. https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.3.163

Method, A. R., Determining, F. O. R., Acid, H., Of, C., & Plants, S. (1942). *Published February*, *1942*. 199–200.

Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of bacillus spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, *8*(7), 1–19. https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037

Mishra, P., Mishra, J., Dwivedi, S. K., & Arora, N. K. (2020). *Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens*. *April*, 259–285. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_10

Nawaz, A., Shahbaz, M., Asadullah, M., Imran, A., Marghoob, M. U., Imtiaz, M., & Mubeen, F. (2020). Potential of Salt Tolerant PGPR in Growth and Yield Augmentation of Wheat (Triticum aestivum L.) Under Saline Conditions. *Frontiers in Microbiology*, *11*(October), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02019

Paião, F. G., Arisitides, L. G. A., Murate, L. S., Vilas-Bôas, G. T., Vilas-Boas, L. A., & Shimokomaki, M. (2013). Detection of Salmonella spp, Salmonella Enteritidis and Typhimurium in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(1), 37–41. https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000002

Pellegrini, M., Djebaili, R., Pagnani, G., Spera, D.M. & Del Gallo, M. (2023). Plant growth-promoting bacterial consortia render biological control of plant pathogens: a review. Sustainable Agrobiology: Design and Development of Microbial Consortia, pp.57-74.

Peng, S., Song, D., Zhou, B., Hua, Q., Lin, X., & Wang, Y. (2022). Persistence of Salmonella Typhimurium and antibiotic resistance genes in different types of soil influenced by flooding and soil properties. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *248*(October). https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114330

Podnar, E., Erega, A., Danevčič, T., Kovačec, E., Lories, B., Steenackers, H., & Mandic-Mulec, I. (2022). Nutrient Availability and Biofilm Polysaccharide Shape the Bacillaene-Dependent Antagonism of Bacillus subtilis against Salmonella Typhimurium. *Microbiology Spectrum*, *10*(6), 1–14. https://doi.org/10.1128/spectrum.01836-22

Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Lee, H. Y., Noorlis, A., Zainazor, T. C. T., Tang, J. Y. H., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2011). Multiplex PCR for the concurrent detection and differentiation of salmonella spp., Salmonella Typhi and salmonella Typhimurium. *Tropical Medicine and Health*, *39*(1), 9–15. https://doi.org/10.2149/tmh.2010-20

Rahman, M., Alam, M. U., Luies, S. K., Kamal, A., Ferdous, S., Lin, A., Sharior, F., Khan, R., Rahman, Z., Parvez, S. M., Amin, N., Hasan, R., Tadesse, B. T., Taneja, N., Islam, M. A., & Ercumen, A. (2022). Contamination of fresh produce with antibiotic-resistant bacteria and associated risks to human health: A scoping review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(1), 1–15. https://doi.org/10.3390/ijerph19010360

Rahman, M. T. (2015). Salmonellosis: A major foodborne disease of Global significance. *Beverage and Food World*, *42*(12), 21–24. https://www.researchgate.net/publication/288827348

Santos, A. C. C., Malta, S. M., Dantas, R. C. C., Coelho Rocha, N. D., Ariston de Carvalho Azevedo, V., & Ueira-Vieira, C. (2022). Antimicrobial activity of supernatants produced by bacteria isolated from Brazilian stingless bee's larval food. *BMC Microbiology*, *22*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12866-022-02548-4

Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (Pgpr). *Biology*, *10*(6), 1–18. https://doi.org/10.3390/biology10060475

Sheng, M., Jia, H., Zhang, G., Zeng, L., Zhang, T., Long, Y., Lan, J., Hu, Z., Zeng, Z., Wang, B., & Liu, H. (2020). Siderophore Production by Rhizosphere Biological Control Bacteria Brevibacillus brevis GZDF3 of Pinellia

ternata and Its Antifungal Effects on Candida albicans. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(5), 689–699. https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10066

Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants*, *11*(22). https://doi.org/10.3390/plants11223065

Yanti, Y., Hamid, H., Reflin, Warnita, & Habazar, T. (2020). The ability of indigenous bacillus spp. Consortia to control the anthracnose disease (colletrotricum capsici) and increase the growth of chili plants. *Biodiversitas*, *21*(1), 179–186. https://doi.org/10.13057/biodiv/d210123

Zhang, R., Li, Z., Gu, X., Zhao, J., Guo, T., & Kong, J. (2022). Probiotic Bacillus subtilis LF11 Protects Intestinal Epithelium Against Salmonella Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*(February), 1–12. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.837886

Zhao, X., Silva, M. B. R. da, Van der Linden, I., Franco, B. D. G. M., & Uyttendaele, M. (2021). Behavior of the Biological Control Agent Bacillus thuringiensis subsp. aizawai ABTS-1857 and Salmonella enterica on Spinach Plants and Cut Leaves. *Frontiers in Microbiology*, *12*(February), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.626029

وارد بایگانی شده