



**Biological Journal of Microorganisms,**  
Year ,12 No.45, Spring 2023  
Received: 2021-12-04 / Accepted: 2022-01-16

(Research Paper)

## **Optimization of Indole Acetic Acid Bio-production from Whey Substrate Using Bacteria Isolated from Rhizosphere and Phyllosphere of Plants**

**Leila Yeganeh**

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran, yeganehr125@gmail.com

**Seyed Mohammad Mehdi Mahmoodi\***

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran, mm.mahmoodi@kau.ac.ir

### **Abstract**

**Introduction:** Indole acetic acid (auxin) is a plant hormone that, in addition to plants, is produced by a number of bacteria. The aim of the present study was to optimize the production of indole acetic acid from whey substrate by bacteria isolated from rhizosphere and phyllosphere of plants.

**Materials and Methods:** The desired bacteria were isolated and purified from phyllosphere and rhizosphere of green beans, cowpea, mint, and parsley plants. The ability of isolates to grow in whey substrate and production of auxin was evaluated. The effect of pH and temperature parameters on the function of isolates was investigated. Impure auxin powder was prepared from the bacterial culture in whey substrate and its function was evaluated on the seed growth rate of lentil and mung bean plants.

**Results:** Out of 26 isolated bacterial samples, 5 isolates (19.2%) had the ability to produce indole acetic acid and grow in whey substrate simultaneously. Two isolates with the highest auxin production capacity were identified using *16S rDNA* region sequencing. One isolate had 97% similarity to *Enterobacter soli* and the other isolate had 99% similarity to *Enterobacter mori*. These isolates showed the highest auxin production capacity at 30 and 35°C respectively and in pH 7. Seed irrigation of the studied plants with produced auxin solutions significantly increased the longitudinal growth of stems of these plants in comparison with control solutions.

**Discussion and Conclusion:** Auxin-producing strains can be isolated from soil and plants, and by using inexpensive substrates such as whey, this phytohormone can be produced on an industrial scale and used as a plant growth stimulant.

**Key words:** Indole Acetic Acid, Auxin, Plant Growth-Promoting Bacteria, Whey Substrate

---

\* Corresponding author

2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[https://bjm.ui.ac.ir/article\\_26258.html](https://bjm.ui.ac.ir/article_26258.html)



## زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال دوازدهم، شماره ۴۵، بهار ۱۴۰۲، صفحه ۳۰-۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶

# بهینه‌سازی تولید زیستی ایندول استیک اسید از سوبسترای آب پنیر با استفاده از باکتری‌های جداسازی شده از ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان

لیلیا یگانه: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران، yeganehr125@gmail.com

سید محمد مهدی محمودی\*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران، mm.mahmoodi@kau.ac.ir

## چکیده

**مقدمه:** ایندول استیک اسید (اکسین) یک هورمون گیاهی است که علاوه بر گیاهان، توسط تعدادی از باکتری‌ها نیز تولید می‌شود. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی تولید ایندول استیک اسید از سوبسترای آب پنیر توسط باکتری‌های جداسازی شده از ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان بود.

**مواد و روش‌ها:** باکتری‌های مدنظر، از فیلوسفر و ریزوسفر گیاهان لوبیا سبز، لوبیا چشم بلبلی، نعناع و جعفری جداسازی و خالص‌سازی شدند. توانایی جدایه‌ها برای رشد در سوبسترای آب پنیر و تولید اکسین ارزیابی شد. تأثیر پارامترهای pH و دما بر عملکرد جدایه‌ها بررسی شد. از کشت باکتری در سوبسترای آب پنیر، پودر ناخالص اکسین، تهیه و عملکرد آن بر میزان رشد بذر گیاهان عدس و ماش بررسی شد.

**نتایج:** از ۲۶ نمونه باکتری جداسازی شده، ۵ جدایه (۱۹/۲ درصد) از توانایی تولید ایندول استیک اسید و رشد در سوبسترای آب پنیر به‌طور همزمان برخوردار بودند. ۲ جدایه با بیشترین قابلیت تولید اکسین، با استفاده از تعیین توالی ناحیه *16S rDNA* شناسایی شدند. یک جدایه به میزان ۹۷ درصد با *انتروباکتر سولی* و جدایه دیگر به میزان ۹۹ درصد با *انتروباکتر موری* شباهت داشتند. این جدایه‌ها به ترتیب در دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در pH=۷ بیشترین قابلیت تولید اکسین را نشان دادند. آبیاری بذر گیاهان بررسی شده با محلول‌های اکسین تولیدی، به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با محلول‌های کنترل توانست رشد طولی ساقه این گیاهان را افزایش دهد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** سویه‌های مولد اکسین را می‌توان از خاک و گیاهان جداسازی کرد و با استفاده از سوبستراهای ارزان قیمتی همچون آب پنیر می‌توان این هورمون گیاهی را در مقیاس صنعتی، تولید و به‌عنوان محرک رشد گیاهان استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** ایندول استیک اسید، اکسین، باکتری‌های محرک رشد گیاه، سوبسترای آب پنیر

\* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[https://bjm.ui.ac.ir/article\\_26258.html](https://bjm.ui.ac.ir/article_26258.html)

## مقدمه

امروزه به دلیل افزایش جمعیت، کاهش منابع آب شیرین، فرسایش خاک و محدود شدن دسترسی بشر به زمین‌های قابل کشت، لزوم استفاده از کشاورزی نوین و به کارگیری عوامل زیستی به منظور بهبود وضعیت رشد گیاهان بیش از پیش احساس می‌شود. میکروارگانیسم‌های موجود در خاک اطراف ریشه یا مستقر روی اندام‌های هوایی گیاه نقش بسیار مهم و سازنده‌ای در ایجاد برهم کنش‌های مثبت با گیاه میزبان و بهبود وضعیت رشد گیاه دارند. بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها از پتانسیل تولید هورمون‌های گیاهی و مواد تحریک‌کننده رشد گیاه همچون اکسین<sup>۱</sup>، جیبرلین<sup>۲</sup>، آبسزیک اسید<sup>۳</sup> و اتیلن<sup>۴</sup> برخوردارند؛ بنابراین، مدیریت صحیح تعاملات مثبت بین میکروب و گیاه می‌تواند با بهبود وضعیت حاصلخیزی خاک و ایجاد توازن در اکوسیستم خاک - گیاه، نیاز به استفاده از کودهای شیمیایی را کاهش و تولید محصولات کشاورزی را به سمت کشاورزی ارگانیک و طبیعی سوق دهد (۱).

ایندول استیک اسید<sup>۵</sup> عضو اصلی خانواده اکسین‌ها است که توسط گیاهان تولید می‌شود و در بسیاری از فعالیت‌های گیاه از قبیل تشکیل برگ، رشد رویان گیاه، شروع رشد ریشه، نورگرایی و رشد میوه نقش مهمی دارد. ایندول استیک اسید با افزایش تعداد انشعابات ریشه به جذب آب و عناصر معدنی لازم از خاک اطراف ریشه کمک شایانی می‌کند. تعداد چشمگیری از باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌های مختلف از پتانسیل تولید ایندول استیک اسید برخوردارند. تولید ایندول استیک اسید در گیاهان و میکروب‌ها از مسیرهای بیوشیمیایی به هم پیوسته‌ای صورت می‌گیرد که مسیر وابسته به اسید آمینه تریپتوفان مهم‌ترین مسیر شناخته شده است (۲ و ۳).

برای تولید زیستی ایندول استیک اسید توسط باکتری‌ها، هزینه سوسترای مورد نیاز رشد باکتری یک عامل کلیدی است که بر قیمت محصول نهایی اثر می‌گذارد. استفاده از سوسترهای ارزان قیمت به ویژه محصولات جانبی کشاورزی یا صنایع لبنی باعث صرفه‌جویی زیادی در هزینه تولید می‌شود. آب پنیر یک محصول جانبی صنایع لبنی است که قند لاکتوز و نیاز به اکسیژن زیستی<sup>۶</sup> بالایی دارد، از آلاینده‌های مهم محیط زیست محسوب می‌شود و معمولاً دفع آن مشکلات زیادی برای کارگاه‌های پنیرسازی ایجاد می‌کند. استفاده از قند لاکتوز موجود در آب پنیر به عنوان یک منبع کربن مناسب و ارزان قیمت برای تولید زیستی ایندول استیک اسید محسوب می‌شود (۴).

هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی تولید زیستی ایندول استیک اسید از سوسترای آب پنیر با استفاده از باکتری‌های جداسازی شده از ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان بود. در این راستا تأثیر عواملی همچون دما و pH بر میزان تولید ایندول استیک اسید، مطالعه و همچنین چگونگی تأثیر محصول تولیدی بر میزان رشد بذر چند گیاه بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

**جداسازی و شناسایی باکتری‌ها:** در این تحقیق پژوهشی کاربردی، چندین نمونه گیاه شامل لوبیا سبز، لوبیا چشم بلبلی، نعناع و جعفری از مزارع اطراف شهرستان کازرون جمع‌آوری شدند. اندام‌های هوایی و ریشه هر گیاه به صورت مجزا بسته‌بندی و در محفظه سرد به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از بخش فیلوسفر گیاهان توسط سواب مرطوب، نمونه برداری و از خاک متصل به ریشه گیاهان نیز در سرم فیزیولوژی رقت‌های متوالی

تهیه شد. از محیط کشت نوترینت آگار برای کشت نمونه‌ها استفاده شد. پلیت‌های کشت داده شده در یک محفظه مرطوب قرار داده و به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. به تدریج از کلنی‌های رشد کرده نمونه‌برداری شد و به منظور خالص‌سازی، مجدداً در پلیت‌های جدید کشت داده شدند.

کلنی‌های خالص‌سازی شده براساس ویژگی‌های مورفولوژیک، رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز، تحرک و تولید اسپور، دسته‌بندی و موارد تکراری حذف شدند. با توجه به اینکه در این تحقیق، قابلیت رشد باکتری در سویسترای آب پنیر و تولید ایندول استیک اسید معیارهای اصلی مدنظر بودند، از آزمون تخمیر قند لاکتوز برای اثبات قابلیت رشد در سویسترای آب پنیر و از آزمون سالکوفسکی<sup>۷</sup> برای اثبات قابلیت تولید ایندول استیک اسید (اکسین) استفاده شد. برای اجرای آزمون سالکوفسکی، از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌های جداسازی شده که غلظت آنها معادل لوله ۱ استاندارد مک‌فارلند ( $3 \times 10^8$ ) تنظیم شده بود، به لوله‌های حاوی محیط نوترینت برات استریل تلقیح شد و لوله‌ها به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس لوله‌های کشت با گشتاور ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه ساتریفیوژ شدند تا سلول‌های باکتری رسوب کنند. میزان ۲ سی‌سی از مایع رویی لوله‌ها برداشته و در لوله‌های آزمایش استریل ریخته شد. یک لوله حاوی محیط کشت نوترینت برات استریل نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به هریک از لوله‌ها (همچنین به لوله شاهد) میزان ۴ سی‌سی معرف تازه تهیه شده سالکوفسکی اضافه شد. این معرف از افزودن ۲ میلی‌لیتر محلول کلروفوریک<sup>۸</sup> ۰/۵ مولار به ۱۰۰ میلی‌لیتر

محلول ۳۵ درصد پرکلریک اسید<sup>۹</sup> به دست آمد (۵). سر لوله‌ها با پارافیلیم بسته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شدند. ایجاد رنگ صورتی تا قرمز نشانه حضور اکسین در لوله‌ها بود. برای دقت بیشتر، جذب نوری محتویات لوله‌ها، در طول موج ۵۳۰ نانومتر، نسبت به لوله شاهد اندازه‌گیری شد. جدایه‌هایی در این مرحله انتخاب شدند که بیشترین قابلیت تولید ایندول استیک اسید را از خود نشان دادند و بقیه آزمون‌ها روی آنها ادامه یافت (۶).

**بررسی تأثیر pH آب پنیر بر میزان تولید ایندول استیک اسید:** برای این منظور ابتدا در چندین ارلن حاوی سویسترای آب پنیر (تهیه شده از افزودن سرکه به شیر پاستوریزه کم چربی با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد)، با افزودن تدریجی اسید کلریدریک ۱ نرمال یا هیدروکسید سدیم ۱ نرمال، pHهای مختلف ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تهیه و باکتری‌های منتخب (با غلظت معادل ۱ مک‌فارلند) به صورت مجزا در این ارلن‌ها کشت داده شدند. ارلن‌ها به مدت ۲ روز روی دستگاه همزن با گشتاور ۱۰۰ دور در دقیقه و در دمای ثابت ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و میزان ایندول استیک اسید تولیدی بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش سالکوفسکی و اندازه‌گیری جذب نوری ارزیابی شد (۷).

**بررسی تأثیر دمای محیط بر میزان تولید ایندول استیک اسید:** باکتری‌های منتخب (با غلظت معادل ۱ مک‌فارلند) در چندین ارلن حاوی سویسترای آب پنیر با pH بهینه (که در آزمایش pH مشخص شد) کشت داده و به مدت ۲ روز در دماهای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد روی همزن با گشتاور ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند و میزان ایندول استیک اسید تولیدی بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد (۱۰).

می‌شد و یک ظرف نیز به‌عنوان آزمون اکسین غلیظ که با محلول آبی اکسین ۲ درصد آبیاری می‌شد. به تدریج با افزایش طول ساقه و ریشه و نیاز بیشتر گیاهان به آب، حجم محلول‌های آبیاری به‌صورت یکسان برای همه ظروف افزایش داده شد. پس از گذشت ۱۵ روز که رشد گیاهان به حد مطلوب رسید، با استفاده از خط‌کش میلی‌متری طول ساقه و ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین از آزمون آماری تی<sup>۱۰</sup> برای بررسی نتایج میزان رشد گیاهان استفاده شد (۸ و ۹).

#### شناسایی باکتری‌های منتخب با روش مولکولی:

باکتری‌هایی انتخاب شدند که بیشترین میزان تولید ایندول استیک اسید را در pH و دمای مناسب نشان دادند و با استفاده از کیت استخراج ژنوم (یکتا تجهیز آزما) عمل استخراج و خالص‌سازی ژنوم آنها انجام گرفت. سپس با استفاده از آغازگرهای همگانی ۲۷F و ۱۴۹۲R واکنش زنجیره‌ای پلیمراس برای تکثیر بخشی از ژن *16S rDNA* باکتری‌ها انجام گرفت. محصولات واکنش روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورس شده و در نهایت برای تعیین توالی، نمونه‌ها به شرکت پیشگام ارسال شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده، در پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی<sup>۱۱</sup>، بلاست<sup>۱۲</sup> و جدایه‌ها شناسایی شدند.

#### نتایج

از مجموع ۲۶ باکتری جداسازی شده از فیلوسفر و ریزوسفر گیاهان بررسی شده، تعداد ۵ جدایه دارای قابلیت تخمیر قند لاکتوز و تولید ایندول استیک اسید به‌صورت همزمان بودند. جدول ۱ برخی از آزمون‌های انجام شده روی این پنج جدایه را نشان می‌دهد.

#### تهیه پودر ناخالص ایندول استیک اسید (اکسین):

برای هر باکتری منتخب، یک ارلن حاوی ۱۰۰۰ سی‌سی آب پنیر تازه در نظر گرفته شد که pH آن در مقدار بهینه تنظیم شده بود و به میزان ۱۰ سی‌سی از باکتری منتخب (با غلظت معادل ۱ مک فارلند) به ارلن اضافه شد. ارلن‌ها در دمای بهینه به مدت ۳ روز روی همزن با گشتاور ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس محتویات ارلن‌ها به تعداد زیادی لوله سانتریفیوژ استریل انتقال داده و با گشتاور ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی لوله‌ها به ظروف پهن استریل انتقال داده و با قراردادن در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شد؛ در نهایت، پودر اکسین ناخالص تولیدشده، جمع‌آوری و به مدت ۳ ساعت در دسیکاتور قرار داده شد تا هر گونه رطوبت احتمالی آن حذف شود و سپس با دقت وزن شد (۴).

#### بررسی تأثیر پودر اکسین ناخالص بر رشد بذرها

**ماش و عدس:** برای این منظور، بذر گیاهان ماش و عدس (هر کدام ۳۰ عدد) ابتدا با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲ دقیقه، ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای هر نمونه بذر، ۴ ظرف شیشه‌ای استریل هم‌اندازه اختصاص داده شد. در تمامی ظروف، بذرها بین چندین لایه گاز استریل قرار گرفتند و ظروف در شرایط دمایی و نوری یکسان قرار داده شدند. از چهار ظرف اختصاص داده شده برای هر بذر، یک ظرف به‌عنوان نمونه شاهد بود که با آب مقطر، روزانه به میزان ۳ سی‌سی آبیاری می‌شد و یک ظرف به‌عنوان کنترل منفی بود که روزانه با آب پنیر هر بار به میزان ۳ سی‌سی آبیاری می‌شد. یک ظرف به‌عنوان آزمون اکسین رقیق که با محلول آبی اکسین ۱ درصد آبیاری

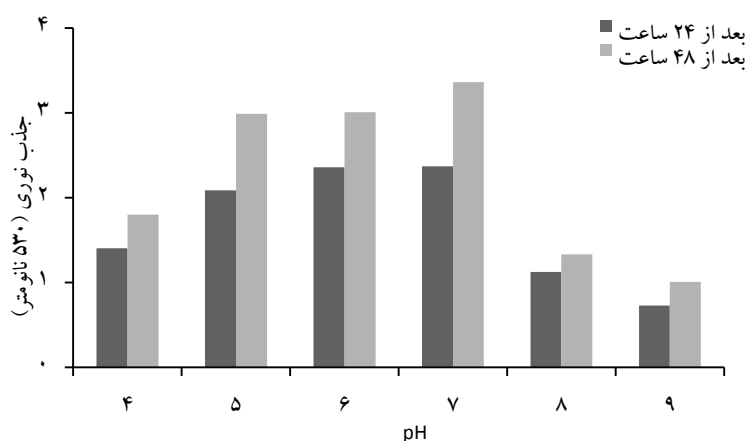
جدول ۱: نتایج آزمون های بیوشیمیایی روی پنج باکتری منتخب

کد باکتری	رنگ آمیزی گرم	آزمون کاتالاز	آزمون اکسیداز	شکل باکتری	تخمیر لاکتوز	آزمون سالکوفسکی	جذب نوری بعد از ۴۸ ساعت در ۵۳۰ نانومتر
الف ۱	-	+	-	میله ای کوتاه	+	+	۰/۹۳۷
الف ۲	-	+	-	میله ای کوتاه	+	+	۲/۸۱۰
الف ۳	-	+	-	میله ای کوتاه	+	+	۳/۳۶۳
ب ۱	-	+	+	میله ای کوتاه	+	+	۳/۱۱۰
ب ۲	-	+	+	میله ای کوتاه	+	+	۱/۷۳۰

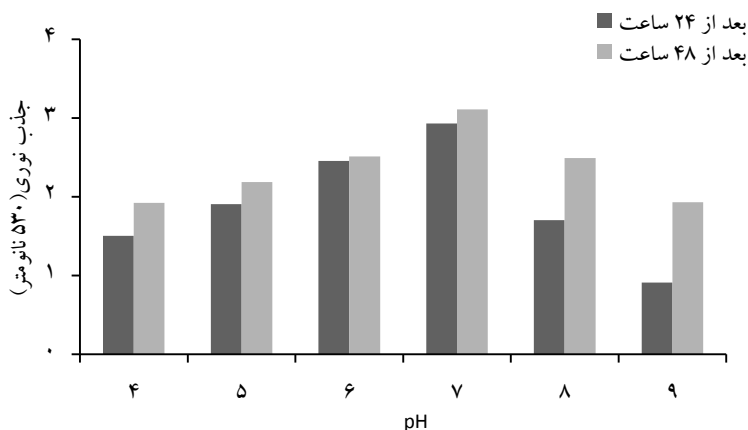
الف: باکتری فیلوسفری، ب: باکتری ریزوسفری

بررسی تأثیر pH آب پنیر بر میزان تولید ایندول استیک اسید مشخص شد هر دو باکتری در pH=۷ بیشترین توانایی تولید ایندول استیک اسید را دارند. نتایج این آزمون در شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده اند.

در ادامه تحقیق، از ۵ باکتری منتخب، ۲ باکتری با کدهای الف ۳ و ب ۱ انتخاب شدند که بیشترین قابلیت تولید ایندول استیک اسید را نشان دادند و بقیه مراحل تحقیق در خصوص این ۲ باکتری انجام گرفت. در



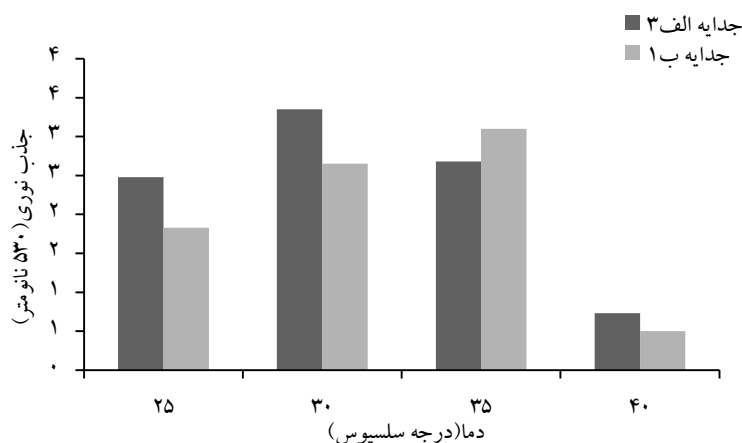
شکل ۱- نتایج بررسی pH در خصوص جدایه الف ۳



شکل ۲- نتایج بررسی pH در خصوص جدایه ب ۱

قابلیت تولید ایندول استیک اسید را دارند. نتایج این بررسی در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

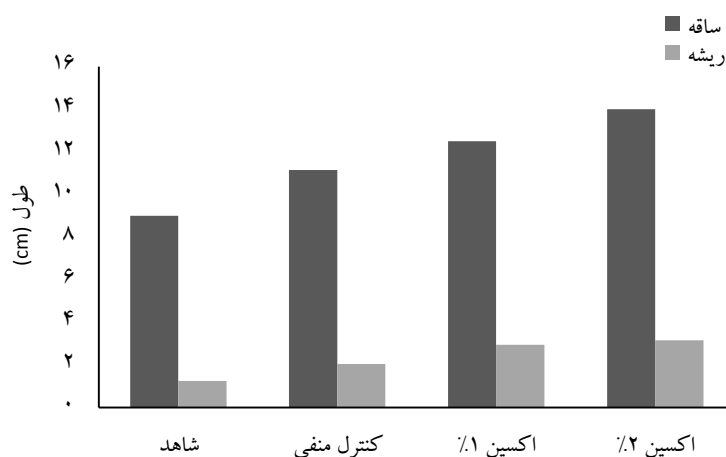
بررسی تأثیر دما بر میزان تولید ایندول استیک اسید نشان داد جدایه الف ۳ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و جدایه ب ۱ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین



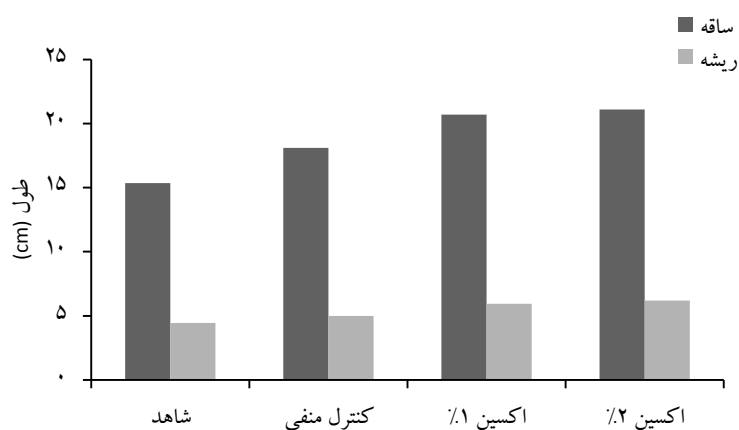
شکل ۳- نتایج تأثیر دما بر میزان تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌های منتخب

با نمونه‌های کنترل منفی و شاهد) داشته است. نتایج آبیاری با اکسین تولیدشده توسط جدایه الف ۳ در شکل‌های ۴ و ۵ و نتایج آبیاری با اکسین تولیدشده توسط جدایه ب ۱ در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده‌اند.

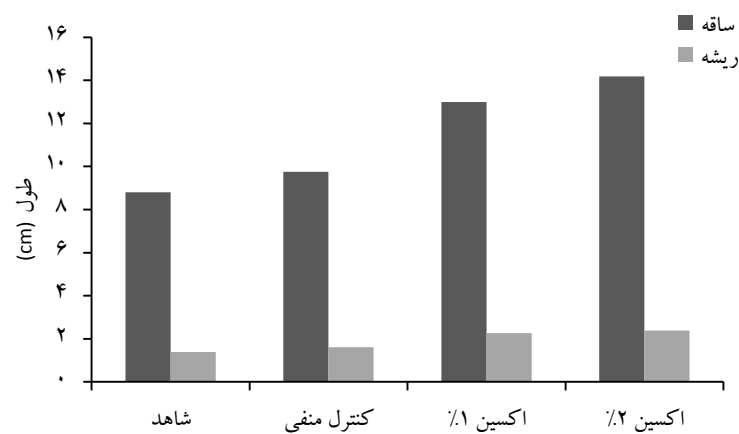
در این تحقیق، تأثیر پودر اکسین ناخالص تولیدشده توسط جدایه‌های الف ۳ و ب ۱، بر میزان رشد بذر گیاهان ماش و عدس به‌طور مجزا بررسی شد. نتایج نشان دادند آبیاری این گیاهان با محلول اکسین ۲ درصد، بیشترین تأثیر را بر افزایش طول ساقه و ریشه (در مقایسه



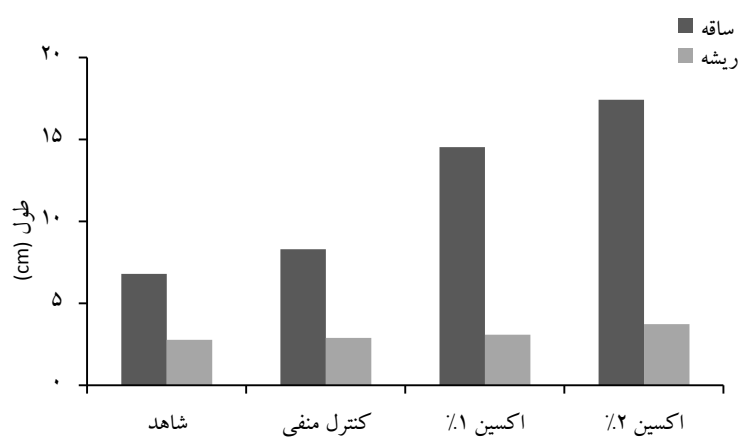
شکل ۴- نتایج میزان رشد گیاه عدس آبیاری شده با اکسین تولیدشده توسط جدایه الف ۳



شکل ۵- نتایج میزان رشد گیاه ماش آبیاری شده با اکسین تولیدشده توسط جدایه الف ۳



شکل ۶: نتایج میزان رشد گیاه عدس آبیاری شده با اکسین تولیدشده توسط جدایه ب ۱



شکل ۷- نتایج میزان رشد گیاه ماش آبیاری شده با اکسین تولیدشده توسط جدایه ب ۱



جدول ۲- نتایج آنالیز آماری جدایه‌های الف ۳ و ب ۱

جدایه ب ۱		جدایه الف ۳		مقایسه محلول‌های آبیاری
گیاه ماش	گیاه عدس	گیاه ماش	گیاه عدس	
۲/۰۷۰۲	۱/۹۳۴	۲/۹	۶/۵۸۸	اکسین ۱ درصد نسبت به کنترل
(۰/۰۲۷۴۸۸)	(۰/۰۳۴۹۷۶)	(۰/۰۰۴۷۷۳)	(۰/۰۰۰۰۱)	
۳/۴۴۷	۱/۸۹۴	۵/۳۷۷	۳/۴۶۱	اکسین ۲ درصد نسبت به کنترل
(۰/۰۰۱۶۵۵)	(۰/۰۳۷۶۵۱)	(۰/۰۰۰۰۲۱)	(۰/۰۰۱۳۹۴)	
۰/۹۰۷	۰/۰۲۷۵	۰/۲۰۹	۰/۱۲۸	اکسین ۱ درصد نسبت به اکسین ۲ درصد
(۰/۱۸۸۱۹۵)	(۰/۴۸۹۱۹۵)	(۰/۴۱۸۳۱۷)	(۰/۴۴۹۹۱۲)	
۱/۳۲۸	۱/۱۲۵	۱/۰۲۷۳	۱/۳۹۶	محلول شاهد نسبت به کنترل
(۰/۱۰۰۳۸۷)	(۰/۱۳۷۶۸۴)	(۰/۱۵۸۹۴۴)	(۰/۰۸۹۸۶۳)	

اعداد جدول: مقادیر آزمون t

اعداد داخل پرانتز: میزان احتمال خطا در سطح معنی داری  $\alpha = 0/05$ 

نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌ها نشان دادند جدایه الف ۳ به میزان ۹۷ درصد با باکتری *انتروباکتر سولی*<sup>۱۳</sup> سویه (LF7a(T) (شماره دسترسی در بانک ژنی MH071140.1) و جدایه ب ۱ نیز به میزان ۹۹ درصد با باکتری *انتروباکتر موری*<sup>۱۴</sup> سویه R3-3 (شماره دسترسی در بانک ژنی GQ406569.1) خویشاوندی دارد. شکل‌های ۸ و ۹ نتایج مقایسه و ردیف‌سازی توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های بررسی شده را نشان می‌دهند.

در این تحقیق، دو جدایه که از لحاظ تولید ایندول استیک اسید وضعیت مطلوب‌تری داشتند، برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. باکتری با کد الف ۳ جداسازی شده از فیلوسفر لویا چشم بلبلی و باکتری با کد ب ۱ جداسازی شده از ریزوسفر گیاه جعفری بالاترین قابلیت تولید اکسین را نشان دادند. با استفاده از آغازگرهای همگانی ۲۷F و ۱۴۹۲R توالی‌های نوکلئوتیدی برای سویه کد الف ۳ با طول ۱۵۰۱ نوکلئوتید و برای سویه کد ب ۱ با طول ۱۴۳۹ نوکلئوتید ایجاد شدند.



Query: None Query ID: lcl|Query\_32079 Length: 960

>Enterobacter mori strain R3-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Sequence ID: GQ406569.1 Length: 1288  
Range 1: 328 to 1280

Score:1727 bits(935), Expect:0.0,  
Identities:949/955(99%), Gaps:5/955(0%), Strand: Plus/Minus

Query 9 CAAAGTGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCAT 68  
|||||  
Sbjct 1280 CAAAGTGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCAT 1221

Query 69 GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTAC 128  
|||||  
Sbjct 1220 GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTAC 1161

Query 129 GATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACG 188  
|||||  
Sbjct 1160 GATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACG 1101

Query 189 CACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGC 248  
|||||  
Sbjct 1100 CACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGC 1041

Query 249 ACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCA 308  
|||||  
Sbjct 1040 ACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCA 981

Query 309 GTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCAACCCTGGCAACAAAGGATAAGG 368  
|||||  
Sbjct 980 GTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCAACCCTGGCAACAAAGGATAAGG 921

Query 369 GTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC 428  
|||||  
Sbjct 920 GTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC 861

Query 429 AGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTC 488  
|||||  
Sbjct 860 AGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTC 801

Query 489 AAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC 548  
|||||  
Sbjct 800 AAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC 741

Query 549 GGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACT 608  
|||||  
Sbjct 740 GGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACT 681

Query 609 TAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACACCTCCAAGTCGACATCGTTA 668  
|||||  
Sbjct 680 TAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACACCTCCAAGTCGACATCGTTA 621

Query 669 CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGT 728  
|||||  
Sbjct 620 CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGT 561

Query 729 CAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTT 788  
|||||  
Sbjct 560 CAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTT 501

Query 789 ACCGCTACACCTGGAAATTCTAccccccTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAAT 848  
|||||  
Sbjct 500 ACCGCTACACCTGGAA-TTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAAT 442

Query 849 GCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGATTCACATCCGACTTGACAGACCGGCTGCGTGCG 908  
|||||  
Sbjct 441 GCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGATTCACATCCGACTTGACAGACCG-CCTGCGTGCG 383

Query 909 CTTTACGCCAGTAATTCGATTA-CGCTTGACCCCTCCGTAT-AC-GCGGCTGC 960  
|||||  
Sbjct 382 CTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATACCGCGGCTGC 328

شکل ۹- نتیجه مقایسه و ردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی جدایه ب ۱

## بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به واسطه تولید و ترشح هورمون‌های گیاهی، توانایی افزایش یا بهبود رشد گیاهان را دارند و امروزه برخی از این محصولات میکروبی که رشد گیاهان را افزایش می‌دهند، تجاری‌سازی شده‌اند. در این تحقیق از مجموع ۲۶ باکتری جداسازی شده از فیلوسفر و ریزوسفر گیاهان، ۵ جدایه (۱۹/۲ درصد) از قابلیت تولید ایندول استیک اسید و تخمیر قند لاکتوز به صورت همزمان برخوردار بودند. هر ۵ جدایه گرم منفی، کاتالاز مثبت، فاقد اسپور و میله‌ای کوتاه بودند. تأثیر pH آب پنیر و دمای محیط بر میزان تولید ایندول استیک اسید توسط دو جدایه برتر بررسی شد. نتایج نشان دادند هر دو جدایه، در pH=۷ از بیشترین توانایی تولید ایندول استیک اسید برخوردار بودند. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند بیشتر باکتری‌ها در pHهای نزدیک به خنثی (بین ۶ تا ۸) بهترین شرایط رشد و طبیعتاً بهترین شرایط را برای تولید محصولات ثانویه دارند. مشابه این بررسی نیز توسط دیگر محققین صورت گرفته است؛ برای مثال، باروچا<sup>۱۵</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۳ تولید بهینه ایندول استیک اسید را برای یک سویه از باکتری سودوموناس پوتیدا<sup>۱۶</sup> در pH=۷/۵ گزارش کرده‌اند (۷).

در بررسی اثر دما، نتایج نشان دادند جدایه با کد الف ۳ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و جدایه با کد ب ۱ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد از پتانسیل بیشتری برای تولید ایندول استیک اسید برخوردارند. در مطالعه محققین مختلف همچون سودها<sup>۱۷</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۲ و ساچدو<sup>۱۸</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۹، به ترتیب دمای ۲۸ درجه و ۳۱ درجه سانتی‌گراد به عنوان بهینه دمای تولید ایندول استیک اسید گزارش شده است (۱۰ و ۱۱). در مطالعه سربسوک<sup>۱۹</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۸ نیز بهترین

دما برای تولید ایندول استیک اسید در حضور سوبسترای آب پنیر ۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (۴). در این تحقیق، از آب پنیر به عنوان یک سوبسترای ارزان قیمت برای کاهش هزینه تولید ایندول استیک اسید استفاده شد. در تحقیق سربسوک و همکاران در سال ۲۰۱۸، برای بهینه‌سازی تولید ایندول استیک اسید توسط اتروباکتر از آب پنیر شیرین به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شده بود (۴). در تحقیق پنگ<sup>۲۰</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز از آرد ذرت به عنوان منبع کربن و از سویا به عنوان منبع نیتروژن با استفاده از باکتری سودوموناس پوتیدا<sup>۲۱</sup> توانسته بودند ایندول استیک اسید تولید کنند (۱۲). نتایج آبیاری بذر گیاهان ماش و عدس با محلول‌های آبی تهیه شده از اکسین ناخالص تولیدی نشان دادند محلول اکسین ۲ درصد بیشترین تأثیر را بر رشد طولی ساقه گیاهان بررسی شده دارد. نتایج آزمون آماری (جدول ۲) نشان دادند در خصوص هر دو جدایه، به کارگیری محلول‌های اکسین ۱ درصد و ۲ درصد به صورت معنی‌داری می‌تواند رشد طولی ساقه گیاهان را نسبت به محلول کنترل افزایش دهد؛ اما نتایج به دست آمده در خصوص تأثیر اکسین تولیدی بر رشد ریشه گیاهان بررسی شده در سطح  $\alpha=0/05$  در همه موارد معنی‌دار نبود ( $P>0/05$ ) (نتایج تأثیر اکسین بر ریشه گیاهان، در جدول ۲ نشان داده نشده‌اند). در این بررسی همچنین مشخص شد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین محلول آبیاری شاهد (آب مقطر) با محلول آبیاری کنترل (آب پنیر) وجود ندارد ( $P>0/05$ ).

در خاتمه، با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و موارد مشابه می‌توان نتیجه گرفت برای تولید زیستی هورمون اکسین توسط باکتری‌های جداسازی شده از خاک و گیاهان، می‌توان از آب پنیر به عنوان یک

- (8) Chandra Sh, Askari K, Kumari M. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018; 16 (2): 581-586.
- (9) Swain MR, Ray RC. Optimization of cultural conditions and their statistical interpretation for production of indole-3-acetic acid by *Bacillus subtilis* CM5 using cassava fibrous residue. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2008; 97 (8): 622-628.
- (10) Sudha M, Shyamala GR, Prbhavati P, Astapriya P, Yamuna DY, Saranya A. Production and optimization of Indole acetic acid by indigenous microflora using agro waste as substrate. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2012; 15 (1): 39-43.
- (11) Sachdev DP, Chaudhari HG, Kasture VM, Dhavale DD, Chopade BA. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian Journal of experimental Biology*. 2009; 47 (12): 993-1000.
- (12) Peng Y, He Y, Wu Z, Lu J, Li C. Screening and optimization of low-cost medium for *Pseudomonas putida* Rs-198 culture using RSM. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014; 45 (4): 1229-1237.

سوبسترای ارزان قیمت و در مقیاس وسیع استفاده کرد. همچنین در صورت خالص‌سازی هورمون اکسین تولیدی می‌توان از آن به شکل مؤثری برای بهبود وضعیت رشد گیاهان به‌ویژه تیره حبوبات استفاده کرد.

## Referenes

- (1) Mohit B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and Plant nutrition*. 2013; 13 (3): 638-649.
- (2) Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*. 2010; 61 (4): 49-64.
- (3) Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*. 2005; 29 (2): 29-34.
- (4) Srisuk N, Sakpuntoon V, Nutaratat P. Production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 using sweet whey as a low-cost feed stock. *Journal of Microbiol biotechnol*. 2018; 28 (9): 1511-1516.
- (5) Shraddha Gang Sh, Sharma Sh, Saraf M, Buck M, Schumacher J. Analysis of Indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski Method. *Bio-protocol*. 2019; 9 (9): 30-34.
- (6) Kamnev A, Shchelochkov A, Perfiliev YD, Tarantilis PA, Polissiou MG. Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction with iron(III). *Journal of Molecular Structure*. 2001; 56 (3): 565-572.
- (7) Bharucha U, Trivedi UB, Patel K. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*. 2013; 2 (3): 215-221.

1- Auxin

2- Gibberellin

3- Abscisic acid

4- Ethylene

5- Indole acetic acid (IAA)

6- Biochemical oxygen demand (BOD)

7- Salkowski

8- FeCl<sub>3</sub>

9- HClO<sub>4</sub>

10- t- test

11- National Center for Biotechnology Information

12- BLAST

13- *Enterobacter soli*

14- *Enterobacter mori*

15- Bharucha

16- *Pseudomonas putida*

17- Sudha

18- Sachdev

19- Srisuk

20- Peng