**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

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 جداسازی‌شده از ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان

**لـــــــــیلا یگانـــــــــــه:** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران، yeganehr125@gmail.com

**سید محمد مهدی محمودی*:** استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ 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 جداسازی‌شده 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 جداسازی‌شده، 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 به‌ترتیب در دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در pH=۷ بیشترین قابلیت تولید اکسین را نشان دادند. آبیاری بذر گیاهان بررسی‌شده 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

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2023 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

## مقدمه

امروزه به‌دلیل افزایش جمعیت، کاهش منابع آب شیرین، فرسایش خاک و محدودشدن دسترسی بشر به زمین‌های قابل کشت، لزوم استفاده از کشاورزی نوین و به‌کارگیری عوامل زیستی به‌منظور 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 برهم‌کنش‌های مثبت با گیاه میزبان و بهبود وضعیت رشد گیاه دارند. بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها از پتانسیل تولید هورمون‌های گیاهی و مواد تحریک‌کنندهٔ رشد گیاه همچون اکسین[1]، جیبرلین[2]، آبسیزیک اسید[3] و اتیلن[4] 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[5] عضو اصلی خانوادهٔ 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 آمینهٔ تریپتوفان مهم‌ترین مسیر شناخته‌شده است (۲ و۳).

برای تولید زیستی ایندول استیک اسید توسط باکتری‌ها، هزینهٔ سوبسترای مورد نیاز رشد باکتری یک عامل کلیدی است که بر قیمت محصول نهایی اثر می‌گذارد. استفاده از سوبستراهای ارزان قیمت به‌ویژه محصولات جانبی کشاورزی یا صنایع لبنی باعث صرفه‌جویی زیادی در هزینهٔ تولید می‌شود. آب پنیر یک محصول جانبی صنایع لبنی است که قند لاکتوز و نیاز به اکسیژن زیستی[6] بالایی دارد، از آلاینده‌های مهم محیط زیست محسوب می‌شود و معمولا دفع آن مشکلات زیادی برای کارگاه‌های پنیرسازی ایجاد می‌کند. استفاده از قند لاکتوز موجود در آب پنیر به‌عنوان 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 سوبسترای آب پنیر با استفاده از باکتری‌های جداسازی‌شده 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 به‌صورت مجزا بسته‌بندی و در محفظهٔ سرد به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از بخش فیلوسفر گیاهان توسط سواب مرطوب، نمونه‌برداری 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 محفظهٔ مرطوب قرار داده و به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. به تدریج از کلنی‌های رشدکرده نمونه‌برداری شد و به‌منظور خالص‌سازی، مجدداً در پلیت‌های جدید کشت داده شدند.

کلنی‌های خالص‌سازی‌شده براساس ویژگی‌های مورفولوژیک، رنگ‌آمیزی 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 سوبسترای آب پنیر و تولید ایندول استیک اسید معیارهای اصلی مدنظر بودند، از آزمون تخمیر قند لاکتوز برای اثبات قابلیت رشد در سوبسترای آب پنیر و از آزمون سالکوفسکی[۷] برای اثبات قابلیت تولید ایندول استیک اسید (اکسین) استفاده شد. برای اجرای آزمون سالکوفسکی، از کشت ۱۸ ساعتهٔ باکتری‌های جداسازی‌شده که غلظت آنها معادل لوله ۱ استاندارد مک‌فارلند ($۳ \times ۱۰^{۸}$) تنظیم شده بود، به لوله‌های حاوی محیط نوترینت براث 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 سانتریفیوژ 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 براث استریل نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به هریک از لوله‌ها (همچنین به لوله شاهد) میزان ۴ سی‌سی معرف تازه تهیه شدهٔ سالکوفسکی اضافه شد. این معرف از افزودن ۲ میلی‌لیتر محلول کلروفریک[۸] ۰/۵ مولار به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۳۵ درصد پرکلریک اسید[۹] به دست آمد (۵). سر لوله‌ها با پارافیلم بسته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شدند. ایجاد رنگ صورتی تا قرمز نشانهٔ 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 سوبسترای آب پنیر (تهیه‌شده از افزودن سرکه به شیر پاستوریزه کم‌چربی 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 مک فارلند) به‌صورت 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 مک فارلند) در چندین ارلن حاوی سوبسترای 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).

**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؛ درنهایت، 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 بذرهای ماش و عدس:** برای این منظور، بذر گیاهان ماش و عدس (هرکدام 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 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[۱۰] 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 تجهیزآزما) عمل استخراج و خالص‌سازی ژنوم آنها انجام گرفت. سپس با استفاده از آغازگرهای همگانی ۲۷F و ۱۴۹۲R واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر بخشی از ژن *16S rDNA* باکتری‌ها انجام گرفت. محصولات واکنش روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد و درنهایت برای تعیین توالی، نمونه‌ها به شرکت پیشگام ارسال شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده، در پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[۱۱]، بلاست[۱۲] و جدایه‌ها شناسایی شدند.

## نتایج

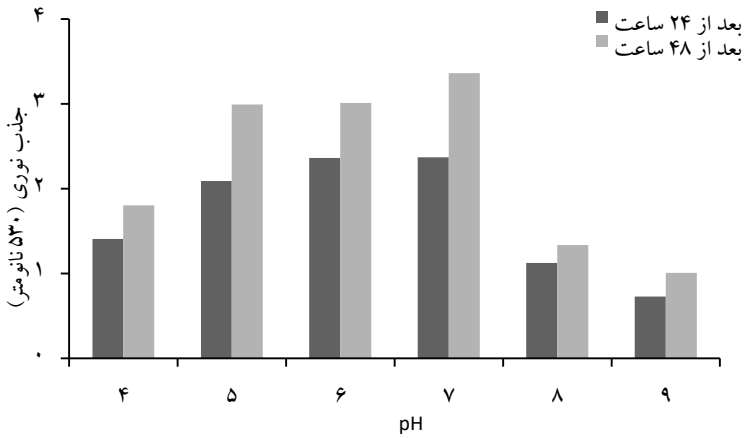
از مجموع ۲۶ باکتری جداسازی‌شده از فیلوسفر و ریزوسفر گیاهان بررسی‌شده، تعداد ۵ جدایه دارای قابلیت تخمیر قند لاکتوز و تولید ایندول استیک اسید به‌صورت همزمان بودند. جدول ۱ برخی از آزمون‌های انجام‌شده روی این پنج جدایه را نشان می‌دهد.

جدول ۱: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی روی پنج باکتری منتخب

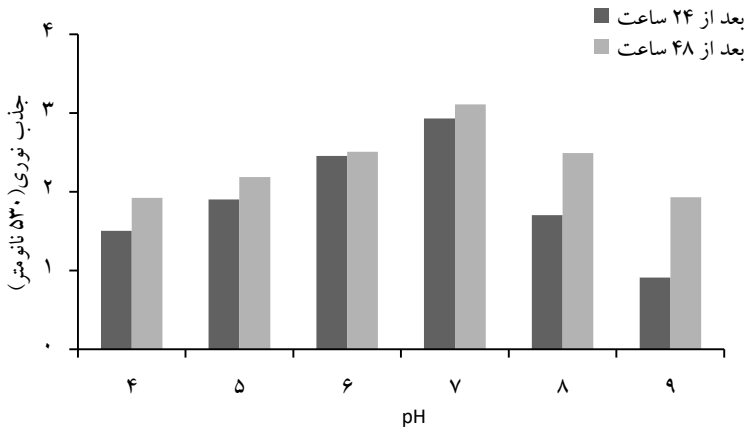
| کد باکتری | رنگ‌آمیزی گرم | آزمون کاتالاز | آزمون اکسیداز | شکل باکتری | تخمیر لاکتوز | آزمون سالکوفسکی | جذب نوری بعد از ۴۸ ساعت در ۵۳۰ نانومتر |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| الف۱ | – | + | - | میله‌ای کوتاه | + | + | ۰/۹۳۷ |
| الف۲ | – | + | - | میله‌ای کوتاه | + | + | ۲/۸۱۰ |
| الف۳ | – | + | - | میله‌ای کوتاه | + | + | ۳/۳۶۳ |
| ب۱ | – | + | + | میله‌ای کوتاه | + | + | ۳/۱۱۰ |
| ب۲ | – | + | + | میله‌ای کوتاه | + | + | ۱/۷۳۰ |

الف: باکتری فیلوسفری، ب: باکتری ریزوسفری

در ادامهٔ تحقیق، از ۵ باکتری منتخب، ۲ باکتری با کدهای الف۳ و ب۱ انتخاب شدند که بیشترین قابلیت تولید ایندول استیک اسید را نشان دادند و بقیه مراحل تحقیق در خصوص این ۲ باکتری انجام گرفت. در 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 شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند.

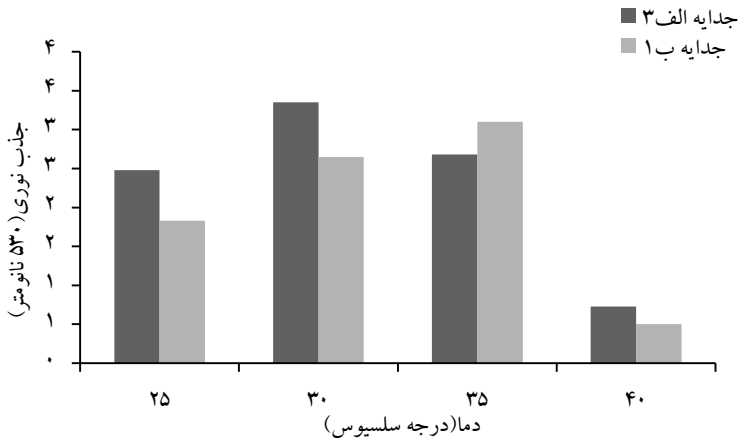



شکل ۱- نتایج بررسی pH در خصوص جدایه الف ۳



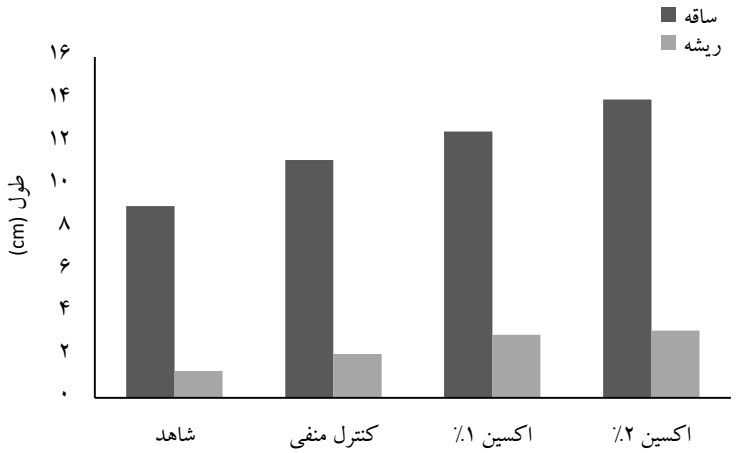

شکل ۲- نتایج بررسی pH در خصوص جدایه ب۱

بررسی تأثیر دما بر میزان تولید ایندول استیک اسید نشان داد جدایه الف۳ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و جدایه ب۱ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین قابلیت تولید ایندول استیک اسید را دارند. نتایج این بررسی در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

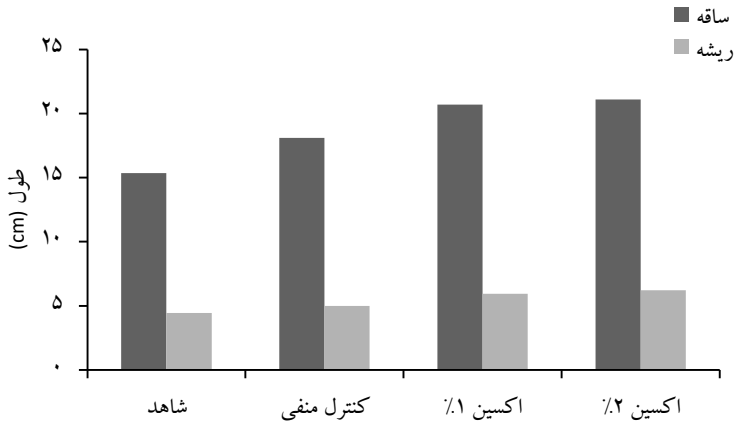



شکل ۳- نتایج تأثیر دما بر میزان تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌های منتخب

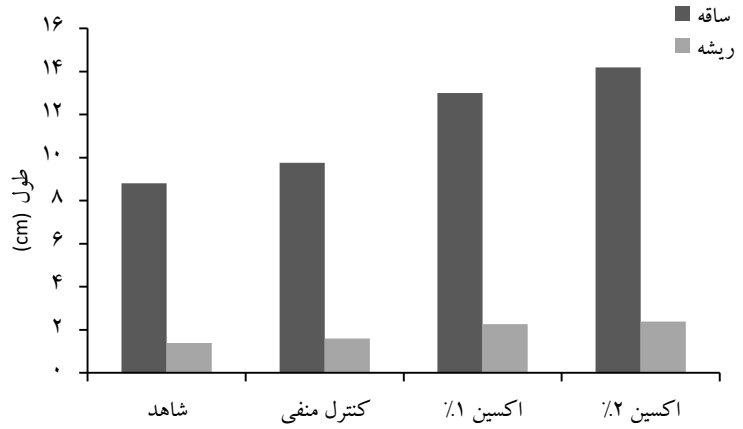
در این تحقیق، تأثیر پودر اکسین ناخالص تولیدشده توسط جدایه‌های الف۳ و ب۱، بر میزان رشد بذر گیاهان ماش و عدس به‌طور مجزا بررسی شد. نتایج نشان دادند آبیاری این گیاهان با محلول اکسین ۲ درصد، بیشترین تأثیر را بر افزایش طول ساقه و ریشه (در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی و شاهد) داشته است. نتایج آبیاری با اکسین تولیدشده توسط جدایه الف۳ در شکل‌های ۴ و ۵ و نتایج آبیاری با اکسین تولیدشده توسط جدایه ب۱ در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده‌اند.



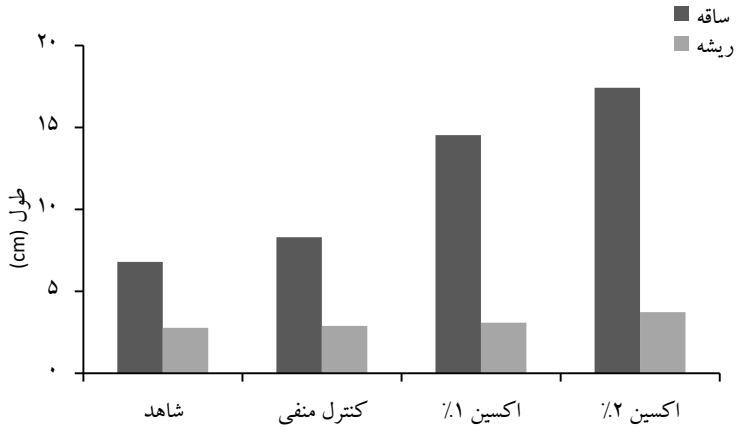

شکل ۴- نتایج میزان رشد گیاه عدس آبیاری‌شده با اکسین تولیدشده توسط جدایه الف۳




شکل ۵- نتایج میزان رشد گیاه ماش آبیاری‌شده با اکسین تولیدشده توسط جدایه الف۳




شکل ۶: نتایج میزان رشد گیاه عدس آبیاری‌شده با اکسین تولیدشده توسط جدایه ب۱




شکل ۷- نتایج میزان رشد گیاه ماش آبیاری‌شده با اکسین تولیدشده توسط جدایه ب۱

جدول ۲- نتایج آنالیز آماری جدایه‌های الف۳ و ب۱

| مقایسه محلول‌های آبیاری | جدایه الف۳ | | جدایه ب۱ | |
|---|---|---|---|---|
| | گیاه عدس | گیاه ماش | گیاه عدس | گیاه ماش |
| اکسین ۱ درصد نسبت به کنترل | ۶/۵۸۸ | ۲/۹ | ۱/۹۳۴ | ۲/۰۷۰۲ |
| | (۰/۰۰۰۰۱) | (۰/۰۰۴۷۷۳) | (۰/۰۳۴۹۷۶) | (۰/۰۲۷۴۸۸) |
| اکسین ۲ درصد نسبت به کنترل | ۳/۴۶۱ | ۵/۳۷۷ | ۱/۸۹۴ | ۳/۴۴۷ |
| | (۰/۰۰۱۳۹۴) | (۰/۰۰۰۰۲۱) | (۰/۰۳۷۶۵۱) | (۰/۰۰۱۶۵۵) |
| اکسین ۱ درصد نسبت به اکسین ۲ درصد | ۰/۱۲۸ | ۰/۲۰۹ | ۰/۰۲۷۵ | ۰/۹۰۷ |
| | (۰/۴۴۹۹۱۲) | (۰/۴۱۸۳۱۷) | (۰/۴۸۹۱۹۵) | (۰/۱۸۸۱۹۵) |
| محلول شاهد نسبت به کنترل | ۱/۳۹۶ | ۱/۰۲۷۳ | ۱/۱۲۵ | ۱/۳۲۸ |
| | (۰/۰۸۹۸۶۳) | (۰/۱۵۸۹۴۴) | (۰/۱۳۷۶۸۴) | (۰/۱۰۰۳۸۷) |

اعداد جدول: مقادیر آزمون t

اعداد داخل پرانتز: میزان احتمال خطا در سطح معنی‌داری α =۰/۰۵

در این تحقیق، دو جدایه که از لحاظ تولید ایندول استیک اسید وضعیت مطلوب‌تری داشتند، برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. باکتری با کد الف۳ جداسازی‌شده از فیلوسفر لوبیا چشم بلبلی و باکتری با کد ب۱ جداسازی‌شده از ریزوسفر گیاه جعفری بالاترین قابلیت تولید اکسین را نشان دادند. با استفاده از آغازگرهای همگانی ۲۷F و ۱۴۹۲R توالی‌های نوکلئوتیدی برای سویه کد الف۳ با طول ۱۵۰۱ نوکلئوتید و برای سویه کد ب۱ با طول ۱۴۳۹ نوکلئوتید ایجاد شدند.

نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌ها نشان دادند جدایه الف۳ به میزان ۹۷ درصد با باکتری *انتروباکتر سولی*[13] سویه LF7a(T) (شماره دسترسی در بانک ژنی MH071140.1) و جدایه ب۱ نیز به میزان ۹۹ درصد با باکتری *انتروباکتر موری*[14] سویه R3-3 (شماره دسترسی در بانک ژنی GQ406569.1) خویشاوندی دارد. شکل‌های ۸ و ۹ نتایج مقایسه و ردیف‌سازی توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های بررسی‌شده را نشان می‌دهند.

```
Query: None Query ID: lcl|Query_56325 Length: 1075


>Enterobacter soli strain LF7a(T) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: MH071140.1 Length: 1501
Range 1: 411 to 1463

Score:1777 bits(962), Expect:0.0,
Identities:1028/1058(97%), Gaps:15/1058(1%), Strand: Plus/Minus

Query 12  aaaGTGGT-AGCGCCCT-CCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCAT 69
          ||||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1463  AAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCAT  1404

Query  70   GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTAC  129
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1403  GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTAC  1344

Query  130  GATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACG  189
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1343  GATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACG  1284

Query  190  CACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGC  249
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1283  CACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGC  1224

Query  250  ACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCA  309
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1223  ACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCA  1164

Query  310  GTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCGCTGGCAACAAAGGATAAGG  369
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1163  GTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCGCTGGCAACAAAGGATAAGG  1104

Query  370  GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC  429
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1103  GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC  1044

Query  430  AGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTC  489
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1043  AGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTC  984

Query  490  AAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC  549
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  983   AAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC  924

Query  550  GGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACT  609
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  923   GGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACT  864

Query  610  TAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAGCCTCCAAGTCGACATCGTTTA  669
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  863   TAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAGCCTCCAAGTCGACATCGTTTA  804

Query  670  CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGT  729
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  803   CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGT  744

Query  730  CAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTC  789
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  743   CAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTC  684

Query  790  ACCGCTymryasrTGGAATTCTAcccccccTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAA  849
           |||||   | |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  683   ACCGCTAC--ACCTGGAATTCTACCCCCCC-TCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAA  627

Query  850  TGCAGTTCWRAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCG  909
           |||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  626   TGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCG  567

Query  910  CTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA  969
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  566   CTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA  507

Query  970  CGGAGTTAGCCCGGTGCCTCCTCCTGCGAGTAACGTCA-TCCACAAGAT-A-TAACCTTG  1026
           ||||||||| ||||| || | | ||||||||||||| ||  |||| | | ||||||
Sbjct  506   CGGAGTTAGCC-GGTGCTTCTT-CTGCGAGTAACGTCAATCACCAAGGTTATTAACCTTA  449

Query  1027  ATGGCT-C-TCCTCGCTGAG-GTACTT-ACCACC-GAA  1059
           ||| || | |||||||||  |||||| || ||| |||
Sbjct  448   ATGCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAA  411
```

شکل ۸- نتیجهٔ مقایسه و ردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی جدایه الف۳

```
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    CAAAGTGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCAT  68
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1280 CAAAGTGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCAT  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  GTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCKAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGG  368
            ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  980  GTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGG  921

Query  369  GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC  428
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  920  GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC  861

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

Query  489  AAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC  548
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  800  AAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC  741

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

Query  609  TAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTA  668
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  680  TAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTA  621

Query  669  CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGT  728
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  620  CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGT  561

Query  729  CAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTC  788
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  560  CAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTC  501

Query  789  ACCGCTACACCTGGAAATTCTAcccccccTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAAT  848
            ||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  500  ACCGCTACACCTGGAA-TTCTACCCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAAT  442

Query  849  GCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCGACTTGACAGACCGGCCTGCGTGCG  908
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct  441  GCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCGACTTGACAGACCG-CCTGCGTGCG  383

Query  909  CTTTACGCCCAGTAATTCCGATTA-CGCTTGCACCCTCCGTAT-AC-GCGGCTGC  960
            |||||||||||||||||| |||||||||||||| || |||||||
Sbjct  382  CTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGC  328
```

شکل ۹- نتیجهٔ مقایسه و ردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی جدایه ب۱

## بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به‌واسطهٔ 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 جداسازی‌شده از فیلوسفر و ریزوسفر گیاهان، ۵ جدایه (۱۹/۲ درصد) از قابلیت تولید ایندول استیک اسید و تخمیر قند لاکتوز به‌صورت 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[۱۵] و همکاران در سال ۲۰۱۳ تولید بهینهٔ ایندول استیک اسید را برای یک سویه از باکتری *سودوموناس پوتیدا*[۱۶] در pH=۷/۵ گزارش کرده‌اند (۷).

در بررسی اثر دما، نتایج نشان دادند جدایه با کد الف۳ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و جدایه با کد ب۱ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد از پتانسیل بیشتری برای تولید ایندول استیک اسید برخوردارند. در مطالعه محققین مختلف همچون سودها[۱۷] و همکاران در سال ۲۰۱۲ و ساچدو[۱۸] و همکاران در سال ۲۰۰۹، به‌ترتیب دمای ۲۸ درجه و ۳۱ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان بهینه دمای تولید ایندول استیک اسید گزارش شده است (۱۰ و ۱۱). در مطالعهٔ سریسوک[۱۹] 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 به‌عنوان یک سوبسترای ارزان قیمت برای کاهش هزینهٔ تولید ایندول استیک اسید استفاده شد. در تحقیق سریسوک و همکاران در سال ۲۰۱۸، برای بهینه‌سازی تولید ایندول استیک اسید توسط *انتروباکتر* از آب پنیر شیرین به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شده بود (۴). در تحقیق پنگ[۲۰] و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز از آرد ذرت به‌عنوان منبع کربن و از سویا به‌عنوان منبع نیتروژن با استفاده از باکتری *سودوموناس پوتیدا* توانسته بودند ایندول استیک اسید تولید کنند (۱۲).

نتایج آبیاری بذر گیاهان ماش و عدس با محلول‌های آبی تهیه‌شده از اکسین ناخالص تولیدی نشان دادند محلول اکسین ۲ درصد بیشترین تأثیر را بر رشد طولی ساقه گیاهان بررسی‌شده دارد. نتایج آزمون آماری (جدول ۲) نشان دادند در خصوص هر دو جدایه، به‌کارگیری محلول‌های اکسین ۱ درصد و ۲ درصد به‌صورت معنی‌داری می‌تواند رشد طولی ساقه گیاهان را نسبت به محلول کنترل افزایش دهد؛ اما نتایج به‌دست‌آمده در خصوص تأثیر اکسین تولیدی بر رشد ریشه گیاهان بررسی‌شده در سطح $\alpha$ =۰/۰۵ در همه موارد معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (نتایج تأثیر اکسین بر ریشه گیاهان، در جدول ۲ نشان داده نشده‌اند). در این بررسی همچنین مشخص شد ازنظر آماری تفاوت معنی‌داری بین محلول آبیاری شاهد (آب مقطر) با محلول آبیاری کنترل (آب پنیر) وجود ندارد (P>۰/۰۵).

در خاتمه، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق و موارد مشابه می‌توان نتیجه گرفت برای تولید زیستی هورمون اکسین توسط باکتری‌های جداسازی‌شده از خاک و گیاهان، می‌توان از آب پنیر به‌عنوان یک

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.

(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, Astapritya 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.


[1]- Auxin
[2]- Gibberellin
[3]- Abscisic acid
[4]- Ethylene
[5]- Indole acetic acid(IAA)
[6]- Biochemical oxygen demand(BOD)
[7]- Salkowski
[8]- $FeCl_3$
[9]- $HClO_4$
[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