کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورۀ ۶، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۶ (۱۰۲-۹۳)
DOI: 10.22059/jbioc.2017.220985.178

تأثیر بیوفیلم تولید شده توسط ریزوباکتری‌های پروبیوتیک گیاهی بر کلنیزاسیون ریشه و رشد گیاه گندم

مریم خضری*
استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۶)

چکیده

به منظور بررسی پتانسیل باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis* در تولید بیوفیلم و کلنیزاسیون ریشه گندم، از ۱۱ سویه این باکتری استفاده شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و در چهار تکرار انجام شد. بنابر نتایج حاصل از این پژوهش، میزان تولید بیوفیلم و بیوسورفکتانت‌ها در ریزوباکتری‌های مورد مطالعه تنوع بالایی نشان داد و بیشترین مقدار تولید این متابولیت‌ها در سویه‌های B3، B1 و B4 دیده شد. بررسی میزان کلنیزاسیون با استفاده از باکتری‌های موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپی‌سین و نالیدیکسیک‌اسید انجام شد. سویه‌های B4 و B3 به ترتیب با جمعیت‌های $۴/۴۱\times۱۰^{۷}$ FU/g و $۴/۳۵\times۱۰^{۷}$ cfu/g، بیشترین میزان کلنیزاسیون ریشه را نسبت به سایر سویه‌ها داشتند. میزان تشکیل بیوفیلم و تولید بیوسورفکتانت‌ها با کلنیزاسیون ریشه گندم به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۸۰ همبستگی داشتند. در بخش دیگر این تحقیق، اثر این سویه‌ها روی فاکتورهای رشدی گیاه گندم مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه سویه‌ها موجب افزایش طول ریشه و اندام هوایی شدند و بیشتر سویه‌ها اثر افزایشی در وزن خشک ریشه و اندام هوایی نشان دادند. براساس یافته‌های این پژوهش، سویه‌های باکتری که پتانسیل بالایی در تولید بیوفیلم و بیوسورفکتانت‌ها داشتند، ریشه گندم را به خوبی کلنیزه نمودند و غالب سویه‌ها اثر افزاینده روی فاکتورهای رشدی گندم نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس سابتیلیس، بیوفیلم، بیوسورفکتانت‌ها، پروبیوتیک، محرک رشد.

Effect of biofilm by plant probiotic rhizobacteria on root colonization and growth of wheat

Maryam Khezri
Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
(Received: Nov. 25, 2016 - Accepted: Mar. 16, 2017)

ABSTRACT

A total of 11 probiotic strains of *Bacillus subtilis* were used to evaluate the potential of biofilm formation and wheat root colonization. Experiments carried out in a completely randomized design with four replications. According to results of this study, biofilm formation and biosurfactants production showed a high diversity in studied rhizobacteria, B3, B1 and B4 strains produced the maximum amount of mentioned metabolites. Evaluation of root colonization was performed using rifampicin and nalidixic acid resistant mutants. B4 and B3 with 4.41×10^{7} cfu/g and 4.35×10^{7} cfu/g had the highest root colonization compared to other strains. Correlation of 0.74 and 0.80 was obtained between biofilm formation and biosurfactants production with wheat root colonization, respectively. In another part of this study, the effects of studied strains were evaluated on wheat plant growth factors. All probiotic rhizobacteria strains increased the length of roots and aerial part of wheat and most of them increased dry weight of roots and aerial part. Based on the findings of this research, strains with high potential in biofilm formation and biosurfactants production were colonized wheat root very well and most of studied strains showed the effect of increasing on wheat growth factors.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biofilm, biosurfactants, growth promoting, probiotic.

* Corresponding author E-mail: m.khezri@urmia.ac.ir Tel: +98 21 66676158

تازه‌های تحقیق

در این تحقیق، میزان تولید بیوفیلم، بیوسورفکتانت‌ها باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و تأثیر آن‌ها در کلنیزاسیون ریشه و فاکتورهای رشدی گیاه گندم مورد ارزیابی قرار گرفته است. بر اساس نتایج این پژوهش، بین کلنیزاسیون ریشه و تولید بیوفیلم، بیوسورفکتانت‌ها به ترتیب همبستگی ۷۴ و ۸۰ درصد دیده شد و کلیه سویه‌های مورد مطالعه روی فاکتورهای رشدی طول و وزن خشک ریشه و اندام هوایی اثر افزایشی نشان دادند ولی بین تولید بیوفیلم و بیوسورفکتانت‌ها با شاخص‌های افزایش یافته در گیاه گندم همبستگی دیده نشد.

مقدمه

در بیشتر اکوسیستم‌های خشکی و آبی می‌توان تنوع فراوانی از میکروارگانیسم‌ها را مشاهده نمود. محیط ریزوسفر به دلیل وجود منابع غذایی مختلف که از ریشه گیاهان ترشح می‌شود، محل مناسبی برای فعالیت میکروب‌های مختلف می‌باشد. مواد مترشحه از ریشه حاوی انواع مواد غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم‌هاست و انرژی لازم جهت رشد، تکثیر و فعالیت‌های فیزیولوژیکی آن‌ها را فراهم می‌آورد. این زیستگاه کوچک، محلی برای تعامل بین گیاه، میکروارگانیسم‌های مفید و بیمارگرهاست (Ashtar *et al*. 2004, Berg *et al*. 2000, Kamilova *et al*. 2005). برخی از باکتری‌های همراه ریشه، اثرات مفیدی روی گیاه دارند. دانشمندان این باکتری‌های ساکن ریزوسفر را ریزوباکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه (PGPR) می‌نامند. این باکتری‌های پروبیوتیک به صورت مستقیم با افزایش حلالیت و جذب مواد غذایی و تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه و به صورت غیرمستقیم با تولید سیدروفور، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌های تجزیه‌کننده، ترکیبات فرّار ضدقارچی و یا با اعمال مکانیسم‌هایی مانند رقابت و پارازیتیسم فعالیت نموده و تاثیر بسزایی در سرکوب بیمارگرها و افزایش رشد و عملکرد گیاه دارند (Kraus and Loper 1995, Ellis *et al.* 2000, Berg *et al*. 2000, Vejan *et al*. 2016).

هر ساله مقادیر زیادی سموم و کودهای شیمیایی جهت کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی و بهبود رشد گیاهان استفاده می‌شود که ورود این مواد به طبیعت، مشکلات جدی برای سلامت انسان و محیط زیست به دنبال دارد. به همین مناسبت گرایش روزافزون به کاهش یا عدم استفاده از سموم و کودهای شیمیایی، منجر به توسعه روش‌های جایگزین یا همراه با این ترکیبات شیمیایی شده است. یکی از این روش‌ها، استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید می‌باشد (Johansson *et al*. 2003, Damalas and Koutroubas 2016). از میان باکتری‌های پروبیوتیک همراه گیاه، جدایه‌های مربوط به جنس *Bacillus* و به‌ویژه گونه *B. subtilis* همواره کانون توجه محققان علوم گیاهی بوده‌اند. جدایه‌های این گونه باکتریایی دارای قابلیت‌های بالا در تولید انواع متابولیت‌های ثانویه و به‌ویژه انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد فرّار ضدقارچی، آنزیم‌های تجزیه‌کننده، بیوسورفکتانت‌ها، بیوفیلم و ... می‌باشند (Nasraoui *et al.* 2007, Kinsella *et al.* 2009, Afsharmanesh and Ahmadzadeh 2016, Balouiri *et al*. 2016).

تولید بیوفیلم در باکتری‌ها راهکاری جهت حفظ و بقا باکتری در شرایط نامساعد محیطی است. در بیوفیلم باکتری‌های مختلف، ترکیبات متفاوتی یافت می‌شود اما ترکیب اصلی آن پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، پروتئین و DNA می‌باشد (Kobayashi 2007, Kearns 2008). بستره این لایه زیستی یک ساختار متراکم ایجاد می‌کند که حفاظت فیزیکی و شیمیایی سلول‌های منفرد موجود در بیوفیلم را به عهده دارد. پرگنه‌های کوچک تشکیل‌دهنده بیوفیلم ممکن است توسط یک گونه باکتری ایجاد شود اما به‌طور معمول گونه‌های مختلف باکتریایی در تشکیل یک بیوفیلم مشارکت دارند. باکتری‌ها، بیوفیلم را در پاسخ به تغییر شرایط محیطی تشکیل می‌دهند (Morikawa et al. 2006). عوامل مختلفی مانند دما، شرایط اسمزی، اسیدیته، میزان آهن و اکسیژن قابل استفاده، نوع و مقدار مواد غذایی به‌ویژه منابع کربن و ازت، نوع بستر و حضور سایر میکروارگانیسم‌های موجود در محیط می‌تواند بر کمیت و کیفیت بیوفیلم تولید شده توسط باکتری‌ها تأثیرگذار باشد (Morikawa *et al*. 2006, Khezri *et al.* 2016). قابلیت تولید بیوفیلم یک مزیت برای باکتری تولیدکننده

آن محسوب می‌شود. باکتری‌های موجود در بیوفیلم در مقایسه با باکتری‌های منفرد، در برابر شرایط نامساعد محیطی به‌ویژه سموم شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت شده و کمتر تحت تأثیر این شرایط قرار می‌گیرند، همچنین این باکتری‌ها کلنیزاسیون موفق‌تری دارند (Molina *et al.* 2003, Khezri *et al.* 2011). محققان معتقدند تولید بیوفیلم در میکروارگانیسم‌های مفید همراه گیاه، بر توانایی آن‌ها در کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی نیز نقش دارد (Bais *et al.* 2004, Khezri *et al.* 2011).

با عنایت به مشکلات عدیده زیست محیطی ناشی از مصرف سموم و کودهای شیمیایی و گرایش روزافزون کاهش مصرف این گونه ترکیبات در بین محققان علوم محیط زیست و کشاورزی، این پژوهش با هدف بررسی پتانسیل تشکیل بیوفیلم، تولید بیوسورفکتانت‌ها و کلنیزاسیون ریزوپلان گیاه مهم و استراتژیک گندم توسط تعدادی سویه بومی باکتری پروبیوتیک *B. subtilis* انجام شد. همچنین تأثیر این سویه‌ها در فاکتورهای رشدی گیاه گندم و میزان همبستگی این ویژگی‌ها با تولید بیوفیلم سویه‌های باکتری در آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ریزوباکتری‌های مورد استفاده در آزمایش‌ها

تعداد ۱۱ سویه باکتری *B. subtilis*، بومی ایران با شماره‌های B1 تا B11، جهت انجام آزمایش‌های این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت (Khezri *et al.* 2011). جهت نگهداری طولانی مدت سویه‌ها، بر اساس روش ولر و کوک از محلول سترون گلیسرول ۲۵٪ در آب مقطر استفاده شد و نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند (Weller and Cook 1983).

تولید بیوفیلم در آزمایشگاه

به منظور بررسی میزان بیوفیلم تولید شده در سویه‌های باکتری مورد مطالعه، سویه‌ها در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی(LB) به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس کشت باکتری با محیط کشت تازه، رقیق و دوباره در شرایط رشدی فوق قرار گرفت. هنگامی که دانسیته نوری سویه‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر به عدد یک رسید، محیط حاوی سویه‌ها به نسبت ۱:۳۵۰ با محیط کشت حداقل MSgg رقیق گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری به پلیت ۹۶ چاهکی پلی‌استیرن منتقل شد. سپس پلیت به مدت ۷۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در شرایط ساکن قرار داده شد. پس از گذشت این زمان پلیت خالی گردید و سه بار، هر بار به مدت یک دقیقه با آب مقطر شستشو شد. جهت خشک شدن، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. جهت ثابت نمودن سویه‌های متصل شده به دیواره چاهک‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هر چاهک اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از شستشو به روش فوق، به چاهک‌ها کریستال ویولت یک درصد اضافه و پس از حداکثر ۱۵ دقیقه شستشو انجام گردید. در پایان، محلول ۱:۴ اتانول-استون اضافه و جهت خواندن میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر از دستگاه الیزاریدر استفاده گردید (Nagórska *et al.* 2008).

آزمون تولید بیوسورفکتانت‌ها

سویه‌های ریزوباکتری مورد مطالعه، روی محیط کشت خون آگار (حاوی محیط کشت اولیه و ۵-۷ درصد خون دیفیبرین شده گوسفند) به صورت نقطه‌ای کشت داده شدند. باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت‌ها پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در اطراف خود هاله شفاف ایجاد نموده و محیط اطراف خود را بی‌رنگ نمودند (Hsieh *et al.* 2004).

تهیه موتانت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک

به منظور بررسی کلنیزاسیون ریشه گندم، از سویه‌های ریزوباکتری مورد مطالعه، موتانت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک تهیه گردید. موتانت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک که به صورت خود به خودی به وجود می‌آیند، از طریق مخطط کردن روی محیط نوترینت آگار (NA) حاوی مقادیر متفاوت آنتی‌بیوتیک، به صورت زیر ایجاد شد. ابتدا مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک ریفامپی‌سین بررسی گردید. برای این منظور از

غلظت‌های افزایشی این آنتی‌بیوتیک (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰پی‌پی‌ام) استفاده شد. پرگنه‌های مقاوم به غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام این آنتی‌بیوتیک انتخاب و جهت القای مقاومت به آنتی‌بیوتیک دوم استفاده شدند. این تیمار با همین غلظت‌ها برای آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک‌اسید هم انجام شد. سپس موتانت‌های مورد نظر روی محیط NA حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر هر دو آنتی‌بیوتیک کشت گردید. به منظور اطمینان از ثبات موتانت‌های ایجاد شده، موتانت‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث (NB) فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس یک میلی‌لیتر از محیط حاوی باکتری به ارلن دیگر که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط NB فاقد آنتی‌بیوتیک بود، انتقال داده شد و دوباره در همان شرایط رشدی قرار گرفتند. این مرحله هر روز، به مدت ۲ هفته تکرار گردید. پس از این مرحله، سویه‌ها روی محیط NA حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر هر دو آنتی‌بیوتیک کشت شدند. در نهایت موتانت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک با سویه‌های اصلی مقایسه و از هر کدام یک پرگنه فاقد تفاوت با سویه اصلی از نظر سرعت رشد، مورفولوژی پرگنه و توانایی آنتاگونیستی در کشت متقابل در برابر قارچ بیمارگر در آزمایشگاه انتخاب و جهت بررسی میزان کلنیزاسیون ریشه توسط سویه‌های منتخب استفاده گردید (Mansouripour *et al*. 2008).

تهیه بذر آغشته به موتانت باکتری آنتاگونیست

در کلیه آزمایش‌های گلخانه‌ای این پژوهش، از روش آغشته‌سازی بذر به باکتری آنتاگونیست استفاده شد. بدین منظور سویه‌های موتانت، به مدت ۲۴ ساعت در ارلن‌های حاوی محیط کشت LB در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند. سپس باکتری‌ها با استفاده از سانتریفوژ ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری گردیدند. سلول‌های باکتری در محلول یک درصد متیل‌سلولز غوطه‌ور شدند، سپس بذرهای گندم رقم فلات ضدعفونی سطحی شده (محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۳ دقیقه)، به مدت دو ساعت در سوسپانسیون 1×10^{9} cfu/ml سویه‌های باکتری قرار داده شدند و پس از خشک شدن در جریان هوای سترون زیر هود به مدت یک ساعت، جهت آزمایش‌های گلخانه‌ای استفاده گردیدند. در تیمار شاهد، گندم درون محلول یک درصد متیل‌سلولز غوطه‌ور گردید (Kempf and Wolf 1989).

ارزیابی کلنیزاسیون ریشه

در بررسی میزان کلنیزاسیون ریشه گندم، آغشته‌سازی بذر به سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری‌ها انجام شد. بذرهای مورد نظر درون گلدان‌های حاوی پرلیت سترون، در اتاق رشد کشت و با محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند. چهار هفته پس از تلقیح، ریشه‌ها از پرلیت خارج گردیدند و زیر جریان ملایم آب شسته شدند. پس از خشک شدن، یک گرم از ریشه درون ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و به مدت یک ساعت روی شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت 10^{-5} سوسپانسیون، روی محیط کشت NA حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپی‌سین و نالیدیکسیک‌اسید پخش گردید. تشتک‌های پتری به دمای ۳۰ درجه سلسیوس انتقال داده شدند و پس از ۲۴ ساعت پرگنه‌ها شمارش گردیدند (Yan *et al*. 2003).

تأثیر ریزوباکتری‌های پروبیوتیک روی فاکتورهای رشدی گندم

جهت بررسی تأثیر ریزوباکتری‌های پروبیوتیک روی شاخص‌های رشدی گیاه گندم، بذرها طبق روش توصیف شده، به ریزوباکتری‌ها آغشته گردیدند و در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک سترون شده کاشته شدند (Weller and Cook 1983). در تیمار شاهد بجای گندم آغشته به باکتری، گندم ضدعفونی سطحی شده، استفاده گردید. گلدان‌ها هر ۲-۳ روز یک بار آبیاری شدند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. پس از گذشت چهار هفته، گیاهچه‌ها به آرامی از بستر خاک خارج و ریشه‌ها توسط آب روان شستشو شدند. شاخص‌های مورد بررسی طول، وزن تر و وزن خشک ریشه و اندام هوایی بود. جهت اندازه‌گیری طول اندام هوایی از محل طوقه تا انتهای گیاهچه و طول ریشه از

طوقه تا انتهای بلندترین ریشه اندازه‌گیری شد. پس از اندازه‌گیری وزن تر ریشه و اندام هوایی، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت یا بیشتر (تا زمان تثبیت شدن وزن خشک نهایی) در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند، سپس توزین گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. گروه‌بندی تیمارها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.1) انجام شد. همبستگی بین صفات مطالعه شده در آزمایشگاه و گلخانه با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون (نرم‌افزار SAS) مورد بررسی قرار گرفت. در مورد صفاتی که عدد صفر در بین آن‌ها وجود داشت، از تبدیل عددی $x=\sqrt{x+0.05}$ استفاده شد.

نتایج و بحث

در تحقیق حاضر، پتانسیل ۱۱ سویه باکتری پروبیوتیک *B. subtilis* بومی ایران در تولید بیوفیلم، بیوسورفکتانت‌ها، کلنیزاسیون ریشه و تأثیر روی شاخص‌های رشدی گیاه مهم گندم مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این آزمایش، میزان تولید بیوفیلم در ریزوباکتری‌های مورد مطالعه تنوع بالایی نشان داد. بیشترین مقدار بیوفیلم توسط سویه‌های B3، B1 و B4 و پس از آن‌ها توسط سویه‌های B6 و B2 تشکیل شد. تعدادی از سویه‌ها تولید بیوفیلم ناچیزی داشته و با تیمار شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۱). از طرفی بیشترین میزان تولید بیوسورفکتانت‌ها نیز مربوط به سویه‌های B1 و B4 با ایجاد هاله روشن ۶/۳۳ میلی‌متری و پس از آن مربوط به سویه B3 با ایجاد هاله ۵/۶۶ میلی‌متری بود. ۹ سویه دیگر نیز هاله‌ای بیش از ۲ میلی‌متر در اطراف پرگنه باکتری ایجاد کردند (شکل ۱). تولید بیوفیلم در باکتری‌ها تحت تأثیر سیگنال‌های محیطی و تغذیه‌ای قرار دارد. ترکیب مواد معدنی و اسیدیته خاک، همچنین محتوای مواد مترشحه از ریشه گیاه میزبان به‌ویژه قندها و اسیدهای آمینه می‌تواند الگو و میزان تولید بیوفیلم باکتری را تحت تأثیر قرار دهد (Khezri 2016). باکتری‌هایی که توان تولید بیوفیلم بالایی داشته باشند، مقاومت بیشتری در برابر شرایط نامساعد محیطی مانند محدودیت اکسیژن، تراکم سلولی، فشار اسمزی بالا، سموم و آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهند. این گونه باکتری‌ها سطوح میزبان را بهتر کلنیزه نموده و قادرند به میزان بالایی از دفاع میزبان اجتناب نمایند (Prigent-Combaret *et al.* 1999, Morris and Monier 2003, Ahmadzadeh 2013). تولید بیوفیلم یک فرایند پیچیده بوده و ژن‌های متعددی در تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها دخالت دارند اما هنوز نکات مبهم فراوانی در فرایند ژنتیکی تولید بیوفیلم باکتری پروبیوتیک *B. subtilis* وجود دارد (Sauer 2003, Khezri *et al.* 2016) مقایسه بیان ژن‌های مختلف در دو وضعیت رشد آزاد و درون بیوفیلم اطلاعات زیادی را در اختیار دانشمندان قرار داده است. آنالیز ریزآرایه DNA در باکتری *B. subtilis*، نشانگر بیان متفاوت ۵۱۹ ژن در سلول‌های موجود در بیوفیلم این باکتری می‌باشد (Stanley *et al.* 2003). سورفکتانت‌های زیستی، ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها هستند که موجب کاهش کشش سطحی می‌شوند. در این مطالعه، کلیه سویه‌ها در محیط خون آگار تولید بیوسورفکتانت‌ها نمودند. سورفکتین از آنتی‌بیوتیک‌های غیرریبوزومی است که ماهیت لیپیدی دارد. این آنتی‌بیوتیک یکی از مهم‌ترین سورفکتانت‌های زیستی است که فعالیت ضدمایکوپلاسمایی، ضدباکتریایی و ضدویروسی آن اثبات شده است (Ongena and Jacques 2008, Pyoung *et al.* 2010). بر اساس یافته‌های محققان در باکتری *B. subtilis* میزان تولید سورفکتین با تشکیل بیوفیلم رابطه مستقیم دارد (Bais *et al.* 2004, Zeriouh *et al.* 2014). در مطالعه حاضر نیز همبستگی ۰/۸۳ بین میزان تولید بیوسورفکتانت‌ها با مقدار تولید بیوفیلم سویه‌ها دیده شد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد توان تولید توام بیوفیلم و سورفکتین توسط سویه‌های باکتری *B. subtilis* می‌تواند موجب کاهش خسارت باکتری بیمارگر روی گیاه آرابیدوپسیس گردد (Bais *et al.* 2004).

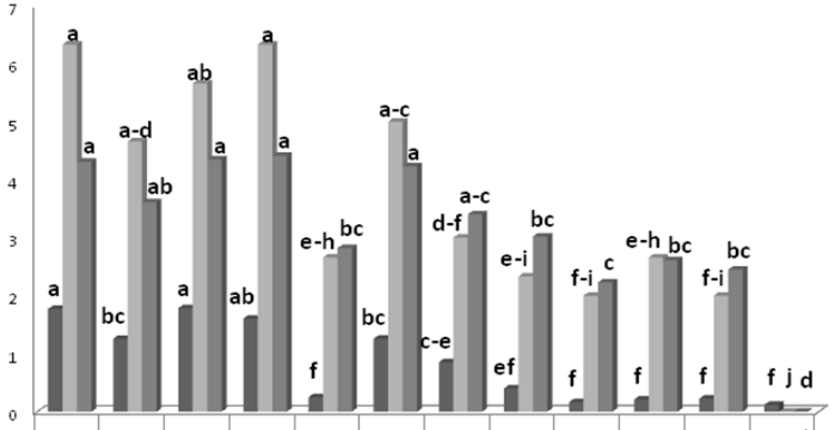
مقایسه میانگین داده‌های حاصل از شمارش پرگنه‌های باکتری‌های موتانت روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپی‌سین و نالیدیکسیک‌اسید،

نشان داد سویه‌ها از نظر کلنیزاسیون ریشه گندم در ۵ گروه آماری قرار گرفتند. پس از ۴ هفته، سویه B4 با جمعیت $۴/۴۱\times۱۰^{۷}$ cfu/g و پس از آن سویه‌های B3 و B1 با جمعیت $۴/۳۵\times۱۰^{۷}$ cfu/g و $۴/۳۳\times۱۰^{۷}$ cfu/g، بیشترین میزان کلنیزاسیون ریشه را نسبت به سایر سویه‌ها داشتند. کمترین کلنیزاسیون مربوط به سویه B9 با جمعیت $۲/۲۳\times۱۰^{۷}$ cfu/g بود (شکل ۱). بنابر نتایج این تحقیق، ۷۳ درصد از سویه‌های مورد بررسی ریشه گندم را بیش از ۳×۱۰^{۷} cfu/g کلنیزه نمودند. ریزوسفر و ریشه گیاهان مکان‌های ترجیحی کلنیزاسیون برای میکروارگانیسم‌های خاک‌زی می‌باشند، زیرا ترشحات ریشه مملو از مواد مغذی مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها است. در حین رشد ریشه و تشکیل ریشه‌های فرعی و مویین، پوست ریشه زخم شده و مواد غذایی نظیر قندها، اسیدهای‌آمینه و اسیدهای‌آلی که منابع تامین انرژی، کربن و نیتروژن برای میکروارگانیسم‌ها هستند، در خاک رها می‌گردند. در چنین جایگاه‌های زیستی، گونه‌های مختلف باکتری تکثیر شده و تشکیل بیوفیلم می‌دهند. تشکیل بیوفیلم روی سطوح زنده در پاسخ به سیگنال‌های محیطی انجام شده و مواد غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها از میزبان زنده تامین می‌گردد (Molina *et al*. 2003).

بررسی‌های آماری صفات مورد مطالعه در آزمایشگاه و گلخانه نشان داد، میزان تشکیل بیوفیلم و بیوسورفکتانت‌ها در آزمایشگاه با کلنیزاسیون ریشه گندم در گلخانه به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۸۰ همبستگی مثبت دارد. با نگاهی به یافته‌های این مطالعه درمی‌یابیم برخی از سویه‌ها مانند B1، B3 و B4 که بیشترین میزان بیوفیلم و بیوسورفکتانت‌ها را در آزمایشگاه تولید نمودند، موفق‌ترین کلنیزه‌کنندگان ریشه در گلخانه بودند و توانستند پس از ۴ هفته ریشه گندم را بیش از $۴/۳\times۱۰^{۷}$ cfu/g کلنیزه نمایند. در حالی که جدایه‌های B5، B9 و B10 که ریشه را به طور ضعیف، بین $۲/۲\times۱۰^{۷}$ cfu/g تا $۲/۸\times۱۰^{۷}$ cfu/g کلنیزه کردند، در آزمایشگاه نیز بیوفیلم و بیوسورفکتانت‌ها بسیار ناچیز تولید نموده و در آخرین گروه آماری و نزدیک شاهد قرار گرفتند (شکل ۱).

توانایی کلنیزاسیون ریشه گیاه میزبان یکی از ویژگی‌های مهم در موفقیت عوامل میکروبی است که رابطه مستقیم با توان کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی دارد. یاریورا و همکاران در تحقیق خود روی سویه *B. amyloliquefaciens* BNM339 که قادر به بیوکنترل تعدادی قارچ بیمارگر گیاهی است، دریافتند کلنیزاسیون بذر سویا توسط این سویه، به عواملی مانند شیمی‌گرایی، توان تشکیل بیوفیلم و رشد باکتری بستگی دارد (Yaryura *et al*. 2008). در دو گونه باکتری *P. fluorescens* و *P. putida* پروتئینی به نام LapA وجود دارد که از بزرگ‌ترین پروتئین‌های این دو میکروارگانیسم است. این پروتئین نقش اساسی در تشکیل بیوفیلم آن‌ها ایفا می‌نماید. محققان اثبات نموده‌اند پروتئین LapA یک عنصر کلیدی در اتصال باکتری به بذر و خاک بوده و در کلنیزاسیون موفق آن‌ها مؤثر می‌باشد. از آن جایی که مراحل اولیه کلنیزاسیون برای استقرار موفق روی ریشه بسیار مهم است، باکتری‌هایی که دارای توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم هستند، کلنیزه‌کنندگان موفق‌تری هستند زیرا هنگام قرار گرفتن روی ریشه، سریعا بیوفیلم تولید نموده و خود را به صورت محکم روی ریشه تثبیت می‌نمایند (Molina *et al*. 2003, Boyd *et al*. 2014).

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، کلیه سویه‌های ریزوباکتری پروبیوتیک استفاده شده در این مطالعه روی طول ریشه و اندام هوایی گیاه گندم اثر مثبت داشتند و کم و بیش موجب افزایش طول ریشه و اندام هوایی شدند. در مورد وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی سویه B6 باعث افزایش چهار ویژگی مورد مطالعه شد. برخی سویه‌ها نظیر B1 و B4 باعث افزایش وزن تر و خشک ریشه شدند اما روی وزن تر و خشک ساقه اثر منفی داشتند. به‌طور کلی اکثر سویه‌ها اثر افزایشی در وزن خشک ریشه و اندام هوایی نشان دادند (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بین تیمارهای مختلف در طول اندام هوایی و ریشه، همچنین وزن تر و خشک ریشه اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد و بین تیمارهای مختلف وزن تر اندام هوایی تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد وجود دارد اما در مورد تأثیر تیمارهای مختلف روی وزن خشک اندام هوایی اختلاف معنی‌دار دیده نشد، همچنین همبستگی بین تولید بیوفیلم و بیوسورفکتانت‌ها با شاخص‌های رشدی مورد بررسی دیده نشد.



	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	control
Biofilm (OD500)	1.771	1.256	1.784	1.605	0.25	1.258	0.851	0.403	0.165	0.211	0.224	0.121
Biosurfactant (mm)	6.33	4.66	5.66	6.33	2.66	5	3	2.33	2	2.66	2	0
Colonization×107 (CFU/g)	4.31	3.61	4.35	4.41	2.82	4.23	3.4	3.02	2.23	2.61	2.45	0

شکل ۱. تشکیل بیوفیلم، تولید بیوسورفکتانت‌ها و کلنیزاسیون ریشه گندم توسط سویه‌های ریزوباکتری پروبیوتیک مورد مطالعه. بر اساس آزمون دانکن، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد (تشکیل بیوفیلم) و ۱ درصد (تولید بیوسورفکتانت‌ها و کلنیزاسیون ریشه) بین تیمارها می‌باشد (اعداد میانگین ۴ تکرار می‌باشند).

Figure 1. Biofilm formation, biosurfactants production and wheat root colonization by studied probiotic rhizobacteria. Different letters indicate statistically significant difference at 5% level (Biofilm formation) or 1% level (biosurfactants production and root colonization) between treatments according to Duncan's multiple range test (numbers are average of four replications)

جدول ۱. تأثیر ریزوباکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه در فاکتورهای رشدی گیاه گندم

Table 1. Effect of studied probiotic rhizobacteria on wheat growth factors

Strains	Root length (mm)*	Aerial length (mm)*	Fresh root weight (mg) *	Fresh aerial weight (mg)**	Dry root weight (mg)*	Dry aerial weight (mg) ns
B1	34 a	15.00 cd	555 ab	88 c	100 ab	56 d
B2	35.33 a	22.33 ab	340 a-c	93 c	153 ab	83 b-d
B3	27.33 b-d	23.33 ab	293 bc	160 c	143 ab	126 ab
B4	33.66 a	12.00 d	576 a	114 c	105 ab	59 d
B5	32.66 a	26.66 a	353 a-c	493 ab	173 ab	120 a-c
B6	35.66 a	26.33 a	593 a	573 a	193 a	146 a
B7	27.66 bc	26.33 a	326 a-c	73 c	113 ab	60 d
B8	33.33 a	10.33 d	436 a-c	79 c	90 b	36 d
B9	28.50 b	26.66 a	286 bc	373 a-c	120 ab	86 b-d
B10	27.23 b-d	21.00 ab	303 bc	273 a-c	126 ab	73 cd
B11	26.23 b-d	20.00 bc	276 c	260 bc	170 ab	60 d
Control	24.66 d	10.66 d	475 a-c	337 a-c	93 b	63 d

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم تفاوت آماری معنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد و ۵ درصد براساس آزمون دانکن می‌باشد (اعداد میانگین ۴ تکرار می‌باشند).

ns, * and ** indicate no statistically significant difference and statistically significant difference at 1% and 5% levels according to Duncan's multiple range test, respectively (numbers are average of four replications).

مطالعات متعددی در زمینه تأثیر باکتری‌های پروبیوتیک روی مولفه‌های جوانه‌زنی بذر و رشد بخش‌های مختلف گیاه گندم انجام شده است. نتایج مطالعه حاضر با نتایج تحقیقات سایر محققان مبنی بر اثر افزاینده فاکتورهای رشدی گیاهان در نتیجه استفاده از باکتری‌های مفید همراه گیاه مطابقت دارد (Majeed *et al.* 2015, Ul Hassan and Bano 2015, Cherif-Silini *et al.* 2016). مطالعات زاهید و همکاران در استفاده از استرین‌های جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* نشان داد، کاربرد این استرین‌ها موجب افزایش جذب فسفر در گیاه ذرت می‌گردد. مقایسه فاکتورهای رشدی گیاهان تیمار شده با باکتری‌های مفید و گیاه شاهد حاکی از تأثیر مثبت این استرین‌ها در افزایش طول، وزن خشک و محتوای ازت و فسفر ساقه و ریشه، همچنین افزایش سطح برگ و ریشه بود (Zahid *et al.* 2015). در مطالعه‌ای که با استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک جنس‌های مختلف جداسازی شده از ریزوسفر گندم و ذرت انجام شد، بیشترین میزان هورمون اکسین و به تبع آن بیشترین اثر افزایشی در طول ریشه، در استرین *B. subtilis*AK31 دیده شد.

استرین‌هایی از باکتری‌های *B. subtilis*، *P. fluorescens* ، *Microbacterium* sp. و *Azotobacter diazotrophicus* نیز بیشترین تأثیر مثبت در وزن خشک ریشه و ساقه نسبت به شاهد داشتند (Karnwal 2012). باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌تواند اثر متفاوتی روی ارقام مختلف گندم داشته باشند. در مطالعه‌ای که در این زمینه انجام شد، استرین‌های *P. fluorescens* NUU1، *P. fluorescens* NUU2 و *Pseudomonas* spp. به خوبی ریشه دو رقم گندم را کلنیزه نمودند اما فقط در یکی از رقم‌ها (cv. *Turon*) افزایش طول و وزن خشک ساقه و ریشه مشاهده شد (Egamberdieva 2010).

امروزه در سراسر دنیا کشاورزی وابسته به مصرف کودهای شیمیایی و آفتکش‌ها می‌باشد. این وابستگی منجر به بروز مشکلات فراوانی نظیر آلودگی محیط زیست، به مخاطره افتادن سلامت موجودات زنده، نابودی اجتماعات زیستی و اختلال در چرخه‌های اکولوژیکی گردیده است، بنابراین گرایش به سمت استفاده از گزینه‌های جایگزین در جهت تولید محصولات ارگانیک سرعت گرفته است. استفاده از کودهای زیستی که با داشتن میکروارگانیسم‌های مفید موجب تقویت و افزایش رشد گیاهان، القای مقاومت به گیاه در برابر بیمارگرها و کاهش یا کنترل بیماری‌های گیاهی می گردند، یکی از مهم‌ترین این گزینه‌ها می‌باشد. تولید بیوفیلم راهکاری در باکتری‌هاست که به آن‌ها کمک می‌کند تنش‌های تغذیه‌ای، خشکی، دما و سایر شرایط نامساعد محیطی را پشت سر بگذراند (Timmusk *et al*. 2007, Epstein *et al.* 2011, Sadekuzzaman *et al.* 2015). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان اظهار داشت باکتری‌های پروبیوتیکی که میزان تولید بیوفیلم در آن‌ها بالاست، ریشه میزبان را بیشتر کلنیزه نموده و از این جهت رقابت‌کننده‌های موفق‌تری در گرفتن مکان‌های مناسب روی ریشه می‌باشند. از آنجایی که کلنیزاسیون موفق میزبان به‌طور مستقیم در توان کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی نقش دارد، قابلیت باکتری‌های پروبیوتیک در تولید بیوفیلم می‌تواند به‌عنوان یک ویژگی مهم در انتخاب آن‌ها، جهت استفاده در مدیریت بیماری‌های گیاهی و بهبود وضع محصولات گیاهی در کشاورزی پایدار لحاظ گردد.

REFERENCES

Afsharmanesh H, Ahmadzadeh M (2016) The Iturin lipopeptides as key compounds in antagonism of *Bacillus subtilis* UTB96 toward *Aspergillus flavus*. Biological Control of Pests and Plant Diseases 5: 79-95. (in Persian)

Ahmadzadeh M (2013) Biological control of plant diseases, plant probiotic bacteria. University of Tehran Press, Iran. 479 pp. (in Persian)

Ashtar HN, Zahir ZA, Arshad M (2004) Screening rhizobacteria for improving the growth, yield and oil content of canola (*Brassica napus* L.). Australian Journal of Agriculture Research 55: 187-194.

Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology 134: 307-319.

Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6: 71-79.

Berg G, Kurze S, Buchner A, Wellington EM, Smalla K (2000) Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium* wilts. Canadian Journal of Microbiology 46: 1128-1137.

Boyd CD, Smith TJ, El-Kirat-Chatel S, Newell PD, DufrêneYF, O'Toole GA (2014) Structural features of the *Pseudomonas fluorescens* biofilm adhesin LapA required for LapG-dependent cleavage, biofilm formation and cell surface localization. Journal of Bacteriology 196: 2775-2788.

Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiology 13: 20-26.

Cherif-Silini H, Silini A, Yahiaoui B, Ouzari I, Boudabous A (2016) Phylogenetic and plant growth promoting characteristics of **Bacillus** isolated from the wheat rhizosphere. Annals of Microbiology 66: 1087-1097.

Damalas CA, Koutroubas SD (2016) Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. Toxics 4: 1; Doi: 10.3390/toxics4010001.

Egamberdieva D (2010) Growth response of wheat cultivars to bacterial inoculation in calcareous soil. Plant, Soil and Environment 56: 570-573.

Ellis RJ, Timms-Wilson TM, Bailey MJ (2000) Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. Environmental Microbiology 2: 274-284.

Epstein AK, Pokroy B, Seminara A, Aizenberg J (2011) Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. PNAS 108: 995-1000.

Hsieh F, Li M, Lin T, Kao S (2004) Rapid detection and characterization of surfactin producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. Current Microbiology 49: 186-191.

Johansson PM, Johnsson L, Gerhardson B (2003) Suppression of wheat-seedling diseases caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* using bacterial seed treatment. Plant Pathology 52: 219-227.

Kamilova F, Validov S, Azarova T, Mulders I, Lugtenberg B (2005) Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environmental Microbiology 7: 1809-1817.

Karnwal A (2012) Screening of plant growth–promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*). African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development 12: 6171-6185.

Kearns DB (2008) Division of labour during *Bacillus subtilis* biofilm formation. Molecular Microbiology 67: 229-231.

Kempf HJ, Wolf G (1989) *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* on wheat. Phytopathology 79: 990-994.

Khezri M, Ahmadzadeh M, Salehi-Jouzani Gh, Behboudi K, Ahangaran A, Mousivand M, Rahimian H (2011) Characterization of some biofilm-forming *Bacillus subtilis* and evaluation of their biocontrol potential against *Fusarium culmorum*. Journal of Plant Pathology 93: 373-382.

Khezri M (2016) Influence of some environmental and nutritional conditions on biofilm formation of probiotic *Bacillus subtilis* strains. Biological Control of Pests and Plant Diseases 4: 157-165. (in Persian)

Khezri M, Ahmadzadeh M, Salehi Jouzani Gh, Sharifi R (2016) A new gene involving in biofilm formation of *Bacillus subtilis*. 11: 245-259. (In Persian).

Kinsella K, Schulthess CP, Morris TF, Stuart JD (2009) Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 41: 374-379.

Kobayashi K (2007) *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. Journal of Bacteriology 189: 4920-4931.

Kraus J, Loper JE (1995) Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Applied and Environmental Microbiology 61: 849-854.

Majeed A, Kaleem Abbasi M, Hameed S, Imran A, Rahim N (2015) Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. Frontiers in Microbiology 6: 198; Doi: 10.3389/fmicb.2015.00198.

Mansouripour SM, Alizadeh A, Safaei N (2008) Biocontrol ability and population dynamics of bacterial antagonists against *Sclerotinia sclerotiorum* in canola. Iranian Journal of Plant Pathology 44: 233-251.

Molina MA, Ramos JL, Urgel ME (2003) Plant-associated biofilms. Review in Environmental Science and Biotechnology 2: 99-108.

Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S (2006) Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ-polyglutamate. Microbiology 152: 2801-2807.

Morris C, Monier JM (2003) The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review of Phytopathology 41: 429-453.

Nagórska K, Hinc K, Stauch MA, Obuchowski M (2008) Influence of the sigmaB stress factor and *yxaB*, the gene for a putative exopolysaccharide synthase under sigmaB control, on biofilm formation. Journal of Bacteriology 190: 3546-3556.

Nasraoui B, Hajlaoui MR, Aïssa AD, Kremer RJ (2007) Biological control of wheat take-all disease: I-Characterization of antagonistic bacteria from diverse soils toward *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Tunisian Journal of Plant Protection 2: 23-34.

Ongena M, Jacques P (2007) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease control. Trends Microbiology 16: 115-125.

Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 181: 5993-6002.

Pyoung K, Ryu J, Kim YH, Chi WT (2010) Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin a from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 138-145.

Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan MFR, Ha SD (2015) Current and recent advanced strategies for combating biofilms. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 14: 491-509.

Sauer K (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. Available on line at: http://genomebiology.com.

Stanley NR, Britton RA, Grossman AD, Lazazzera BA (2003) Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. Journal of Bacteriology 185: 1951-1957.

Timmusk S, Paalme V, Lagercratz U, Nevo E (2007) Detection and quantification of plant drought tolerance enhancing bacterium *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wild barley (*Hordeum spontaneum*) with real-time PCR. Journal of Applied Microbiology 107: 736-745.

Ul Hassan T, Bano A (2015) The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 15: 190-201.

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A (2016) Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-a review. Molecules 21: 573; Doi: 10.3390/molecules21050573.

Weller DM, Cook RJ (1983) Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonades. Phytopathology 73: 463-469.

Yan Z, Reddy MS, Kloepper JW (2003) Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. Canadian Journal of Microbiology 49: 383-389.

Yaryura PM, Leo M, Correa, OS, Kerber NL, Pucheu NL, García AF (2008) Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. Current Microbiology 56: 625-632.

Zahid M, KaleemAbbasi M, Hameed S, Rahim N (2015) Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). Frontiers in Microbiology 6: 207; Doi: 10.3389/fmicb.2015.00207.

Zeriouh H, de Vicente A, Pérez-García A, Romero D (2014) Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. Environmental Microbiology 16: 2196-2211.