کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۱۲۶-۱۱۵) مقاله پژوهشی
DOI: 10.22059/jbioc.2021.326484.307

معرفی *Bacillus subtilis* UTBMS7 به عنوان یک باکتری پروبیوتیک موثر علیه *Fusarium pseudograminearum* روی گندم

محسن ساسانی[1]، مسعود احمدزاده[2*]
۱ دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲ استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۰)

چکیده

گندم از مهمترین محصولات کشاورزی در ایران است که نقش مهمی درتامین امنیت غذایی کشور دارد. بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم با عامل *F. pseudograminearum*، از مهمترین بیمارگرهای گندم است که هر ساله موجب ایجاد خسارت‌های اقتصادی می‌شود، در این تحقیق، هشتاد جدایه باکتری از جنس باسیلوس از ریزوسفر مزارع گندم شهرستان‌های استان همدان جداسازی شد، در آزمون کشت متقابل به ترتیب جدایه‌های ۳ و ۱۱ و ۲۲ و ۴ و ۷ با ۶۰، ۵۵، ۳۷،۵، ۲۲،۵ و ۲۰ درصد بیشترین توانایی را در ممانعت از رشد قارچ *F. pseudograminearum* نشان دادند، در آزمون تاثیر متابولیت‌های فرّار نیز جدایه‌های ۳ و ۷ و ۱۱ به‌ترتیب با ۵۴، ۵۲ و ۴۹ درصد بیشترین درصد بازداری از رشد قارچ را نشان دادند. این جدایه‌ها همچنین توانایی تثبیت نیتروژن، تولید سیدروفور و آنزیم‌های خارج سلولی موثر در کنترل بیولوژیک (پروتئاز، لیپاز و کیتیناز) را داشتند، اما هیچکدام از جدایه‌ها قادر به تولیدآنزیم فسفاتاز نبودند. بررسی‌های گلخانه‌ای که به‌صورت تیمار بذور گندم با جدایه‌های برتر انجام شد نشان داد که جدایه ۳ توانست بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم را به مقدار هشتاد درصد در مقایسه با تیمار شاهد کنترل کند، همچنین این جدایه توانست موجب افزایش شاخص‌های رشدی گندم (طول ساقه و وزن خشک ریشه)، در حضور و نبود قارچ بیمارگر شود. از این‌رو این جدایه پس از بررسی بیشتر می‌تواند به عنوان جدایه برتر جهت کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه و افزایش شاخص‌های رشدی گندم معرفی شود.

واژه های کلیدی: باکتری، کنترل بیماری، تحریک رشد.

Introducing of *Bacillus subtilis* UTBMS7 as a probiotic bacteria against on wheat

Mohsen Sasani[1,] , Masoud Ahmadzadeh[2,*]
[1,] Ph.D. Student, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran
[2,] Ph.D. Professor, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: July 1, 2021 - Accepted: August 1, 2021)

Abstract

Wheat is one of the most important agricultural products in Iran, that plays an important role in ensuring food security. Crown and root rot disease by *F. pseudograminearum* is one of the most important pathogens that cause economic damages every year. In this study, 80 isolates of *Bacillus* were isolated from wheat rhizosphere. In dual-culture test, 3, 11, 22, 4 and 7 isolates with 60, 55, 37.5, 22.5 and 20% maximum ability, respectively. In effect test of volatile metabolites on inhibination the growth of *F. pseudograminearum*, 3, 7 and 11 with 54, 52 and 49% showed the highest percentage of inhibition of fungal growth. These isolates were also capable of nitrogen fixation, production of siderophore and extracellular enzymes involved in biological control (protease, lipase and chitinase), but none of the isolates were able to produce phosphatase enzyme. Greenhouse studies by treating wheat seeds with selected isolates showed that 3 was able to control crown and root rot of wheat by 80.33% compared to the control treatment. Also, this isolate could increase the growth indices of wheat (stem length and root dry weight) in the presence and absence of pathogenic fungi. Therefore, this isolate, after further studies can be introduced as a superior isolate to control crown and root rot disease and promote wheat growth.

Keywords: Bacteria, Disease control, Growth promotion.

E-mail: ahmadz@ut.ac.ir

مقدمه

گندم گیاهی است که در مساحت وسیعی از زمین‌های کشاورزی دنیا و حتی در نواحی خشک و نیمه‌خشک کشت‌شده و محصول کافی تولید می‌نماید. اهمیت اقتصادی آن، چه ازنظر تولید و چه ازنظر تغذیه در دنیا بیش از سایر محصولات کشاورزی است. گندم از مهم‌ترین گیاهان زراعی به‌شمار می‌رود زیرا؛ زراعت آن از بقیه گیاهان ساده‌تر، تطابق آن با شرایط آب و هوایی متفاوت، بیشتر و از طرفی غذای اولیه واصلی اغلب مردم جهان را تشکیل می‌دهد. گندم ازنظر تولید و سطح زیر کشت مهم‌ترین محصول کشاورزی ایران بوده و از اهمیت خاصی در کشور برخوردار است (FAO 2018). طبق آمارنامه ارائه‌شده توسط وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۵ مصرف سرانه گندم در کشور ۲۴۰ کیلوگرم بوده که این رقم بیش از دو برابر مصرف سرانه دنیا است (متوسط مصرف سرانه دنیا نود کیلوگرم است). عوامل مختلفی موجب کاهش تولید گندم در واحد سطح شده، تولید این محصول را تهدید می‌کنند. بیمارگرهای عامل پوسیدگی طوقه و ریشه گندم یکی از مهمترین آنها است، که در بیشتر موارد، عامل این بیماری گونه‌های مختلف جنس فوزاریوم می‌باشند، یکی از مهمترین گونه‌های این جنس قارچ *F. pseudograminearum* می‌باشد که باعث ایجاد پوسیدگی طوقه و ریشه می‌شود. بیشترین خسارت این بیماری در شرایط آب و هوایی مرطوب می‌باشد. این بیمارگر همچنین با تولید توکسین‌های قارچی باعث ایجاد خسارت کیفی به دانه‌های گندم و فراورده‌های حاصل از آن نیز می‌شود (Obanor *et al*. 2013). علائم بیماری به‌صورت زخم‌های قهوه‌ای تیره در نواحی زیر طوقه، میان گره و ریشه، گندم مشاهده می‌شود. در اقلیم‌های دارای آب و هوای مرطوب و معتدل بیمارگر می‌تواند موجب ایجاد خسارت اقتصادی شدید در سطح مزرعه گردد (Smiley 2009). با توجه به خاک‌زاد بودن بیمارگر و ناکارآمدی سموم شیمیایی و همچنین تاثیرات سو باقیمانده‌های سموم شیمیایی در محیط‌زیست؛ پژوهش‌ها به‌دنبال یافتن جایگزینی مناسب جهت کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه متمرکز شده‌است (Cook 2000). از روش‌های کنترلی جایگزین می‌توان به، اصلاح روش‌های آبیاری مرسوم و استفاده مناسب از منابع آبی، ارقام مقاوم و متحمل، ضدعفونی بذر، تناوب زراعی مناسب، کاربرد صحیح کودهای شیمیایی و کنترل بیولوژیک بیماری با استفاده از باکتری‌ها اشاره کرد (Wagacha and Muthombi 2007). استفاده از عوامل بیولوژیک به عنوان روشی مطمئن برای کنترل قارچ‌های بیمارگر پیشنهاد شده است (Ling *et al*. 2010)، چرا که این عوامل سبب کاهش خسارت قارچ‌های بیمارگر شده، موجب برقراری تعادل در اکوسیستم‌های کشاورزی می‌شوند (Joniur *et al*. 2000) عوامل بیولوژیک و در راس آن‌ها باکتری‌های جنس باسیلوس به‌دلیل استفاده از روش‌های مختلف آنتاگونیستی نظیر رقابت بر سر منابع غذایی، تولید ترکیبات ممانعت کننده از رشد قارچ نظیر متابولیت‌های فرّار و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، القای مقاومت و ... ، توانایی بالایی در کنترل قارچ‌های بیمارگر داشته و با توجه به تولید اندوسپور داخلی می‌توانند بقای خود را تحت شرایط سخت محیط ریزوسفر برای مدتی طولانی حفظ کنند، در حال حاضر فرمولاسیون‌های مختلف و موفقی از محصولات بیولوژیک بر پایه باکتری باسیلوس در سطح جهان و ایران تولید شده که به عنوان قارچ‌کش‌ها و کودهای زیستی در سطح مزارع مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani 2021)؛ از طرفی دیگر این باکتری‌ها با تولید هورمون‌ها، متابولیت‌ها و ترکیبات فرّار محرک رشد باعث بهبود رشد و عملکرد گیاه شوند؛ لذا به منظور افزایش تولید گندم در واحد سطح، جداسازی و غربالگری مناسبی از باکتری‌های جنس باسیلوس از محیط ریزوسفر گندم و معرفی جدایه‌ای برتر از این باکتری که بتواند کنترل مناسبی روی قارچ فوزاریوم داشته و توانایی تولید متابولیت‌ها و هورمون‌های محرک رشد گندم را داشته باشد، می‌تواند بسیار راهگشا باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر باکتری‌های جنس باسیلوس در کنترل قارچ *F. pseudograminearum* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه قارچ بیمارگر و بذر گندم

قارچ *F. pseudograminearum* که در تحقیقات پیشین به عنوان عامل پوسیدگی طوقه و ریشه گندم جداسازی شده بود (Safaei *et al*. 2012) از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه تهیه شد. بذر گندم رقم فلات که طی پژوهش‌های متعدد به عنوان رقم حساس به این بیماری معرفی شده است نیز از بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد.

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های باسیلوس از ریزوسفر گندم

نمونه برداری از مزارع گندم سه شهرستان نهاوند، ملایر و تویسرکان واقع در استان همدان در اردیبهشت‌ماه سال ۹۸ انجام شد. نمونه‌برداری به صورت تصادفی در مرحله گلدهی و از بوته‌های گندمی که از نظر ارتفاع گیاه و اندازه سنبله نسبت به سایرین متمایز بودند انجام گرفت. به منظور جداسازی باکتری، خاک چسبیده به ریشه تکانده شده و نمونه خاک هر مزرعه به آزمایشگاه منتقل شد؛ سپس از از هر نمونه خاک، سری رقت‌های $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۸}$ تهیه و یکصد میکرولیتر از هر سری رقت روی پتری‌دیش حاوی محیط کشت NA پخش گردید. پتری‌دیش‌ها به صورت وارونه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس هشتاد جدایه باکتریایی مشابه جنس باسیلوس بر اساس خصوصیات فنوتیپی (شکل، تحرک، رنگ، سرعت رشد، مورفولوژی کلونی) و رنگ آمیزی گرم انتخاب شده که پس از سه مرحله خالص سازی به روش کشت چهار خطی وارد مرحله غربالگری شدند.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ *F. pseudograminearum*

برای بررسی قدرت بازداری از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاه از روش (Thammasittirong 2016) استفاده شد. به‌این ترتیب که یک قرص پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ *F. pseudograminearum* به فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از لبه تشتک پتری حاوی محیط NA+PDA قرار داده شد. سپس یک لوپ از باکتری به‌صورت خطی و با فاصله ۴/۵ سانتی‌متر از قارچ بیمارگر کشت شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از هفت روز، شعاع رشد پرگنه قارچ در حضور باکتری و تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. درصد ممانعت از رشد قارچ توسط باکتری با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

درصد ممانعت از رشد قارچ = $[(R1 - R2)/R1] \times 100$

شعاع رشد قارچ R_2 = / شعاع رشد قارچ در تیمار شاهد = R_1 درحضور باکتری

بررسی اثر ترکیبات فرّار باکتری علیه *F. pseudograminearum*

این آزمون مطابق روش (Fiddaman and Rossall 1994)انجام شد. یکصد میکرولیتر از کشت مایع ۴۸ ساعته باکتری، روی محیط LBA پخش‌شد و همزمان یک قرص پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ روی محیط PDA کشت داده و آن را در مقابل (قسمت بالایی) محیط حاوی باکتری قرار داده و شکاف بین دو تشتک پتری را با نوار پارافیلم مسدود کرده تا از خروج ترکیبات فرّار جلوگیری شود. در تیمار شاهد از آب مقطر به‌جای سوسپانسیون باکتری استفاده شد. تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. درصد کاهش رشد پرگنه بیمارگر نسبت به شاهد که بدون باکتری بود به‌عنوان معیاری جهت ارزیابی اثر ضد میکروبی ترکیبات فرّار مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی توانایی تولید آنزیم‌های خارج سلولی

بررسی تولید آنزیم پروتئاز: در این بررسی از محیط اسکیم میلک آگار (شامل: ۱۵ گرم پودر شیر، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و نه گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد، باکتری به‌صورت خطی در تشتک‌های حاوی محیط کشت و در دمای سی درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. تشکیل هاله بی‌رنگ اطراف کلونی باکتری، نشانه فعالیت آنزیم پروتئاز است (Bajaj and Sharma 2011).

توانایی تولید آنزیم کیتیناز

مقدار چهار درصد حجمی کیتین کلوئیدال به محیط آب آگار ۱/۵ درصدی اضافه گردید. پس از اتوکلاو و انتقال به تشتک پتری، باکتری به‌صورت خطی کشت‌شده و پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت، با معرف لوگول رنگ‌آمیزی شد، وجود هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده تجزیه کیتین توسط باکتری می‌باشد (Buzzini and Martini 2002). معرف لوگول به این ترتیب، تهیه شد: دو گرم یدور پتاسیم به همراه یک گرم ید به سیصد میلی‌لیتر آب افزوده‌شده و تا انحلال کامل هم‌زده می‌شود. مقدار مناسبی از محلول حاصل به تشتک‌های پتری حاوی محیط افزوده شده تا محیط رنگ شده و هاله مشاهده گردد.

توانایی تولید آنزیم آمیلاز

به محیط کشت NA، ۲ درصد نشاسته محلول افزوده و پس از اتوکلاو در تشتک پتری ریخته شد. باکتری به‌صورت خطی روی محیط کشت گردید و پس از ۴۸ ساعت؛ محیط با معرف لوگول رنگ‌آمیزی شد. هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده تجزیه نشاسته توسط باکتری است (Yazdanparast 1993).

توانایی تولید آنزیم فسفاتاز

محیطی شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم، ۰/۵ گرم فسفات کلسیم، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم و ۱۵ گرم آگار آماده شده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، سپس باکتری به‌صورت خطی روی آن کشت داده و به انکوباتور منتقل شد. پس از ۴۸ ساعت وجود هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده خاصیت حل‌کنندگی فسفات هست (Sperber 1958)

بررسی توانایی تولید برخی ترکیبات محرک رشد

بررسی توان تولید سیدروفور: به روش CAS آگار از محیط کروم‌آزورول‌اس استفاده شد (Alexander and Zuberer 1991)؛ بدین منظور، پنج میکرولیتر از باکتری به وسط تشتک پتری محیط CAS آگار منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. اگر رنگ محیط کشت به‌دلیل خروج آهن از محیط CAS آگار، به نارنجی تغییر پیدا کند، نشان‌دهنده تولید سیدروفور توسط باکتری است. بدین منظور مطابق روش (Ghazy and El-Nahrawy 2021) پس از گذشت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از کشت باکتری نسبت به بررسی قطر هاله به قطر کلونی باکتری اقدام شد.

توانایی تثبیت نیتروژن

به روش آزمون کاهش استیلن (پیش‌ماده و کوفاکتور آنزیم نیتروژناز) انجام شد (Miladiarsi and Widyastuti 2017). بدین منظور باکتری در محیط NFB کشت و پس از پنج روز انکوبه شدن در دمای سی درجه سلسیوس، وضعیت باکتری بررسی شد. اطراف کلونی باکتری، وجود هاله تغییر رنگ یافته از سبز به آبی نشان‌دهنده تثبیت نیتروژن بود.

آزمایشات گلخانه‌ای

آزمون بیماری‌زایی

تهیه مایه تلقیح قارچ بیمارگر مطابق روش مولر و همکاران، (۲۰۰۳) انجام شد. بدین منظور، چهار قرص چهار میلی‌متری از کشت تازه قارچ به ارلن حاوی چهارصد گرم بذر گندم منتقل گردید و به مدت پانزده روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شد اثبات بیماری‌زایی مطابق روش اسمیلی و یان (Smiley and Yan 2009) با کمی تغییرات انجام شد. پنج عدد بذر پس از ضدعفونی سطحی در سطح خاک قرار داده شد و سه سانتی‌متر خاک استریل در سطح بذور پخش گردید. سپس ده عدد بذر از مایه تلقیح به خاک افزوده شد و و با یک لایه سه سانتی‌متری از همان خاک پوشیده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. آبیاری به‌صورت یک روز در میان انجام شد. شدت بیماری چهل روز پس از کاشت گندم و بر اساس شاخص معرفی شده توسط اسمیلی و یان (۲۰۰۹) اندازه‌گیری شد.

کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم با جدایه‌های باکتریایی

یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته هر جدایه باکتریایی

به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB منتقل‌شد و به‌مدت ۴۸ ساعت درون دستگاه شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰rpm و دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جمعیت هر جدایه به 10^{8} CFU/ml رسانده شد. تعداد ۵ عدد بذر گندم رقم فلات درون محیط کشت باکتری به مدت یک ساعت قرار گرفتند و پس از خشک شدن در زیر هود لامینار نسبت به کاشت بذور اقدام شد. کاشت بذرها و افزودن قارچ بیمارگر، به روش اسمایلی و یان انجام شد (Smiley and Yan 2009). بدین منظور این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۰ تیمار و سه تکرار در گلدان‌های سه کیلوگرمی (خاک زراعی، کود دامی و ماسه) در گلخانه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران در دی‌ماه ۱۳۹۸، انجام شد (جدول ۱). آبیاری گلدان‌ها به صورت یک‌روز در میان انجام شد. پس از گذشت چهل روز از کاشت بذور، ارزیابی اثر باکتری‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم و افزایش شاخص‌های رشدی گندم در حضور و عدم حضور بیمارگر انجام شد. درصد کنترل بیماری نیز از فرمول ۲ محاسبه شد:

$$\text{درصد کنترل بیماری} = \frac{\text{(شدت بیماری در تیمار اعمال شده} - \text{شدت بیماری در تیمار شاهد}}{\text{شدت بیماری در تیمار شاهد}} \qquad \text{فرمول ۲)}$$

شناسایی مولکولی جدایه برتر

با توجه به نتایج آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به‌دست‌آمده در این پژوهش، جدایه ۳ به‌عنوان جدایه برتر به‌منظور کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم انتخاب شد.

باکتری در محیط NB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رشد داده شد، سپس DNA ژنومی با استفاده از روش فنل/کلروفرم استخراج شد (Kheirandish and Harighi 2015).

تکثیر ژن 16s rRNA جدایه منتخب با روش PCR و با استفاده از آغازگرهای عمومی یوباکتریال FD1 5′ CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT 3′ GAT CCT GGC TC AG و RD1 5′ CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC 3 انجام شد (Weisburg *et al*. 1991). مقایسه شباهت توالی ژن 16s rRNA با استفاده از برنامه BLAST پایگاه داده بانک ژن (NCBI) انجام شد.

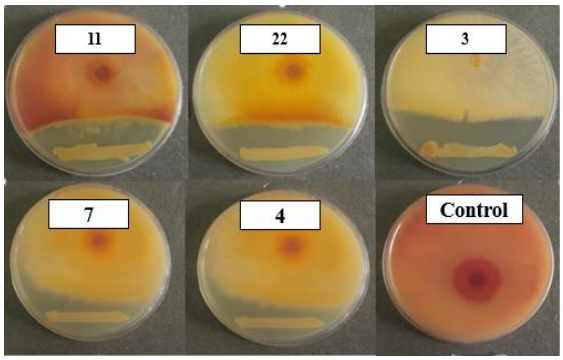
آنالیز نتایج

داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایشات گلخانه‌ای و آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار SAS Version 9.4، تجزیه و تحلیل آماری شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح یک درصد انجام پذیرفت.

نتایج

ممانعت از رشد قارچ *F. pseudograminearum*

تاثیر هشتاد جدایه باسیلوس جداسازی‌شده از ریزوسفر گندم، بر کنترل قارچ *F. pseudograminearum* با استفاده از روش کشت متقابل درون تشتک پتری، مورد ارزیابی قرار گرفت، پنج جدایه باکتریایی درصد مناسبی از کنترل قارچ بیمارگر را نشان دادند، جدایه‌های ۳ و ۱۱ بالاترین درصد کنترل قارچ بیمارگر را داشتند، لذا این پنج جدایه برای ادامه بررسی‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند.



شکل۱. تاثیر جدایه‌های باکتریایی در ممانعت از رشد قارچ *F. pseudograminearum* به روش کشت متقابل

Figure 1. The effect of bacterial isolates on growth inhibition of *F. pseudograminearum* by dual culture method

جدول ۱. مقایسه میانگین درصد ممانعت کنندگی از رشد قارچ *F. pseudograminearum* . توسط جدایه‌های باکتریایی به روش کشت متقابل و ترکیبات فرّار

Table 1. Comparison table of the average percentage of growth inhibition of *F. pseudograminearum* by bacterial isolates by dual culture and volatile compounds

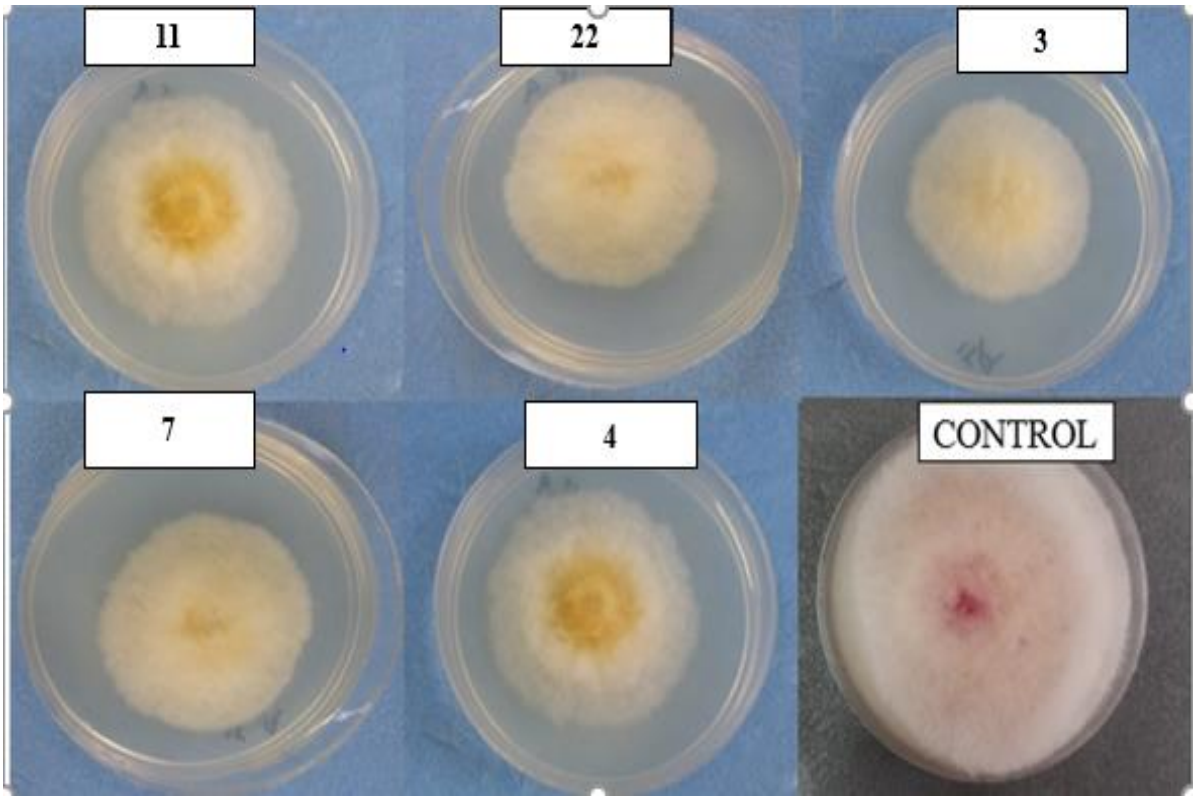
Treatment / Strain	3	4	7	11	22	Control
Control on dual culture (%)	60 a	22.5 c	c 20	a 55	b 37.5	d 0
Control on volatile metabolites (%)	54 a	46 ab	52 a	49 b	48 ab	0 c

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

* Mean in each column with the same letter is not significantly different at P<0.01.

اثر ترکیبات فرّار باکتری علیه *F. pseudograminearum*

در این آزمایش متابولیت‌های فرّار تولید شده توسط جدایه‌های باکتریایی منتخب توانستند از رشد قارچ بیمارگر جلوگیری کنند که به ترتیب جدایه‌های ۳ و ۱۱ بیشترین درصد ممانعت کنندگی از رشد را نشان دادند. همچنین به نظر می‌رسد که اثر این ترکیبات فرّار وابستگی بسیاری به حضور باکتری دارد و این ترکیبات غالبا نقش قارچ ایستایی دارند، چرا که پس از باز شدن درب پتری‌دیش، قارچ بیمارگر مجددا پس از گذشت ۸ روز توانست تمام سطح پتری‌دیش را پر کند.



شکل ۲. تاثیر متابولیت های فرّار جدایه‌های باکتریایی در ممانعت از رشد قارچ *F. pseudograminearum*

Figure 2 .The effect of volatile metabolites of bacterial isolates on growth inhibition of *F. pseudograminearum*

تولید آنزیم‌های خارج سلولی توسط جدایه-های باکتریایی

تولید آنزیم پروتئاز

وجود هاله شفاف در اطراف کلونی باکتری، نشان‌دهنده توانایی باکتری در تولید این آنزیم و تجزیه پروتئین شیر است که در این بررسی هر ۵ جدایه توانایی تولید آنزیم پروتئاز را داشتند.

تولید آنزیم لیپاز

در این بررسی ۵ جدایه تولید کننده آنزیم لیپاز بودند، وجود هاله‌ای شفاف در اطراف کلونی باکتری نشان-دهنده تجزیه لیپید توسط باکتری می‌باشد.

تولید آنزیم کیتیناز

وجود هاله شفاف در اطراف کلونی باکتری، نشان‌دهنده توانایی باکتری در تولید آنزیم کیتیناز است که در این بررسی ۵ جدایه توانایی تولید این آنزیم را داشتند.

تولید آنزیم فسفاتاز

در این آزمایش نیز وجود هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده تولید آنزیم فسفاتاز توسط باکتری است، که در این مطالعه هیچکدام از جدایه‌ها توانایی تولید این آنزیم را نداشتند.

بررسی توانایی تولید متابولیت‌ها و هورمون‌های محرک رشدی

تولید سیدروفور

در این بررسی وجود هاله‌ای نارنجی رنگ فلوئورسنت اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده توانایی باکتری در تولید این ترکیب است، در این بررسی پنج جدایه باکتریایی قادر به تولید سیدروفور بودند.

تثبیت نیتروژن

در این آزمایش پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت باکتری، تغییر رنگ محیط کشت از سبز به آبی نشان-دهنده توانایی باکتری در تثبیت نیتروژن است، در این بررسی سه جدایه: ۳، ۷ و ۱۱ تثبیت کننده نیتروژن بودند.

آزمایشات گلخانه‌ای

پس از گذشت چهل روز از کاشت گندم در گلخانه نسبت به بررسی تاثیر باکتری‌ها روی شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه و همچنین افزایش شاخص‌های رشدی گندم اقدام شد. در تیمار شاهد مثبت (اثبات بیماری زایی)، ۶۹,۳۳ درصد بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه ثبت شد، همچنین در تیمار شاهد منفی (گیاه سالم)، سلامت ریشه و طوقه گیاه کاملا مشهود بود. گیاهان آلوده به آزمایشگاه منتقل شدند و پس از ضدعفونی سطحی و انجام اصول کخ، شناسایی قارچ بیمارگر انجام شد و بیماری‌زایی اثبات شد. در تیمارهای کنترل بیماری (تیمار بذور گندم با جدایه‌های باکتریایی منتخب و حضور قارچ بیمارگر)، جدایه‌های ۳ و ۱۱ به ترتیب با ۸۰,۳۳ و ۶۹,۷۷ دصد کنترل بیماری، بیشترین درصد کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم را در مقایسه با تیمار شاهد مثبت (بیماری‌زایی)، نشان دادند.

در بحث بررسی شاخص‌های رشدی گندم، شاخص-های رشدی گیاهان گندم تیمار شده با باکتری در مقایسه با تیمار شاهد منفی افزایش معنی‌داری داشت و به ترتیب جدایه ۳ و ۱۱ بیشترین افزایش طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و وزن ساقه را نشان دادند. همچنین در گیاهان گندم تیمار شده با جدایه ۳، این جدایه حتی در حضور قارچ بیمارگر توانست موجب افزایش شاخص‌های رشدی گیاه نظیر وزن خشک ساقه و ریشه وطول ریشه در مقایسه با تیمار شاهد منفی

(گیاه سالم) گردد؛ لذا در این مطالعه جدایه شمارهٔ ۳ به عنوان برترین جدایه برای کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم و افزایش دهنده رشد گندم انتخاب شد.

شکل ۳. A، اثبات بیماری‌زایی (شاهد مثبت) قارچ *F. pseudograminearum*، B، گیاهان سالم (شاهد منفی)، C، تاثیر جدایه ۳ در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم

Figure 3 A, Proof of pathogenicity (positive control) of *F. pseudograminearum*, B, Healthy plants (negative control), C, Effect of 3 isolate on control of crown and root rot of wheat

جدول ۲. جدول مقایسه میانگین بذور گندم تیمار شده با جدایه‌های ۳ و ۴ و ۷ و ۱۱ و ۲۲ روی افزایش صفات رشدی گندم و کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم با عامل *F. pseudograminearum*

Table 2. Comparison table of the mean of wheat seeds treated with 3, 4, 7, 11 and 22 isolates on increasing the growth traits of wheat and controlling crown and root rot of wheat with *F. pseudograminearum*

Treatment	Root length (cm)	Stem length (cm)	Root dry (g) weight	Stem dry weight (g)	Disease (%)	Disease control (%)
3	43 a	18.66 a	1.06 a	0.37 a	-	-
4	20 c	13 b	0.48 d	0.16 c	-	-
7	34.66 ab	15.33 a	0.78 b	0.23 b	-	-
11	41.33 a	16 a	0.98 a	0.32 a	-	-
22	33.66 ab	15.66 a	0.86 b	0.29 ab	-	-
3 + Pathogen	31 b	14 ab	0.84 b	0.28 ab	12.33 e	80.33 a
4 + Pathogen	18.66 c	10 c	0.34 de	0.26 b	60.66 a	14.22 d
7 + Pathogen	20.18 c	10.66 c	0.64 bc	0.18 c	27.66 b	60.62 c
11 + Pathogen	28.33 bc	13.33 b	0.79 b	0.23 b	21.66 c	69.77 b
22 + Pathogen	24.41 c	11.33 b	0.63 bc	0.19 c	27.66 b	60.62 c
Pathogen	18.33 c	8.33 d	0.21e	0.05 e	69.33 a	-
Control	38.66 a	15.33 a	0.51 c	0.17 c	-	-

❊ میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

* Mean in each column with the same letter is not significantly different at P<0.01.

شناسایی مولکولی

در نهایت پس از انجام تست‌های مختلف آزمایشگاهی و گلخانه‌ای و ارزیابی نتایج حاصله، جدایه شماره ۳ به عنوان جدایه برتر معرفی گردید و پس از بررسی توالی این جدایه با توالی‌های مشابه در سایت NCBI و رسم درخت فیلوژنتیکی این جدایه با نام *Bacillus subtilis* UTBMS7 و کد دسترسی MW988104 در سایت NCBI ثبت شد.

بحث

قارچ *Fusarium pseudograminearum* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه گندم یکی از عوامل مهم کاهنده تولید گندم در واحد سطح در کشور می‌باشد، با توجه به خاک‌زاد بودن بیماگر و ناکارآمدی سموم شیمیایی در کنترل بیمارگرهای خاک‌زاد، نیاز به استفاده از روش‌های جایگزین بیش از پیش احساس می‌شود. کنترل بیولوژیک بیمارگر با استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک یک روش جایگزین مناسب، ایمن و پایدار است که ضمن کارآمدی با سایر روش‌های مدیریتی مرسوم در کشاورزی پایدار نیز سازگار است (Haas and keel, 2003). استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک که از یک‌سو توانایی بالایی در کنترل بیمارگرها داشته و از طرف دیگر به واسطه تولید متابولیت‌ها و هورمون‌های محرک رشد، می‌توانند موجب افزایش محصول گندم شوند، امیدواری‌هایی در این زمینه ایجاد کرده است. لیکن پیچیدگی‌های روابط میکروبی در خاک، تعاملات بین میکروارگانیسم‌ها و بی‌ثباتی در رفتار عوامل بیوکنترل، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک را با محدودیت‌هایی مواجه کرده است. لذا فرآیند جداسازی و غربالگری عوامل بیوکنترل بسیار حائز اهمیت بوده و جدایه برتر معرفی شده بایستی علاوه بر توانایی بالا در کنترل عوامل بیمارگر بایستی بتواند با تولید هورمون‌ها و متابولیت‌های محرک رشد سبب بهبود رشد گیاه گردد. لذا با توجه به اهمیت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در کشور و نبود یک روش مدیریتی مناسب جهت کنترل این بیماری، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر جدایه‌های باسیلوس ریزوسفر گندم روی قارچ *Fusarium pseudograminearum* انجام شد، از بین ۸۰ جدایه جداسازی شده، به‌ترتیب جدایه‌های ۳، ۱۱، ۲۲، ۴ و ۷ به ترتیب با ۶۰، ۵۵، ۳۷,۵، ۲۲,۲ و ۲۲ درصد بیشترین بازداری را از رشد قارچ بیمارگر در روش کشت متقابل را نشان دادند، لذا این جدایه‌ها جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. در تحقیقات متعدد اثر آنتاگونیستی بالای باکتری‌های باسیلوس در کنترل قارچ‌های بیمارگر به اثبات رسیده است، جدایه BAS23 باسیلوس موجب کنترل بیش از ۵۰ درصدی قارچ‌های بیمارگر برنج شده و باعث کاهش بیش از ۶۰ درصدی وزن خشک میسلیوم قارچ‌های بیمارگر در مقایسه با تیمار شاهد شده است (Saechow *et al*. 2018). در آزمایش مربوط به اثر متابولیت‌های فرّار جدایه‌های ۳، ۷ و ۱۱، به ترتیب با ۵۴، ۵۲ و ۴۹ درصد بیشترین اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر را نشان دادند، همچنین در این بررسی پس از باز شدن درب پتری و قرار دادن قارچ در دمای محیط، قارچ بیمارگر مجددا توانست رشد خود را اغاز کرده و پس از گذشت ۸ روز تمام پتری را پر کند که این امر نشان‌دهنده تاثیر قارچ-ایستایی متابولیت‌های فرّار تولیدی باکتری‌های باسیلوس است و همچنین نشان‌دهنده این امر است که حضور و زنده‌مانی باکتری برای تدام کنترل قارچ بیمارگر ضروری است در بررسی‌های مربوط به تولید سیدروفور جدایه-های منتخب قادر به تولید سیدروفور بودند، لذا در شرایط کمبود آهن باکتری‌ها می‌توانند با تولید سیدروفور مقادیر اندک آهن موجود در محیط را کلاته کرده، از دسترس پاتوژن‌ها خارج کرده و در اختیار خود و گیاه قرار دهند، بنابراین تولید سیدروفور می‌تواند هم به‌عنوان یک محرک رشد عمل کند و هم از طریق مکانیسم رقابت موجب کنترل بیماری گردد (Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani 2021). در آزمون بررسی تثبیت نیتروژن، سه جدایه قادر به تثبیت نیتروژن بودند، نیتروژن یکی از مهمترین عناصر جهت افزایش رشد گندم بوده و نقش مهمی در افزایش عملکرد محصول دارا می‌باشد، لذا با توجه به افزایش قیمت کودهای شیمیایی ازته در سال‌های اخیر و آبشویی بالای این عنصر و همچنین اثرات سوء زیست-محیطی کاربرد کودهای شیمیایی ازته در محیط زیست، قابلیت تثبیت نیتروژن توسط باکتری‌ها از اهمیت ویژه-ای برخوردار بوده و بایستی یکی از معیارهای مهم جهت انتخاب جدایه برتر باشد، همچنین توانایی تثبیت نیتروژن به صورت آزاد (بدون نیاز به تشکیل گره) توسط گونه‌های مختلف جنس باسیلوس استرین UTB96 *Bacillus velezensis*(ساسانی و همکاران، ۱۳۹۹) و همچنین استرین *Bacillus licheniformis* CEW 1W به اثبات رسیده است (Yousuf *et al*. 2017) و طبق بررسی‌های صورت گرفته نشان‌داده شده که باکتری‌هایی که توانایی تثبیت نیتروژن را دارند می‌توانند سبب بهبود

رشد و عملکرد گیاه شوند (Hashem *et al*. 2019)، در آزمایش مربوط به تولید آنزیم پروتئاز، لیپاز و کیتیناز، همه جدایه‌ها قادر به تولید این آنزیم‌ها بودند، یکی از مکانیزم‌های مهم در کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیمارگر تولید آنزیم‌های خارج سلولی است که عمدتا به منظور تخریب دیواره سلولی و غشای پلاسمایی بیمارگر هدف تولید می‌شوند، به‌عنوان مثال کیتین که پلی‌مر اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچ‌های حقیقی است یکی از سخت‌ترین ترکیبات موجود در طبیعت است، آنزیم کیتیناز تولید شده توسط باکتری‌های باسلیوس یکی از مهمترین آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین است. لذا باکتری‌های باسیلوس با تولید این آنزیم موجب تخریب دیواره سلولی قارچ بیمارگر شده و از رشد آن ممانعت به‌عمل می‌آورند (Shoda 2000). بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که قارچ *F. pseudograminearum* قادر به ایجاد بیماری روی گیاه گندم رقم فلات بوده و به شکل معنی‌دار و قابل‌ملاحظه‌ای منجر به پوسیدگی بذر، پوسیدگی طوقه و ریشه و مرگ گیاهچه گندم می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش با نتایج منصوری و پژومند (۱۳۸۴) مطابقت داشت. در بررسی تاثیر باکتری‌ها در کنترل بیماری، بذور گندم تیمار شده با جدایه‌های منتخب درجات مختلفی از شدت بیماری را نشان دادند، جدایه ۳ با ۸۰,۳۳ درصد بیشترین درصد کنترل بیماری را نشان داد، گزارش شده است که، تیمار بذور خیار با استرین *B. subtilis* SQR موجب کاهش شصت درصدی بیماری پژمردگی آوندی خیار ناشی از قارچ بیمارگر فوزاریوم شده است (Cao *et al*., 2011). همچنین در بررسی شاخص‌های رشدی این جدایه موجب افزایش ارتفاع گیاه، طول، ضخامت و حجم ریشه در مقایسه با تیمار شاهد منفی و مثبت شد. که دلیل این امر می‌تواند به‌دلیل توانایی باکتری در تولید هورمون‌های محرک رشد نظیر هورمون اکسین و خصوصا تثبیت نیتروژن باشد، گزارش شده است که کاربرد استرین YL6 موجب افزایش رشد گیاه و محتوای فسفر و نیتروژن در گیاه گندم و سویا شده است که این امر به دلیل افزایش طول و حجم ریشه گیاه به‌واسطه تولید هورمون اکسین و همچنین رشد بهتر گیاه به واسطه محتوای نیتروژن کافی تولید شده توسط باکتری می‌باشد (Ku *et al*., 2018). نکته جالب توجه در ارتباط این جدایه افزایش شاخص‌های رشدی گیاه گندم در مقایسه با تیمار شاهد مثبت حتی در حضور قارچ بیمارگر بود که این امر نشان‌دهنده این موضوع است که این جدایه می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تولید تجاری محصولات و کودهای بیولوژیک جهت افزایش عملکرد گندم در واحد سطح باشد، یکی از دلایل افزایش طول و حجم ریشه گندم می‌تواند مربوط به حضور هورمون اکسین و آنزیم ACC deaminase توسط باکتری باشد، هورمون اکسین نقش بسیار موثری در افزایش طول ریشه داشته و آنزیم ACC deaminase با تجزیه ACC که پیش‌ماده تولید اتیلن است موجب افزایش رشد ریشه می‌شود. تولید اکسین و ACC deaminase در گونه‌های مختلف باسیلوس به اثبات رسیده است (Glick *et al*. 2007) . شواهدی مبنی بر وجود این آنزیم در سویهٔ UTBMS7 وجود دارد که در حال بررسی دقیق است. در ارتباط با افزایش طول و وزن خشک ساقه در مقایسه با تیمار شاهد، افزایش طول ریشه به گیاه کمک می‌کند که مواد غذایی و آب را از قسمت‌های عمیق‌تر خاک جذب کرده و تغذیه بهتری در مقایسه با تیمار شاهد داشته باشد، همچنین تثبیت نیتروژن توسط موجب افزایش محتوای نیتروژن گیاه شده که این امر نقشی کلیدی در بهبود رشد گندم ایفا می‌کند.

REFERENCES

Ahmadzadeh M and Sharifi Tehrani (2021) Plant probiotic bacteria. University of Tehran Press, 629pp.

Alexander DB, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurol S reagent evaluates siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils 12: 39-45.

Bajaj BK, Sharma P (2011) An alkali-thermo tolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2. New Biotechnology 28(6): 725-732.

Buzzini P, Martini A (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. Journal of Applied Microbiology 93(6): 1020-1025.

Cao Y, Zhang, Z, Ling, N, Yuan, Y, Zheng, X, Shen, B. and Shen, Q (2011) *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. Biology and Fertility of Soils 47(5): 495-506.

Cook RJ (2000) Advances in plant health management in the twentieth century. Annual Review of Phytopathology, 38(1): 95-116.

FAO (2018) FAOSTAT Database on Agriculuyre, Food and Agiculture Organization of the United Nation.

Fiddaman PJ, Rossall S (1994) Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology 76(4): 395-405.

Ghazy N, El-Nahrawy S (2021) Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. Archives of Microbiology 203(3): 1195-1209.

Glick WH, Miller CC, Cardinal LB (2007) Making a life in the field of organization science. Journal of Organizational Behavior 28(7): 817-835.

Haas D, Keel C (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology, 41(1): 117-153.

Hashem A, Tabassum B, Abd_Allah EF (2019) *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi Journal of Biological Sciences, 26(6): 1291-1297.

Júnior AG, dos Santos ÁF, Auer CG (2000) Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. Floresta, 30(1-2): 155-166.

Kheirandish Z, Harighi B (2015) Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato. Biological Control 86: 14-19.

Ku, Y, Xu, G, Tian, X, Xie, H, Yang, X. and Cao, C (2018) Root colonization and growth promotion of soybean, wheat and Chinese cabbage by *Bacillus cereus* YL6. PLoS One 13(11), p.e0200181.

Ling N, Xue C, Huang Q, Yang X, Xu Y, Shen Q (2010) Development of a mode of application of bioorganic fertilizer for improving the biocontrol efficacy to *Fusarium* wilt. Biocontrol 55(5): 673-683.

Mansoori B, Pazhomand MA (2005) Field reactions of some wheat advance lines and cultivars to common root and crown rot pathogens in Fars province. Seed and Plant 21(1): 81-91.

Miladiarsi NRM, Widyastuti R (2017) Selection, Characterization and Application of *Rhizobacteria* and its Effect on Chili (*Capsicum annuum* L.) Plant Growth. Research Journal of Microbiology 12: 161-169.

Mueller DS, Nelson RL, Hartman GL, Pedersen WL (2003) Response of commercially developed soybean cultivars and the ancestral soybean lines to *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Plant Disease 87(7): 827-831.

Obanor F, Neate S, Simpfendorfer S, Sabburg R, Wilson P, Chakraborty S (2013) *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* caused the 2010 head blight epidemics in Australia. Plant Pathology 62(1): 79-91.

Saechow S, Thammasittirong A, Kittakoop P, Prachya S, Thammasittirong SNR (2018) Antagonistic activity against dirty panicle rice fungal pathogens and plant growth-promoting activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. Journal of Microbiology and Biotechnology 28(9): 1527-1535.

Safaei D, Younesi H, Shaykh al-Islami M (2012) *Fusarium* species causing root and crown rot of wheat in Kermanshah province. Journal of Plant Diseases 48(2): 265-268.

Sasani M, Ahmadzadeh M (1399) Seed bioprim with *Bacillus velezensis* UTB96 to control the fungal pathogen of root and crown rot (*Fusarium psudograminearum*) and to improve some growth indices of wheat. Iranian Journal of Seed Science and Technology.

Shoda M (2000) Bacterial control of plant diseases. Journal of Bioscience and Bioengineering 89(6): 515-521.

Smiley RW (2009) Water and temperature parameters associated with winter wheat diseases caused by soilborne pathogens. Plant Disease 93(1): 73-80.

Smiley RW, Yan H (2009) Variability of *Fusarium* crown rot tolerances among cultivars and lines of spring and winter wheat. Plant Disease 93: 945-961.

Sperber JI (1958) The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research 9(6): 778-781.

Thammasittirong SNR (2016) In vitro Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* BAS114 against *Curvularia lunata*. Advances in Environmental Biology 10(1): 176-183.

Wagacha JM, Muthomi JW (2007) *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. Crop Protection 26: 877-885.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173(2): 697-703.

Yazdanparast R (1993) Screening for starch-hydrolysing bacteria. Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI) 7(1): 35-41.

Yousuf J, Thajudeen J, Rahiman M, Krishnankutty SP, Alikunj A, Abdulla MH (2017) Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. Journal of Basic Microbiology 57(11): 922-932.