جداسازی و بررسی برخی خصوصیات محرک رشدی باکتری‌های متحمل به نمک مولد پلیمر از خاک‌های شور

مریم طالبی اتوئی*[۱]، محسن علمائی[۲]، رضا قربانی نصرابادی[۳]، سید علیرضا موحدی نائینی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۱)

چکیده

گسترش شوری چالش بزرگی در بیشتر خاک‌های زراعی مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌باشد. اخیراً استفاده از روش‌های زیستی همانند استفاده از ریزجانداران خاکزی به منظور کاهش اثرات زیان‌بار شوری بر گیاهان، اهمیت زیادی پیدا کرده است. در این مطالعه سعی شده است باکتری‌های متحمل به نمک از خاک‌های شور جداسازی گردند و خصوصیات محرک رشدی آنها همانند توانایی تولید اکسین، سیدروفور، سیانیدهیدروژن، مقاومت به خشکی و آزادسازی فسفر و پتاسیم از منبع نامحلول معدنی، بررسی شود. از بین ۲۰ جدایه متحمل به نمک مولد پلیمر، بر اساس آزمون خاصیت محرک رشد گیاه، در نهایت دو جدایه شماره ۱۷ و ۵ به‌عنوان جدایه برتر انتخاب شدند. نتایج نشان داد که میانگین تولید پلیمر از ۰/۸ تا ۴/۲ گرم بر لیتر متغیر بود و بیشترین آن در جدایه ۱۷ به دست آمد. اکثر جدایه‌ها قادر به تولید هاله نارنجی در محیط CAS-Agar بودند که بیشترین مقدار سیدروفور در جدایه ۵ با نسبت قطر هاله به کلنی برابر با دو مشاهده شد. بیشترین میزان تولید اکسین در جدایه شماره ۱۷ با مقدار ۸/۱۴ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. همچنین این جدایه بالاترین توانایی آزادسازی پتاسیم معدنی با مقدار ۱۲/۲ و ۱۸/۶۲ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب در حضور و عدم حضور نمک داشت. اغلب جدایه‌ها مقاومت به خشکی در سطح ۲ و ۵ بار از خود نشان دادند. بیشترین مقاومت به خشکی در سطح ۱۵بار در جدایه شماره ۱۷ و ۵ به‌ترتیب با ۵۵/۶ و ۵۳/۲ درصد کاهش رشد نسبت به محیط بدون تنش مشاهده شد. آزمایش‌های تعیین ترادف ژنی ۱۶SrRNA نشان داد که جدایه ۱۷ به میزان ۹۹/۴ درصد با سویه *Bacillus licheniformis* DSM13 و جدایه ۵ به میزان۹۹/۵۷ درصد با سویه *Bacillus megaterium* NBRC 15308 قرابت فیلوژنی دارند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، پلی‌ساکارید، مقاومت به خشکی

۱- دانشجوی دکتری علوم خاک، گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (مکاتبه کننده)
۲- دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
*پست الکترونیک: mta_soil84@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

شوری فرآیندی در حال گسترش بوده که بخش اعظم خاک‌های زراعی مناطق خشک ایران با این مشکل مواجه هستند. اثرات منفی شوری بر رشد گیاه از طریق یون‌های سمی همانند کلر و سدیم، تولید اتیلن، پلاسمولیز، ممانعت از فتوسنتز و جوانه‌زنی بذرها، کاهش رشد، گلدهی و تشکیل میوه اعمال می‌شود (Sunkar, & Bartels 2005). امروزه بدلیل هزینه‌های بالای مواد اصلاح‌کننده شیمیایی و در برخی مواقع آلودگی‌های ناشی از کاربرد این مواد، سعی بر آن است تا بهره‌برداری از اراضی شور با بکارگیری روش‌های زیستی انجام شود. ریزجانداران از روش‌هایی مانند افزایش انحلال عناصر غذایی کم‌محلول، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور، تولید اکسین، تولید آنزیم ACC- دآمیناز، محدود کردن جذب سدیم، افزایش چرخه آب و بهبود تنظیم اسمزی و تجمع پرولین در گیاه، موجب افزایش رشد گیاه و کاهش اثرات تنش شوری در محصولات کشاورزی می‌شوند (Grover *et al*., 2011).

اکسین نقش اصلی در گسترش ریشه بازی می‌کند و برخلاف اتیلن می‌باشد. بنابراین، مدیریت تولید اکسین در ریزجانداران اندوفیت در گیاهان شورپسند یک ابزار مهم در ایجاد تحمل به شوری می‌باشد. باکتری‌های محرک رشد گیاه قادر به انحلال ترکیبات معدنی کم محلول مانند فسفر می‌باشند که از طریق تولید اسیدهای آلی، اسیدهای معدنی و ترشح پروتون، موجب کاهش pH ریزوسفر شده و باعث افزایش قابلیت دسترسی عناصر برای گیاه می‌شوند (Sundra *et al*., 2002). سیدروفورها ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که توسط ریزجانداران خاک ترشح می‌شوند و با میل ترکیبی شدید و اختصاصی که برای کمپلکس شدن با آهن سه ظرفیتی دارند، باعث افزایش فراهمی آهن قابل دسترس برای گیاه می‌شوند (Milagers *et al*., 1999). همچنین تولید سیانیدهیدروژن یکی از روش‌های کنترل زیستی توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌باشد (Bagnasco *et al*., 1998).

باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها، همانند قارچ‌ها قادر به انطباق با طیف وسیعی از تغییرات در افزایش اسمولاریته خارجی از طریق بیوسنتز پلیمرها، اگزوپلی‌ساکاریدها، هورمون‌های گیاهی و آنزیم‌ها می‌باشند. سازوکارهایی که ریزجانداران قادر به رشد و زنده ماندن در زیستگاه‌های شور هستند، عمدتا در میان گونه‌های مختلف مشابه است. راهکارهای اصلی شامل اجتناب از غلظت زیاد نمک از طریق غشاء مخصوص یا ترکیبات دیواره سلولی، پمپاژ یون ازسلول‌های با فرآیند خارج کردن نمک، تطابق محیط داخل سلول آنها با جمع آوری اسمولیت‌های آلی غیر سمی و تطابق پروتئین‌ها و آنزیم با غلظت‌های بالای یون‌های املاح می‌باشد (Ruppel *et al* , 2013).

ریزجانداران مقاوم به نمک و نمک دوست، پتانسیل بالایی در زمینه‌های مختلف زیست فناوری را دارند. تولید انواع متابولیت‌ها، بیوپلیمرها نظیر بیوسورفاکتانت، اگزوپلی‌ساکارید و آنزیم‌های هیدرولازی پایدار و فعال در مقادیر بالای نمک، تجزیه ماکرومولکول‌های گوناگون، پالایش زیستی و سوخت‌های زیستی، از زمینه‌های کاربرد این گروه از ریزجانداران می‌باشند (Oren, 2010). اگزوپلی‌ساکاریدها به‌دلیل داشتن مقادیر بالای گروه‌های عاملی اسید اورونیک، کربوکسیلیک اسید و سولفات، تمایل بالایی برای تشکیل پیوند با کاتیون‌ها و فلزات سنگین دارند. این گروه‌های عاملی به عنوان لیگاند برای کاتیون‌هایی همانند Fe در محیط‌های آبی عمل کرده و منجر به افزایش جمعیت میکروبی به دلیل فراهم کردن عناصر غذایی مورد استفاده آنها می‌شوند (Mancuso Nichols *et al*., 2005). همچنین اگزوپلی‌ساکارید با اتصال به یون‌های فلزی از محیط خارجی، می‌تواند به مصرف یون‌های سدیم از محیط شور کمک کند (Lloret *et al*, 1998). افزایش رشد اغلب ریزجانداران در شرایط شور به‌دلیل توانایی آنها در افزایش دسترسی و جذب نیتروژن، کربن و مواد معدنی می‌باشد. ریزوباکتری‌ها در گیاهان نمک دوست می‌توانند با تولید اگزوپلی‌ساکارید و تشکیل غلاف ریزوسفری در ایجاد شرایط مناسب برای باکتری‌های احیاکننده نیتروژن (Bergmann *et al*., 2009)، تثبیت نیتروژن اتمسفری و فراهمی آمونیوم برای فرآیندهای متابولیک گیاهی و نیز غنی سازی کربن و نیتروژن (Nabeel *et al*., 2010)، نقش داشته باشند. با توجه به اهمیت باکتری‌های نمک‌دوست و متحمل به نمک در کاهش اثرات منفی شوری در گیاه از طریق تولید مواد محرک رشد گیاه و پلی‌ساکاریدها، در این مطالعه سعی بر جداسازی و مطالعه جدایه‌های توانمند

Archive of SID

www.SID.ir

محرک رشد گیاه بومی مناطق شور برای تهیه زادمایه‌های میکروبی سازگار با شرایط شور برای رشد بهتر گیاهان و پیشبرد اهداف کشاورزی پایدار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های متحمل به نمک مولد پلیمر

برای جداسازی باکتری‌های نمک دوست مولد پلیمر (پلی‌ساکارید) از ۱۵ منطقه از خاک‌های شور استان گلستان نمونه برداری شد (جدول ۱). پس از تهیه سری‌های رقت از خاک، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده بر روی ظروف پتری حاوی آگار مغذی+ ۵ درصد نمک (گرم بر لیتر: ۲ yeast extract, ۱ beef extract, ۵ peptone, ۴۰/۵ NaCl, ۴/۸۵ $MgSO_4.7H_2O$, ۳/۵ $MgCl_2.6H_2O$, ۱ KCl, ۰/۱۸ $CaCl_2.2H_2O$, ۰/۰۱۳ NaBr, ۰/۰۳ $NaHCO_3$, آگار ۱۵) (Rodriguez-Valera *et al.*, 1981)، تلقیح و کلنی‌های ناهمانند از نظر ظاهری و سرعت رشد انتخاب، جداسازی و خالص سازی شدند. جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک، تولید پلیمر و خاصیت محرک رشد گیاه غربالگری گردیدند.

جدول ۱- برخی خصوصیات خاک‌های مورد مطالعه

Table 1. Some properties of studied soils

(Soil number)	(MPN)	OC %	pH	EC ($dS\ m^{-1}$)
1	1.3×10^5	0.73	7.6	5.45
2	1.3×10^5	0.93	7.7	86.63
3	1.3×10^5	0.65	7.5	14.00
4	2.2×10^4	0.44	7.5	121.0
5	3.3×10^5	0.48	8.6	14.83
6	3.0×10^6	0.63	8.1	11.32
7	7.9×10^5	0.96	7.8	16.47
8	6.0×10^5	0.93	7.6	4.93
9	2.2×10^5	0.54	7.4	12.70
10	3.0×10^5	0.80	7.7	11.70
11	4.0×10^5	0.30	8.2	18.01
12	3.9×10^5	0.45	7.9	9.42
13	1.2×10^6	0.65	7.6	10.72
14	3.0×10^5	0.41	7.8	21.75
15	6.0×10^4	0.81	7.6	31.11

توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک

محیط کشت مایع مغذی دارای صفر، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد نمک NaCl تهیه شد و از جدایه‌های باکتریایی مورد نظر سوسپانسیونی با جمعیت تنظیم شده cfu $۱/۵\times۱۰^۸$ بر روی این محیط‌ها کشت شد. میزان کدورت ناشی از رشد با جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر سنجیده شد.

اندازه‌گیری مقدار پلیمر

برای بررسی تولید پلی‌ساکارید، از محیط کشت تغییریافته(Moraine & Rogovin, 1966) MY (گرم بر لیتر: Glucose,۱۰؛ yeast extract, ۳؛ malt ۳؛ extract, ۵؛ peptone, ۴۰/۵؛ NaCl, ۴/۸۵؛ $MgSO_4.7H_2O$, ۳/۵ ؛ $MgCl_2.6H_2O$, ۱ ,KCl؛ ۰/۱۸, $CaCl_2.2H_2O$, ۰/۰۱۳ NaBr,؛ ۰/۰۳ $NaHCO_3$, استفاده شد(Rodrguez-Valera *et al.*, 1981) . ارلن‌ها حاوی محیط کشت پس از تلقیح با جدایه‌ها با جمعیت تنظیم شده cfu $۱/۵\times۱۰^۸$، به میزان ۱درصد به مدت ۵ روز در گرمخانه شیکردار در دمای ۳۲ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. سپس محتویات محیط کشت در دمای ۴ درجه سلسیوس و دور (۱۴۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه) سانتریفیوژ شد. یک حجم از صاف شده محیط کشت با سه حجم الکل اتانول ۹۶ درصد مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد تا رسوب پلیمر ته‌نشین شود. رسوب باقیمانده به مدت یک شب در آون با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا خشک شود. سپس وزن خشک این رسوب اندازه‌گیری شد و به عنوان میزان

Archive of SID
www.SID.ir

تولید پلیمر در یک لیتر از محیط کشت صاف شده محاسبه شد.

آزمون‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه (PGP)

توانایی تولید سیدروفور: آزمون نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور با استفاده از محیط کشت Cas-Agar انجام گرفت. این محیط بر اساس روش اصلاح شده الکساندر و زوبرر (Alexander & Zuberer, 1991) تهیه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به روش لکه-گذاری روی پلیت‌ها تلقیح شد. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری‌ها و بعد از گذشت ۱۲۰ ساعت ارزیابی گردید.

اندازه‌گیری کمی توان تولید اکسین (IAA): اندازه‌گیری توان تولید اکسین با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف سالکوفسکی انجام گرفت. برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت یکسان برای تلقیح ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط مایع مغذی حاوی L-Tryptophane با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (در تیمارهای شوری با ۵ درصد نمک سدیم کلرید) استفاده شد. از ارلن‌های مذکور بعد از ۷۲ ساعت نمونه‌گیری شد و پس از گذراندن مراحل سانتریفیوژ، محلول شفاف رویی به آرامی جدا و یک میلی‌لیتر از این محلول به دو میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (۲ میلی‌لیتر محلول نیم مولار $FeCl_3$ و ۹۸ میلی‌لیتر $HClO_4$ ۳۵ درصد) افزوده شد. بعد از ۲۰ دقیقه، شدت رنگ تولید شده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان اکسین تولیدی با مقایسه شدت جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید (IAA) محاسبه گردید (Patten & Glick, 1996).

اندازه‌گیری کمی توان حلالیت فسفر معدنی نامحلول: به منظور اندازه‌گیری میزان حلالیت فسفر در محیط مایع، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط اسپربر (شامل گرم بر لیتر: ۱۰ Glucose، ۰/۵ $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵ NaCl، ۰/۵ KCl، ۰/۱ $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۵ $MnSO_4.7H_2O$، ۰/۵ $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۵ Yeast extract، ۵ $Ca_3(PO_4)_2$، (در تیمارهای شوری با ۵ درصد نمک سدیم کلرید) منتقل گردید. نمونه‌ها به مدت ۹۶ ساعت بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم‌مولیبدات‌وانادات مخلوط و میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان حلالیت فسفر توسط باکتری با مقایسه جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف KH_2PO_4، محاسبه گردید (Sperber, 1958).

اندازه‌گیری سیانید هیدروژن: ابتدا جدایه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط آگار مغذی غنی شده با گلایسین (۴/۴گرم در لیتر) کشت داده شدند. سپس کاغذ صافی‌های خیسانده شده در پیکرات‌سدیم (پیکریک اسید ۰/۵ درصد و کربنات سدیم ۲درصد) در قسمت داخلی درب پلیت گذاشته شد. پلیت‌ها به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی گردید. تغییر رنگ کاغذ صافی‌ها به ترتیب از کرم (تولید HCN کم)، قهوه‌ای روشن (تولید HCN متوسط)، قهوه‌ای تیره (تولید HCN زیاد)، آجری (تولید HCN خیلی زیاد) متغیر بود که به ترتیب با درجه بندی ۱ تا ۴ مشخص شد (Donate-Correa *et al.*, 2004).

اندازه‌گیری کمی توان حلالیت پتاسیم معدنی نامحلول: پس از یکسان سازی جمعیت، به مقدار ۱ میلی‌لیتر از کشت تازه باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر به محیط الکساندروف (بر حسب گرم بر لیتر: ۵ Sucrose، ۰/۵ $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱ $CaCO_3$، ۰/۰۰۵ $FeCl_3$، ۰/۰۰۲ $NaHMoO_4$، ۵ Muscovite، آب مقطر ۱۰۰۰میلی‌لیتر و pH=7، (در تیمارهای شوری با ۵ درصد نمک سدیم کلرید) با سه تکرار تلقیح شد. مقدار پتاسیم آزاد شده از مسکوویت پس از ده روز در محلول رویی سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) شده با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر مدل (Model PFP7 Flame Photometer) اندازه‌گیری شد (Savostin, 1971).

Archive of SID

www.SID.ir

آزمون کمی مقاومت به خشکی

به منظور ارزیابی میزان تحمل جدایه‌ها به سطوح مختلف خشکی از محیط کشت مایع مغذی حاوی مقادیرمختلف پلی اتیلن گلیکول (PEG) ۶۰۰۰ استفاده شد. مقادیر صفر، ۱۴۷/۴۱، ۲۰۸/۲۷، ۳۰۳/۲۱، ۳۲۶/۱۷ گرم پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) ۶۰۰۰ در هر لیتر محیط کشت به‌ترتیب برای ایجاد پتانسیل‌های آبی معادل صفر، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ بار استفاده شد (Michel &Kaufmann, 1973). ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت با جمعیت تنظیم شده cfu $۱۰^{۸}\times$ ۱/۵ مایه‌زنی شده و بر روی شیکر دورانی با چرخش معادل ۱۲۰ دور در دقیقه و به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. میزان رشد جدایه‌ها در سطوح مختلف خشکی با اندازه-گیری چگالی نوری محیط رشد آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر، توسط اسپکتوفتومتر تعیین و درصد کاهش رشد هر جدایه در سطوح مختلف پلی‌اتیلن‌گلیکول در مقایسه با میزان رشد همان جدایه در محیط مایع مغذی (سطح صفر) محاسبه گردید (Michel & Kaufmann, 1973).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها با روش تکثیر 16S rRNA

به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی، از روش استاندارد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جدایه‌های مورد نظر و با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) و 1492R (ACGGGCGGTGTGTRC)، برای تکثیر DNA استفاده شد. خوانش توالی‌های باکتری‌های منتخب و مقایسه آنها با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعات ژنومی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با استفاده از برنامه BlastN انجام شد.

تجزیه آماری داده‌ها: در این تحقیق، آزمایش‌ها به-صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار آنجام شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین نیز با آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel نسخه 2010 صورت گرفت.

نتایج و بحث

جداسازی جدایه‌های متحمل به نمک مولد پلیمر

برای به‌دست آوردن جدایه‌های متحمل به نمک مولد پلیمر، ابتدا جدایه‌ها بر اساس میزان تحمل به نمک و توانایی تولید پلیمر در محیط جامد و مایع غربالگری شدند. در غربالگری اولیه، ۶۶ جدایه متحمل به نمک از محیط آگار مغذی + ۵ درصد نمک جداسازی شدند که از بین آنها، ۲۰ جدایه توانایی بالاتری در تولید پلی‌ساکارید در محیط جامد MY+ ۵ درصد نشان دادند. جدول (۲) درصد بهینه نمک برای رشد ۲۰ جدایه انتخاب شده از مرحله غربالگری اولیه را نشان می‌دهد. تعیین درصد بهینه نمک برای هر جدایه باکتری از طریق اندازه‌گیری میزان کدورت حاصل از رشد (چگالی نوری) در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد. همانطور که جدول (۲) نشان می‌دهد، اکثر جدایه‌ها توانایی رشد در غلظت‌های صفر، ۲/۵ و ۵ درصد نمک را به‌خوبی دارا بوده و در برخی جدایه‌ها با افزایش شوری تا ۵ درصد، رشدشان افزایش یافت. سپس کاهش و بیشتر جدایه‌ها با افزایش شوری تا ۱۰ درصد همچنان قادر به رشد و تعدادی کمی قادربه رشد در ۱۵ درصد نمک بودند.

گونتیا و همکاران (Gontia *et al*., 2011) گزارش دادند سویه *Brachybacterium saurashtrense* sp. Nov جدا شده از ریشه گیاه نمک دوست سالیکورنیا، قادر به رشد در کلرید سدیم ۰/۶۸مولار بود. مطالعه فنوتیپی ۱۳۴ جدایه باکتری‌های مولد اگزوپلی‌ساکارید جداشده از مناطق با شوری بالا نشان داد که جدایه غالب آنها میله-ای شکل، گرم منفی با متابولیسم تنفسی هستند که به جنس هالوموناس تعلق داشتند (Jose Marti´nez-Ca novas *et al*., 2004). همچنین بیبی و همکاران (Bibi *et al*., 2011) گزارش دادند باکتری گرم منفی اندوفیت YC6886 *Haloferula luteola* sp. Nov قادر به رشد در کلرید سدیم ۳۰۰-۵۰۰ میلی‌مولار بود. همچنین پاول و همکاران (Paul *et al*., 2014) گزارش کردند باکتری *Azotobacter chroococcum* توانایی رشد در ۰/۳ -۱/۵ مولار نمک داشت، گرچه شوری باعث کاهش رشد این باکتری شده بود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- میزان رشد جدایه‌های باکتری درسطوح مختلف نمک

Table 2. The growth rate of bacterial isolates in different salinity levels

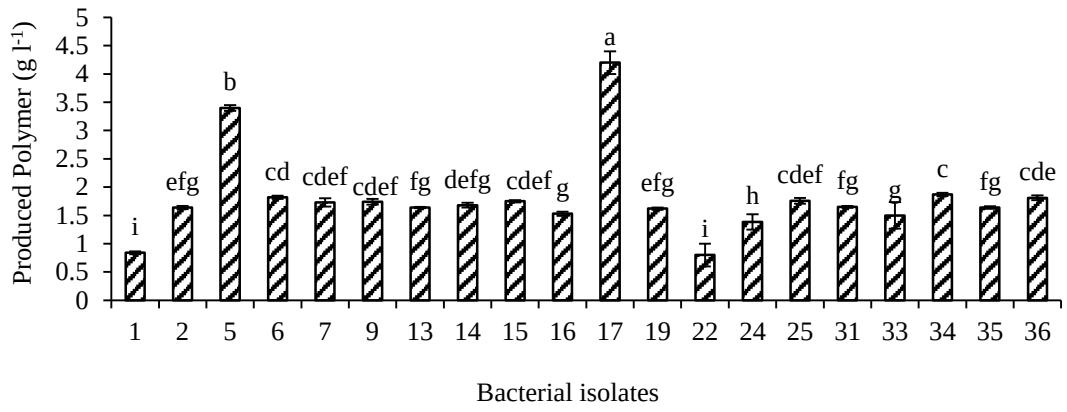
Isolates	Different levels of NaCl (%)				
	0	2.5	5	10	15
1	0.98	0.88	0.50	0.01	0.00
2	1.12	1.99	1.48	1.01	0.03
5	1.68	2.00	1.99	1.02	0.08
6	1.12	1.02	1.38	1.12	0.07
7	0.66	1.19	2.03	1.42	0.07
9	0.98	1.89	1.56	1.43	0.07
13	1.43	1.52	1.23	0.95	0.07
14	1.78	1.39	1.24	0.24	0.09
15	1.78	1.46	1.24	0.46	0.00
16	0.47	1.34	1.45	0.76	0.07
17	0.96	1.26	1.52	0.70	0.09
19	0.89	1.49	1.33	0.40	0.08
22	0.43	0.87	1.07	1.32	0.05
24	1.95	1.42	1.28	0.06	0.01
25	0.65	1.29	1.36	0.76	0.04
31	1.76	2.03	1.82	0.05	0.01
33	1.65	1.98	1.33	0.21	0.00
34	0.96	1.98	0.54	0.23	0.08
35	0.53	0.97	1.00	1.12	0.07
36	1.98	1.78	1.11	0.56	0.09

توانایی تولید پلی‌ساکارید

توانایی تولید پلی‌ساکارید جدایه‌های غربالگری شده از مرحله قبل از طریق مقایسه نوع کلنی تشکیل شده در محیط نمکی MY نسبت به محیط بدون قند سنجیده شد. ۲۰ جدایه باکتریایی قادر به تشکیل کلنی‌هایی موکوئیدی، آبدار و چسبنده در محیط MY نسبت به محیط بدون قند (آگارمغذی+ ۵ درصد NaCl) بودند. مطابق شکل (۱)، دامنه مقدار پلیمر استخراج شده از یک لیتر محیط کشت بین ۴/۲-۰/۸ گرم بوده است. این مقادیر با تغییر منبع کربنی محیط، درصد نمک، نوع نمک، دما، pH و ... متفاوت بوده است. بوچروتروچ و همکاران (Bouchotroch *et al*., 2000) گزارش دادند که سویه بایروهالینا (جدایه باکتری نمک دوست نسبی) جداسازی شده از زیستگاه‌های شور، حدود ۱/۶-۰/۸گرم در لیتر اگزوپلی‌ساکارید تولید کرد. خصوصیات قابل توجه این پلیمرها توانایی آنها در افزایش ویسکوزیته محلول در مقادیر pH کم و امولسیون کنندگی ترکیبات مختلف هیدروکربن است. کمیت اگزوپلی‌ساکاریدهای تولیدی، ترکیبات شیمیایی و خصوصیات فیزیکی آنها، بستگی به سویه باکتری‌ها دارد. نتایج قوراشی و صابر (Qurashi & Sabri, 2012) نشان داد پتانسیل تشکیل بیوفیلم و EPS تولیدی در سطوح متفاوت شوری برای گونه‌های مختلف باکتری متفاوت است. به‌طور کلی حضور EPS در بیوفیلم باکتری منجر به کلنیزاسیون بهتر ریشه گیاه در شرایط شور می‌شود. اهمیت پلی-ساکاریدهای خارج‌سلولی درکاهش تنش شوری به‌وسیله یوشیمورا و همکاران (Yoshimura *et al*., 2012) تأیید شده است. این پژوهشگران بیان داشتند که تغییر در نسبت ترکیبات قند در پلی‌ساکارید خارج سلولی در سیانوباکتر *Nostoc* sp، به‌طور چشمگیری در شرایط تنشی سدیم کلرید نسبت به شرایط محیطی بدون تنش تغییر یافته بود. اگزوپلی‌ساکارید به‌عنوان سازوکاری برای حفاظت ریشه از غلظت زیاد نمک در گیاه و باکتری‌های کلنیزه کننده ریشه تولید می‌گردد. برخی گیاهان هالوفیت ترکیبی از اگزوپلی‌ساکارید ویسکوز موسوم به موسیلاژ را تولید می‌کنند که دارای ظرفیت بالای پیوند با آب در آوندهای چوبی ساقه و ریشه می‌باشد و به-عنوان ذخایر آبی در زمان مواجه شدن با شوری عمل می‌کنند. تولید موسیلاژ در هالوفیت *Kosteletzkya virginica*به‌طور مثبتی وابسته با سطوح نمک می‌باشد (Ghanem *et al*., 2010).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- ولید پلیمر (پلی‌ساکارید) درجدایه‌های باکتریایی مختلف

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 1. Exopolymer (Exopolysaccharide) production by different bacterial isolates

Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $P < 0.05$

نسبت قطر هاله سیدروفوری به کلنی

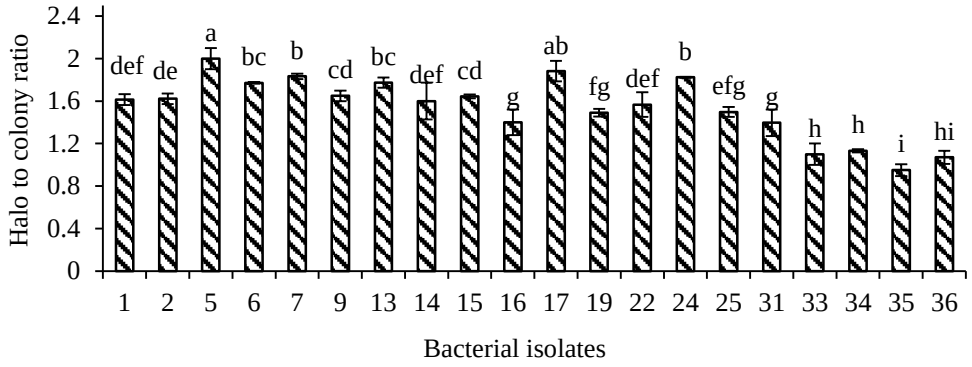
توانایی تولید سیدروفور بر اساس شاخص نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش، بین ۰/۹۵ تا ۲ بود که بیشترین مقدار آن در جدایه شماره ۵ مشاهده شد (شکل۲). نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که میزان تولید سیدروفور در ۲۰ جدایه مورد آزمایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار بوده است ($P<0.01$). بررسی توان تولید سیدروفور در۲۰ جدایه مورد بررسی نشان می‌دهد بیشتر جدایه‌ها قادر به رشد درمحیط CAS-Agar هستند و توانایی تولید سیدروفور را دارند. نتایج تحقیق شیلو و همکاران (Shilev *et al.*, 2012) نیز نشان داد تنش شوری در گیاه آفتابگردآن تا حدی با تلقیح سویه‌های سودوموناس از طریق تولید ایندول‌ها و سیدروفورها کاهش یافت.

توانایی تولید اکسین

نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که بین جدایه‌ها، سطوح شوری و اثر متقابل آنها در تولید اکسین اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.01$). مقایسه میانگین بین جدایه‌ها نشان داد بیشترین مقدار مربوط به جدایه شماره ۱۷ با ۸/۱۴ و کمترین در جدایه شماره ۲۵ با ۰/۶۴ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (شکل۳). تولید اکسین در حضور ۵ درصد نمک کلرید سدیم در بیشترجدایه‌ها کاهش و برخی افزایش یافته است که این تغییرات را می‌توان مربوط به سازوکار متفاوت جدایه‌ها در مواجهه با تنش و توانمندی رشد آنها را در غلظت‌های مختلف مرتبط دانست. جدایه‌های شماره ۱۷ و ۵ بیشترین مقدار را نسبت به سایر جدایه‌ها در محیط بدون نمک و ۵ درصد نمک سدیم کلرید نشان دادند. نتایج پانوار و همکاران (Panwar *et al.* , 2016) نشان داد با افزایش شوری تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، باعث افزایش تولید هورمون اکسین، انحلال فسفر و تولید آنزیم ACC- دآمیناز در باکتری متحمل به نمک *Pantoea dispersa* (PSB3) شده است.

همچنین پاول و همکاران (Paul *et a*l., 2014) گزارش کردند باکتری *Azotobacter* سویه H11 و A32 بیشترین مقدار اکسین را تولید کردند که با افزایش غلظت نمک تا ۰/۳ مولار، مقدار اکسین تولید شده در سویهH11 افزایش، اما در سویه H12 کاهش یافت. تیواری و همکاران (Tiwari *et al*, 2011) ریزو باکتری های متحمل به شوری مولد اکسین جنس‌های (*Nitrinicola lacisaponensis, Pseudomonas mendocina Arthrobacter* sp., *Bacillus pumilus, Halomonas* را از مکانهای بسیار شور جداسازی کردند و نتایج آنها نشان داد تلقیح گندم با باکتری‌های متحمل به شوری مولد اکسین، سبب افزایش رشد گندم در خاک‌های متأثر از شوری شده است (Tiwari *et al,* 2011).

Archive of SID
www.SID.ir

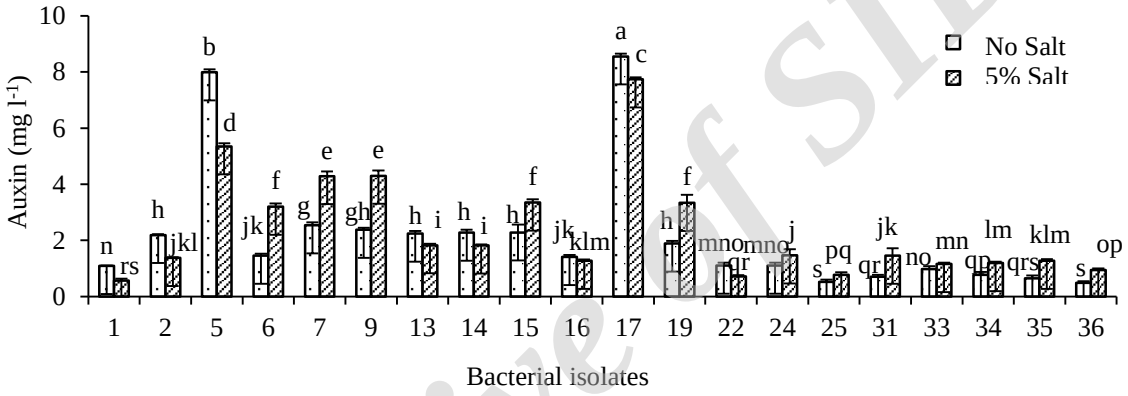


شکل ۲- نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه‌های باکتریایی مختلف در محیط CAS آگار

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 2. The ratio of halo to colony in different bacterial isolates in CAS Agar medium

Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P < 0.05



شکل۳- تولید اکسین در جدایه‌های باکتری در حضور و عدم حضور نمک

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 3. Auxin production by bacterial isolates in presence/absence of salt

Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P < 0.05

توانایی انحلال فسفر معدنی

نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که بین جدایه‌ها، سطوح شوری و اثر متقابل آنها در انحلال فسفر اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0.01). بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین توانایی انحلال فسفات معدنی به مقدار ۱۲۷/۱ در باکتری شماره ۲۲ مشاهده شد (شکل۴). با افزایش شوری در محیط، انحلال فسفر معدنی توسط برخی جدایه‌ها کاهش یافته است. اما برخی جدایه‌ها در محیط شور همچنان قادر به انحلال مقادیر بالای فسفر بودند (جدایه‌های شماره ۲۲ و ۲۵). هو و همکاران (Hu *et al.*, 2006)، نشان دادند که باسیلوس‌ها با ساخت اسیدهای آلی و منابع کلاته کننده، در تولید فسفر محلول خاک موثر بودند. در غربالگری از ۱۲۹ باکتری با توانایی انحلال کانی سنگ فسفات، سویه *Oceanobacillus picturae* با توانایی انحلال ۹۷٪ از این عنصر به‌عنوان سویه برتر شناخته شد (El-Tarabily &Youssef, 2010)که این فعالیت عامل مهمی در کاهش اثرات منفی شوری در رشد گیاه است.

توانایی تولید سیانیدهیدروژن

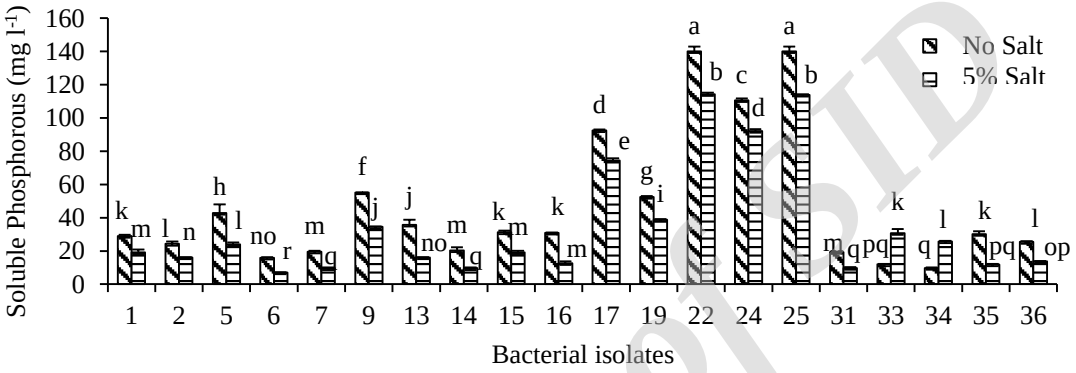
از ۲۰ جدایه انتخاب شده از غربالگری اولیه، تنها ۵ جدایه (۱۷، ۱۵، ۱۳، ۱۹ و ۳۴) قادر به تولید سیانید هیدروژن به مقدار خیلی زیاد (آجری رنگ) و دو جدایه (۳۶ و ۳۳) به مقدار زیاد (قهوه‌ای تیره) بودند. توانایی تولید سیانیدهیدروژن یکی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیک توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه می باشد که به کنترل گیاه نسبت به بیماری‌ها از طریق مختل نمودن سیستم تنفسی قارچ‌های بیماریزا موجب توقف

Archive of SID
www.SID.ir

رشد گردیده، ولی بر روی دیگر جوامع میکروبی خاک یا گیاه تأثیر سو نداشته و باعث رشد بهتر گیاه در خاک مخصوصا خاک‌های شور می‌شود (Bagnasco *et al*, 1998).

توانایی انحلال پتاسیم معدنی نامحلول

ریزجانداران حل‌کننده پتاسیم نقش مهمی در تأمین پتاسیم از طریق معدنی کردن پتاسیم نامحلول بر عهده دارند. ریزجانداران از طریق تولید اسید آلی، سیدروفور و پلی‌ساکارید، حلالیت پتاسیم از فرم‌هایی مانند میکا، فلدسپات و دیگر کانی‌ها را امکانپذیر می‌کنند. نتایج تجزیه داده‌ها نشان داد که جدایه‌ها، سطوح شوری و اثر متقابل آنها در انحلال پتاسیم معنی‌دار است ($p<0.01$). مقایسه میانگین انحلال پتاسیم جدایه‌های باکتریایی (شکل ۵) در سطوح مختلف شوری نشان داد که بیشترین مقدار پتاسیم در جدایه شماره ۱۷ با مقدار ۱۸/۶۲ مشاهده شد. در محیط شور نیز بالاترین مقدار پتاسیم آزاد شده را نسبت به بقیه جدایه‌ها از خود نشان داده که احتمالاً می‌توان آن را به قابلیت‌های سازگاری رشد در درصدهای مختلف نمک نسبت داد.

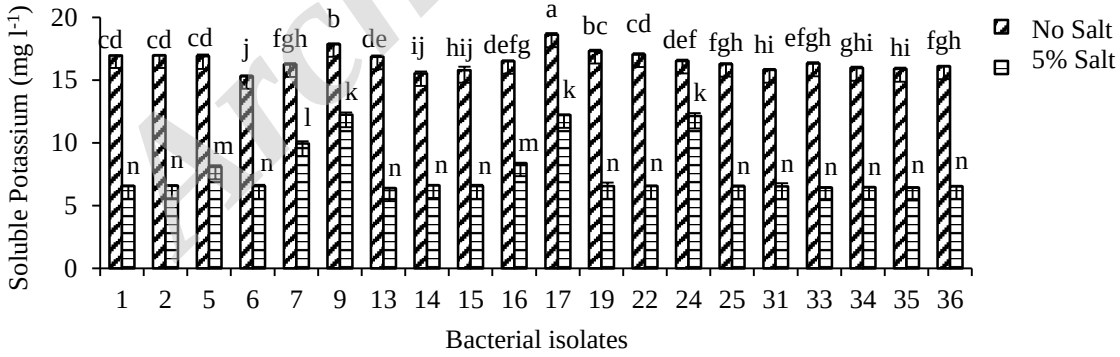


شکل ۴-آزادسازی فسفر از منبع تری کلسیم فسفات در جدایه‌های باکتری درحضور و عدم حضور نمک

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 4. Phosphate solubilizing from tri-calcium phosphate source by bacterial isolates in presence /absence of salt

Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $P < 0.05$



شکل ۵- آزادسازی پتاسیم از کانی مسکوویت در جدایه‌های باکتری در حضور و عدم حضور نمک

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 5. Potassium solubilization from muscovite by bacterial isolates presence /absence of salt

Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $P < 0.05$

ریزجانداران از طریق تولید پلی‌ساکارید کپسولی همراه با تولید اسید آلی مانند اسید تارتاریک و اسید اگزالیک منجر به حلالیت فلدسپار و ایلایت و آزادسازی پتاسیم شده‌اند (Sheng & He., 2006).

نتایج مطالعه لیو و همکاران (Liu *et al*, 2006) نشان داد که باکتری *Bacillus mucilaginosus* توانست علاوه بر انحلال کانی‌های خاک و میکا، به طور همزمان منجر به رهاسازی پتاسیم و اکسید سیلسیم از شبکه کریستال

Archive of SID
www.SID.ir

شود. اما توانایی انحلال فلدسپات را نداشت. همچنین *B. mucilaginosus* با تولیدپلی‌ساکارید و اسیدهای آلی در طول رشد و با جذب اسیدهای آلی توسط پلی‌ساکاریدها و چسبیدن به سطح کانی‌ها، منجر به ایجاد سطحی با غلظت بالای اسید آلی در نزدیکی کانی شود. علاوه بر این، پلی‌ساکارید با جذب اکسید سیلسیم، در تعادل بین کانی و فاز مایع و در نتیجه تخریب و تجزیه کانی‌های سیلیکاته بوسیله باکتری موثر بود.

مقاومت به تنش خشکی

با افزایش میزان پلی اتیلن گلیگول مصرفی، رشد جدایه-ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. مقاومت به تنش خشکی بین جدایه‌ها متفاوت بود. کمترین کاهش رشد جدایه‌ها نسبت به محیط بدون تنش در سطح ۲ بار در جدایه شماره ۵ با ۸/۱۵ درصد و بیشترین در جدایه شماره۱۶ مشاهده شد. همچنین در سطوح ۵ و ۱۰ بار کمترین کاهش رشد در جدایه شماره ۵ مشاهده شد (جدول۳). کمترین کاهش در سطح پتانسیل ۱۵ بار در جدایه شماره ۱۷ و ۵ بترتیب با ۵۵/۶ و ۵۳/۲ درصد نسبت به محیط بدون تنش مشاهده شد. جدایه‌هایی با کمترین کاهش رشد را در سطوح ۱۰ و ۱۵ بار، توانایی رشد بالاتری در درصدهای بالای نمک نیز نشان دادند. همچنین تولید پلی‌ساکارید در جدایه‌های متحمل به شوری و خشکی بیشتر بوده است که احتمالاً به سازگاری با شرایط تنشی وابسته است. مطالعه ابوالحسنی زراعتکار و همکاران (Abolhassani-Zeraatkar *et al*, 2009) نیز نشان داد که بین تحمل به تنش و ترشح پلی‌ساکاریدها رابطه مستقیم وجود دارد و دو جدایه S27K و S36K را به‌عنوان جدایه برتراز نظر میزان تولید پلی‌ساکارید و تحمل به تنش خشکی و شوری انتخاب کردند.

نتایج مولکولی

آزمایشات تعیین ترادف ژنی ۱۶SrRNA نشان داد که جدایه ۱۷ به میزان ۹۹/۴ درصد با سویه DSM13 *Bacillus licheniformis* و جدایه ۵ به میزان۹۹/۵۷ درصد با سویه *Bacillus megaterium* NBRC 15308 قرابت فیلوژنی دارند.

جدول ۳- درصد کاهش رشد جدایه‌های باکتری در سطوح مختلف تنش خشکی

Table 3. Decreasing (%) in the growth rate of bacterial isolates under different drought stresses

(Isolates)	(Decreasing percentage in the growth rate)			
	15 bar	10bar	5 bar	2bar
1	84.62	52.24	41.66	48.89
2	65.07	43.19	34.70	21.92
5	53.25	36.29	17.59	8.15
6	93.26	30.77	37.5	25.96
7	60.85	41.64	35.01	22.59
9	58.55	54.05	42.34	19.81
13	97.74	13.92	26.58	18.98
14	67.57	37.38	36.33	28.97
15	68.55	37.99	32.43	30.83
16	90.81	63.26	58.16	54.08
17	55.61	55.44	37.74	14.01
19	66.72	52.51	57.46	34.65
22	95.71	57.062	31.43	15.29
24	98.79	98.03	89.07	77.04
25	100	98.48	51.78	12.5
31	99.82	22.61	30.89	15.31
33	99.24	65.54	61.34	42.86
34	98.11	55.44	34.84	22.77
35	97.85	69.18	54.08	40
36	82.20	66.66	50	33.05

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه اغلب جدایه‌ها درصد بالای نمک را تحمل نمودند که دو جدایه ۵ و ۱۷ از نظر میزان تولید پلیمر و برخی خصوصیات محرک رشد مانند سیدروفور (جدایه ۵)، حلالیت پتاسیم و اکسین (جدایه۱۷) بیشترین مقدار را در سطوح شور و غیرشور نشان دادند. همچنین

Archive of SID

www.SID.ir

این جدایه‌ها بیشترین مقاومت در برابر تنش خشکی را از خود نشان دادند. با توجه به توانایی بالای این جدایه‌ها در تنش شوری و خشکی و تولید متابولیت‌های مؤثر در مقاومت به شوری، انتظار می‌رود جدایه‌های مذکور از توانمندی مطلوبی در کاهش تنش شوری گیاهان برخوردار باشند. لذا بایستی مطالعات گلخانه‌ای جهت ارزیابی کارایی آنها در بهبود رشد گیاهان در خاک‌های متأثر ازنمک صورت پذیرد.

References

Abolhassani-Zeraatkar M., Lakzian A., Haghnia G., Astarayi A. and Sarcheshmepour M. 2009. The study of salt and drought tolerance of *Sinorhizobium meliloti* isolated from Kerman province. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 6(1): 1-10. (In Persian)

Alexander D.B. and Zuberer D.A. 1991. Use of Chrome Azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12: 39-45.

Bagnasco P., De La Fuente L., Gualtieri G., Noya F. and Arias A. 1998. Fluorescent *pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1317-1322.

Bartels D., and Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 23-58.

Bergmann D., Zehfus M., Zierer L., Smith B. and Gabel M. 2009. Grass rhizosheaths: Associated bacterial communities and potential for nitrogen fixation. *Western North American Naturalist*, 69(1): 105-114.

Bibi F., Chung E.J., Yoon H.S., Song G.C., Jeon C.O. and Chung Y.R. 2011. *Haloferula luteola* sp nov., an endophytic bacterium isolated from the root of a halophyte, *Rosa rugosa*, and emended description of the genus *Haloferula*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 1837-1841.

Bouchotroch S., Quesada E., Izquierdo I., Rodrı´guez M. and Be´jar V. 2000. Bacterial exopolysaccharides produced by new discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas* isolated from hypersaline habitats in Morocco. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24: 374-378.

Donate-Correa J., Leon-Barrios M. and Perez-Galdona R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proligerus*, a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant and Soil*, 266: 261-272.

El-Tarabily K.A., and Youssef T. 2010. Enhancement of morphological,anatomical and physiological characteristics of seedlings of the mangrove Avicennia marina inoculated with a native phosphate-solubilizing isolate of Oceanobacillus picturae under greenhouse conditions. *Plant and Soil*, 332: 147-162.

Ghanem M.E., Han R.M.,Classen B., Quetin-Leclerq J., Mahy G., Ruan C.J., Qin P., Perez-Alfocea F., and Lutts S. 2010. Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: localization and composition in relation to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 167(5): 382-392.

Gontia I., Kavita K., Schmid M., Hartmann A. and Jha B. 2011. *Brachybacterium saurashtrense* sp nov., a halotolerant root-associated bacterium with plant growth-promoting potential. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 2799-2804

Grover M., Ali S. Z., Sandhya V., Rasul A. and Venkateswarlu, B. 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5): 1231-1240.

Hu X., Chen J. and Guo J. 2006. Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 983-990.

Jose Marti´nez-Ca novas M., Quesada E., Marti´nez-Checa F., d Moral A. and Be jar V.2004. A Taxonoic study to establish the relationship between exopolysaccharide-producing bacteria strains living in diverse hypersaline habitats. *Current Microbiology*, 48: 348-353.

Archive of SID

www.SID.ir

Liu W., Xushi X., Xianghua W., Qiyin Y., Yongming L. and Peter C.h. 2006. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environmental Geochemistry and Health*, 28: 133-140

Lloret J., Wulff B.B.H., Rubio J.M., Downie J.A., Bonilla i. and Rivilla R. 1998. Exoplysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain Rhizobium meliloti EFBI. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3): 1024-1028.

Mancuso Nichols C., Garon lardière S., Bowman J.P., Nichols P.D., Gibson J.A.E. and Guézennec, J. 2005. Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microbial Ecology*, *49*: 578-589.

Michel D., and Kaufmann M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylen Glycol 6000. *Plant Physiology*, 51: 914-916.

Milagers M.F., Machuca A. and Napoleao D. 1999. Detection of siderophore production from sevrel fungi and bacteria by chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 1-6.

Moraine RA., and Rogovin P. 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnology Bioengineering*, 8: 511-524.

Nabeel M.A., Kathiresan K., Rajendran N., Ohnishi H., Hamaoka H. and Omori K. 2010. Contribution by microbes to the foodweb of a mangrove biotope: the approach of carbon and nitrogen stable isotopes. *African Journal of Marine Science*, 32(1): 65– 70.

Oren A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 3(1): 825-834.

Panwar M., Tewari R., Gulati A., and Nayyar H. 2016. Indigenous salt-tolerant rhizobacterium Pantoea dispersa (PSB3) reduces sodium uptake and mitigates the effects of salt stress on growth and yield of chickpea. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 278

Patten C., and Glick B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 207-220.

Paul S., Bandeppa., Aggarwal Ch., Thakur, J.K., Rathi, M.S. and Khan, M.A. 2014. Effect of salt on growth and plant growth promoting activities of *Azotobacter chroococcum* isolated from saline soils. *Environment and Ecology*, 32 (4): 1255-1259.

Qurashi A.W., and Sabri A.N. 2012. Biofilm formation in moderately halophilic bacteria is influenced by varying salinity levels. *Journal of Basic Microbiology*, 52: 566-572.

Rodriguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F. and Ramos-Cormenzana A. 1981. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbial Ecology*, 7: 235-243.

Ruppel S., Franken Ph. and Witzel K. 2013. Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 40: 940–951.

Savostin, P., 1972. Microbial transformation of silicates. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 132(1): 37-45.

ShengX. F., and He L.Y. 2006. Solubilization of potassium bearing minerals by a wild type strain of Bacillus edaphicus and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(1): 66-72.

Shilev S., Sancho E.D. and Benlloch-Gonza'lez M. 2012. Rhizospheric bacteria alleviate salt-producced stress in sunflower. *Journal of Environmental Management*, 95: 37-41.

Sperber J.I. 1958. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9: 778-781.

Sundra B., Natarajam V. and Hari K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*, 77: 43-49

Tiwari S., Singh P., Tiwari R., Meena K.K., Yandigeri M., Singh D.P. and Arora D.K. 2011. Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat(*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 47(8): 907-916.

Yoshimura H., Kotake T., Aohara T., Tsumuraya Y., Ikeuchi M. and Ohmori M. 2012. The role of extracellular polysaccharides produced by the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HK-01 in NaCl tolerance. *Journal of Applied Phycology*, 24(2): 237-243.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation and Investigation of Some Growth-Promoting Properties of Halotolerant Bacteria -Producing Polymer of Saline Soils

Maryam Talebi Atouei[1*], Mohsen Olamaee[2], Reza Ghorbani Nasrabadi[3], Seyed Alireza Movahedi Naeini[2]

(Received: January 2017 Accepted: July 2017)

Abstract

Salinity is the most important challenge in arid and semi arid regions. Recently, biological methods are considered as a way for decreasing harmful effects of salinity on plant. In this study halotolerant bacteria were isolated from saline soils. The characteristics of plant growth promotion (PGP) such as production of exopolymer, siderophore, HCN, auxin, ability of potassium and phousphate solubilization and tolerance to drought stress were investigated. Among the 20 isolates selected, two isolates (5, 17) selected as super isolates based on PGP test. Results shown that mean produced exopolymer was in range of 0.8 to 4.2 g l^{-1} and maximum value was observed by the isolate17. All of the isolates can produce halo in CAS-Agar and bacteria isolate No. 5 produced maximum siderophore with the halo to colony ratio two. Maximum auxin production (8.14 mg l^{-1}) was observed by the isolate17. Also, this isolate had highest ability of potassium solubilization in presence (12.20) and absence (18.62) of salt. Most of the isolates showed drought tolerance at 2 and 5 bar levels. At 15 bar, Isolates 17 and 5 has the highest tolerance to drought stress in comparison to control with 55.6 and 53.2 percentage reuction in growth rate, respectively. With 16S rRNA sequencing, the more closley studied of halotolerant superior isolates were identified as *Bacillus*. Isolate No. 17 had 99.4% similarity to *Bacillus licheniformis* DSM13, while isolate No.5 showed 99.57% sequence homology to *Bacillus megaterium* NBRC 15308.

Keywords: Auxin, Exopolysaccharide, Tolerance to drought

Archive of SID

1- Ph.D Student, Department of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Associate Prof., Department of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
3- Assistant Prof., Department of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
* Corresponding author Email: mta_soil84@yahoo.com

www.SID.ir