

جداسازی و غربالگری جدایه‌های ازتوباکتر بومی خاک‌های شور و سنجش صفات محرک رشدی آنها

رضا خدادادی^۱، رضا قربانی نصرآبادی^{۲*}، محسن علمائی^۳، سید علیرضا موحدی نائینی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸)

چکیده

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی بوده که قابلیت تولید گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با توجه به روند افزایش توسعه اراضی شور و کمبود اراضی مطلوب برای کشاورزی، شناسایی راهکارهایی برای افزایش مقاومت گیاهان در برابر شرایط شوری، اهمیت زیادی دارد. استفاده از باکتری‌های محرک رشد از جمله *ازتوباکترها* یکی از راهکارهای مهم تعدیل اثرات شوری محسوب می‌شود. در این راستا و برای انجام پژوهش حاضر، ۱۵ نمونه از خاک‌های شور اراضی استان گلستان به منظور جداسازی باکتری *ازتوباکتر* جمع‌آوری شد. تعداد ۳۲ جدایه باکتریایی جداسازی و خالص‌سازی شد. بعد از انجام آزمایشات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تعداد ۲۳ جدایه منسوب به *ازتوباکتر* انتخاب شد. جدایه‌ها از نظر توانایی رشد در غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ درصد نمک، توانایی تولید اگزوپلی ساکارید، توانایی تحمل به خشکی، برخی ویژگی‌های محرک رشدی گیاه شامل توان تثبیت نیتروژن مولکولی، انحلال پتاسیم معدنی نامحلول، انحلال فسفات معدنی نامحلول، تولید ایندول استیک اسید (IAA) و تولید هیدروژن سیانید مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج پژوهش نشان داد که با افزایش میزان نمک رشد جدایه‌ها کاهش یافت. توانایی تولید اگزوپلی ساکارید (۰/۴ تا ۵/۶ گرم بر لیتر) در ۷۸/۲ درصد از جدایه‌ها مشاهده شد. افزایش سطح پلی اتیلن گلیکول باعث کاهش میزان رشد جدایه‌ها شد. نتایج حاصل از آزمون‌های محرک رشد گیاه نشان داد که توان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌ها (۵۲/۵ تا ۲۱۸/۱ میلی‌گرم بر لیتر)، توان تولید ایندول استیک اسید (۲/۴ تا ۶۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر)، توان حل‌کنندگی پتاسیم جدایه‌ها (۱۲/۹ تا ۲۸/۳ میلی‌گرم بر لیتر)، توان تثبیت زیستی نیتروژن (۲/۹ تا ۵/۱ نانومول اتیلن بر ساعت) بود. از بین ۲۳ جدایه منسوب به *ازتوباکتر* بر اساس آزمون‌های فیزیولوژیک باکتری در سطوح مختلف نمک و خشکی و آزمون‌های محرک رشدی، جدایه AZ₁₃ به عنوان جدایه برتر انتخاب شد.

واژه‌های کلیدی: اگزوپلی ساکارید، تنش خشکی، جداسازی باکتری، حل‌کنندگی فسفات، شوری خاک

خدادادی ر.، قربانی نصرآبادی ر.، علمائی م.، موحدی نائینی س. ۱۳۹۷. جداسازی و غربالگری جدایه‌های *ازتوباکتر* بومی خاک‌های شور و سنجش صفات محرک رشدی آنها. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۷، شماره ۲. ص: ۱۰۹-۱۲۲.

۱- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استادیار گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (مکاتبه کننده)

۳- دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*پست الکترونیک: rgnasr@yahoo.com

مقدمه

شوری خاک از شایع‌ترین تنش‌های محیطی بوده که با محدود نمودن رشد و نمو گیاه، تولید موفقیت‌آمیز محصولات زراعی را به مخاطره می‌اندازد. تلقیح گیاهان زراعی با انواع مختلفی از باکتری‌های مفید خاکزی یکی از سازوکارهای مقابله با شوری می‌باشد (Klopper *et al.*, 1989). این باکتری‌ها به دو صورت مستقیم یعنی تحریک رشد گیاه از طریق سازوکارهای تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مانند تولید هورمون‌های گیاهی، تثبیت زیستی نیتروژن، حل‌کنندگی فسفات و غیرمستقیم یعنی کنترل عوامل بیماری‌زا از طریق تولید ترکیبات مختلف مانند سیانیدهیدروژن، متابولیت‌های ضدقارچی و آنتی‌بیوتیک‌ها به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند (Vessey *et al.*, 2003). نقش انواع باکتری‌های آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن از جمله ازتوباکتر در رشد گیاه، به‌طور عمده به‌واسطه تولید هورمون‌های محرک رشد همانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین، توان تثبیت زیستی نیتروژن، حل‌کنندگی فسفات، افزایش مقاومت به تنش‌ها، تولید ویتامین‌ها و کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشد (Kennedy *et al.*, 2004). از جمله سازوکارهایی که باکتری‌ها برای انطباق با شرایط تنشی از خود نشان می‌دهند، تولید اگزوپلی‌ساکارید می‌باشد (Redmile-Gordon *et al.*, 2014). تلقیح گیاهان با باکتری‌های مولد اگزوپلی‌ساکارید سبب کاهش جذب سدیم و تحریک رشد گیاه در شرایط تنش شوری می‌شود (Ashraf *et al.*, 2009). ازتوباکتر از توانمندی مطلوبی برای رشد در محیط‌های تنشی برخوردار بوده و در شرایط نامساعد محیطی تشکیل سیست می‌دهد (Vela *et al.*, 1974). با توجه به اهمیت باکتری‌های مقاوم به به نمک در کاهش اثرات منفی شوری در گیاهان از طریق تولید مواد محرک رشد گیاه و اگزوپلی‌ساکارید، هدف از این پژوهش جداسازی جدایه‌های ازتوباکتر مقاوم به شوری، خشکی و تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید و پایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی در شرایط آزمایشگاهی و اندازه‌گیری برخی ویژگی‌های محرک رشدی تحت شرایط شوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری ازتوباکتر

برای جداسازی جدایه‌های ازتوباکتر بومی خاک‌های شور استان گلستان، نمونه‌برداری از مزارع با شوری‌های مختلف انجام گرفت. به‌منظور جداسازی جدایه‌های باکتریایی مقاوم به نمک، محیط کشت انتخابی وینوگرادسکی حاوی پنج درصد نمک تهیه شد (Larsen *et al.*, 1986). برای شناسایی نسبی باکتری ازتوباکتر، آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف که شامل آزمون گرم، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز و آزمون تولید اسید از قند انجام گرفت (Krieg *et al.*, 2005).

ارزیابی رشد جدایه‌های باکتریایی در سطوح مختلف شوری

به‌منظور سنجش رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف شوری، محیط کشت وینوگرادسکی جامد، حاوی غلظت‌های صفر، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ درصد شوری (سدیم کلرید^۱) تهیه شد و جدایه‌های باکتریایی در شرایط مناسب (۲۸ تا ۳۰ درجه سلسیوس) انکوباسیون شدند. پس از گذشت پنج تا هفت روز، قطر کلنی‌ها با شاهد (بدون کلرید سدیم) مقایسه شده و به‌صورت کیفی گروه‌بندی شدند (Merchan *et al.*, 2003). سنجش کمی اثر شوری بر رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع وینوگرادسکی دارای صفر، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ درصد شوری (کلرید سدیم) انجام گرفت. پس از رشد جدایه‌های باکتریایی در محیط پیش‌کشت، به میزان دو درصد حجمی سوسپانسیون باکتریایی (با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند^۲) به محیط کشت مایع دارای نمک تلقیح شد. میزان کدورت ناشی از رشد پس از ۷۲ ساعت با جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر مدل BRATE بررسی شد.

توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید جدایه‌های باکتریایی

سنجش تولید اگزوپلی‌ساکارید جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت قنددار MY (به‌ترتیب ترکیبی از ۱۰، ۵، ۳، ۴۰/۵، ۴/۸۵، ۳/۵، ۱، ۱/۸، ۰/۱۳ و ۰/۰۳ گرم بر لیتر

1. NaCl
2. Mcfarland

و روی شیکر با دور (150 rpm) و در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس مقدار دو میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته و سانتریفیوژ (10000 rpm) شد. مقدار فسفر آزاد شده به روش آمونیوم مولیبدات و انادات در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل BRITE اندازه‌گیری شد (Mehta & Nautiyal., 2001).

اندازه‌گیری کمی توان تولید ایندول استیک اسید (IAA)
توانایی تولید ایندول استیک اسید جدایه‌های باکتریایی در محیط مایع مغذی حاوی تریپتوفان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سنجد شده. ابتدا جدایه‌ها را در محیط پیش‌کشت مایع رشد داده و پس از رسیدن به رشد مطلوب (استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) به میزان دو درصد حجمی در محیط حاوی تریپتوفان دارای صفر، ۲، ۵ و ۱۰ درصد نمک (سدیم‌کلرید) مایه زنی شد و روی شیکر (150 rpm) و در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس مقدار دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون درون هر ارلن برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه (10000 rpm) سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی به دو میلی‌لیتر معرف سالکوسکی (شامل ۹۸ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۳۵ درصد، دو میلی‌لیتر محلول ۰/۵ مولار $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) افزوده شد. شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل BRITE در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Rubio et al., 2000).

اندازه‌گیری کمی توان حل پتاسیم معدنی نامحلول
توانایی حلالیت پتاسیم جدایه‌های باکتریایی در محیط الکساندروف (به ترتیب ترکیبی از ۵، ۰/۵، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۰۲ و ۵ گرم بر لیتر از ساکارز، منیزیم‌سولفات، کلسیم کربنات، آهن‌کلرید، سدیم هیدروژن مولیبدات و مو سکوویت) اندازه‌گیری شد. ابتدا جدایه‌ها را در محیط پیش‌کشت مایع مغذی رشد داده و پس از رسیدن به رشد مطلوب (استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) به میزان دو درصد حجمی در محیط الکساندروف، دارای صفر، ۲، ۵ و ۱۰ درصد نمک (سدیم‌کلرید) مایه زنی شد. پس از گذشت ۱۰ روز، محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه (10000 rpm) سانتریفیوژ شده و محلول رویی با استفاده

از گلوکز، پیتون، عصاره مالت، عصاره مخمر، سدیم‌کلرید، منیزیم‌سولفات، منیزیم‌کلرید، پتاسیم‌کلرید، کلسیم-کلرید، سدیم‌برمید و سدیم هیدروژن کربنات) انجام گرفت. پس از تهیه پیش‌کشت از جدایه‌های باکتریایی و رسیدن آن‌ها به کدورت ۰/۵ مک‌فارلند، تلقیح آن‌ها صورت گرفت. پس از گذشت پنج روز، محتویات محیط کشت به مدت ۳۰ دقیقه با دور (14000 rpm) سانتریفیوژ شد. به منظور جداسازی پلیمر، یک حجم از محلول صاف شده با سه حجم اتانول ۹۶ درصد مخلوط شد، سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور (5000 rpm) سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج و رسوب باقی‌مانده در لوله سانتریفیوژ به مدت یک شب در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت وزن خشک رسوب به‌عنوان میزان آگزوبلی‌ساکارید تولیدی در یک لیتر محیط کشت محاسبه شد (Ventusa., 2004).

بررسی توانایی تحمل به خشکی جدایه‌های باکتریایی
سنجش مقاومت به خشکی جدایه‌های باکتریایی با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG6000) انجام شد. برای انجام این آزمون پتانسیل‌های آبی برابر صفر، ۲-، ۵- و ۱۰- از پلی‌اتیلن‌گلیکول در محیط کشت مایع مغذی^۱ تهیه شد. پس از تهیه پیش‌کشت باکتریایی با جمعیت مناسب، تلقیح جدایه‌ها انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر با دور (150 rpm) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. رشد باکتریایی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل BRITE در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Michel & Kaufman., 1973).

بررسی ویژگی‌های محرک رشدی جدایه‌های باکتریایی
اندازه‌گیری کمی توان حل فسفات معدنی نامحلول
توانایی حلالیت تری‌کلسیم فسفات جدایه‌های باکتریایی در محیط اسپربر (به ترتیب ترکیبی از ۱۰، ۰/۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۵ گرم بر لیتر گلوکز، عصاره مخمر، کلسیم‌کلرید، منیزیم‌سولفات، تری‌کلسیم‌سولفات) اندازه‌گیری شد. پس از رسیدن جدایه‌های باکتریایی به رشد مطلوب در محیط پیش‌کشت مایع مغذی (استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) به میزان دو درصد حجمی در محیط اسپربر، دارای صفر، ۲، ۵ و ۱۰ درصد نمک (سدیم‌کلرید) مایه زنی انجام گرفت

قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. پایش میزان تولید سیانید هیدروژن جدایه‌های باکتریایی از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی شد (Donate-Correa *et al.*, 2004).

نتایج و بحث

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مقدماتی جدایه‌های ازتوباکتر

تعداد ۱۵ نمونه خاک با دامنه شوری بین ۴/۶ تا ۱۵/۲۱ دسی‌زیمنس بر متر از مزارع استان گلستان برای جداسازی ازتوباکتر انتخاب شد (جدول ۱). بعد از برداشت نمونه‌های خاک، و تهیه سری رقت، کشت باکتری بر روی محیط جامد وینوگرادسکی حاوی پنج درصد نمک سدیم کلرید انجام گرفت. تحقیق حاضر منجر به جداسازی و خالص‌سازی تعداد ۳۲ جدایه که از لحاظ ریخت‌شناسی به جدایه‌های ازتوباکتر شباهت داشتند شد. پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیک شامل آزمون‌های گرم، اکسیداز، کاتالاز، توانایی تولید اسید از قند، احیای نیترات، حرکت، هیدرولیز نشاسته و هم‌چنین ارزیابی تولید سیست در کشت کهنه، تعداد ۲۳ جدایه ازتوباکتر انتخاب و برای انجام مراحل و آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).

از دستگاه فلیم فتومتر مدل (Model PFP7 Flame Photometer) اندازه‌گیری شد (Chen *et al.*, 2006).

اندازه‌گیری کمی توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی به‌منظور بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکولی از روش احیاء استیلین (ARA) و دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده شد. درون لوله‌های آزمایش در پوش دار ۱۳ میلی‌متری مقدار پنج میلی‌لیتر محیط کشت وینوگرادسکی مایع فاقد نیتروژن ریخته و محیط استریل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی به هر لوله اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ درصد حجم هوای داخل هر لوله به‌وسیله سرنگ تخلیه و به همان میزان گاز استیلین به لوله‌ها تزریق شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سطح زیر منحنی ایجادشده دستگاه کروماتوگرافی گازی (GOW-MAC) اندازه‌گیری شد (Ravikumar *et al.*, 2004).

ارزیابی توان تولید سیانید هیدروژن

سنجش میزان تولید سیانید هیدروژن جدایه‌ها باکتریایی در محیط جامد نوترینت براث شده با گلایسین (۴/۴ گرم بر لیتر) انجام شد. کاغذ صافی‌های خیس‌ساز شده در پیکرات سدیم (پیکریک اسید ۰/۵ درصد و کربنات سدیم دو درصد) در قسمت داخلی درب پلیت

جدول ۱- ویژگی‌های خاک‌های نمونه‌برداری شده برای آزمایش‌های میکروبی

Table 1. The characteristics of the sampled soils for microbial tests

Soil textural classes	Clay	Silt	Sand	OC	pH	EC	Samples
	(%)	(%)	(%)	(%)		(dS m^{-1})	
Loam	42	19.5	38.5	1.4	8	4.6	1
Silty clay loam	45	38	17	0.52	7.4	8.12	2
Clay loam	45	30	25	0.41	7.3	10.11	3
Silty clay loam	53	32	15	0.06	7.2	12.4	4
Clay	32.5	43	24.5	0.92	7.1	9.41	5
Silty clay loam	48	34.6	17.4	1.7	7.5	6.52	6
Clay loam	44.5	31	24.5	0.62	7.6	10.51	7
Clay	38	42.5	19.5	0.04	7.8	14.12	8
Silty clay loam	51.5	36	12.5	1.2	8	5.2	9
Loam	32.5	18.5	49	0.3	7.3	13.26	10
Silty clay	47	44.6	8.4	1.34	7.6	12.71	11
Clay loam	45.4	30	24.6	0.07	7.2	15.21	12
Silty loam	53.2	13.1	33.7	0.56	7.6	11	13
Clay	26.5	42.3	31.2	0.41	7.4	10.24	14
Silty clay loam	54.6	31.4	14	1.02	8.19	8.23	15

جدول ۲- آزمون‌های انجام شده برای شناسایی باکتری‌های ازتوباکتر

Table 2. Determinative tests for primary identification of *Azotobacter* isolates

Isolates	Gram test	Oxidase	Catalase	Acid production of sugar	NO ₃ reduction	Mobility	Starch hydrolysis	Cyst
B ₁	-	+	+	+	+	+	+	+
B ₂	-	+	+	+	+	+	+	+
B ₃	-	+	+	+	-	-	+	+
B ₄	-	+	+	+	+	+	-	+
B ₅	-	+	+	+	+	-	+	+
B ₆	-	+	+	+	-	-	-	+
B ₇	-	+	+	+	+	+	-	+
B ₈	-	+	+	+	-	-	+	+
B ₉	-	+	+	+	+	+	-	+
B ₁₀	-	+	+	+	+	-	-	+
B ₁₁	-	+	+	+	-	-	-	+
B ₁₂	-	+	+	+	+	+	-	+
B ₁₃	-	+	+	+	+	+	+	+
B ₁₄	-	+	+	+	+	-	+	+
B ₁₅	-	+	+	+	+	+	+	+
B ₁₆	-	+	+	+	-	-	-	+
B ₁₇	-	+	+	+	+	-	-	+
B ₁₈	-	+	+	+	+	+	+	+
B ₁₉	-	+	+	+	+	+	-	+
B ₂₀	-	+	+	+	+	-	-	+
B ₂₁	-	+	+	+	-	-	+	+
B ₂₂	-	+	+	+	+	+	+	+
B ₂₃	-	+	+	+	+	+	+	+

ارزیابی تحمل جدایه‌ها به شوری

نتایج حاصل از میزان تحمل جدایه‌های مختلف به درصد‌های مختلف شوری نشان داد که با افزایش میزان شوری، رشد جدایه‌ها کاهش یافت، میزان کاهش رشد جدایه‌ها متفاوت بود. تمامی جدایه‌ها به غیر از جدایه شماره هفت توانستند تا غلظت پنج درصد نمک را تحمل نمایند. جدایه‌های (۲۱، ۱۹، ۱۵، ۱۳، ۱۲ و ۵) توانایی رشد نسبتاً ضعیف تا متوسطی در غلظت ۱۰ درصد نمک از خود نشان دادند (جدول ۳). میزان رشد کمی جدایه‌های باکتریایی در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل BRITE در طیف زمانی پنج روز اندازه‌گیری شد که جدایه‌های باکتریایی در مدت زمان سه روز بهترین رشد را داشتند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمارهای باکتری و شوری بر جمعیت جدایه‌های باکتریایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۸). با افزایش میزان شوری رشد جدایه‌ها روند کاهشی داشت. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان رشد در محیط بدون شوری مربوط به

جدایه شماره ۱۴ (۱/۸۵) و کم‌ترین رشد مربوط به جدایه شماره چهار (۰/۵) می‌باشد. بیش‌ترین میزان رشد در سطوح ۲، ۵ و ۱۰ درصد شوری به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های ۱۳، ۱۳ و ۱۸ و هم‌چنین کم‌ترین رشد مربوط به جدایه‌های ۸، ۴ و ۴ بود (جدول ۴). بال و همکاران (Bal et al., 2013) گزارش کردند با افزایش میزان شوری رشد جدایه‌ها کاهش یافت و از طرفی آن‌ها بیان داشتند که توانایی جدایه‌ها در میزان تحمل به شوری در غلظت‌های مختلف نمک متفاوت می‌باشد.

ارزیابی توان تولید اگزوپلی‌ساکارید جدایه‌های باکتریایی یکی از ویژگی‌های باکتری تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید ایجاد کلنی چسبنده و موکوییدی در محیط جامد MY است. توانایی جدایه‌ها به صورت کیفی از طریق نوع کلنی تشکیل شده در محیط نمکی MY سنجیده شد، نتایج نشان داد که ۸۰ درصد جدایه‌ها قادر به تشکیل کلنی‌های آبدار، چسبنده و موکوییدی در مقایسه با محیط جامد بدون قند MY بودند.

جدول ۳- ارزیابی رشد کیفی جدایه‌های باکتریایی در سطوح مختلف شوری

Table 3. Qualitative assay of bacterial growth in different levels of salinity

Isolates	salinity levels					Isolates	salinity levels				
	0	2%	5%	7%	10%		0	2%	5%	7%	10%
B ₁	++++	+++	+++	++	-	B ₁₃	++++	++++	+++	+++	++
B ₂	++++	+++	++	-	-	B ₁₄	+++	++	+	-	-
B ₃	++++	++++	++	-	-	B ₁₅	+++	+++	++	+	+
B ₄	++++	++++	+++	-	-	B ₁₆	+++	+++	+	+	-
B ₅	++++	++++	+++	++	+	B ₁₇	++++	+++	++	-	-
B ₆	++++	+++	++	+	-	B ₁₈	++++	+++	++	+	-
B ₇	+++	++	-	-	-	B ₁₉	++++	++++	+++	+	+
B ₈	++++	+++	++	+	-	B ₂₀	+++	+++	++	+	-
B ₉	++	+++	++	+	-	B ₂₁	++++	+++	+++	++	+
B ₁₀	++++	++++	+++	+	-	B ₂₂	++++	++++	++	+	-
B ₁₁	+++	++	+	-	-	B ₂₃	++	+	+	-	-
B ₁₂	++++	++++	+++	++	+						

- عدم رشد، + رشد ضعیف، ++ رشد متوسط، +++ رشد خوب، ++++ رشد بسیار خوب.

NO growth-, Weak+, Fair++, Good+++, Very good++++

جدول ۴- رشد کمی جدایه‌های باکتریایی در مدت زمان سه روز

Table 4. Quantitative growth of bacterial isolates within three days

Isolates	salinity levels				Isolates	salinity levels			
	0%	2%	5%	10%		0%	2%	5%	10%
B ₁	0.98 ^{FG}	0.83 ^{LM}	0.64 ^{XWV}	0.12 ^{IGH}	B ₁₃	1.84 ^A	1.06 ^E	0.89 ^{JK}	0.12 ^{IGH}
B ₂	0.92 ^H	0.8 ^{PMON}	0.62 ^{WV}	0.04 ^{LMKN}	B ₁₄	1.85 ^A	1.02 ^F	0.78 ^{PQON}	0.09 ^{IH}
B ₃	0.92 ^H	0.51 ^{AB}	0.34 ^E	0.06 ^{LJMK}	B ₁₅	0.81 ^{LMON}	0.64 ^{WV}	0.46 ^{BC}	0.13 ^{GH}
B ₄	0.52 ^{AZ}	0.43 ^D	0.32 ^E	0.014 ^N	B ₁₆	0.95 ^{GH}	0.56 ^{AZY}	0.48 ^C	0.12 ^{GH}
B ₅	0.81 ^{LMON}	0.71 ST	0.64 ^U	0.052 ^{LJMKN}	B ₁₇	0.77 ^{PQOR}	0.63 ^{UV}	0.52 ^{AZ}	0.22 ^F
B ₆	0.78 ^{PQON}	0.61 ^{XWV}	0.57 ^Y	0.044 ^{MN}	B ₁₈	0.93 ^{IH}	0.71 ST	0.56 ^{ZY}	0.25 ^F
B ₇	0.81 ^{LMON}	0.74 ^{STR}	0.51 ^{AB}	0.05 ^{LJMK}	B ₁₉	1.51 ^B	0.82 ^{LMN}	0.71 ^{UV}	0.08 ^{IJK}
B ₈	0.62 ^{WV}	0.42 ^D	0.15 ^G	0.06 ^{LJMK}	B ₂₀	0.96 ^{GH}	0.51 ^{AB}	0.35 ^E	0.15 ^G
B ₉	0.83 ^{LMK}	0.71 ^T	0.58 ^{XWY}	0.07 ^{LJK}	B ₂₁	1.33 ^C	0.85 ^{LJK}	0.61 ^{XWV}	0.15 ^G
B ₁₀	0.76 ^{PQR}	0.63 ^{UV}	0.42 ^D	0.08 ^{JK}	B ₂₂	1.26 ^C	0.67 ^U	0.46 ^{CD}	0.16 ^G
B ₁₁	0.75 ^{SQR}	0.62 ^{UV}	0.53 ^{AZ}	0.1 ^G	B ₂₃	1.25 ^C	0.93 ^H	0.56 ^{AZY}	0.14 ^{GH}
B ₁₂	1.28 ^D	0.88 ^{IJ}	0.58 ^{XY}	0.03 ^{LMN}					

همکاران (Bouchotroch *et al.*, 2000) در پژوهشی گزارش کردند که جدایه باکتری مقاوم به نمک جداسازی شده از زیستگاه‌های شور، حدود ۰/۸ تا ۱/۶ گرم بر لیتر ازتوباکتر ساکارید تولید می‌کند. ازتوباکتر دارای سلول‌های متابولیکی فعال بوده که قادر به تولید سطح بالایی از ازتوباکتری ساکارید نسبت به دیگر ریزجانداران بوده که می‌تواند یک ساختار ژلاتینی سخت و محکم اطراف سلول به نام سیست را بوجود آورده و سبب یک سازوکار برای بقای جدایه باکتریایی در شرایط تنش شوری باشد (Gasisa *et al.*, 1994)

مقدار کمی ازتوباکتری ساکارید تولیدی جدایه‌های باکتریایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). نتایج نشان داد که ۷۸/۲ درصد جدایه‌ها توانایی تولید ازتوباکتری ساکارید در محیط مایع را داشتند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار تولید ازتوباکتری ساکارید مربوط به جدایه شماره چهار به میزان ۵/۵ گرم بر لیتر و هم‌چنین کم‌ترین مقدار مربوط به جدایه شماره سه با ۰/۴ گرم بر لیتر بود (جدول ۶). مقادیر تولید ازتوباکتری ساکارید در جدایه‌های باکتریایی با تغییر درصد نمک، نوع نمک و دما متفاوت خواهد بود. بوچوتروچ و

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین تولید پلی ساکارید جدایه‌های باکتریایی

Table 5. Mean comparison results of the polysaccharide production by bacterial isolates

Sources Change	df	Mean square
bacteria	22	10.47**
Error	45	0.0012
Cv	-	1.27

جدول ۶- مقدار پلی ساکارید تولید شده توسط جدایه‌ها (گرم بر لیتر)

Table 6: Amount of bacterial polysaccharide production (g l⁻¹)

Isolates	Polysaccharide (g l ⁻¹)	Isolates	Polysaccharide (g l ⁻¹)
B ₁	----	B ₁₃	5.2 ^b
B ₂	2.3 ^j	B ₁₄	3.2 ^j
B ₃	0.4 ^m	B ₁₅	3.4 ⁱ
B ₄	5.6 ^a	B ₁₆	4.1 ^e
B ₅	3.2 ^j	B ₁₇	2.3 ^k
B ₆	3.9 ^f	B ₁₈	3.7 ^g
B ₇	5.2 ^b	B ₁₉	4.6 ^c
B ₈	4.3 ^d	B ₂₀	3.5 ^h
B ₉	3.7 ^g	B ₂₁	----
B ₁₀	----	B ₂₂	----
B ₁₁	3.4 ⁱ	B ₂₃	----
B ₁₂	2.1 ^l		

عدم توانایی تولید پلی ساکارید

Inability to produce polysaccharides.

سطوح ۵-، ۱۰- و ۲۰- بار شد (جدول ۷). نتایج نشان داد که جدایه‌هایی که رشد مطلوبی در سطوح مختلف شوری و پلی اتیلن گلیکول داشتند میزان تولید پلی ساکارید مطلوبی را از خود نشان دادند. اشرف و همکاران (Ashraf *et al.*, 2004) بیان کردند که جدایه‌های مقاوم به تنش خشکی با افزایش پلی ساکارید برون یاخته‌ای و تجمع برخی از آنزیم‌ها، شرایط تنشی از جمله خشکی و شوری را تحمل نموده و به رشد خود ادامه می‌دهند.

بررسی توانایی تحمل به خشکی جدایه‌های باکتریایی نتایج تجزیه واریانس نشان داد که رشد باکتری‌ها در سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان رشد جدایه‌های باکتریایی در سطوح ۵-، ۱۰- و ۲۰- مربوط به جدایه شماره ۱۳ بود. افزایش سطح پلی اتیلن گلیکول به ترتیب سبب کاهش رشد ۸/۵۸، ۲/۷۲ و ۹/۹۲ درصدی جدایه‌های باکتریایی در

جدول ۷- اثر خشکی اعمال شده با پلی اتیلن گلیکول بر میزان رشد جدایه‌ها

Table 7. The effect of drought stress imposed by PEG-6000 on growth of isolates

Isolates	Water potential levels				Isolates	Water potential levels			
	0	-5	-10	-20		0	-5	-10	-20
B ₁	1.79 ^{dc}	0.49 ^{rq}	0.12 ^{egfh}	----	B ₁₃	1.92 ^a	0.83 ^l	0.55 ^p	0.14 ^{egfd}
B ₂	1.52 ^f	0.42 ^{ts}	0.21 ^{bca}	0.12 ^{egfh}	B ₁₄	1.21 ^{hi}	0.21 ^{bca}	0.085 ^{jikh}	0.008 ^{ml}
B ₃	1.85 ^b	0.23 ^{yzx}	0.106 ^{igfh}	0.005 ^m	B ₁₅	0.95 ^k	0.62 ^o	0.21 ^{bca}	0.021 ^{ml}
B ₄	1.32 ^g	0.54 ^{pq}	0.31 ^{ywx}	0.107 ^{igfh}	B ₁₆	1.67 ^e	0.73 ^{pq}	0.34 ^{vw}	0.085 ^{jikh}
B ₅	1.25 ^h	0.69 ^{mn}	0.201 ^{bcd}	0.092 ^{jgh}	B ₁₇	0.85 ^l	0.41 ^{stu}	0.17 ^{ecd}	0.064 ^{jikl}
B ₆	1.16 ⁱ	0.32 ^{wx}	0.12 ^{egfh}	0.008 ^{ml}	B ₁₈	0.95 ^k	0.35 ^{vw}	0.14 ^{egfd}	0.023 ^{ml}
B ₇	1.54 ^f	0.72 ^m	0.31 ^{ywx}	0.12 ^{egfh}	B ₁₉	1.74 ^d	0.54 ^{pq}	0.36 ^{vwu}	0.11 ^{igfh}
B ₈	1.62 ^e	0.63 ^r	0.45 ^{rs}	0.21 ^{bca}	B ₂₀	1.02 ^j	0.81 ^l	0.38 ^{vtu}	0.102 ^{jigfh}
B ₉	1.81 ^{bc}	0.26 ^{zya}	0.102 ^{jigfh}	0.085 ^{jikh}	B ₂₁	1.24 ^h	0.41 ^{stu}	0.18 ^{cd}	----
B ₁₀	1.63 ^e	0.83 ^l	0.021 ^{ml}	----	B ₂₂	1.64 ^e	0.73 ^m	0.24 ^{bza}	0.048 ^{jimkl}
B ₁₁	1.74 ^d	0.35 ^{vw}	0.15 ^{efd}	0.032 ^{mkl}	B ₂₃	1.54 ^f	0.47 ^{rs}	0.25 ^{bza}	----
B ₁₂	1.73 ^d	0.65 ^{on}	0.42 ^{vwx}	0.21 ^{bca}					

----عدم توانایی رشد.

---- Inability to grow.

جدول ۸ - نتایج تجزیه واریانس رشد و آزمون‌های محرک رشد باکتری در سطوح مختلف شوری

Table 8. Analysis of variance results of growth and PGPR tests at different levels of salinity

Source of variation	df	Mean square			
		Release Phosphorous (mg l ⁻¹)	IAA production (mg l ⁻¹)	Release Potassium (mg l ⁻¹)	Growth Bacterial
Bacterial	22	5540.6**	582.5**	70.9**	0.31**
Salinity	3	179859.3**	2494.4**	2909/2**	10.31**
Bacteria* Salinity	66	1678.3**	72.1**	7.66**	0.008**
Error	184	1.18	0.95	1.17	0.11
Cv	1.59	1.59	10.54	10.01	4.26

میزان آزادسازی فسفر مقدار pH محیط کاهش یافت، این در صورتی بود که با افزایش میزان نمک تا سطح ۱۰ درصد مقدار pH محیط کشت تغییر محسوسی نداشت، آن‌ها بیان داشتند که با افزایش میزان شوری جمعیت میکروبی تحت تأثیر قرار گرفته و ریزجانداران در تلاش برای بقا بوده و میزان تولید متابولیت‌ها و سازوکارهای تغذیه‌ای و فیزیولوژیک کاهش می‌یابد. نتایج بدست آمده از اثر غلظت‌های مختلف نمک‌های KC, CaCl₂ و NaCl بر توان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های باکتریایی نشان داد که استفاده از نمک سدیم کلرید، تا سطح پنج درصد منجر به کاهش آزادسازی فسفر شد. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که سطوح بیش از دو درصد اثر قابل توجهی بر توانایی حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های باکتریایی داشته است. بنابراین ویژگی تحمل به نمک جدایه‌های باکتریایی تا اندازه زیادی برای بقای آن‌ها در خاک‌های متأثر از نمک حائز اهمیت است (Son et al., 2006).

ارزیابی توان تولید ایندول استیک اسید (IAA)

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای باکتری، شوری و اثر متقابل آن‌ها بر توان تولید ایندول استیک اسید در سطح احتمال یک درصد ($p < 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۸). تمام جدایه توانایی تولید ایندول استیک اسید را داشتند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید ایندول استیک‌اسید در محیط بدون نمک مربوط به جدایه شماره ۱۳ با ۶۱/۲۱ و کم‌ترین میزان تولید در جدایه شماره ۱۵ با ۲/۴۱ میلی گرم بر لیتر بود (جدول ۱۰).

بررسی خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های باکتریایی

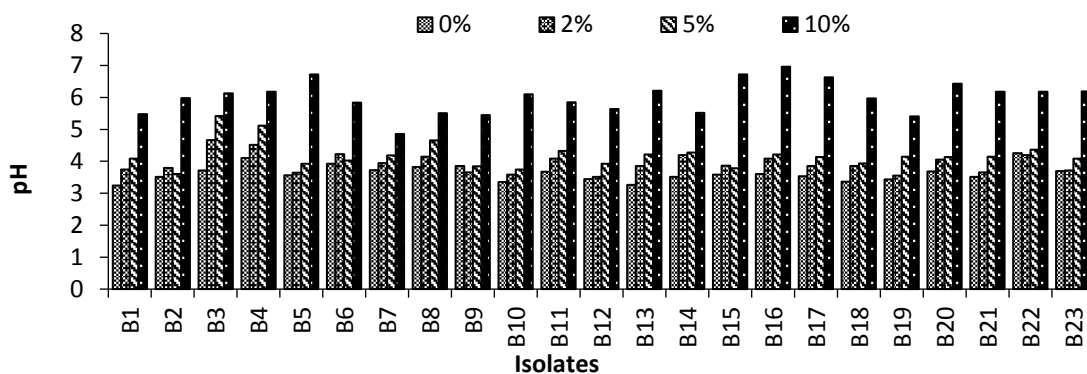
ارزیابی توان حل‌کنندگی تری کلسیم فسفات

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر تیمارهای باکتری، شوری و اثر متقابل آن‌ها بر توان حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های باکتریایی در سطح احتمال یک درصد ($p < 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۸). تمام ۲۳ جدایه توانایی انحلال تری کلسیم فسفات را داشتند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان فسفر آزاد شده در محیط بدون نمک مربوط به جدایه شماره یک با ۲۱۸/۲۴ و کم‌ترین میزان مربوط به جدایه شماره ۲۲ با ۵۲/۵۱ میلی‌گرم بر لیتر بود (جدول ۹). شوری سبب کاهش توان حل‌کنندگی تری-کلسیم فسفات جدایه‌های باکتریایی شد، به‌طوری‌که در بالاترین سطح شوری میزان فسفر آزاد شده به مقدار قابل توجهی (۷۴ تا ۹۹/۱ درصد) نسبت به شاهد بدون نمک کاهش یافت (جدول ۹). با افزایش میزان آزادسازی فسفر مقدار pH محیط هم کاهش یافت، به‌طوری‌که جدایه شماره یک ضمن کاهش قابل توجه pH محیط رشد از ۷/۵ به ۳/۲۴ توانست ۲۱۷/۲۴ میلی‌گرم بر لیتر فسفر را آزاد نماید (شکل ۱). فنکام و همکاران (Fankem et al., 2006) بیان داشتند که حل کردن فسفات‌های معدنی نتیجه اثرات ترکیبی کاهش pH خاک و تولید اسیدهای آلی است. به‌طور کلی باکتری‌های موجود در ریزوسفر از طریق تولید اسیدهای آلی متفاوت همانند اسیدهای کربوکسیلیک و سازوکارهای کاهش pH ریزوسفر فسفات‌های موجود در مواد فسفردار مختلف را آزاد می‌کنند. نوتیال و همکاران (Nautiyal et al., 2000) در پژوهشی نشان دادند که با افزایش

جدول ۹- اثر سطوح مختلف نمک بر میزان آزادسازی فسفر (میلی گرم بر لیتر) جدایه‌ها

Table 9. The effect of salinity levels on phosphorous release (mg l^{-1}) by the isolates

Isolates	Release Phosphorous (mg l^{-1})				Isolates	Release Phosphorous (mg l^{-1})			
	0%	2%	5%	10%		0%	2%	5%	10%
B ₁	218.24 ^a	85.25 ^f	75.84 ^{cd}	14.23 ^{ghfe}	B ₁₃	214.67 ^b	92.32 ^e	62.25 ^f	4.63 ^k
B ₂	138.56 ^h	96.32 ^d	87.52 ^b	2.39 ^l	B ₁₄	76.21 ^p	55.89 ^j	34.28 ⁱ	11.21 ⁱ
B ₃	142.32 ^g	25.32 ^o	12.32 ^m	8.24 ^j	B ₁₅	181.32 ^d	98.45 ^d	56.57 ^g	5.05 ^k
B ₄	72.72 ^q	30.32 ⁿ	21.26 ^l	8.32 ^j	B ₁₆	183.28 ^{cd}	61.54 ⁱ	42.25 ^h	2.05 ^l
B ₅	127.74 ^j	97.25 ^d	31.12 ^j	7.68 ^l	B ₁₇	137.59 ^h	93.57 ^e	64.25 ^{ef}	2.06 ^l
B ₆	78.36 ^p	52.32 ^k	21.12 ^l	12.32 ^{hi}	B ₁₈	160.59 ^f	92.25 ^e	74.65 ^d	11.21 ⁱ
B ₇	96.92 ⁿ	74.32 ^h	31.32 ^j	15.56 ^{cdfe}	B ₁₉	158.17 ^f	136.65 ^a	62.25 ^f	18.32 ^{ab}
B ₈	96.05 ⁿ	37.28 ^m	24.54 ^k	16.52 ^{cd}	B ₂₀	110.25 ^l	52.87 ^k	42.56 ^h	12.56 ^{ghi}
B ₉	89.46 ^o	75.64 ^h	41.25 ^h	17.35 ^{cab}	B ₂₁	132.98 ⁱ	96.52 ^d	65.89 ^e	15.74 ^{cde}
B ₁₀	165.85 ^e	133.26 ^b	91.32 ^a	14.57 ^{gdfe}	B ₂₂	52.56 ^r	45.55 ^l	32.56 ^g	13.54 ^{ghf}
B ₁₁	121.89 ^k	98.32 ^d	62.06 ^f	18.65 ^a	B ₂₃	104.26 ^m	82.36 ^g	42.89 ^h	12.84 ^{ghi}
B ₁₂	184.91 ^c	105.64 ^c	77.58 ^c	13.87 ^{ghfe}					



شکل ۱- اثر سطوح مختلف شوری بر تغییرات pH ایجاد شده به وسیله جدایه‌ها

Figure 1. The effect of different salinity levels on pH changes by the isolates

(Yaamin *et al.*, 2004) و همکاران *et al.*, 2011 بیشترین مقدار تولید ایندول استیک اسید در جدایه‌های /زئوباکتر را ۶۷/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند که با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد.

ارزیابی توان حل‌کنندگی پتاسیم معدنی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای باکتری، شوری و اثر متقابل آن‌ها بر توان حل‌کنندگی پتاسیم در سطح احتمال یک درصد ($p < 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۸). جدایه‌ها بعد از گذشت ۱۰ روز حداکثر حلالیت پتاسیم را از خود نشان دادند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین مقدار حلالیت پتاسیم در محیط بدون نمک در جدایه شماره ۱۳ به مقدار ۲۸/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر و کم‌ترین مقدار در جدایه شماره چهار با ۱۲/۹۶ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (جدول ۱).

تولید ایندول استیک اسید جدایه‌های باکتریایی در سطوح مختلف نمک روند کاهشی را از خود نشان داد، به طوری که در بالاترین سطح شوری، میزان تولید به مقدار قابل توجهی (۶۵/۳۱ تا ۹۷/۷ درصد) نسبت به شاهد کاهش یافت. بیشترین میزان تولید ایندول استیک اسید در سطوح مختلف شوری برای جدایه شماره ۱۳ و کم‌ترین میزان تولید برای جدایه شماره ۱۵ مشاهده شد (جدول ۱۰). /زئوباکتر از جمله باکتری‌های تولیدکننده ایندول استیک اسید می‌باشد و مقایسه میزان تولید ایندول استیک اسید در جدایه‌های مختلف /زئوباکتر، سودوموناس و انتروباکتر نشان داد که بیشترین میزان در جدایه‌های /زئوباکتر گزارش شده است (Rubio *et al.*, 2000). تولید ایندول استیک اسید نقش مهمی در توسعه سلولی، تقسیم سلولی، سرعت رشد گیاه، فتوسنتز و افزایش رشد گیاه در شرایط تنش شوری دارد، بنابراین این سازوکار می‌تواند باعث تعدیل اثرات منفی تنش شوری در رشد گیاه در خاک‌های متأثر از شوری باشد (Grover)

جدول ۱۰- اثر سطوح مختلف نمک بر میزان تولید IAA (میلی گرم بر لیتر) جدایه‌ها

Table 10. The effect of salinity levels on IAA production (mg l⁻¹) by the isolates

Isolates	IAA production (mg l ⁻¹)				Isolates	IAA production (mg l ⁻¹)			
	0%	2%	5%	10%		0%	2%	5%	10%
B ₁	7.86 ^{jk}	7.63 ^{ji}	5.32 ^{hg}	2.56 ^d	B ₁₂	14.68 ^f	13.25 ^{ed}	5.23 ^{hig}	2.65 ^d
B ₂	28.12 ^b	15.32 ^c	8.63 ^{ecd}	5.21 ^a	B ₁₃	61.21 ^a	47.26 ^a	35.12 ^a	3.46 ^{cdb}
B ₃	7.09 ^{lk}	5.02 ^k	2.32 ^{lk}	2.04 ^{gedf}	B ₁₄	25.58 ^c	18.46 ^b	7.89 ^{efd}	3.69 ^{cadb}
B ₄	6.46 ^l	4.22 ^{lk}	3.6 ^{likj}	0.75 ^{ghf}	B ₁₅	2.41 ^m	0.56 ^m	0.012 ^m	0 ^h
B ₅	23.53 ^{cd}	16.23 ^c	9.32 ^{cd}	2.85 ^{cd}	B ₁₆	6.63 ^l	2.65 ^l	1.52 ^{lm}	0.12 ^h
B ₆	10.52 ^{ji}	5.32 ^{jk}	2.78 ^{lkj}	2.65 ^{cd}	B ₁₇	11.85 ^{hi}	6.21 ^{jk}	4.22 ^{hikj}	0.65 ^{gh}
B ₇	13.56 ^{hgf}	9.25 ^{gh}	5.62 ^{hg}	3.05 ^{cdb}	B ₁₈	13.52 ^{hgf}	8.96 ^{hi}	4.62 ^{hij}	0.72 ^{gh}
B ₈	16.87 ^e	12.25 ^{ef}	8.54 ^{ecd}	4.57 ^{ab}	B ₁₉	12.63 ^{hgi}	11.62 ^{geh}	4.56 ^{hij}	0.73 ^{gh}
B ₉	12.32 ^{hi}	11.34 ^{gef}	5.53 ^{hig}	3.21 ^{cd}	B ₂₀	15.62 ^{ef}	11.63 ^{ef}	6.69 ^{efg}	0.28 ^h
B ₁₀	13.25 ^{hgf}	11.21 ^{gf}	10.31 ^c	4.25 ^{cab}	B ₂₁	17.26 ^e	12.63 ^{ef}	5.47 ^{hig}	2.52 ^{ed}
B ₁₁	22.25 ^d	15.21 ^{cd}	12.56 ^b	2.42 ^{edf}	B ₂₂	17.25 ^e	11.52 ^{gef}	8.76 ^{cd}	2.64 ^{cd}
					B ₂₃	14.56 ^{gf}	12.63 ^{ef}	5.95 ^{hfg}	0.85 ^{geh}

ترشح اسیدهای آلی و معدنی و ترشحات پلی- ساکارید می‌توانند منجر به آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار شوند (Parmar and Sindhu., 2013).

شوری سبب کاهش توان حل‌کنندگی پتاسیم جدایه‌های باکتریایی گردید، محدوده‌ی کاهش در بالاترین سطح شوری (۶۱/۸۹ تا ۹۱/۳۱ درصد) مشاهده شد (جدول ۱۱). بسیاری از پژوهشگران بیان داشتند که ریزموجودات از طریق کاهش pH

جدول ۱۱- اثر سطوح مختلف نمک بر میزان حل‌کردن پتاسیم (میلی گرم بر لیتر) جدایه‌ها

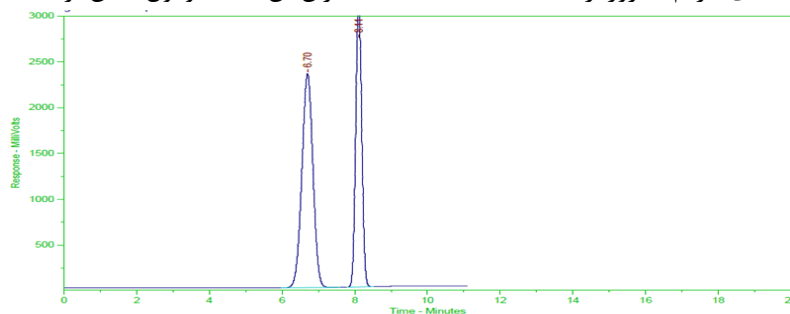
Table 11. The effect of salinity levels on potassium solubilization (mg l⁻¹) by the isolates

isolates	Release Potassium (mg l ⁻¹)				isolates	Release Potassium (mg l ⁻¹)			
	0%	2%	5%	10%		0%	2%	5%	10%
B ₁	29.36 ^b	22.63 ^a	11.62 ^b	4.25 ^{cab}	B ₁₂	18.08 ^{gh}	13.95 ^{egfh}	6.25 ^{efg}	1.4 ^{fgh}
B ₂	18.4 ^{gef}	13.66 ^{efh}	7.25 ^{efg}	2.024 ^{fcgdhe}	B ₁₃	33.38 ^a	23.25 ^a	14.29 ^a	6.53 ^a
B ₃	13.91 ^h	9.65 ^j	6.62 ^{efgd}	1.59 ^{fghe}	B ₁₄	15.86 ^h	12.56 ^{igh}	8.25 ^{ed}	3.56 ^{fcgdbe}
B ₄	12.96 ⁱ	7.24 ^k	6.25 ^{efg}	0.85 ^{gh}	B ₁₅	20.65 ^{dbc}	16.56 ^{bc}	8.65 ^{cd}	3.94 ^{cadb}
B ₅	17.83 ^{ghf}	14.56 ^{edf}	12.25 ^{ab}	2.72 ^{fcgdhe}	B ₁₆	20.63 ^{bc}	18.56 ^b	8.65 ^{ed}	2.54 ^{fcgdhe}
B ₆	16.54 ^{gh}	14.83 ^{edfc}	8.36 ^g	1.25 ^{gh}	B ₁₇	17.68 ^{geh}	14.46 ^{egf}	7.25 ^{efd}	0.3 ^h
B ₇	17.45 ^{gh}	12.53 ^{igh}	6.37 ^{efgd}	4.41 ^{cadb}	B ₁₈	16.89 ^{gh}	12.3 ^{ih}	6.52 ^{efgd}	1.61 ^{fghe}
B ₈	16.82 ^{gh}	12.45 ^{ih}	8.37 ^{ed}	4.05 ^{cadb}	B ₁₉	16.53 ^{ghf}	12.44 ^{ih}	5.45 ^{fg}	2.28 ^{fcgdhe}
B ₉	18.65 ^{def}	14.69 ^{edfc}	10.74 ^{cb}	5.52 ^{ab}	B ₂₀	19.76 ^{dec}	15.44 ^{edfc}	12.54 ^{ab}	6.24 ^a
B ₁₀	16.95 ^{geh}	15.84 ^{edc}	8.24 ^{ed}	6.28 ^a	B ₂₁	20.85 ^{dec}	14.75 ^{edfc}	8.87 ^{ecd}	1.85 ^{fgdhe}
B ₁₁	18.71 ^{gef}	15.32 ^{edc}	8.28 ^{ed}	4.25 ^{cadb}	B ₂₂	15.98 ^h	11.49 ^{ij}	7.74 ^{efd}	3.1 ^{fcgdbe}
					B ₂₃	21.53 ^b	16.54 ^{dc}	12.62 ^{ab}	4.24 ^{cadb}

۷/۰۴ نانومول اتیلن بر ساعت بود. هم‌چنین کم‌ترین مقدار مربوط به جدایه شماره ۱۲ با ۲/۹۳ نانومول اتیلن بر ساعت بود (شکل ۳). در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی انتظار می‌رفت که تمامی جدایه‌ها توانایی احیای استیلن به اتیلن را داشته باشند، اما تعدادی از جدایه‌ها (شماره‌های ۸، ۹ و ۱۹) پتانسیل تثبیت را نشان ندادند، این در حالی است که تمامی جدایه‌ها در محیط فاقد منبع نیتروژن قادر به رشد بودند. قابلیت تثبیت نیتروژن مولکولی در ازتوباکتر ثابت شده است، بنابراین احتمال می‌رود که میزان فعالیت

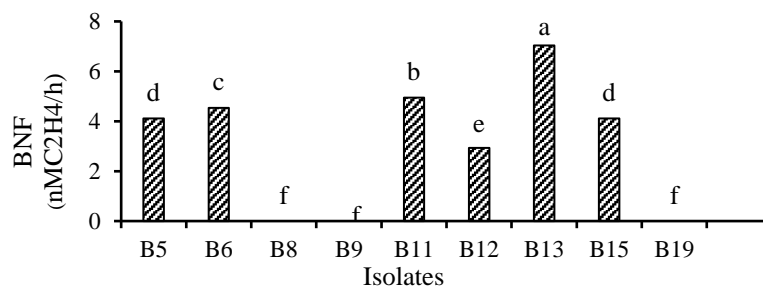
اندازه‌گیری کمی توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی با توجه به رشد کمی و کیفی جدایه‌ها در درصد‌های مختلف شوری، میزان تولید پلی‌ساکارید، رشد در سطوح مختلف پلی‌اتیلن گلیکول و نتایج آزمون‌های محرک رشدی تعداد ۱۰ جدایه منتخب برای اندازه‌گیری توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن انتخاب شدند. خروج گاز اتیلن در مدت زمان ۶/۷ دقیقه و گاز استیلن در مدت زمان ۸/۱ دقیقه صورت گرفت (شکل ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار نیتروژن تولید شده در مدت زمان ۲۴ ساعت مربوط به جدایه شماره ۱۳ به میزان

در حالی که در روش‌های ایزوتوپی حتی مقادیر بسیار پایین تثبیت نیز قابل اندازه‌گیری است. رجایی و همکاران (Rajai *et al.*, 2007) توانایی تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی را در ۶۳ جدایه/زئوباکتر مورد بررسی قرار دادند، نتایج این پژوهش نشان داد که ۳۴ جدایه از بین ۶۳ جدایه توانایی تثبیت زیستی نیتروژن را داشتند و بالاترین میزان آن ۸/۳ نانومول اتیلن بر ساعت گزارش شد.



شکل ۲- آنالیز تثبیت بیولوژیک نیتروژن به روش کروماتوگرافی گازی (بیشترین مقدار فعالیت، ۷/۰۴ نانومول اتیلن بر ساعت اندازه‌گیری شد)

Figure 2. Analysis of biological nitrogen fixation by gas chromatography (The highest activity was measured to be 7.04 nmol ethylene h⁻¹)



شکل ۳- تثبیت بیولوژیک نیتروژن (نانومول اتیلن بر ساعت) در جدایه‌های منتخب باکتریایی

Figure 3. Biological nitrogen fixation (nmol ethylene h⁻¹) by selected bacterial isolates

یافته، توانایی تولید سیانید هیدروژن توسط جدایه‌های باکتریایی به‌عنوان یک متابولیت در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی به خوبی شناخته شده است. لذا استفاده از آن‌ها یک قابلیت بالقوه و فرآیندی مناسب به‌عنوان یک جنبه جدید در روش‌های تقویت و تحریک رشد گیاهان زراعی در شرایط تنشی می‌باشد (Péchy *et al.*, 2008).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش تعداد ۲۳ جدایه متحمل به شوری منسوب به /زئوباکتر از خاک‌های متأثر از نمک جداسازی شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های باکتریایی متحمل به شوری

نیتروژناز در سویه‌هایی که قابلیت تثبیت را از خود نشان ندادند به قدری کم بوده که توسط روش کروماتوگرافی گازی قابل اندازه‌گیری نمی‌باشد. مارتینسون و همکاران (Martensson *et al.*, 1984) بیان داشتند که اندازه‌گیری فعالیت نیتروژناز توسط روش احیای استیلن و کروماتوگرافی گازی برای مقادیر بالای تثبیت نیتروژن و یا به عبارتی فعالیت بالای آنزیم نیتروژناز مناسب است،

ارزیابی توان تولید سیانید هیدروژن

نتایج حاصل از ارزیابی تولید سیانید هیدروژن نشان داد که میزان تولید سیانید هیدروژن جدایه‌های شماره ۱۳، ۲۳ و ۵ زیاد، جدایه‌های ۲۲، ۳، ۲۰، ۶ و ۴ متوسط، جدایه‌های ۱۶، ۱۸، ۲۴ و ۲۳ کم و سایر جدایه‌ها بدون توانایی تولید سیانید هیدروژن بودند. تحقیقات انجام شده توسط کرمر و سوئسی (Kremer & Souissi., 2001) نیز نشان داده است که تقریباً ۳۲ درصد از جدایه‌های باکتریایی توانایی تولید سیانید هیدروژن را داشته‌اند. در تنش شوری میزان تولید رادیکال‌های آزاد در گیاه افزایش می‌یابد و گیاه دچار تنش اکسیداتیو می‌شود، در این شرایط مقاومت گیاه در برابر بیمارگرهای گیاهی کاهش

افزایش شوری میزان ویژگی‌های محرک رشدی مذکور کاهش یافت. علاوه بر این، برخی جدایه‌های منتخب توانمندی تثبیت بیولوژیک نیتروژن را از خود نشان دادند. به‌طور کلی، با توجه به تولید اگزوپلی‌ساکارید، تحمل به شوری و ویژگی‌های محرک رشدی برخی از جدایه‌های حاصل از این پژوهش، به نظر می‌رسد آن‌ها از پتانسیل مطلوبی برای بهبود رشد گیاه برخوردار باشند. بر اساس رشد کمی و کیفی جدایه‌ها در درصدهای مختلف نمک، میزان تولید پلی‌ساکارید، رشد در سطوح مختلف پلی‌اتیلن گلیکول و نتایج آزمون‌های محرک رشدی، جدایه B13 به‌عنوان جدایه برتر پیشنهاد می‌شود. بنابراین برای اثبات توانمندی آن‌ها انجام آزمایش‌های گلدانی و مزرعه-ای ضروری است.

بوده ولی با افزایش شوری میزان رشد آنها کاهش یافت. ۷۸/۲ درصد جدایه‌های باکتریایی توانایی تولید اگزوپلی-ساکارید در محیط شور را از خود نشان دادند. با افزایش سطوح پلی‌اتیلن گلیکول رشد جدایه‌های باکتریایی متفاوت بود، نتایج رشد باکتری‌ها در سطوح مختلف شوری، تولید پلی‌ساکارید و هم‌چنین رشد در سطوح مختلف پلی‌اتیلن گلیکول با یکدیگر همپوشانی داشت، به‌طوری‌که جدایه شماره ۱۳ رشد مطلوبی در سطوح مختلف شوری و خشکی داشته و هم‌چنین تولید پلی-ساکارید مطلوبی را از خود نشان داد. ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی جدایه‌های باکتریایی نشان داد که تمامی جدایه‌ها توانایی حل کردن تری‌کلسیم فسفات، پتاسیم معدنی و تولید ایندول استیک اسید را دارا بوده ولی با

References

- Ashraf M., Hasnain S., Berge O. and Mahmood T. 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils*, 40(3): 157-162.
- Bal H.B. Nayak L. Das S. and Adhya T.K. 2013. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil*, 366(1-2), pp.93-105.
- Bouchotroch S., Quesada E., Izquierdo I., Rodriguez M. and Béjar V. 2000. Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus Halomonas, isolated from hypersaline habitats in Morocco. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(6): 374-378.
- Chen J., Guo J. 2006. Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tiammu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal Micro Bitechology*. 22: 983-990.
- Donate-Correa J., León-Barrios M. and Pérez-Galdona R. 2005. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant and Soil*, 266(1-2): 261-272.
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W. and Etoa, F.X. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *Afric. J. Biotech.* 5: 2450-2460.
- 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), pp.1231-1240.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., and Zablutowicz R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7(2): 39-44.
- Kennedy I.R. Choudhury A.T.M.A. and Kecskés M.L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), pp.1229-1244.
- Kremer R.J., and Souissi T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Current Microbiology*, 43(3): 182-186.
- Krieg N.R., and Manual H.J.C.B.S. 1984. Systematic Bacteriology, Williams Baltimore.
- Larsen H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 39(1-2): 3-7.
- Mårtensson A.M. and Ljunggren H.D. 1984. A comparison between the acetylene reduction method, the isotope dilution method and the total nitrogen difference method for measuring nitrogen fixation in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant and Soil*, 81(2): 177-184.
- Mehta S. and Nautiyal C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*, 43(1): 51-56.

- Merchan F. Lorenzo L.D. Rizzo S.G. Niebel A. Manyani H. Frugier F. Sousa C. and Crespi M., 2007. Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 51(1), pp.1-17.
- Michel B.E., and Kaufmann M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51(5): 914-916.
- Nautiyal C.S., Bhadauria S., Kumar P., Lal H., Mondal R. and Verma D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182 (2): 291-296.
- Parmar P. and Sindhu S.S. 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3(1): 25-31.
- Paul S. 2013. Osmotic stress adaptations in rhizobacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 53(2): 101-110.
- Péchy-Tarr M. Bruck D.J. Maurhofer M. Fischer E. Vogne C. Henkels M.D. Donahue K.M. Grunder J. Loper J.E. and Keel C. 2008. Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental microbiology*, 10(9): 2368-2386.
- Rajai S.A., Alikhani C., President F. 2007. Evaluation of the ability of some native soils E. Azotobacter Chaharmahal and Bakhtiari Province in the production of plant growth stimulant. *Journal of Agricultural Science*, 30: 33-47. (In Persian)
- Ravikumar S., Kathiresan K., Ignatiammal S.T.M., Selvam M.B. and Shanthy S. 2004. Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312(1): 5-17.
- Redmile-Gordon M.A., Brookes P.C., Evershed R.P., Goulding K.W.T. and Hirsch P.R. 2014. Measuring the soil-microbial interface: Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from soil biofilms. *Soil Biology and Biochemistry*, 72: 163-171.
- Rubio M.G., Valencia-Plata S.A., Bernal-Castillo J. and Martínez-Nieto P. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter sp.* and *Pseudomonas sp.*, producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(4): 171-176.
- Son H.J., Park G.T., Cha M.S. and Heo M.S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97(2): 204-210.
- Sundara B., Natarajan 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(1): 43-49.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2): 571-586.
- Vela G.R. 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 28(1): 77-79.
- Ventosa A., Mellado E., Sanchez-Porro C., and Marquez M.C. 2008. Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. In *Microbiology of Extreme Soils*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp: 87-115.
- Yasmin S., Rahman Bakar M.A., Malik K.A. and Hafeez F.Y. 2004. Isolation characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar soils. *Journal of Basic Microbiology*, 44: 241-252.

Isolation and Screening of Native *Azotobacter* from Salt Affected Soils and Measurement of Their Growth Promoting Properties

Reza Khodadadi¹, Reza Ghorbani Nasr Abadi ^{2*}, Mohsen Olamaee³, Seyed Alireza Movahedi Naini³

(Received: June 2017 Accepted: February 2017)

Abstract

Salinity as one of the major abiotic stresses severely affects crop productivity. Plant growth promoting bacteria is being considered to ameliorate salinity stress. Fifteen samples of salt affected soils from Golestan province were collected to isolate *Azotobacter*. Thirty- two bacterial isolates were isolated and purified. Physiological and biochemical tests confirmed twenty-three isolates belongs to Genus *Azotobacter*. The isolates were assessed for their growth in liquid medium supplemented with 2, 5 and 10 % of salt. Exopolysaccharide production, drought stress tolerant and some selected growth promoting properties such as nitrogen fixation, solubilization insoluble potassium, tri-calcium phosphate solubilization, indole acetic acid and hydrogen cyanid production capability was evaluated. Results showed that increasing salt concentration had negative effect on bacterial growth. Exopolysaccharide production ($0.4-5.6 \text{ g L}^{-1}$) was positive by 78.2% of the isolates. Higher levels of polyethylene glycol reduced growth of the isolates. Plant growth promoting tests showed tri-calcium phosphate solubilization ($52.5-218.1 \text{ gL}^{-1}$), IAA production ($2.4 - 60.2 \text{ mg L}^{-1}$), potassium solubilization ($12.9-28.3 \text{ mg L}^{-1}$) and biological nitrogen fixation ($2.9 - 5.1 \text{ nmol ethylene hr}^{-1}$). Among the 23 isolates to *Azotobacter*, based on physiological tests of bacteria in different levels of salt and drought and PGPR tests, isolate AZ₁₃ was selected as the superior isolate.

Keywords: Bacteria isolation, Drought stress, Phosphate solubilization, Polysaccharide, Soil salinity

Khodadadi R., Ghorbani-Nasrabadi R., Olamaee M. and Movahedi-Naini S. 2019. Isolation and screening of native *Azotobacter* from salt affected soils and measurement of their growth promoting properties. *Applied Soil Research*, 7(2): 109-122.

1- Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology , Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

2- Assistant Professor, Department of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

3- Associate Professor Department of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

* Corresponding Author Email: rgnasr@yahoo.com