

## The ability of ACC deaminase production in isolated bacteria from drought, saline and saline-sodic soils and selection of the most efficient bacteria

**Reza Soleimani**

Assistant Professor of Soil science, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran, rsoleimani@ut.ac.ir

**Hossein Ali Alikhani**\*

Professor of Soil Biology and Technology, Tehran University, Iran, halikhan@ut.ac.ir

**Hasan Towfighi**

Professor of Soil Chemistry, Tehran University, Iran, htowfighi@ut.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Drought, salinity and salinity-sodicity conditions reduce plant growth, due to stress ethylene biosynthesis. Because of capability of some soil bacteria for stress alleviation, and ACC consumption, this investigation was carried out to select the best ACC deaminase producer bacteria in conditions of drought, salinity and salinity-sodicity affected soils.

**Materials and methods:** In this investigation, 400 bacteria were isolated from soils with different levels of electrical conductivity (EC) and sodium adsorption ratio (SAR) and analyzed the variability of their ability in ACC consumption and  $\alpha$ -ketobutyrate as indices of ACC deaminase production. Also, the effects of different drought and salinity stress on bacteria growth trend and ACC consumption ability were analyzed.

**Results:** Data analysis indicated that, not only the ability of ACC production was different among isolates, but also amounts of ACC consumption were affected by drought and salinity tensions. In the most isolates, there was a significant decrease in trend of ACC deaminase production as affected by tensions. But, one of bacterial species as *Bacillus simplex* that was isolated from saline-sodic soils, in addition to ability of production of 901 nmole  $\alpha$ -ketobutyrate per milligram protein per hours in normal conditions, has the highest production stability in drought and salinity tensions. Also, this bacterium was continued to ACC deaminase production up to EC of 40 dS.m<sup>-1</sup> and OP (Osmosis pressure) of -25 bar.

**Discussion and conclusion:** According to comparison among isolates, *B. simplex* has the highest efficiency of ACC deaminase production, in drought and salinity conditions, and was tolerant to these tensions. Therefore, *B. simplex* was proposed for field experiments in drought, salinity and salinity-sodicity affected soils.

**Key words:** *Bacillus simplex*, ACC deaminase, drought, Salinity, Salinity-sodicity

---

\* Corresponding author

**Received:** July 12, 2015/ **Accepted:** March 2, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۶۶-۵۳  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲

## بررسی توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز در باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های خشک، شور و شور- سدیمی و انتخاب باکتری کارآمد در تولید آنزیم

**رضا سلیمانی:** استادیار خاکشناسی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران، rsoleimani@ut.ac.ir  
**حسین علیخانی\*:** استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تهران، ایران، halikhan@ut.ac.ir  
**حسن توفیقی:** دانشیار شیمی خاک، دانشگاه تهران، ایران، htofighi@ut.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** تنش‌های خشکی، شوری و شور- سدیمی، از راه‌های گوناگونی مانند ساخت زیستی اتیلن تنش‌ناهی مایه کاهش رشد گیاهان می‌شوند. به دلیل توانابودن برخی از باکتری‌های خاک در کاهش تنش و مصرف پیشنیاز تولید اتیلن (ACC)، این پژوهش برای دستیابی به باکتری برتر سازنده آنزیم ACC-دآمیناز در تنش‌های خشکی، شوری و شور- سدیمی خاک‌ها انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، با جداسازی ۴۰۰ باکتری از خاک‌های با قابلیت هدایت الکتریکی و نسبت جذب سدیمی گوناگون، توان تجزیه ACC و ساخت آلفاکتوبوتیرات به‌عنوان معیار ساخت آنزیم ACC-دآمیناز در باکتری‌های سازنده این آنزیم و اثر تنش‌های خشکی و شوری بر روند رشد باکتری‌ها و توان مصرف ACC بررسی شد.

**نتایج:** پردازش و آزمون داده‌ها نشان داد که نه تنها توانایی ساخت آنزیم ACC-دآمیناز در میان جدایه‌ها با هم ناهمبند بود، بلکه اندازه مصرف ACC در آنها بسیار وابسته به تنش‌های خشکی و شوری بود. در بیشتر جدایه‌های باکتری، با افزایش تنش، روند کاهشی معنی‌داری در مصرف ACC دیده شد؛ اما گونه باکتری *باسیلوس سیمپلکس* که از خاک‌های شور- سدیمی جداسازی شد، افزون بر توانایی ساخت ۹۰۱ نانومول آلفاکتوبوتیرات بر میلی‌گرم پروتئین در ساعت در شرایط بدون تنش، دارای بیشترین پایداری مصرف ACC در تنش‌های خشکی و شوری بود. این باکتری، در برابر دیگر جدایه‌ها، بردباری نسبی بیشتری به تنش‌های خشکی و شوری دارد و تا شوری ۴۰ دسی‌زیمنس بر متر و پتانسیل اسمزی ۲۵- بار، همچنان ACC را مصرف کرد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با بررسی باکتری‌های جداسازی شده آشکار شد که باکتری *باسیلوس سیمپلکس*، کارایی بیشتری در ساخت آنزیم ACC-دآمیناز در تنش‌های خشکی و شوری داشت و بردبار به تنش‌های یادشده بود؛ بنابراین، کاربرد این باکتری برای کاهش تنش‌ها در خاک‌های شور و شور- سدیمی و مناطق خشک و نیمه‌خشک در شرایط مزرعه پیشنهاد شد.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری *باسیلوس سیمپلکس*، آنزیم ACC-دآمیناز، خشکی، شوری، شور- سدیمی

\* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

کم‌آبی، شوری و شور-سدیمی بودن ذاتی خاک‌ها و همچنین شور شدن ثانویه<sup>۱</sup> در بسیاری از مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان و بخش‌های گسترده‌ای از ایران به‌عنوان یک دشواری و عامل کاهش‌دهنده رشد، کارکرد و کیفیت گیاهان کشاورزی به‌شمار می‌رود. ساخت زیستی حداقل<sup>۲</sup> در خاک‌های شور و شور-سدیمی به‌دلیل فراوانی و تعادل ناشایست غلظت کاتیون‌ها و آنیون‌های محلول خاک (در خاک‌های شور و شور-سدیمی)، درصد سدیم تبادل<sup>۳</sup> بیشتر از ۱۵ و نسبت جذب سطحی سدیم<sup>۴</sup> بیشتر از ۱۳ (در خاک‌های شور-سدیمی) رخ می‌دهد (۱). به رأی گامالرو و گلیک<sup>۵</sup>، برخی از تنش‌ها مانند کم‌آبی و شوری مایه دگرگونی فیزیولوژی گیاه می‌شوند. افزایش ساخت زیستی اتیلن و رسیدن غلظت آن به اندازه کاهش‌دهنده رشد گیاهی یکی از این دگرگونی‌ها است که به آن ساخت اتیلن تنشی گویند (۲). سیدیکی<sup>۶</sup> و همکاران نیز گزارش کردند که اتیلن ساخته‌شده در پاسخ به تنش شوری، مایه کاهش رشد ریشه و در پی آن کاهش جذب آب و عناصر غذایی و کاهش رشد گیاه می‌شود (۳). با کاهش ساخت ACC<sup>۷</sup> (۱-آمینو سیکلو پروپان-۱-کربوکسیلات پیش‌نیاز ساخت اتیلن)، گیاه با کمک باکتری‌های سازنده آنزیم ACC-دآمیناز، از ساخت بیش از اندازه طبیعی اتیلن در گیاه جلوگیری می‌کند. ساخت آنزیم ACC-دآمیناز در باکتری‌های مختلفی از جمله در جنس‌های سودوموناس و باسیلوس گزارش شده است (۴). حضور این ژن و فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز بیشتر در سودوموناس فلورسنس جداسازی شده از

ریزوسفر گیاهان مختلف بررسی شده است. برخی از پژوهشگران، فعالیت‌نداشتن این آنزیم را در سایر گونه‌ها، مانند سودوموناس استاتوری و همچنین در جنس‌های ازتوباکتروانتروباکتر گزارش کرده‌اند (۵). استفاده از سویه‌های باکتری بومی با توجه به سازش به شرایط محیطی (۶) و برهم‌کنش بهتر با گیاهان هر منطقه می‌تواند اثر بیشتری داشته باشد. یک مدل برای شناخت کارایی ACC-دآمیناز در کاهش اندازه اتیلن در گیاهان را گلیک و همکاران پیشنهاد کرده‌اند (۷). در این مدل آمده است که یک باکتری با توانایی ساخت ACC-دآمیناز پس از پیوستن به بذر یا ریشه گیاه، مونومرهای ACC را در دو گام جداکردن و شکستن<sup>۸</sup> به آلفا کتوتیرات<sup>۹</sup> و آمونیوم دگرگون می‌کند. با کاهش ACC در رویه بیرونی، برای پیدایش تعادل میان اندازه ACC در درون و بیرون یاخته‌های ریشه گیاه، اندازه بیشتری از ACC ساخته‌شده خود را به بیرون (در خاک) ترشح می‌کند و با پیدایش یک شیب از درون بافت گیاه به سوی بیرون، مایه کاهش غلظت ACC و در پی آن غلظت اتیلن درون گیاه می‌شود. با این فرایند، باکتری‌های سازنده آنزیم ACC-دآمیناز باعث می‌شوند که اندازه اتیلن به مرز بحرانی برای رشد گیاه نرسد به گونه‌ای که بوته میری گیاهان به‌ویژه در آغاز رشد کاهش می‌یابد.

بنابراین با هدف جداسازی باکتری‌های توانمند در ساخت ACC-دآمیناز از خاک‌های خشک، شوری و شور-سدیمی و بررسی توان بردباری در برابر تنش‌های خشکی و شوری آنها این پژوهش انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**نمونه برداری از خاک‌های معمولی، شور و شور-سدیمی به منظور جداسازی باکتری:** در آغاز از ۶۰ جایگاه از استان خوزستان از خاک‌های همانندی از دیدگاه شوری و شور-سدیمی بودن نمونه برداری خاک‌ها از مزارع گندم انجام شد. خاک ریزوسفری با استفاده از پروتکل مربوطه با روش تکان دادن ملایم ریشه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در یک لیتر آب استریل دارای ۰/۹ درصد کلرید سدیم آماده شد (۸). برای جداسازی باکتری‌ها، حدود ۲۵۰ گرم از نمونه خاک‌ها، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس pH، قابلیت هدایت الکتریکی<sup>۱۱</sup> عصاره اشباع، غلظت کلسیم به روش کمپلکسومتری<sup>۱۱</sup>، غلظت سدیم و پتاسیم به روش فلیم فتومتری<sup>۱۲</sup> اندازه گیری شد و با توجه به این نتایج، نسبت جذب سطحی سدیم نیز برآورد گردید (۹).

**جداسازی<sup>۱۳</sup> و خالص سازی<sup>۱۴</sup> باکتری‌ها:** در این گام در آغاز سوسپانسیون همگن خاک آماده شد. به این گونه که ۱۰ گرم خاک به ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری دارای ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون، ریخته و در شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد برای ۳۰ دقیقه گذاشته شد. سپس سری‌های رقت (از ۱۰<sup>-۱</sup> تا ۱۰<sup>-۹</sup>) آماده و ۰/۱ میلی لیتر از آن روی پلیت دارای محیط کشت آگار مغذی پخش شد. همه پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد برای ۵ روز گرماگذاری شدند. برای خالص سازی جدایه‌ها، کلنی‌های پدیدآمده از بالاترین رقت‌های هر نمونه کشت شده گزینش شد و دوباره روی محیط کشت رشد داده شد و تا زمان بهره گیری از آنها روی محیط کشت شیدار<sup>۱۵</sup> در یخچال نگهداری شدند.

**ارزیابی کیفی جدایه‌ها از دیدگاه توان ساخت ACC-دآمیناز:** برای انجام این آزمایش از سه سری ظروف پلیت دارای محیط کشت DF<sup>۱۶</sup> بهره برداری شد:

- ۱- ظروف پلیت دارای محیط کشت DF و ACC (به عنوان تنها منبع نیتروژن)
- ۲- شاهد مثبت: ظروف پلیت دارای محیط کشت DF و کلرید آمونیوم (منبع نیتروژنی پایه)
- ۳- شاهد منفی: ظروف پلیت دارای محیط کشت DF بدون هر گونه منبع نیتروژنی

سپس مایه زنی و انکوباسیون انجام شد و اندازه کلنی‌های پدیدآمده در ظروف پلیت با شاهد سنجدیه ارزیابی شدند (۸).

همچنین توانایی جدایه‌ها در ساخت آنزیم ACC-دآمیناز در محیط مایع با بهره برداری از روش بهبود یافته پنروز و گلیک<sup>۱۷</sup> آزمایش شد (۱۰). برای این کار، یک لوپ از هر جدایه به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت TSB در ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری مایه زنی شد. پس از ۲۴ ساعت از رشد باکتری در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، به اندازه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت در سه محیط زیر و در ۴ تکرار مایه زنی و برای ۲۴ ساعت روی شیکر با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دور ۸۰ rpm تکان داده شد:

- ۱- محیط کشت DF
- ۲- محیط کشت DF همراه با ۱۰۰ میکرولیتر ACC ۰/۳ مولار
- ۳- محیط کشت DF همراه با ۱۰۰ میکرولیتر سولفات آمونیوم

دانسیته نوری این محیط‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر همانند شناسه‌ای از رشد باکتری در آن محیط اندازه گیری شد.

### اندازه‌گیری کمی آلفاکتوتیرات: برای این کار از

روش پنروز و گلیک به‌گیری شد (۱۰). در این روش از ۱۶ جدایه برتر از باکتری‌های غربال‌شده در گام‌های پیشین، سوسپانسیون باکتری با بهره‌گیری از محیط کشت TSB<sup>۱۸</sup> آماده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از آن به ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت روی شیکر با چرخش ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد گذاشته شد. آنگاه سوسپانسیون درون ارلن، در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه ساتریفیوژ (g ۸۰۰۰) شد. یاخته‌های مانده در ته لوله پس از شستشو با مایع حداقل DF، در ۷/۵ میلی‌لیتر از همان محیط سوسپانسیون شد و همه آن درون ارلن ۵۰ میلی‌لیتری سترون ریخته شد. سپس به اندازه ۴۵ میکرولیتر از محلول نیم‌مولار ACC به سوسپانسیون باکتری یادشده افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر (با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد) گذاشته شد تا فعالیت آنزیم برانگیخته شود. پس از ساتریفیوژ (g ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد)، یاخته‌های مانده در ته لوله با ۵ میلی‌لیتر از Tris-HCl یک‌دهم مولار با pH برابر ۷/۵ شسته شدند. یاخته‌های مانده در ته لوله در یک میلی‌لیتر از محلول شستشوی یادشده حل شد و همه آن به لوله میکروساتریفیوژ ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد ساتریفیوژ (g ۱۰۰۰۰ برای ۵ دقیقه) گردید. محلول رویی دور ریخته شد و پس از اینکه یاخته‌های مانده در ته لوله در ۶۰۰ میکرولیتر از Tris-HCl یک‌دهم مولار در pH برابر ۷/۵ آب آویز شدند به اندازه ۳۰ میکرولیتر تولوئن به آن افزوده شد و برای ۳۰ ثانیه ورتکس<sup>۱۹</sup> شد. آنگاه به اندازه ۲۰۰ میکرولیتر از

سوسپانسیون یادشده جداگانه به یک لوله شاهد و سه لوله میکروساتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری جدید ریخته شد. به اندازه ۲۰ میکرولیتر از محلول ACC نیم‌مولار به هر یک از لوله‌های میکروساتریفیوژ دارای ۲۰۰ میکرولیتر از یاخته‌های باکتری افزوده شدند. لوله‌ها در آغاز ورتکس و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آنگاه یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۵۶ مولار به هر لوله افزوده شد و محلول نهایی درون هر لوله با بهره‌گیری از ورتکس آمیخته و در دمای اتاق، ساتریفیوژ (g ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه (نگهداری گردید. یک میلی‌لیتر از محلول رویی درون هر لوله میکروساتریفیوژ برداشته و با ۸۰۰ میکرولیتر از اسید کلریدریک ۰/۵۶ مولار، درون یک لوله آزمایش کوچک ورتکس شد. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول ۴، ۲- دی نیتروفنیل تیدرازین (محلول ۰/۲ درصد ۴، ۲- دی نیتروفنیل تیدرازین در اسید کلریدریک دو مولار) به هر لوله افزوده شد، با انجام ورتکس، هر لوله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد خوابانده شد. پس از آن به محلول یادشده ۲ میلی‌لیتر سود ۲ مولار افزوده و آمیخته گردید تا یکنواخت شود. در پایان، دانسیته نوری (OD) در طول موج ۵۴۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (برای آماده‌سازی محلول‌های استاندارد از ماده خالص آلفا-کتوتیرات بهره‌گیری شد). نتایج برحسب نانومول آلفاکتوتیرات بر میلی‌گرم پروتئین در ساعت گزارش شد. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین نمونه‌ها از روش برادفورد استفاده شد (۱۱). براساس این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تولوئنی شده با ۱۰۰ میکرولیتر سود ۰/۱ نرمال مخلوط شد. ۵۰ میکرولیتر از

۳۰ و ۴۰ دسی‌زیمنس بر متر به دست آید. سپس دگرگونی رشد جدایه‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری محیط رشد آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و مقایسه شد.

**شناسایی جدایه برتر:** برای شناسایی باکتری برتر به روش ژنتیکی (*I6S rRNA*)، استخراج DNA با روش استاندارد انجام شد (۱۴). در آغاز کافت یاخته و دگرگون کردن پروتئین‌ها با با به کارگیری بافر کافنده (لیزوزیم، EDTA، SDS، پروتئیناز K)، انجام شد و سپس با بهره‌گیری از فنل و کلروفرم همه بخش‌ها غیر از اسیدهای نوکلئیک ته‌نشین داده شد (۱۵). در پایان، با بهره‌گیری از استات سدیم و اتانول مطلق سرد، DNA محلول ته‌نشین شد. در این پژوهش، برای تکثیر ژن *16S rRNA* جدایه برگزیده از پرایمرهای 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' (RP) و 3'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' (RP) بهره‌گیری شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۳۳</sup> با بهره‌گیری از دستگاه ترموسایکلر با شرایط تکثیر<sup>۳۴</sup> استاندارد انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر (۲۰۰ μM) Mix dNTP، ۰/۸ میکرولیتر (۵۰ mM) MgCl<sub>2</sub>، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq Polymerase انجام شد. در ادامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۳ دقیقه و اسرشت<sup>۲۵</sup> در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل و اسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال<sup>۲۶</sup> در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شده<sup>۳۷</sup> در دمای ۷۲

هر نمونه با بافر Tris-HCl (pH ۸/۵) و معرف کوماسی بلو تیمار شد و پس از ۳۰ دقیقه مقدار پروتئین با مقایسه جذب نوری با منحنی استاندارد (حاصل از پروتئین خالص آلبومین) در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد.

### آزمون بردباری در برابر تنش خشکی جدایه‌های

**باکتری:** به منظور ارزیابی توان بردباری جدایه‌ها، اندازه‌گونی از تنش خشکی، از توان رشد آنها در محیط کشت تریپتیک سوی برات دارای غلظت‌های گوناگون پلی‌اتیلن گلیکول<sup>۲۰</sup> ۶۰۰۰ بهره‌گیری شد. پایه معادله میشل و کافن<sup>۲۱</sup>، غلظت‌های صفر، ۲۰۲/۲، ۲۹۵/۷، ۳۶۷/۷، ۴۲۸/۴ و ۴۸۱/۹ گرم پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ برای هر کیلوگرم محیط کشت تریپتیک سوی برات برابر پتانسیل‌های آبی ۰، -۵، -۱۰، -۱۵، -۲۰ و -۲۵ بار بود (۱۲). اندازه‌رشد جدایه‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری<sup>۲۲</sup> محیط رشد آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر، با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد و درصد کاهش رشد هر جدایه در اندازه‌های پلی‌اتیلن گلیکول به کاررفته در برابر رشد همان جدایه در محیط تریپتیک سوی برات برآورد گردید. ۳ تکرار از محیط تریپتیک سوی برات مایه‌زنی نشده دارای اندازه‌های گوناگون پلی‌اتیلن گلیکول نیز همانند شاهد برای اندازه‌گیری میزان چگالی نوری این محیط در شرایط یادشده آماده شد (۱۳).

### آزمون بردباری در برابر تنش شوری جدایه‌های

**باکتری:** برای این کار، توان رشد جدایه‌های باکتری در محیط کشت تریپتیک سوی برات دارای اندازه‌های گوناگون نمک‌های کلرید سدیم، کلرید کلسیم و کلرید منیزیم ارزیابی شد. اندازه‌های نمک افزوده شده به گونه‌ای به کار رفت که شوری‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۰،

باکتری‌های جدا شده نشان داد که ۱۰۱ جدایه، رشد شایسته‌ای در محیط کشت دارای ACC داشته و همانند جدایه‌های سازنده آنزیم ACC-*دآمیناز* آزمایش شدند.

**فراوانی جدایه‌های باکتری سازنده آنزیم ACC-*دآمیناز*: نسبت قطر کلنی‌ها با کاربرد ACC به قطر کلنی با کاربرد کلرید آمونیوم میان صفر و ۱ بود.** فراوانی باکتری‌ها در کاربرد ACC، در بازه‌های با ۰/۱۵ اختلاف در شکل ۱- الف نشان داده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود، تنها ۲ درصد از باکتری‌ها در بالاترین بازه توان کاربرد ACC (بیش از ۰/۸۵) هستند که در آزمایش‌ها، این باکتری‌های برتر از دیدگاه توانایی ساخت آنها در تنش‌های خشکی و شوری و همچنین توان بردباری خود جدایه‌ها به تنش بررسی شدند؛ همچنین به منظور ازدست‌دادن جدایه یا جدایه‌های توانای دیگر، شماری از باکتری‌ها که همانندی چشمگیری با گروه نخست از دیدگاه توان ساخت آنزیم ACC-*دآمیناز* نداشتند نیز آزمایش شدند (جدول ۲). با بررسی فراوانی‌ها، آشکار شد که ۷۵ درصد از باکتری‌ها، بدون توان مصرف یا با توان مصرف ناچیز (کمتر از ۰/۱) بودند؛ همچنین، آشکار شد که از میان باکتری‌های جداسازی شده که سازنده آنزیم ACC-*دآمیناز* بودند (۲۵ درصد)، سهم خاک‌های شور، شور-سدمی و معمولی به ترتیب ۹، ۹ و ۷ درصد بود (شکل ۱-ب).

**تغییرات توان ساخت آلفاکتوبوتیرات در جدایه‌های باکتری:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تفاوت میان توان ساخت آلفاکتوبوتیرات در جدایه‌های باکتری در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). میان این ۱۱ باکتری، جدایه‌های *RN86*، *BN243* و *RSS33* به ترتیب با توان ساخت ۹۰۶، ۹۰۴ و ۹۰۱ نانو مول آلفاکتوبوتیرات/میلی گرم پروتئین/ساعت بیشترین اندازه

درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۶). فرآورده به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ژل آگارز ۱ درصد، بارگذاری و پس از دیدن باند ویژه آن (۱۴۰۰ bp)، به کمک راهنما<sup>۲۸</sup>، برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد (۱۷).

**تجزیه‌های آماری:** آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی<sup>۲۹</sup> (CRD) در ۴ تکرار با منبع تغییر باکتری (۱۶ جدایه باکتری برای تولید آلفاکتوبوتیرات) و در مورد تیمارهای خشکی و شوری با ۶ اندازه گوناگون تنش انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار SAS (v 9.1) انجام شد و نتایج تجزیه واریانس به دست آمد؛ سپس با بهره‌گیری از آزمون چنددامنه‌ای دانکن<sup>۳۰</sup>، میانگین داده‌ها در پایه آماری ۵ درصد با یکدیگر سنجیده شدند.

## نتایج

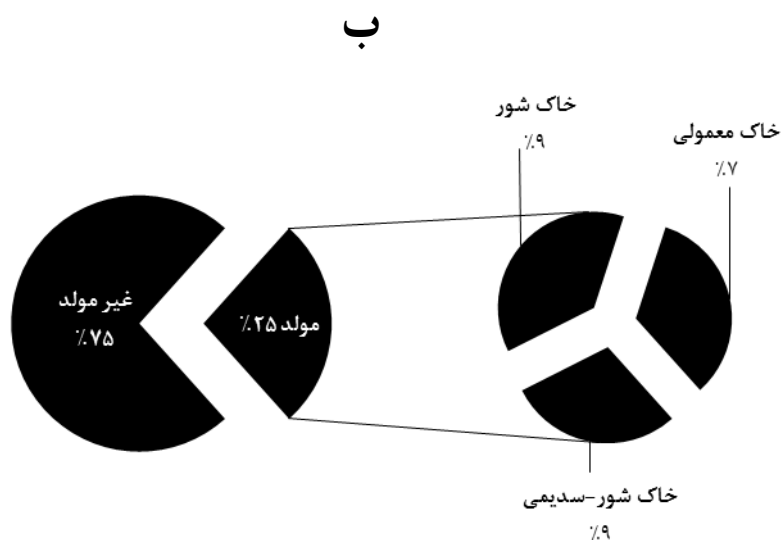
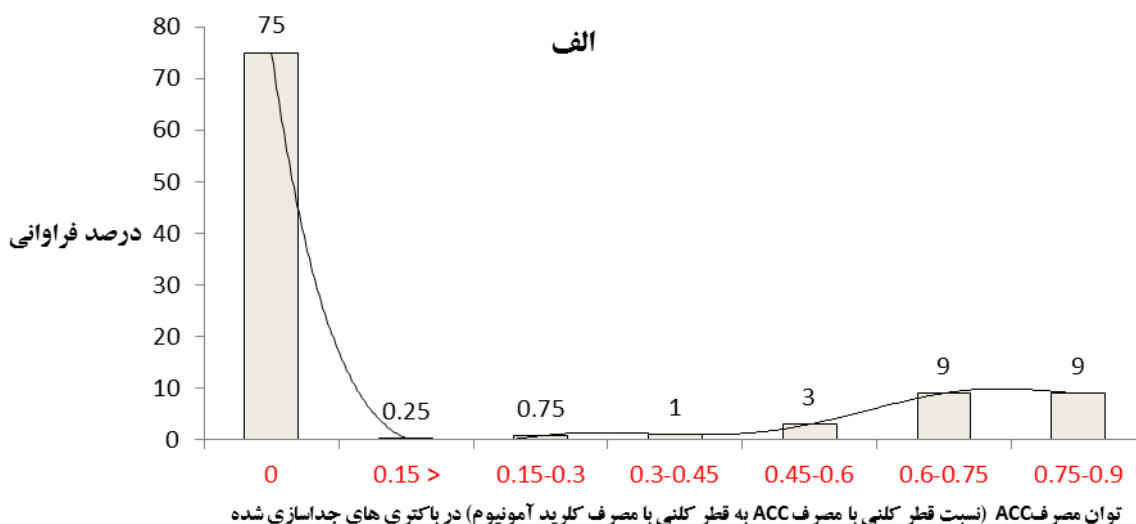
نتایج تجزیه شیمیایی خاک‌های نمونه برداری شده نشان داد که بازه شوری خاک‌ها میان ۰/۱ تا ۲۶/۳ دسی‌زیمنس بر متر و نسبت جذب سدیمی میان ۰/۱ تا ۳۰/۱۲ (میلی‌اکی‌والان بر لیتر)<sup>۳۱</sup> است. همچنین میانگین سدیم، کلسیم و منیزیم محلول خاک به ترتیب ۵۶، ۲۲ و ۱۷ میلی‌اکی‌والان بر لیتر و میانگین pH خاک‌ها، ۷/۶۱ بود. تعداد ۴۰۰ باکتری از خاک ریزوسفری و ناریوسفری جداسازی گردید. با نگاه به اندازه رشد باکتری و قطر کلنی پدید آمده در برابر شاهد مثبت، سویه‌های توانمند در ساخت آنزیم ACC-*دآمیناز* گزینش شدند. نتایج بررسی کیفی توان ساخت آنزیم در

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های توان ساخت آلفا کتوبوتیرات در باکتری‌ها

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال
تکرار	۳	<sup>ns</sup> ۱/۸۴	۰/۳۴۹
جدایه باکتری	۱۵	۶۱۲/۴*	۰/۰۱۷
خطا	۴۵	۱۲/۱	-
=۵/۶۴CV%			

\* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است.

آلفا کتوبوتیرات را ساختند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۲). هرچند تفاوت‌هایی در توان ساخت آلفا کتوبوتیرات میان جدایه‌های برتر دیده شد، ۵ جدایه که از دیدگاه مقایسه قطر کلنی‌ها، دارای توان مصرف ACC کمتری بودند (توان ۰/۸۰) هماهنگی بیشتری با توان ساخت آلفا کتوبوتیرات داشته و میان ۰/۳۹ تا ۰/۴۸ میکرومول در میلی گرم پروتئین در ساعت ساختند.



شکل ۱- مقایسه فراوانی توان مصرف ACC (الف) و نسبت باکتری‌های سازنده و غیرسازنده (ب) فراوانی نسبی جدایه‌های باکتری سازنده ACC-دآمیناز در خاک‌های نمونه‌برداری شده



جدول ۲- توان ساخت آلفاکتوبوتیرات در جدایه‌های باکتری برتر

ردیف	جدایه‌های باکتری	توان ساخت آلفاکتوبوتیرات (نانومول در میلی گرم پروتئین در ساعت)	شیب منحنی بردباری در برابر تنش	
			خشکی	شوری
۱	BSS179	۵۵۰±۴۱c	-۰/۲۰۱±۰/۰۱۸c	-۰/۱۴۱±۰/۰۱۳c
۲	BSS236	۵۱۱±۳۸c	-۰/۱۹۳±۰/۰۱۶c	-۰/۱۴۸±۰/۰۱۴c
۳	BSS167	۶۸۴±۴۳c	-۰/۲۰۵±۰/۰۱۹a	-۰/۱۳۸±۰/۰۱۴a
۴	BS132	۵۰۷±۴۳c	-۰/۱۹۴±۰/۰۱۸c	-۰/۱۴۶±۰/۰۱۲b
۵	BS58	۷۳۲±۶۱b	-۰/۱۸۸±۰/۰۱۶c	-۰/۱۵۱±۰/۰۱۴d
۶	RN84	۷۲۴±۷۴b	-۰/۲۲۱±۰/۰۲۱c	-۰/۱۴۳±۰/۰۱۲b
۷	RN86	۹۰۶±۸۷a	-۰/۲۰۹±۰/۰۱۹c	-۰/۱۳۵±۰/۰۱۱c
۸	RSS33	۹۰۱±۹۵a	-۰/۱۲۰±۰/۰۱۱d	-۰/۱۰۲±۰/۰۱۱b
۹	BSS174	۴۱۶±۵۱b	-۰/۱۵۱±۰/۰۱۴c	-۰/۱۳۴±۰/۰۱۲c
۱۰	BSS172	۴۳۱±۴۴c	-۰/۱۹۳±۰/۰۱۷c	-۰/۱۳۸±۰/۰۱۴c
۱۱	BN243	۹۰۴±۹۲a	-۰/۲۰۲±۰/۰۱۸a	-۰/۱۶۳±۰/۰۱۴a
۱۲	BSS235	۳۸۶±۴۲d	-۰/۱۴۴±۰/۰۱۳c	-۰/۱۳۱±۰/۰۱۱b
۱۳	BSS194	۳۱۳±۳۸d	-۰/۱۵۸±۰/۰۱۵c	-۰/۱۳۲±۰/۰۱۲d
۱۴	BS89	۳۵۴±۴۳d	-۰/۲۰۱±۰/۰۱۸c	-۰/۱۴۳±۰/۰۱۴b
۱۵	BS77	۳۱۳±۳۷d	-۰/۱۷۴±۰/۰۱۶c	-۰/۱۳۲±۰/۰۱۴c
۱۶	RS3	۳۹۴±۴۹d	-۰/۲۰۳±۰/۰۱۷d	-۰/۱۲۸±۰/۰۱۲b

میانگین‌هایی که با حرف یا حروف مشترک مشخص شده‌اند براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بدون تأثیر شوری و سدیمی N=، شور-سدیمی SS=، شور S=، توده خاک B=، ریزوسفر R=

درمورد جدایه *RSS33*، این شیب برابر با ۰/۱۲۱- بود (شکل ۲-الف). وضعیت کاهش چگالی نوری و مقایسه سه جدایه برتر سازنده آنزیم ACC-د/میناز در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، جدایه *RSS33* نسبت به جدایه‌های دیگر، دارای توان بردباری در برابر خشکی بیشتری بود و جدایه‌های *RN86* و *BS243* با شیب‌های ۰/۱۶۵ و ۰/۱۷۱-، توان بردباری در برابر خشکی پایین‌تری داشتند.

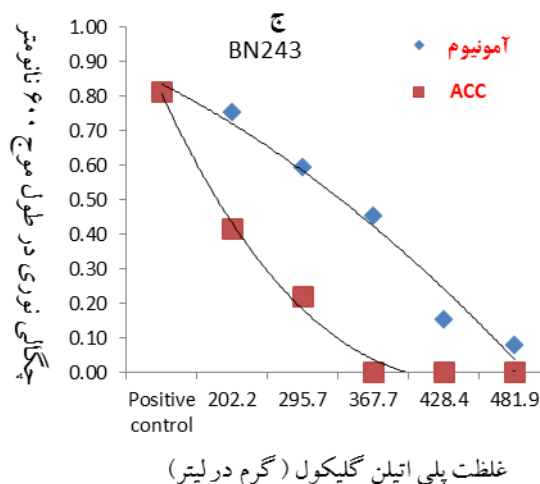
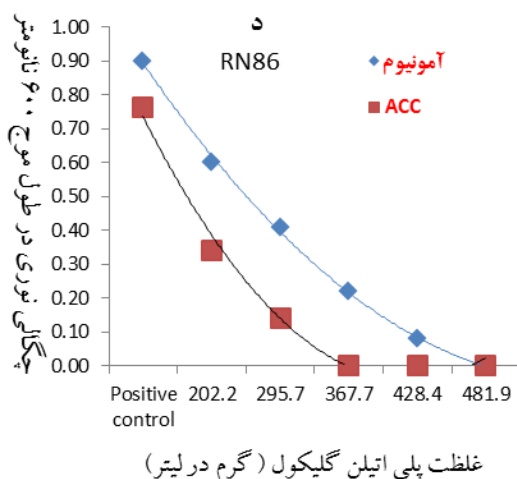
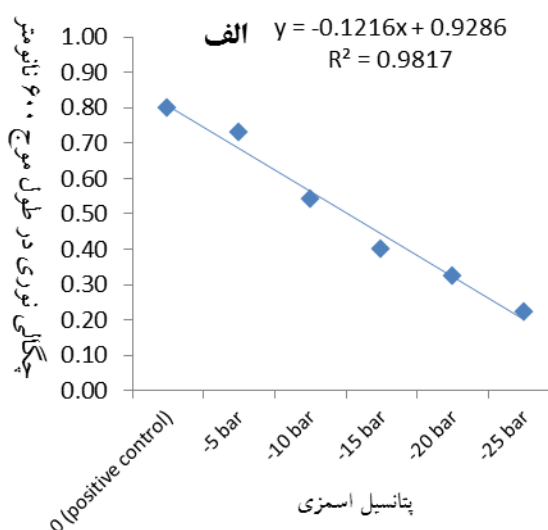
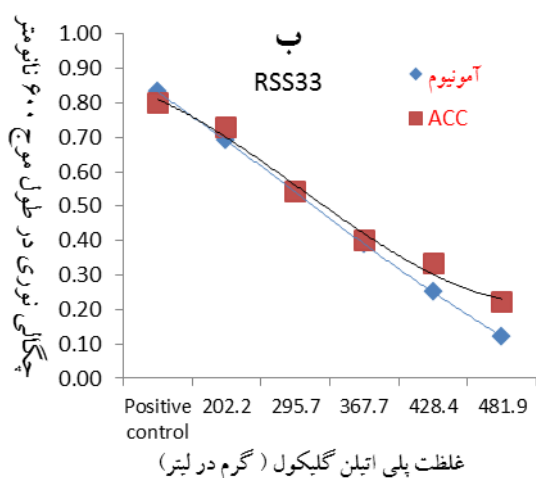
همچنین، ارزیابی توان بردباری در برابر شوری جدایه‌ها با بهره‌گیری از محلول‌های نمکی (ترکیبی از

#### مقایسه توان بردباری به تنش خشکی و شوری:

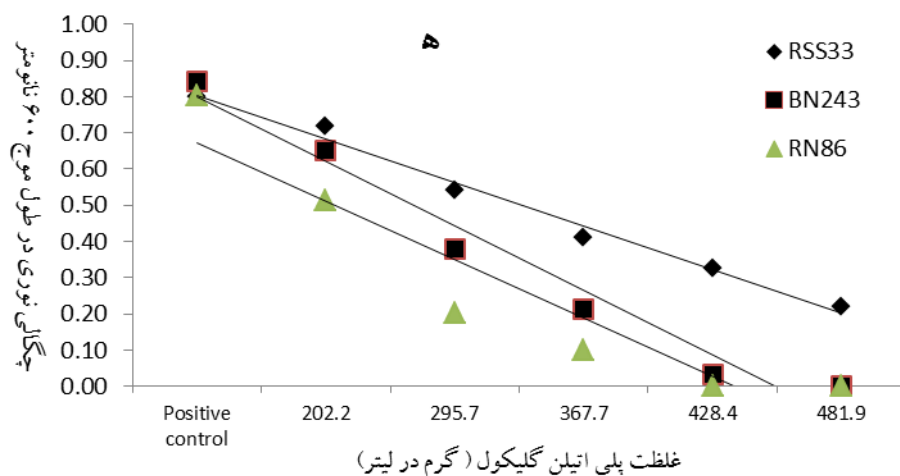
درمورد سنجش تنش خشکی، با حل کردن مقادیر مختلف ماده پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در محیط کشت باکتری، قابلیت بهره‌گیری مولکول‌های آب کاهش یافت و پتانسیل‌های اسمزی ناهمانندی ایجاد شد. همان‌طور که در شکل ۲ درمورد جدایه *RSS33* دیده می‌شود، با افزایش غلظت پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در محیط کشت، چگالی نوری ( $OD_{600}$ ) به عنوان معیاری از رشد باکتری، روند کاهش نشان داد. شیب منحنی حاصل، بیانگر شدت پاسخ جدایه باکتری به تنش ایجاد شده است. به طوری که شیب کاهش کمتر (شیب ملایم‌تر)، نشان‌دهنده بردباری نسبی بیشتر است که

*RSS33* با شیب  $0/102-$  بردبارترین جدایه و پس از آن جدایه‌های *BSS235* و *BS77* به ترتیب با شیب‌های  $0/131-$  و  $0/132-$  در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. منحنی‌های حاصل از آزمون بردباری در برابر تنش شوری در مورد جدایه‌های *BSS243* و *RN86* دارای شیب کاهشی شدیدتری نسبت به جدایه *RSS33* بود (جدول ۲).

کلریدهای سدیم، کلسیم و منیزیم) نشان داد که در این شرایط نیز، با افزایش قابلیت هدایت الکتریکی، چگالی نوری در طول موج  $600$  نانومتر تغییر یافت؛ در این حالت نیز، روند کلی شیب منحنی حاصل، شدت پاسخ جدایه‌های باکتری را به تنش شوری نشان داد؛ به طوری که شیب کاهشی کمتر، نشان‌دهنده بردباری نسبی بیشتر است. همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود جدایه



شکل ۲- (الف) پیامد تنش خشکی بر روند رشد جدایه *RSS33*، (ب) پیامد مصرف ACC و آمونیم ( $\text{NH}_3$ ) بر روند رشد جدایه *RSS33* در تنش، (ج) پیامد مصرف ACC و آمونیم بر روند رشد جدایه *BN243* در تنش، (د) پیامد مصرف ACC و آمونیم بر روند رشد جدایه *RN86* در تنش و (ه) مقایسه سه جدایه برتر سازنده آنزیم ACC-دآمیناز متأثر از تنش خشکی



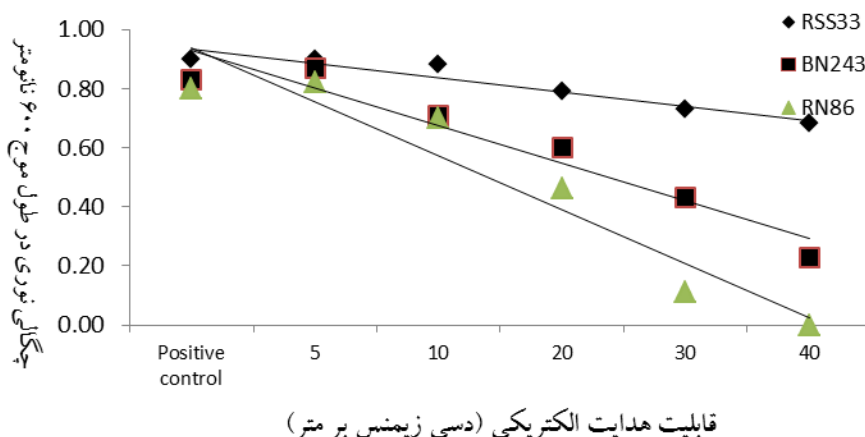
ادامه شکل ۲

می‌شود، با افزایش تنش شوری، از توان مصرف ACC در جدایه‌ها کاسته شده که به صورت کاهش رشد نمایان می‌شود. در مورد جدایه *RSS33* در برابر دو جدایه برتر دیگر، روند کاهش کندتر بود. در جدایه‌های *RN86* و *BSS243*، با مصرف ACC، کاهش شدیدتری در رشد باکتری دیده شد و می‌توان اظهار داشت که با افزایش تنش خشکی، تمایل این باکتری‌ها به جذب ACC و در واقع توانایی ساخت آنزیم ACC-دآمیناز کمتر شد.

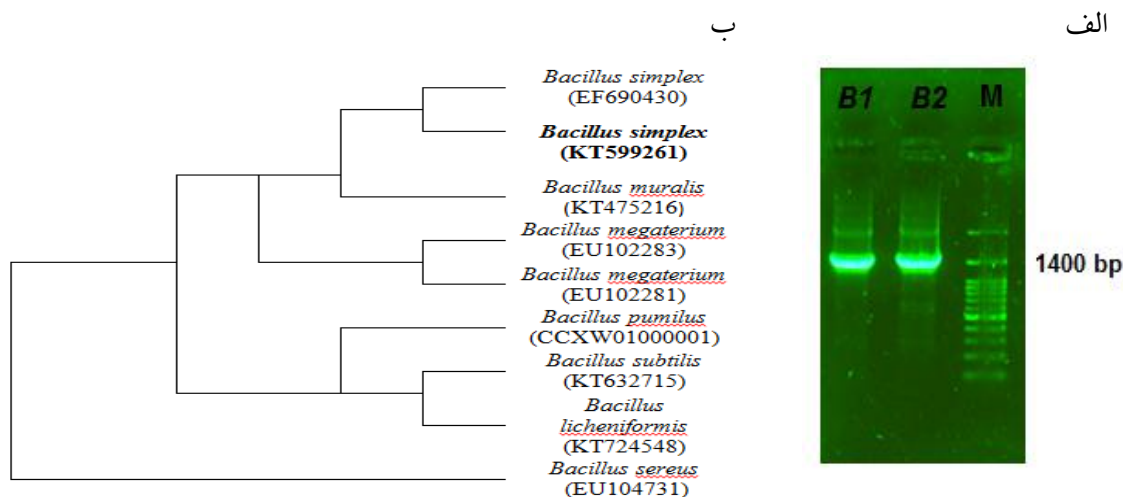
**نتیجه شناسایی جدایه باکتری برتر:** پس از انجام مراحل شناسایی ژنتیکی، نتایج تعیین توالی‌ها، به وسیله نرم‌افزار بلست<sup>۳۱</sup> بررسی شد و با توجه به میزان قرابت‌ها مشخص شد که به احتمال ۹۹ درصد این جدایه باکتری (*RSS33*)، متعلق به گونه *باسیلوس سیمپلیکس*<sup>۳۲</sup> است و در بانک ژن (Accession Number: BankIt KT599261) ثبت شد. باندا الکتروفورز و درخت فیلوژنی در شکل ۴ نشان داده شده است.

**پیامد تنش خشکی بر توان مصرف ACC در جدایه‌های باکتری:** همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، با افزایش تنش خشکی، از توان مصرف ACC در جدایه‌ها کاسته شد. در مورد جدایه *RSS33* در برابر دو جدایه برتر دیگر، این روند کندتر بود و همچنین با مقایسه دو منبع نیتروژن (آمونیم و ACC) مشخص شد که در تنش‌های بالاتر، منبع ACC از مزیت نسبی هم برخوردار بود و با مصرف آن در باکتری، کاهش کمتری در رشد جدایه *RSS33* در برابر مصرف آمونیم حاصل شد (شکل ۲-الف). در واقع با مصرف آمونیم، حساسیت باکتری به تنش خشکی بیشتر شد. در جدایه‌های *RN86* و *BSS243*، با مصرف ACC در برابر مصرف آمونیم، کاهش شدیدتری در رشد باکتری دیده شد و می‌توان اظهار داشت که با افزایش تنش خشکی، تمایل این باکتری‌ها به جذب ACC و در واقع توانایی ساخت آنزیم ACC-دآمیناز کمتر شد.

**پیامد تنش شوری بر توان مصرف ACC در جدایه‌های باکتری:** همان‌طور که در شکل ۳ دیده



شکل ۳- تغییرات رشد باکتری‌ها به‌عنوان معیاری از توان مصرف ACC در اثر تنش شوری



شکل ۴- الف): باند الکتروفوروز مربوط به تکثیر ژن *16S rRNA* باکتری باسیلوس سیمپلکس (M: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، B1: *B. simplex*؛ ب): درخت فیلوژنی براساس توالی ژن *16S rRNA* باکتری باسیلوس سیمپلکس (رسم شده با کمک نرم‌افزار MEGA.6 و بر مبنای الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه<sup>۳۳</sup>)

### بحث و نتیجه‌گیری

همچنین، مشخص شد که ۲۵ درصد از باکتری‌های جداسازی شده، با درجه‌های مختلفی، سازنده آنزیم ACC-دآمیناز بودند. ۱۲ درصد از باکتری‌های جداسازی شده از خاک در مطالعات چاودهاری و سیندهو<sup>۳۴</sup> توانا در ساخت آنزیم ACC-دآمیناز بودند (۱۸). اما دیدن فراوانی جدایه‌ها نشان داد که تعداد باکتری‌های در محدوده بالاترین توانایی، اندک (تنها

در این پژوهش، با توجه به اینکه نمونه‌برداری اولیه به تعداد زیاد و از خاک‌های ناهمانند از دیدگاه قابلیت هدایت الکتریکی نسبت جذب سطحی سدیم انجام شد، باکتری‌های جداسازی شده نیز به همان نسبت، متنوع بود و توانایی‌های ناهمانند در ساخت آنزیم ACC-دآمیناز در تنش‌های خشکی و شوری از خود نشان دادند.

۲درصد از کل باکتری‌ها) بود؛ درحالی که بیش از ۷۵درصد از جدایه‌ها، سازنده آنزیم ACC-دآمیناز نبودند. فراوانی نسبی باکتری‌های سازنده، در خاک‌های شور و شور-سدیمی در برابر خاک‌های معمولی بیشتر بود. این نتایج نشان داد که برای یافتن جدایه‌های باکتری سازنده آنزیم ACC-دآمیناز، می‌توان به خاک‌های شور و شور-سدیمی مراجعه کرد. در این پژوهش، با بهره‌گیری از چندین گام آزمون و مقایسه جدایه‌ها، یک باکتری متعلق به گونه *باسیلوس سیمپلکس* از ریزوسفر گندم در یک خاک شور-سدیمی جداسازی شد که ویژگی‌های یک باکتری برتر را برای شرایط خشکی و شور و شور-سدیمی بودن داشت. پژوهشگران مختلف مانند سیدیکی و همکاران، ساخت آنزیم ACC-دآمیناز در جنس *باسیلوس* را گزارش کردند (۳). نتایج نشان داد که این باکتری به‌ازای مصرف ACC، آهنگ رشدی همانند مصرف آمونیوم از خود نشان داد. نسبت قطر کلنی باکتری *باسیلوس سیمپلکس* با مصرف ACC در برابر قطر آن با مصرف آمونیوم برابر یک بود و همچنین این باکتری توانست ۹۰۱ نانومول آلفاکتو بوتیرات در میلی گرم پروتئین در ساعت به‌عنوان معیاری از فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز ساخت کند. براساس نتایج پژوهشگران مختلف، گونه‌های باکتری از جنس *باسیلوس* توانایی تولید مقادیر میان صفر تا ۱/۵ میکرومول آلفاکتو بوتیرات در میلی گرم پروتئین در ساعت را داشتند (۳ و ۱۹). در تنش‌های خشکی، شوری و شور-سدیمی، ترشحات ریشه‌ای به‌تبعیت از رشد گیاه، کمتر است و منابع آلی کمتری در اختیار باکتری‌ها قرار می‌گیرد؛ از طرفی، جمعیت موجودات خاکزی همانند باکتری‌ها نیز کمتر است و بنابراین توانایی

بهره‌گیری از ACC به‌عنوان یک مزیت در رابطه بین باکتری و گیاه محسوب می‌شود. نبود کاهش شدید در توان مصرف ACC در شرایط تنش‌های حاکم بر خاک‌های متأثر از خشکی، شوری و شور-سدیمی، تعیین‌کننده مؤثر بودن مایه‌زنی است و به‌تدریج با افزایش رشد و توسعه ریشه‌های گیاه، آثار متقابل باکتری و گیاه در جهت گسترش رشد هر دو موجود زنده پیش خواهد رفت. باکتری *باسیلوس سیمپلکس*، در تنش‌های خشکی و شوری، بیشتر از دیگر جدایه‌های برتر، آنزیم ACC-دآمیناز ساخت. به‌طوری که در پتانسیل‌های اسمزی و مقادیر شوری مختلف، توان مصرف ACC بیشتری در برابر دیگر جدایه‌ها داشت. اهمیت این موضوع از آنجا مشخص می‌شود که پژوهشگران مختلف، اظهار داشتند که بخشی از توانایی یک گونه گیاهی برای سازش با شرایط تنش خشکی و شوری بستگی به ریزجانداران توانا به ساخت آنزیم ACC-دآمیناز دارد (۱۹ و ۲۰). از آنجایی که بخشی از کاهش رشد گیاه در شرایط خشکی، شوری و شور-سدیمی، به افزایش اندازه اتیلن و رسیدن آن به غلظت اتیلن تنشی در بافت گیاهی مربوط می‌شود؛ بنابراین مصرف ACC (پیش‌نیاز ساخت اتیلن) در باکتری‌های بردبار به شوری و خشکی و به دنبال آن عدم ساخت اتیلن اضافی، می‌تواند جبران‌کننده این خلاء در گیاهان باشد (۲۱). همچنین این باکتری، دارای توان بردباری به تنش به خشکی و شوری (اسمو-هالوتولرنس<sup>۳۵</sup>) مناسبی در برابر سایر جدایه‌ها بود. پژوهشگران گزارش کردند که در مورد جنس *باسیلوس* تعداد گونه‌های بیشتری در برابر جنس‌های دیگر باکتری، توانایی بردباری به تنش‌های غیرزیستی<sup>۳۶</sup> مانند خشکی و شوری در سطح بالا را دارند (۲۲). این

- deaminase. *FEMS Microbiology Ecology* 2015; 91(1): 86-102.
- (5) Soleimani R. Cumulative and residual effects of zinc sulfate on grain yield, zinc, iron, and copper concentration in corn and wheat. *Journal of plant nutrition* 2012; 35(1):85-92.
- (6) Meybodi SM., Khorasani H. Biosorption of chromium by *Pseudomonas* sp. isolated from oil contaminated soils of Khuzestan. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 14(3): 101-110.
- (7) Glick BR., Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 251(1): 1-7.
- (8) Barillot CDC., Sarde CO., Bert V., Tarnaud E., Cochet N. A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Annals of Microbiology* 2013; 63(3): 471-476.
- (9) Page AL., Miller RH., Keeney DR. *Methods of Soil Analysis*. 2nd Ed. American Society of Agronomy, Madison, WI., USA; 1982.
- (10) Penrose DM., Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiology of Plants* 2003; 118(1): 10-15.
- (11) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(3): 248- 254.
- (12) Michel BE., Kaufmann MR. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 1973; 51(5): 914-916
- (13) Sandhya V., Ali SKZ., Minakshi G., Reddy G., Venkateswarlu B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils* 2009; 46(1): 17-26.

موضوع به تشکیل اندوسپور در این باکتری‌ها و تجمع ترکیبات محافظت کننده از خشکی<sup>۳۷</sup> همانند ترهالوز و گلوتامین برمی گردد؛ به طوری که پیگوت و هیلبرت<sup>۳۸</sup> نیز اظهار داشتند که اندوسپورهای باسیلوس قادرند که شرایط نامناسب محیطی را تحمل کنند (۲۳). این ویژگی، مایه این است که بتوان از آنها به شکل فرمولاسیون پودری بهره برد؛ به طوری که جمعیت‌های مورد نظر از آنها بتوانند پویایی خود را حفظ کنند. با توجه به نتایج به دست آمده، گونه باکتری باسیلوس سیمپلکس، برای انجام آزمون‌های مزرعه‌ای به عنوان باکتری کاهش دهنده تنش‌های خاک‌های شور، شور-سدیمی و مناطق خشک و نیمه خشک پیشنهاد می شود.

## References

- (1) Qadir M., Ster JD., Schubert S., Noble AD., Sahrawat KL. Phytoremediation of sodic and saline-sodic soils. *Advance in Agronomy* 2007; 96(2): 198-247.
- (2) Gamalero E., Glick BR. Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. In: Ahmad P., Prasad MNV. editors. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*, Springer-Verlag, Berlin; 2012: 395-412.
- (3) Siddikee MDA., Sundaram S., Chandrasekaran M., Kim, K., Selvakumar G., Tongmin S. Halotolerant bacteria with ACC deaminase activity alleviate salt stress effect in canola seed germination. *Journal of Korean Society Applied Biology and Chemistry* 2015; 58(2): 237-241.
- (4) Li Z., Chang S., Ye S., Chen M., Lin L., Li Y., Li S., An Q. Differentiation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from its homologs is the key for identifying bacteria containing ACC

- (14) Dauphin L., Moser A., Bowen MD. Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. *Journal of Microbiology Methods* 2009; 76(1): 30-37.
- (15) Maciel BM., Santos ACF., Dias JCT., Vidal RO., Dias RGC., Gross E., Cascardo JCM., Rezende RP. Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical land farm soil used for bioremediation of oil waste. *Genetic and Molecular Research* 2009; 8(1): 375-388.
- (16) Hebron HR., Yang Y., Hang J. Purification of genomic DNA with minimal contamination of proteins. *Journal of Biomolecular Technology* 2009; 20(3): 278-281.
- (17) Parmeela S., Johri BN. Phylogenetic analysis of bacterial endophytes showing antagonism against *Rhizoctonia solani*. *Current Science* 2004; 87(5): 687-692.
- (18) Chaudhary D., Sindhu SS. Inducing salinity tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by inoculation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-containing *Mesorhizobium* strains. *African Journal of Microbiology Research* 2015; 9(2): 117-124.
- (19) Nadeem SM., Zahir ZA., Naveed M., Nawaz S. Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. *Annals of Microbiology* 2013; 63(3): 225-232.
- (20) Alikhani HA., Saleh Rasteen N., Bihamta M. The Evaluation of IAA and ACC deaminase production ability by Iranian soils rhizobial strains and the effects of superior strains application on plant growth characteristics. *Iranian Journal of Agricultural Science* 2007; 38(4): 693-703.
- (21) Shaharoon B., Muhammad A., Rashid W., Khalid A. *Role of ethylene and plant growth-promoting rhizobacteria in stressed crop plants*. In: Venkateswarlu B., Shanker AK., Shanker C., Maheswari M., editors. *Crop stress and its management: Perspectives and Strategies*. Springer Science; 2012: 429-446.
- (22) Wang QF., Li W., Liu YL., Cao H., Li Z., Guo GQ. *Bacillus qingdaonensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a crude sea-salt sample collected near Qingdao in eastern China. *International journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 2007; 57(2): 1143-1147.
- (23) Piggot PG., Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*, *Current Opinion in Microbiology* 2004; 7(6): 579-586.

- 
- <sup>1</sup> - Secondary salinization
  - <sup>2</sup> - Minimal Bioproductivity
  - <sup>3</sup> - ESP (Exchangeable sodium percentage)
  - <sup>4</sup> - SAR (Sodium adsorption ratio)
  - <sup>5</sup> - Gamalero & Glick
  - <sup>6</sup> - Siddikee
  - <sup>7</sup> - 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate
  - <sup>8</sup> - Cleaving & Sequestering
  - <sup>9</sup> - ( $\alpha$ -KB)  $\alpha$ -ketobutyrate
  - <sup>10</sup> - EC (Electrical conductivity)
  - <sup>11</sup> - Complexometry
  - <sup>12</sup> - Flame photometry
  - <sup>13</sup> - Isolation
  - <sup>14</sup> - Purification
  - <sup>15</sup> - Slant Agar Medium
  - <sup>16</sup> - Dworkin foster
  - <sup>17</sup> - Penrose & Glick
  - <sup>18</sup> - Tryptic soybean broth
  - <sup>19</sup> - Vertex
  - <sup>20</sup> - PEG (Poly Ethylene Glycole) 6000
  - <sup>21</sup> - Michel & Kaufmann
  - <sup>22</sup> - OD (Optical density)
  - <sup>23</sup> - PCR (Polymerase chain reaction)
  - <sup>24</sup> - Amplification
  - <sup>25</sup> - Denaturing
  - <sup>26</sup> - Annealing
  - <sup>27</sup> - Extension
  - <sup>28</sup> - Ladder
  - <sup>29</sup> - Completely Randomized Design
  - <sup>30</sup> - DMRT (Duncan's multiple range test)
  - <sup>31</sup> - Blast
  - <sup>32</sup> - *Bacillus simplex*
  - <sup>33</sup> - Neighbor-joining
  - <sup>34</sup> - Chaudhary & Sindhu
  - <sup>35</sup> - Osmo-halotolerant
  - <sup>36</sup> - Abiotic tensions
  - <sup>37</sup> - Xeroprotectant
  - <sup>38</sup> - Piggot & Hilbert