Identification of halophile bacteria from salt deserts of Iran and study some of their physiological traits

Maryam Safdarian*
PhD student of Molecular physiology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, msafdarian7@yahoo.com
Hossein Askari
Associate Professor of Molecular physiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, askarihossein@yahoo.com
Masoud Soltani Najafabadi
Associate Professor of Plant breeding, Seed and Plant improvement institute, Karaj, Iran, masoodsoltani@yahoo.com
Ghorbanali Nematzadeh
Professor of Molecular genetics, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, gh.nematzadeh@gmail.com

Abstract

Introduction: Halophiles and halotolerant microorganisms are some of the extremophiles that are able to grow in medium containing sodium chloride and have adapted to life in salinity environments. Halophiles bacteria in saline soils by maintaining the food chain, decomposition of organic matter and improvement of soil structure and fertility improve soil conditions.

Materials and methods: In order to isolate the halotoletant bacteria, from the halophyte rhizosphere, four desert areas in Golestan province were sampled. To check the Extremophile of isolates, their resistance was tested for resistant to salinity, drought, temperature and PH. Also, plant growth promoting traits were measured.

Results: From forty-five strains which were isolated, three strains (G3, G6 and G14) have demonstrated the ability of resistance to 35% salt. Isolates G6 and G3 phosphate solubiliziation power of 301 and 201 ppm, respectively. Isolated G6 micrograms produced auxin 20/7 Mg/ ml. G14 and G6 grow at 50 °C, pH = 10 and osmotic potential -0 /7MPa. While G3 strain grows at 50 °C, pH = 7/ 5 and osmotic potential -0/49. The three strains of the bacterial genera *Bacillus* and *Pseudomonas*, respectively.

Discussion and conclusion: In this study, isolates due to the growth in concentrations of salt and saturated salt tolerance of extreme environmental conditions and are likely halotolerant or halophile bacteria and its potential for use in various fields of biotechnology including biotech, industrial enzyme production and biological fertilizers for saline soil improvement.

Key words: Auxin, *Bacillus*, Halotoerant, Halophile, *Pseudomonas*, Phosphate solubility, Salt

* Corresponding author
Received: March 1, 2016/ **Accepted:** July 3, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۲، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۴۵- ۵۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۱۳

شناسایی باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ شوری از خاک‌های شور گلستان و بررسی برخی صفات فیزیولوژیک آنها

مریم صفدریان*: دانشجوی دکترای فیزیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران، msafdarian7@yahoo.com
حسین عسکری: استادیار فیزیولوژی مولکولی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، ایران، askarihossein@yahoo.com
مسعود سلطانی نجف‌آبادی: استادیار اصلاح نباتات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، کرج، ایران، masoodsoltani@yahoo.com
قربانعلی نعمت زاده** : استاد ژنتیک مولکولی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران، gh.nematzadeh@gmail.com

چکیده

مقدمه: میکروارگانیسم‌های هالوفیل (نمک‌دوست) و هالوتولرانت (تحمل‌کنندهٔ نمک) گروهی از افراطی پسندها که قادر به رشد در محیط واجد نمک سدیم‌کلراید هستند و برای زندگی در محیط‌های شور تطابق یافته‌اند. وجود باکتری‌های نمک‌دوست در خاک‌های شور ازطریق حفظ چرخهٔ غذایی، تجزیهٔ مواد آلی و بهبود ساختمان و حاصلخیزی خاک شرایط خاک را بهبود می‌بخشد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور جداسازی باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ شوری، از ریزوسفر گیاهان شورپسند، چهار منطقهٔ بیابانی در استان گلستان نمونه‌گیری شد. برای بررسی میزان اکسترموفیل‌بودن جدایه‌ها، مقاومت آنها به شوری، خشکی، دما و pH بررسی شد و.همچنین صفات محرک رشد آنها نیز اندازه‌گیری گردید.

نتایج: از چهل و پنج جدایهٔ به‌دست‌آمده، سه جدایه (G3، G6 و G14) مقاومت ۴۰ درصدی به شوری را نشان دادند. جدایه‌های G6 و G3 به‌ترتیب دارای قدرت حل‌کنندگی فسفات به‌میزان ۳۰۱ و ۲۰۱ میلی‌گرم بر لیتر بودند. جدایهٔ G6 ۲۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر اکسین تولید کرد. جدایهٔ G14 وG6 در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، pH=۱۰ و پتانسیل اسمزی ۰/۷- مگاپاسکال رشد داشتند؛ درحالی‌که جدایهٔ G3 در دمای ۵۰ درجه، درpH=۷/۵ و پتانسیل اسمزی ۰/۴۹- رشد داشتند. این سه سویه مربوط به جنس‌های باکتریایی *Bacillus* و *Pseudomonas* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: در مطالعهٔ حاضر جدایه‌های جداشده به‌دلیل رشد در غلظت‌های اشباع نمک و تحمل شرایط سخت محیطی، باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ شوری و یا احتمالاً نمک‌دوست است و پتانسیل استفاده در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژیکی ازجمله تولید آنزیم‌هایی صنعتی و کودهای بیولوژیکی برای اصلاح خاک‌های شور را دارد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، باکتری تحمل‌کنندهٔ شوری، *باسیلوس*، *سودوموناس*، شوری، حل‌کنندگی فسفات

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران
** دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران

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

باکتری‌ها و آرکی‌ها میکروارگانیسم‌های غالب در شوره‌زارها[1] هستند (۱ و ۲). سازگاری آنها می‌تواند به‌دلیل بالابودن فشار اسمزی، تجمع املاح آلی در سیتوپلاسم آنها و ایجاد تعادل اسمزی باشد. دریاچه‌های نمک، حوضچه‌های استخراج نمک، شورابه‌ها و خاک‌های بسیار شور و خشک، زیستگاه طبیعی باکتری‌ها و آرکی‌های نمک‌دوست هستند (۱ و ۳). این‌گونه میکروارگانیسم‌ها در چنین شرایط سخت طبیعی با تنش‌های فراوان ازجمله غلظت‌های بالای نمک، خشکی شدید و تابش نور فرابنفش خورشید مقابله می‌کنند و با تنظیم فشار اسمزی بقای خود را تضمین می‌کنند (۴ و ۵). در سال‌های اخیر، پتانسیل استفاده از این ارگانیسم‌ها در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژی دارویی، زیست‌پالایی، کودهای زیستی و غیره به‌شدت مورد توجه قرار گرفته است. پتانسیل بالای این ارگانیسم‌ها به‌دلیل خصوصیات منحصربه‌فرد، متابولیسم متفاوت و سازگاری آنها به شوری بالا است که سبب تسهیل در استفاده از آنها برای بسیاری از فرایندهای صنعتی می‌شود؛ برای مثال هنگام کار با آنها به استریلیزاسیون نیازی نیست. باکتری‌های اکسترموفیل (میکروارگانیسم‌هایی را که قادر به زندگی در زیستگاه‌هایی با دمای بالا و پایین، pH قلیایی و اسیدی، فشار هیدروستاتیک بالا و غلظت بالای نمک هستند) به‌جهت سازگاری با شرایط سخت زیستی به‌عنوان منابع ارزشمندی برای شناسایی و تخلیص آنزیم‌های مورداستفاده در صنایع مختلف مانند آمیلاز، پروتئاز، نوکلئاز، لیپاز، ایزومرازها و هیدرولازهای جدید که در غلظت‌های نمکی بالا پایداری خود را حفظ می‌کنند مطرح هستند (۱، ۲و ۵).

میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست به‌دلیل مقدار بالای نمک در درون سلول، تعادل اسمزی ایجاد می‌کنند، گاهی غلظت نمک (به‌خصوص پتاسیم کلرید) در درون سلول ممکن است به ۵ مولار هم برسد. پروتئین‌های هالوفیل‌ها به‌نحوی سازگار شده‌اند که برای پایداری و فعالیت مناسب به این میزان نمک نیاز دارند (۳). هالوتولرانت‌ها طیف وسیعی از باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند که در برابر نمک مقاوم هستند؛ بدین معنی که در حضور نمک و یا غیاب آن می‌توانند رشد و تکثیر داشته باشند. معمولاً این باکتری‌ها که روی مواد غذایی حاوی ۵درصد یا بیشتر نمک می‌توانند رشد کنند، شامل بعضی از انواع *Bacillus*، *Microcucus*، *Corynebacterium*، *Streptococcus* و *Clostridium* هستند (۵).

از راهکارهای نوین برای مقابله با تنش شوری در گیاهان و کاهش آثار زیان‌بار آن معرفی میکروارگانیسم‌های تحمل‌کنندهٔ شوری است که بهبوددهندهٔ رشد گیاه نیز هستند. گیاه‌پالایی (استفاده از گیاهان تحمل‌کنندهٔ شوری) و یا اصلاح زیستی (با استفاده از میکروارگانیسم‌های تحمل‌کنندهٔ شوری) برای اصلاح خاک‌های شور در مقیاس وسیع ازجملهٔ این روش‌ها است (۶ و ۷). برخی از باکتری‌های جداسازی‌شده از مناطق شور شامل *Flavobacterium, Azospirillum, Alcaligens, Acetobacterium* و *Pseudomonas* است. باکتری‌های نمک‌دوست و تحمل‌کنندهٔ شوری در اطراف ریشهٔ گیاهان می‌توانند آثار تنش شوری را کاهش دهند و حاصلخیزی خاک را بهبود ببخشند (۲). باکتری‌های محرک رشد جداسازی‌شده از مناطق شور مقاومت به مقادیر بالای نمک را نشان می‌دهند و باعث افزایش مقاومت گیاه دربرابر تنش شوری اطریق هدایت هیدرولیکی، تجع اسمزی، ازبین‌بردن آثار سمی یون سدیم، حفظ هدایت اسمزی بالاتر و فتوسنتز بیشتر می‌شود (۸). باکتری‌های ریزوسفری می‌توانند از افزایش غلظت اتیلن در گیاهان در هنگام بروز

تنش جلوگیری کند و سبب کاهش آثار منفی این هورمون در رشد و توسعه اندامهای گیاهی به ویژه ریشه شوند. باکتری‌های محرک رشد می‌توانند ازطریق تولید آنزیم *ACD*آ*مینـاز* (۱- آمینوسیکلوپروپان ۱-کربوکسیلات) میزان تولید اتیلن را تنظیم کنند. این آنزیم به‌صورت غیرمستقیم و عمدتاً ازطریق کاهش سطح اتیلن در گیاه باعث تداوم رشد گیاه می‌شود (۹). همچنین باکتری‌های محرک رشد با مکانیسم‌های مختلفی همچون تثبیت نیتروژن مولکولی، انحلال فسفر نامحلول، تولید سیدروفور میکروبی، تولید هورمون‌های گیاهی ازقبیل اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها و کاهش غلظت اتیلن می‌توانند باعث افزایش رشد شوند (۲ و ۱۰). برای شناسایی و توصیف تکامل نژادی باکتری‌ها از تجزیه و تحلیل ژن *16SrRNA* استفاده می‌شود. ژن‌های *16SrRNA* برای زنده‌ماندن همهٔ موجودات ضروری هستند و همچنین ردیف بازهای آلی در این ژن‌ها به‌شدت محافظت می‌شود. به همین دلیل تعیین ردیف بازهای آلی ژن *16SrRNA* به‌عنوان یک روش استاندارد برای شناسایی گونه‌ها، جنس‌ها و باکتری‌ها به کار می‌رود. اخیراً ردیف بازهای آلی فقط در بخش کوچکی از ژن *16SrRNA* برای تشخیص باکتری‌های در سطح جنس یا سطوح بالاتر استفاده می‌شود. از جمله اهداف موردنظر در پژوهش پیش رو جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد تحمل‌کنندهٔ شوری، و بررسی مقاومت به خشکی، حرارت و اسیدیتهٔ محیط در این باکتری‌ها است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک: نمونه‌گیری از عمق ۳۰سانتی‌متری خاک چهار منطقهٔ بیابانی از بیابان‌های شور استان گلستان (اینچه برون، آق قلا، گمیشان و سیمین شهر) در مهرماه ۱۳۹۲ صورت گرفت. نمونه‌های خاک در داخل کیسه‌های نایلونی قرار گرفتند و برای به‌حداقل‌رسیدن تبخیر به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان منتقل گردیدند و در دمای ۴ درجه سانتیگراد (یخچال) نگهداری شدند.

جداسازی باکتری‌ها: برای جداسازی باکتری‌ها یک گرم از نمونهٔ خاک در ۹ میلی‌لیتر از محلول نمکی استاندارد (۰/۸۵درصد نمک طعام) حل شد و به‌مدت یک ساعت روی شیکرانکوباتور با دور ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت و تا رقت 10^{-11}رقیق شد. ۶۰ میکرولیتر از سوسپانسیون خاک روی چند محیط کشت پخش و در دمای ۲ ± ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. کلونی‌هایی که مورفولوژی متفاوتی داشتند، انتخاب شدند و با کشت متوالی خالص‌سازی و برای مطالعات بیشتر در دمای۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در این آزمایش از محیط‌های کشت (جدول ۱) برای باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ شوری برای جداسازی باکتری‌ها استفاده شد.

جدول ۱- نام محیط کشت و ترکیبات آنها

نام محیط کشت	ترکیبات (گرم بر لیتر)
NA	Nutrient Brouth: 8, Agar: 15
TSA	Tryptone: 15, Soytone: 5, Sodioum Chloride: 5, Agar: 15
LBA	LB: 25, Agar: 15
GYA	Glycerol: 5, Yeast Extract: 2, Dipotassium phosphate: 1, Agar: 15
A	NaCl: 174, $MgSO_4.7H_2O$: 0.1, $(NH_4)_2SO_4$: 2, K_2HPO_4: 3.12, NH_4CL: 2, Glucose: 10

مقاومت به شوری: برای بررسی میزان مقاومت به شوری جدایه‌ها، آنها در محیط کشت مایع نوترینت براث با غلظت‌های بدون شوری (شاهد)، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۵ و ۴۰درصد کلریدسدیم کشت داده شدند. میزان رشد جدایه‌ها (با اندازه‌گیری چگالی نوری در ۶۶۰ نانومتر) اندازه‌گیری شدند.

مقاومت به خشکی: محیط کشت مایع با پتانسیل‌های مختلف (۰/۵۰ ، ۰/۱۵-، ۰/۰۳-، ۰/۴۹-، و ۰/۷۳- مگاپاسکال) با اضافه‌کردن غلظت‌های مناسب از پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG 6000) تهیه و با ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت مایع باکتریایی تلقیح شدند. از هر غلظت سه تکرار تهیه شد؛ سپس در دمای ۲ ± ۳۰ درجه سلسیوس و با ۱۲۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. رشد باکتری‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد (۱۱).

مقاومت به pH بالا: باکتری‌ها در محیط کشت مایع نوترینت براث با pHهای مختلف ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۹ و ۱۰ کشت داده شدند. باکتری‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲ ± ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند؛ سپس جذب نوری محیط حاوی باکتری‌ها در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (۱۲).

مقاومت به درجه حرارت: به‌منظور بررسی اثر تنش حرارتی یک لوپ از کشت تازه باکتری در لوله‌های ۳۰میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر نوترینت براث تلقیح و به‌مدت ۸ ساعت در شیکر انکوباتور قرار داده شد تا جمعیت باکتریایی به 2×10^{8} cfu/ml برسد. لوله‌های کشت‌شده را به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده و سپس جذب نوری آنها در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (۳).

تخمین کمی ایندول۳- استیک‌اسید (IAA): برآورد میزان اکسین با روش بریک و همکاران (۱۹۹۱) و با استفاده از اسپکتروفتومتری انجام شد. نمونه‌های باکتری که به‌مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت نوترینت برات همراه با ال-تریپتوفان (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ۲درصد نمک طعام در ۳۰ درجه سانتیگراد رشد کرد و با معرف سالکوسکی[۲] (۵۰ میلی لیتر، ۳۵درصد از اسیدپرکلریک، ۱ میلی‌لیتر ۰/۵ مولار محلول $FeCl_3$) به نسبت ۱:۱ مخلوط شدند. تولید اکسین به‌صورت درجاتی از رنگ صورتی نشان داده می‌شود و چگالی نوری آن، در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. غلظت اکسین تولیدشده با تهیهٔ منحنی استاندارد از اکسین در محدودهٔ ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد شد (۱۳).

حلالیت فسفات: برای شناسایی قدرت حل‌کنندگی فسفات باکتری‌ها، هر جدایه به‌طور جداگانه روی محیط کشت جامد پیکوفسکی (PKV) حاوی ۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم تری‌کلسیم‌فسفات، ۰/۵ گرم عصارهٔ مخمر، ۰/۵ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۲ گرم کلرید سدیم، ۰/۱گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۰۰۳گرم سولفات آهن، ۰/۰۰۰۳گرم سولفات منگنز و ۱۰ گرم آگار در لیتر با اسیدیتهٔ ثابت ۷ (محیط کشت جامد) کشت شد و پتری‌ها در دمای ۲±۳۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۵ روز نگهداری شدند. برای شناسایی قدرت حل‌کنندگی فسفات از خصوصیت شفاف‌سازی محیط پیرامون کلنی استفاده شد (۳)؛ سپس هر جدایه به‌صورت جداگانه در محیط کشت مایع پیکوفسکی به‌مدت ۱۰۰ ساعت (با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه) و در دمای ۲±۳۰ درجه سانتیگراد کشت داده شد. در پایان، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت از هر فالکون برداشته و به ویال‌های ۲میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس برای حذف باکتری و مواد جامد موجود در محیط کشت، ویال‌ها به‌مدت ۱۰

دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی شفاف هر ویال به ویال‌های جدید منتقل گردید (۱۴ و۱۵). درنهایت فسفر قابل‌استفاده با روش پیشنهادشده توسط واتانابی و السن[۳] (۱۴) اندازه‌گیری شد.

سیدروفور: اندازه‌گیری سیدروفور تولیدشده توسط باکتری‌ها با استفاده از روش کاس شاتل[۴] (۱۶) صورت گرفت. باکتری‌های کشت‌شده در محیط حداقل آهن و در دمای (۲±۳۰) درجه سلسیوس کشت شدند؛ سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۲۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول کاس به مایع رویی کشت به نسبت مساوی اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. در صورت وجود سیدروفور، آهن از ترکیب رنگی حذف و باعث کاهش در شدت رنگ آبی می‌شود. شدت رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۳۰ نانومتر خوانده می‌شود. برای اندازه‌گیری میزان سیدروفور، محیط حداقل به‌عنوان شاهد استفاده شد و درصد سیدروفور با استفاده از فرمول [(Ar–As)/Ar] × 100، محاسبه شد که در آن، به Ar = جذب مرجع (محیط حداقل + محلول تولیدشده به‌روش کاس)، As= جذب نمونه است. (۱۶).

اندازه‌گیری میزان اسیدسیانیدریک (HCN): بررسی تولید HCN، به‌روش نمک الی یا معدنی اسیدپیکریک (۱۰) انجام شد. باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت براث حاوی ۴/۴درصد گرم گلیسین کشت داده شدند؛ سپس کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) آغشته به محلول ۲درصد کربنات سدیم و ۵/۰درصد اسیدپیکریک روی محیط کشت قرار داده شد و در انکوباتور با دمای ۲± ۲۸ درجه سانتیگراد به‌مدت ۹۶ ساعت قرار گرفتند. تولید HCN توسط تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد تا نارنجی قهوه‌ای نشان داده می‌شود (۱۷).

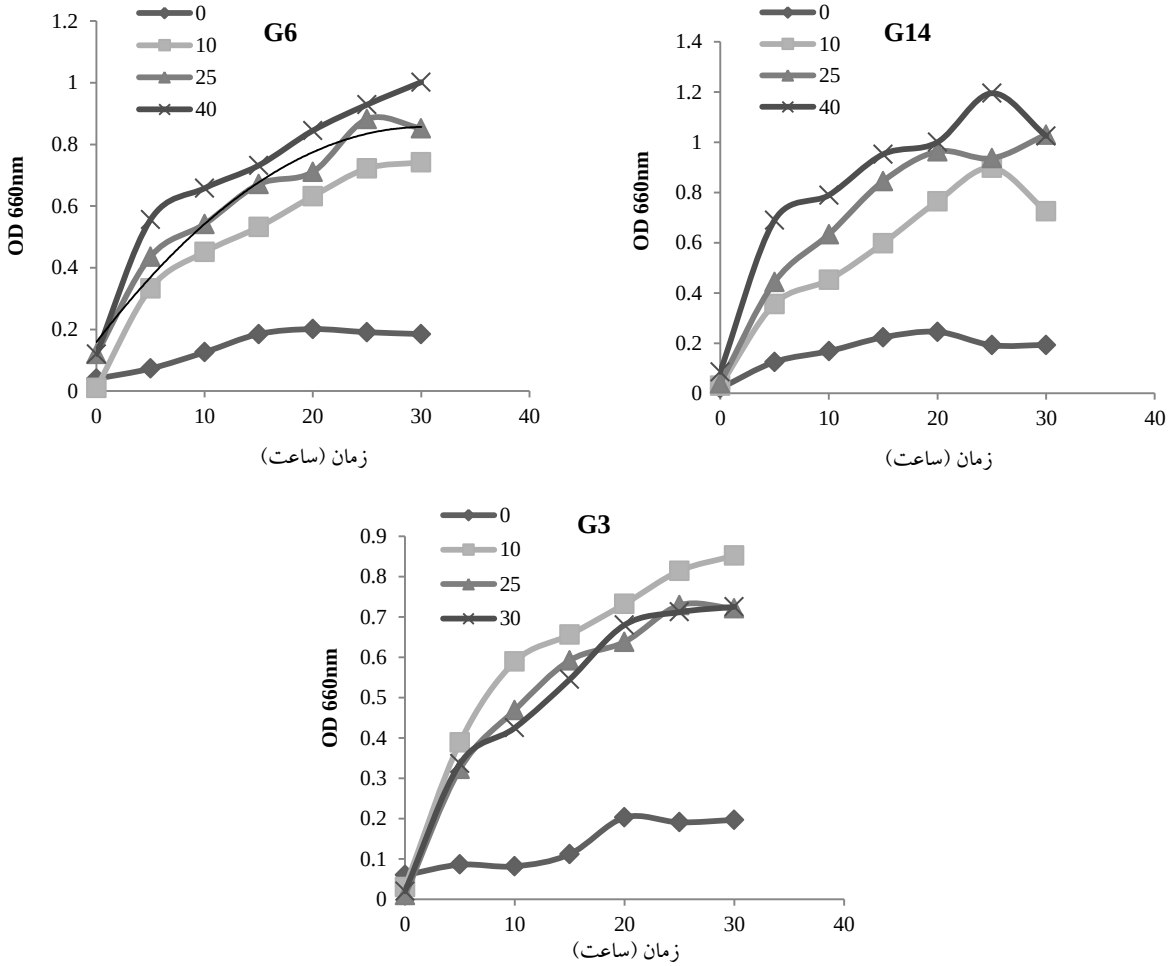
بررسی مولکولی: استخراج DNA به‌روش فنل-کلروفرم انجام گرفت (۳) به‌منظور انجام واکنش PCR و تکثیر ژن *16SrDNA* با طول ۱۵۰۰ bp، از پرایمرهای 27F, 5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′ و 1525R, 5′-AAGGAGGTGATCCAGCC-3′ استفاده شد (۱۲). هر واکنش ۲۵میکرولیتری شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mixes kit (Thermo Scientific, USA)، ۵۰ نانوگرم DNA و ۲۰pmol از هر پرایمر بود. شرایط PCR شامل دمای واسرشت‌سازی ۹۴ درجه به‌مدت ۵ دقیقه، به‌همراه ۳۵ سیکل حرارتی با دمای ۹۴ درجه به‌مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه به‌مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجه به‌مدت ۲ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. به‌منظور خالص‌سازی محصول PCR از روی ژل آگارز (یک‌درصد) بریده و توسط کیت خالص‌سازی (MN آلمان) خالص شد و توالی‌یابی توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گرفت.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی: توالی ژن *16SrDNA* باکتری‌های موردنظر که مشابه با توالی‌های 16SrDNA سایر باکتری‌ها در بانک ژنی GenBank/EMBL/DDBJ بودند ازطریق برنامهٔ BLASTN مقایسه و با نرم‌افزار MEGA6 هم‌ردیف[۵] شدند. آنالیز فیلوژنی و رسم درخت فیلوژنتیک براساس الگوریتم Neighbor-joining phylogeny انجام شد (۱۸).

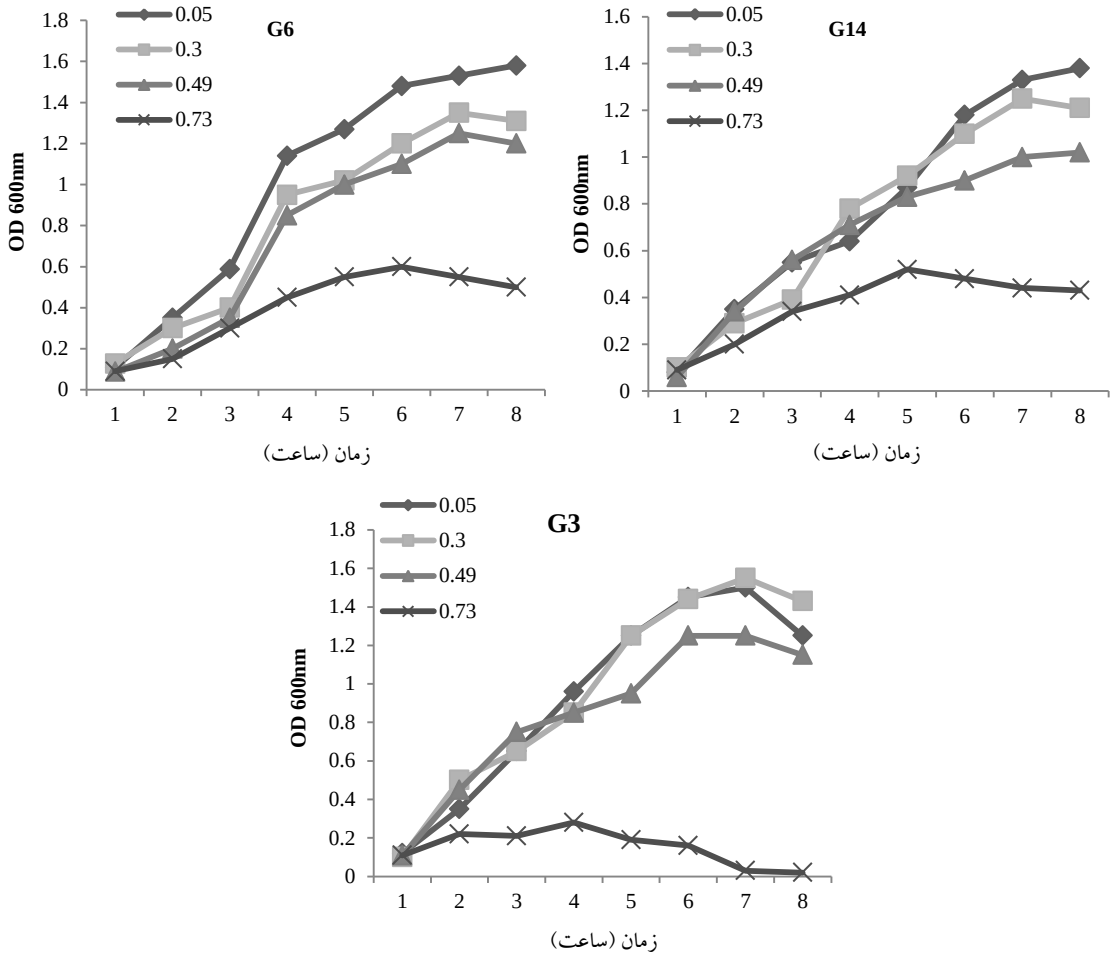
نتایج

خالص‌سازی باکتری‌ها: از مناطق نمونه‌گیری‌شده با شوری ۴۰ دسی‌زیمنس بر متر ۴۵ جدایه، جداسازی و خالص‌سازی شد. از میان این جدایه‌ها، ۳۰ جدایه توانایی

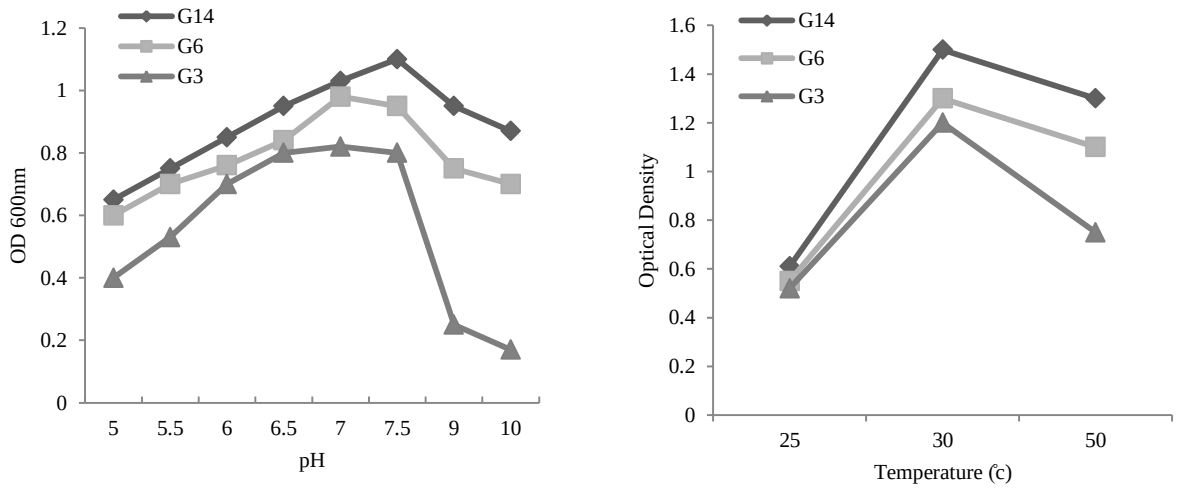
تحمل ۵درصد شوری، ۱۰جدایه توانایی تحمل ۰/۷- مگاپاسکال، ۱۵ جدایه توانایی تحمل دمای ۵۰ درجه و pH= ۱۰ را داشتند. ۱۰ جدایه هم تا حدودی مقاومت به هر چهار تنش را نشان دادند. سه جدایهٔ G14، G6 و G3 بالاترین میزان مقاومت به تنش‌های غیرزیستی (شوری، خشکی و pH) را نشان دادند. جدایهٔ G14 وG6 در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، pH=۱۰، پتانسیل اسمزی ۰/۷- مگاپاسکال و شوری ۴۰درصد مقاومت داشتند. بهترین رشد G6 در شوری ۱۰-۲۵درصد G14 در شوری ۱۰-۳۰درصد مشاهده شد (شکل ۲ و ۳)؛ درحالی‌که جدایهٔ G3 در ۳۰ درصد شوری، دمای ۵۰ درجه، pH=۷/۵ و پتانسیل اسمزی ۰/۴۹- را تحمل کرد و بهینهٔ رشد این جدایه در شوری ۱۰درصد مشاهده شد (شکل ۱، ۲ و۳). ارزیابی سه جدایه برای حل‌کنندگی فسفات، تولید اکسین، اسیدسیانیدریک و تولید سیدروفور انجام شد. نتایج نشان داد از بین سه جدایه، جدایه‌های G6 و G3 به‌ترتیب دارای قدرت حل‌کنندگی فسفات به‌میزان ۳۰۱ و ۲۰۱ میلی‌گرم بر لیتر بودند. جدایهٔ G6 قادر به تولید ۲۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر اکسین پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون بود؛ هیچ‌کدام از جدایه‌ها HCN و سیدروفور تولید نکردند (جدول ۲).



شکل ۱- رشد جدایه‌های G6, G14 و G3 در محیط کشت مایع و نوترینت براث حاوی درصدهای متفاوت نمک (نشان‌داده‌شده در نمودار). رشد باکتری‌ها با OD 660 nm نشان داده شده است.



شکل ۲- رشد جدایه‌های G6, G14 و G3 در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن گلیکول در پتانسیل‌های (۰/۰۵-، ۰/۳-، ۰/۴۹- و ۰/۷۳- مگاپاسکال). رشد باکتری‌ها با OD 600 nm نشان داده شده است.



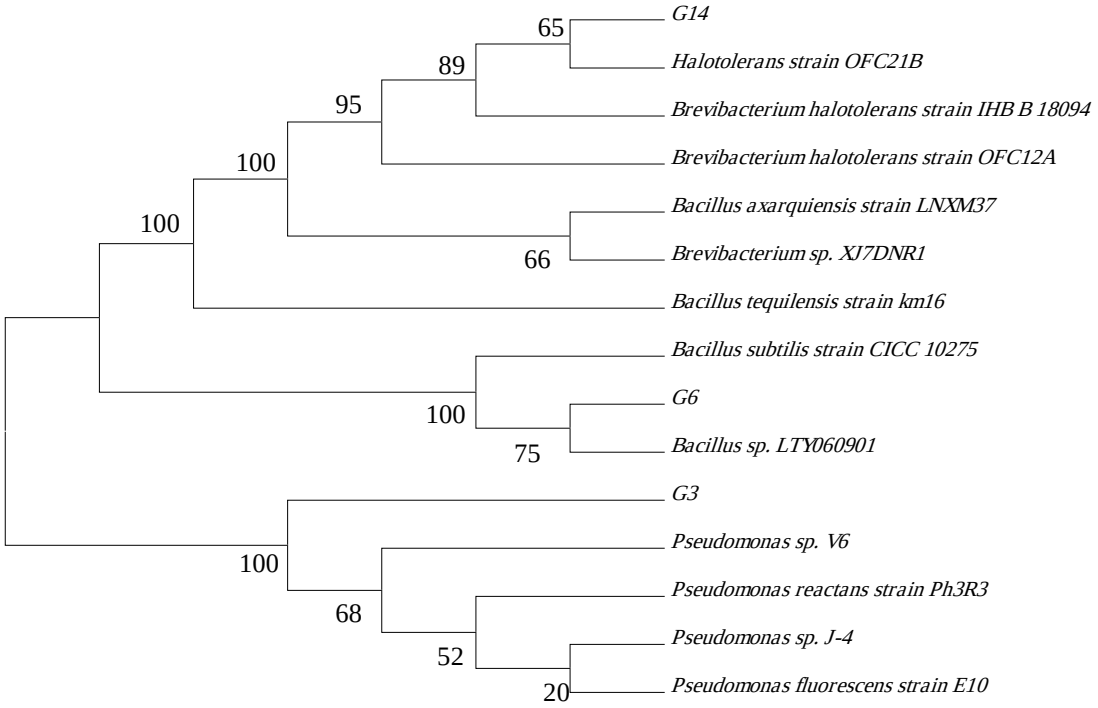
شکل ۳- اثر pH ها (نمودار راست) و دماهای مختلف (نمودار چپ) بر رشد باکتری‌های G6, G14 و G3 رشد باکتری‌ها با OD 600 nm نشان داده شده است.

جدول۲- صفات فیزیولوژیکی در جدایه‌های جداسازی‌شده

جدایه	تست گرم	مقاومت به شوری (۵ مولار)	حل‌کنندگی فسفات(ppm)	تولید اکسین (µg/ml)	تولید سیدروفور	HCN
G6	+	+	۲۰۱	۲۰/۷	-	-
G14	+	+	-	-	-	-
G3	-	+	۳۰۱	-	-	-

+، وجود صفت و -، نبودِ صفت

شناسایی جدایه‌ها: تطابق چندگانهٔ (Multiple alignment) توالی *16SrDNA* باکتری موردنظر با سایر توالی‌های *16SrDNA* موجود در بانک ژنی NCBI نشان داد که باکتری G14 و G6 با ۹۹ و ۹۹/۹درصد شباهت متعلق به *Bacillus subtillis* و باکتری G3 با ۹۹درصد شباهت متعلق به *Pesudumonas reactans* است(۴) (شکل ۴).



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی براساس توالی ژن16S rDNA باکتریG6, G14 و G3 و سایر توالی‌های دردسترس در بانک ژنی NCBI که نشان‌دهندهٔ موقعیت این باکتری‌ها در میان سایر باکتری‌هاست. رسم درخت فیلوژنتیک براساس الگوریتم neighbor-joining و براساس ضریب صد Boot Strap

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ نمک و نمک‌دوست نسبی گروه متنوعی را متشکل از جنس‌های مختلف تشکیل داده‌اند که در محدودهٔ وسیعی از غلظت‌های نمک می‌توانند رشد کنند و در مناطق بسیار شور یا شور در خاک و آب وجود دارند. باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ شوری و نمک‌دوست در خاک‌های شور ازطریق حفظ چرخهٔ مواد غذایی، تجزیهٔ مواد آلی و بهبود ساختمان و حاصلخیزی خاک، شرایط خاک را بهبود می‌بخشند. مطالعهٔ حاضر جداسازی باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ شوری از خاک‌های منحصربه‌فرد با شوری وpH قلیایی بالا است. عوامل محیطی مختلف بر رشد هالوتولرانت‌ها و نمک‌دوست‌ها بسیار مؤثرند. دمای محیط کشت علاوه بر تأثیر بر میزان رشد، در نمک‌دوستی میکروارگانیسم نیز دخالت دارد؛ به‌گونه‌ای که می‌تواند حتی در طبقه‌بندی آنها به نمک‌دوست یا تحمل‌کننده تأثیرگذار باشد (۶، ۷ و ۱۵)؛ به این دلیل، اثر تغییرات دما بر محیط کشت بررسی شد تا شرایط رشد ازنظر دما و میزان تحمل آنها به دماهای بالا بررسی شود. در پژوهشی که ونتوسا[۶] در سال ۱۹۹۸ انجام داده، دامنهٔ تحمل دما در بین باکتری‌های نمک‌دوست نسبی جداسازی‌شده از زیستگاه‌های معمول اکثراً بین ۴۵-۱۵ درجه سانتیگراد است (۸)؛ از طرفی در کتاب مرجع برگی[۷] نیز گزارش‌های ارائه‌شده دربارهٔ دامنهٔ تحمل دما در باکتری‌های نمک‌دوست نسبی بیشتر بین ۴۵-۱۵ درجه سانتیگراد است؛ هرچند برخی در ۴ درجه سانتیگراد نیز رشد می‌کنند (۲۰). در صورتی که نتایج این پژوهش نشان داد بهترین دما برای باکتری‌های هالوفیل ۴۰-۳۰ درجه سانتیگراد است که تا ۵۰ درجه را هم توانستند تحمل کنند و دامنهٔ تحمل دمایی بین ۵۰-۲۰ درجه بود.

تأثیر تنش شوری با استفاده از غلظت‌های متفاوت کلرید سدیم و خشکی با استفاده از غلظت‌های متفاوت *پلی‌اتیلن‌گلیکول* ۶۰۰۰ بر رشد جدایه‌ها بررسی شد. هر دو تنش با افزایش فشار اسمزی محیط باعث ایجاد تنش اسمتیک در جدایه‌ها می‌شوند که خود مستلزم تنظیم اسمزی توسط جدایه‌ها هستند. *پلی‌اتیلن‌گلیکول* به‌دلیل وزن مولکولی زیاد (۶۰۰۰) نمی‌تواند وارد آپوپلاست شود؛ بنابراین آب نه تنها از سلول فاصله می‌گیرد؛ بلکه از دیوارهٔ سلولی نیز دور نگه داشته می‌شود و این امر باعث می‌شود این پلیمر شرایط بسیار مشابهی با خاک نسبت به سایر مواد اسمزی که به‌تدریج وارد دیوارهٔ سلولی می‌شوند، ایجاد کند (۶ و ۸). در این آزمایش جدایه‌ها توانایی زنده‌ماندن در ۲۰درصد *پلی‌اتیلن گلیکول* و رشد در ۳۵درصد کلرید سدیم دیده شد. در گزارشی رحمان و ناتیال[۸] (۱۲)، گزارش کردند که سویه‌هایی از جنس *ریزوبیوم* توانایی مقاومت در تنش ۴۵درصد *پلی‌اتیلن‌گلیکول* را دارند. همچنین راوین کومار[۹] و همکاران (۲۱)، در آزمایشی اعلام کردند سویه‌های *سودوموناس* توانایی زنده‌ماندن در ۴۰/۵درصد *پلی‌اتیلن‌گلیکول* را دارند. مقاومت به تنش شوری، خشکی و حرارت بالا در دو جدایهٔ G6 و G14 که از جنس *باسیلوس* بودند بالاتر از جدایهٔ G3 که از جنس *سودوموناس* بود دیده شد که می‌تواند به‌دلیل شکل دیوارهٔ داخلی *باسیلوس* باشد (۱۳). خواب در اندوسپورهای *باسیلوس* آنها را مستعد مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی کرده است. شکل اسپورها و توانایی مقاومت در برابر تنش‌های زیستی باعث حفظ جمعیت و استفاده از آنها در فرمولاسیون پودری کرده است (۹ و ۲۲).

باکتری های نمک‌دوست و تحمل‌کننده شوری در

اطراف ریشهٔ گیاهان می‌توانند آثار تنش شوری را کاهش دهند و حاصلخیزی خاک را بهبود ببخشند (۸). راجپوت[۱۰] و همکاران (۱۱) گزارش کردند که ایزولهٔ SAL-15 قادر به افزایش مقاومت گندم به شرایط شوری خاک است. ارتفاع گیاه و بیوماس گیاه پس از تلقیح در مقایسه با عدمِ‌تلقیح به‌میزان زیادی افزایش یافت. ایزولهٔ SAL-15 براساس تجزیه و تحلیل توالی‌یابی ژنی *16SrRNA* متعلق به گونه و جنس *Planococcus rifietoensis* بود. این باکتری قادر به زنده‌ماندن در غلظت بالای نمک (۶۵ گرم بر لیتر) و pH برابر ۹ است که می‌تواند رشد گیاه را نیز در این شرایط بهبود ببخشد. نتیجهٔ این مطالعه نشان داد باکتری SAL-15 پتانسیل زیادی برای تولید کود بیولوژیکی برای افزایش عملکرد در خاک‌های شور را دارد. همچنین دارای توانایی تولید اکسین و انحلال فسفات معدنی است (۱۵). باکتری‌های محرک رشد جداسازی‌شده از مناطق شور مقاومت به مقادیر بالای نمک را نشان می‌دهند و باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش شوری ازطریق هدایت هیدرولیکی، تجع اسمزی، ازبین‌بردن آثار سمی یون سدیم، حفظ هدایت اسمزی بالاتر و فتوسنتز بیشتر می‌شود (۸). باکتری‌های محرک رشد تحمل‌کنندهٔ شوری نسبت به سایر باکتری‌های محرک رشد توانایی بیشتری برای تحمل شوری محیط را دارند. از میان جدایه‌ها دو جدایهٔ تولیدکنندهٔ اکسین و حل‌کنندهٔ فسفات بودند؛ درحالی‌که فسفر در شرایط شوری غیرمحلول یا با حلالیت ضعیف است. بسیاری از باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات عملکرد گیاه را حتی در شرایط تنش هم افزایش می‌دهند. حلالیت فسفات توسط جنس *Bacillus sp* جداشده از خاک‌های شور را پژوهشگران دیگر نیز گزارش داده‌اند (۴ و ۱۶). جدایه‌ها در غلظت بالای نمک (۵ مولار کلرید سدیم) در شرایط آزمایشگاهی مقاومت نشان دادند. حل‌کنندگی فسفات صفت بسیار مهم محرک رشد گیاه است. در این فرایند میکروارگانیسم‌های حل‌کنندهٔ فسفات، فسفات نامحلول را حل می‌کنند و آن را در دسترس گیاهان قرار می‌دهند (۲۳). ال آزیم[۱۱] و همکاران گزارش دادند که تمام جدایه‌هایی که حل‌کنندهٔ فسفات هستند می‌توانند تری‌کلسیم‌فسفات (TCP) را در محیط کشت مایع و جامد به اسیدهای آلی تبدیل کنند و باعث اسیدی‌شدنpH محیط کشت شود (۲۵ و ۲۶). کاهش pH محیط به‌دلیل تولید اسیدهای آلی و قند توسط جدایه‌ها است؛ علاوه بر این، جدایه‌ها قادر به تحمل ۵ مولار کلرید سدیم (۳۵درصد) هستند که نشان‌دهندهٔ مقاومت به شوری است. از سه سویهٔ شناسایی‌شده یک سویه تولیدکنندهٔ اکسین بود. تولیدIAA وابسته به حضور ال تریپتوفان در محیط است که باکتری با بهره‌گیری از نصف ال تریپتوفان، ایندول‌استیک‌اسید تولید می‌کند. افزایش در تولید IAA وابسته به افزایش در میزان ال تریپتوفان بود. تولید ایندول‌استیک‌اسید یک صفت مهم محرک رشد گیاه برای باکتری است؛ به‌طوری که این فیتوهورمون سیستم ریشهٔ گیاه را توسعه می‌دهد، جذب مواد غذایی را بهبود می‌بخشد (۲۴ و ۲۵). اگامباردیوا (۲۰۰۹) گزارش داد باکتری‌های محرک رشد تحمل‌کنندهٔ شوری، در شرایط تنش شوری تولید اکسین آنها افزایش می‌یابد و باعث افزایش رشد گیاه در شرایط تنش شوری می‌شوند (۱۰ و ۲۰).

براساس نتایج آنالیز فیلوژنی دو جدایه مربوط به جنس *باسیلوس* و یکی از آنها به جنس *سودوموناس* تعلق داشت. نقش *باسیلوس* در ارتقای رشد گیاه به‌طور گسترده‌ای شناخته شده است. بسیاری از گونه‌های

باسیلوس ازجمله *Bacillus subtilis*، *Bacillus amyloliquoefaciens*، *Bacillus cereus*، *Bacillus pumilus* و *Bacillus polymyxa* به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیکی به‌دلیل تولید چندین آنتی‌بیوتیک شناخته شده‌اند و حمایت‌کنندهٔ رشد گیاه در شرایط تنش شوری توسط تولیدکنندهٔ فیتوهورمون‌ها، حل‌کنندهٔ فسفات، تولید آمونیاک از مواد نیتروژن‌دار آلی و غیره هستند (۱۳ و ۲۸). لیم و کیم[۱۲] (۲۰۰۹) گزارش تولید IAA و IBA توسط *Bacillus Subtilis AH18* و *Bacillus licheniforims K1* کردند. همچنین افزایش در رشد فلفل قرمز، اسفناج، گوجه فرنگی و تربچه را نشان دادند (۱۷). همچنین جدایه‌های *Bacillus pumilus* و *Bacillus licheniforims* جداشده از ریزوسفر توسکا با تولید جیبرلین C19 باعث رشد ساقه می‌شوند (۲۲).

گزارش‌های پژوهشگران دیگر نیز نشان داد که باکتری‌های جداسازی‌شده از خاک شور به احتمال زیاد مقاومت در برابر تنش شوری را از خود نشان می‌دهند. از سوی دیگر اگر این باکتری‌ها دارای صفات محرک رشد نیز باشند، برای کشاورزی پایدار ایدئال هستند (۸ و ۱۱).

در مطالعهٔ حاضر جدایه‌های جداشده به‌دلیل رشد در غلظت‌های اشباع نمک و تحمل شرایط تنش محیطی احتمالاً جزء باکتری‌های تحمل‌کنندهٔ شوری بود و پتانسیل استفاده در زمینه‌های مختلف بیوتکنولوژیکی ازجمله تولید آنزیم‌های صنعتی و کودهای بیولوژیکی برای اصلاح خاک‌های شور را دارند.

References

(1) Abrol IP., Yadav JSP., Massoud, FI. Salt Affected Soils and Their Management. *Food and Agriculture Organization* (FAO), Soils Bulletin, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome; 1988. vol. 39.

(2) Margesin R., Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic Microorgnisms for biotechnology. *Extremophiles* 2001; 5(4): 73-83.

(3) Holt JG., Krieg NR., Sneath PHA., staley JT., Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilrins. Maryland; 1994.

(4) Kaye JZ., Baross AJ. Synchronous effects of temperapture, hydrostatic pressure and salinity on growth, phospholipids profiles, and protein patterns of four *Halomonas* species isolated from deep see hydrothermal -vent and sea surface environments. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 56(10): 6220-6229.

(5) Larsen H. Halophilic and halotolerant microorganisms -an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Reviews* 1986; 39 (1): 3-7.

(6) Madigan M., Oren A. Thermophilic and halophilic extremophils. *Current Opinion in Microbiology* 1999; 2(3): 265-269.

(7) Mehrshad M., Amoozegar MA., Yakhchali B., Shahzedeh Fazeli A. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. *Biological Journal of Microorganisms* 2012; 1(2): 49-70.

(8) Ventosa A., Nieto JJ., Oren A. Biology of moderately holophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62(2): 504-544.

(9) Kiran KK., Chandra TS. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus sp. strain TSCVKK*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008; 77 (5): 1023- 31.

(10) Egamberdiyeva D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum* 2009; 31(4): 861-864.

(11) Rajput L., Imran A., Mubeen F., Hafeez FY. Salt-tolerant pgpr strain *planococcus rifietoensis* promotes the growth and yield of wheat (triticum aestivum l.) Cultivated in saline soil. *Pakistan journal of botany* 2013; 45(6): 1955-1962.

(12) Rehman A., Nautiyal CS. Effect of drought on the growth and survival of the stress-tolerant bacterium *Rhizobium sp*. NBRI2505 sesbania and its drought-sensitive transposon Tn5 mutant. *Current Microbiology* 2002; 45(5): 368- 377.

(13) Barazani O, Friedman J. Effect of exogenously applied l-tryptophan on allelochemical activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Chemical Ecology*. 2000; 26(2): 343- 9.

(14) Watanabe F., Olsen S. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and NaHCO3 extracts from soil. *Soil Science Society of America, Proceedings* 1965; 29(6): 677–678.

(15) Yasmin S., Hafeez F., Schmid M., Hartmann A. Plant beneficial rhizobacteria for sustainable increased yield of cotton with reduced level of chemical fertilizer. *Pakistan Journal of Botany* 2013; 45(2): 655-662.

(16) Payne SM. Detection, Isolation and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology* 1994; 235(1): 329- 44.

(17) Castric PA. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology* 1974; 21 (5): 613- 8.

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

(19) Kunte H. Halophilic microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology* 1995; 48: 185-197.

(20) Barazani O, Friedman J. Effect of exogenously applied l-tryptophan on allelochemical activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Chemical Ecology*. 2000; 26(2): 343- 9.

(21) Praveen Kumar G., Kishore N., Leo Daniel Amalraj E., Mir Hassan Ahmed SK., Rasul A., Desai S. "Evaluation of fluorescent *Pseudomonas sp*. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi," *Plant Growth Regulation* 2012; 67(2): 133-140.

(22) Lim JH., Kim SD. Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniforims* K11. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 2009; 52(5): 531- 8.

(23) Pikovskaya R. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologyal* 1948; 17(2): 362- 370.

(24) Arabi F., Nikravesh Z., Babaeezad V., Rezaeian V., Rahimian H. Occurrence of bacterial leaf spot of garden beet caused by *Pseudomonas syringae pv*. aptata in Iran. *Iran Journal of Plant Pathology* 2006; 42 (4): 655- 671 (In Persian).

(25) El-Azeem SAMA., Mehana TA., Shabayek AA. Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. *African Crop Science Conference Processing* 2007; 8: 1517- 25.

(26) Jan AT., Azam M., Ali A., Haq Q. Novel approaches of beneficial *Pseudomonas* in mitigation of plant diseases an appraisal. *Journal of Plant Interactions* 2011; 6(4): 195- 205.

(27) Klopper JW. *A review of mechanisms for plant growth promoting by PGPR*. 6th international PGPR workshop, 5-10 october 2003, calculla, India; 2003.

(28) Yildirim E., Taylor AG. Effect of biological treatments on growth of bean Plants under Salt Stress. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 2005; 48: 176-177.

[1]- Salt Marsh
[2]- Salkowski
[3]- Watanabe and Olsen
[4]- CAS-Shattle
[5]- Blast
[6]- Vensota
[7]- Bergey
[8]- Rehman and Nautiyal
[9]- Praveen Kumar
[10]- Rajput
[11]- El-Azeem
[12]- Lim and Kim