مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال ششم، شماره اول، پیاپی بیست و یکم، تابستان ۱۳۹۶ (۵۸-۴۱)

مقایسه کمی تولید آمونیاک و تری‌ایندول استیک اسید در جدایه‌های باکتریایی شور، قلیا و شور و قلیاپسند خاک

مهرنوش اسکندری تربقان[۱]، امیر لکزیان[۲*]، علی رضا آستارایی[۳]، امیر فتوت[٤]، حسین بشارتی[٥]

۱. دانشجوی دکتری علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۲. استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۳ و ٤. دانشیاران گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۵. دانشیار، مؤسسه تحقیقات خاک وآب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۰/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/۵/۲۹)

چکیده

جداسازی و شناسایی جدایه‌هایی با خصوصیت PGPR می‌تواند برای بهبود رشد گیاهان در مناطق شور مورد استفاده قرار گیرد. به منظور اندازه‌گیری کمی برخی خصوصیات PGPR در جدایه‌های باکتریایی شور، قلیا و شورو قلیاپسند بومی خاک های استان خراسان رضوی، از شش منطقه مختلف، جدایه‌ها جداسازی و خالص‌سازی شدند تا غلظت آمونیاک به روش نسلر اصلاح شده و تری ایندول استیک اسید به روش سالکووسکی در آنها اندازه گیری گردد. جدایه‌های قلیاپسند بیشترین تولید آمونیاک (۰/۰۵۵٪) را در بین هر سه گروه باکتری نشان دادند که ۹/۵ برابر متوسط آن در جدایه‌های شوروقلیاپسند (۰/۰۰۵۸ ٪) و ۱۳ برابر متوسط آن در شورپسندها (۰/۰۰٤ ٪) بود. اکثر جدایه‌های شور، قلیا و شور و قلیاپسند به ترتیب با میانگین ۰/۰۰۰۳، ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۲۱٪ تولیدکننده IAA بودند که مقدار تولیدی در گروه شور و قلیا حدود ٦ برابر شورپسندها و ۱٤/۵ برابر قلیاپسندها بود. بررسی معادلات پیش‌بینی غلظت آمونیاک و IAA تولیدی به‌ترتیب فقط در جدایه‌های شوروقلیاپسند برای تولید آمونیاک (P=۰/۰٤٦) و در جدایه‌های شورپسند برای تولید IAA (P=۰/۰۱۵) تحت تأثیر EC و pH محیط کشت معنی‌دار شد (P≤۰/۰۵). معادلات رگرسیون چند متغیره جهت پیش بینی غلظت‌های آمونیاک و IAA تولیدی جدایه‌ها تحت تأثیر EC وpH محیط در غلظت‌های بالا و پایین از آمونیاک و IAA از کارایی چندانی برخوردار نبود. استفاده از روش‌های نسلر و سالکووسکی پس از کمی تغییرات به دلیل سهولت اجرا و نتایج نسبتاً دقیق آن، قابل توصیه و پیشنهاد در تحقیقات بعدی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تری ایندول استیک اسید، روش سالکووسکی، روش نسلر، شورپسند، شور و قلیاپسند، قلیاپسند.

* نویسندهٔ مسئول: امیر لکزیان E-mail: lakzian@ferdowsi.um.ac.ir

Quantitative comparison of ammonia and 3-indoleacetic acid production in halophilic, alkalophilic and haloalkalophilic bacterial isolates in soil

Mehrnoush Eskandari Torbaghan[1], Amir Lakzian[2*], Ali Reza Astaraei[3], Amir Fotovat[4], Hossein Besharati[5]

1. Ph.D. Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3, 4. Associate Professors, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
5. Associate Professor, Soil and Water Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

(Received: Jan. 8, 2016 - Accepted: Aug. 20, 2017)

Abstract

Isolation and identification of isolates with PGPR characteristic can be used to improve plant growth in saline areas. In order to quantitative measure of PGPR characteristic in native halophilic, alkalophilic and haloalkalophilic bacterial isolates of Khorasan Razavi soils, isolates were isolated and purified from six different areas to measure the concentration of ammonia production via corrected Nesslerization method and 3-indoleacetic acid as Salkowski method. The alkalophiles isolates showed maximum ammonia production (0.055%) among the three groups of bacteria which this amount was 9.5 times of its average in haloalkalophiles isolates (0.0058%) and 13 times of ammonia production average in halophiles (0.004%). Most of halophiles, alkalophiles and haloalkalophiles isolates were IAA producer with 0.0003, 0.0001 and 0.0021 percent respectively that the IAA amount in haloalkalophilic group was about 6 and 14.5 times of it in halophilic and alkalophilic isolates respectively. Equations to predict the concentration of ammonia and 3-indole acetic acid production was only significant in the haloalkalophilic isolates for ammonia production (P=0.046) and halophilic isolates for IAA production (P=0.015) under effect of electrical conductivity and pH in 0.05 probability level. Results represented that the multiple regression analysis for prediction of ammonia and IAA concentrations producing by isolates had not any significant performance in high and low concentrations under effect of electrical conductivity and pH. Uses of Nesslerization and Salkowski methods after some modifications show promises and are recommendable in research due to their ease of implementation and relatively accurate results.

Keywords: 3-Indoleacetic acid, Alkalophiles, Haloalkalophiles, Halophiles, Nesslerization method, Salkowski method.

مقدمه

ریزجانداران شورپسند خاک گروهی از ریزجانداران هستند که قادر به رشد در محیط‌هایی با غلظت زیاد نمک بوده و برای رشد در شرایط چنین محیط‌هایی سازگاری یافته‌اند (Zanjirband *et al*., 2013). باکتری‌های قلیاپسند در محدوده pH بین ۹ تا ۱۱، pH خود را حدود ۹/۵ حفظ می‌کنند. این باکتری‌ها با سیستم‌های انتقال پروتون در غشای سیتوپلاسمی (پمپ ATP و تعویض‌کننده سدیم با پروتون) به فعالیت خود ادامه می‌دهند (Horikoshi, 1999). گروهی دیگر از باکتری‌ها که قادر به رشد در شرایط قلیا و در حضور نمک هستند، به‌عنوان شوروقلیاپسند شناخته می‌شوند. این ویژگی دوگانه شور و قلیاپسندی، آنها را برای مطالعات پایه و از جنبه‌های مختلف بیوتکنولوژی جالب و مورد توجه نموده است (Joshi, 2006; Feng *et al*., 2005). جداسازی این باکتری‌ها از مناطقی همانند دریاچه‌های قلیایی، دریاچه‌های تبخیری نمک، شوراب‌های نمکی، چشمه‌های کربناتی و دریاهای نمکی و نیز از محیط‌های شور و قلیای معمولی همانند خاک‌های شور و قلیا انجام می شود (Singh *et al*., 2010).

از سوی دیگر تولید محصولات کشاورزی متأثر از شوری خاک‌ها بوده و تأثیر منفی نمک‌ها بر گیاهان به‌وسیله کمبود آب و در نتیجه تنش اسمزی و نیز تأثیر یون‌های سدیم اضافی در فرآیندهای بیوشیمیایی مهم گیاه اختلال ایجاد می‌نماید (Detkova & Boltyanskay, 2007). در پاسخ به تنش شوری، گیاهان شروع به تجمع ترکیبات تنظیم‌کننده اسمزی با وزن ملکولی اندک همانند الکل‌های شیرین[1] و اسیدهای آمینه می‌کنند. تجمع این ترکیبات یک مکانیسم اولیه در مقاومت به شوری و سازگاری به تنش اسمزی در گیاهان است. گرچه در برخی موارد، مقدار تنظیم‌کننده‌های اسمزی کافی نیست. بنابراین، تنظیم‌کننده‌های اسمزی با منشأ باکتریایی می‌تواند در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد (Rontein *et al*., 2002). در *آزوسپیریلیوم هالوپرافرنس* و *آزوسپیریلیوم برازیلنس*، گلایسین، بتائین رشد گیاه و تثبیت نیتروژن را در شرایط تنش شوری تحریک می‌کند (Hartman, 1988). این باکتری‌ها از طریق تثبیت نیتروژن و تولید هورمون‌هایی مانند اکسین می‌توانند مقاومت گندم را به شرایط شوری بهبود بخشند (Saatovich, 2006). به‌کارگیری چهارجنس باکتری و دو جنس اکتینومایست دی آزوتروف‌های غیرهمزیست شور و قلیاپسند بر گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) نشان داد که در تیمارهای اکتینومایست وزن خشک گیاه بیشتری نسبت به جنس‌های باکتری به‌دست آمده است. لیکن ارتفاع گیاهان در تیمارهای حاوی باکتری افزایش بیشتری نشان داد (Butale *et al*., 2010). Oren *et al*. (2001) گزارش کردند که باکتری *هالوباکتریوم پراویلنس*[2] بیشترین میزان تجزیه ترکیبات آروماتیک نیتروژن دار را در شوری ۱۳ تا ۱۴درصد دارا بود. در مطالعه تأثیر شوری بر دیازوتروف آزادزی و کل جمعیت باکتری‌ها در دو خاک شور مشاهده گردید که جمعیت دی ازوتروف‌های آزادزی و کل باکتری‌های هتروتروف در خاک با شوری ۳۵dS/m به‌طور قابل توجه و معنی‌داری بیشتر از خاک با شوری ۷۰ dS/m بود (Moradi *et al*., 2011).

گزارش شده است که IAA تولیدشده توسط سویه‌های باکتریایی جدا شده از محیط‌های پرتنش به افزایش تحمل گیاهان به شوری پس از تلقیح باکتری‌ها به گیاه کمک می‌نماید (Mishra *et al*., 2015). نتایج حاصل از تعیین ترکیبات مختلف اکسین در ۵۰ سویه از گونه‌های *سودوموناس فلورسنس* و

1. Sugar alcohols

2. *Halobacterium parevalens*

سودوموناس پوتیدا با استفاده از دستگاه HPLC نشان داد که تعداد ۳۶ سویه از باکتری‌ها قادر بودند حداقل یکی از انواع ترکیبات ایندولی اکسین شامل IAA (ایندول استیک اسید)، IAM (ایندول استامید) و ILA (ایندول لاکتیک اسید) را ترشح کنند (Khakipour *et al.*, 2012). بررسی تأثیر تلقیح سویه‌های تولیدکننده IAA بر رشد گیاهچه‌های کلزا در آزمون گلخانه‌ای نیز نشان داد که این سویه‌ها ارتفاع اندام هوایی (تا ۱۵/۵٪)، وزن خشک اندام هوایی (تا ۵۸٪) و وزن خشک ریشه (تا ۳۰۵٪) را به‌طور معنی‌دار افزایش دادند (Khakipour *et al.*, 2012). بررسی جمعیت باکتریایی دریاچه بسیار شور سمبهار[1] در هندوستان منجر به جداسازی ۹۳ باکتری شور و قلیاپسند که در محیطی با ۲–۲۵درصد نمک و pH بین۶ تا۱۲رشد بهینه داشتند، گردید (Sahay *et al.*, 2012). در بین خصوصیت‌های بهبوددهنده رشد گیاه جدایه‌های تولیدکننده آمونیوم با (۵۶٪) در مقایسه با تولیدکنندگان ACC دی آمیناز (۵۳٪)، ایندول استیک اسید (۵۰٪)، سیانید هیدروژن (۲۸٪)، سیدروفور (۲۱٪) و فسفرمحلول (۳۴٪) بیشترین بودند. جدایه‌ها خصوصیت PGPR و تولیدکننده آنزیمی از خود نشان دادند که می‌تواند برای بهبود رشد گیاهان در مناطق شور مورد بهره‌برداری قرار گیرد (Sahay *et al.*, 2012). ایران دارای محیط‌های شور متنوعی می‌باشد که تنوع میکروبی آنها و توانایی در تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک خارجی، اسمولیت‌ها و حتی بیش از این‌ها از جنبه دارا بودن خصوصیات PGPR در زمینه بیوتکنولوژی کشاورزی کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (Rohban, 2009). هدف از اندازه‌گیری توام غلظت آمونیاک و IAA در این مطالعه، به دلیل بررسی کارایی و توانمندی استفاده از جدایه‌ها در مجاورت گیاه تحت تنش شوری در مراحل بعدی بود.

1. Sambhar lake

از آنجا که بین خصوصیات ترفیع‌دهندگی رشد گیاه برخی از این خصوصیات شامل تولید آمونیاک، IAA وACC دی آمیناز مستقیماً در کاهش تنش شوری نسبت به سایر خصوصیت‌ها همانند تولید سیدروفور، انحلال فسفات‌های نامحلول و تولید HCN نقش دارند، اندازه‌گیری این سه خصوصیت در جدایه‌های فوق‌الذکر مدنظر قرار گرفت تا در نهایت کارایی این جدایه‌ها در مجاورت گیاه بررسی گردد. همچنین به‌دلیل حجم بالا، نتایج مربوط به اندازه‌گیری ACC دی آمیناز در این بررسی گنجانده نشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی اولیه سویه‌ها

به منظور جداسازی جدایه‌های شور، قلیا و شور و قلیاپسند، نمونه‌برداری از شش منطقه مختلف از خاک‌های استان خراسان رضوی (جدول۱) از عمق صفر تا ۲۵ سانتی‌متری خاک انجام شد. سپس نمونه‌ها در ظروف استریل به همراه ثبت مشخصات جغرافیایی محل نمونه‌برداری با GPS در مدت زمان کمتر از ۴۸ ساعت و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل و نگهداری شدند. جداسازی و خالص‌سازی هر یک از جدایه‌های شور، قلیا و شور و قلیاپسند از نمونه‌های خاک توسط محیط کشت اختصاصی آنها (جدول۲) انجام شد. جهت جداسازی، سوسپانسیون ۱:۱ از خاک و آب (یک گرم خاک به یک میلی لیتر آب مقطر استریل) تهیه شد. یک قطره از سوسپانسیون فوق بر روی محیط کشت اختصاصی جامد پخش گردید. محیط کشت‌ها در دمای مناسب (۳۵°C تا ۳۷) به مدت ۳ تا ۷ روز بسته به نوع ریزجانداران گرما گذاری شدند. به ترتیب ۱۵ جدایه شورپسند توسط محیط کشت Ventosa *et al.* (1982)، ۱۹ جدایه قلیاپسند توسط محیط کشت (I) (Horikoshi, 2006) و ۱۴ جدایه شور و قلیاپسند توسط محیط کشت اختصاصی (Jones *et al.*, 1992) جداسازی شدند. پس از جداسازی، برای

اطمینان از خالص بودن آنها، چندین مرتبه کشت مجدد انجام شد. جدایه‌های خالص‌سازی شده جهت نگهداری طولانی مدت به روش نیتروژن مایع (Horikoshi, 1999) ذخیره سازی شدند.

مورفولوژی و خصوصیات بیوشیمیایی

مورفولوژی کلنی‌ها از لحاظ رنگ، فرم، بزرگی و قوام مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ابعاد سلولی و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری از جمله واکنش به رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز نیز انجام گردید (Brenner *et al*., 2005; Holt *et al*., 1994).

اندازه‌گیری کمی غلظت آمونیاک

به منظور اندازه‌گیری کمی غلظت آمونیاک تولیدی از روش نسلر اصلاح شده (Heonsang *et al*., 2013) با کمی تغییرات جهت مناسب شدن روش برای جدایه‌های موردنظر استفاده گردید. ابتدا برای هر دسته از جدایه‌ها محیط کشت اختصاصی مایع آنها تهیه و جدایه‌ها در هر گروه مجدداً بازکشت شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تازه از هرجدایه در سه تکرار به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های سانتریفیوژ شده به بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی‌لیتری منتقل و با آب مقطر استریل به حجم رسیدند. استانداردهای مورد نظر نیز از استاندارد مادر کلرید آمونیوم با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر تهیه شد. غلظت استانداردهای تهیه شده از کلرید آمونیوم شامل صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. سپس به تمامی استانداردها، شاهد و نمونه‌ها مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA جهت حذف مزاحمت یونی کاتیون‌های کلسیم و منیزیم اضافه شد (Yuen & Pollard, 1952). EDTA مصرفی از انحلال ۱۰ گرم سود در ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر به‌وسیله حرارت دهی و سپس افزودن ۵۰ گرم EDTA و رساندن حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر آماده‌سازی گردید. مقدار ۰/۴ میلی لیتر از معرف نسلر (شرکت فولکا Fluka) به تمامی استاندارها، شاهد و نمونه‌ها اضافه و در نهایت پس از ۳۰ دقیقه غلظت آمونیاک در آنها در طول موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. پس از رسم منحنی‌های استاندارد، غلظت آمونیاک برای هر گروه از جدایه‌ها تعیین شد.

اندازه‌گیری غلظت تری ایندول استیک اسید (IAA)

به منظور اندازه‌گیری غلظت تری ایندول استیک اسید تولیدی در جدایه‌ها و تکرارهای آنها از روش سالکووسکی (Glickmann & Dessaux, 1995; Gutierrez *et al*., 2009) با کمی تغییرات جهت مناسب شدن روش برای جدایه‌های مذکور استفاده گردید. ابتدا برای هر دسته از آنها محیط کشت اختصاصی مایع تهیه و جدایه‌ها در هر گروه مجدداً بازکشت شدند. جهت اندازه‌گیری AAI اسید آمینه تریپتوفان به مقدار یک گرم بر لیتر به‌عنوان پیش ماده به محیط کشت‌های تازه اضافه گردید (Swain *et al*., 2007). پس از آن محیط کشت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور دردقیقه سانتریفیوژ شدند. به ۲ میلی‌لیتر از محلول فوقانی سانتریفیوژ شده، ۲ میلی‌لیتر از معرف R1 (سالکووسکی) اضافه و سپس قرائت نمونه‌ها پس از گذشت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۳۲°C، در طول موج ۵۳۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. معرف R1 یا سالکووسکی از انحلال ۱۲ گرم کلرید آهن شش آبه ($FeCl_3.6H_2O$) در ۴۲۹ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و رساندن به حجم نهایی یک لیتر تهیه گردید. جهت تهیه استانداردها نیز ابتدا استاندارد مادر ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از انحلال ۰/۱ گرم تری ایندول استیک (سیگما) در یک لیتر آب مقطر تهیه و سپس سایر استانداردهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر تهیه گردید.

مقادیر pH و هدایت الکتریکی برای هر گروه از جدایه‌ها توسط دستگاه pH متر–EC متر مدل (EW-35414-00) اندازه‌گیری گردید و پتانسیل اسمزی، کل مواد جامد محلول و غلظت در تمامی جدایه‌ها

محاسبه شد (جدول‌های ۳، ۴ و ۵). مقادیر آمونیاک و IAA تولیدی جدایه‌ها با نرم‌افزار MSTAT-C تجزیه آماری و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ مقایسه شد. همچنین محاسبه رگرسیون چند متغیره[1] برای بررسی اثر هدایت الکتریکی و pH بر تولید آمونیاک و تری ایندول استیک اسید تولیدی در جدایه‌ها نیز توسط نرم‌افزار MSTAT-C انجام گردید.

جدول ۱. مشخصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری شده از استان خراسان رضوی

منطقه	محل نمونه برداری	مختصات نمونه برداری					ارتفاع (متر)	تعداد نمونه
		ثانیه	دقیقه		درجه	جهت		
۱	دریاچه نمک تبخیری بردسکن	۴۷	۳۶	۰۳	۳۵	N▪	۸۵۹	۲
		۶۰	۰۸	۵۳	۵۷	E△		
۲	کال شور عارف آباد کاشمر	۸۹	۵۱	۵	۳۵	N	۹۳۳	۱
		۷۸	۳۷	۳۸	۵۸	E		
۳	منطقه یونسی و مرندیز	۳۰	۵۰	۴۷	۳۵	N	۷۹۸	۱
	شهرستان بجستان	۱۸	۲۲	۲۷	۵۸	E		
۴	باغات آستان قدس رضوی	۸۴	۳۳	۳۶	۳۴	N	۹۰۸	۱
	گناباد (۱)	۶۳	۵۶	۵۶	۵۸	E		
۵	باغات آستان قدس رضوی	۸۹	۳۰	۲۶	۳۴	N	۸۸۴	۱
	گناباد (۲)	۵۱	۲۷	۵۸	۵۸	E		
۶	کال شور عشق آباد شهرستان	۲۷۶	–	۰۵	۳۶	N	۱۱۰۵	۱
	نیشابور	۶۴۳	–	۴۱	۵۸	E		

▪N جهت شمال، △E جهت شرق

جدول ۲. محیط کشت‌های اختصاصی جدایه‌های باکتریایی شور، قلیا و شور و قلیاپسند

ترکیبات	مقدار (گرم بر لیتر)		
	شورپسند▪	قلیاپسند	شورو قلیاپسند
گلوکز	۱	۱۰	–
پلی پپتون	–	۵	–
عصاره مخمر	۱۰	۵	۱۰
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	–	۱	–
سولفات منیزیوم هفت آبه	۹/۶	۰/۲	۱
کربنات سدیم	–	۱۰*	۱۸/۵▲
کلرید سدیم	۸۱	–	۲۰۰
کلرید منیزیوم دو آبه	۷	–	–
کلرید کلسیم	۰/۳۶	–	–
کلرید پتاسیم	۲	–	۲
بی کربنات هیدروژن سدیم	۰/۰۶	–	–
برمیدسدیم	۰/۰۲۶	–	–
پروتئاز پپتون	۵	–	–
کازمینو اسید	–	–	۷/۵
تری سدیم سیترات	–	–	۳
کلرید منگنز چهار آبه	–	–	۰/۰۰۰۳۶
سولفات آهن هفت آبه	–	–	۰/۰۵
آگار	۱۵	۲۰	۲۰

▪ pH محیط کشت قبل از استریل‌سازی با KOH یک نرمال بر روی ۷/۲ تنظیم گردید.

▲ جداگانه از سایر مواد استریل گردیده و قبل از کشت جدایه‌ها به محیط کشت اضافه گردید.

1. Multiple Regression Analysis

جدول ۳. مقادیر pH، هدایت الکتریکی، پتانسیل اسمزی، کل مواد جامد محلول و غلظت در محیط کشت جدایه‌های باکتریایی شورپسند در مرحله سکون

جدایه	pH	هدایت الکتریکی (dS/m)	پتانسیل اسمزی (bar)	کل مواد جامد محلول (٪)	غلظت (meq/l)
H1	۵	۴۳/۵۷	۱۵/۶۸	۲/۷۸	۴۳۵/۷۰
H2	۵	۴۲/۴۵	۱۵/۲۸	۲/۷۱	۴۲۴/۵۳
H3	۷/۶	۵۴/۷۴	۱۹/۷۰	۳/۵۰	۵۴۷/۴۲
H4	۷/۳	۵۳/۶۲	۱۹/۳۰	۳/۴۳	۵۳۶/۲۵
H5	۸	۶۱/۴۴	۲۲/۱۲	۳/۳۹	۶۱۴/۴۶
H6	۸/۲	۶۸/۱۴	۲۴/۵۳	۴/۳۶	۶۸۱/۴۹
H7	۸/۱	۶۶/۴۷	۲۳/۹۳	۴/۲۵	۶۶۴/۷۳
H8	۷/۶	۶۷/۰۳	۲۴/۱۳	۴/۲۹	۶۷۰/۳۲
H9	۶/۷	۶۰/۳۲	۲۱/۷۱	۳/۸۶	۶۰۳/۲۸
H10	۴/۹	۶۴/۷۹	۲۳/۳۲	۴/۱۴	۶۴۷/۹۷
H11	۷/۵	۶۶/۴۷	۲۳/۹۳	۴/۲۵	۶۶۴/۷۳
H12	۷/۴	۶۵/۹۱	۲۳/۷۲	۴/۲۱	۶۵۹/۱۴
H13	۵/۱	۶۷/۰۳	۲۴/۱۳	۴/۲۹	۶۷۰/۳۲
H14	۴/۹	۶۴/۷۹	۲۳/۳۲	۴/۱۴	۶۴۷/۹۷
H15	۷/۵	۶۵/۹۱	۲۳/۷۲	۴/۲۱	۶۵۹/۱۴
میانگین	۶/۷۲	۶۰/۸۵	۲۱/۹۰	۳/۸۹	۶۰۸/۵۰

جدول ٤. مقادیر pH، هدایت الکتریکی، پتانسیل اسمزی، کل مواد جامد محلول و غلظت در محیط کشت جدایه‌های باکتریایی قلیاپسند در مرحله سکون

جدایه	pH	هدایت الکتریکی (dS/m)	پتانسیل اسمزی (bar)	کل مواد جامد محلول (٪)	غلظت (meq/l)
A1	۸/۸۵	۱۱/۹۶	۴/۳۰	۰/۷۶۵۹	۱۱۹/۶۷
A2	۸/۶۵	۱۲/۰۸	۴/۳۵	۰/۷۷۳۷	۱۲۰/۸۹
A3	۹/۱	۱۲/۰۸	۴/۳۵	۰/۷۷۳۷	۱۲۰/۸۹
A4	۹/۰۵	۱۲/۲۱	۴/۳۹	۰/۷۸۱۵	۱۲۲/۱۱
A5	۹/۱	۱۲/۳۳	۴/۴۴	۰/۷۸۹۳	۱۲۳/۳۳
A6	۸/۸۵	۱۲/۲۱	۴/۳۹	۰/۷۸۱۵	۱۲۲/۱۱
A7	۹	۱۲/۳۳	۴/۴۴	۰/۷۸۹۳	۱۲۳/۳۳
A8	۸/۸	۱۲/۶۹	۴/۵۷	۰/۸۱۲۷	۱۲۷
A9	۷/۵	۱۱/۴۷	۴/۱۳	۰/۷۳۴۶	۱۱۴/۷۸
A10	۹/۱	۱۱/۴۷	۴/۱۳	۰/۷۳۴۶	۱۱۴/۷۸
A11	۹	۱۲/۲۱	۴/۳۹	۰/۷۸۱۵	۱۲۲/۱۱
A12	۹/۱	۱۲/۴۵	۴/۴۸	۰/۷۹۱۷	۱۲۴/۵۵
A13	۹/۱	۱۲/۲۱	۴/۳۹	۰/۷۸۱۵	۱۲۲/۱۱
A14	۹/۱	۱۲/۲۱	۴/۳۹	۰/۷۸۱۵	۱۲۲/۱۱
A15	۹	۱۲/۶۹	۴/۵۷	۰/۸۱۲۷	۱۲۷
A16	۹	۱۲/۴۵	۴/۴۸	۰/۷۹۷۱	۱۲۴/۵۵
A17	۹	۱۳/۵۵	۴/۸۷	۰/۸۶۷۵	۱۳۵/۵۴
A18	۹/۱	۱۲/۸۲	۴/۶۱	۰/۸۲۰۶	۱۲۸/۲۲
A19	۸/۸	۱۲/۳۳	۴/۴۴	۰/۷۸۹۳	۱۲۳/۳۳
میانگین	۸/۸۹	۱۲/۲۱	۴/۳۹	۰/۷۸۱۵	۱۲۲/۱۱

جدول ۵. مقادیر pH، هدایت الکتریکی، پتانسیل اسمزی، کل مواد جامد محلول و غلظت در محیط کشت جدایه‌های باکتریایی شور و قلیاپسند در مرحله سکون

جدایه	pH	هدایت الکتریکی (dS/m)	پتانسیل اسمزی (bar)	کل مواد جامد محلول (٪)	غلظت (meq/l)
HA1	۸/۸	۴۸/۱۷	۱۷/۳۴	۳/۰۸	۴۸۱/۷۴
HA2	۸/۹	۶۸/۶۴	۲۴/۷۱	۴/۳۹	۶۸۶/۴۷
HA3	۸/۷	۷۵/۸۷	۲۷/۳۱	۴/۸۵	۷۵۸/۷۴
HA4	۹	۸۶/۷۱	۳۱/۲۱	۵/۵۴	۸۶۷/۱۳
HA5	۹/۲	۹۸/۷۵	۳۵/۵۵	۶/۳۲	۹۸۷/۵۶
HA6	۸/۹	۱۰۲/۳۶	۳۶/۸۵	۶/۵۵	۱۰۳۲/۹۶
HA7	۹	۱۰۸/۳۹	۳۹/۰۲	۶/۹۳	۱۰۸۳/۹۱
HA8	۸/۹	۱۰۷/۱۸	۳۸/۵۸	۶/۸۵	۱۰۷۱/۸۷
HA9	۹	۱۱۴/۴۱	۴۱/۱۸	۷/۳۲	۱۱۴۴/۱۳
HA10	۹/۱	۲۹۵/۰۶	۱۰۶/۲۲	۱۸/۸۸	۲۹۵۰/۶۵
HA11	۹/۱	۲۵۲/۹۱	۹۱/۰۴	۱۶/۱۸	۲۵۲۹/۱۳
HA12	۹/۱	۲۷۷/۰۰	۹۹/۷۲	۱۷/۷۲	۲۷۷۰/۰۰
HA13	۸/۹	۲۶۴/۹۵	۹۵/۳۸	۱۶/۹۵	۲۶۴۹/۵۷
HA14	۹	۲۵۲/۹۱	۹۱/۰۴	۱۶/۱۸	۲۵۲۹/۱۳
میانگین	۸/۹۹	۱۵۹/۶۱	۵۷/۴۶	۱۰/۲۱	۱۵۹۶/۱۶

نتایج و بحث

بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها (جدول‌های ۶ تا ۸) نشان داد از هر دو گروه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در جدایه‌های استخراج شده و خالص‌سازی شده از خاک های شور استان وجود داشت.

جدول ٦. بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی شورپسند

جدایه	شکل و قوام کلنی	رنگ کلنی	ابعاد کلنی (mm)	واکنش گرم	تست کاتالاز	تست اکسیداز
H1	دایره ای– ریز	سفید	۵	–	+	–
H2	سطح براق – حاشیه صاف	شیری	۴	–	+	–
H3	رشته‌ای– سطح کدر	شیری	۷	–	+	+
H4	دایره–ریز	سفید	۱	–	+	–
H5	دایره– نقطه‌ای شکل	شیری	۱	–	+	–
H6	رشته‌ای– لزج	سفید	۵	+	+	–
H7	دایره– لبه صاف	بی رنگ	۲	+	+	–
H8	دایره– بزرگ	شیری	۵	+	+	–
H9	کیسه مانند و متورم	سیاه	۲	–	+	–
H10	رشته‌ای و کریستالی	بی رنگ	۴	–	+	–
H11	دایره– کدر–لبه نامشخص	سفید مایل به شیری	۲	–	+	–
H12	حلقه مانند و مرطوب	زرد کم رنگ	۴	–	+	–
H13	دایره –ریز و کدر	سفید	۱	–	–	–
H14	رشته‌ای– بزرگ	شیری	۵	–	+	–
H15	رشته‌ای	سفید مایل به شیری	۴	–	+	–

جدول ۷. بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی قلیاپسند

جدایه	شکل و قوام کلنی	رنگ کلنی	ابعاد کلنی (mm)	واکنش گرم	تست کاتالاز	تست اکسیداز
A1	دایره- لبه صاف	شیری	۷	+	+	−
A2	بزرگ- رشته‌ای	سفید	۳/۴	−	+	+
A3	ریز	قهوه‌ای تیره	۲	−	+	+
A4	حلقه مانند	شفاف (بی‌رنگ)	۸	−	+	+
A5	رشته‌ای	شیری- مات	۷	−	+	+
A6	دایره- لزج	قهوه‌ای کم رنگ	۵	−	+	+
A7	رشته‌ای- لبه ناصاف	شیری	۱/۲	+	+	−
A8	رشته‌ای- لبه ناصاف	شیری	۱/۷	−	+	+
A9	لزج- لبه صاف	بی رنگ	۴	−	+	+
A10	نقطه‌ای و بسیار ریز	سفید	۱	−	+	+
A11	رشته‌ای-بزرگ	شیری	۳	+	+	−
A12	تک کلونی	زرد	۵	−	+	+
A13	حاشیه رشته‌ای- وسط صاف	قهوه‌ای	۷	−	−	+
A14	خشک و پوسته ای	شیری	۳	+	+	−
A15	قطور و کریستالی	سفید	۲	−	+	+
A16	پودری شکل- خشک	سفید	۳	−	+	+
A17	بزرگ و مرطوب	سفید مایل به زرد	۱۰	−	+	+
A18	دایره- براق	زرد طلایی	۶	−	−	+
A19	دایره- حاشیه نامشخص	کرم	۳	−	+	+

جدول ۸. بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی شورپسند

جدایه	شکل و قوام کلنی	رنگ کلنی	ابعاد کلنی (mm)	واکنش گرم	تست کاتالاز	تست اکسیداز
HA1	میله‌ای- ریز و لزج	قهوه‌ای	۱	+	+	−
HA2	مربعی و کریستالی	سفید	۲	+	+	−
HA3	دایره- ریز و حاشیه نامشخص	سفید متمایل به شیری	۱	−	−	+
HA4	دایره- متوسط	شیری مایل به قهوه‌ای	۳	−	−	+
HA5	دایره-ریز	شیری	۱	−	+	+
HA6	دایره- ریز و سطح براق	سفید	۱/۵	+	+	−
HA7	حلقه ای	قهوه‌ای تیره	۲	+	+	−
HA8	دایره- حاشیه مشخص	سفید	۲	−	+	+
HA9	دایره- سطح براق	خاکستری	۱	+	+	−
HA10	دوایر متحدالمرکز-وسط تیره	سفید-قهوه‌ای	۱	−	+	+
HA11	دایره- حاشیه نامشخص	سفید	۲	−	+	+
HA12	رشته‌ای- بزرگ	شیری	۳	+	−	−
HA13	دایره- متوسط	سیاه	۲	−	+	+
HA14	دایره- حاشیه صاف	شیری	۱	−	+	+

مقایسه میانگین غلظت آمونیاک تولیدی جدایه‌های شورپسند (شکل ۱) نشان داد که تولید آمونیاک در جدایه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ داشتند. محدوده تولید آمونیاک در جدایه‌ها بین صفر تا ۰/۰۱۵۵۴ درصد متغیر بود. بیشترین و کمترین غلظت آمونیاک به ترتیب در جدایه‌های H8 و H9 مشاهده شدند.

نتایج تولید آمونیاک در بین سه گروه جدایه‌ها در

قلیاپسندها نشان داد (شکل ۲) که بیشترین غلظت آمونیاک تولیدی در دو جدایه A7 و A5 بدون اختلاف معنی‌دار و سپس در جدایه A16 با اختلاف معنی‌دار با دو جدایه قبلی مشاهده گردید (شکل ۲). کمترین مقدار نیز بترتیب در جدایه‌های A18، A12 و A4 بدون اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ مشاهده شد. مقایسه میانگین تولید آمونیاک سایر جدایه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان نداد (شکل ۲).

غلظت آمونیاک تولیدی در جدایه‌های شور و قلیاپسند نیز اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند (P<۰/۰۵) (شکل ۳). به طورکلی، بیشترین میانگین آمونیاک تولیدی در جدایه‌های قلیاپسندها مشاهده گردید (۰/۰۵۵ درصد) که این مقدار ۹/۵ برابر متوسط آن در جدایه‌های شورو قلیاپسند ($۵/۷۹۷\times۱۰^{-۳}$ درصد) و ۱۳ برابر متوسط آمونیاک تولیدی در شورپسندها ($۳/۹۹۲\times۱۰^{-۳}$ درصد) بود. در بین باکتری‌ها برخی باکتری‌های تولیدکننده نیترات از آمونیاک، نسبتاً قلیاپسند هستند که برخی از آنها شیمیوارگانوتروف هوازی (همانند باسیلوس‌ها) و برخی غیر هوازی (همانند کلستریدیوم ها) می‌باشند (Bertrand *et al*., 2014). شواهد غیر مستقیمی همانند حضور جمعیت‌های فعال دنیتریفیکاتورها و باکتری‌های مصرف‌کننده نیترات نیز شامل گونه‌های هالوموناس شورو قلیاپسند هتروتروف[1] (Sorokin, 2003) و باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد شیمیولیتوتروف[2] نشان داده که اکسیدهای نیتروژن ممکن است در محیط‌های قلیایی تشکیل شوند. آزمایشات نشان داد که ایزوله‌های دریاچه قلیایی متعلق به قلیاپسندهای اجباری با pH در حدود ۹ بودند. در محیط کشت پیوسته محدود شده با آمونیاک به همراه کنترل pH، یکی از ایزوله‌ها در pH بیشتر از ۱۱/۴ رشد نمود.

1. Heterotrophic haloalkaliphilic *Halomonas* spp.
2. Chemolithoautotrophic SOB

حداکثر مطلق نه تنها در میان شیمیولیتوتروف‌ها بلکه حتی نزدیک به حداکثر اثبات شده برای قلیاپسندهای هتروتروف بود (۱۱/۵) (Sturr *et al*., 1994). این نشان می‌دهد که قلیا پسندهای تولیدکننده آمونیاک به نحوی موفق بر غلبه بر مشکل عمده (همانند محدودیت کربن) متابولیسم اتوتروفی در نسبت‌های شدیداً زیاد کربنات به بی کربنات می شوند.

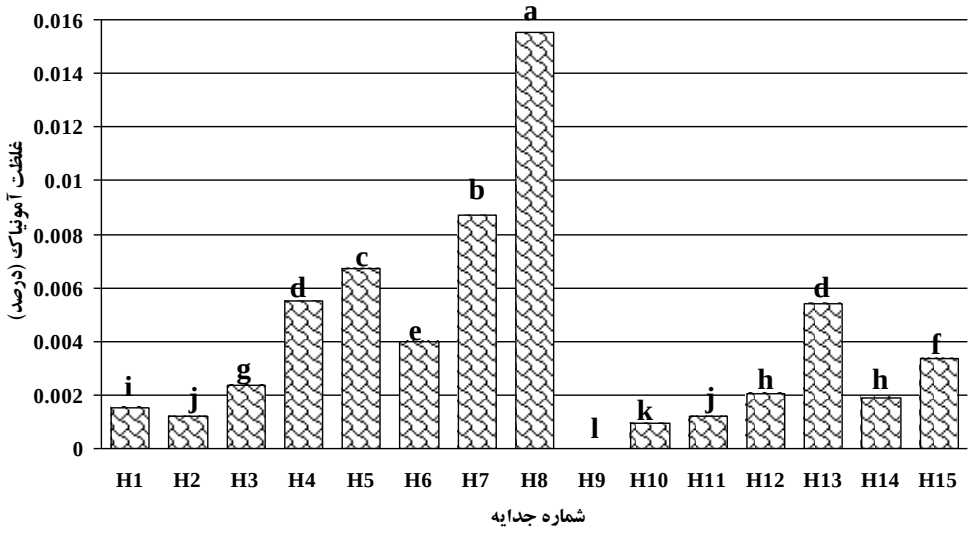
گرچه، غلظت زیاد نمک مشکل بزرگتری برای جدایه‌هایی همانند نیتروزوموناس هالوفیلا[3] نسبت به pH زیاد بود. رشد در محدوده غلظت ۰/۱ تا ۰/۹ مولار سدیم از منبع کلرید سدیم امکان پذیر بود. کشت‌ها نیازی به یون Cl^- نداشتند، آنها توانستند در محیط کشت کربنات سدیم خالص رشد کنند. مشکل دیگر برای این نیتریفیکاتورهای خاص شور و قلیاپسند غلظت آمونیاک بود. در اسیدیته ۱۰ آنها قادر به مقاومت در غلظت بیش از ۸ میلی مولار کلرید آمونیوم نبودند و نتوانستند بدون فاز تاخیری زمانی که غلظت آمونیاک کمتر از ۴ میلی مولار بود رشد نمایند. سمیت آمونیاک با افزایش pH افزایش یافت (Sturr *et al*., 1994).

نتایج تجزیه و تحلیل رگرسیون چند متغیره غلظت آمونیاک برای هر گروه از جدایه‌ها (جدول ۹) نشان داد که تنها معادله به‌دست آمده بر پیش بینی غلظت آمونیاک تولیدی در جدایه‌های شورو قلیا پسند (سومین معادله جدول۹) تحت تأثیر هدایت الکتریکی محیط و pH در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (P=۰/۰۴۶). نتایج رگرسیون چند متغیره برای سایر معادله ها و ضرایب رگرسیونی به لحاظ آماری معنی‌دار نشد (جدول ۹).

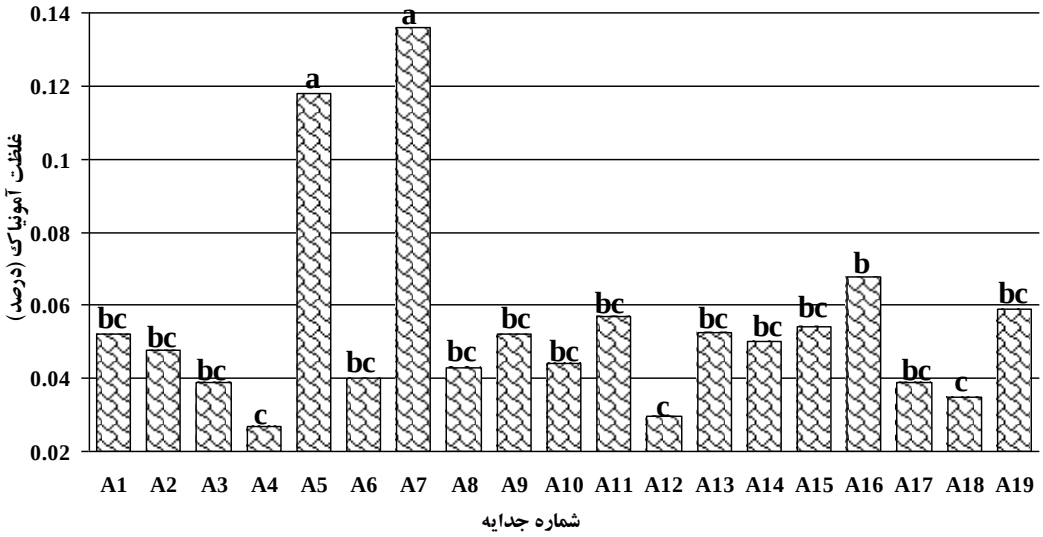
در بسیاری از حالات، استفاده از بستره‌های مختلف به‌عنوان یک ویژگی مهم در شناسایی گونه باکتری عمل می‌نماید (Jeong *et al*., 2013). یکی از

3. *Nitrosomonas halophila*

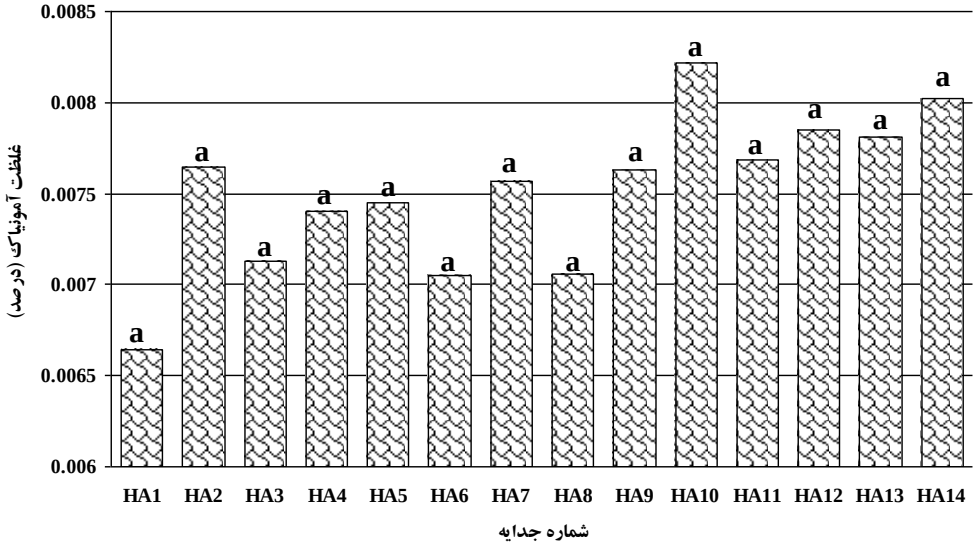
فاکتورهای مهم در انتخاب روش اندازه‌گیری آمونیاک، غلظت آن و حضور یون‌های مزاحم در اندازه‌گیری می‌باشد. در روش نسلر حداقل مقدار آمونیاک تولیدی باید بیش از ۲۰mg/l باشد (Jeong *et al*., 2013). که با توجه به میانگین غلظت آمونیاک تولیدی جدایه‌ها در این روش و نیز سهولت اجرای آن، استفاده از روش مناسب به نظر می‌رسد. بررسی ۲۰ باکتری اندوفیت جداسازی شده از برگ چهار هالوفیت غالب و گونه‌های مقاوم به نمک در منطقه گجرات هند نشان داد که شش باکتری (۳۰٪) و دو باکتری (۱۰٪) به ترتیب تولیدکننده آمونیاک و دارای فعالیت انحلال فسفات معدنی بودند (Arora *et al*., 2014). از این تعداد ۸۵ درصد ایزوله‌ها (۱۷ باکتری) در کلرید سدیم ۷/۵ درصد رشد نمودند و ۱۵ باکتری یا ۷۵ درصد آنها به غلظت بیش از ۱۰ درصد کلرید سدیم مقاومت نشان دادند. تجزیه فیلوژنتیک باکتری‌ها نشان داد که بیشتر آنها به جنس باسیلوس تعلق داشتند (Arora *et al*., 2014).



شکل ۱. مقایسه میانگین غلظت آمونیاک تولیدی در جدایه‌های باکتریایی شورپسند (٪)



شکل ۲. مقایسه میانگین غلظت آمونیاک تولیدی در جدایه‌های باکتریایی قلیاپسند (٪)



شکل ۳. مقایسه میانگین غلظت آمونیاک تولیدی در جدایه‌های باکتریایی شور و قلیاپسند (٪)

جدول ۹. نتایج تجزیه و تحلیل رگرسیون چند متغیره غلظت آمونیاک در جدایه‌های باکتریایی شور، قلیا و شور و قلیاپسند

نوع جدایه	متغیرهای مستقل	ضرایب رگرسیون متغیرهای مستقل	معنی‌داری متغیرهای مستقل	معادله	ضریب رگرسیون (R^2)	ضریب رگرسیون تعدیل شده (R^2_{adj})	ضریب رگرسیون چندگانه ($R^2_{multiple}$)	معنی‌داری معادله
شورپسند	EC (dS/m) pH	۰/۸۳۹ ۱۰/۷	۰/۵۳۹ ۰/۲۲۷	NH_3=1.77EC-4.65pH-83.39	۰/۲۰۹	۰/۰۷۷	۰/۴۵۷	۰/۲۴۵
قلیاپسند	EC (dS/m) pH	$-۴/۸۲ \times ۱۰^{-۳}$ $۵/۸۴ \times ۱۰^{-۳}$	۰/۷۷۱ ۰/۷۸۰	$NH_3=2.67\times10^{-4}$ EC-1.38×10^{-4} pH +0.062	۰/۰۰۷	−۰/۱۱۷	۰/۰۸۶	۰/۹۴۳
شور و قلیاپسند	EC (dS/m) pH	$۴/۲۵ \times ۱۰^{-۲}$ ۲۵/۸	۰/۱۸۴ ۰/۱۹۷	NH_3=7.66EC-2.58pH-180.41	۰/۴۲۹	۰/۳۲۵	۰/۶۵۵	۰/۰۴۶*

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

بررسی غلظت تری ایندول استیک اسید در جدایه‌های شورپسند (شکل ۴) نشان داد که بیشترین غلظت IAA تولیدی به ترتیب در جدایه‌های H8، H7، H5 و H6 با اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگر مشاهده گردید (P<۰/۰۵). جدایه H4 تولیدکننده IAA نبود (شکل ۴). محدوده تولید تری ایندول استیک اسید در بین جدایه‌های شورپسند از صفر تا $۲/۰۳۶\times۱۰^{-۳}$ درصد متغیر بود.

اکثر جدایه‌های قلیاپسند تولیدکننده تری ایندول استیک اسید نبودند (شکل ۵). بیشترین غلظت IAA تولیدی با $۵/۷۵۲\times۱۰^{-۳}$ درصد و $۳/۸۲۷\times۱۰^{-۳}$ درصد و اختلاف معنی‌دار با یکدیگر در جدایه‌های A8 وA1 مشاهده گردید. سپس دو جدایه A11 و A13 بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر و نهایتاً جدایه A7، بیشترین غلظت تری ایندول استیک اسید را به خود اختصاص دادند (شکل ۵).

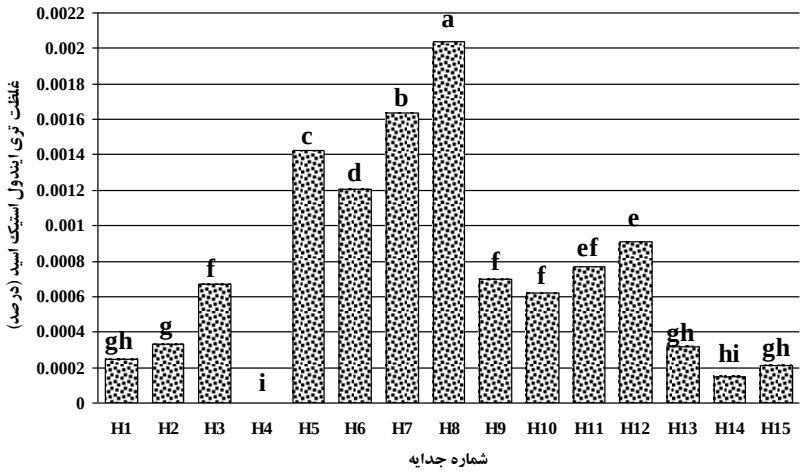
بیشترین و کمترین غلظت تری ایندول استیک اسید در جدایه‌های شورو قلیا پسند (شکل ۶) به ترتیب با $۵/۰۸۳\times۱۰^{-۳}$ و صفر درصد در دو جدایه HA3 و HA5 مشاهده گردید. دو جدایه HA8 و HA9 بیشترین غلظت IAA (به ترتیب $۴/۳۹۳\times۱۰^{-۳}$ و $۳/۶۰۴\times۱۰^{-۳}$ درصد) را پس از جدایه حداکثر و با اختلاف معنی‌دار با یکدیگر در سطح احتمال ۰/۰۵ نشان دادند.

مقایسه میانگین غلظت تری ایندول استیک اسید

تولیدی در سه گروه نشان داد که جدایه‌های شور و قلیا، شور و قلیاپسند به‌ترتیب با میانگین $۲/۱۱۶\times۱۰^{-۳}$، $۳/۴۶\times۱۰^{-۴}$ و $۱/۴۶\times۱۰^{-۴}$ درصد تولیدکننده تری ایندول استیک اسید بودند که غلظت تولیدی IAA شور و قلیاپسندها حدود ۶ و ۱۴/۵ برابر غلظت آن در دو گروه شور و قلیاپسندها بود.

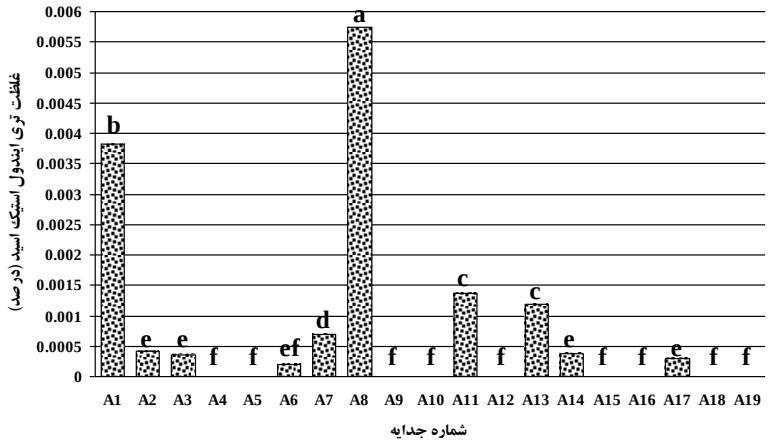
در تحقیقی بر ۶۰ جدایه ریزوبیومی و *سودوموناس فلورسنت* مشخص گردید که بین جدایه‌های *سودوموناس فلورسنت* و ریزوبیومی از نظر توان تولید IAA اختلاف معنی‌داری داشتند و در بین آنها جدایه R9 با حداقل غلظت تولید IAA ppm۰/۴۵ و جدایه R32 با حداکثر توان تولید IAA ۱۰/۸۶ ppm به ترتیب به عنوان جدایه‌های ناتوان و برتر انتخاب شدند (Alikhani *et al*., 2011). ارزیابی جمعیت و خواص محرک رشدی باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری در نهال‌های پسته تحت شرایط گلخانه‌ای نشان داد، فراوانی جدایه‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری در تولید ایندول استیک اسید، به ترتیب، ۴۸/۵، ۶۰ و ۴۷/۸ درصد و فراوانی جدایه‌ها در تثبیت نیتروژن، به ترتیب ۲۷/۳، ۶۴ و ۱۷/۴ درصد بود (Hojjat Noughi *et al*., 2013). بررسی و جداسازی دو باکتری مقاوم به شوری *باسیلوس لیچنوفورمیس*[1] و *باسیلوس*[2] به ترتیب با مقاومت ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی مول بر لیتر کلرید سدیم از منطقه ریزوسفر سیب‌زمینی از یک خاک شور در کشور الجزیره نشان داد هر دو باکتری تولیدکننده مقدار زیادی تری ایندول استیک اسید (به ترتیب ۷۸ و ۱۰۱ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. این باکتری‌ها علاوه بر تولید آنزیم‌های متعدد همانند اوره آز، توانایی تولید سیدروفور و انحلال فسفر معدنی و خاصیت ضد قارچی زیادی نیز از خود نشان دادند (Nabti *et al*., 2013).

در اکثر موارد یک باکتری افزاینده رشد از طریق بیش از یک سازوکار فعالیت می‌کند. بسیاری از باکتری‌ها دارای قابلیت تثبیت زیستی نیتروژن، محلول کردن فسفر و تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه می‌باشند که *آزوسپیریلیوم هالوپرفرانس* نمونه بارزی از این باکتری‌های شورپسند می‌باشد (Banerjee *et al*., 2006). Vessey (2003) ۲۶۶ سویه از باکتری‌های شورپسند را مورد بررسی قرار داده و دریافت که ۸۳ درصد آنها قابلیت تولید سیدروفورها، ۵۸ درصد تولیدکننده تری ایندول استیک اسید و ۵۴ درصد دارای توانایی حل کردن فسفات بودند.

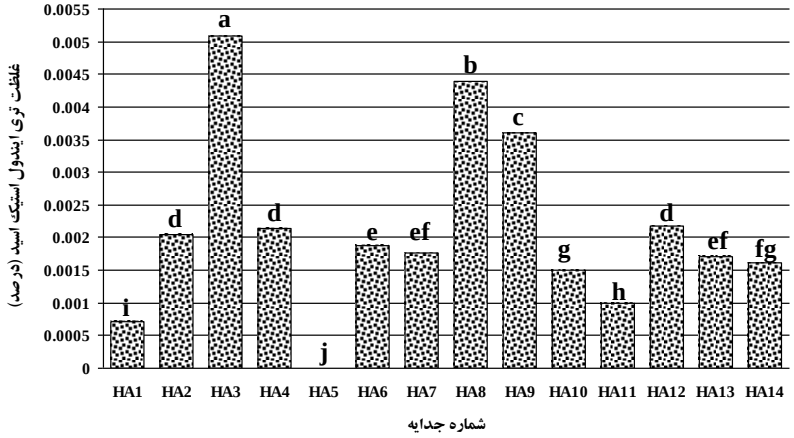


شکل ٤. مقایسه میانگین غلظت تری ایندول استیک اسید تولیدی در جدایه‌های باکتریایی شورپسند (٪)

1. *Bacillus licheniformis*
2. *Bacillus* sp



شکل ۵. مقایسه میانگین غلظت تری ایندول استیک اسید تولیدی در جدایه‌های باکتریایی قلیاپسند (٪)



شکل ٦. مقایسه میانگین غلظت تری ایندول استیک اسید تولیدی در جدایه‌های باکتریایی شور و قلیاپسند (٪)

نتایج تجزیه و تحلیل رگرسیون چند متغیره برای هر گروه از جدایه‌ها (جدول ۱۰) نشان داد که تنها معادله به‌دست آمده بر پیش‌بینی غلظت تری ایندول استیک اسید تولیدی در جدایه‌های شورپسند (اولین معادله جدول۱۰) تحت تأثیر هدایت الکتریکی محیط و pH در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (P=۰/۰۱۵). نتایج رگرسیون چند متغیره برای سایر معادله‌ها و ضرایب رگرسیونی به لحاظ آماری معنی‌دار نشد (جدول ۱۰).

جدول ۱۰. نتایج تجزیه و تحلیل رگرسیون چند متغیره غلظت تری ایندول استیک اسید تولیدی در جدایه‌های باکتریایی شور، قلیا و شور و قلیاپسند

نوع جدایه	متغیرهای مستقل	ضرایب رگرسیون متغیرهای مستقل	معنی‌داری متغیرهای مستقل	معادله	ضریب رگرسیون (R^2)	ضریب رگرسیون تعدیل شده (R^2_{adj})	ضریب رگرسیون چندگانه ($R^2_{multiple}$)	معنی‌داری معادله
شورپسند	EC (dS/m) pH	۰/۲۰۱ ۲/۵۰	۰/۲۱۸ ۰/۰۲۵	NH_3=0.024EC-0.0603pH-20.99	۰/۵۳۳	۰/۴۴۸	۰/۷۳۰	۰/۰۱۵*
قلیاپسند	EC (dS/m) pH	۳/۳۲ −۳/۱۰	۰/۷۱۵ ۰/۷۸۶	NH_3=80.3EC-41.5pH -5.58	۰/۰۱۰	−۰/۱۱۴	۰/۰۹۸	۰/۹۲۵
شور و قلیاپسند	EC (dS/m) pH	۹/۲۱ × ۱۰$^{-۳}$ ۴	۰/۸۳۴ ۰/۰۵۵	NH_3=1.86×10^{-3} EC-0.628pH+580.33	۰/۳۲۷	۰/۲۰۵	۰/۵۲۷	۰/۱۱۳

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

متوسط مقدار pH در جدایه‌های شورپسند اسیدی (معادل ۶/۷۲) بود (جدول ۳). رشد اکثر جدایه‌ها در محیط کشت موجب تغییر pH گردید. حداکثر و حداقل pH به ترتیب با ۴/۹ و ۸/۲ برای جدایه‌های H10 و H14 (بیشترین) و H6 (کمترین) مشاهده گردید. رشد شش جدایه H10، H14، H1، H2، H13 و H9 موجب کاهش مقدار pH نسبت به محیط کشت اولیه گردید، لیکن رشد سایر جدایه‌ها موجب افزایش pH در محیط کشت شد (جدول ۳). متوسط هدایت الکتریکی محیط dS/m ۶۰/۸۵ بود (جدول ۳). متوسط مقادیر پتانسیل اسمزی، کل مواد جامد محلول و غلظت به‌ترتیب bar ۲۱/۹، ۳/۸۹٪ و meq/l ۶۰۸/۵ بود. فشار اسمزی زیاد در محیط کشت باکتری‌ها که تقریباً برابر فشار اسمزی در خاک در نقطه پژمردگی دائم (atm ۱۰تا۲۰) می‌باشد را می‌توان یکی از دلایل زنده‌مانی و احتمالاً کارایی این باکتری‌ها در شرایط شوری زیاد خاک در مجاورت گیاه مطاق با گزارش‌های سایر محققان (Saatovich, 2006; Mishra *et al*., 2015) دانست.

مقایسه مقدار pH در جدایه‌های قلیاپسند (جدول۴) نشان‌دهنده شرایط قلیایی حاکم بر محیط کشت و تغییر pH محیط کشت بود (مقدار pH در شاهد ۸/۷ بود). رشد هیچ یک از باکتری‌ها در محدوده pH اسیدی و خنثی رخ نداد و جدایه A9 کمترین مقدار pH را به خود اختصاص داد (۷/۵). باکتری‌های قلیاپسند می‌توانند محیط زیست خود را به یک اسیدیته مناسب جهت رشد تغییر دهند (Horikoshi, 2006). *باسیلوس کلوزی*[1] شماره ۲۲۱ که یک تولیدکننده خوب پروتئاز قلیایی است، می‌تواند به آهستگی در pH خنثی رشد نماید و pH محیط کشت مایع را تغییر دهد. مشاهده شده است زمانی که pH محیط کشت به حدود ۹ رسید، باکتری شروع به رشد سریع نموده و مقدار زیادی از همان پروتئاز قلیایی را تولید نمود. اویاما و هوری کوشی یک قلیاپسند گونه *آرتروباکتر*[2] که از پلیمر ε- کاپرولکتوم[3] بهره‌برداری می‌کند، را جداسازی نمودند. این ریزجاندار همچنین توانایی تغییر pH محیط کشت مایع را به یک pH مناسب داشت (Horikoshi, 2006). بررسی مقدار هدایت الکتریکی جدایه‌ها نیز نشان داد که رشد آنها در محیط کشت تأثیر اندکی بر هدایت الکتریکی محیط رشد داشت. مقدار هدایت الکتریکی در نمونه شاهد برابر dS/m ۱۰/۴ بود. از دیگر ویژگی های بارز سویه‌های باسیلوس قلیاپسند این است که برای بسیاری از آنها یون‌های سدیم جهت رشد و تحرک مطلقاً مورد نیاز است. جذب اسید آمینه به درون سلول‌ها به‌عنوان تابعی از کلرید سدیم توسط Kitada & Horikoshi (1997) نشان داد که حضور کلرید سدیم نقش مهمی در مکانیزم انتقال فعال اسید آمینه به درون سلول‌های قلیاپسندها بازی می‌کند. در برخی از سویه‌های باسیلوس قلیاپسند، یون‌های پتاسیم (K^+) می‌توانند جایگزینی برای یون‌های سدیم باشند (Horikoshi, 2006). نیاز به سدیم همچنین در فرآیند تمایز، تولید اسپور و جوانه‌زنی سویه‌های قلیاپسند مشاهده و تایید شده است (Horikoshi, 2006). متوسط مقادیر پتانسیل اسمزی، کل مواد جامد محلول و غلظت به ترتیب bar ۴/۳۹، ۰/۷۸۱۵٪ و meq/l ۱۲۲/۱۱ بود (جدول ۴).

Kudo & Horikoshi (1983a) جوانه‌زنی باکتری قلیاپسند باسیلیوس سودوفیرموس را گزارش نمودند. هیچ جوانه‌زنی در غیاب کلرید سدیم مشاهده نشد. درجه حرارت مناسب برای جوانه‌زنی در حدود ۳۷ °C بود و جوانه‌زنی در محدوده pH ۸/۵ تا ۱۱/۱

1. *Bacillus clausii*

2. *Arthrobacter* sp.

۳. ε -caprolactam polymer (شیمی آلی) دارای فرمول $CONH(CH_2)_5$ تکه‌های سفید، نقطه ذوب ۶۸ تا ۶۹ درجه سلسیوس، ساخته‌شده از سیکلوهگزان، برای ساخت الیاف مصنوعی خصوصاً نایلون شش استفاده می‌شود.

اتفاق افتاد. pH مناسب برای جوانه‌زنی در حدود ۱۰ بود. غلظت کلرید سدیم مناسب برای جوانه‌زنی ۰/۱ تا ۰/۵ مولار بود. سایر کاتیون‌ها همانند پتاسیم، آمونیوم، روبیدیوم، سزیوم و کلسیم این اثر تحریکی را نشان ندادند. فقط کاتیون لیتیوم تحریک ضعیفی را نشان داد (Kudo & Horikoshi, 1983b).

میانگین pH در جدایه‌های شور و قلیاپسند ۸/۹۹ بود (جدول ۵) که اختلاف چندانی با مقدار pH شاهد (۹/۱۳) نداشت. میانگین هدایت الکتریکی در جدایه‌های شور و قلیاپسند بسیار زیاد بود (dS/m ۱۵۹/۶۱). بررسی مقدار هدایت الکتریکی در جدایه‌ها دارای اختلاف زیادی پس از رشد بود (جدول ۵). حداکثر و حداقل مقدار آن به ترتیب با dS/m ۴۸/۱۷ و ۲۵۹/۰۶ به ترتیب برای سویه HA1 و HA10 مشاهده گردید. متوسط مقدار پتانسیل اسمزی، کل مواد جامد محلول و غلظت نیز به ترتیب برابر bar ۵۷/۴۶، ۱۰/۲۱ ٪ و meq/l ۱۵۹۶/۱۶ بود (جدول ۵). متوسط pH در جدایه‌های قلیا و شور و قلیاپسند بیشتر از گروه شورپسندها بود. لیکن مقدار هدایت الکتریکی، فشار اسمزی، نمک‌های جامد محلول و غلظت به ترتیب در جدایه‌های قلیا، شور و شورقلیاپسند از روند افزایشی برخوردار بودند (جدول‌های ۳، ۴ و ۵). مقدار هدایت الکتریکی، فشار اسمزی، نمک‌های جامد محلول، غلظت در جدایه‌های شور و قلیا به ترتیب ۱۳ و ۲/۶ برابر قلیاپسندها و شورپسندها بود. این ریزجانداران به منظور بقا در شرایط پرتنش سازگاری‌های مختلف بیوانرژی و ساختاری برای حفظ هموستازی pH و فشار اسمزی داخل سلولی را توسعه داده‌اند (Sorokin *et al*., 2014). باکتری‌های شورزی مقدار نمک بیشتر از آنچه را که در محیط محلول خارجی وجود دارد از طریق برداشت فعال یون‌ها در پرتوپلاسم انباشته می‌سازند، لذا فشار آب داخل سلول در مقایسه با محلول خارجی منفی‌تر باقی می‌ماند و سیستم‌های آنزیمی آنها به نحوی تکامل یافته‌اند که در شرایط سطوح بالای نمک در پرتوپلاسم انجام وظیفه می‌نمایند. باکتری‌هایی با تحمل کمتر به شوری سیستم‌های آنزیمی تطابق یافته‌ای نداشته و برای تنظیم فشار اسمزی در پرتوپلاسم خود از محلول‌های آلی استفاده می‌کنند (Kafi & Mahdavi Damghani, 2000).

نتیجه‌گیری

میانگین میزان تولید آمونیاک در جدایه‌های قلیاپسند (٪۰/۰۵۵) بسیار بیشتر از دو گروه دیگر بود. روش نسلر روشی بسیار حساس در اندازه‌گیری آمونیاک در غلظت‌های پایین می‌باشد لیکن حتی در محیط کشت شورپسندها با متوسط pH برابر ۶/۷۲ و احتمال مزاحمت یونی و وجود خطا در اندازه‌گیری، به کارگیری روش با اندکی تغییر از نتایج مطلوبی برخوردار بود. غلظت IAA تولیدی در جدایه‌های شوروقلیاپسند از دو گروه دیگر بالاتر بود و این غلظت تحت تأثیر pH و هدایت الکتریکی نبود و مستقیماً به نوع ریزجاندار وابسته بود. از مطالعات فیزیولوژیکی روشن است که تنظیم جذب یون و جایگزینی آنها در داخل اندامک‌ها و سلول‌ها اساس تحمل را در این ریزجانداران تشکیل می‌دهند.

REFERENCES

Alikhani, H.; Saghafi Marakhanlo, D.; Ebadi Nahari, A.; (2011). Evaluation of production hormone auxin, indole acetic acid (IAA) by *Rhizobium* bacteria and *Pseudomonas fluorescens*. The first National Conference on Modern Agricultural Sciences & Technologies; Zanjan, University of Zanjan.

Arora, S.; Patel, P.N.; Vandez, M.J.; Rao, G.G.; (2014). Isolation and characterization of endophytic bacteria colonizing halophyte and other salt tolerant plant species from coastal

Gujarat. African Journal of Microbiology Journal; 8(17): 1779-1788.

Banerjee, M.; Yesmin, R.L.; Vessey, J.K.; (2006). Plant-growth promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides., pp.137-181. in: Handbook of microbial biofertilizers. Ed.,Rai, M., K., Food Production Press, U.S.A

Brenner, D. J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sec ed. Vol 2. Part B. Springer.

Bertrand, J.C.; Caumette, P.; Lebaron, P.; Matheron, R.; Normand, P.; Sime-Ngando, T.; (2014). Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology, Germany, Springer.

Butale, S.V.; Raut, A.A.; Sawant, T.B.; (2010). Application of moderately haloalkaliphilic nonsymbiotic diazotrophs of Lonar lake to saline soils. International Journal of Microbiology Research; 2(2): 1-4.

Detkova, E.N.; Boltyanskaya, Yu. V.; (2007). Osmoadaptation of Haloalkaliphilic Bacteria: Role of Osmoregulators and Their Possible Practical Application. Microbiology; 76(5): 511-522.

Feng, J.P.; Zhou, Y.; Zhou, S.; Liu Rhodes, K.W.; (2005). *Halorubrum alkaliphilum sp.* nov., a novel haloalkaliphile isolated from a soda lake in Xinjiang, China. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology; 55: 149-152.

Glickmann, E.; Dessaux, Y.; (1995). A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. Applied and Environmental Microbiology; 61(2): 793-796.

Gutierrez, C.K.; Matsui; G.Y.; Lincoln, D. E.; Lovell, C.R.; (2009). Production of the Phytohormone Indole-3-Acetic Acid by Estuarine Species of the Genus *Vibrio*. American Society for Microbiology; 75(8): 2253-2258.

Hartman, A.; (1988). Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* Spp. Plant and Soil; 110: 225-238.

Heonsang, J.; Jongtaek, P.; Hyunook, K.; (2013). Determination of NH^{4+} in Environmental Water with Interfering Substances Using the Modified Nessler Method. Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry; 1-9.

Hojjat Noughi, F.; Akhgar, A.R.; Esfandiarpour, I.; Khavazi, K.; (2013). Evaluation of Population and Properties of PGPB of Endorhizosphere, Rhizosphere and Nonrhizosphere in Pistachio Seedlings. Water and Soil Science; 23(4): 215-234.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T.; (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilrins. Maryland.

Horikoshi, K.; (1999). Alkaliphiles. Kodansha: Hardwood Academy Publisher, Germany, Springer.

Horikoshi, K.; (2006). Alkaliphiles-Genetic Properties and Applications of Enzymes, Japan, Springer.

Horikoshi, K.; (1999). Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews; 735-750.

Jeong, H.; Park, J.; Kim, H.; (2013). Determination of NH4+ in environmental water with interfering substances using the modified Nessler method. Journal of Chemistry, Hindawi Publishing Corporation; 1-10.

Jones, B.; Brian, E.; Gravin, J.; Stolberglaan, V.; (1992). European patent application. Bulletin 93/18, Publication number: EP 0 540 127 A1, Rank Xerox (UK) Business Services (3. 10/3.6/3.3. 1).

Joshi, R.; (2006). Extracellular Enzymes from halophilic and haloalkaliphilic bacteria isolated from seawater along the coastal Gujarat. Rajkot, India:

Saurashtra University.

Kafi, M.; Mahdavi Damghani, A.; (2000). Mechanisms of environmental stress resistance in plants. Ferdowsi University Press.

Khakipour, N.; Khavazi, K.; Akhgar, A.; (2012). Identification of Indole compounds produced by a selection of *fluorescent Pseudomonas* and their inoculation effect on the growth of rape. Iranian Journal of soil Research; (A) 26(4): 415-423.

Kitada, M.; Horikoshi, K.; (1997). Sodium ion-stimulated a-(l-C)-aminoisobutyric acid uptake in alkalophilic *Bacillus* species. Journal of Bacteriology; 131: 784-788.

Kudo, T.; Horikoshi, K.; (1983b). RNA-polymerase of alkalophilic *Bacillus* sp. No.2b-2. The Third International Symposium Ribosomes and Nucleic Acid Mitabolism; Czechoslovakia; 247-256.

Kudo, T.; Horikoshi, K.; (1983a). RNA Polymerase from vegetative cells and spores of an alkalophilic *Bacillus* sp. Spores VII, 220. The Third International Symposium Ribosomes and Nucleic Acid Mitabolism; Czechoslovakia.

Mishra, S.; Singh, R.P.; Raghuvanshi, S.; Gupta, S.; (2015). Deducing the Bio-Perspective Capabilities of Fe(II) Oxidizing Bacterium Isolated from Extreme Environment. Biochemistry & Analytical Biochemistry; 4(2):1-5.

Moradi, A.; Tahmourespour, A.; Hoodaji, M.; Khorsandi, F.; (2011). Effect of salinity on free living - diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. African Journal of Microbiology Research; 5(2): 144-148.

Nabti, E.H.; Mokrane, N.; Ghoul, M.; Manyani, H.; Dary, M.; Megias, M.G.; (2013). Isolation and Characterization of Two Halophilic Bacillus (*B. licheniformis* and *Bacillus* sp.) with Antifungal Activity. Journal of Ecology of Health & Environment; 1(1): 13-17.

Oren, A.; Gurevich, P.; Henis, Y.; (2001). Reduction of nitro substituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eu-bacteriua *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacfer marismortui*. Applied and Environmental Microbiology; 57: 3367-3370.

Rohban, R.; Amoozegar, M.A.; Ventosa, A.; (2009). Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Journal Industerial Microbiology and Biotechnology; 36: 333-340.

Rontein, D.; Basset, G.; Hanson, A.D.; (2002). Metabolic Engineering of Osmoprotectant Accumulation in Plants. Metabolic Engineering; 4: 49-56.

Saatovich, S.Z.; (2006). *Azospirilli* of Uzbekistan soil and their influence on growth and development of wheat plants. Plant and Soil; 283: 137-145.

Sahay, H.; Mahfooz, S.; Singh, A.K.; Singh, S.; Kaushik, R.; Saxena, A.K.; Arora, D.K.; (2012) Exploration and characterization of agriculturally and industrially important haloalkaliphilic bacteria from environmental samples of hypersaline Sambhar lake, India. World Journal of Microbiology and Biotechnology; 28: 3207-3217.

Singh, S.P.; Purohit, M.K.; Raval, V.H.; Pandey, S.; Akbari, V.G.; Rawal, C.M.; (2010). Capturing the potential of Haloalkaliphilic bacteria from the saline habitats through culture dependent and metagenomic approaches. *Curent Reasearch*, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology; 81-87.

Sorokin, D.Y.; Berben, T.; Denise Melton, E.; Overmars, L.; Vavourakis, C.H.D.; Muyzer, G.; (2014). Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. Extremophiles; 18(5): 791-809.

Sorokin, D.Y.; (2003). Oxidation of inorganic sulfur compounds by obligatory organotrophic bacteria. Microbiology (Moscow, English Translation); 72: 641-653.

Sturr, M.G.; Guffanti, A.A.; Krulwich, T.A.; (1994). Growth and bioenergetics of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 in continuous culture at high pH. Journal of Bacteriology; 176: 3111-3116.

Swain, M.R.; Naskar, S.K.; Ray, R.C.; (2007). Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culture able cowdung micro flora. Polish Journal of Microbiology; 56(2): 103-110.

Ventosa, A.; Quesada, E.; Rodriguez-Valera, F.; Ruiz-Berraquero, F.; Ramos-Cormenzana, A.; (1982). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. Journal of general microbiology; 128: 1959-1968.

Vessey, J.K.; (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil; 255: 571-586.

Yuen, S.H.; Pollard, A.G.; (1952). The determination of nitrogen in agricultural materials by the Nessler regent. I. Prepration of the regent. Journal of the Science of Food and Agriculture; 441-447.

Zanjirband, M.; Kasra Kermanshahi, R.; Golbang, N.; (2013). Isolation of the moderately halophilic bacteria and effects of pH and incubation on their growth. Journal of Taxonomy and Biosystematics; 1(1): 21-32.