Iranian Journal of Soil and Water Research ISNN: 2423-7833
Homepage: http://ijswr.ut.ac.ir

Isolation, Screening and Identification of Growth-Promoting Rhizobacteria Resistant to Abiotic Stresses from the Microbiome of Alfalfa (*Medicago sativa*) in Saline and Arid Soils in Kerman Province

Mahboobeh Abolhasani Zeraatkar[1]✉ | **Ahmad Tajabadi Pour**[2]

1. Corresponding Author, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: m.abolhasani@uk.ac.ir
2. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Vali-e-asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran. E-mail: tajabadi@vru.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: March. 15, 2023

Revised: May. 17, 2023

Accepted: May. 28, 2023

Published online: June. 22, 2023

Keywords:
Abiotic Stress,
Biofertilizer,
Exopolysaccharide,
Hydrogen Cyanide,
Phosphate Solubilization.

ABSTRACT

The purpose of this study is to investigate the characteristics of plant growth promoting rhizobacteria that stimulate plant growth, such as biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, and produce hydrogen cyanide and exopolysaccharides, to prepare suitable and efficient biofertilizers. In this research, 135 Rhizobacteria strains were isolated, screened and identified from saline and arid soils in Kerman Province, and some of their growth-promoting characteristics were studied. The Rhizobacteria strains were studied with respect to their ability to fix nitrogen, solubilize insoluble organic and inorganic phosphates in solid and liquid culture media, and produce hydrogen cyanide and exopolysaccharides. Their growth at various sodium chloride concentrations (0, 1, 3, and 5%) and at different polyethylene glycol 6000 concentrations (water potential 0, -1, -2, and -3.5 MPa) was also investigated. According to the results, 72% and 76% of the Rhizobacteria strains exhibited almost no growth at 5% sodium chloride concentration and at water potential -3.5 MPa, respectively. In addition, 50% of them were able to produce hydrogen cyanide under saline conditions. Three of the strains (SM16, SM65, and SM89) were the most efficient producers of exopolysaccharides and had high phosphate solubilization ability (102, 98.5 and 121.7 mL/L, respectively) and were also among Rhizobacteria strains resistant to abiotic stresses. Three strain safe and efficient strains can have great potential to be used as a high quality biofertilizer for improving growth of crop plants in the region.

Cite this article: Abolhasani Zeraatkar, M., Tajabadi Pour, A. (2023) Isolation, Screening and Identification of Growth-Promoting Rhizobacteria Resistant to Abiotic Stresses from the Microbiome of Alfalfa (Medicago sativa) in Saline and Arid Soils in Kerman Province, *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 54 (4), 675-693. https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.356810.669471

© The Author(s). Publisher: University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.356810.669471

مجله تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۴، شماره ۴ شاپا: ۲۴۲۳-۷۸۳۳
Homepage: http://ijswr.ut.ac.ir

جداسازی، غربالگری و شناسایی ریزوباکتری‌های محرک رشد مقاوم به تنش‌های غیرزیستی از میکروبیوم گیاه یونجه (*Medicago sativa*) در خاک‌های خشک و شور استان کرمان

محبوبه ابوالحسنی زراعتکار[۱] ✉ | احمد تاج‌آبادی پور[۲]

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، رایانامه: m.abolhasani@uk.ac.ir

۲. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران، رایانامه: tajabadi@vru.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۲/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۷
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۴/۱

واژه‌های کلیدی:
اگزوپلی ساکارید،
انحلال فسفات،
تنش غیرزیستی،
سیانید هیدروژن،
کود زیستی.

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی خصوصیات ریزوباکتری‌های بومی محرک رشد از قبیل تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، انحلال فسفات، تولید سیانید هیدروژن و اگزوپلی ساکارید در راستای تهیه کود زیستی مناسب و کارآمد منطقه انجام شد. در این مطالعه، ۱۳۵ باکتری از ریشه گیاه یونجه در خاک‌های شور و خشک استان کرمان جداسازی، غربالگری و شناسایی شد و برخی از ویژگی‌های محرک رشد بودن این ریزوباکتری‌ها هم مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ریزوباکتری‌ها از نظر توانایی تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات‌های آلی و معدنی نامحلول در محیط کشت جامد و مایع، تولید سیانید هیدروژن و اگزوپلی ساکارید مورد بررسی قرار گرفتند. رشد ریزوباکتری‌ها در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۰، ۱، ۳ و ۵ درصد) و غلظت‌های مختلف پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (پتانسیل آبی ۰، ۱-، ۲- و ۳/۵- مگاپاسکال) نیز مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی‌ها نشان داد که ۷۲ درصد ریزوباکتری‌ها در سطح ۵ درصد نمک کلرید سدیم و ۷۶ درصد در سطح پتانسیل آبی ۳/۵- مگاپاسکال تقریبا هیچ رشدی نداشتند. از طرفی ۵۰ درصد ریزوباکتری‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن در شرایط شور را داشتند. سه باکتری SM16، SM65 و SM89 از کارآمدترین ریزوباکتری‌های تولیدکننده اگزوپلی ساکارید و دارای قدرت حل کنندگی فسفات بالا به ترتیب به میزان ۱۰۲، ۹۸/۵ و ۱۲۱/۷ میلی‌گرم بر لیتر بودند و از طرفی جزء ریزوباکتری‌های مقاوم به تنش‌های غیرزیستی نیز قرار داشتند. بنابراین این سه سویه باکتریایی ایمن و کارآمد ممکن است پتانسیل خوبی برای تبدیل شدن به یک کود زیستی با کیفیت بالا جهت بهبود رشد محصولات زراعی در منطقه را داشته باشند.

استناد: ابوالحسنی زراعتکار؛ محبوبه، تاج آبادی پور؛ احمد، (۱۴۰۲). جداسازی، غربالگری و شناسایی ریزوباکتری‌های محرک رشد مقاوم به تنش‌های غیرزیستی از میکروبیوم گیاه یونجه (Medicago sativa) در خاک‌های خشک و شور استان کرمان. *مجله تحقیقات آب و خاک ایران*، ۵۴ (۴)، ۶۹۳-۶۷۵.
https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.356810.669471

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.356810.669471

مقدمه

نظام کشاورزی جهان در قرن بیست و یکم با چالش‌های بیشتری، مانند کاهش در بهره‌وری و تخریب در پایداری اکوسیستم کشاورزی روبرو شده است. طبق برآوردهای سازمان ملل متحد پیش‌بینی می‌شود جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به ۹ بیلیون نفر برسد (Wood, 2001) و افزایش مستمر تقاضا برای غذا و کمبود همزمان در عرضه وجود داشته باشد (Kumar et al., 2017). بنابراین کشاورزان بایستی به سمت کشاورزی پایدار سوق داده شوند تا نیازهای کشاورزی جهان در آینده تامین شود (Altieri, 2004).

از طرفی شوری خاک و کم‌آبی از بزرگترین موانع رشد محصولات کشاورزی در جهان و به‌ویژه در ایران و استان کرمان محسوب می‌شوند. از طرفی به‌دلیل تغییرات اقلیمی در سال‌های اخیر، شاهد افزایش چشمگیر خشکسالی هستیم. معمولاً تعداد بسیار زیادی باکتری در خاک (حدوداً 10^8 تا 10^9 باکتری در هر گرم خاک) وجود دارد، اما در هر گرم از خاک تحت تنش خشکی یا شوری اغلب 10^6 باکتری یافت می‌شود (Timmusk et al., 2011). برای حفظ کشاورزی پایدار، طبیعت پویای خاک نه تنها برای تولید غذای کافی بلکه برای حفظ پایداری محیط زیست در سراسر جهان برای نسل آینده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Ahmad et al., 2016; Paustian et al., 2016).

تمامی گیاهان میزبان میکروبیوم خاصی هستند. میکروبیوم متشکل از باکتری‌ها، قارچ‌ها، ائومیست‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌های باستانی و آغازیان است (Compant et al., 2019). توزیع میکروبیوم در سراسر خاک به‌طور یکنواخت و مساوی نیست، اغلب تعداد میکروبیوم‌ها در اطراف ریشه گیاهان (ریزوسفر) بسیار بیشتر از تعداد آن‌ها در توده خاک است. ریشه‌های گیاهان مقدار زیادی قند، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی کوچک از خود ترشح می‌کنند. همین امر باعث می‌شود میکروبیوم‌ها در اطراف ریشه گیاهان تجمع کنند و از این مواد به‌عنوان منبع تغذیه استفاده کنند (Badri et al., 2009). گیاهان میکروبیوم‌های خاص خود را دارند و این میکروبیوم‌ها دارای چندین عملکرد و ویژگی منحصربه‌فرد می‌باشند. گیاهان با انتخاب فعالیت‌های خاص میکروارگانیسم‌های میکروبیوم ریزوسفری خود می‌توانند از اثرات مثبت این میکروارگانیسم‌ها در رشد و بقای خود بهره ببرند (Gupta et al., 2021). ارتباط متقابل بین میکروبیوم و گیاه میزبان وجود دارد، بدین شکل که گیاهان ارتباطات شیمیایی بین میکروب‌ها را دریافت و درک می‌کنند و میکروب‌ها نیز قادرند پیام‌های شیمیایی گیاهی را دریافت و درک کنند، بنابراین بر اساس این روابط سلامت گیاه را می‌توان با تغییر در اعضای میکروبیوم ریزوسفر از بین برد یا اصلاح کرد (Korenblum et al., 2022). جمعیت میکروبی در ارتباط با گیاهان می‌تواند نقش مثبت مهمی در رشد گیاه و بهبود کیفیت تولیدات مختلف زراعی ایفا کند. در بین میکروارگانیسم‌های خاک، باکتری‌هایی که به عنوان ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR[1]) شناخته می‌شوند امیدوار کننده‌ترین هستند. ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه باعث افزایش سلامت گیاه و افزایش سرعت رشد گیاه بدون ایجاد آلودگی زیست محیطی می‌شوند (Calvo et al., 2014; Singh et al., 2017). تحریک رشد گیاه توسط باکتری‌های محرک رشد با مکانیسم‌های مختلف به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم صورت می‌گیرد. تحریک مستقیم رشد گیاه توسط ریزوباکتری‌های محرک رشد بدین شکل است که باکتری با تولید یک یا چند هورمون گیاهی، مانند اُکسین، سیتوکینین یا جیبرلین یا بهبود توانایی گیاه در جذب عناصر غذایی خاک باعث تحریک رشد گیاه می‌شوند، باکتری‌ها این کار را از طریق تامین آهن، فسفات، روی و پتاسیم محلول و تثبیت نیتروژن برای گیاه انجام می‌دهند (Glick, 2012; Gamalero & Glick, 2019). بیشتر این باکتری‌ها قدرت انجام تعدادی از این فعالیت‌ها را با هم دارند. تحریک غیرمستقیم رشد گیاه توسط ریزوباکتری‌های محرک رشد زمانی اتفاق می‌افتد که این باکتری‌ها در نقش عامل کنترل‌گر زیستی وارد عمل شوند و با توقف پاتوژن‌های گیاهی، روند رشد را به حالت عادی بازگردانند. این روش‌ها شامل ساخت آنتی‌بیوتیک‌های بازدارنده‌ی پاتوژن‌ها، تولید سیانید هیدروژن، ساخت آنزیم‌های لیز کننده دیواره‌ی سلولی قارچ‌های بیماری‌زا، تولید سیدروفور (آهن‌بَر) در نتیجه پاتوژن‌ها از دستیابی به آهن موردنیازشان محروم می‌مانند، رقابت با پاتوژن‌های گیاهی بر سر اشغال جایگاه بر سطح یا نزدیک ریشه گیاهان و ساخت هورمون‌های گیاهی می‌باشند.

در مورد خاک تحت تنش‌های غیرزیستی، مانند خاک تحت تاثیر شوری یا کمبود آب، سازگاری باکتری انتخاب‌شده با این شرایط سخت بایستی در نظر گرفته شود. تنش ممکن است ویژگی‌های فیزیولوژیکی باکتری‌های مفید برای گیاهان را تغییر دهد (Rubiano et al., 2015; Bogati & Walczak., 2022). در فشار محیطی ناشی از شوری یا خشکی، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها با تحمل بالا بایستی انتخاب شوند. زیرا باکتری‌های محرک رشد موجود در سطح یا داخل ریشه‌ی گیاهان می‌توانند در شرایط کم‌آبی یا شوری مقاومت کنند و آسیب‌های ناشی از کم‌آبی و یا شوری را در گیاهان کاهش دهند (Lau & Lennon, 2012). برای جداسازی و شناسایی مجموعه باکتری‌های

1. Plant growth-promoting Rhizobacteria

محرک رشد گیاه در محیط‌های شور یا خشک، محل نمونه‌برداری سویه‌های باکتریایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و ازآنجایی‌که گیاهان محلی و بومی محیط‌های خشک و شور با میکروبیوتای مرتبط خود تکامل یافته‌اند، اعتقاد بر این است که انتخاب سویه‌های باکتریایی از این محیط‌های بومی خاص ممکن است به دستیابی سویه‌های باکتریایی منجر شود که مقاوم به تنش‌های غیرزیستی هستند و بقا و ماندگاری طولانی‌تری در مزارع با فضای باز را در خاک‌های آن منطقه دارند (Alori et al., 2020).

تجاری‌سازی گروه‌های باکتری‌های محرک رشد تحت‌عنوان کودهای زیستی چالشی بزرگی است. کود زیستی به ماده‌ای اطلاق می‌شود که حاوی میکروارگانیسم‌های زنده است که وقتی روی بذر، گیاه یا خاک استفاده می‌شود، در ریزوسفر یا داخل گیاه کلونیزه می‌شود و با مکانیسم‌های انحلال فسفات، تولید سیدروفور، تولید اگزوپلی ساکارید، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن و افزایش فراهمی سایر عناصر غذایی مورد نیاز گیاه باعث تحریک و افزایش رشد گیاه می‌شوند. استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد به عنوان کودهای زیستی در سیستم کشاورزی علاوه بر کشاورزی پایدار برای سلامتی انسان‌ها نیز اهمیت زیادی دارد. استفاده از مجموعه‌های میکروارگانیسمی در حال تبدیل‌شدن به ابزاری قابل اعتماد و قدرتمند برای حمایت از رشد گیاهان در محیط‌های تحت تنش، به ویژه تحت تنش شوری (Yanez yazlle et al., 2021; Kapadia et al., 2021) یا کم‌آبی (Mansour et al., 2021; Saleem et al., 2021) است. با توجه به اینکه سطح وسیعی از زمین‌های استان کرمان شور و خشک هستند و تاکنون مطالعه جامعی روی بررسی صفات محرک رشدی باکتری‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* در سطح وسیع استان کرمان که تحت درجه‌های مختلف از خشکی و شوری قرار دارند، انجام نشده است و به منظور جستجوی سویه‌های جدید *سینوریزوبیوم ملیلوتی* محرک رشد گیاه یونجه برای تهیه کودهای زیستی و توسعه نقشه تنوع میکروبی در استان کرمان مطالعه در این زمینه امری ضروری به نظر می‌رسد، بدین جهت مطالعه حاضر به جستجوی باکتری‌های محرک رشد بومی گیاه یونجه در محیط‌های خشک و شور استان کرمان که دارای خصوصیت مناسب جهت تهیه کود زیستی (مقاوم به تنش‌های غیرزیستی، تثبیت بیولوژیک نیتروژن، انحلال فسفات، تولید اگزوپلی ساکارید، تولید سیانید هیدروژن و غیره) هستند، پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

در این مطالعه ۱۳۵ جدایه از گره‌های ریشه یونجه (*Medicago Sativa*) بومی استان کرمان جداسازی و غربالگری شدند. مزارع یونجه استان کرمان با بیشترین سطح زیر کشت به‌عنوان جامعه آماری در نظر گرفته شد و از ریشه گیاهان یونجه و خاک این مزارع نمونه‌برداری صورت گرفت. pH در گل اشباع و هدایت الکتریکی (EC) در عصاره گل اشباع نمونه‌های خاک مزارع اندازه‌گیری شد. خاک‌های مزارع یونجه استان کرمان دارای pH در محدوده ۷/۶ تا ۸/۲ و شوری خاک (EC) این مزارع نیز در محدوده ۴/۶۷ تا ۱۴/۲۳ دسی‌زیمنس بر متر مربع بود. سویه‌ها از گره‌های ریشه یونجه جدا شدند. بدین منظور گره‌های هر بوته ضدعفونی و در مقداری آب نمک استریل (کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد (وزنی/حجمی)) له و مقداری از این سوسپانسیون روی محیط کشت YEM دارای مانیتول ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، K_2HPO_4 ۰/۵ گرم، KH_2PO_4 ۰/۱ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۲ گرم، NaCl ۰/۱گرم، آگار ۱/۵ درصد (وزنی/حجمی)، کنگورد ۰/۰۲۵ درصد (وزنی/حجمی) و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر کشت شدند (Surange et al., 1997). pH محیط بر روی ۷ تنظیم شد. بعد از جداسازی و خالص سازی جدایه‌ها از آزمون گره‌زایی (Beck et al., 1993) جهت تایید باکتری‌های *سینوریزوبیوم* استفاده شد و بر اساس توانایی گره‌زایی و وضعیت مطلوب رشد گیاه تعداد ۹۷ باکتری *سینوریزوبیومی* .*Sinorhizobim sp* تایید و برای مطالعه مرحله بعد انتخاب شدند. برای نگهداری طولانی باکتری‌های منتخب روی محیط کشت جامد YEM حاوی کربنات کلسیم در لوله‌های درب‌دار به‌صورت مورب کشت داده و بعد از رشد کافی در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

ارزیابی نیمه کمی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول ریزوباکتری‌ها

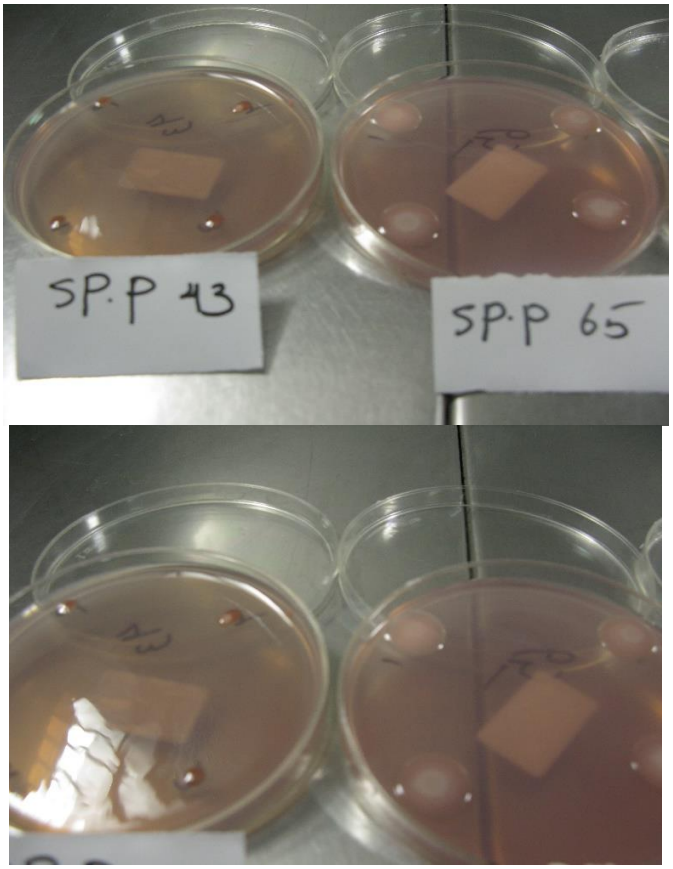
در این مرحله توان حل کنندگی فسفات معدنی نامحلول ۹۷ باکتری تایید شده مورد بررسی قرار گرفت. از محیط کشت SP[1] دارای گلوکز ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۲۵ گرم، $CaCl_2$ ۰/۱گرم، $Ca_3(PO4)_2$ ۲/۵ گرم، آگار ۱/۷ درصد (وزنی/حجمی) و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد (Sperber, 1958). pH محیط بر روی ۷ تنظیم شد. برای هر باکتری یک پتری حاوی محیط کشت SP (چهار تکرار در هر پتری) در نظر گرفته شد. ابتدا هر باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع SP رشد داده شد و بعد از گذشت ۴۸

1. Sperber

ساعت از رشد باکتری به مرکز هر یک از قسمت‌های چهارگانه پتری، مقدار ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح شد. پتری‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۱ روز نگه‌داری شدند. جهت بررسی انحلال فسفات از شاخص حلالیت فسفات (رابطه ۱) استفاده شد (Sharon et al., 2016).

رابطه ۱) $\text{شاخص حلالیت فسفات} = \frac{CD+HD}{CD}$

در این فرمول قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات اطراف کلنی (HD) و قطر کلنی رشد یافته (CD) می‌باشد (شکل ۱) و این شاخص مبنای توان حل کنندگی فسفات معدنی نامحلول باکتری‌ها در نظر گرفته شد.



شکل ۱. هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات اطراف کلنی (HD) و قطر کلنی رشد یافته (CD) در محیط کشت اسپربر در دو باکتری SM65 و SM43

ارزیابی نیمه کمی توانایی انحلال فسفات آلی باکتری‌ها

برای بررسی توان حل کنندگی فسفات آلی ۹۷ باکتری انتخاب شده، از محیط کشت[1]ISP استفاده شد. pH محیط بر روی ۷ تنظیم شد. از آنجایی که فیتات‌ها فراوان‌ترین انواع فسفات آلی موجود در خاک هستند (Dalal, 1977) بنابراین در محیط کشتISP به جای تری‌کلسیم فسفات موجود در محیط اسپربر از اینوزیتول هگزا فسفات به عنوان منبع فسفر آلی استفاده شد. مراحل آزمایشی این آزمون همانند آزمون بررسی توان حل کنندگی فسفات معدنی نامحلول باکتری‌ها بود.

ارزیابی مقاومت به شوری ریزوباکتری‌ها

از بین ۹۷ باکتری منتخب ۲۵ ریزوباکتری جهت ارزیابی مقاومت به تنش شوری و خشکی انتخاب شدند. جهت بررسی تحمل به شوری ریزوباکتری‌ها رشد آن‌ها در محیط کشت مایع YEM با غلظت‌های ۰، ۱، ۳ و ۵ درصد کلرید سدیم اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل ۲۵ ریزوباکتری با ۴ سطح شوری در سه تکرار انجام شد. برای این منظور ابتدا ریزوباکتری‌ها در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YEM رشد داده شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از رشد ریزوباکتری مقدار۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون‌ها برداشته و پس از یکسان کردن تعداد سلول‌های باکتری به محیط کشت تازه YEM حاوی مقادیر متفاوت کلرید

1. Inisitol hexa

سدیم اضافه و در انکوباتور چرخان با ۱۸۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگه‌داری و پس از گذشت ۷۲ ساعت میزان رشد ریزوباکتری‌ها بر اساس چگالی نوری (OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

ارزیابی مقاومت به خشکی ریزوباکتری‌ها

جهت بررسی تحمل به خشکی ریزوباکتری‌ها رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع YEM با پتانسیل آبی ۰، ۱-، ۲- و ۳/۵- مگاپاسکال (با پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰) در سه تکرار اندازه‌گیری شد. این آزمایش نیز در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل ۲۵ ریزوباکتری با ۴ سطح پتانسیل آبی در سه تکرار انجام شد. برای این منظور ابتدا هر باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YEM رشد داده و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از رشد باکتری مقدار۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته و پس از یکسان کردن تعداد سلول‌های باکتری به محیط کشت تازه YEM حاوی مقادیر متفاوت پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ اضافه و در انکوباتور چرخان با ۱۸۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگه‌داری و پس از گذشت ۷۲ ساعت میزان رشد ریزوباکتری‌ها بر اساس چگالی نوری (OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کمی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول ریزوباکتری‌ها

برای این آزمون تعداد ۱۴ باکتری انتخاب شد. بدین منظور ابتدا هر ریزوباکتری در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع SP رشد داده شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از رشد باکتری مقدار۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته و پس از یکسان کردن تعداد سلول‌های باکتری به محیط کشت تازه SP افزوده و در انکوباتور چرخان با ۱۸۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگه‌داری و در زمان‌های ۵۰ و ۱۰۰ ساعت میزان فسفات قابل استفاده با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. بدین جهت در زمان‌های ۵۰ و ۱۰۰ ساعت ۲ میلی‌لیتر محیط کشت از هر لوله فالکون برداشته شد. برای حذف باکتری و مواد جامد روی محیط کشت عمل سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام و میزان فسفر قابل استفاده در محلول رویی شفاف با روش مولیبدات وانادات اندازه‌گیری شد (Cotteni, 1980).

ارزیابی کیفی توان تولید سیانید هیدروژن (HCN) ریزوباکتری‌ها در شرایط شور

برای این آزمون نیز تعداد ۱۴ ریزوباکتری مرحله قبل در نظر گرفته شد. برای ارزیابی کیفی توان تولید سیانید هیدروژن از روش اسیدپیکریک استفاده شد (Egamberdiyeva, 2009). برای هر ریزوباکتری سه پتری حاوی محیط کشت جامد YEM با سطح شوری ۳ درصد به‌کار برده شد. سپس هر باکتری ابتدا در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YEM رشد داده و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از رشد باکتری مقدار۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته و پس از یکسان کردن تعداد سلول‌های باکتری به هر پتری حاوی محیط کشت جامد YEM تلقیح شد. سپس کاغذ صافی آغشته به محلول معرف (۲ درصد کربنات سدیم و ۰/۵ درصد اسیدپیکریک) روی محیط کشت قرار داده و با پارافیلم با دقت، جلوگیری از خروج سیانید هیدروژن، درزگیری و در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت نگه‌داری شدند. توان تولید سیانید هیدروژن با توجه به تغییر رنگ کاغذ معرف از زرد تا قهوه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت (Castric, 1974).

بررسی میزان تولید اگزوپلی ساکارید ریزوباکتری‌های مقاوم به شوری در شرایط تنش

برای این آزمون تعداد ۵ ریزوباکتری انتخاب شد. این مطالعه در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل ۵ ریزوباکتری (سه باکتری مقاوم، یک جدایه نیمه مقاوم و حساس‌ترین باکتری به خشکی و شوری) با ۴ سطح شوری (۰، ۱، ۳ و ۵ درصد کلرید سدیم) در سه تکرار انجام شد. برای این منظور ابتدا هر باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YEM رشد داده شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از رشد باکتری مقدار۱۰۰ ماکرولیتر برداشته و پس از یکسان کردن تعداد سلول‌های باکتری از این سوسپانسیون‌ها به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت تازه YEM حاوی مقادیر مختلف کلرید سدیم اضافه شد. ارلن‌ها به انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از گذشت مدت زمان ۱۲۰ ساعت محیط کشت کاملا هم زده و عمل سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۱۵ درجه سلسیوس) انجام شد. محلول رویی جداسازی و به آن آمونیوم استات یک مولار اضافه شد (شکل ۲). جهت رسوب اگزوپلی‌ساکارید در محلول دو برابر محلول رویی ایزوپروپانول سرد اضافه و رسوب حاصل توزین شد (Gauri et al., 2009).

شکل ۲. اگزوپلی ساکارید ریزوباکتری‌ها

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

در این پژوهش تعداد ۱۳۵ جدایه از گره‌های یونجه در استان کرمان جداسازی شدند. جدایه‌ها گرم منفی و میله‌ای بودند. کلنی‌های این جدایه‌ها دایره‌ای، لعابی و چسبناک، محدب، شیری رنگ و فاقد توان جذب کنگورد بودند که با خصوصیات مورفولوژیکی باکتری‌های *سینوریزوبیوم* در مطالعات دیگر مطابقت داشت (Latrach et al., 2017). از آنجایی که مطمئن‌ترین روش تشخیص *سینوریزوبیوم ملیلوتی* بررسی توانایی آلودگی گیاه میزبان است (Beck et al., 1993). در آزمونی که بر روی ۱۳۵ جدایه خالص‌سازی شده صورت گرفت، تعداد ۹۷ جدایه که پس از گذشت ۶ هفته توانایی گره‌دار کردن گیاه یونجه در هر سه تکرار را داشتند و از طرفی گیاه میزبان آن‌ها دارای وضعیت رشد عالی در هر سه تکرار بود، به‌عنوان باکتری *سینوریزوبیوم ملیلوتی* تایید و برای مراحل بعدی پژوهش انتخاب شدند. اینکه برخی از جدایه‌های خالص‌سازی شده توانایی گره‌دار کردن گیاه یونجه را نداشتند می‌توان به‌دلیل وجود باکتری‌های غیرسینوریزوبیومی داخل گره و یا سایر آلودگی‌ها در زمان کشت و خالص سازی تاثیر گذار باشد و یا اینکه باکتری *سینوریزوبیوم* در طی مسیر خالص‌سازی به هر دلیلی از جمله استفاده از مواد استریل کننده توانایی خود را از دست داده باشد. بر اساس مطالعات انجام شده برخی از ریزوباکتری‌های محرک رشد (PGPR) توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفر را دارند و آن را در دسترس گیاهان قرار می‌دهند، باکتری‌های همزیست که به‌عنوان PGPR عمل می‌کنند شامل *سینوریزوبیوم، ریزوبیوم، برادی ریزوبیوم و مزوریزوبیوم* با گیاهان لگومینه، فرانکیا با درختان و بوته‌های غیر لگومینه می‌باشند (Zahran, 2001). بنابراین باکتری‌های *سینوریزوبیوم* جداسازی شده در این آزمایش که دارای توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن بودند، در دسته ریزوباکتری‌های محرک رشد (PGPR) قرار می‌گیرند.

ارزیابی نیمه کمی توانایی انحلال فسفات آلی و معدنی نامحلول ریزوباکتری‌ها

از آنجایی که یکی از ویژگی‌های مهم ریزوباکتری‌های محرک رشد، توانایی انحلال فسفات آلی و معدنی است، بنابراین این آزمون روی ۹۷ باکتری منتخب انجام شد. در جدول ۱ نتایج ارزیابی نیمه کمی توانایی انحلال فسفات آلی و معدنی نامحلول در محیط کشت جامد آورده شده است. در این بررسی شاخص حلالیت فسفات (رابطه ۱) مبنای توان حل کنندگی فسفات معدنی و آلی باکتری‌ها در نظر گرفته شده است (Sharon et al., 2016). هاله شفاف اطراف باکتری‌ها حاصل انحلال فسفات نامحلول توسط باکتری‌ها است (Sharon et al., 2016).

از بین ۹۷ ریزوباکتری تایید شده، ۵۱ ریزوباکتری (۵۲/۵ درصد) توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول را داشتند. ۵۱ ریزوباکتری توانا دارای شاخص حلالیت فسفات معدنی نامحلول در محدوده ۵/۶۲ –۱/۳۳ بودند (جدول ۱). بیشترین توانایی حل فسفات را ریزوباکتری های SM16، SM76 و SM89 (شاخص حلالیت ۵/۶۲) و کمترین توانایی حل فسفات را ریزوباکتری SM95 (شاخص حلالیت ۱/۳۳) داشت (جدول ۱). از این ۹۷ ریزوباکتری تایید شده، ۸۲ باکتری (۸۴/۵ درصد) توانایی انحلال فسفات آلی را داشت. در این ارزیابی شاخص حلالیت فسفات آلی ۶/۶۴ –۱/۳۴ بود، که بیشترین توانایی حل فسفات آلی را ریزوباکتری‌های SM50 (شاخص حلالیت ۶/۶۴)، SM54 (شاخص حلالیت ۶/۴۷)، SM83 (شاخص حلالیت ۶/۱۹) و کمترین توانایی حل فسفات آلی را ریزوباکتری SM82 (شاخص حلالیت ۱/۳۴) نشان داد (جدول ۱). فسفر بعد از نیتروژن مهمترین عنصر کلیدی در تغذیه گیاهان است. فسفر به وفور در خاک به دو صورت آلی و معدنی یافت می‌شود، اما ۹۹–۹۵٪ فسفات موجود نامحلول، غیر متحرک و به شکل رسوبی است بنابراین جذب آن برای گیاهان دشوار است. انحلال فسفر توسط باکتری‌های حل کننده فسفات یک ویژگی مهم است که می‌توان با PGPRها به آن دست یافت. ریزوباکتری‌های

محرک رشد انواع مختلفی از اسیدهای آلی از جمله اسید استیک، اسید مالیک، اسید سوکسینیک، اسید کربوکسیلیک، اسید استیک، اسید مالیک، اسید تارتاریک، اسید گلوکونیک، اسید اگزالیک و اسید سیتریک ترشح می‌کنند، که pH را در ریزوسفر کاهش داده و در نتیجه فسفر را از منابع فسفات مانند $Ca_3(PO_4)_2$ در خاک‌های آهکی آزاد می‌کنند (Oteino et al., 2015; Kumar & Safar, 2015). از جمله PGPRهایی که در انحلال فسفات نقش دارند شامل جنس‌های *سینوریزوبیوم، ریزوبیوم، مزوریزوبیوم، آرتروباکتر، باسیلوس، بیجرینکیا، انتروباکتر، سودوموناس، فلاووباکتریوم* وغیره هستند (Oteino et al., 2015). بنابراین برخی از باکتری‌های *سینوریزوبیوم* که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند جزء ریزوباکتری‌های محرک رشد هستند که توانایی انحلال فسفات نامحلول را دارند. از میان میکروب‌های متنوع و فراوان در ریزوسفر، باکتری‌های حل کننده فسفات یک راه حل بیوتکنولوژیکی جایگزین در کشاورزی پایدار برای تامین نیاز فسفر گیاه می‌باشد.

جدول ۱. شاخص حلالیت فسفات آلی و معدنی نامحلول باکتری‌های مختلف

کد ریزوباکتری	شاخص حلالیت فسفات معدنی	شاخص حلالیت فسفات آلی	کد ریزوباکتری	شاخص حلالیت فسفات معدنی	شاخص حلالیت فسفات آلی	کد ریزوباکتری	شاخص حلالیت فسفات معدنی	شاخص حلالیت فسفات آلی
SM1	۱/۰۰	۱/۴۳	SM34	۱/۰۰	۲/۰۰	SM67	۱/۰۰	۲/۳۸
SM2	۲/۵۷	۲/۱۴	SM35	۱/۷۱	۲/۴۳	SM68	۱/۰۰	۵/۷۱
SM3	۱/۸۱	۲/۰۰	SM36	۱/۰۰	۱/۰۰	SM69	۵/۰۵	۵/۷۱
SM4	۱/۰۰	۱/۰۰	SM37	۱/۰۰	۱/۶۲	SM70	۲/۲۸	۲/۳۰
SM5	۱/۴۳	۱/۴۲	SM38	۱/۰۰	۱/۰۰	SM71	۱/۴۳	۲/۸۶
SM6	۱/۰۰	۱/۰۰	SM39	۱/۴۳	۱/۹۰	SM72	۱/۰۰	۱/۶۲
SM7	۱/۷۱	۲/۲۸	SM40	۲/۸۶	۴/۱۰	SM73	۴/۹۵	۵/۰۵
SM8	۱/۰۰	۱/۴۳	SM41	۱/۵۲	۲/۲۸	SM74	۱/۰۰	۱/۴۲
SM9	۱/۴۳	۲/۸۶	SM42	۱/۰۰	۱/۰۰	SM75	۱/۶۲	۲/۱۹
SM10	۱/۴۳	۲/۶۶	SM43	۱/۰۰	۱/۴۲	SM76	۵/۶۲	۳/۴۳
SM11	۰/۰۰	۲/۹۵	SM44	۱/۰۰	۱/۰۰	SM77	۱/۰۰	۱/۰۰
SM12	۱/۶۲	۲/۰۹	SM45	۱/۰۰	۲/۰۰	SM78	۱/۴۳	۲/۰۹
SM13	۱/۴۲	۱/۸۱	SM46	۱/۰۰	۲/۱۹	SM79	۱/۰۰	۲/۸۵
SM14	۱/۰۰	۴/۱۹	SM47	۵/۲۴	۳/۰۵	SM80	۲/۲۸	۱/۴۳
SM15	۱/۹۵	۲/۴۸	SM48	۱/۰۰	۲/۵۷	SM81	۲/۷۶	۲/۸۵
SM16	۵/۶۲	۳/۹۰	SM49	۱/۰۰	۱/۴۲	SM82	۱/۴۴	۱/۳۴
SM17	۱/۰۰	۱/۴۳	SM50	۴/۸۶	۶/۶۶	SM83	۵/۱۴	۶/۱۹
SM18	۱/۰۰	۱/۵۲	SM51	۱/۴۲	۵/۷۱	SM84	۲/۲۸	۱/۵۲
SM19	۱/۹۵	۲/۶۲	SM52	۲/۵۷	۱/۴۳	SM85	۲/۲۸	۱/۵۲
SM20	۱/۰۰	۱/۰۰	SM53	۱/۰۰	۱/۰۰	SM86	۱/۰۰	۲/۵۷
SM21	۲/۰۰	۵/۹۰	SM54	۵/۴۳	۶/۴۷	SM87	۱/۰۰	۲/۸۵
SM22	۱/۴۳	۲/۲۸	SM55	۱/۷۱	۱/۹۵	SM88	۱/۰۰	۱/۵۲
SM23	۱/۰۰	۱/۰۰	SM56	۱/۰۰	۱/۰۰	SM89	۵/۶۲	۵/۲۳
SM24	۱/۰۰	۱/۸۱	SM57	۱/۰۰	۱/۰۰	SM90	۴/۷۶	۳/۹۰
SM25	۱/۰۰	۲/۵۷	SM58	۱/۴۲	۶/۱۹	SM91	۲/۰۹	۲/۴۸
SM26	۱/۰۰	۲/۴۷	SM59	۱/۰۰	۱/۷۱	SM92	۱/۰۰	۲/۵۷
SM27	۲/۸۶	۲/۸۵	SM60	۱/۰۰	۱/۷۱	SM93	۱/۰۰	۱/۰۰
SM28	۱/۴۳	۱/۷۱	SM61	۴/۴۸	۴/۷۶	SM94	۵/۵۲	۳/۴۳
SM29	۱/۰۰	۱/۰۰	SM62	۳/۲۳	۲/۷۶	SM95	۱/۳۳	۲/۱۹
SM30	۱/۰۰	۲/۲۸	SM63	۱/۰۰	۲/۰۰	SM96	۱/۴۳	۲/۱۹
SM31	۱/۰۰	۴/۹۵	SM64	۱/۰۰	۲/۱۹	SM97	۱/۴۳	۲/۰۰
SM32	۲/۶۷	۲/۰۰	SM65	۴/۲۸	۵/۷۱			
SM33	۱/۰۰	۱/۰۰	SM66	۱/۰۰	۱/۸۰			

ارزیابی مقاومت به شوری و خشکی ریزوباکتری‌ها

برای مرحله ارزیابی میزان مقاومت ریزوباکتری‌ها به تنش‌های خشکی و شوری از بین ۹۷ ریزوباکتری که توانایی انحلال فسفات معدنی و آلی آن‌ها بصورت نیمه کمی بررسی شده بود همه ریزوباکتری‌هایی که توانایی بالایی در انحلال فسفات داشتند و تعدادی هم از باکتری‌هایی که در این مرحله توانایی ضعیفی در انحلال فسفات نشان دادند، انتخاب شدند. در مجموع ۲۵ باکتری جهت ارزیابی مقاومت به شرایط تنش شوری و خشکی انتخاب شد. نتایج بدست آمده از این آزمون نشان داد که ریزوباکتری، تنش شوری و خشکی و برهم‌کنش بین آنها تاثیر معنی‌داری بر میزان رشد ریزوباکتری‌ها داشته است (جدول ۲).

جدول ۲. تجزیه واریانس رشد ریزوباکتری‌ها در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم و پلی اتیلن گلیکول در محیط کشت مایع

		میانگین مربع‌های	
منابع تغییر	درجه آزادی	شوری (OD_{600nm})	پتانسیل آبی (OD_{600nm})
ریزوباکتری	۲۴	۱/۱۸۵۵*	۰/۰۸۲۰*
تنش	۳	۱۲/۳۹۳۵*	۸/۹۱۹۹*
ریزوباکتری × تنش	۷۲	۰/۱۳۰۹*	۰/۰۶۹۹*
خطای آزمایش	۲۰۰	۰/۰۱۲۶	۰/۰۰۸۵

* در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

نتایج نشان داد که اگر چه با افزایش سطح شوری میانگین رشد همه ریزوباکتری‌ها کاهش یافت اما ریزوباکتری‌ها از نظر تحمل به شوری با هم تفاوت چشم‌گیری داشتند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) میزان رشد ریزوباکتری‌ها در شرایط بدون تنش در محدوده ۱/۸۷–۰/۸۴ بود، که بعد از اعمال تنش شوری در سطح ۵ درصد کلرید سدیم این میزان رشد به ۱/۴۲–۰/۰۰۸ کاهش یافت. همچنین نتایج این آزمون نشان داد که در سطح شوری ۱ درصد کلرید سدیم، بیشترین میزان رشد را ریزوباکتری‌های SM16، SM89، SM65 و SM40 (چگالی نوری ۱/۶۸–۱/۳۶) و کمترین میزان رشد را ریزوباکتری SM85 (چگالی نوری ۰/۳۷) داشته است، با افزایش غلظت نمک به سطح ۳ درصد که تقریبا معادل قابلیت هدایت الکتریکی dSm^{-1} ۴۵ است، بیشترین میزان رشد را ریزوباکتری‌های SM16، SM89 و SM65 (چگالی نوری ۱/۵۷–۱/۴۶) و کمترین میزان رشد را هم ریزوباکتری SM7 (چگالی نوری ۰/۲۹) داشت. در سطح شوری ۵ درصد که تقریبا معادل قابلیت هدایت الکتریکی dSm^{-1} ۶۴ می‌باشد، دو ریزوباکتری SM16 و SM65 (چگالی نوری ۱/۴) بالاترین تحمل به شوری را داشته و تعدادی از ریزوباکتری‌ها شامل SM10، SM94، SM39 و SM75 (چگالی نوری ۰/۳–۰/۱۸) رشد بسیار کمی داشتند و ۷۲ درصد ریزوباکتری‌ها هم در این سطح شوری تقریبا رشدی نداشتند (جدول ۳). بر اساس نتایج این آزمون چهار ریزوباکتری SM16، SM65، SM89 و SM40 دارای بالاترین سطح تحمل به شوری بودند و عملکرد بهتری داشتند.

شوری یک عامل استرس مهم برای باکتری‌های ریزوبیومی محسوب می‌شود، زیرا مانع رشد آن‌ها می‌شود (Farissi et al., 2014). در مطالعه حاضر، همه ریزوباکتری‌ها قادر به تحمل غلظت نمک تا سطح ۳ درصد بودند و تعدادی از آن‌ها (SM16، SM65، SM89 و SM40) به خوبی قادر به تحمل غلظت نمک تا سطح ۵ درصد (حدود غلظت ۶۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم) هم بودند و احتمالا این باکتری‌ها قادر به تحمل غلظت‌های بالاتر نمک هم خواهند بود. بنابراین برخی از باکتری‌های *سینوریزوبیوم* بومی جدا شده از خاک‌های شور استان کرمان توانایی تحمل غلظت بالای نمک را دارند. در مطالعات دیگر هم وجود باکتری‌های مقاوم *سینوریزوبیوم* گزارش شده است. پژوهشگران باکتری‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* را از خاک‌های الجزایر جداسازی کردند که قادر به تحمل غظت نمک تا ۸۰۰ میلی‌مولار بودند (Merabet et al., 2006). در مطالعه دیگری (Azib et al., 2022) نیز باکتری‌های *سینوریزوبیوم* مقاوم به غلظت نمک ۶۴۰ میلی مولار را از خاک‌های الجزایر جداسازی کردند. در فشار محیطی ناشی از شوری یا خشکی، گیاهان و میکروارگانیسم‌های با تحمل بالا قادر به زندگی هستند. باکتری‌های مقاوم به شرایط کم‌آبی یا شوری که در داخل و کنار ریشه‌ی گیاهان زندگی می‌کنند، می‌توانند آسیب‌های ناشی از کم‌آبی و شوری را در گیاهان کاهش دهند (Lau & Lennon, 2012). مطالعات نشان می‌دهد که تعداد کمی از باکتری *سینوریزوبیوم* قادر به تحمل غلظت بالای نمک می‌باشند، که این مقاومت باکتری‌ها نتیجه تجمع درون سلولی متابولیت‌ها با وزن مولکولی کم به نام اسمولیت‌ها است، از این متابولیت‌ها می‌توان به بتائین، پرولین و ترهالوز اشاره کرد (Sharma et al., 2019).

جدول ۳. مقایسه میانگین میزان رشد ریزوباکتری‌ها (OD_{600nm}) در غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم در محیط کشت مایع

کد ریزوباکتری	شوری (OD_{600nm})			
	۰٪ کلرید سدیم	۱٪ کلرید سدیم	۳٪ کلرید سدیم	۵٪ کلرید سدیم
SM3	۱/۲۸۲bc	۰/۹۴۸c-e	۱/۱۷۸b	۰/۰۶۲f
SM7	۱/۰۰۷d-h	۰/۸۱۱d-h	۰/۲۹۳h	۰/۰۶۱f
SM10	۱/۴۰۰b	۰/۴۸۸j-l	۰/۹۳۵b-d	۰/۳۰۵c
SM16	۱/۷۲۸a	۱/۶۸۴a	۱/۵۷۳a	۱/۴۱۹a
SM21	۱/۶۷۹a	۰/۸۷۴c-f	۰/۵۲۹f-h	۰/۰۱۶f
SM27	۱/۱۲۷c-f	۰/۵۹۵h-k	۰/۶۳۲e-g	۰/۰۳۲f
SM39	۰/۸۸۰gh	۰/۶۶۵f-j	۰/۸۴۱c-e	۰/۲۴۱cd
SM40	۱/۱۶۱cd	۱/۳۵۹b	۰/۶۲۶e-g	۰/۰۲۱f
SM47	۱/۱۵۲c-e	۱/۰۸۱c	۰/۴۱۲gh	۰/۰۳۲f
SM50	۱/۱۱۲c-f	۰/۷۳۰e-i	۰/۹۸۷bc	۰/۰۰۸f
SM54	۰/۹۴۱e-h	۰/۹۱۷c-e	۰/۵۳۰f-h	۰/۱۱۲ef
SM58	۰/۹۳۲f-h	۰/۴۰۸k-l	۰/۷۲۵c-f	۰/۰۹۵ef
SM61	۱/۰۷۰d-g	۰/۵۶۱i-l	۰/۸۲۰c-e	۰/۰۱۱f
SM65	۱/۸۷۳a	۱/۵۰۱ab	۱/۴۵۶a	۱/۳۵۷a
SM69	۰/۹۲۸f-h	۰/۶۳۵g-j	۰/۶۶۱d-g	۰/۰۴۹f
SM73	۱/۱۰۸c-f	۰/۷۴۵e-i	۰/۹۴۳bc	۰/۰۹۸ef
SM75	۰/۹۲۲f-h	۰/۷۶۸e-i	۰/۶۱۱e-g	۰/۱۸۰de
SM76	۱/۲۷۸bc	۱/۰۰۹cd	۱/۱۶۰b	۰/۰۶۴f
SM78	۱/۱۱۹c-f	۰/۶۲۱g-k	۰/۵۹۷e-g	۰/۰۱۸f
SM83	۱/۸۲۵a	۰/۸۳۰d-g	۰/۷۵۵c-f	۰/۰۲۱f
SM85	۱/۰۳۲d-h	۰/۳۶۸l	۰/۴۲۰gh	۰/۰۴۷f
SM89	۱/۸۰۳a	۱/۶۴۴a	۱/۴۹۶a	۱/۲۲۷b
SM90	۱/۰۵۳d-h	۰/۴۹۵j-l	۰/۸۵۵c-e	۰/۰۰۹f
SM94	۰/۸۴۴h	۰/۶۷۵f-j	۰/۸۴۳c-e	۰/۲۵۸cd
SM96	۱/۰۵۰d-h	۰/۸۰۲d-h	۰/۷۰۹c-f	۰/۰۱۹f
LSD	۰/۱۷۸	۰/۱۹۳	۰/۲۳۹	۰/۱۰۰

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۴) میزان رشد ریزوباکتری‌ها در شرایط بدون تنش در محدوده ۱/۸۷–۰/۸۴ بود، که بعد اعمال تنش خشکی و رسیدن پتانسیل آبی به سطح ۳/۵- مگاپاسکال این محدوده به ۰/۱۹–۰/۰۲ کاهش پیدا کرد. نتایج نشان داد که میزان رشد ریزوباکتری‌های با افزایش غلظت پلی‌اتیلن گلیکول کاهش بسیار محسوسی داشت (جدول ۴)، که به نظر می‌رسد احتمالا مقداری پلی‌اتیلن گلیکول توانسته از منافذ دیواره سلولی عبور کند و باعث سمیت شدید باکتری شود، که دلیل سمیت آن هم غلظت زیاد یون‌های آلومینیوم که در سنتز این ماده بکار رفته می‌باشد (Whalley et al., 1998). لذا شاید بهتر باشد در پژوهش‌های بعدی از سوربیتول (Kavamura et al., 2013) به جای پلی‌اتیلن گلیکول استفاده شود.

بر اساس نتایج همه ریزوباکتری‌ها قادر به رشد تا پتانسیل آبی ۲- مگاپاسکال بودند اما این ریزوباکتری‌ها از نظر میزان رشد رفتار متفاوتی در محیط کشت مایع با غلظت‌های مختلف نمک پلی‌اتیلن گلیکول نشان دادند (جدول ۴). در پتانسیل آبی ۱- مگاپاسکال بیشترین میزان رشد را ریزوباکتری‌های SM65 (چگالی نوری ۰/۳۱) و SM58 (چگالی نوری ۰/۲۹) و کمترین رشد را ریزوباکتری SM90 با مقدار چگالی نوری ۰/۰۸ داشت، در پتانسیل آبی ۲- مگاپاسکال بیشترین میزان رشد را ریزوباکتری‌های SM54 (چگالی نوری ۰/۳۷) و SM90 (چگالی نوری ۰/۳۶) و کمترین میزان رشد را ریزوباکتری‌های SM21، SM40، SM50 و SM69 (چگالی نوری در ۰/۱۷–۰/۱۴) داشتند. در پتانسیل آبی ۳/۵- مگاپاسکال دو ریزوباکتر SM73 (چگالی نوری ۰/۱۹) و SM16 (چگالی نوری ۰/۱۷) بالاترین تحمل به تنش را داشته و تعدادی از ریزوباکتری‌ها شامل SM65، SM76، SM89 و SM94 (چگالی نوری ۰/۱۱–۰/۱) رشد بسیار کمی داشتند و ۷۶ درصد ریزوباکتری‌ها هم در این سطح تنش تقریبا رشدی نداشتند. بر اساس نتایج این آزمون دو ریزوباکتری (SM16 و SM73) دارای بالاترین

سطح تحمل به خشکی می‌باشند و رشد بهتری نسبت به سایر ریزوباکتری‌ها نشان دادند.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که یکی از مکانیسم‌های دفاعی در باکتری‌های ریزوبیومی افزایش غلظت اسید آمینه‌ها از جمله گلوتامین، گلوتامات و بتائین در سلول‌ها برای ایجاد تعادل در پتانسیل باکتری‌ها است (Sharma et al., 2019). در تنش‌های شدید (نزدیک مرگ باکتری) به باکتری‌ها شوک وارد شده و باکتری‌ها از تمام انرژی و مکانیسم‌های حفاظتی خود برای ادامه حیات استفاده می‌کنند و تغییراتی در فعالیت‌های بیوشیمیایی و آنزیمی خود می‌دهند. از جمله این تغییرات تجمع سریع‌تر ترکیبات اسیدآمینه و اسمولیت‌ها در سلول‌های باکتری و یا تولید پلی‌ساکارید بیشتر است که منجر به افزایش تحمل باکتری‌ها به تنش می‌شود. اما باکتری‌هایی که از نظر ژنتیکی مقاوم نیستند، مدت زمان زیادی نمی‌توانند این شرایط را تحمل کنند و در نتیجه با افزایش تنش به سرعت از بین می‌روند.

جدول ٤. مقایسه میانگین میزان رشد باکتری‌ها (OD_{600nm}) در غلظت‌های مختلف پلی اتیلن گلیکول ٦٠٠٠ در محیط کشت مایع

کد ریزوباکتری	پتانسیل آبی (OD_{600nm})			
	۰ مگاپاسکال	۱- مگاپاسکال	۲- مگاپاسکال	۳/۵- مگاپاسکال
SM3	۱/۲۸۲bc	۰/۰۹۸hi	۰/۲۱۷bc	۰/۰۵۴hi
SM7	۱/۰۰۷d-h	۰/۱۳۲e-i	۰/۱۸۳bc	۰/۰۹۷ef
SM10	۱/۴۰۰b	۰/۱۳۷e-i	۰/۲۰۴bc	۰/۰۹۲e-h
SM16	۱/۷۲۸a	۰/۱۹۷b-d	۰/۲۵۹b	۰/۱۶۸ab
SM21	۱/۶۷۹a	۰/۲۳۳b	۰/۱۵۴c	۰/۰۸۹e-h
SM27	۱/۱۲۷c-f	۰/۱۶۳c-f	۰/۲۱۶bc	۰/۰۵۷g-i
SM39	۰/۸۸۰gh	۰/۱۵۸c-g	۰/۲۱۶bc	۰/۰۹۹ef
SM40	۱/۱۶۱cd	۰/۱۱۷f-i	۰/۱۴۱c	۰/۰۵۲hi
SM47	۱/۱۵۲c-e	۰/۰۸۶hi	۰/۱۹۹bc	۰/۰۹۵e-g
SM50	۱/۱۱۲c-f	۰/۰۸۸hi	۰/۱۷۴c	۰/۰۲۵i
SM54	۰/۹۴۱e-h	۰/۱۵۷c-g	۰/۳۷۲a	۰/۰۶۲f-i
SM58	۰/۹۳۲f-h	۰/۲۹۲a	۰/۱۹۴bc	۰/۰۹۸ef
SM61	۱/۰۷۰d-g	۰/۱۱۱f-i	۰/۱۸۶bc	۰/۰۹۷e-g
SM65	۱/۸۷۳a	۰/۳۱۲a	۰/۲۱۱bc	۰/۱۴۷bc
SM69	۰/۹۲۸f-h	۰/۱۳۴e-i	۰/۱۶۵c	۰/۰۷۸e-h
SM73	۱/۱۰۸c-f	۰/۱۸۹b-e	۰/۱۹۹bc	۰/۱۹۳a
SM75	۰/۹۲۲f-h	۰/۱۰۳g-i	۰/۱۹۹bc	۰/۰۷۶e-h
SM76	۱/۲۷۸bc	۰/۱۰۶f-i	۰/۲۰۷bc	۰/۱۳۸b-d
SM78	۱/۱۱۹c-f	۰/۰۹۹hi	۰/۲۱۱bc	۰/۱۰۱ef
SM83	۱/۸۲۵a	۰/۱۴۳d-h	۰/۱۹۱bc	۰/۰۸۳e-h
SM85	۱/۰۳۲d-h	۰/۱۳۹e-i	۰/۲۱۱bc	۰/۰۸۶e-h
SM89	۱/۸۰۳a	۰/۱۹۹bc	۰/۱۹۷bc	۰/۱۱۶c-e
SM90	۱/۰۵۳d-h	۰/۰۸۴i	۰/۳۶۰a	۰/۰۹۹ef
SM94	۰/۸۴۴h	۰/۱۸۴b-e	۰/۱۸۱bc	۰/۱۰۶de
SM96	۱/۰۵۰d-h	۰/۱۴۲d-h	۰/۱۹۹bc	۰/۰۵۷g-i
LSD	۰/۱۷۸	۰/۰۴۸	۰/۰۶۶	۰/۰۳۴

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

ارزیابی کمی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول ریزوباکتری‌ها

ارزیابی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول بر روی ۱۴ ریزوباکتری انجام گرفت این ریزوباکتری‌ها شامل ۸ ریزوباکتری با توانایی بالای انحلال فسفات بر اساس شاخص حلالیت فسفات در آزمون نیمه کمی (SM16، SM65، SM73، SM76، SM83، SM89، SM90 و SM94) که در بین آن‌ها سه ریزوباکتری (SM16، SM65 و SM89) مقاوم به تنش شوری و دو ریزوباکتری (SM16 و SM73) مقاوم به تنش خشکی وجود داشت و ۳ ریزوباکتری با توانایی متوسط انحلال فسفات (SM21، SM27 و SM40) که در بین آن‌ها یک ریزوباکتری (SM40) مقاوم به تنش شوری وجود داشت و در نهایت ۳ ریزوباکتری با توانایی پایین انحلال فسفات (SM3، SM10 و SM75) بودند. نتایج بدست

آمده از این آزمون نشان داد که ریزوباکتری، زمان و برهم کنش بین آنها اثر معنی‌داری بر قدرت حل کنندگی فسفات دارد (جدول ۵).

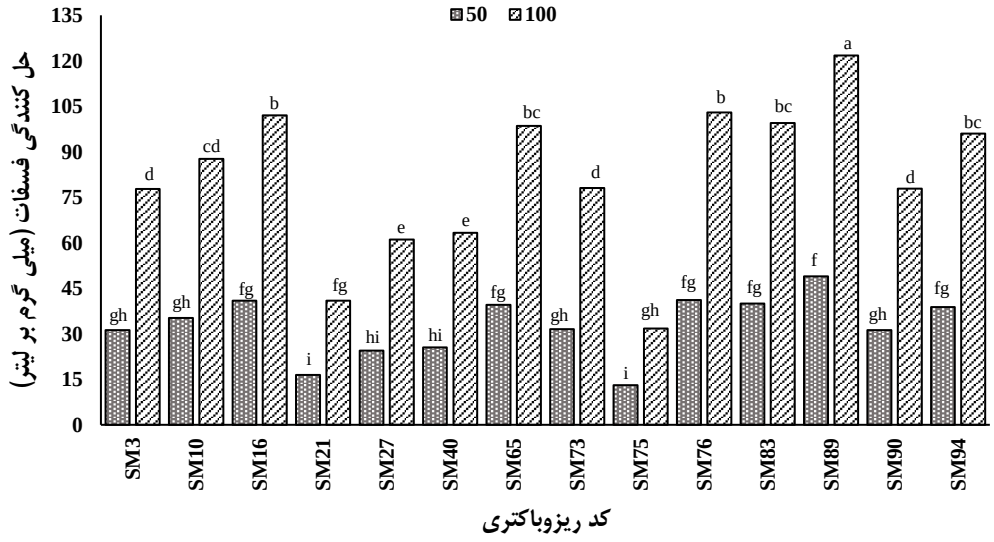
جدول ۵. تجزیه واریانس توانایی انحلال فسفات ریزوباکتری‌ها در محیط کشت مایع

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربع‌های فسفات
ریزوباکتری ریزوبیومی	۱۳	۱۸۶۷/۵*
زمان	۱	۴۹۶۷۲/۶*
ریزوباکتری × زمان	۱۳	۳۴۴/۴*
خطای آزمایش	۵۶	۴۸/۹

* در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.

نتایج نشان داد که از بین ۱۴ ریزوباکتری منتخب ریزوباکتری‌های SM89، SM76، SM16، SM83، SM65 و SM94 به ترتیب دارای بیشترین قدرت حل کنندگی فسفات به میزان ۱۲۱/۷، ۱۰۳، ۱۰۲، ۹۹/۵، ۹۸/۵ و ۹۶ میلی‌گرم بر لیتر بودند که از بین این ۶ ریزوباکتری سه باکتری SM16، SM65 و SM89 جزء ریزوباکتری‌های مقاوم به شوری نیز بودند (شکل ۳).

در مطالعه‌ای (Leontidou et al., 2020) ریزوباکتری *Chryseobacterium sp.* با چندین صفت محرک رشد گیاه (PGPR)، از جمله توانایی تولید IAA، فعالیت ACC دآمیناز و حل شدن فسفات جداسازی کردند و گزارش دادند که این ریزوباکتری‌ها حاوی ژن‌هایی هستند که ممکن است در تقویت رشد گیاه و تنظیم تنش نقش داشته باشند و می‌توان از آن‌ها برای افزایش عملکرد محصول در شرایط تنش غیرزیستی استفاده کرد. به‌طور مشابه، (Liu et al., 2016) ژنی را در *Klebsiella sp.* که با توانایی تولید سیدروفور، IAA، حل شدن فسفات و تثبیت N_2 کشف کرده و ادعا کردند که این باکتری‌ها می‌توانند در محیط‌های با تنش‌های زیستی رشد کنند و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کود زیستی در مناطق خشک استفاده کرد. در مطالعات مشابه دیگر (Intron et al., 2009; Mumtaz et al., 2020) توضیح دادند که حل شدن فسفر و روی توسط ریزوباکتری‌ها جذب آن‌ها را بهبود بخشیده و رشد و عملکرد گیاه را افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای که پژوهشگران عملکرد کودهای بیولوژیک را در تثبیت نیتروژن ملکولی به‌وسیله باکتری‌های *ریزوبیوم* بررسی کردند، نتایج نشان داد که عملکرد بهتر باکتری‌های *ریزوبیوم* تثبیت کننده نیتروژن وابسته به توانایی قدرت انحلال فسفات این باکتری‌ها و فسفات قابل دسترس گیاه می‌باشد (Chakraborty et al., 2010; Mahantesh & Patil, 2011). بنابراین از میان میکروب‌های متنوع و فراوان در ریزوسفر، باکتری‌های حل کننده فسفات یک راه حل بیوتکنولوژیکی جایگزین در کشاورزی پایدار برای تامین نیاز فسفر گیاه ایجاد کرده‌اند.



شکل ۳. مقایسه میانگین غلظت فسفات محلول مایع رویی کشت ریزوباکتری‌ها بعد از گذشت مدت زمان ۵۰ و ۱۰۰ ساعت از کشت
میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

ارزیابی کیفی توان تولید سیانید هیدروژن (HCN) در ریزوباکتری‌ها در شرایط شور

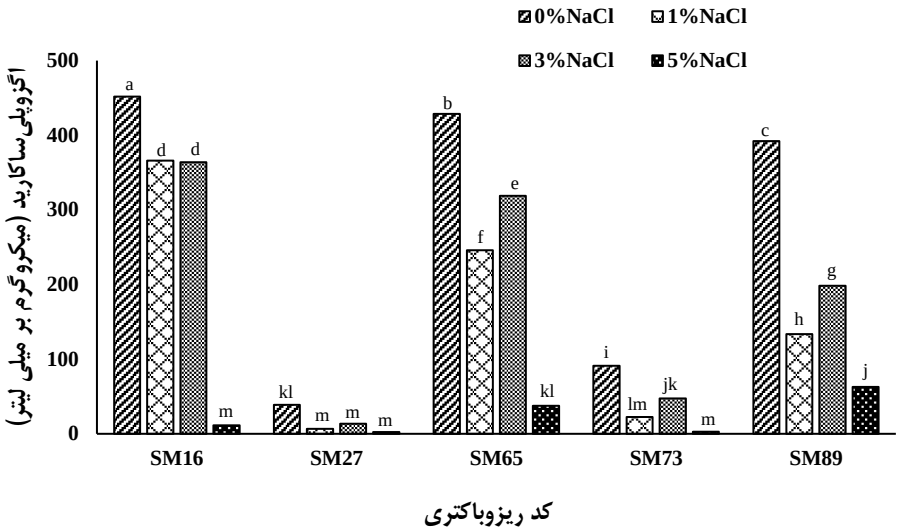
برای این مطالعه از ۱۴ ریزوباکتری مرحله قبل استفاده شد و تغییر رنگ کاغذ معرف از کرم تا قهوه‌ای نشان دهنده توانایی ریزوباکترها در تولید سیانید هیدروژن بود. نتایج نشان داد ریزوباکتری‌های SM16، SM40، SM65، SM73، SM75، SM89 و SM94 در این مطالعه دارای توانایی تولید هیدروژن سیانید در شرایط شور هستند. نتایج مشابه با این مطالعه نیز تولید سیانید هیدروژن را در شرایط تنش گزارش کردند (Agbodjato et al., 2015; Nazli et al., 2021). تولید باکتریایی سیانید هیدروژن به‌عنوان یک عامل کنترل زیستی در برابر انواع پاتوژن‌ها عمل می‌کند و گسترش بیماری را کاهش می‌دهد (Crowley, 2006). تحریک غیرمستقیم رشد گیاه توسط ریزوباکتری‌های محرک رشد زمانی اتفاق می‌افتد که این باکتری‌ها در نقش عامل کنترل‌گر زیستی ظاهر شوند و با توقف پاتوژن‌های گیاهی مهارکننده رشد گیاه، روند رشد را به حالت عادی بازگردانند. این رخداد به چندین روش مختلف ممکن است اتفاق بیفتد. یکی از این روش‌ها تولید سیانید هیدروژن می‌باشد، این مکانیسم موجب حفاظت از گیاهان تحت تنش شوری یا کم‌آبی دربرابر عوامل بیماری‌زایی می‌شود (Mavrodi et al., 2012).

بررسی میزان تولید اگزوپلی ساکارید ریزوباکتری‌های مقاوم به شوری در شرایط تنش

این آزمون بر روی ۵ ریزوباکتری شامل سه باکتری مقاوم به شوری (SM16، SM65 و SM89)، یک ریزوباکتری نیمه مقاوم (SM73) و حساس‌ترین ریزوباکتری به شرایط تنش شوری (SM27) انجام گرفت. مقایسه میانگین میزان تولید اگزوپلی ساکارید ریزوباکتری‌ها در سطوح مختلف شوری نشان داد اگر چه ریزوباکتری‌ها دارای توانایی تولید اگزوپلی ساکارید متفاوتی هستند و از طرفی افزایش شوری منجر به کاهش تولید اگزوپلی ساکارید در ریزوباکتری‌ها می‌شود، اما ریزوباکتری‌ها تحت سطوح مختلف شوری رفتار متفاوتی نشان دادند و ریزوباکتری‌های مقاوم به تنش شوری و خشکی میزان پلی‌ساکارید بیشتری نسبت به ریزوباکتری‌های دیگر تولید کردند (شکل ۴). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که سه ریزوباکتری مقاوم به شوری SM16، SM65 و SM89 به‌ترتیب دارای بیشترین توانایی تولید اگزوپلی ساکارید به میزان ۳۶۴، ۳۱۸/۷ و ۱۹۸/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر در سطح تنش ۳ درصد کلرید سدیم بودند و حساس‌ترین ریزوباکتری به تنش شوری (SM27) دارای کمترین توانایی تولید اگزوپلی ساکارید به میزان ۱۳/۶۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (شکل ۴). بر اساس نتایج سه ریزوباکتری مقاوم به شوری SM16، SM65 و SM89 به ترتیب ۳۳، ۳۱/۴ و ۲۸/۷ برابر اگزوپلی ساکارید بیشتری نسبت به حساس‌ترین ریزوباکتری به تنش شوری (SM27) تولید کردند (شکل ۴).

پژوهشگران گزارش کرده‌اند که اگزوپلی ساکاریدها مقدار زیادی آب را حفظ می‌کنند، که به باکتری‌ها و گیاهان کمک می‌کند تا در شرایط تنش خشکی زنده بمانند (Yasmin, 2020). سویه‌های ریزوباکتری مقاوم در این مطالعه مقادیر غلظت قابل توجهی اگزوپلی ساکارید نسبت به بقیه ریزوباکتری‌ها در شرایط تحت تنش اسمزی تولید کردند که نشان دهنده پاسخ این باکتری‌ها به تنش است و این نتایج با نتاج پژوهشگران دیگر مطابقت دارد. مطالعات پژوهشگران نشان می‌دهد که در تنش شوری و خشکی، تعدادی از سویه‌های باکتریایی اگزوپلی ساکارید بیشتری تولید می‌کنند (Ali et al., 2013; Nazli et al., 2021). گزارش شده است که باکتری‌ها تولید اگزوپلی ساکارید را به‌عنوان مکانیزم بقا در شرایط تنش تولید می‌کنند (Nguyen et al., 2020 & Primo et al., 2020)، از طرفی این اگزوپلی ساکاریدها به سطوح می‌چسبند و به اتصال ذرات خاک کمک می‌کنند که منجر به بهبود ساختمان خاک و در نتیجه نگهداری آب بیشتر می‌شود (Asghari et al., 2019).

اگزوپلی ساکاریدها مخلوطی از پلیمرهای با وزن مولکولی بالا شامل کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و سایر ترکیبات آلی (Morcillo & Manzanera, 2021) و دارای آب در ساختار خود هستند. این اگزوپلی ساکاریدها به باکتری‌ها کمک می‌کند در شرایط تحت تنش زنده بمانند و میکروبیولوژیست‌های خاک از همین ویژگی ریزوباکتری‌های محرک رشد برای القای تحمل به خشکی در گیاهان زراعی استفاده می‌کنند (Nadeem et al., 2020). باکتری‌های تولید کننده اگزوپلی ساکارید آب را در خود نگه می‌دارند که باعث ایجاد محیط کوچکی در اطراف ریشه شده و تنش اسمزی را در این منطقه حساس کاهش می‌دهد (Ilyas et al., 2020). علاوه بر این گزارش شده است که تلقیح ریزوباکتری‌های تولیدکننده اگزوپلی ساکارید باعث رشد گیاه در شرایط تنش خشکی با بهبود ساختمان خاک و حفظ آب می‌شود (Asghari et al., 2019). شرث و همکاران (Sharath et al., 2021) گزارش کردند که *Acinetobacter sp.* دارای توانایی قوی در تولید اگزوپلی ساکارید است، آن‌ها با تلقیح این باکتری‌ها شاهد بهبود جوانه‌زنی بذر، قدرت گیاهچه، طول ریشه و وزن غوزه پنبه در شرایط خشکی بودند.



شکل ٤. مقایسه میانگین میزان تولید اگزوپلی ساکارید باکتری‌های سینوریزوبیوم در شرایط تنش شوری
میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج این مطالعه نشان داد که برخی از باکتری‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* جدا شده از گره‌های ریشه یونجه (*Medicago sativa*) کشت شده در زمین‌های شور و خشک استان کرمان ویژگی‌های فیزیولوژیکی قابل توجهی مانند تحمل غلظت بالای نمک و تحمل بالای تنش خشکی را دارند. بر اساس مطالعات پژوهشگران نقش باکتری‌های اندوفیت در بیوتکنولوژی کشاورزی از کاهش استرس‌های محیطی تا بهبود رشد و سلامت گیاه متغیر است (Mahgoub et al., 2021). همچنین بر اساس نتایج مطالعه حاضر برخی از ریزوباکتری‌های غربال شده در این پژوهش از خصوصیات ریزوباکتری‌های محرک رشد (PGPR) مانند توانایی تولید اگزوپلی ساکارید، تثبیت نیتروژن ملکولی، تولید سیانید هیدروژن و توانایی انحلال فسفات‌های آلی و معدنی در سطح بالا برخوردار بودند. بنابراین ریزوباکتری‌های محرک رشد مورد مطالعه در این پژوهش ممکن است پتانسیل خوبی داشته باشند تا به‌عنوان یک مایه تلقیح موثر برای خاک‌های کویری استان کرمان که تحت تنش‌های شدید غیرزیستی قرار دارند، استفاده شوند. در مطالعه گلخانه‌ای که متعاقبا انجام گرفته است، استفاده از ریزوباکتری‌های SM16، SM65 و SM89 به‌عنوان ریزوباکتری‌های محرک رشد باعث بهبود رشد گیاه یونجه و تغییراتی در متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های گیاه یونجه در شرایط تنش شوری شد و مشاهده شد که آن‌ها تلقیح کننده‌های بسیار کارآمدی هستند که در مقاله دیگری گزارش شده است. بنابراین می‌توان از این باکتری‌ها برای استفاده در تولید یک کود زیستی بالقوه، پس از آزمایش مزرعه‌ای در شرایط طبیعی، برای کمک به تحمل تنش خشکی و شوری گیاه یونجه استفاده شود. در شرایط اکولوژیکی خشک تا نیمه خشک تحقیقات آینده بایستی بر روی شناسایی سویه‌های باکتریایی مفیدتر با پتانسیل تولید اگزوپلی ساکارید بیشتر همراه با صفات مختلف محرک رشد برای کمک به تحمل به تنش‌های غیرزیستی در گیاهان زراعی مختلف متمرکز شود. هدف این مطالعات بایستی شناسایی سویه‌های باکتریایی ایمن و کارآمد برای تلقیح باشد. ریزوباکتری‌هایی که بتوانند باعث بهبود رشد گیاه در شرایط محیطی مختلف شده و در مقیاس بزرگ استفاده شوند. توجه به این گونه تحقیقات جهت تجاری‌سازی موفقیت‌آمیز این ریزوباکتری‌ها و جایگزینی نهایی آن‌ها با مواد شیمیایی مضر برای محیط زیست و موجودات زنده در تولید محصولات کشاورزی امری ضروری است تا بتوان کشاورزی را به سمت یک سیستم پایدار هدایت نمود و سلامت انسان‌ها را نیز حفظ نمود.

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

REFERENCE

Agbodjato, N. A., Noumavo, P. A., Baba-Moussa, F., Salami, H. A., Sina, H., Sezan, A., Bankole, H., Adjanohoun, A., & Baba-Moussa, L. (2015). Characterization of potential plant prowth promoting rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in central and northern benin (west africa). *Applied and*

Environtal Soil Science, Article ID 901656, 9 pages. https://doi.org/10.1155/2015/901656.

Ahmad, M., Nadeem, S. M., Naveed, M., & Zahir, Z. A. (2016). Potassium-solubilizing bacteria and their application in agriculture. In: Meena, V., Maurya, B., Verma, J., Meena, R. (eds). Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture. Springer, New Dehli, pp, 293-313. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_21.

Ali, S. Z.; Sandhya, V., & Rao, L. V. (2013). Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide producing fluorescent *Pseudomonas* sp. *Annals of Microbiology, 64*, 493–502. https://doi.org/10.1007/s13213-013-0680-3.

Alori, E. T., Emmanuel, O. C., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2020). Plant-archaea relationships: A potential means to improve crop production in arid and semiarid regions. *World Journal Microbiolology and Biotechnology, 36(9)*, 133. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02910-6. PMID: 32772189.

Altieri, M. A. (2004). Linking ecologists and traditional farmers in the search for sustainable agriculture. *Frontiers in Ecology and the Environment, 2 (1)*, 35-42. https://doi.org/10.1890/1540-9295.

Asghari, B., Khademian, R., & Sedaghati, B. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) confer drought resistance and stimulate biosynthesis of secondary metabolites in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) under water shortage condition. *Scientia Horticculturae, 263*, 109132. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109132.

Azib, S., Cheloufi, H., Attb, S., Bouras, N., & Holtz, M. D. (2022). Phenotypic and genotypic diversity of microsymbionts nodulating *Medicago sativa* (L.) in the Algerian Sahara. *Jordan Journal of biological Sciences, 15(2)*, 227-238. https://doi.org/10.54319/jjbs/150210.

Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment, 32*, 666–681. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.

Beck, D. P., Materon, L. A., & Afandi, F. (1993). Practical rhizobium legume technology manual. ICARDA. pp, 1-104. https://hdl.handle.net/20.500.11766/67561.

Bogati, K., & Walczak, M. (2022). The impact of drought stress on soil microbial community, enzyme activities and plants. *Agronomy, 12 (1)*, 189. https://doi.org/10.3390/agronomy12010189.

Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil, 383(12)*, 3-41. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8.

Castric, P. A. (1974). Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of Pseudomonas aeruginosa. *Canadian Journal of Microbiology, 21(5)*, 613-618. https://doi.org/10.1139/m75-088.

Chakraborty, B. N., Chakraborty, U., Saha, A., Sunar, K., & Dey, P. L. (2010). Evaluation of phosphate solubilizes from soils of north Bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agricultural Sciences, 6(2)*, 195-200. https://www.researchgate.net/publication/242630621.

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends inmicrobial application. *Journal of Advanced Research, 19*, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004.

Cotteni, I. (1980). Methods of plant analysis. In: Soil and Plant Testing as a base for fertilizer recommendation. FAO Soils Bulletin, 38(2), 67-100.

Crowley, D. E. (2006). Microbial siderophores in the plant rhizospheric. In: Barton, L. L., Abadia, J. (eds) Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms; Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 169–198. https://doi.org/10.1007/1-4020-4743-6_8.

Dalal, R. C. (1977). Soil organic phosphorus. *Advances in Agronomy, 29*, 83-117. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60216-3.

Egamberdiyeva, D. (2009). Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum, 31(4)*, 861-864. https://doi.org/10.1007/s11738-009-0297-0

Farissi, M., Ghoulam, C., & Bouizgaren, A. (2014). The effect of salinity on yield and forage quality of alfalfa populations in the Marrakech region (Morocco). *Fourrages, 219*, 271-275.

Gamalero, E., & Glick, B. R. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture and stressed environments. In: Van Elsas, J. D., TreVors, J. T., Soares Rosado, A. & Nannipieri, P., (eds). Modern Soil Microbiology, (3rd ed.); CRC Press: Boca Raton, FL, USA; pp. 361–380. https://doi.org/10.1201/9780429059186.

Gauri, S. S., Mandal, S. M., Mondal, K. C., Dey, S., & Pati, B. R. (2009). Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacter* sp. SSB81. *Bioresource Technology, 100*, 4240–4243. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.064.

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, Article ID 963401. https://doi.org/10.6064/2012/963401.

Gupta, R., Anand, G., Gaur, R., & Yadav, D. (2021). Plant-microbiome interactions for sustainable agriculture: A review. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *27(1)*, 165–179. https://doi.org/10.1007/s12298-021-00927-1.

Ilyas, N., Mumtaz, K., Akhtar, N., Yasmin, H., Sayyed, R., Khan, W., Enshasy, H., Dailin, D., Elsayed, E., & Ali, Z. (2020). Exopolysaccharides producing bacteria for the amelioration of drought stress in wheat. *Sustainability*, *12*, 8876. https://doi.org/10.3390/su12218876.

Intorne, A. C., Oliveira, M. V. V., Lima, M. L., Silva, J. F., Olivares, F. L., & Filho, G. A. D. (2009). Identification and characterization of gluconacetobacter diazotrophicus mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology, 191(5)*, 477–483. https://doi.org/10.1007/s00203-009-0472-0.

Kapadia, C., Sayyed, R. Z., El Enshasy, H. A., Vaidya, H., Sharma, D., Patel, N., Malek, R. A., Syed, A., Elgorban, A. M., & Ahmad, K. (2021). Halotolerant microbial consortia for sustainable mitigation of salinity stress, growth promotion, and mineral uptake in tomato plants and soil nutrient enrichment. *Sustainability*, *13(25)*, 8369. https://doi.org/10.3390/su13158369.

Kavamura, V. N., Santos, S. N., Silva, J. L., Parma, M. M., Avila, L. A., Visconti, A., Zucchi, T. D., Taketani, R. G., Andreote, F. D., & Melo, I. S. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research, 168(4)*, 183–191. https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002.

Korenblum, E., Massalha, H., & Aharoni, A. (2022). Plant–microbe interactions in the rhizosphere via a circular metabolic economy. The *Plant Cell, 34(9)*, 3168-3182. https://doi.org/10.1093/plcell/koac163.

Kumar, A., Verma, H., Singh, V. K., Singh, P. P., Singh, S. K., Ansari, W. A. (2017). Role of *pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. In: Meena, V., Mishra, P., Bisht, J., Pattanayak, A. (eds) Agriculturally important microbes for sustainable agriculture. Springer, Singapore, pp. 195-215. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5343-6_7.

Kumar, J. C., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Journal of Agricultural Research and Development*, *5(2)*, 0108-0119. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5171.2164.

Latrach, L., Mouradi, M., Farissi, M., Bouizgaren, A., & Ghoulam, C. (2017). Physiological characterization of rhizobial strains nodulating alfalfa (*Medicago sativa*) isolated from soils of Southeastern Morocco. *Applied Journal of Envionmentalr Engineeering Science*, *3(4)*, 353-364. https://doi.org/10.48422/IMIST.PRSM/ajees-v3i4.10032.

Lau, J. A., & Lennon, J. T. (2012). Rapid response of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, *109(35)*, 14058–14062. https://doi.org/10.1073/pnas.1202319109. ·

Leontidou, K., Genitsaris, S., Papadopoulou, A., Kamou, N., Bosmali, I., Matsi, T., Madesis, P., Vokou, D., Karamanoli, K., & Mellidou, I. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria isolated from halophytes and drought-tolerant plants: Genomic characterisation and exploration of phyto-beneficial traits. *Scientific Reports, 10*, 14857. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71652-0.

Liu, W., Wang, Q., Hou, J., Tu, C., Luo, Y., & Christie, P. (2016). Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growthpromoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. *Scientific Reports, 6*, 26710. https://doi.org/10.1038/srep26710.

Mahantesh, P., & Patil, C. S. (2011). Isolation and biochemical characterization of phosphate solubilizing microbes. *International Journal of Microbiology Research*, 3(1), 67-70.

Mahgoub, H. A., Fouda, A., Eid, A. M., Ewais, E. E., & Hassan, S. E. (2021). Biotechnological application of plant growth-promoting endophytic bacteria isolated from halophytic plants to ameliorate salinity tolerance of *Vicia faba* L. *Plant Biotechnology Reports*, *15*, 819–843. https://doi.org/10.1007/s11816-021-00716-y.

Mansour, E., Mahgoub, H. A. M., Mahgoub, S. A., El-Sobky, E., Abdul-Hamid, M. I., Kamara, M. M., Abu Qamar, S. F., El-Rarabily, K. A., & Desoki, E. S. M. (2021). Enhancement of drought tolerance in diverse *Vicia faba* cultivars by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria under newly reclaimed soil conditions. *Scientific Reports, 11*, 24142. https://doi.org/10.1038/s41598-021-02847-2.

Mavrodi, D. V., Mavrodi, O. V., Parejko, J. A., Bonsall, R. F., Kwak, Y. S., Paulitz, T. C., Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (2012). Accumulation of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid in the rhizosphere of dryland cereals. *Applied and Environmental Microbiology, 78(3)*, 804–812. https://doi.org/10.1128/AEM.06784-11.

Merabet, C., Bekki, A., Benrabah, N., Bey, M., Bouchentouf, L., Ameziane, H., Rezki, M. A., Domergue, O., Cleyet Marel, J. C., Avarre, J. C., Bena, G., Bailly, X., & De Lajudie, P. (2006). Distribution of *Medicago*

species and their microsymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Research and Managment, 20(3),* 219-231. https://doi.org/10.1080/15324980600705685.

Morcillo, R., & Manzanera, M. (2021). The Effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress Tolerance. *Metabolites, 11(6),* 337. https://doi.org/10.3390/metabo11060337.

Mumtaz, Z. M., Ahmad, M., Jamil, M., Asad, S. A., & Hafeez, F. (2018). Bacillus strains as potential alternate for zinc biofortification of maize grains. *International Journal of Agriculture and Biology, 20(8),* 1779–1786. https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0690.

Nadeem, S. M., Ahmad, M., Tufail, M. A., Asghar, H. N., Nazli, F., & Zahir, Z. A. (2020). Appraising the potential of EPS-producing rhizobacteria with ACC-deaminase activity to improve growth and physiology of maize under drought stress. *Physiologia Plantarum, 172(2),* 463–476. https://doi.org/10.1111/ppl.13212.

Nazli, F., Wang, X., Ahmad, M., Hussain, A., Bushra Dar, A., Nasim, M., Jamil, M., Panpluem, N., & Mustafa, A. (2021). Efficacy of indole acetic acid and exopolysaccharides-producing *Bacillus safensis* strain FN13 for inducing Cd-stress tolerance and plant growth promotion in *Brassica juncea* (L.). *Applied Sciences, 11(9),* 4160. https://doi.org/10.3390/app11094160.

Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., & Nguyen, H. T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiology, 6(4),* 451–469. https://doi.org/10.3934/microbiol.2020027.

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., & Germaine, K. J. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. *Frontiers in Microbiology, 6,* 745. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745.

Paustian, K., Lehmann, J., Ogle, S., Reay, D., Robertson, G.P., Smith, P. (2016). Climate smart soils. *Nature, 532,* 49-57. https://doi.org/10.1038/nature17174.

Primo, E., Bogino, P., Cossovich, S., Foresto, E., Nievas, F., & Giordano, W. (2020). Exopolysaccharide II is relevant for the survival of *Sinorhizobium meliloti* under water deficiency and salinity stress. *Molecules, 25(21),* 4876. https://doi.org/10.3390/molecules25214876.

Rubiano-Labrador, C., Bland, C., Miotello, G., Armengaud, J., & Baena, S. (2015). Salt stress induced changes in the exoproteome of the halotolerant bacterium *Tistlia consotensis* deciphered by proteogenomics. *PLOS ONE, 10,* 135065. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135065.

Saleem, M., Nawaz, F., Hussain, M. B., & Ikram, R. M. (2021). Comparative effects of individual and consortia Plant Growth Promoting Bacteria on physiological and enzymatic mechanisms to confer drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Journal Soil Science and Plant Nutrition*, *21*, 3461–3476. https://doi.org/10.1007/s42729-021-00620-y.

Sharath, S., Triveni, S., Nagaraju, Y., Latha, P. C., & Vidyasagar, B. (2021). The role of phyllosphere bacteria in improving cotton growth and yield under drought conditions. *Frontiers in Agron*omy, *3*, 466. https://doi.org/10.3389/fagro.2021.680466.

Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules, 9(7),* 285. https://doi.org/10.3390/biom9070285.

Sharon, J. A., Hathwaik, L. T., Glenn, G. M., Imam, S. H., & Lee, C. C. (2016). Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 16(2),* 525-536. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000043.

Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech, 7(4),* 255. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0896-1.

Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*. 9(6), 778-781. https://doi.org/10.1071/AR9580778.

Surange, S., Wollum, A.G., Kumar, N., & Natutiyal, C.S. (1997). Characterisation of *Rhizobium* from root noudules of leguminous trees growing in alkaline soils. *Canadian Journal of Microbiol*ogy, *43*, 891-894 https://doi.org/10.1139/m97-130.

Timmusk, S., Paalme, V., Pavlicek, T., Bergquist, J., Vangala, A., Danilas, T., & Nevo, E. (2011). Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. *PLOS ONE, 6*, 17968. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017968.

Whalley, W. A., Bengough, A. G., & Dexter, A.R. (1998). Water stress induced by PEG decreases the maximum growth pressure of the roots of pea seedling. *Journal of Experimental Botany*, *49(327),* 1689-1694. https://doi.org/10.1093/jxb/49.327.1689.

Wood, N. T. (2001). Nodulation by numbers: the role of ethylene in symbiotic nitrogen fixation. *Trends in*

Plant Science, 6(11), 501-502. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02128-8.

Yanez-Yazlle, M. F., Romano-Armada, N., Acreche, M. M., Rajal, V. B., Irazusta, V. P. (2021). Halotolerant bacteria isolated from extreme environments induce seed germination and growth of chia (*Salvia hispanica* L.) and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under saline stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *218*, 112273. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112273.

Yasmin, H., Naeem, S., Bakhtawar, M., Jabeen, Z., Nosheen, A., Naz, R., Keyani, R., Mumtaz, S., & Hassan, M.N. (2020). Halotolerant rhizobacteria Pseudomonas pseudoalcaligenes and Bacillus subtilis mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress. *PLOS ONE, 15*, 0231348. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231348.

Zahran, H. H. (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology, 91(2-3),* 143-153. https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00342-x.

Isolation, Screening and Identification of Growth-Promoting Rhizobacteria Resistant to Abiotic Stresses from the Microbiome of Alfalfa (*Medicago sativa*) in Saline and Arid Soils in Kerman Province

EXTENDED ABSTRACT

Introduction:

Microorganisms are often exposed to environmental stresses such as limited nutrient availability, salinity and sudden changes in osmolarity, drought stress, and temperature rise or fall. Proper responses of bacteria under these conditions are necessary for them to adapt effectively to environmental stresses and changes. *Sinorhizobium* bacteria inside alfalfa roots can be used for various purposes in agriculture. Some of these bacteria are also among plant growth-promoting Rhizobacteria that stimulate and promote plant growth often via one or more mechanisms, such as biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore and the exopolysaccharide production, and increased availability of nutrients required by plants.

Materials and methods:

In this research, 135 Rhizobacteria strains were isolated, screened and identified from saline and arid soils in Kerman Province, and some of their growth-promoting characteristics were studied. The Rhizobacteria strains were studied with respect to their ability to fix nitrogen, solubilize insoluble organic and inorganic phosphates in solid and liquid culture media, and produce hydrogen cyanide and exopolysaccharides. Their growth at various sodium chloride concentrations (0, 1, 3, and 5%) and at different polyethylene glycol 6000 concentrations (water potential 0, -1, -2, and -3.5 MPa) was also investigated.

Results and discussion:

According to the results, 72% and 76% of the Rhizobacteria strains exhibited almost no growth at 5% sodium chloride concentration and at water potential -3.5 MPa, respectively. In addition, 50% of them were able to produce hydrogen cyanide under saline conditions. Three of the strains (SM16, SM65, and SM89) were the most efficient producers of exopolysaccharides (364, 318.7 and 198.3 µg/mL, respectively) at 3% sodium chloride stress level, had high phosphate solubilization ability (102, 98,5 and 121.7 mL/L, respectively) and were also among Rhizobacteria strains resistant to abiotic stresses.

Conclusions:

The viability and effectiveness of native *Sinorhizobium* bacteria are reduced due to salt and osmotic stress, water scarcity, high soil temperature, and soil acidity and alkalinity. *Sinorhizobium* strains differ in their tolerance to environmental factors. Inoculation of alfalfa with native strains of *Sinorhizobium* adapted to specific environments and resistant to abiotic stresses, on the one hand, can increase nodulation and nitrogen fixation under stress conditions, on the other hand, to improve plant growth and yield through their potential to stimulate plant growth. Inoculating alfalfa with effective strains of *Sinorhizobium* has significant economic and environmental benefits. The main purpose of this study was to select native *Sinorhizobium* strains isolated from saline and dry regions in Kerman Province that were tolerant to unfavorable environmental conditions and were also able to stimulate plant growth. These safe and efficient strains can have great potential to be used as a high quality biofertilizer for improving growth of crop plants in the region.

Keywords: Abiotic Stress, Biofertilizer, Exopolysaccharide, Hydrogen Cyanide, Phosphate Solubilization.