Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Soil Management and Sustainable Production

Print ISSN: 2322-1267
Online ISSN: 2322-1275

Isolation and identification of salt tolerant-plant growth promoting bacteria from the rhizosphere of halophyte plants

Tahereh Safarzadeh[1], Mohsen Olamaee[*2], Elham Malekzadeh[3], Seyed Alireza Movahedi Naini[4], Ali Pakdin-Parizi[5]

1. Ph.D. Student, Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: tahere.safarzadeh@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: olamaee_m@yahoo.com
3. Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: emalekzadeh@gau.ac.ir
4. Associate Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: salirezam@yahoo.com
5. Assistant Prof., Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran. E-mail: a.pakdin@sanru.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 08.01.2023
Revised: 09.09.2023
Accepted: 09.09.2023

Keywords:
Halophyte plants,
Indole acetic acid,
Plant growth promoting bacteria,
Salinity stress

ABSTRACT

Background and Objectives: Salinity is a serious problem and one of the main factors in reducing agricultural productivity worldwide. The use of microorganisms to improve plant growth in low-quality soil is a potential solution to address this problem. The salinity-resistant microbiome improves the health of the salinity-affected soils, maintains ecological functions, and enhances plant growth. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria (ST-PGPR) can adjust the salinity stress adverse conditions for their symbiotic plants through several mechanisms. This study aimed to isolate, identify, and investigate the characteristics of salt tolerant-plant growth promoting rhizobacteria from the rhizosphere of halophyte plants.

Materials and Methods: Salinity-tolerant plant growth promoting bacteria were isolated from the rhizosphere of native halophyte plants collected from the north Iran. Bacterial isolates were selected according to their ability to grow in 2 M sodium chloride and traits of the motility, inorganic phosphate solubilization ability in PKV-Agar medium using phosphate solubilization index calculation, and siderophore production capacity in CAS-agar medium by calculating its production index. Then, the top 10 isolates were selected and the ability of nitrogen fixation in Burk's medium, potassium dissolution in Aleksandrov's medium by using the potassium solubilization index, as well as, the production of intrinsic IAA and the tryptophan-dependent IAA were investigated. Finally, molecular identification of selected bacterial isolates was performed based on 16S rDNA gene sequencing.

Results: Four genera of *Bacillus*, *Klebsiella*, *Proteus*, and *Halomonas* were identified after 16S rDNA gene sequencing. The most of isolates belonged to the genus *Bacillus*. Species belonging to *Klebsiella* and *Halomonas* genera had the highest salt tolerance. *Klebsiella* genus showed phosphorus and potassium solubilizing ability more than other isolates. The highest amount of siderophore production was observed in the isolate belonging to *Proteus* genus. All isolates were able to fix nitrogen. Among the studied

isolates, *Bacillus* isolates had the highest rate of intrinsic IAA, and the tryptophan-dependent IAA production in *B. licheniformis* was higher than other isolates.

Conclusion: The isolation of a wide range of salt-tolerant bacteria with favorable characteristics from the rhizosphere of halophyte plants indicates the microbial richness potential of this area, which provides the possibility of finding useful microorganisms that promote plant growth and reduce the adverse effects of stress in plants.

Cite this article: Safarzadeh, Tahereh, Olamaee, Mohsen, Malekzadeh, Elham, Movahedi Naini, Seyed Alireza, Pakdin-Parizi, Ali. 2023. Isolation and identification of salt tolerant-plant growth promoting bacteria from the rhizosphere of halophyte plants. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 13 (3), 99-115.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJSMS.2023.21627.2115
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار

شاپا چاپی: ۱۲٦۷-۲۳۲۲

شاپا آنلاین: ۱۲۷۵-۲۳۲۲

جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد گیاه متحمل به شوری از ریزوسفر گیاهان شورزی

طاهره صفرزاده[۱]، محسن علمائی*[۲]، الهام ملک‌زاده[۳]، سید علیرضا موحدی نائینی[٤]، علی پاکدین- پاریزی[٥]

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: tahere.safarzadeh@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: olamaee_m@yahoo.com

۳. استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: emalekzadeh@gau.ac.ir

٤. دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: salirezam@yahoo.com

۵. استادیار پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: a.pakdin@sanru.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰۵/۱۰
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۰٦/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰٦/۱۸

واژه‌های کلیدی:
ایندول استیک اسید،
باکتری‌های محرک رشد گیاه،
تنش شوری،
گیاهان شورزی

چکیده

سابقه و هدف: شوری یک مشکل جدی و یکی از عوامل اصلی کاهش تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان است. استفاده از ریزجانداران برای بهبود رشد گیاه در خاک بی‌کیفیت، یک راهکار بالقوه برای مقابله با این مشکل می‌باشد. جامعه میکروبی مقاوم به شوری، سلامت خاک تحت‌تأثیر شوری را بهبود بخشیده، عملکردهای اکولوژیکی را حفظ و رشد گیاهان را تقویت می‌کند. باکتری‌های محرک رشد گیاه متحمل به شوری (ST-PGPR)، از طریق مکانیسم‌های متعددی قادر به تعدیل شرایط نامساعد تنش شوری برای گیاهان همزیست خود می‌باشند. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی، شناسایی و بررسی ویژگی‌های باکتری‌های محرک رشد گیاه متحمل به شوری از ریزوسفر گیاهان شورزی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های محرک رشد گیاه متحمل به شوری از ریزوسفر گیاهان شورزی بومی شمال ایران جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های باکتری با توانایی رشد در محیط حداقل ۲ مولار کلرید سدیم انتخاب و صفات تحرک، توانایی انحلال فسفات معدنی در محیط کشت PKV-آگار با استفاده از محاسبه شاخص انحلال فسفات، تولید سیدروفور در محیط کشت CAS-آگار و توان تولید آن با محاسبه شاخص توان تولید در آن‌ها ارزیابی شد. براساس نتایج به‌دست آمده، ۱۰ جدایه برتر انتخاب شدند و توانایی تثبیت نیتروژن در محیط کشت Burk، انحلال پتاسیم در محیط Aleksandrov و توان انحلال آن توسط جدایه‌ها با استفاده از محاسبه شاخص انحلال پتاسیم و نیز تولید IAA-ذاتی و تولید IAA در حضور

پیش‌ماده ال-تریپتوفان در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتری منتخب بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rDNA انجام شد.

یافته‌ها: با بررسی توالی ژن 16S rDNA، چهار جنس *Bacillus*، *Klebsiella*، *Proteus* و *Halomonas* شناسایی شدند. بیش‌ترین جدایه‌ها به جنس *Bacillus* تعلق داشتند. گونه‌های متعلق به جنس‌های *Klebsiella* و *Halomonas* بیش‌ترین تحمل به نمک را داشتند. جنس *Klebsiella* توان انحلال فسفر و پتاسیم بیش‌تری نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد. بیش‌ترین میزان تولید سیدروفور در جدایه متعلق به جنس *Proteus* مشاهده شد. همه جدایه‌ها قادر به تثبیت نیتروژن بودند. در بین جدایه‌های مورد بررسی جدایه‌های *Bacillus* بیش‌ترین میزان تولید IAA-ذاتی را داشتند و در حضور پیش ماده ال-تریپتوفان میزان تولید IAA در جدایه *B. licheniformis* بیش از سایر جدایه‌ها بود.

نتیجه‌گیری: جداسازی طیف وسیعی از باکتری‌های متحمل به شوری با خصوصیات مطلوب از محیط ریزوسفر گیاهان شورزی نشان‌دهنده غنای میکروبی بالقوه این ناحیه می‌باشد که امکان یافتن ریزجانداران مفید محرک رشد گیاه به‌منظور کاستن اثرات نامطلوب تنش در گیاهان را فراهم می‌کند.

استناد: صفرزاده، طاهره، علمائی، محسن، ملک‌زاده، الهام، موحدی نائینی، سید علیرضا، پاکدین- پاریزی، علی (۱۴۰۲). جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد گیاه متحمل به شوری از ریزوسفر گیاهان شورزی. *نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار*، ۱۳ (۳)، ۱۱۵-۹۹.

DOI: 10.22069/EJSMS.2023.21627.2115

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

شوری خاک یک عامل محدودکننده مهم است که منجر به بیابانی شدن زمین‌های قابل‌کشت در سراسر جهان شده (۱) و مسأله جدی برای امنیت غذایی جهانی می‌باشد (۲، ۳). در سراسر جهان حدود ۲۰ درصد از کل زمین‌های زیرکشت و ۳۳ درصد از زمین‌های کشاورزی آبی، در معرض شوری بالا هستند و علاوه بر این، ۵۰ درصد از زمین‌های زراعی تا سال ۲۰۵۰ شور خواهند شد (٤). شوری بر فرآیندهای مهم خاک مانند تنفس، تجزیه بقایا، نیتریفیکاسیون، تنوع زیستی خاک و فعالیت میکروبی تأثیر منفی می‌گذارد (۵).

گیاهان شورزی قادر به رشد در خاک‌های شور هستند و به‌دلیل ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما اطلاعات کمی در مورد جامعه میکروبی مرتبط با آن‌ها وجود دارد (٦). ریزوسفر این گیاهان محیطی مطلوب برای زیست ریزجانداران مفید با توانایی مقاومت در برابر غلظت‌های بالای نمک و تحریک رشد گیاه همزیست می‌باشد (۷). برخی از این ریزجانداران، باکتری‌هایی هستند که می‌توانند به‌طور مؤثر ریشه یا خاک ریزوسفر گیاهان زراعی را کلونیزه کنند که باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[1] نامیده می‌شوند. به دلیل مشارکت آن‌ها در فرآیندهای کلیدی مانند تشکیل ساختار خاک، تجزیه مواد آلی، حذف سموم، سرکوب بیماری‌های گیاهی و به‌طور کلی چرخه کربن، نیتروژن، فسفر و گوگرد، وجود این ریزجانداران برای حفظ و سلامت عملکرد خاک، هم در خاک‌های طبیعی و هم در خاک‌های کشاورزی مدیریت‌شده حیاتی است (۸). در خاک‌های سالم، چرخه مواد مغذی و تخریب مواد آلی توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها کنترل می‌شود، در حالی‌که در خاک‌های متأثر از نمک، باکتری‌ها اهمیت دارند (۹).

PGPRها از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند تولید ایندول استیک اسید، انحلال فسفر و پتاسیم، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور به رشد گیاه کمک می‌کنند (٤، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲). گیاه میزبان و جامعه میکروبی وابسته به آن با برهم‌کنش بسیار نزدیک، برای زنده ماندن در شرایط نامساعد محیطی تکامل یافته‌اند (۱۳، ١٤). امروزه بهره‌گیری از روش‌های سازگار با محیط زیست مانند استفاده از ریزجانداران شورزی و متحمل به شوری در راستای افزایش جذب مواد معدنی، محافظت از گیاهان در برابر سمیت یونی و افزایش رشد ریشه و ساقه در شرایط شور مورد توجه قرار گرفته است. گیاهان ذرت و گندم تلقیح شده با جدایه‌های باکتری‌های محرک رشد متحمل به شوری مانند *Bacillus*، *Enterobacter*، *Pseudomonas* و *Burkholderia* در شرایط تنش شوری درصد جوانه‌زنی بالاتر، زیست‌توده بیش‌تر و در نهایت رشد بهتری نشان داده‌اند (۱۵). ریزوباکترهای متحمل به نمک محرک رشد گیاهان (ST-PGPR)[2] پتانسیل ذاتی برای مقابله با شوری را دارند، بنابراین، می‌توان از آن‌ها به عنوان یک راهکار مؤثر در افزایش بهره‌وری سیستم‌های کشاورزی استفاده کرد (١٦، ۱۷). این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های ریزوسفری متحمل به شوری با ویژگی‌های محرک رشد گیاه انجام شد تا بتواند راه‌گشایی برای بهره‌برداری آتی از آن‌ها در افزایش تحمل گیاهان زراعی در خاک‌های تحت تنش شوری باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک: نمونه‌برداری تصادفی از خاک ریزوسفری گیاهان شورزی بومی شمال ایران (استان گلستان و سواحل شرق استان مازندران) شامل *Halostachys caspica*، *Salsola nitraria*، *Halocnemuim*، *Salicornia herbacea*

1- Plant Growth Promoting Rhizobacteria

2- Salt Tolerant-Plant Growth Promoting Rhizobacteria

strobolacenum و *Plantago cornopus* انجام شد. ۲۲ نمونه خاک ریزوسفری به آزمایشگاه بیولوژی خاک واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل و تا زمان جداسازی باکتری‌ها در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک منطقه نمونه‌برداری مانند بافت خاک (۱۸)، pH و EC (۱۹)، پس از هواخشک کردن و عبور از الک ۲ میلی‌متری، با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد.

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های باکتری: به‌منظور جداسازی باکتری‌ها، خاک ریزوسفری با محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد (۱:۱۰ وزنی: حجمی) مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس سری‌های رقت متوالی خاک تا 10^{-5} تهیه و ۰/۱ میلی‌لیتر از آن روی پتری‌دیش حاوی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۵ درصد نمک کلرید سدیم پخش گردید و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از ٢٤ ساعت، کلنی‌های با مورفولوژی متفاوت انتخاب و خالص‌سازی شدند (۲۰).

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و ژنوتیپی جدایه‌های باکتری: در غربالگری اولیه جدایه‌ها، آزمون‌های تحمل به شوری (٦)، توانایی انحلال فسفر (۸)، تولید سیدروفور (۸)، سولفیدهیدروژن و تحرک (۲۱) انجام شد. براساس نتایج این آزمون‌ها، از میان ۲۲۰ جدایه خالص‌سازی شده، جدایه‌های برتر انتخاب و از نظر بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. توانایی تثبیت نیتروژن (۲۲)، انحلال پتاسیم (۲۳) و تولید IAA (۸) نیز در این جدایه‌ها مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی میزان رشد جدایه‌ها در سطوح مختلف شوری: میزان رشد جدایه‌ها در سطوح مختلف نمک کلرید سدیم ۲، ۳ و ٤ مولار (به‌ترتیب معادل: ۱۱/٦، ۱۷/۵ و ۲۳/۳ درصد نمک کلرید سدیم) به روش لکه‌گذاری روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی نمک بررسی شد. نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری و میزان رشد آن‌ها در طول یک هفته بررسی شد (٦).

بررسی کیفی توانایی انحلال فسفر معدنی: به‌منظور بررسی کیفی حل‌کنندگی فسفات توسط جدایه‌های باکتری، هر جدایه به‌طور جداگانه در محیط کشت PKV[1]-آگار (محیط کشت (گرم در لیتر): گلوکز (۱۰)، تری‌کلسیم فسفات (۵)، سولفات آمونیوم (۰/۵)، سولفات منیزیم (۰/۲)، کلرید پتاسیم (۰/۲)، عصاره مخمر (۰/۵)، سولفات منگنز (۰/۰۰۲)، سولفات آهن (۰/۰۰۲) و آگار (۱۵) می‌باشد)، حاوی ۲ درصد نمک کلریدسدیم در ۳ تکرار مستقل لکه‌گذاری، و پس از ۷ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، تشکیل هاله روشن، پیرامون کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۸). قطر هاله حاصل از انحلال فسفات معدنی و قطر کلنی اندازه‌گیری شد و شاخص انحلال فسفر (PSI)[2] با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (٢٤).

$$PSI=\frac{\text{قطر هاله+قطر کلنی}}{\text{قطر کلنی}} \qquad (۱)$$

بررسی توانایی تولید سیدروفور: با روش لکه‌گذاری روی محیط کشت CAS-آگار حاوی ۲ درصد نمک کلریدسدیم توانایی تولید سیدروفور جدایه‌ها بررسی شد. قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی و قطر کلنی پس از گذشت یک هفته اندازه‌گیری شد (۸) و شاخص تولید سیدروفور (SPI)[3] طبق معادله زیر محاسبه شد (٢٤).

$$SPI=\frac{\text{قطر هاله+قطر کلنی}}{\text{قطر کلنی}} \qquad (۲)$$

تولید آنزیم اوره آز: از محیط کشت Christensen's Urea Agar حاوی ۲ درصد نمک کلریدسدیم در ۳ تکرار استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ٢٤ ساعت گرماگذاری شدند. تغییر

1- Pikovskaya
2- Phosphate Solubilization Index
3- Siderophore Production Index

رنگ محیط کشت از زرد به سرخ‌آبی[1] نشان‌دهنده توان تولید آنزیم اوره‌آز در جدایه‌ها بود (۲۵).

آزمون تحرک و توان تولید سولفید هیدروژن: از محیط کشت نیمه جامد SIM Motility (BAM M137) حاوی ۲ درصد نمک کلریدسدیم به‌منظور بررسی توان تحرک و تولید سولفید هیدروژن استفاده شد. پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، محیط کشت‌ها بررسی شدند (۲۱).

توانایی تثبیت نیتروژن: بررسی کیفی توانایی تثبیت نیتروژن در محیط کشت جامد Burk فاقد نیتروژن و حاوی ۲ درصد نمک کلریدسدیم به روش لکه‌گذاری و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انجام شد. ظهور کلنی روی محیط کشت بیانگر توانایی تثبیت نیتروژن بود (۸، ۲۲).

آزمون کیفی انحلال پتاسیم: برای بررسی توانایی انحلال پتاسیم از محیط کشت جامد Aleksandrov (محیط کشت (گرم در لیتر): گلوکز (۵)، سولفات منیزیم (۰/۵)، کلریدآهن (۰/۰۰۵)، کربنات کلسیم (۰/۱)، فسفات کلسیم (۲)، مسکوویت (۲) و آگار (۱۵) می‌باشد)، حاوی ۲ درصد نمک کلریدسدیم به روش لکه‌گذاری و گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس استفاده شد (۲۳). توان انحلال پتاسیم جدایه‌ها با استفاده از شاخص انحلال پتاسیم[2] (KSI) ارزیابی شد (۲٦).

$$KSI = \frac{\text{قطر هاله+قطر کلنی}}{\text{قطر کلنی}} \qquad (۳)$$

سنجش کمی توانایی تولید اکسین (IAA): اندازه‌گیری توانایی تولید اکسین با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف سالکوفسکی انجام شد. هر جدایه به‌صورت جداگانه در محیط کشت Modi حاوی ۰/۲۵ مولار کلریدسدیم تلقیح شد. محیط‌های کشت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با ۱۲۰ دور در دقیقه در انکوباتور شیکردار به‌مدت ۱٤ روز گرماگذاری شده و هر ۳ روز یک‌بار سنجش اکسین انجام شد. مایع رویی محیط‌کشت به نسبت ۲:۱ (حجمی: حجمی) با معرف سالکوفسکی مخلوط شده و در دمای اتاق به‌مدت ۲۰ دقیقه نگه‌داری شده و میزان جذب در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از آن‌جا که تولید ذاتی IAA و ترکیبات مرتبط با IAA می‌تواند بسیار کم باشد، بنابراین، توان تولید اکسین پس از افزودن ال-تریپتوفان (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به محیط رشد نیز ارزیابی شد. تولید IAA جدایه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد IAA (در محدوده غلظت ۵۰-۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) محاسبه شد (۸).

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتری: به‌منظور شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب، استخراج DNA ژنومی براساس روش CTAB با اندکی تغییر انجام شد (۲۷). برای تکثیر ژن 16S rDNA از پرایمرهای عمومی ۲۷F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و ۱٤۹۲R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT3') استفاده شد. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل واسرشت‌سازی ثانویه شامل ٦۰ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۵٦ درجه سلسیوس و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. پس از تعیین توالی، جستجوی مشابهت با استفاده از نرم‌افزار Blast در پایگاه داده NCBI انجام شد و بر اساس نتایج به‌دست آمده جدایه‌ها شناسایی شدند و توالی آن‌ها در پایگاه داده GenBank ثبت گردید.

نتایج

ویژگی‌های مناطق نمونه‌برداری: بافت خاک‌های نمونه‌برداری شده، لومی رسی سیلت، سیلتی لوم، لوم و شن بود. محدوده شوری در عصاره اشباع خاک‌ها متنوع و از شور تا به شدت شور ۹/۹-۱۰۳/٦ دسی‌زیمنس بر متر (معادل ۰/٦-٦ درصد نمک کلرید

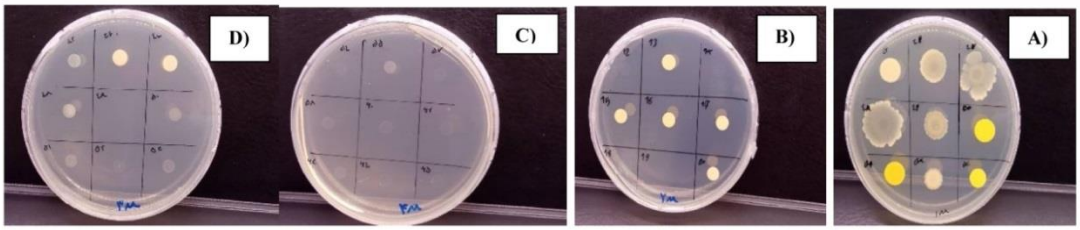
1- Magenta color
2- Potassium Solubilization Index

سدیم) متغیر بود. دامنه pH در عصاره اشباع نمونه‌های خاک بین ۷/۰۵ تا ۷/۶۸ بود.

تنوع مشاهده شده بین جدایه‌های جداشده از ریزوسفر گیاهان مختلف: در این پژوهش از میان ۲۲۰ باکتری جداسازی شده از ۲۲ نمونه خاک ریزوسفری، تعداد باکتری‌های گرم- مثبت بیش‌تری نسبت به گرم- منفی جداسازی شد به‌نحوی‌که ٦٦/٣٦ درصد باکتری‌ها گرم- مثبت بودند. بیش از ۹٦ درصد باکتری‌ها کاتالاز- مثبت بودند. در رابطه با آزمون تحمل به شوری، ۳٤/۵ درصد از جدایه‌ها توان رشد در محیط کشت حاوی ۲ مولار، ۲۳/۵ درصد از جدایه‌ها توان رشد در محیط کشت حاوی ۳ مولار، ۹/٦ درصد از جدایه‌ها توان رشد در محیط کشت حاوی ٤ مولار نمک کلریدسدیم را داشتند. برای صفات انحلال فسفر معدنی، تولید سیدروفور، آنزیم اوره‌آز، تحرک و تولید سولفید هیدروژن، به ترتیب ٤۹/۳، ۳۸/۲، ۱۱، ۳۲/۷، ۲۹/۵ و ۲۷/٦ درصد از جدایه‌ها توانایی موردنظر را نشان دادند.

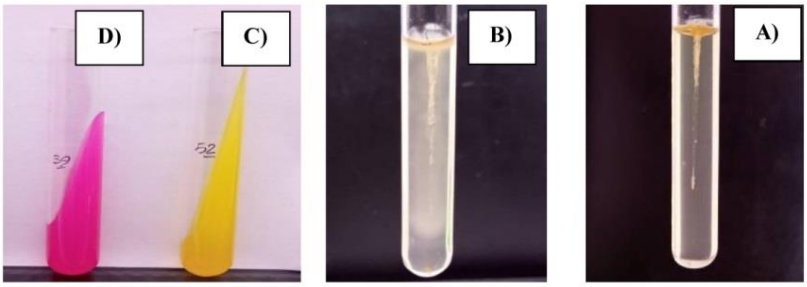
شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب: از بین ۱۰ جدایه مورد بررسی، چهار جنس مختلف شناسایی شد که پنج جدایه متعلق به جنس *Bacillus*، دو جدایه متعلق به جنس *Klebsiella*، دو جدایه متعلق به جنس *Proteus* و یک جدایه متعلق به جنس *Halomonas* بود. جدایه‌های *Bacillus* شامل *Bacillus sp.* (TS108 و TS206)، *B. licheniformis* (TS200 و TS218) و *B. paralicheniformis* (TS217) بودند. جدایه *Klebsiella* شامل *Klebsiella pneumoniae* (TS58 و TS63)، جدایه *Proteus* شامل *Proteus mirabilis* (TS160 و TS189) و جدایه *Halomonas* شامل *Halomonas sp.* (TS62) بودند.

بررسی برخی خصوصیات بیوشیمیایی و محرک رشد جدایه‌های منتخب: هر ۱۰ جدایه منتخب توان رشد در سطح شوری ۲ مولار را داشتند. به غیر از جدایه‌های *B.licheniformis* و *P.mirabilis*، سایر جدایه‌ها قادر به رشد در سطح شوری ۳ مولار بودند و جدایه‌های *Klebsiella* و *Halomonas* قادر به رشد در سطح ٤ مولار نمک کلرید سدیم بودند (شکل ۱). همه جدایه‌های مورد بررسی متحرک، اوره‌آز مثبت و قادر به تثبیت نیتروژن بودند (شکل ۲). توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها با هم متفاوت بود، به‌طوری‌که بیش‌ترین توان انحلال مربوط به جدایه *K. pneumoniae* TS58 و کم‌ترین توان انحلال مربوط به جدایه *Halomonas sp.*TS62 بود. جدایه *P. mirabilis* TS189 بیش‌ترین توان تولید سیدروفور و جدایه *Bacillus sp.* TS200 کم‌ترین توان را داشتند (شکل ۳). هیچ‌یک از جدایه‌های *Bacillus* توانایی تولید سولفید هیدروژن را نداشتند. توانایی انحلال پتاسیم نیز بین جدایه‌ها متفاوت بود، به‌طوری‌که بیش‌ترین و کم‌ترین توان انحلال به‌ترتیب در جدایه *K. pneumoniae* TS58 و *Bacillus sp.* TS108 مشاهده شد. در رابطه با توان تولید IAA-ذاتی بیش‌ترین مقدار مربوط جدایه *B. licheniformis* TS200 و کم‌ترین مقدار مربوط به جدایه‌های *K. pneumoniae* TS58 و *K. pneumoniae* TS63 بود. افزودن پیش‌ماده ال-تریپتوفان به محیط کشت منجر به تقویت تولید IAA توسط جدایه‌های باکتری شد. با این‌حال پاسخ جدایه‌ها به ال-تریپتوفان متفاوت بود. بیش‌ترین میزان افزایش نسبی IAA در *Proteus mirabilis* TS160 (٤۳ برابر) و کم‌ترین افزایش نسبی در *Bacillus paralicheniformis* TS217 (۱/۱۷ برابر) مشاهده شد. در جدایه *B. licheniformis* TS218 بیش‌ترین مقدار تولید هورمون در حضور ال-تریپتوفان اندازه‌گیری شد (۲۰/۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر). در شکل ٤، تأثیر افزودن ال-تریپتوفان بر توانایی تولید IAA توسط جدایه‌های باکتری نشان داده شده است. خلاصه خصوصیات مورفولوژیک، بیوشیمیایی، محرک رشدی جدایه‌های باکتری شناسایی شده در جدول ۱ آورده شده است.



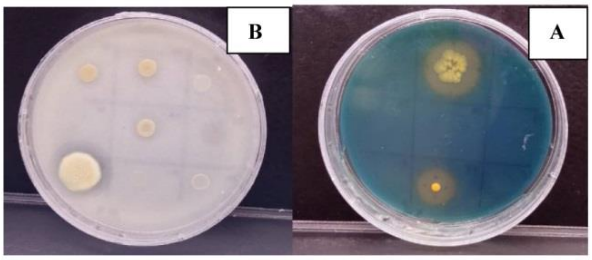
شکل ۱- رشد جدایه‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار در غلظت‌های ۱ (A)، ۲ (B)، ۳ (C) و ٤ (D) مولار نمک کلرید سدیم.

Figure 1. The growth of isolates on nutrient agar culture medium in 1 (A), 2 (B), 3 (C) and 4 (D) M of sodium chloride.



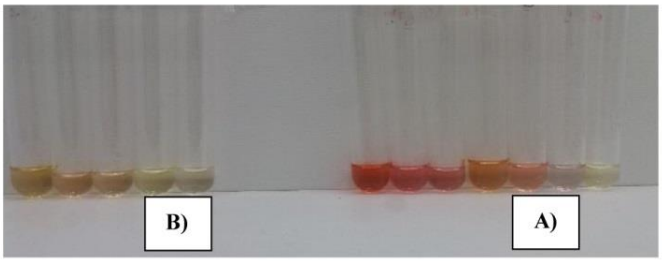
شکل ۲- جدایه فاقد تحرک (A)، متحرک (B)، بدون (C) و با (D) توان تولید آنزیم اوره‌آز.

Figure 2. Isolates without (A) and with (B) motility, without (C) and with (D) urease enzyme production ability.



شکل ۳- هاله شفاف و نارنجی پیرامون کلنی به‌ترتیب بیانگر توان انحلال فسفات (A) و تولید سیدروفور (B).

Figure 3. Clear and orange halo zone around the colony indicating the phosphate solubilization (A) and siderophore production ability (B), respectively.



شکل ٤- توان تولید IAA در حضور پیش ماده ال-تریپتوفان (A) و تولید ذاتی IAA (B).

Figure 4. IAA production based on L-tryptophan precursor (A) and intrinsic IAA production (B).

جدول ۱- ویژگی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی، محرک رشد گیاه و شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب.

Table 1. Morphological, biochemical, plant growth promoting characteristics and molecular identification of selected isolates.

جدایه Isolate	شناسایی مولکولی جدایه‌ها Molecular identification of isolates		ویژگی‌های مورفولوژیک باکتری‌ها Morphological characteristics of bacteria					ویژگی‌های بیوشیمیایی و محرک رشد باکتری‌ها Biochemical and growth promoting characteristics of bacteria										
	ریزجانداران Microorganisms	شماره دسترسی Accession Number	حاشیه Margin	رنگ Color	برآمدگی Elevation	بافت Texture	شکل Shape	کلرید سدیم ۲ مولار NaCl 2M	کلرید سدیم ۳ مولار NaCl 3M	کلرید سدیم ٤ مولار NaCl 4M	شاخص انحلال فسفر Phosphate Solubilization Index	شاخص تولید سیدروفور Siderophore Production Index	اوره‌آز Urease	توان تحرک Motility	سولفید هیدروژن H_2S	شاخص انحلال پتاسیم Potassium Solubilization Index	ایندول استیک اسید-ذاتی IAA-Intrinsic (µg/ml)	ایندول استیک اسید-تریپتوفان IAA-tryptophan (µg/ml)
58	*Klebsiella pneumoniae*	OQ780746	صاف smooth	شیری milky	محدب convex	لزج-مرطوب slimy-moist	دایره‌وار round	+	+	+	3.82	4.08	+	+	+	5.15	0.25	4.16
62	*Halomonas sp.*	OQ780747	صاف smooth	شیری milky	برآمده umbonate	چسبناک viscous	دایره‌وار round	+	+	+	1.94	5.00	+	+	+	1.76	0.48	2.48
63	*Klebsiella pneumoniae*	OQ780748	صاف smooth	شیری milky	محدب convex	لزج-مرطوب slimy-moist	دایره‌وار round	+	+	+	3.76	3.46	+	+	+	4.35	0.25	3.4
108	*Bacillus sp.*	OQ780749	صاف smooth	شیری milky	محدب convex	موکوئید mucoid	دایره‌وار round	+	+	−	3.25	6.55	+	+	−	1.27	0.98	6.46
160	*Proteus mirabilis*	OQ780750	پیچ‌خورده curled	شیری-مات milky-opaque	برآمده umbonate	مرطوب-مات moist-matte	متحدالمرکز concentric	+	−	−	2.26	5.38	+	+	+	2.14	0.30	12.93
189	*Proteus mirabilis*	OQ780751	پیچ‌خورده curled	شیری-مات milky- opaque	برآمده umbonate	مرطوب-مات moist-matte	متحدالمرکز concentric	+	−	−	2.8	9.88	+	+	+	2.58	0.61	6.49
200	*Bacillus licheniformis*	OQ780754	رشته‌ای filamentous	مات opaque	فرورفته crateriform	مات matte	رشته‌ای filamentous	+	−	−	3.37	3.75	+	+	−	1.89	3.78	6.71
206	*Bacillus sp.*	OQ780752	دارای زائده lobate	شیری milky	برجسته raised	درخشان-چسبناک shiny viscose	نامنظم irregular	+	+	−	3.21	4.26	+	+	−	1.41	1.79	3.18
217	*Bacillus paralicheniformis*	OQ780753	دارای زائده lobate	شیری milky	برجسته raised	درخشان-چسبناک shiny-viscose	نامنظم irregular	+	+	−	3.36	4.36	+	+	−	1.40	2.39	2.8
218	*Bacillus licheniformis*	OM992200	رشته‌ای filamentous	مات opaque	برآمده crateriform	مات matte	رشته‌ای filamentous	+	−	−	3.43	5.73	+	+	−	1.68	0.88	20.12

+: Ability & -: Inability

+: توانایی و -: عدم توانایی

بحث

ریزوسفر گیاهان شورزی منبع ایده‌آلی برای جداسازی ریزوباکتری‌های متحمل به نمک با توانایی افزایش رشد گیاهان زراعی می‌باشد (۲۸). PGPRها با سازوکارهای منحصر به‌فرد خود می‌توانند اثرات نامطلوب تنش شوری را کاهش داده و از رشد و سلامت گیاه در خاک‌های تحت‌تأثیر شوری حمایت کنند که در نهایت منجر به افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳٤). بنابراین، برای انتخاب باکتری محرک رشد گیاه متحمل به شوری، حفظ خصوصیات محرک رشد گیاه در شرایط تنش‌زا یک ویژگی مهم است که هنگام انتخاب آن باید در نظر گرفته شود (۲۹). برخی از ریزوباکترهای محرک رشد مانند جنس‌های *Azospirillum*، *Arthrobacter*، *Enterobacter*، *Burkholderia*، *Bacillus*، *Alcaligenes*، *Pseudomonas*، *Klebsiella*، *Microbacterium*، *Rhizobium*، *Streptomyces* و *Pantoea* به‌دلیل توانایی تحمل و کاهش تنش شوری در گیاهان شناخته شده‌اند (۱، ۳، ۲۸، ۳۵، ۳٦، ۳۷، ۳۸).

در میان جدایه‌های منتخب که در صفات مورد بررسی نتایج بالاتری داشتند، *Bacillus*ها، جنس غالب بودند. *باسیلوس*‌ها به فراوانی در انواع خاک‌های شور و غیرشور یافت می‌شوند. این باکتری‌ها در برابر تغییرات محیطی نامساعد مانند کمبود مواد غذایی، تغییرات دما و رطوبت، تنش اکسیداتیو و درجات بالای شوری تکامل یافته‌اند (۳۹، ٤۰، ٤۱). در مطالعات مشابه، بیش‌تر ST-PGPRهای جدا شده از ریزوسفر گندم، گوجه‌فرنگی و گل داوودی متعلق به جنس *باسیلوس* بوده‌اند. از ویژگی‌های این گروه از باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توان به تولید ایندول استیک اسید (IAA)، سیدروفور، تولید آنزیم‌های خارج سلولی، حل‌کنندگی فسفات، تثبیت نیتروژن، تحرک و القای مقاومت در برابر پاتوژن‌ها اشاره کرد (٤۰، ٤۲، ٤۳، ٤٤).

گونه‌های متعددی از جنس *Klebsiella* نیز به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد با توانایی بیوسنتز ایندول-۳-استیک اسید، حل کنندگی فسفات، تولید سیدروفور، سنتز استوئین و ۲،۳- بوتاندیول و تثبیت نیتروژن جداسازی و شناسایی شده است (۳، ۲۸، ۳۷، ٤۵، ٤٦، ٤۷، ٤۸).

یک جدایه *Proteus* با توانایی تولید سیدروفور، انحلال فسفات و اثرات ضد قارچی قوی بر بیمارگر گیاهی *Fusarium oxysporum* گزارش شده است (٤۹). افزایش تولید IAA در یک جدایه *P. mirabilis* تیمار شده با ۵ درصد (معادل یک مولار) نمک کلریدسدیم نشان داده شده است. IAA مهم‌ترین تقویت‌کننده رشد گیاه است که رشد ریشه را تحریک کرده و به دنبال آن جذب مواد مغذی را تحت شرایط مختلف تنش بهبود می‌بخشد (۳۳).

باکتری‌های متعلق به جنس *Halomonas*، به‌عنوان گونه‌های نمک‌دوست شناخته می‌شوند (۵۰). توانایی بالای افزایش رشد گیاه توسط جدایه‌های هالوموناس جداسازی شده از ریزوسفر *Salicornia* گزارش شده است (۵۲).

فراهمی زیستی فسفر برای گیاه بسیار مهم است، زیرا یکی از عناصر غذایی مهم مورد نیاز برای رشد و نمو آن می‌باشد (۵۳). از طرفی شوری تعادل غذایی و جذب عناصر را کاهش می‌دهد. باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توانند فسفر نامحلول آلی و معدنی را به اشکال قابل دسترس برای گیاه تبدیل کنند (۱۰، ۳۰، ۳۹، ٤۵، ۵۵).

در تنش شوری، ژن‌های کدکننده آنزیم‌های فسفاتاز و اسیدهای آلی در ST-PGPRها، بیش‌تر بیان می‌شوند که به افزایش انحلال فسفات معدنی نامحلول کمک می‌کند. در مطالعه‌ای، بین جدایه‌های بررسی شده، صفات PGP در غلظت بالای ۱۵ تا ۲۰

درصد نمک کلریدسدیم مشاهده شد. جدایه شناسایی شده، *Bacillus* متحمل به شوری، بیش‌ترین توان انحلال فسفات را در غلظت ۱۵ درصد نمک نشان داد (۱، ٥٦).

عدم دسترسی گیاه به آهن قابل‌جذب از محدودیت‌های خاک‌های قلیایی است. آهن جزء مهم‌ترین عناصر ریزمغذی در خاک می‌باشد که برای بسیاری از واکنش‌های حیاتی گیاه ضروری می‌باشد (۳۹). سیدروفورهای ترشح‌شده از PGPRها قابلیت دسترسی به عناصر غذایی به‌ویژه آهن را افزایش می‌دهند (۵۷). به‌طوری‌که تولید سیدروفور توسط PGPR متحمل به شوری می‌تواند نیاز آهن و چرخه عناصر غذایی را در محصولات کشت شده تحت تنش شوری با تغییر pH ریزوسفر را برآورده کند (۳٤، ٤٤). تولید سیدروفور توسط برخی از گونه‌های *Bacillus* و *Klebsiella* گزارش شده است (۳۷، ٥٦، ۵۸، ۵۹).

در کشاورزی، نیتروژن اصلی‌ترین ماده غذایی است که تأثیر قابل‌توجهی بر رشد گیاه دارد. باکتری‌های آزادزی و همزیست می‌توانند نیتروژن اتمسفر را در شرایط تنش شوری تثبیت کرده و به رشد گیاه کمک کنند. باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن جداسازی شده از ریزوسفر گندم قادر به تحمل سطح شوری ۱۰۰ تا ٤۰۰ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم بودند (۱۷). توانایی تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات، تولید IAA و سیدروفور و نیز مهار رشد قارچ‌های بیماری‌زا توسط *B. licheniformis* گزارش شده است (۵۱).

حضور ژن‌های مسئول مقاومت در برابر شوری بالا و ژن‌های ویژه nif که در تثبیت نیتروژن اتمسفری نقش دارند در جدایه *Kelebsiela* نشان داده شده است (۲۸، ٤٦). تلقیح گیاهچه‌های بادام‌زمینی با جدایه‌های *Kelebsiela*، *Pseudomonas*، *Agrobacterium* و *Ochrobactrum* با افزایش محتوای نیتروژن و تعدیل محتوای IAA سبب افزایش رشد گیاهان شده است (۲۸).

غلظت بالای یون سدیم در خاک‌های شور به‌شدت بر جذب پتاسیم توسط گیاهان تأثیر می‌گذارد (٥٦). تلقیح گیاهان حساس به نمک با PGPR متحمل به نمک، نقش مهمی در حفظ نسبت یون پتاسیم به سدیم در این گیاهان دارد (۳۸). توانایی انحلال پتاسیم توسط تعداد زیادی از جنس‌های باکتریایی شامل *Klebsiella*، *Agrobacterium*، *Enterobacter*، *Bacillus*، *Burkholderia*، *Arthrobacter*، *Aspergillus* و *Pseudomonas* گزارش شده است (٦۰). در مطالعه‌ای شاخص انحلال پتاسیم از کانی میکا، برای باکتری‌های *باسیلوس* بین ۱/٦۲ تا ۲/۳۷ بود. در بین جدایه‌های *باسیلوس*، *B. licheniformis* بیش‌ترین توان حل‌کنندگی پتاسیم را نشان داد (٦۱). در مطالعه‌ای دیگر بین چهار جدایه *Bacillus*، *Enterobacter*، *Pseudomonas* و *Achromobacter* با توانایی حل‌کنندگی پتاسیم، بیش‌ترین مقدار حل‌کنندگی پتاسیم در جدایه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* مشاهده شد (٦۲).

علاوه بر نقش PGPRها در دسترسی به عناصر معدنی، فیتوهورمون‌ها نیز پاسخ‌های فیزیولوژیک و مکانیسم‌های بیوشیمیایی گیاهان را تعدیل می‌کنند و بقای آن‌ها را در شرایط تنش شوری افزایش می‌دهند (٥٦). باکتری‌های مقاوم به نمک می‌توانند با تولید متابولیت‌های میکروبی و هورمون‌هایی مانند اکسین و سیتوکینین، تحمل گیاه را در برابر تنش شوری با بهبود جذب آب و مواد معدنی افزایش دهند (۳۱). تولید IAA به‌عنوان معیار اصلی برای غربالگری PGPR در نظر گرفته می‌شود، زیرا باکتری‌های تولیدکننده IAA اثرات مفید شگرفی بر رشد گیاه دارند (۳۷). هورمون IAA تولید شده توسط باکتری‌های همزیست در تقسیم، تمایز و طویل شدن سلول‌های ریشه گیاهان

تحت تنش شوری نقش بسیار مهمی بازی می‌کند (۲۹، ۳۰، ۳۲، ٥٤، ٥٥، ٦٥). این منبع هورمونی می‌تواند به گیاه برای دستیابی مجدد به هموستازی هورمونی که در نتیجه تنش شوری مختل شده است کمک کند (٦٥). در پژوهش حاضر، *Bacillus*ها بیش‌ترین توان تولید IAA را داشتند و تنوع بسیاری بین جدایه‌های باکتری مشاهده شد. این ناهمگونی در تولید IAA به مسیرهای بیوشیمیایی متعدد، کنترل ژنتیکی و تأثیرات محیطی نسبت داده می‌شود (٦٤).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به تغییرات اقلیمی و افزایش روند شور شدن خاک‌ها که بر رشد و نمو گیاه از نظر تولید کمی و هم‌چنین کیفیت رشد تأثیر می‌گذارد، استفاده از ریزجانداران سودمند و بومی ریزوسفری گیاهان شورزی می‌تواند راهکار قابل‌توجهی برای مقابله با این شرایط نامطلوب باشد. در مطالعه حاضر، برخی از ریزجانداران جداسازی شده علاوه بر تحمل سطوح بالای شوری، خصوصیات مختلف تحریک رشد گیاه را نیز دارا بودند. بیش‌ترین جدایه‌ها با خصوصیات افزایندگی رشد گیاه به جنس *Bacillus* تعلق داشتند. گونه‌های متعلق به جنس‌های *Klebsiella* و *Halomonas* بیش‌ترین تحمل به نمک را نشان دادند.

منابع

1.Kapadia, C., Patel, N., Rana, A., Vaidya, H., Alfarraj, S., Ansari, M. J., Gafur, A., Poczai, P. & Sayyed, R. Z. (2022). Evaluation of plant growth-promoting and salinity ameliorating potential of halophilic bacteria isolated from saline soil. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-14. **doi:10.3389/fpls.2022.946217.**

2.Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10 (6), 1-18. **doi:10.3390/ biology10060475.**

3.Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019). Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-18. **doi:10.3389/fmicb.2019.02791.**

4.Castiglione, S., Oliva, G., Vigliotta, G., Novello, G., Gamalero, E., Lingua, G., Cicatelli, A., & Guarino, F. (2021). Effects of compost amendment on glycophyte and halophyte crops grown on saline soils: Isolation and characterization of rhizobacteria with plant growth promoting features and high salt resistance. *Applied Sciences*, 11 (5), 1-15. **doi:10.3390/app11052125.**

5.Schirawski, J., & Perlin, M. H. (2018). Plant–microbe interaction 2017-the good, the bad and the diverse. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (5), 1-6. **doi:10.3390/ijms 19051374.**

6.Kearl, J., McNary, C., Lowman, J. S., Mei, C., Aanderud, Z. T., Smith, S. T., West, E., Colton, M., Hamson., & Nielsen, B. L. (2019). Salt-tolerant halophyte rhizosphere bacteria stimulate growth of alfalfa in salty soil. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-11. **doi:10.3389/ fmicb.2019.01849.**

7.Palacio-Rodríguez, R., Coria-Arellano, J. L., López-Bucio, J., Sánchez-Salas, J., Muro-Pérez, G., Castañeda-Gaytán, G., & Sáenz-Mata, J. (2017). Halophilic rhizobacteria from *Distichlis spicata* promote growth and improve salt tolerance in heterologous plant hosts. *Symbiosis*, 73, 179-189. **doi:10.1007/ s13199-017-0481-8.**

8.Castellano-Hinojosa, A., & Bedmar, E. J. (2017). Methods for evaluating plant growth-promoting rhizobacteria traits.

P 255-274, In: H.B. Singh, B. K. Sarma, and C. Keswani (eds), Advances in PGPR Research. Wallingford UK: CABI.

9. Orhan, F., & Gulluce, M. (2015). Isolation and characterization of salt-tolerant bacterial strains in salt-affected soils of Erzurum, Turkey. *Geomicrobiology Journal*, 32 (6), 521-529. **doi: 10.1080/01490451.2014.962674.**
10. Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? *Microbiological Research*, 207, 41-52. **doi:10.1016/j.micres.2017.11.004.**
11. Abdelaal, K., AlKahtani, M., Attia, K., Hafez, Y., Király, L., & Künstler, A. (2021). The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants. *Biology*, 10 (6), 520. **doi:10.3390/ biology10060520.**
12. Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13-24. **doi:10.1016/j.micres.2015. 12.003.**
13. Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Ouzari, I., Daffonchio, D., & Borin, S. (2013). Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with Salicornia growing in Tunisian hypersaline soils. *BioMed Research International*, 2013, 1-13. **doi:10.1155/ 2013/248078.**
14. Chen, W., Lin, F., Lin, K. H., Chen, C., Xia, C., Liao, Q., Chen, S. P., & Kuo, Y. W. (2022). Growth promotion and salt-tolerance improvement of *Gerbera jamesonii* by root colonization of *Piriformospora indica*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(3), 1219-1228. **doi:10.1007/s00344-021-10385-4.**
15. Shultana, R., Zuan, A. T. K., Naher, U. A., Islam, A. M., Rana, M. M., Rashid, M. H., Irin, I.J., Islam, S.S., Rim, A.A., & Hasan, A. K. (2022). The PGPR mechanisms of salt stress adaptation and plant growth promotion. *Agronomy*, 12 (10), 2266. **doi:10.3390/ agronomy12102266.**
16. Ilyas, N., Mazhar, R., Yasmin, H., Khan, W., Iqbal, S., Enshasy, H. E., & Dailin, D. J. (2020). Rhizobacteria isolated from saline soil induce systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) against salinity stress. *Agronomy*, 10 (7), 1-19. **doi:10.3390/agronomy10070989.**
17. Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-14. **doi:10.3389/fmicb.2017.02104.**
18. Gee, G. W., and Bauder, J. W. (1986). Particle-size analysis. P 383-411, In: A. Klute (ed.), Methods of soil analysis: Physical and mineralogical methods. Soil Science Society of America Inc.
19. Jackson, M. (1967). Soil chemical analysis prentice. Hall of India Private Limited, New Delhi, 498p.
20. Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, 8 (1), 1-14. **doi:10.1186/1471-2180-8-230.**
21. M Atlas, R. 2010. Handbook of microbiological media. 1572p.
22. Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., & Sa, T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37 (10), 1970-1974. **doi:10.1016/j. soilbio.2005.02.025.**
23. Hu, X., Chen, J., & Guo, J. (2006). Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (9), 983-990. **doi:10.1007/s11274-006-9144-2.**
24. Liang, Y., Xu, Z., Xu, Q., Zhao, X., Niu, S., & Yin, X. (2023). Isolation of Inorganic Phosphorus-solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Festuca*

arundinacea Schreb. *Geomicrobiology Journal*, 40 (6), 538-546. **doi:10.1080/ 01490451.2023.2208096.**

25. Goswami, D., Patel, K., Parmar, S., Vaghela, H., Muley, N., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N. (2015). Elucidating multifaceted urease producing marine Pseudomonas aeruginosa BG as a cogent PGPR and bio-control agent. *Plant Growth Regulation*, 75, 253-263. **doi: 10.1007/s10725-014-9949-1.**
26. Mali, S. D., & Attar, Y. C. (2021). Formulation of cost-effective agro residues containing potassium solubilizing bacterial bio-inoculants using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102113. **doi:10.1016/j.bcab.2021.102113.**
27. Minas, K., McEwan, N. R., Newbold, C. J., & Scott, K. P. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 325 (2), 162-169. **doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02424.x.**
28. Sharma, S., Kulkarni, J., & Jha, B. (2016). Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1600. **doi:10.3389/fmicb.2016. 01600.**
29. Tirry, N., Ferioun, M., Kouchou, A., Laghmari, G., Bahafid, W., & El Ghachtouli, N. (2022). Enhanced Salinity Tolerance of *Medicago sativa*, roots AM colonization and soil enzyme activities by PGPR. *Environmental Sciences Proceedings*, 16 (1), 14. **doi: 10.3390/environsciproc2022016014.**
30. Wang, W., Wu, Z., He, Y., Huang, Y., Li, X., & Ye, B. C. (2018). Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L. by Bacillus isolated from saline soil in Xinjiang. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 520-529. **doi:10.1016/j. ecoenv.2018.08.070**
31. Salimi, A., Etemadi, M., Eshghi, S., Karami, A., & Alizargar, J. (2021). The effects of *halomonas* sp. and *azotobacter* sp. on ameliorating the adverse effect of salinity in purple basil (*Ocimum basilicum* l.). *Preprints*. 1, 1-27. **doi:10.20944/preprints202106. 0391.v1.**
32. Sagar, A., Rai, S., Ilyas, N., Sayyed, R. Z., Al-Turki, A. I., El Enshasy, H. A., & Simarmata, T. (2022). Halotolerant rhizobacteria for salinity-stress mitigation: Diversity, mechanisms and molecular approaches. *Sustainability*, 14 (1), 1-19. **doi:10.3390/su14010490.**
33. Zia, R., Nawaz, M. S., Yousaf, S., Amin, I., Hakim, S., Mirza, M. S., & Imran, A. (2021). Seed inoculation of desert-plant growth-promoting rhizobacteria induce biochemical alterations and develop resistance against water stress in wheat. *Physiologia Plantarum*, 172 (2), 990-1006. **doi:10.1111/ppl.13362.**
34. Yasmin, H., Nosheen, A., Naz, R., Keyani, R., & Anjum, S. 2019. Regulatory role of rhizobacteria to induce drought and salt stress tolerance in plants. P 279-335, In: Maheshwari, D., and Dheeman, S. (eds) Field Crops: Sustainable Management by PGPR. Sustainable Development and Biodiversity, Springer, Cham.
35. Sarkar, A., Ghosh, P. K., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., Pandey, S., Mondal, M. H., & Maiti, T. K. (2018). A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Research in Microbiology*, 169 (1), 20-32. **doi:10.1016/j.resmic.2017.08.005.**
36. Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLos One*, 11 (6), 1-24. **doi:10.1371/ journal.pone.0155026.**
37. Kusale, S. P., Attar, Y. C., Sayyed, R. Z., Malek, R. A., Ilyas, N., Suriani, N. L., Khan, N., & El Enshasy, H. A. (2021). Production of plant beneficial and antioxidants metabolites by *Klebsiella variicola* under salinity stress. *Molecules*, 26 (7), 1-16. **doi:10.3390/ molecules26071894.**
38. Sunita, K., Mishra, I., Mishra, J., Prakash, J., & Arora, N. K. (2020). Secondary metabolites from halotolerant plant growth promoting rhizobacteria for

ameliorating salinity stress in plants. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-12. **doi:10.3389/fmicb.2020.567768.**

39. Barbaccia, P., Gaglio, R., Dazzi, C., Miceli, C., Bella, P., Lo Papa, G., & Settanni, L. (2022). Plant Growth-Promoting Activities of Bacteria Isolated from an Anthropogenic Soil Located in Agrigento Province. *Microorganisms*, 10 (11), 1-13. **doi: 10.3390/microorganisms10112167.**
40. Amaresan, N., Kumar, K., Madhuri, K., & Usharani, G. K. (2016). Isolation and characterization of salt tolerant plant growth promoting rhizobacteria from plants grown in tsunami affected regions of Andaman and Nicobar Islands. *Geomicrobiology Journal*, 33 (10), 942-947. **doi:10.1080/01490451.2015.1128994.**
41. Remonsellez, F., Castro-Severyn, J., Pardo-Esté, C., Aguilar, P., Fortt, J., Salinas, C., Barahona, S., León, J., Fuentes, B., & Saavedra, C. P. (2018). Characterization and salt response in recurrent halotolerant *Exiguobacterium* sp. SH31 isolated from sediments of Salar de Huasco, Chilean Altiplano. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-17. **doi:10.3389/fmicb.2018.02228.**
42. Zhou, C., Zhu, L., Xie, Y., Li, F., Xiao, X., Ma, Z., & Wang, J. (2017). Bacillus licheniformis SA03 confers increased saline–alkaline tolerance in chrysanthemum plants by induction of abscisic acid accumulation. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-17. **doi:10.3389/fpls.2017. 01143.**
43. Upadhyay, S. K., & Singh, D. P. (2015). Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biology*, 17 (1), 288-293. **doi:10.1111/plb.12173.**
44. Albdaiwi, R. N., Khyami-Horani, H., Ayad, J. Y., Alananbeh, K. M., & Al-Sayaydeh, R. (2019). Isolation and characterization of halotolerant plant growth promoting rhizobacteria from durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) cultivated in saline areas of the dead sea region. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-16. **doi:10.3389/ fmicb.2019.01639.**
45. Liu, W., Hou, J., Wang, Q., Ding, L., & Luo, Y. (2014). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated saline-alkali soil. *Chemosphere*, 117, 303-308. **doi: 10.1016/ j.chemosphere.2014.07.026.**
46. Liu, W., Wang, Q., Hou, J., Tu, C., Luo, Y., & Christie, P. (2016). Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. *Scientific Reports*, 6 (1), 1-10. **doi: 10.1038/srep26710.**
47. Sapre, S., Gontia-Mishra, I., & Tiwari, S. (2018). Klebsiella sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). *Microbiological Research*, 206, 25-32. **doi:10.1016/ j.micres.2017.09.009.**
48. Singh, R. P., Jha, P., & Jha, P. N. (2015). The plant-growth-promoting bacterium Klebsiella sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 184, 57-67. **doi:10.1016/j.jplph.2015.07.002.**
49. Drzewiecka, D. (2016). Significance and roles of Proteus spp. bacteria in natural environments. *Microbial ecology*, 72, 741-758. **doi:10.1007/s00248-015-0720-6.**
50. Jha, B., Gontia, I., & Hartmann, A. (2012). The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil*, 356, 265-277. **doi:10.1007/ s11104-011-0877-9.**
51. Oliva, G., Di Stasio, L., Vigliotta, G., Guarino, F., Cicatelli, A., & Castiglione, S. (2023). Exploring the Potential of Four Novel Halotolerant Bacterial Strains as Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) under Saline Conditions. *Applied Sciences*, 13 (7), 1-13. **doi:10.3390/app13074320.**
52. Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Ouzari, I., Daffonchio, D., & Borin, S. (2013). Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated

with Salicornia growing in Tunisian hypersaline soils. *BioMed Research International*, 2013, 1-13. **doi:10.1155/ 2013/248078.**

53. Jiang, H., Wang, T., Chi, X., Wang, M., Chen, N., Chen, M., Pan, L., & Qi, P. (2020). Isolation and characterization of halotolerant phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing the peanut rhizosphere in salt-affected soil. *Geomicrobiology Journal*, 37 (2), 110-118. **doi:10.1080/01490451.2019.1666195.**
54. Kashyap, B. K., Ara, R., Singh, A., Kastwar, M., Aaysha, S., Mathew, J., and Solanki, M. K. 2019. Halotolerant PGPR bacteria: Amelioration for salinity stress. P 509-530, In: D. Singh, V. Gupta, and R. Prabha (eds) Microbial Interventions in Agriculture and Environment. Springer, Singapore.
55. Safdarian, M., Askari, H., Nematzadeh, G., & Adriano, S. O. F. O. (2020). Halophile plant growth-promoting rhizobacteria induce salt tolerance traits in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Pedosphere*, 30(5), 684-693. **doi: 10.1016/S1002-0160(19)60835-0.**
56. Mishra, P., Mishra, J., & Arora, N. K. (2021). Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants-Recent developments and prospects: A review. *Microbiological Research*, 252, 1-13. **doi:10.1016/j.micres.2021. 126861.**
57. Girma, B., Panda, A. N., Roy, P. C., Ray, L., Mohanty, S., & Chowdhary, G. (2022). Molecular, biochemical, and comparative genome analysis of a rhizobacterial strain *Klebsiella* Sp. KBG6. 2 imparting salt stress tolerance to *Oryza sativa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 203, 1-13. **doi: 10.1016/j.envexpbot.2022.105066.**
58. Sultana, S., Alam, S., & Karim, M. M. (2021). Screening of siderophore-producing salt-tolerant rhizobacteria suitable for supporting plant growth in saline soils with iron limitation. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 1-5. **doi:10.1016/j.jafr.2021.100150.**
59. Vandana, U. K., Singha, B., Gulzar, A. B. M., & Mazumder, P. B. 2020. Molecular mechanisms in plant growth promoting bacteria (PGPR) to resist environmental stress in plants. P 221-233, In: V. Sharma, R. Salwan, and L.K.T. Al. Ani, (eds), In Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture, Elsevier, Academic Press.
60. Kour, D., Rana, K. L., Kaur, T., Yadav, N., Halder, S. K., Yadav, A. N., Sachan, S.G., & Saxena, A. K. 2020. Potassium solubilizing and mobilizing microbes: biodiversity, mechanisms of solubilization, and biotechnological implication for alleviations of abiotic stress. P 177-202, In: A. A. Rastegari, A. N. Yadav, & N. Yadav (eds), In New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering, Elsevier.
61. Raji, M., & Thangavelu, M. (2021). Isolation and screening of potassium solubilizing bacteria from saxicolous habitat and their impact on tomato growth in different soil types. *Archives of Microbiology*, 203(6), 3147-3161. **doi:10.1007/s00203-021-02284-9.**
62. Dong, X., Lv, L., Wang, W., Liu, Y., Yin, C., Xu, Q., Yan, H., Fu, J., & Liu, X. (2019). Differences in distribution of potassium-solubilizing bacteria in forest and plantation soils in Myanmar. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16 (5), 1-14. **doi:10.3390/ijerph16050700.**
63. Susilowati, D. N., Sudiana, I., Mubarik, N. R., Agatis, J., & Campus, D. (2015). Species and functional diversity of rhizobacteria of rice plant in the coastal soils of Indonesia. *Indonesian Journal of Agricultural Science*. 16, 39-50. **doi: 10.21082/IJAS.V16N1.2015.P39-50.**
64. Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125. **doi:10.1007/s10482-013-0095-y.**
65. Saleem, S., Iqbal, A., Ahmed, F., & Ahmad, M. (2021). Phytobeneficial and salt stress mitigating efficacy of IAA producing salt tolerant strains in *Gossypium hirsutum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 (9), 5317-5324. **doi:10.1016/j.sjbs.2021.05.056.**