# جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد اگزو پلی ساکارید بومی خاک‌های شور

فرانک مشبکی اصفهانی[1]، آرزو طهمورث پور، مهران هودجی، میترا عطاآبادی و احمد محمدی

دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان واحد خوراسگان؛ **Faranakmoshabaki@yahoo.com**

دانشیار میکروب شناسی گروه علوم پایه پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان واحد خوراسگان؛ **A.tahmoures.p@gmail.com**

استاد گروه علوم خاک دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان واحد خوراسگان؛ **Mehran.hoodaji1@gmail.com**

استادیار گروه علوم خاک دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان واحد خوراسگان؛ **Mitra_ataabadi@yahoo.com**

دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان واحد خوراسگان؛ ؛**mghehsareh@yahoo.com**

دریافت: **95/6/24** و پذیرش: **96/4/12**

## چکیده

**اگزو پلی ساکاریدهای مترشحه از باکتری‌ها دارای نقش مهمی در مقاومت باکتری‌ها در مقابل تنش‌ها از جمله شوری می‌باشند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های شورزی با بیشترین توان تولید اگزو پلی ساکارید از خاک و بررسی میزان تولید اگزو پلی ساکارید در غلظت های مختلف نمک انجام گردید. نمونه‌های خاک مورد نظر بر محیط نوترینت آگار دارای 5 % نمک کشت شد. از میان باکتری‌های شورزی، کلونی‌های موکوئیدی با قدرت رشد در حضور بیشترین غلظت نمک به عنوان کلونی مولد اگزو پلی ساکارید انتخاب و مقدار اگزوپلی ساکارید تولیدی هر کدام از جدایه‌ها در غلظت 5 % نمک تعیین و سویه برتر مورد شناسایی قرار گرفت. ماهیت اگزو پلی ساکارید سویه برتر با استفاده از تکنیک FTIR و مقدار اگزو پلی ساکارید تولیدی در غلظت‌های بالاتر نمک نیز با روش آنترون تعیین گردید. در طیف مادون قرمز اگزوپلی ساکارید سویه مورد نظر پیک‌های جذبی مربوط به ترکیبات کربوهیدراتی از جمله بی گلوکان، همچنین گروه‌های الکل، فنول، کربوکسیلیک اسید، کربونیل و آلکین مشاهده شد و تولید اگزوپلی ساکارید توسط جدایه فوق به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) همراه با افزایش نمک، افزایش یافت. بر اساس نتایج سویه‌ای با توان رشد در محیط 25 % نمک و تولید 0/168 g/L اگزوپلی ساکارید در مدت 24 ساعت به عنوان سویه برتر انتخاب شد و بر اساس توالی 16S rDNA به عنوان *سیتروباکتر فروندی سویه* ATHM38 با شماره دسترسی KX553903 در پایگاه NCBI ثبت گردید.**

**واژه‌های کلیدی:** اگزو پلی ساکارید، *سیترو باکتر فروندی* و شوری

---

[1] نویسنده مسئول، آدرس: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان واحد خوراسگان

## مقدمه

ایران دارای اقلیم گرم و خشک بوده و مجموع خاک‌های شور و سدیمی در آن حدود 27 میلیون هکتار تخمین زده می‌شود که بیش از نیمی از زمین‌های قابل کشت می اشد. در اکثر نقاط کره زمین کمبود آب و شوری منابع آب و خاک از جمله مهمترین عوامل محدود کننده رشد گیاهان و تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌روند، کمبود آب می‌تواند بسته به شدت و زمان تنش و مرحله نمو گیاه، بر فیزیولوژی رشد، حجم سلول، تقسیم سلولی، دیواره سازی سلول، وزن تر و خشک، عملکرد و اجزای عملکرد گیاه تأثیر بگذارد (تمرتاش و همکاران، 1389). این امر باعث تکامل مکانیسم‌های تحمل به خشکی و شوری در گیاهان زراعی بومی، در اثر کشت متوالی در این مناطق گشته است. در سال‌های اخیر تلاش-های زیادی برای بکار بردن روش‌های زیستی برای کاهش تنش‌های محیطی صورت گرفته است. از جمله این روش-ها استفاده از باکتری‌ها و تولیدات باکتریایی نظیر اگزوپلی ساکاریدها است. اگزوپلی ساکاریدها، پلی ساکاریدهای زنجیره‌ای بلندی هستند که از واحدهای قندی تشکیل شده‌اند. این واحدهای قندی عمدتاً گلوکز، گالاکتوز و رامنوز در نسبت‌های مختلف هستند.

این ترکیبات در طی مراحل رشد میکروبی در محیط رها می‌شوند و از آنجا که متصل به سطح سلول میکروبی نیستند، می‌توان آنها را از پلی ساکاریدهای کپسوله شده که متصل به سطح سلول هستند متمایز کرد. اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی در دو گروه هموپلی ساکاریدها (سلولز، دکستران، موتان، آلترنان، پولولان، لوان، کوردلان ) و هتروپلی ساکاریدها ( ژلان و زانتان ) قرار می‌گیرند (ولمن و مدوکس[1]، 2009). پلی ساکاریدها گروه‌های پلیمری بسیار متغیری هستند. مشخصات ساختاری آنها مانند وزن مولکولی، تعداد و اتصالات ساکاریدی، نقش مهمی در کاربرد وسیع آنها در صنایع مختلف دارد. بسیاری از پلی ساکاریدهای مشتق از گیاهان مانند نشاسته، پکتین و صمغ به عنوان عوامل قوام دهنده، ژله ی کننده، مورد استفاده قرار می‌گیرند، در دهه‌های اخیر اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی جایگزین پلی ساکاریدهای گیاهی شده‌اند که از خواص فوق برخوردار بوده و به مقدار فراوان و با درجه خلوص بالاتری به دست می‌آیند. اگزوپلی ساکاریدها در هنگام رشد باکتری‌ها به وسیله باکتری‌های مختلف مانند باکتری‌های *اسیدلاکتیک*[2]، *بیفیدوباکتریوم‌ها*[3] و *باسیلوس‌ها*[4] تولید می‌شوند. توانایی تولید اگزو پلی ساکارید در میان باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها و مخمرها می‌باشد (لارپین و همکاران[5] ، 2002). اگزو پلی ساکاریدها در محیط دارای مزایای منحصر به فردی هستند، به طور مثال از سلول‌ها در مقابل مس محافظت می‌کنند (لوئی جستین و همکاران[6]، 2001 ). همچنین شناسائی پلی ساکاریدها، به عنوان جاذب‌های مؤثر و مناسب از لحاظ اقتصادی، منجر به کاربرد آنها در تصفیه فاضلاب‌های صنایع گوناگون، شده است. کاربرد اینگونه جاذب‌ها در حذف و کنترل مواد سرطان زا یا سمی، مانند کروم، جیوه، کادمیوم و فلزات سنگین در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته و موجب بهبود راندمان حذف آلاینده-های مختلف در سیستم‌های تصفیه فاضلاب شده است (ساغروانی و همکاران، 1390).

در کشاورزی همواره سعی بر این بوده است تا تحمل گیاهان زراعی نسبت به تنش‌های محیطی افزایش یابد. اخیرا استفاده از روش‌های بیولوژیکی یعنی استفاده از ریز موجودات خاکزی به منظور کاهش اثرات تنش‌های محیطی بر گیاهان اهمیت زیادی پیدا کرده است. مطالعات مارگزین و همکاران[7] (2001) نشان داده است که برخی از میکرو ارگانیسم‌ها با مکانیزم‌های تولید پلیمر نقش مهمی در جبران مشکل رطوبتی خاک بخصوص در شرایط تنش شوری ایفا می‌کنند به طوریکه در محیط‌های شور برخی میکروارگانیسم‌های نمکدوست قادر به زندگی و ادامه حیات هستند، این میکرو ارگانیسم‌ها با تولید بیوسورفکتانت‌ها و پلی ساکاریدهای خارج سلولی می‌توانند نقش ویژه‌ای در مقابله با تنش‌های محیطی کمبود آب در خاک که به طور معمول عامل اصلی کاهش عملکرد در گیاهان می‌باشد بازی کنند.

در ارتباط با تنش شوری باکتری‌های شوردوست[8] و مقاوم به شوری[9] شناخته شده که با شرایط محیطی با نمک زیاد سازگاری یافته‌اند. این باکتری‌ها در شرایط سخت می‌توانند رشد یافته و مکانیسم‌های فیزیولوژی و بیوشیمی آنها در هنگام پاسخ به شرایط نمک زیاد توسعه پیدا کرده است (زنجیربند، 1385). در واقع باکتری‌های مقاوم به شوری طیف وسیعی از باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند که در حضور نمک و یا غیاب آن می‌توانند

1. Welman and Maddox
2. *Lactic acid bacteria*
3. *Bifidobacterium*
4. *Bacillus*
5. Larpin et al.
6. Looijesteijn et al.
7. Margesin et al.
8. Halophile
9. Halotolerant

تکثیر یافته و رشد کنند که شامل بعضی از انواع *باسیلوس*، *میکروکوکوس*، *استرپتوکوکوس* و *کورینه باکتریوم* هستند (کفیلزاده و همکاران، 1386) این باکتری‌ها می‌توانند با تغییر و تحول ماده آلی در خاک بر شاخص‌های میکروبی مؤثر باشند ( ناهیدان و نوربخش، 1388).

از آنجا که تنش شوری، تمام مراحل رشد گیاه از جوانه زنی تا تولید دانه و میوه را تحت تأثیر قرار می‌دهد و اثر بازدارنده بر رشد و متابولیسم گیاه دارد، پژوهش حاضر با هدف جداسازی سویه‌های مقاوم به شوری تولید کننده اگزو پلی ساکارید و استفاده از این سویه‌ها در مراحل بعدی تحقیق، به منظور ارزیابی تأثیر اگزو پلی ساکارید باکتریایی بر جوانه زنی گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری از خاک شور

به منظور جداسازی باکتری‌های مولد اگزوپلی ساکارید ابتدا از خاک‌های شور منطقه رودشت اصفهان نمونه‌برداری شد، نمونه‌ها به طور تصادفی از سطح تا عمق 30 سانتی متری ده نقطه مختلف برداشته و با هم خوب مخلوط شدند، از مخلوط خاک یک نمونه به وزن 1 تا 2 کیلوگرم برداشته شد، بلافاصله در ظروف استریل به آزمایشگاه ارسال و آزمایش‌های مورد نیاز جهت تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بر روی آن انجام شد.

### جداسازی باکتری‌های مقاوم به شوری

ابتدا از نمونه خاک مورد نظر ( 1gr) سری رقت تهیه شد ($10^{-1}$ - $10^{-6}$) سپس اقدام به شمارش و تعیین جمعیت باکتری‌ها و باکتری‌های تحمل کننده نمک گردید به این صورت که پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار دارای 5 % نمک (NaCl)آماده شد. 250 میکرولیتر از هر رقت توسط بر سطح پلیت گسترده و کشت شد. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای 30 درجه قرار داده شد و بعد از سه روز شمارش انجام شد. سپس از میان باکتری‌های تحمل کننده نمک، کلونی‌هایی که دارای خاصیت کشسانی بودند به عنوان کلونی‌های موکوئیدی مولد اگزوپلی ساکارید در نظر گرفته و شمارش شدند.

### تعیین حداکثر غلظت قابل تحمل نمک (MTC)[1]

برای بررسی مقاومت باکتری‌ها به شوری، رشد جدایه‌ها بر محیط کشت‌های نوترینت براث حاوی غلظت‌های مختلف نمک (26- 0 %) پس از 72 ساعت انکوباسیون در دمای (30 ± 2 °C) درجه سانتیگراد بررسی شد.

### تولید اگزوپلی ساکارید

برای انتخاب سویه‌ای که قادر به تولید حداکثر پلی ساکارید برون سلولی است، 10میلی لیتر از محیط کشت شبانه هر جدایه که کدورت آن معادل 0/5 مک فارلند بود به 240 میلی لیترBHI[2] براث (5 %) نمک و 2 % سوکروز انتقال یافته و با سرعت 180 دور در دقیقه به مدت 48 ساعت گرما گذاری گردید. سپس محیط کشت‌های حاوی باکتری به مدت 30 دقیقه با سرعت 13000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شده، محلول صاف رویی جدا شده و با حجم معادل ایزوپروپانول مخلوط گردید. برای رسوب اگزو پلی ساکاریدها، مخلوط حاصل به مدت یک شبانه روز در دمای 4 درجه سانتیگراد نگه داشته شده، سپس مجدداً به مدت 30 دقیقه با سرعت 13000 دور در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب ته نشین شده جمع آوری گردید. رسوب حاصل دو بار با اتانول شسته و در مجاورت هوا، خشک شد و در نهایت مقدار اگزوپلی ساکارید اندازه‌گیری شد (آرورا و همکاران[3]، 2010).

### سنجش مقدار تولید اگزوپلی ساکارید

میزان اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط سویه‌ها به روش آنترون تعیین گردید ( مک کریدی و همکاران[4]، 1950). به این صورت که 4 ساعت قبل از انجام آزمایش محلول اسید سولفوریک 75% تهیه شد. در مرحله دوم محلول آنترون و الکل و سپس محلول 0/2 ٪ آنترون آماده شد. پس از آن در 6 تیوپ مرجع محلول‌های استاندارد تهیه شد که به ترتیب دارای 0، 20، 40، 60، 80، 100 میلی‌گرم بر لیتر گلوکز بودند. سپس 1میلی لیتر از عصاره حاوی اگزوپلی ساکارید، 5 میلی لیتر از محلول خنک آنترون اضافه شد. پس از قرار گرفتن به مدت 5 دقیقه در حمام آب یخ، به مدت 10 دقیقه در حمام آب جوش با دمای 100 درجه قرار گرفت، سپس مجدداً به حمام آب یخ منتقل شد. پس از خنک شدن کامل محلول، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 578 نانومتر اندازه‌گیری شد ( قدس و همکاران [5]، 2015).

### شناسایی سویه‌ها بر اساس مرفولوژی و خصوصیات بیوشیمیایی

برای شناسایی سویه برتر مقاوم به شوری و مولد اگزوپلی ساکارید، تهیه ی گسترش میکروبی و رنگ آمیزی گرم انجام شد. با توجه به مرفولوژی جدایه و نوع واکنش گرم، سایر تست‌های بیوشیمیایی نظیر اوره آز، تخمیر

---

1. Maximum Tolarable Concentration

2. Brain Heart Infusion

3. Arora et al.

4. McCready et al.

5. Ghods et al.

گلوکز، MR[1]، VP[2]، تخمیر مانیتول و تولید گاز، ایندول، لاکتوز، $H_2S$ انجام گرفت (کاپوچینو و شرمن [3]، 1996؛ کریگ و هولت[4]، 1989).

**شناسایی سویه‌ها بر اساس توالی ژن 16 S rDNA**

به منظور تکثیر ژن 16 s rDNA از پرایمرهای عمومی[5] (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 27F و (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT3') 1492R استفاده شد. برنامه PCR با استفاده از آنزیم تگ پلیمراز و به روش زیر انجام گرفت:

- دناتوراسیون اولیه در دمای 95 درجه سانتیگراد به مدت 4 دقیقه، به منظور جدا شدن دو رشته DNA الگو از یکدیگر
- 30 سیکل شامل 1 دقیقه دناتوراسیون در دمای 95 درجه سانتی گراد، 30 ثانیه در دمای 60 درجه سانتی گراد به منظور اتصال پرایمرها به توالی DNA و 35 ثانیه طویل سازی در دمای 72 درجه سانتی گراد
- طویل سازی نهایی در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه
- نگهداری در دمای 4 درجه سانتی گراد. (مادئونو و همکاران[6]، 2011).

همچنین به منظور نظارت بر کیفیت محصولات PCR، الکتروفورز آنها بر روی ژل 1 درصد انجام گرفت. نمونه‌های تهیه شده از محصولات PCR به شرکت تکاپوزیست با توجه به دستورالعمل آن شرکت ارسال شد. سپس تعیین توالی DNA حاصل بر اساس آنالیز مولکولی به کمک نرم افزار Blast در پایگاه NCBI[7] مورد بررسی قرار گرفته و تشابه آنها با اطلاعات موجود در GenBank مقایسه و ثبت گردید.

**بررسی تأثیر شوری بر میزان تولید اگزو پلی ساکارید**

به منظور بررسی تأثیر شوری بر میزان تولید اگزو پلی ساکارید سویه مورد نظر، استخراج اگزو پلی ساکارید در محیط کشتBHI براث با درصدهای مختلف نمک (5، 6، 7 و 8 %) صورت گرفت و مقدار اگزوپلی ساکارید تولید شده به روش آنترون اندازه‌گیری شد (آرورا و همکاران، 2010).

1. Methyl red
2. Voges-Proskauer Test
3. Cappuccino and Sherman
4. Krieg and Holt
5. Universal primers
6. Madueno et al.
7. National Center for Biotechnological Information

**تعیین ماهیت و شناسایی اگزوپلی ساکارید**

اگزوپلی ساکارید تولید شده از طریق طیف سنجی مادون قرمز[8]، یا FTIR که یک تکنیک تجزیه‌ای برای شناسایی مواد آلی ( در برخی موارد غیر آلی) می‌باشد، شناسایی شد. باندهای جذبی مادون قرمز، اجزا و ساختارهای مولکولی خاص را مشخص می‌نمایند. برای انجام این تکنیک 1 تا 2 میلی گرم پودر جاذب خشک شده توسط فریز درایر با 100 میلی گرم KBr سائیده شد و تحت فشار 7500 کیلوگرم به مدت 30 ثانیه قرار داده شد تا یک رسوب شفاف حاصل گردید. طیف‌های جذبی مادون قرمز توسط دستگاه FTIR با وضوح طیفی و دقت طول موج به ترتیب $4\ cm^{-1}$ و 0/01 ثبت گردید و از قرص KBr به عنوان رفرنس استفاده شد (مانکوسو وهمکاران[9]، 2004). طیف مادون قرمز فوریر (FTIR Spectrum)نمونه‌های مورد نظر با استفاده از دستگاه Perkin Elmer FTIR Spectrophotometer دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه گردید.

**پردازش داده‌ها**

برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS ورژن 20 و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. همچنین با استفاده از آزمون تحلیل واریانس معنی‌دار بودن میانگین‌ها بین تیمارهای مختلف بررسی شد و تفاوت ($p < 0/05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد و از آزمون تعقیبی دانکن برای مقایسه میانگین‌ها به صورت دوبه دویی بین تیمارهای مختلف استفاده گردید.

## نتایج

**ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک**

خاک نمونه‌برداری شده از ناحیه رودشت اصفهان برای جداسازی باکتری‌ها، دارای بافت لومی، پ هاش 8 و قابلیت هدایت الکتریکی 30/2 دسی‌زیمنس بر متر بوده است. نتایج برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و خاک نمونه‌بردار شده در جدول (1) ارائه شده است.

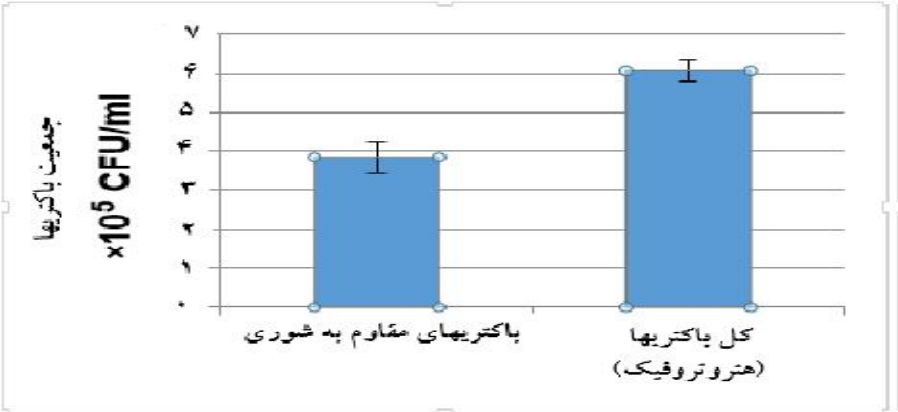
**شمارش باکتری‌ها**

نتایج شمارش باکتری‌های هتروتروف و شمارش باکتری‌های نمک دوست نشان داد که جمعیت کل باکتری-ها $6/05 \times 10^5$ CFUml $^{-1}$ بوده و 6/54 % از این تعداد مولد اگزوپلی ساکارید بودند و جمعیت باکتری‌های نمک دوست $4/05 \times 10^5$ CFUml $^{-1}$ بوده و از این تعداد 44/5 ٪ تولید کننده‌ی اگزوپلی ساکارید بودند. نتایج شمارش در شکل (1) ارائه شده است.

8. Fourier Transform Infrared Spectroscopy
9. Mancuso et al.

**جدول 1- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک**

| Na+ (meq/l) | SP ٪ | EC dS/m | pH عصاره | T.N.V % | OC % | N % | P a.v.a mg/kg | Gypsum % ($CaSo_4$) | Physical Tests | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | Sand% | Silt% | Clay% | Text |
| 760 | 47 | 30/2 | 8 | 31 | 0/59 | 0.06 | 348 | 5/7 | 49 | 40 | 11 | L |




**شکل1- جمعیت کل باکتری‌های هتروتروف و باکتری‌های مقاوم به شوری**

**جدول 2- حداکثر غلظت قابل تحمل نمک (MTC)[1] توسط سویه‌های جداسازی شده مولد اگزوپلی ساکارید**

| شماره باکتری | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نمک قابل تحمل(%) | 7 | 9 | 15 | 15 | 25 | 25 | 7 |
| توان تولید اگزوپلی ساکارید | - | - | + | + | + | + | - |

[1] Maximum Tolerable Concentration

**انتخاب باکتری‌های مولد اگزوپلی ساکارید مقاوم به شوری**

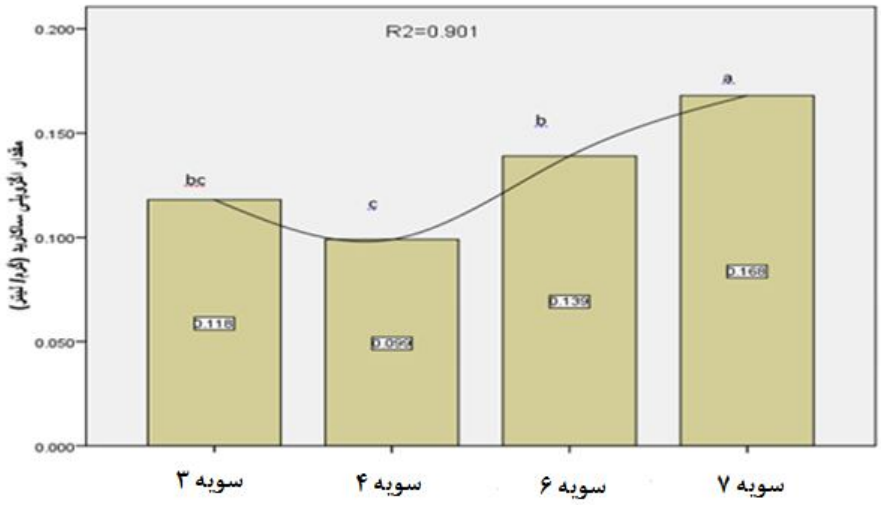
ابتدا از خاک شور 7 سویه مقاوم به شوری جداسازی شد که از میان آنها 4 سویه مولد اگزوپلی ساکارید بودند تحمل آنها نسبت به شوری سنجیده و به عبارتی حداکثر غلظت قابل تحمل نمک برای هر سویه تعیین شد (جدول 2). نتایج نشان داد باکتری‌های جدا شده، مقاوم به شوری بوده، دارای توان رشد در غلظت‌های مختلف نمک بودند. از میان جدایه‌های مقاوم به شوری مولد اگزوپلی ساکارید، سویه‌های 3 و 4 دارای توان رشد بر محیط حاوی (15-0%) نمک و سویه 6 دارای توان رشد در (15-1 %) و سویه 7 دارای توان رشد در (25-0 %) نمک بودند. لذا این جدایه‌ها جهت استخراج اگزوپلی ساکارید و تعیین مقدار آن در غلظت پایه (5 %) انتخاب شدند.

**انتخاب سویه با بالاترین توان تولید اگزوپلی ساکارید**

به منظور جداسازی سویه‌ای که دارای بیشترین توان تولید اگزوپلی ساکارید است، مقدار اگزو پلی ساکارید تولید شده توسط هر باکتری به روش آنترون تعیین گردید بر اساس نتایج آزمون تحلیل واریانس، سویه 7 با تولید 0/168 گرم در لیتر اگزوپلی ساکارید در مدت زمان 24 ساعت به عنوان سویه برتر تولید کننده‌ی اگزوپلی ساکارید، با تفاوت معنی‌دار ($P < 0/05$) از دیگر سویه ها انتخاب شد. برای محاسبه میزان تولید اگزو پلی ساکارید از معادله (1) استفاده شده است. نتایج در شکل (2) ارائه شده است.

معادله (1)

مقدار اگزو پلی ساکارید = 0/67 + 0/ 949 * باکتری




در نمودار حروف یکسان عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها را نشان می‌دهد.

**شکل 2- مقایسه میانگین میزان اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط سویه‌های مختلف مورد مطالعه در 5 % نمک**

**شناسایی سویه برتر**

شناسایی جدایه انتخابی طی دو مرحله صورت گرفت. در مرحله اول شناسایی باکتری با استفاده از نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی بر اساس سیستم طبقه‌بندی برگی[1] صورت گرفت جدول (3). در مرحله دوم با توجه به نتایج، برای شناسایی دقیق تر، از روش مولکولی تعیین توالی 16S rDNA استفاده گردید. مقایسه توالی ژن 16 S rDNA بدست آمده از سویه‌ی مورد نظر با توالی‌های بانک ژن نشان داد که این سویه دارای بالاترین شباهت (99%) با سویه *سیتروباکتر فروندی*[2] بوده و با عنوان *سیتروباکتر فروندی* ATHM38 و شماره دسترسی[3]، KX553903 در پایگاه NCBI ثبت شد.

[1]. Berrgey

[2]. *Citrobacter freundii*

[3]. Accession number

**جدول 3- تست‌های انجام شده جهت شناسایی سویه برتر**

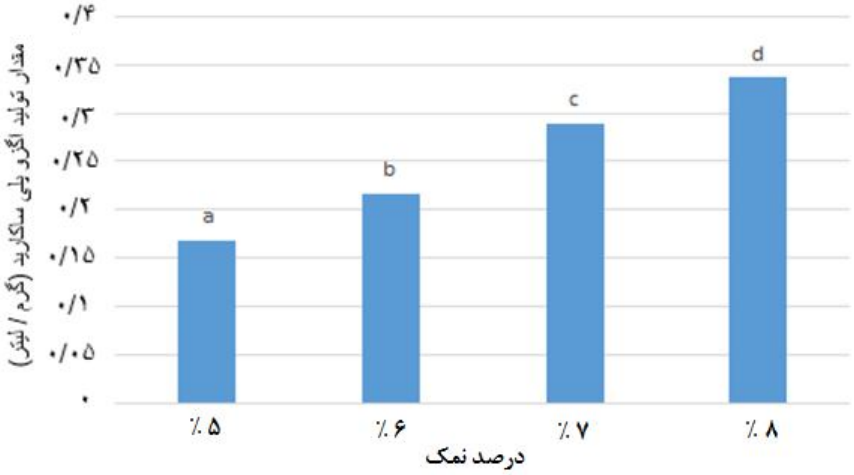
| تست | شکل | رنگ | سایز (میلیمتر) | واکنش گرم | تولید اسپور | کاتالاز | اکسیداز | مانیتول | لاکتوز |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + /- | میله ای | شیری | 1-2/5 | - | - | + | + | + | - |

| تست | اوره | ایندول | سیترات | حرکت | تولید $H_2S$ | MR | VP | TSI | گاز تولید | OF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + /- | - | - | + | - | + | + | - | A/A | _ | FA |

توضیح : FA : بی هوازی اختیاری، OA: هوازی اجباری، علائم(-) : عدم رشد، (+): رشد

**بررسی تأثیر شوری بر میزان تولید اگزوپلی ساکارید سویه برتر**

نتایج بررسی میزان تولید اگزوپلی ساکارید سویه مورد نظر در محیط کشت حاوی درصدهای مختلف نمک (8 - 5 %) نشان داد میزان تولید اگزوپلی ساکارید همراه با افزایش درصد نمک به طور معنی‌دار ( $P < 0/05$) افزایش یافت و بیشترین میزان اگزو پلی ساکارید در حضور 8% نمک تولید شد. (شکل3).

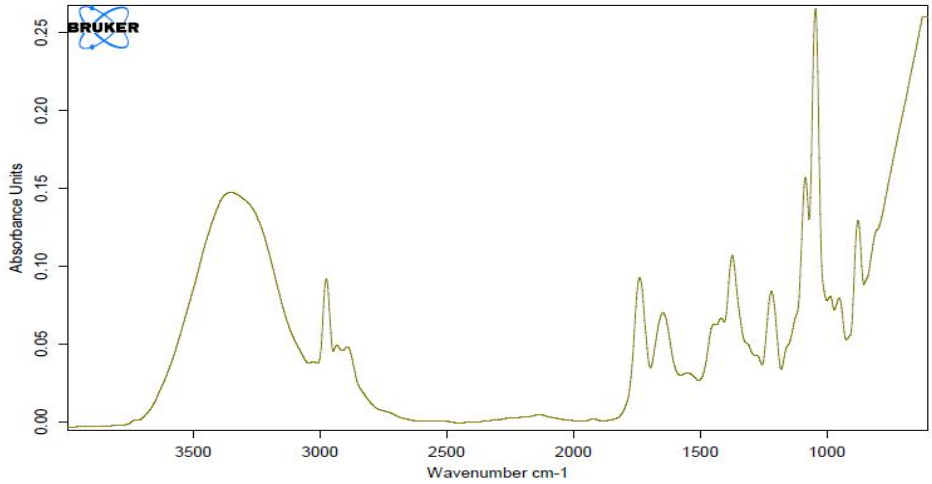



در نمودار حروف یکسان عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها را نشان می‌دهد.

**شکل3- مقایسه میانگین اثر شوری بر میزان تولید اگزوپلی ساکارید سویه مورد مطالعه**

**شناسایی گروه‌های عامل در ساختار اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط FTIR**

مطالعه طیف اگزو پلی ساکارید *سیترو باکتر فروندی* پیک $3200-3500Cm^{-1}$ مربوط به باندهای کششی (H- و OH-) الکل و فنول، پیک $3100Cm^{-1}$-3000 مربوط به باند کششی (C-H) آروماتیک، $Cm^{-1}$ 1760-1665 مربوط به باندهای کششی (C=O) کربونیل و کربوکسیلیک اسید، پیک $Cm^{-1}$ 1500-1400مربوط به باند کششی (C-C) آروماتیک، پیک $Cm^{-1}$ 1320-1000مربوط به باندهای کششی (C-O) الکل و کربوکسیلیک اسید و پیک $610-700Cm^{-1}$ مربوط به پیوند کششی (C-H) آلکنها را نشان داد (شکل 4).




**شکل 4- طیف مادون قرمز فوریه برای اگزوپلی ساکارید باکتری *سیترو باکتر فروندی***

## بحث

شوری خاک در تمام دنیا رو به گسترش بوده و یکی از مهم ترین چالش‌ها برای کشاورزی در جهان محسوب می‌شود. میکروارگانیسم‌های نمک دوست نقش مهمی در تبدیل زیستی و یا پاکسازی زیستی ترکیبات سمی فلزی در محیط‌های طبیعی ایفا می‌کنند و شناسایی سویه-های متحمل به غلظت‌های بالای این ترکیبات مرحله نخست در استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در فرآیندهای پاکسازی زیستی است (آموزگار و همکاران، 1386).

در تحقیق حاضر از خاک منطقه رودشت اصفهان جهت نمونه‌برداری استفاده شد، پس از انجام آزمایش‌های لازم جهت تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، شوری خاک (dS/m) 30/2 اندازه یری شد و با توجه به درجه‌بندی خاک‌های شور (الیاسی، 1381) این خاک جز دسته خاک‌های با شوری زیاد قرار گرفت لذا از آن، جهت جداسازی باکتری‌های مقاوم به شوری استفاده گردید. تعداد 7 سویه باکتریایی جدا شد که از میان این 7 سویه مقاوم به شوری، 4 سویه تولید کننده اگزوپلی ساکارید و دارای توان رشد در غلظت‌های مختلف نمک بودند.

بررسی میزان تولید اگزوپلی ساکارید سویه‌های مختلف در درصد نمک (5 %) نشان داد سویه *سیترو باکتر فروندی ATHM38* بیشترین میزان نمک را بطور معنی‌دار در مقایسه با دیگر سویه‌ها تولید کرد و میزان تولید اگزو پلی ساکارید این سویه همراه با افزایش نمک، افزایش یافت که علت آن را می‌توان به افزایش جرم مولکولی و انشعابات زنجیره ماکرومولکولی اگزوپلی ساکارید تولید شده تحت شرایط تنش شوری نسبت داد که باعث کاهش از دست دادن آب سلول‌ها و حفظ شرایط رشد سلول در شرایط تنش شده است (بری روا و همکاران،[1] 2005). چان و همکاران [2] (2012) نیز بیان کردند باکتری *سیترو باکتر فروندی* با تولید اگزو پلی ساکارید توانسته در مقابل مواد شیمیایی مضر موجود در محیط زیست از خود محافظت کند. اشرف و همکاران[3] (2005) نیز شاهد افزایش میزان تولید اگزو پلی ساکارید باکتری *هالوموناس وریابیلیس*[4] سویه (HT1) و *پلانوکوکوس ریفیتونسیس* سویه[5] (RT4) همراه با افزایش نمک بوده‌اند که با نتایج تحقیق حاضر همسو می‌باشد همچنین نتایج مشابهی در رابطه با نقش اگزو پلی ساکارید به عنوان یکی از مکانیسم-های سازگاری با شرایط تنش شوری توسط سایر محققان گزارش شده است (شنگ و همکاران[6] 2006؛کنفورا و همکاران[7]، 2014).

در این مطالعه جهت شناسایی گروه‌های عاملی در اگزو پلی ساکارید تولید شده، از طیف سنجی مادون قرمزاستفاده شد. در مطالعه طیف اگزو پلی ساکارید *سیترو باکتر فروندی* کشش‌های ارتعاشی مربوط به گروه‌های آروماتیک، کربونیل و کربوکسیلیک اسید و آلکنها مشاهده شد. آنیما و رقوان[8] (2014) در طیف مادون قرمز اگزو پلی پلی ساکارید *باسیلوس سوبتی لیس* ارتعاشات کششی باند H-N مربوط به آمین‌ها، باند C-O مربوط به آمیدها و

---

1. Breierova et al.
2. Chan et al.
3. Ashraf et al.
4. *Halomonas variabilis (HT1)*
5. Planococcus rifietoensis (RT4)
6. Sheng et al.
7. Canfora et al.
8. Anima and raghvan

الکل‌ها، باند H-O مربوط به استرها، باندهای C-H مربوط به آلکن‌ها و آلکین‌ها را مشاهده کردند. همچنین جیندال و همکاران[1] (2011) نیز به وجود گروه‌های عامل کربوکسیل در اگزوپلی ساکارید *سیانو باکتری اوسیلاتوریا فرموس*[2] اشاره کرده‌اند.

واضح است که شرایط زیست محیطی مختلف مانند پ هاش و استرس شوری و خشکی بر جمعیت باکتری‌ها اثر می‌گذارد. از کاربردهای مهم اگزو پلی ساکارید کاربرد آن در کشاورزی (حاصلخیزی خاک) و محیط زیست (زیست پالایی) می‌باشد (چونهای و همکاران[3]، 2010). املال و همکاران[4] (1999) اثر باکتری-باکتری‌های مولد اگزو پلی ساکارید روی خصوصیات فیزیکی ریزوسفر خاک را مورد بررسی قرار دادند نتایج نشان داده کلنیزاسیون متراکم ریزوسفر گندم همراه باکتری مولد اگزو پلی ساکارید با خاکدانه سازی و پایداری خاک چسبیده به ریشه همراه بوده است. در تحقیقات دیگر تأثیر اگزو پلی ساکارید بر جوانه‌زنی ذرت (نعمت و همکاران[5]، همکاران[5]، 2012) ، ذرت، گندم و برنج (آرورا و همکاران، 2010) تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داده جوانه‌زنی بذر در گیاهان همراه با کاربرد اگزو پلی ساکارید باکتریای بهبود یافته است. این باکتری‌ها در خاک شور اگزو پلی ساکارید بیشتری تولید کرده و باعث افزایش دانه بندی اطراف ریشه‌ی ذرت تلقیح شده در خاک شور نسبت به شاهد شده‌اند. همچنین این سویه‌های مقاوم به شوری به احتمال زیاد با افزایش اگزو پلی ساکارید و تجمع برخی از آنزیم‌ها مانند آمینو پپتیداز، اسید آمینه گلوتامات و بتائین به منظور تعدیل فشار اسمزی در سلول‌ها، شرایط نامساعد را تحمل کرده و به رشد خود ادامه داده‌اند و از طریق تولید اگزو پلی ساکاریدها و تشکیل کمپلکس با عناصر در خاک شور و کاهش اثر سمیت آنها همچنین افزایش جذب و نگهداری آب، سبب افزایش درصد جوانه‌زنی در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌ها شده‌اند. پس می‌توان اینطور نتیجه‌گیری کرد که تلقیح اگزوپلی ساکارید تولید شده از باکتری‌ها می تواند حاصلخیزی و بهره‌وری در خاک‌های متأثر از املاح شور را افزایش دهد.

## نتیجه‌گیری

از دستاوردهای این تحقیق جداسازی *سیترو باکتر فروندی* ATHM38 با توانایی رشد در غلظت‌های بالای نمک (25%) و تولید اگزو پلی ساکارید می‌باشد. با توجه به یافته‌های این تحقیق می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که باکتری‌ها با تولید اگزو پلی ساکارید با استرس شوری مقابله می‌کنند همچنین افزایش نمک باعث افزایش تولید اگزو پلی ساکارید باکتری‌ها می‌شود. اینطور به نظر می‌رسد که تولید اگزو پلی ساکارید نه تنها باعث حفظ سلول‌ها در برابر تنش شوری می‌شود بلکه به آنها کمک می‌کند تا سمیت سدیم را در خاک کاهش داده و در نتیجه رشد گیاه تحت تنش شوری را افزایش دهند.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه مسئولین محترم بخش خاک و بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (واحد خوراسگان) به دلیل فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این تحقیق، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

1. Jindal et al.
2. Oscillatoria formosa cyanobacterium
3. Chunhui et al.
4. Amellal et al.
5. Nemat et al.

## فهرست منابع:


1. الیاسی، خ. 1381. اصلاح خاک‌های شور و سدیمی (مدیریت خاک وآب). انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه واحد آذربایجان غربی. 320صفحه.
2. آموزگار، م ع؛ آشنگرف، م. و ملک زاده، ف. 1386. جداسازی باکتری‌های نمک دوست نسبی مقاوم به تلوریت از مناطق مختلف ایران و اثر شوری و نمک‌های سلنیوم بر روی این مقاومت. نشریه محیط شناسی. ج 33، ش 41، ص 24-17.
3. زنجیربند، م. 1385. جداسازی و شناسایی بعضی از باکتری‌های نمک دوست و بررسی اثر برخی عوامل مؤثر بر رشد آنها. پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان.
4. تمرتاش؛ ر، شکریان، ف. و کارگر، م. 1389. بررسی تأثیر تنش شوری وخشکی بر ویژگی جوانه زنی بذر شبدر برسیم. مجلهٔعلمی پژوهشی مرتع. ج 4، ش 2، ص 288-297 .
5. کفیلزاده؛ ف، جاوید، ح. و کارگر، م. 1386. جداسازی میکروارگانیسم‌های هالوفیل و هالوترانت از دریاچه بختگان و اثر فاکتورهای فیزیکی – شیمیایی بر فراوانی آنها. مجله آب و فاضلاب. ج 18، ش 3، ص 81-87.
6. ناهیدان، ص. و نوربخش، ف. 1388. تأثیر تاریخچه مدیریت کربن آلی بر برخی از خصوصیات بیولوژیکی خاک. مجموعه مقالات یازدهمین کنگره علوم خاک ایران، گرگان، 23-21 تیر. صفحه : 85-86.
7. ساغروانی؛ ف، محمدیون، س. و محمدیون، ا. ح. 1390. نقش جاذب‌های پلی ساکاریدی در کاهش خطرات زیست محیطی فاضلاب‌های صنعتی. پنجمین همایش تخصصی مهندسی محیط زیست، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده محیط زیست.
8. Amellal, N., Bartoli, F., Villemin, G., Talouizte, A. and Heulin, T. 1999. Effects of inoculation of EPS producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. Plant and Soil. 211: 93-101.
9. Anima, N. and Raghvan, C.M. 2014. Production and characterization of exopolysaccharides from the bacteria isolated from pharma lab sinks. International Journal of Pharmtech Research. 6(4):1301-1305.
10. Arora, M., Kaushik, A., Rani, N. and Kaushik, C.P. 2010. Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination. *Journal* of *Environmental Biology*. 31(5): 701-704.
11. Ashraf, M., Hasnain, S. and Hussain, F. 2005. Exopolysaccharides (exopolysaccharide) producing biofilm bacteria in improving physicochemical characteristics of the salt affected soils. Proceedings of the International Conference on Environmentally Sustainable Development.
12. Breierova, E., Hromadkova, Z., Stratilova, E., Sasinkova, V. and Ebringerova, A. 2005. Effect of salt stress on the production and properties of extracellular polysaccharides produced by Cryptococcus laurentii. Zeitschrift Fur Naturforschung C. 60(5-6):444-50.
13. Canfora, L., Bacci, G., Pinzari, F., Lo Papa, G., Dazzi, C. and Benedetti, A. 2015. Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil. Applied Soil Ecology. 93: 120–129.
14. Cappuccino, J. and Sherman, N. 1996. Microbiology (a laboratory manual). 1th edn, New York: Benjamin, Cumming Publishing Company INC.
15. Chan, G.F., Noor Aini, A.R., Lee suan, C., Noor zarini, A.l., Nasiri, R. and Ikubar, M.R. 2012. Communal microaerophilic-aerobic biodegradation of Amaranth by novel NAR-2 bacterial consortium. *Bioresource Technology*. 105:48 –59.
16. Chunhui, L., Lu, J., Lu, L., Liu, L., Wang, F. and Xiao, M.۲۰۱۰ . Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis*8-37-0-1. Bioresource Technology. 101: 5528–5533.

17. Ghods, S., Sims, I.M., Moradali, M.F. and Rehm, B.H.A. 2015. Bactericidal compounds growth of the plant pathogen Pseudomonas syringae pv. Actinidiae, which forms biofilms composed of a novel exopolysaccharide. Applied and Environmental Microbiology. 81: 4026- 4036.
18. Jindal, N., Singh, D.P. and Khattar, J.I.S. 2011. Kinetics and physico-chemical characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Oscillatoriaformosa*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 27: 2139-2146.
19. Kreig, N. and Holt, J.G. 1989. Bergey s manual of systemic bacteriology. 2th edn, New York : Williams and Wilkins, 722 p.
20. Larpin, S., Sauvageot, N.S., Pichereau, V., Laplace, J.M. and Auffray, Y.k. 2002. Biosynthesis of Exopolysaccharide by Bacillus licheniformis Strain Isolated from Ropy Cider. International Journal of Food Microbiology. 77:1-9.
21. Looijesteijn, P.L., Trapet, L., De Vries, E., Abee, T. and Hugenholtz, J. 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *lactococcus lactis*. International Journal of Food Microbiology. 64:71-80.
22. Madueno, L., Coppootelli, B.M., Alvarez, H.M. and Morelli, I.S. 2011. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. International Biodeterioration and Biodegradation. 65: 345-351.
23. Mancuso Nichols., C.A., Garon, S., Bowman, J.P., Raguenes, G. and Guezennec, J. 2004. Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. Journal of Applied Microbiology. 96(5): 1057-1066.
24. Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology.Extremophiles. 5:73–83.
25. McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H.S. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. Analytical chemistry. 22: 1156-1158.
26. Nemat, M.A., Azza, S.T., Magdi, T.A. and Magdy, A. 2012. Ameliorate of Environmental Salt Stress on the Growth of Zea mays L. Plants By Exopolysaccharides Producing Bacteria. Journal of Applied Sciences Research. 8(4): 2033-2044.
27. Sheng, G.P., Yu, H.Q. and Yue, Z. 2006. Factors influencing the production of extracellular polymeric substances by *Rhodopseudomonas acidophila*. International Biodeterioration & Biodegradation. 58: 89-93.
28. Welman, A.D. and Maddox, I.S. 2009. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biotechnology. 21(6): 268-274.

# Isolation and identification of indigenous saline soil exopolysaccharide-producing bacteria

**F. Moshabaki Isfahani[1], A. Tahmoorespour, M. Hoodaji, M. Ataabadi and A. Mohamadi**

PhD student of Department of Soil Science, Islamic Azad University of Isfahan, Khorasgan Branch; E-mail: Faranakmoshabaki@yahoo.com

Associate Professor of Microbiology, Department of Basic Medical Sciences, Isfahan Islamic Azad University Khorasgan Branch; E-mail: A.tahmoures.p@gmail.com

Professor, Department of Soil Science, Isfahan Islamic Azad University Khorasgan Branch; E-mail: Mehran.hoodaji1@gmail.com

Assistant Professor, Department of Soil Science, Isfahan Islamic Azad University Khorasgan Branch; E-mail: Mitra_ataabadi@yahoo.com

Associate Professor, Department of Soil Science, Isfahan Islamic Azad University Khorasgan Branch; E-mail: mghehsareh@yahoo.com

Received: Sptember, 2016 & Accepted: July, 2017

**Abstract**

Exopolysaccharides secreted by bacteria has an important role in bacterial resistance against stresses such as salinity. This study aimed to isolate and identify halotolerant bacteria with the most exopolysaccharide production potential of the soil and evaluate the production of exopolysaccharides in different salt concentrations. Soil samples were spread on nutrient agar ± %5 NaCl then among the salt tolerant colonies, the most tolerable salt concentration (MTC) of mucoid ones was isolated and the EPS production in the presence of (5%) salt concentrations was assayed. The nature of exopolysaccharide produced by superior strain was identified with FTIR Spectrometer and the exopolysaccharides production in higher concentrations of salt were determined by anthrone-sulfuric acid method. In the infrared spectrum of exopolysaccharide, the absorption peaks were attributed to the presence of carbohydrate compounds such as β-glucans and also to alcohol groups, phenols, carboxylic acids, carbonyl and alkyne. The exopolysaccharide production was significantly (Pvalue < 0.05) increased by increasing salt stress. According to the results, the strain no-7 with growth potential on the 25% salt and producing exopolysaccharides (0.168 g /L) in 24 hours was selected as a superior strain and according to 16S rDNA gene sequencing was identified as *Citrobacter freundii* ATHM38 and submitted to GenBank under the accession number KX553903.

**Keywords:** Exopolysaccharide, *Citrobacter freundii*, Salinity.

[1.] Corresponding author: Isfahan, Isfahan Islamic Azad University Khorasgan Branch